

Carla Maria Ribeiro Ferreira

**Otimização da síntese para obtenção de *Lapdesf ibu-tau* e
ibu-ftd e ensaio de toxicidade pré-clínica dose única
(aguda) e doses repetidas em camundongos**

Araraquara - SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Otimização da síntese para obtenção de *Lapdesf ibu-tau* e *ibu-ftd* e ensaio de toxicidade pré-clínica dose única (aguda) e doses repetidas em camundongos

Carla Maria Ribeiro Ferreira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista
para obtenção do grau de Farmacêutica-
Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Chung Man Chin

Araraquara – SP

2014

*“Quem sabe concentrar-se numa coisa e insistir nela como único objetivo, obtém,
ao fim e ao cabo, a capacidade de fazer qualquer coisa.”*

Mahatma Gandhi

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por todo apoio financeiro ao projeto, e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, pela infraestrutura necessária ao desenvolvimento do projeto.

À Profa. Dra. Chung Man Chin, pela orientação do projeto, me auxiliando e ensinando durante o processo todo, sendo um exemplo a ser seguido. Ao Dr. Ednir de Oliveira Vizioli, pelo auxílio durante todas as etapas do projeto e todo treinamento necessário.

Ao Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade, pelo suporte a toda parte de análise histopatológica e análise dos resultados.

À Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini, por ceder o espaço do laboratório de Toxicologia para realização dos ensaios bioquímicos e ao Ms. Elias Carvalho Padilha por todo suporte na parte bioquímica e análise dos resultados.

Ao Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, por me auxiliar com relatórios e estar sempre disposto a ajudar.

Aos colegas do laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos (LAPDESF), do laboratório de Farmacognosia e do laboratório de Toxicologia que de alguma forma contribuíram com o projeto.

À minha família, Claudiceia, Carlos e Marcos, que apesar das divergências estão sempre me apoiando, e em especial aos meus avós Claudina e Ariovaldo, que estariam radiantes neste momento.

Ao apoio que recebi durante toda trajetória do projeto que sempre me levou a continuar e aprender e em especial o apoio e carinho em todas as ocasiões durante esses anos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1. Processo inflamatório e necessidade de novos fármacos com atividade anti-inflamatória.....	12
2. A importância dos estudos de toxicidade.....	16
3. Objetivos.....	16
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
1. Reagentes e Solventes.....	17
2. Preparação dos compostos de ibuprofeno.....	18
1. Síntese do híbrido <i>Lapdesf ibu-ftd</i> (N-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)-2-(4-isobutilfenil)propanamida).....	18
2. Síntese do híbrido <i>Lapdesf ibu-tau</i> (ácido 2-[[2-(4-isobutilfenil)propanoil] amido} etanosulfônico).....	20
3. Métodos analíticos.....	23
4. Ensaio toxicológicos, bioquímicos e histológicos.....	23
1. Ensaio toxicológicos.....	24
2. Ensaio bioquímicos.....	27
1. Análise estatística.....	28
3. Ensaio histológicos.....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
1. Síntese do híbrido <i>Lapdesf ibu-ftd</i>	30
1. Análise por espectroscopia na região do infravermelho.....	33
2. Análise por faixa de fusão.....	38
2. Síntese do híbrido <i>Lapdesf ibu-tau</i>	39
1. Análise por espectroscopia na região do infravermelho.....	42

2. Análise por faixa de fusão.....	46
3. Ensaio Biológicos.....	47
1. Acompanhamento comportamental e Letalidade.....	47
2. Análise ponderal e Avaliação do consumo de água e ração.....	54
3. Análise bioquímica do sangue.....	59
4. Análise histopatológica.....	68
4. CONCLUSÃO.....	77
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
6. APÊNDICES.....	87
7. DADOS FINAIS.....	90

RESUMO

A inflamação é basicamente uma resposta de proteção tissular cuja função é proteger o organismo de micro-organismos e toxinas que promovem a lesão celular. A resposta inflamatória gera o aparecimento dos quatro sinais cardinais dor, edema, calor e rubor podendo posteriormente ocorrer a perda de função do tecido ou órgão. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) promovem sua atividade alterando a atividade de prostaglandinas (PGs), por inibição das isoformas de ciclo-oxigenases constitutivas (COX1) e induzidas (COX2). A inibição não seletiva destas enzimas (por AINEs clássicos) gera reações adversas graves, como as reações gastrointestinais, em pacientes pré-dispostos e/ou que as utilizam por um período prolongado. Os AINEs de segunda geração (inibidores seletivos de COX2), também se mostraram tóxicos, podendo causar alterações cardiovasculares. Neste sentido, o planejamento de novos compostos com atividade anti-inflamatória e destituídos de toxicidade ainda é um desafio para a química farmacêutica e medicinal. Dois derivados de ibuprofeno (AINE clássico) foram obtidos anteriormente no Lapdesf por Castro (2008) e Vizioli (2006), demonstrando atividade anti-inflamatória em modelo de inflamação aguda (edema de pata) e crônica (colite ulcerativa), destituídos de gastroulceração (VIZIOLI, 2009). Diante destes resultados o presente estudo visou à preparação dos compostos e o estudo pré-clínico de toxicidade em dose única (aguda) e em doses repetidas em camundongos, bem como as análises comportamentais, histopatológicas dos órgãos e ensaios bioquímicos.

Os achados comportamentais, bioquímicos e histopatológicos permitem concluir que não foi observada toxicidade nos modelos estudados, exceto para o grupo de administração dose única de 2000 mg/kg via intraperitoneal do composto *Lapdesf ibu-tau*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Síntese composto <i>Lapdesf ibu-ftd</i>	18
Figura 2	Síntese composto <i>Lapdesf ibu-tau</i>	20
Figura 3	Síntese modificada composto <i>Lapdesf ibu-tau</i>	21
Figura 4	Espectro de absorção no infravermelho <i>Lapdesf ibu-ftd</i> (KBr).....	34
Figura 5	Espectro de absorção infravermelho ibuprofeno (KBr).....	36
Figura 6	Espectro de absorção no infravermelho anidrido ftálico (KBr).....	37
Figura 7	Espectro de absorção infravermelho taurina (KBr).....	43
Figura 8	Espectro de absorção infravermelho padrão <i>Lapdesf ibu-tau</i> (KBr).....	44
Figura 9	Espectro de absorção no infravermelho <i>Lapdesf ibu-tau</i> (KBr).....	45
Figura 10	Lâminas da análise histopatológica (coradas por H.E.).....	73
Figura 11	Lâminas da análise histopatológica animal encontrado morto do grupo <i>Lapdesf ibu-tau</i> dose única de 2000 mg/kg administrado intraperitonealmente (coradas por H.E.).....	74
Figura 12	Lâminas da análise histopatológica animal encontrado morto do grupo <i>Lapdesf ibu-ftd</i> dose única de 2000 mg/kg administrado intraperitonealmente (coradas por H.E.).....	75
Figura 13	Lâminas da análise histopatológica do grupo ibuprofeno doses repetidas de 620 mg/kg (equimolar à dose 1000 mg/kg do composto <i>Lapdesf ibu-tau</i>) administrado por gavagem (coradas por H.E.).....	76

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Valores I.V. <i>Lapdesf ibu-ftd</i>	35
Tabela 2	Valores I.V. ibuprofeno.....	36
Tabela 3	Valores I.V. anidrido ftálico.....	37
Tabela 4	Valores I.V. taurina	43
Tabela 5	Valores I.V. padrão <i>Lapdesf ibu-tau</i>	45
Tabela 6	Valores I.V. <i>Lapdesf ibu-tau</i>	46
Quadro 1	Principais bandas determinantes para confirmação da obtenção do produto <i>Lapdesf ibu-ftd</i> (pastilha KBr).....	34
Quadro 2	Principais bandas determinantes para confirmação do <i>Lapdesf ibu-tau</i> com os padrões (pastilha KBr).....	42
Quadro 3	Observações comportamentais e média da frequência observada no Grupo Controle Negativo (n = 4).....	48
Quadro 4	Observações comportamentais e média da frequência observada com administração de dose única do composto <i>Lapdesf ibu-tau</i> por via oral (gavage).....	49
Quadro 5	Observações comportamentais e média da frequência observada com administração de dose única do composto <i>Lapdesf ibu-ftd</i> por via oral (gavage).....	49
Quadro 6	Observações comportamentais e média da frequência observada com administração de dose única do composto <i>Lapdesf ibu-tau</i> por via intraperitoneal.....	50
Quadro 7	Observações comportamentais e média da frequência observada com administração de dose única do composto <i>Lapdesf ibu-ftd</i> por via intraperitoneal.....	51

Quadro 8	Observações comportamentais e média da frequência observada com administração de doses repetidas (10 dias) do composto <i>Lapdesf ibu-ftd</i> por via oral (gavage).....	52
Quadro 9	Observações comportamentais e média da frequência observada com administração de doses repetidas (10 dias) do composto <i>Lapdesf ibu-tau</i> por via oral (gavage).....	53
Quadro 10	Observações comportamentais e média da frequência observada no grupo ibuprofeno doses repetidas de 620 mg/kg (equimolar à dose 1000 mg/kg do composto <i>Lapdesf ibu-tau</i>) administrado por gavage (n = 6).....	54
Quadro 11	Consumo de água e ração dos ensaios de toxicidade.....	56
Quadro 12	Evolução ponderal (em gramas) dos camundongos machos tratados com os compostos híbridos de ibuprofeno, dos grupos controle (salina) e do grupo padrão (ibuprofeno) & peso relativo do fígado nos ensaios de toxicidade doses repetidas.....	58
Quadro 13	Resultados análise bioquímica do sangue dos Ensaios de Toxicidade dose única e doses repetidas dos híbridos de ibuprofeno, comparados estatisticamente com grupo controle (salina).....	63
Quadro 14	Parâmetros Bioquímicos - Valores de referência literatura.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
Lapdesf	Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
MIPs	Medicamentos isento de prescrição
AA	Ácido aracdônico
COX	Ciclo-oxigenases
PG	Prostaglandinas
TX	Tromboxanos
LTC	Leucotrienos
TGO	Transaminase Glutâmica Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmica Pirúvica
GGT	Gama Glutamil Transferase
ALP	Fosfatase alcalina
IV	Infravermelho
DEPC	Dietilcianofosfonato
DMF	Dimetilformamida
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
NaOH	Hidróxido de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
HE	Hematoxilina eosina
NOEL	No Observed Effect Level
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level

1. INTRODUÇÃO

1.1. Processo inflamatório e necessidade de novos fármacos com atividade anti-inflamatória

Os agentes anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são os fármacos amplamente prescritos e usados em todo o mundo, desde a produção do ácido acetilsalicílico pela Bayer em 1899 (VANE & BOTTING, 1998; CARVALHO *et al*, 2004). Atualmente há mais de 50 AINEs diferentes no mercado global, sendo o ibuprofeno um dos mais utilizados dentre os medicamentos isentos de prescrição (MIPs) (RANG & DALE, 2011; WILCOX, 2005).

O processo inflamatório sempre recebeu um grande destaque na ciência por ser o primeiro sinal biológico em qualquer estado de anormalidade, tanto fisiológica, por quebra da homeostasia, quanto patológica, como em casos de lesões e infecções, sendo caracterizada por aumento na permeabilidade capilar, extravasamento de proteínas plasmáticas e recrutamento de células polimorfonucleares no tecido afetado (MEDZHITOV, 2008; GABRIEL & MATTESON, 1995).

A resposta inflamatória tem papel fundamental na manutenção da homeostasia, no entanto a exacerbação e/ou persistência desse processo pode conduzir à uma resposta crônica, devido ao dano tecidual através de mediadores inflamatórios e processos líticos. Na literatura é sugerido que o processo crônico é originado por desordem na resposta dos fibroblastos para controlar o quadro inflamatório, levando a retenção e sobrevivência inadequada de polimorfonucleares no tecido lesionado (BUCKLEY, 2001; DE MELO, 2014).

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) possuem um impacto positivo sobre a qualidade de vida do paciente, por incorporar benefícios como a melhoria de dores musculoesqueléticas, e em algumas doenças que são acompanhadas da cronicidade

inflamatória como a artrite reumatoide. No entanto, a maioria dos AINEs é eficaz para alívio de sintomas pontuais em doenças crônicas, melhorando a qualidade de vida dos pacientes, no entanto, existem riscos no tratamento que acarretam efeitos colaterais severos que podem atuar contrário à esta melhora (GABRIEL & MATTESON, 1995; SCARPIGNATO, 2010).

No processo inflamatório, os lipídeos presentes na membrana celular são biologicamente convertidos em sinalizadores, que se decompõem depois de cessado o estímulo (SERHAN, HAAEQSTROM & LESLIE, 1996).

O ácido araquidônico (AA) ou 5,8,11,14-ácido eicosatetraenóico, é oriundo de fontes alimentares e da conversão do ácido linoleico (Ômega 6), não se apresenta livremente intracelular (citoplasma), sendo esterificado em fosfolipídios de membrana. É liberado pela ação da fosfolipase A2 por estímulos mecânicos, químicos, físicos ou ainda por outros mediadores como o sistema complemento (BOGATCHEVA *et al.*, 2005; ROLAND *et al.*, 2004).

Na chamada cascata do AA os seus metabólitos são sintetizados por duas principais vias enzimáticas, as ciclo-oxigenases (COX) que geram prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX), e as lipoxigenases produzindo leucotrienos (LTC) e lipoxinas. A primeira pode ser inibida por AINEs e a segunda com corticoides que irão inibir toda a cascata do AA, por inibição da fosfolipase A2 (JAWABRAH AL-HOURANI, *et al.*, 2011; RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011).

A ação primária dos AINEs é, então, de inibir a enzima COX de ácidos graxos e, deste modo, inibir a produção de PG e TX. Existem duas classes de anti-inflamatórios: os clássicos, os quais são inibidores das isoformas COX-1 e COX-2, variando no grau de inibição de cada isoforma; e os coxibes, que são mais seletivos para isoforma 2. Os efeitos farmacológicos destes compostos são mais relacionados à inibição da

COX-2, enquanto os efeitos indesejáveis, em especial os gastrointestinais, são resultados principalmente da inibição da COX-1 (FIORUCCI & DISTRUTTI, 2011; RANG & DALE, 2011).

Os AINEs, porém, ao alterar a atividade das prostaglandinas, inibindo as isoformas de ciclo-oxigenases constitutivas (COX-1) e induzidas (COX-2), geram reações adversas graves em pacientes pré-dispostos e/ou que os utilizam por um período prolongado. Entre os perigos do uso, encontram-se as reações gastrointestinais como dispepsia severa, úlceras duodenais e gástricas com complicações que promoveram a hospitalização, realização de procedimentos cirúrgicos e até mesmo a morte. (GABRIEL & MATTESON, 1995).

O ibuprofeno é amplamente utilizado como analgésico e anti-inflamatório, sendo relativamente seguro aprovado e indicado para uso em crianças. É um AINE tradicional, derivado do ácido propiônico, inibidor não-seletivo de COX, apresentando meia-vida curta (2-4 horas), com alta ligação às proteínas plasmáticas (99%). É considerado equipotente e bem mais tolerado em comparação ao ácido acetilsalicílico e é o AINE tradicional mais comumente usado nos Estados Unidos da América (GOODMAN & GILMAN, 2012). Os efeitos adversos no humano incluem distúrbios do trato gastrintestinal, além de distúrbios oculares, dermatite, aumento de temperatura corporal, hepatite, reações alérgicas envolvendo múltiplos órgãos, e diplopia.

Efeitos do trato gastrintestinal como dor abdominal, erosão/úlceras gástricas e hemorragia GI são efeitos colaterais comuns frequentes dos AINEs tradicionais. Além destes temos efeitos adversos que englobam o sistema nervoso central, como cefaleia, vertigem, tonturas e confusão, e também efeitos adversos relativos ao sistema cardiovascular, podendo a ter ocorrência de trombose, AVC e infarto do miocárdio. (GOODMAN & GILMAN, 2012).

Os AINEs possuem efeitos sobre o sistema renal devido ao bloqueio da síntese de produtos da COX do ácido araquidônico, sendo que estes possuem função importante na hemodinâmica renal, na liberação de renina e no controle da função tubular (BURTIS *et al*, 2008).

Ensaio de toxicidade pré-clínica determinaram que a DL₅₀ em camundongos por administração oral é de 740 mg/kg, e por administração intraperitoneal é de 320 mg/kg, sendo observado na DL₅₀ por via intraperitoneal, efeitos gastrointestinais de ulceração ou sangramento do estômago e comportamentais de alteração no tempo de sono, incluindo mudanças do reflexo de endireitamento (LEWIS, 1992; ADAMS *et al*, 1969).

A disfunção renal quimicamente induzida pelo ibuprofeno é dependente da dose e duração da exposição (YODA & KODA-KIMBLE, 1995). O ibuprofeno é caracterizado como um AINE com um perfil de alta segurança e baixa incidência de toxicidade hepática. Com a administração de ibuprofeno em baixas doses ou em terapia crônica, as elevações séricas das aminotransferases são comparáveis ao ensaio placebo, já quando são administradas altas doses em regime de 2400 a 3200 mg/dia ocorre maior elevação da ALT. Geralmente as elevações da ALT não ultrapassam 100 UI/L, sendo que alterações leves ou moderadas da AST e ALT são observadas com a administração de diversos AINEs (BESSONE, 2010; BURTIS *et al*, 2008).

O planejamento de novos fármacos com potencial atividade anti-inflamatória e/ou com redução dos efeitos tóxicos inerentes ao mecanismo de ação é sustentado pela ampla utilização no tratamento de patologias, cujos processos de base permeiam pela resposta inflamatória (VIZIOLI, 2009).

Dois derivados de ibuprofeno foram obtidos anteriormente no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos (Lapdesf), tendo sido observado atividade

anti-inflamatória em modelo de inflamação aguda (edema de pata induzida por carragenina) e crônica (colite ulcerativa induzida por ácido acético), sem demonstrar efeitos adversos comuns aos AINEs. (VIZIOLI, 2009).

1.2. A importância dos estudos de toxicidade

A continuidade dos estudos para avaliação clínica de candidatos a fármacos são dependentes dos resultados de toxicidade pré-clínica. Os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração (ANVISA, 2010).

Os estudos de toxicidade de doses repetidas têm como objetivo, caracterizar o perfil toxicológico da substância pela administração repetida. A partir deles é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos nas funções fisiológicas, hematológicas, bioquímicas, anatomo e histopatológicas, além de informações sobre a indicação do NOEL (No Observed Effect Level) e NOAEL (No Observed Adverse Effect Level).

1.3. Objetivos

O presente trabalho visa à continuidade dos estudos dos compostos candidatos à fármacos, com a realização dos ensaios toxicológicos, de acordo com o *Guia para a Condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos ANVISA* (2010), para avaliação inicial de sua segurança.

Os objetivos específicos dessa pesquisa com os híbridos de ibuprofeno são:

- Preparação e otimização da síntese de *Lapdesf ibu-ftd* (*N*-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)-2-(4-isobutilfenil) propanamida);
- Preparação e otimização da síntese de *Lapdesf ibu-tau* (ácido 2-[[2-(4-isobutilfenil) propanoil] amido} etanosulfônico);
- Ensaio de toxicidade com dose única (aguda);
- Ensaio de toxicidade com doses repetidas;
- Análise histopatológica dos órgãos: rins, fígado, estômago, pulmão e coração;
- Exames bioquímicos: Transaminase Glutâmica Oxalacética (TGO), Transaminase Glutâmica Pirúvica (TGP), Gama Glutamil Transferase (GGT), Creatinina e Uréia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes e solventes

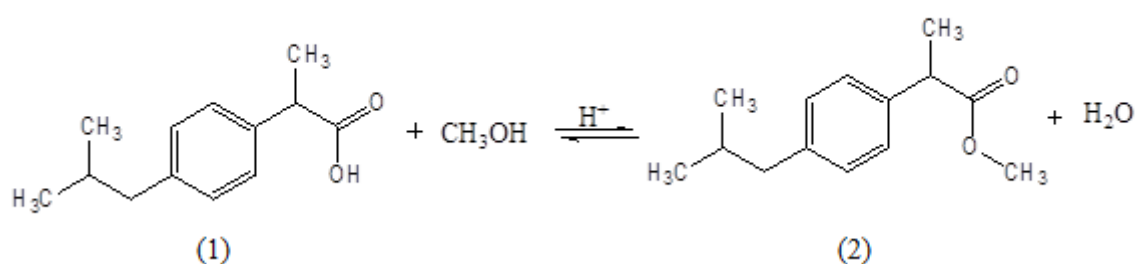
Acetato de etila P.A. (Synth), ácido acético glacial P.A. (J. T. Baker); ácido sulfúrico P.A. (Merck); anidrido ftálico (J. T. Baker); bicarbonato de sódio (Synth); clorofórmio (Synth); diclofenaco (Galena); diclorometano P.A. (Synth); dietilcianofosfanato – DEPC (Sigma); hidrato de hidrazina 25% (J. T. Baker); hidróxido de sódio (Synth); sulfato de sódio anidro (Synth); metanol P.A. (Merck); ibuprofeno (Galena); taurina (Deg); 1-hidroxibenzotriazol – HOBt (Sigma); N,N'-diisopropilcarbodiimida – DIC (Sigma).

2.2. Preparação dos compostos de ibuprofeno

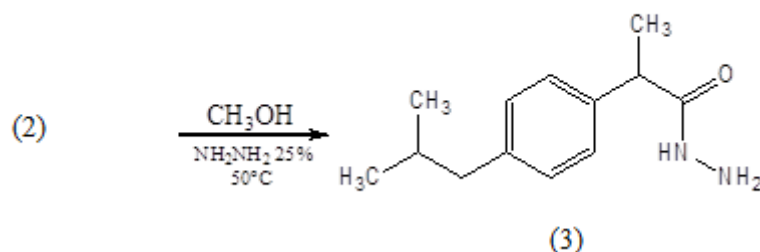
A metodologia do preparo dos compostos de ibuprofeno utilizada foi baseada na descrita por Castro (2008) e Vizioli (2006), com modificações propostas durante o projeto.

2.2.1. Síntese do híbrido *Lapdesf ibu-ftd* (N-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)-2-(4-isobutilfenil) propanamida)

OBTENÇÃO DO 2-(4-ISOBUTILFENIL)PROPANOATO DE METILA



OBTENÇÃO DO 2-(4-ISOBUTILFENIL)PROPANOHIDRAZINA



OBTENÇÃO DO N-(1,3-DIOXO-1,3-DIIDRO-2H-ISOINDOL-2-IL)-2-(4-ISOBUTILFENIL)PROPANAMIDA

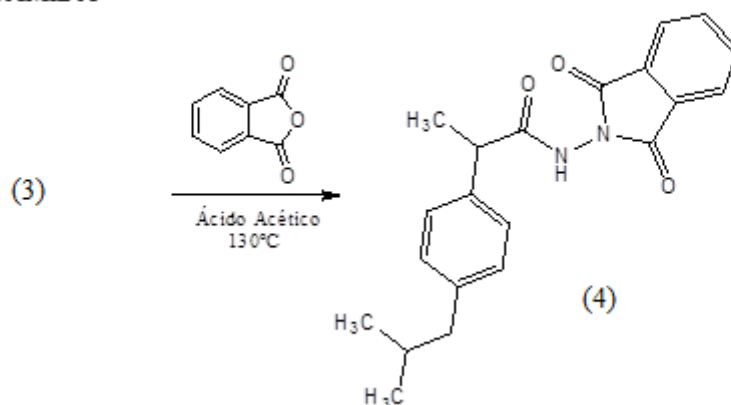


Figura 1: Síntese composto *Lapdesf ibu-ftd*

➤ **Metodologia sintética descrita por Castro (2008)**

Reagiu-se 1,45 mmol (320 mg) de ibuprofeno com 20 mL de metanol e ácido sulfúrico concentrado (2 gotas), sob agitação, à temperatura ambiente por 24 horas. O solvente foi evaporado por pressão reduzida para se obter um sólido branco.

Reagiu-se 1,45 mmol de 2-(4-isobutilfenil) propanoato de metila com 20 mL de metanol e 10 mL de hidrato de hidrazina a 25%, sob agitação a 50°C por 24 horas. Após o qual foi adicionado cerca de 4 mL de gelo. O precipitado é filtrado e lavado com água gelada.

Reagiu-se 1,45 mmol de 2-(4-isobutilfenil) propanohidrazida com 1,45 mmol de anidrido ftálico e 7 mL de ácido acético glacial, em refluxo por 5 horas. Após o qual foi resfriado e neutralizado (pH = 7) com solução de NaOH 20%. O precipitado formado foi filtrado e lavado com água.

➤ **Metodologia modificada**

Em balão de 125 mL, adicionou-se 320 mg de ibuprofeno com 20 mL metanol e 2 gotas de ácido sulfúrico. A mistura foi mantida sob agitação, em refluxo acoplado à agente secante, à temperatura ambiente por 24 horas. O solvente foi evaporado em temperatura ambiente por pressão reduzida para se obter um líquido viscoso incolor, com rendimento de 100%.

Em balão de 250 mL, sob refluxo, foram adicionados 0,64g do líquido viscoso (éster de ibuprofeno), 25 mL metanol e 15 mL hidrato de hidrazina 25%. A reação foi mantida a 45-50°C, sob agitação, por 24 horas. O isolamento reacional foi feito reduzindo o volume de solvente, e adicionando em seguida cerca de 4 mL água/gelo. O precipitado formado foi filtrado e lavado com água destilada gelada.

Em balão de 50 mL, adicionou-se 0,32 g (1,45 mmol) de 2-(4-isobutilfenil) propanohidrazida com 0,215 g (1,45 mmol) de anidrido ftálico e 7 mL de ácido acético

glacial, em refluxo por 5 horas, à 130°C. A mistura foi neutralizada (pH = 7) com solução aquosa de NaOH 20% em banho de gelo. O precipitado (híbrido *Lapdesf ibu-*ftd**) formado foi filtrado e lavado com água destilada gelada.

2.2.2. Síntese do híbrido *Lapdesf ibu-tau* (ácido 2-[[2-(4-isobutilfenil) propanoil] amido} etanosulfônico)

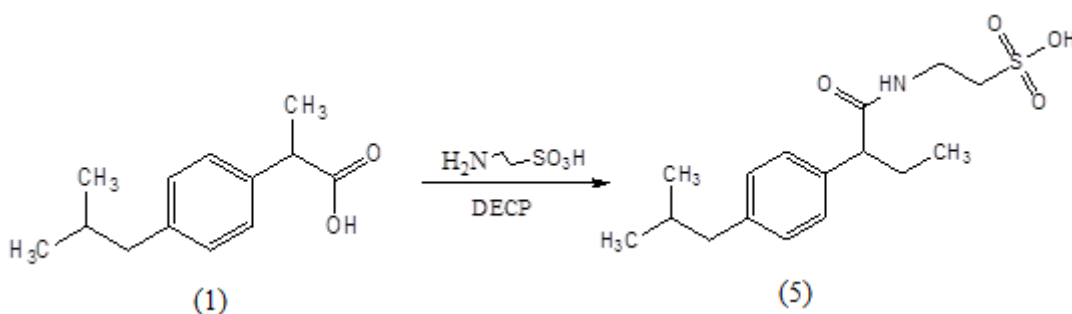


Figura 2: Síntese composto *Lapdesf ibu-tau*

➤ Metodologia sintética descrita por Vizioli (2006)

Primeiramente foi destilado trietilamina, para se eliminar qualquer resíduo de água e secar, sob peneira molecular, que foi previamente ativada em mufla por 2 horas, tanto a trietilamina quanto o DMF que foram utilizados para realizar a síntese. A interferência da água na reação reflete diretamente no produto e no rendimento desta.

Reagiu-se 206 mg (1 mmol) de ibuprofeno solubilizado em DMF previamente seca sob peneira molecular, e foi adicionado, sequencialmente, em banho de gelo, 0,9 ml de dietilcianofosfonato (DEPC), 150 mg (1,2 mmol) de taurina e 7,8 mL de trietilamina previamente seca sob peneira molecular. A reação foi mantida por 2 horas sob agitação a temperatura ambiente. Ao final da reação, o excesso de base foi removido através de arraste por nitrogênio. Após essa eliminação de base, o restante foi tratado com clorofórmio, filtrado e o solvente eliminado por evaporação à pressão reduzida.

O resíduo obtido foi adicionado, em pequenas porções, sobre uma solução aquosa saturada e gelada de NaHCO_3 . O precipitado formado foi recolhido por filtração, lavado com pequena porção de água destilada gelada, e seco sob pentóxido de fósforo em dessecador previamente montado, para eliminar a água (interferente). A massa seca obtida foi triturada sob THF sendo o resíduo sólido filtrado e seco.

➤ **Metodologia modificada: Proposta nº 1**

Reagiu-se 200 mg (1mmol) de ibuprofeno solubilizado em 10 mL DMF seco sob peneira molecular, e foi adicionado, sequencialmente, em banho de gelo, 0,1 mL de dietilcianofosfonato (DEPC), 125 mg (1 mmol) de taurina e 0,5 mL de trietilamina previamente destilada e seca sob peneira molecular, até pH 8-9. A reação foi mantida por 3 horas, em refluxo, sob agitação, a temperatura ambiente. Ao final da reação, o excesso de base foi removido através de arraste de nitrogênio. Após a eliminação de base, o restante foi tratado com clorofórmio, filtrado e o solvente foi eliminado por evaporação à pressão reduzida. Adicionou-se o resíduo, em pequenas porções, sobre uma solução aquosa saturada e gelada de NaHCO_3 , obtendo-se um precipitado que foi recolhido por filtração e lavado com água destilada gelada, sendo este seco sob pentóxido de fósforo em dessecador previamente montado. A massa seca obtida foi triturada sob THF e o resíduo sólido (híbrido *Lapdesf ibu-tau*) filtrado e seco.

➤ **Metodologia modificada: Proposta nº 2**

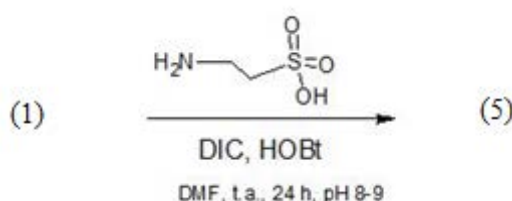


Figura 3: Síntese modificada composto *Lapdesf ibu-tau*

Em balão de 250 mL, foi adicionado 125 mg de ibuprofeno solubilizado em 20 mL DMF. Foi solubilizado 250 mg de taurina em DMSO (gotas) e adicionou-se 20 mL DMF e trietilamina (TEA) até atingir o pH 8-9. Adicionou-se ao balão reacional, sequencialmente, em banho de gelo, 0,2 mL N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), 0,160 mL 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e solução de taurina. O pH foi corrigido novamente com TEA (pH 8-9). A reação foi mantida em banho de gelo por, no mínimo, 1 hora. Após 24 horas de reação, foi realizada uma filtração simples para retirada de resíduo de taurina insolúvel. Para obter o composto, foi realizada extração líquido-líquido com 50 mL acetato de etila, 20 mL água destilada e 20 mL hexano. A fase orgânica foi separada e seca, obtendo-se o produto híbrido *Lapdesf ibu-tau*.

➤ **Metodologia modificada: Proposta nº 3**

Primeiramente se liofilizou a taurina, para obtenção de uma forma amorfa com melhor solubilidade. Depois se reagiu 125 mg de ibuprofeno solubilizado em 20 mL DMF seco sob peneira molecular, e foi adicionado, sequencialmente, em banho de gelo, 0,9 mL de dietilcianofosfonato (DEPC), 250 mg de taurina e 7,8 mL de trietilamina previamente destilada e seca sob peneira molecular, até pH básico (9-10). A reação foi mantida por 5 horas, em refluxo, sob agitação, a temperatura ambiente. Ao final da reação, o excesso de base foi removido através de arraste de nitrogênio. Após a eliminação de base, o restante foi tratado com clorofórmio, filtrado e o solvente foi eliminado por evaporação à pressão reduzida. Adicionou-se, em pequenas porções, solução aquosa saturada e gelada de NaHCO_3 sobre o resíduo, obtendo-se um precipitado que foi recolhido por filtração e lavado com água destilada gelada, sendo este seco sob pentóxido de fósforo em dessecador previamente montado. A massa

seca obtida foi triturada sob THF e o resíduo sólido (híbrido *Lapdesf ibu-tau*) filtrado e seco.

2.3. Métodos analíticos

Os compostos foram comparados com os referidos padrões por espectroscopia na região do infravermelho (IV), pelo espectrômetro infravermelho FTIR-8300 da SHIMADZU Corporation, e por faixa de fusão, pelo aparelho digital ponto de fusão MQAPF-301, da Microquímica Equipamentos LTDA. No caso do composto híbrido *Lapdesf ibu-tau*, foi realizada uma cromatografia em camada delgada, utilizando sistema de fase móvel clorofórmio:metanol:ácido acético (85:15:5), e foi realizada a revelação com ninidrina, sendo também a visualização feita com lâmpada UV (254 e 365 nm).

2.4. Ensaios toxicológicos, bioquímicos e histológicos

O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara, para execução dos ensaios biológicos, tendo a aprovação (Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 03/2012). A pesquisa segue os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

Para realização dos ensaios foram utilizados camundongos *Swiss*, machos, com 6 semanas de idade e peso entre 25-35 gramas, de procedência do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP Campus Botucatu) sob regime de ração e água *ad libitum* excetuando o período anterior e posterior à administração dos compostos, sendo os ensaios biológicos foram realizados segundo protocolo CEUA/FCF/CAr nº 03/2012.

Os ensaios de toxicidade de dose única (aguda) foram realizados embasados no “Guia Para A Condução de Estudos Não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento De Medicamentos” (ANVISA, 2010) e no “Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method n° 423” (OECD, 2001). Os ensaios correspondentes a esta classe são os Ensaio 1 a 4, discriminados a seguir.

Os ensaios de toxicidade de doses repetidas foram realizados embasados no “Guia Para A Condução de Estudos Não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento De Medicamentos” (ANVISA, 2010) e no “OECD Guideline for Testing of Chemicals: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents n° 407” (OECD, 1995). Os ensaios correspondentes a esta classe são os Ensaio 5 a 7, discriminados a seguir.

2.4.1. Ensaios toxicológicos

Para realização dos testes de toxicidade foram delineados 25 grupos contendo 6 animais cada, totalizando 150 animais. O tamanho da amostra foi determinado de acordo com o “OECD Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method (Guideline 423)” e com o “OECD Guideline for Testing of Chemicals: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents (Guideline 407)” no qual é indicado o uso de seis animais (do mesmo sexo) em cada grupo, sendo esse um número significativo para observar os efeitos de cada dose. É preconizado pela OECD Guideline for the Testing of Chemicals a utilização de 6 animais por grupo e a administração de no mínimo 4 concentrações de cada composto para cada grupo no caso do estudo de toxicidade aguda de dose única e de no mínimo 3 concentrações de cada composto para cada grupo no estudo de toxicidade de doses repetidas. Os grupos são separados por ensaios, conforme indicado abaixo.

➤ **Estudo de toxicidade de dose única (aguda) (OECD 423, 2001; ANVISA, 2010)**

Foram utilizadas duas vias de administração: via oral (gavage) e intraperitoneal; e quatro doses para o estudo de dose única: 250, 500, 1000, 2000 mg/kg.

Os animais foram observados por 14 dias após a administração das substâncias. No dia da administração os animais foram observados três vezes e, posteriormente, uma vez ao dia.

Os seguintes parâmetros foram analisados: mortalidade; sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais); variações no peso corporal e no consumo de ração e água; frequência dos sinais clínicos de toxicidade; investigações anatomo e histopatológicas; e testes bioquímicos.

Os grupos delineados no ensaio de dose única foram:

- **Ensaio 1:** Determinação da toxicidade aguda/dose única por via oral do composto *Lapdesf ibu-tau* em camundongos machos nas doses de 250 mg/kg (Grupo 1), 500 mg/kg (Grupo 2), 1000 mg/kg (Grupo 3) e 2000 mg/kg (Grupo 4).
- **Ensaio 2:** Determinação da toxicidade aguda/dose única por via oral do composto *Lapdesf ibu-ftd* em camundongos machos nas doses de 250 mg/kg (Grupo 5), 500 mg/kg (Grupo 6), 1000 mg/kg (Grupo 7) e 2000 mg/kg (Grupo 8).
- **Ensaio 3:** Determinação da toxicidade aguda/dose única por via intraperitoneal do composto *Lapdesf ibu-tau* em camundongos machos nas doses de 250 mg/kg (Grupo 9), 500 mg/kg (Grupo 10), 1000 mg/kg (Grupo 11) e 2000 mg/kg (Grupo 12).
- **Ensaio 4:** Determinação da toxicidade aguda/dose única por via intraperitoneal do composto *Lapdesf ibu-ftd* em camundongos machos nas doses de 250

mg/kg (Grupo 13), 500 mg/kg (Grupo 14), 1000 mg/kg (Grupo 15) e 2000 mg/kg (Grupo 16).

➤ **Estudo de toxicidade de doses repetidas (OECD 407, 1995; ANVISA, 2010)**

Foi utilizada uma via de administração apenas, a via oral (gavage), por ser a de predileção para possível rota de administração. A escolha das doses foi estabelecida a partir das informações produzidas nos estudos feitos de toxicidade aguda. Três doses foram utilizadas, sendo a mais alta escolhida com a expectativa produzir efeitos tóxicos observáveis, mas não morte nem sofrimento intenso. As demais doses foram estabelecidas em sequência descendente. O regime de doses foi o de administração por gavagem de dose única continuamente por 10 dias e a duração das observações até 14 dias após a primeira administração.

Os parâmetros avaliados foram: mortalidade, sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais); variações no peso corporal e no consumo de ração e água, frequência dos sinais clínicos de toxicidade; investigações anatômicas e histopatológicas; e testes bioquímicos.

Os grupos delineados no ensaio de doses repetidas foram:

- **Ensaio 5:** Determinação da toxicidade aguda/doses repetidas por via oral do composto *Lapdesf ibu-ftd* em camundongos machos nas doses de 250 mg/kg (Grupo 17), 500 mg/kg (Grupo 18) e 1000 mg/kg (Grupo 19).
- **Ensaio 6:** Determinação da toxicidade aguda/doses repetidas por via oral do composto *Lapdesf ibu-tau* em camundongos machos nas doses de 500 mg/kg (Grupo 20), 1000 mg/kg (Grupo 21), 1500 mg/kg (Grupo 22).

➤ **Grupos controle**

Os grupos controle foram separados em positivo e negativo. Os grupos controle negativo foram referentes ao veículo (solução salina 0,9%) da administração oral e intraperitoneal, no caso de dose única, e administração oral durante 10 dias, no caso de doses repetidas. O grupo controle negativo foi composto por:

- **Controle 1 e 2:** dose única de solução salina 0,9% por via oral em camundongos machos e dose única de solução salina 0,9% intraperitoneal em camundongos machos (Grupo 23).
- **Controle 3:** doses repetidas de solução salina 0,9% por via oral em camundongos machos (Grupo 24).

O grupo padrão (fármaco referência) foi delineado para o regime de doses repetidas, sendo realizado utilizando ibuprofeno 620 mg/kg (equimolar à dose de 1000 mg/kg do composto *Lapdesf ibu-tau*) sendo a administração via oral (gavage) durante 10 dias.

- **Ensaio 7:** Grupo padrão de toxicidade aguda/doses repetidas por via oral em camundongos machos com administração de ibuprofeno na dose de 620 mg/kg, equimolar à dose de 1000 mg/kg do composto *Lapdesf ibu-tau* (Grupo 25).

2.4.2. Ensaio bioquímicos

Os ensaios bioquímicos foram realizados com o plasma sanguíneo dos animais que permaneceram vivos até o término do período de observação (14 dias), sendo o sangue coletado, por decapitação, em *eppendorf* contendo anticoagulante heparina 2500U, sendo então centrifugado a 6200 rpm na mini centrífuga para *eppendorf*, Capsulefuge PMC-88/GMG Lab, para obtenção do plasma.

Os ensaios bioquímicos contemplaram a análise da Transaminase Glutâmica Oxalacética (TGO), Transaminase Glutâmica Pirúvica (TGP), Gama Glutamil Transferase (GGT), Creatinina e Uréia, de acordo com a quantidade de plasma obtido de cada animal, sendo as dosagens bioquímicas realizadas por kits comerciais (Labtest) através de reações colorimétricas, enzimáticas-colorimétricas ou cinéticas. As análises foram realizadas utilizando o Laboratório de Toxicologia, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP/Araraquara), com autorização da Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini e orientação do Ms. Elias Carvalho Padilha.

2.4.2.1. Análise estatística

Após as análises bioquímicas, os resultados apresentados foram analisados estatisticamente. As comparações estatísticas foram feitas de acordo com o teste de Mann-Whitney para comparar um grupo contra o controle respectivo, não pareado e não paramétrico, utilizando-se o software GraphPad InStat versão 3.0. Valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significantes.

2.4.3. Ensaio histológico

Após 14 dias a partir da administração dos compostos, os órgãos para os ensaios histológicos foram coletados após o sacrifício do animal, através do deslocamento cervical seguido da decapitação ou logo após o animal ser encontrado morto durante o tempo de experimentação, sendo o estômago, coração, rins e fígado excisados e fixados em solução de formalina (solução de formaldeído a 10%) até a análise macroscópica e preparo para realização dos cortes histológicos.

Metodologia análise macroscópica

Os órgãos foram recebidos no Laboratório de Patologia, departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia (UNESP/Araraquara), aos cuidados do Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade, em frascos numerados de 1 (um) a 150 (cento e cinquenta) sem identificação dos grupos de tratamento ou controle. Cada frasco foi aberto e os órgãos: fígado, estômago, rim e coração foram analisados macroscopicamente quanto à cor, tamanho (comprimento, altura e largura) e presença de lesões visíveis. Além disso, especificamente para o fígado, foi analisada a consistência ao realizar-se o corte macroscópico. Os dados foram anotados em livro de registro seguindo o número de cada frasco. No caso do fígado foi escolhido o lobo mediano para realizar o processamento devido à fácil do lobo também pela presença da vesícula biliar. Para o rim procedeu-se, após a análise macroscópica, o corte longitudinal para que fosse possível analisar região cortical e medular nos cortes histológicos. No caso do estômago, foram realizados cortes seriados da região de esôfago para a região não glandular com espaçamento de 2,0 mm para que fosse possível analisar todo o órgão nas avaliações histológicas.

Processamento e inclusão em parafina

Após esta fase os órgãos foram incluídos em cassetes numerados (numeração enviada) para processamento e posterior corte histológico. Os órgãos foram lavados em água corrente por no mínimo 12 horas e seguiram em histotécnico, sendo submetidos a concentrações crescentes de álcool com posterior substituição por xilol em concentrações também crescentes e consequente inclusão em parafina posicionando os cortes para que a área de interesse estivesse voltada para a área de corte.

Cortes histológicos e coloração

Os blocos numerados foram então cortados em micrótomo obtendo-se cortes histológicos com 5 µm, os quais foram levados às lâminas de vidro e corados com a coloração de Hematoxilina & Eosina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Síntese do híbrido *Lapdesf ibu-ftd*

Foi realizado a síntese do composto *Lapdesf ibu-ftd* a princípio seguindo a metodologia proposta por Castro (2008), mas com modificações pelos problemas encontrados durante as etapas de síntese.

Na etapa de esterificação, após a etapa de eliminação do solvente por pressão reduzida em temperatura ambiente, foi obtido um líquido viscoso incolor com rendimento de aproximadamente 100%, sendo realizada cromatografia em camada delgada (fase móvel: 95% diclorometano:5% metanol) para acompanhamento da síntese.

Na etapa de obtenção da hidrazida de ibuprofeno, após o isolamento reacional foi observada a formação de um precipitado que foi filtrado e lavado com cerca de 10 mL de água destilada gelada para fornecer um sólido amorfo de coloração branca, com a faixa de fusão de 78°C-82°C e com rendimento de 60%, sendo a reação acompanhada por CCD (fase móvel: 90% diclorometano:10% metanol).

A etapa final, para a obtenção do híbrido *Lapdesf ibu-ftd*, foi feita em balão de 50 mL, onde foi adicionado 0,32 g de 2-(4-isobutilfenil) propanohidrazida com 0,215 g de anidrido ftálico e 7 mL de ácido acético glacial, em refluxo por 5 horas, à 130°C. A mistura foi neutralizada (pH = 7) com solução aquosa de NaOH 20% em banho de

gelo. O precipitado (híbrido *Lapdesf ibu-ftd*) formado foi filtrado e lavado com água destilada gelada. O rendimento foi de 78%. O acompanhamento da reação foi feito por CCD (fase móvel: diclorometano/metanol 95:5).

As mudanças no procedimento, visaram aperfeiçoar a síntese, tendo melhor rendimento nas etapas de formação da hidrazida de ibuprofeno, que é uma etapa na qual o rendimento tem uma variação grande dependendo das condições da síntese, e da etapa final, visando à neutralização da solução final para que ocorra a precipitação do híbrido *Lapdesf ibu-ftd*.

O produto da esterificação que resulta em líquido viscoso é armazenado em freezer, para evitar degradação, sendo utilizado nas etapas subsequentes, sendo os produtos, até esse momento, das etapas de obtenção de hidrazida de ibuprofeno e do produto final, advindas do líquido viscoso contendo o éster de ibuprofeno.

As faixas de fusão longas apresentadas nos precipitados da 1ª etapa obtidos por adição de hidróxido de sódio, são indicativas que existe resíduo, sendo na etapa de esterificação (separação sal) possivelmente ainda temos a presença do sulfato de sódio, ocasionando a fusão heterogênea do produto. A realização da segunda etapa a partir da obtenção do éster precipitado, após separação do produto desejado e do sal interferente, não foi realizada pois o rendimento reacional é muito baixo pois a separação não é tão efetiva, sendo perdido produto, o que diminui o rendimento.

O aumento de proporção de reagentes já está no novo procedimento pois o rendimento na etapa da obtenção de 2-(4-isobutilfenil) propanohidrazina é relativamente baixo. A incorporação do sistema de refluxo na etapa de esterificação também já está no novo procedimento, pelas condições físicas (temperatura, umidade) do laboratório, sendo que esses fatores também influenciam nas sínteses, contudo sendo possivelmente evitados para se obter o produto desejado de maneira

que o rendimento seja alto e o produto puro. A utilização do aparelho rotaevaporador, tanto na etapa de esterificação quanto na etapa da hidrazida, para redução de volume por intermédio da evaporação à pressão reduzida do solvente, também está descrita no novo procedimento, sendo esse processo utilizado para melhor eficiência na obtenção do líquido viscoso contendo o éster e para melhorar o rendimento da etapa da hidrazida.

Após as modificações realizadas no procedimento, a reação foi otimizada e seu rendimento melhorado, obtendo quantidade suficiente para realizar a etapa final de formação do híbrido de *Lapdesf ibu-ftd*. Utilizando o éster de ibuprofeno em forma de líquido viscoso, foi feita a etapa de obtenção de hidrazida de ibuprofeno, obtendo um rendimento variado de 50-75%. Com esse rendimento relativamente alto em comparação ao obtido pelo procedimento antigo proposto por Castro (2008), sendo esse entre 10 a 50% dependendo da reação, sendo dificilmente obtido um rendimento de 50% e não obtendo quantidade suficiente da hidrazida de ibuprofeno para continuar a síntese. No procedimento modificado a quantidade dos reagentes aumentou, o que possibilitou a obtenção do produto mesmo com um rendimento usual baixo, como 50%.

Com as modificações impostas pela nova metodologia foi possível obter rendimentos altos na etapa de formação de hidrazida de ibuprofeno e continuação da reação.

A etapa final se desenvolveu de acordo com o proposto por Castro (2008), sendo obtido o produto final com rendimento variado, sendo maior interesse nas condições que levam ao rendimento entre 60-80%. As condições se dão pela temperatura atingida, pois o aquecimento pode algumas vezes ser mais brando, dependendo da temperatura externa à reação, pela umidade e pela neutralização do produto. A

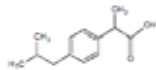
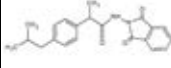
“correção” do pH, ou seja, se ultrapassamos o pH neutro e tentamos corrigi-lo com adição de ácido acético (solvente), podemos ter alterações que variam desde a simples mudança no rendimento até a formação de sal (pela adição de mais ácido na base presente e vice-versa) e água, possivelmente interferindo no produto final, devendo este procedimento ser evitado a medida do possível.

Com a incorporação do agitador magnético “RCT basic IKAMAG® safety control” foi possível a otimização da síntese pois se realiza 16 sínteses simultaneamente, em frascos de 20 mL separados, sendo nesse caso a primeira etapa (esterificação) realizada rapidamente em grande quantidade. Isso possibilitou a maior disponibilidade de líquido viscoso para segunda etapa (formação de hidrazida de ibuprofeno) e melhor nas condições do líquido viscoso, pois é possível armazenar o frasco reacional no freezer e evitar degradação. Com isso foi possível modificações nas quantidades de produto e rendimento da 2ª etapa, possibilitando o término da síntese.

No total, foram realizadas várias reações, sendo os produtos unidos e realizado o processo de purificação em coluna (FE sílica; FM 95:5, diclorometano:metanol).

3.1.1. Análise por espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Foram obtidos os espectros de absorção no infravermelho (IV) das reações e comparados com o espectro de absorção dos reagentes de partida, ibuprofeno e anidrido ftálico, com o composto obtido. O quadro 1 indica as diferentes bandas que caracterizam o composto.

Compostos	Valores de absorção no IR					
	N-H imida cíclica 3200 cm^{-1}	C=O imida 1780 cm^{-1} a 1706 cm^{-1}	C=O anidrido 1775 cm^{-1} a 1740 cm^{-1}	C=O ácido carboxílico 1725 cm^{-1} a 1700 cm^{-1}	C=O amida 1695 cm^{-1} a 1630 cm^{-1}	N-N 1215 cm^{-1}
	-	-	-	1718,58 cm^{-1}	-	-
	-	-	1762,94 cm^{-1}	-	-	-
	3248,13 cm^{-1}	1703,14 cm^{-1}	-	-	1651,07 cm^{-1}	1230,58 cm^{-1}

Quadro 1: Principais bandas determinantes para confirmação da obtenção do produto *Lapdesf ibu-ftd* (pastilha KBr)

A seguir está indicado o espectro de absorção na região do infravermelho do composto.

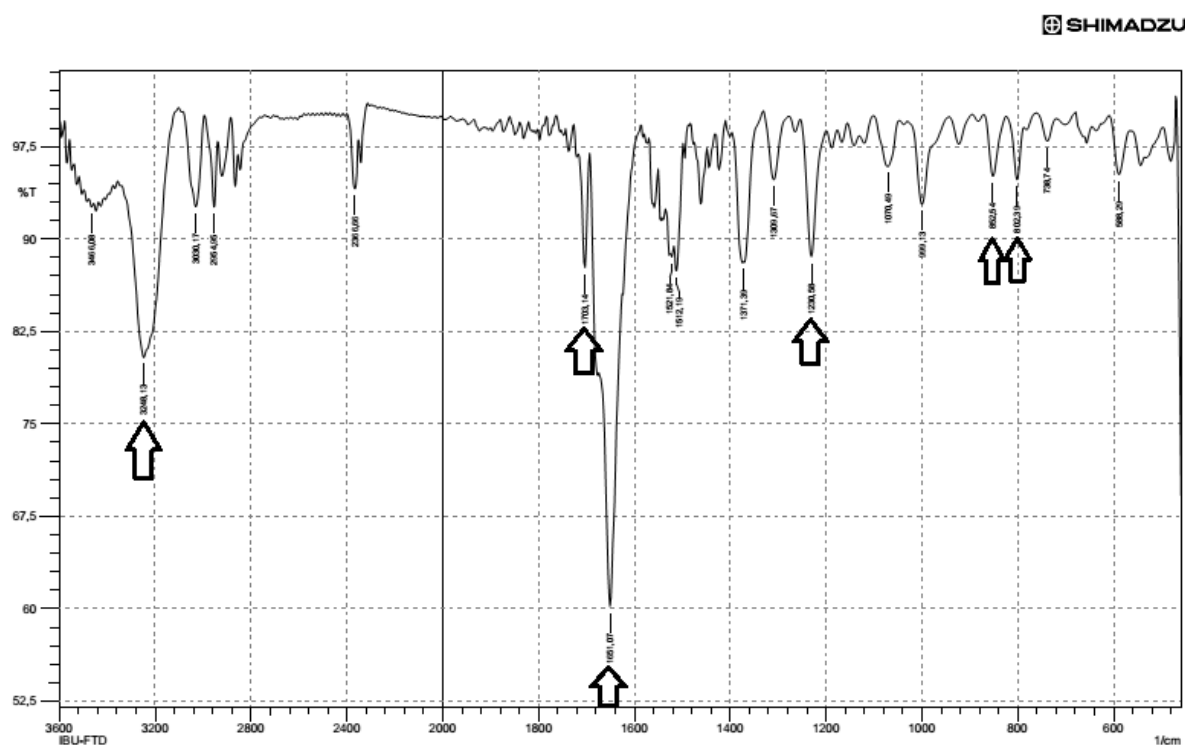


Figura 4: Espectro de absorção no infravermelho *Lapdesf ibu-ftd* (KBr)

Podemos identificar bandas características do produto desejado, *Lapdesf ibu-ftd*, sendo essas indicadas na tabela abaixo:

Tabela 1: Valores I.V. *Lapdesf ibu-ftd*

Valores absorção	Grupamento característico
3248,13 cm^{-1}	N-H imida cíclica (ftalimida)
1703,14 cm^{-1}	C=O imida
1651,07 cm^{-1}	C=O amida
1230,58 cm^{-1}	N-N
802,39 cm^{-1} e 852,54 cm^{-1}	C-H aromático posição <i>para</i>

É possível observar as bandas de grupamentos característicos do produto desejado, sendo essas as que caracterizam amida e imida cíclica, principalmente. Temos a faixa de valores de absorção do grupo C=O imida entre 1706 cm^{-1} e 1780 cm^{-1} , sendo o produto apresentando o valor de absorção de 1703,14 cm^{-1} , correspondendo ao grupamento indicado. A banda de N-H imida cíclica (ftalimida), tem valor de absorção 3200 cm^{-1} , sendo o composto apresentando valor de absorção de 3248,13 cm^{-1} . A presença do grupo amida também é relevante, sendo este apresentado entre 1630 cm^{-1} e 1695 cm^{-1} , no qual o composto condiz com esses valores, possuindo valor de absorção 1651,07 cm^{-1} . A substituição em posição *para* no anel aromático é característica advinda do ibuprofeno, sendo ela analisada pois podemos ter subprodutos nos quais a orientação pode ter sido modificada, sendo esses valores utilizados para comprovar a substituição na posição desejada. A ligação N-N é importante nesse produto pois ela é bem característica, sendo o valor de absorção entre 1215 cm^{-1} e 1076 cm^{-1} , já entrando na região de *fingerprint* (1300 cm^{-1} a 900 cm^{-1}), o que dificulta a visualização.

A seguir, temos o espectro de absorção no infravermelho do ibuprofeno.

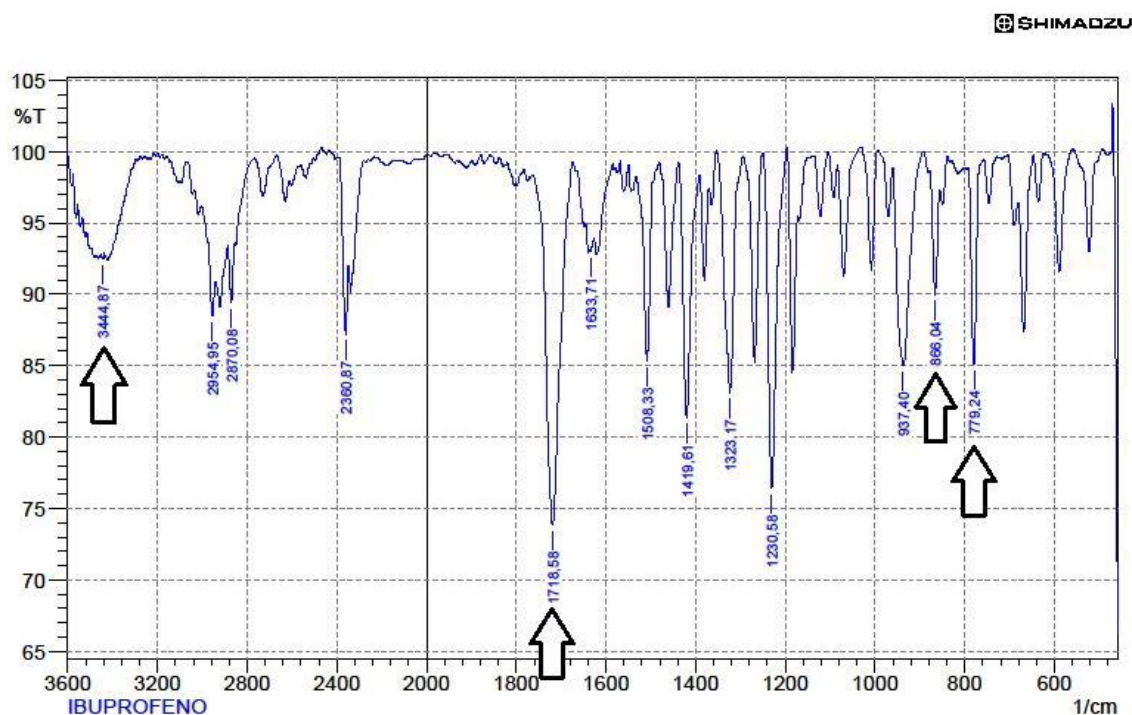


Figura 5: Espectro de absorção infravermelho ibuprofeno (KBr)

O ibuprofeno possui uma banda intensa e bem definida em $1718,58\text{ cm}^{-1}$ e que está de acordo com a literatura ($1700\text{ a }1725\text{ cm}^{-1}$), sendo essa banda atribuída ao estiramento da carbonila $\text{C}=\text{O}$ de ácidos carboxílicos, e possui o fingerprinting característico dos hidrocarbonetos aromáticos dissustituídos, incluindo a absorção do anel aromático substituído em posição para, estiramento em $866,04\text{ cm}^{-1}$ e $779,24\text{ cm}^{-1}$, o que está de acordo com a literatura, 850 cm^{-1} e 800 cm^{-1} .

Tabela 2: Valores I.V. ibuprofeno

Valores absorção	Grupamento característico
$3444,87\text{ cm}^{-1}$	O-H
$1718,58\text{ cm}^{-1}$	$\text{C}=\text{O}$ ácido carboxílico
$866,04\text{ cm}^{-1}$ e $779,24\text{ cm}^{-1}$	C-H aromático posição para

Baseado nesse espectro foi possível estabelecer a banda característica de ácido carboxílico e da substituição em aromático na posição *para*. O espectro de absorção do anidrido ftálico é indicado a seguir, assim como os valores de grupamento

anidrido, o que caracteriza a presença desse composto como “resíduo” após o término do tempo de reação.

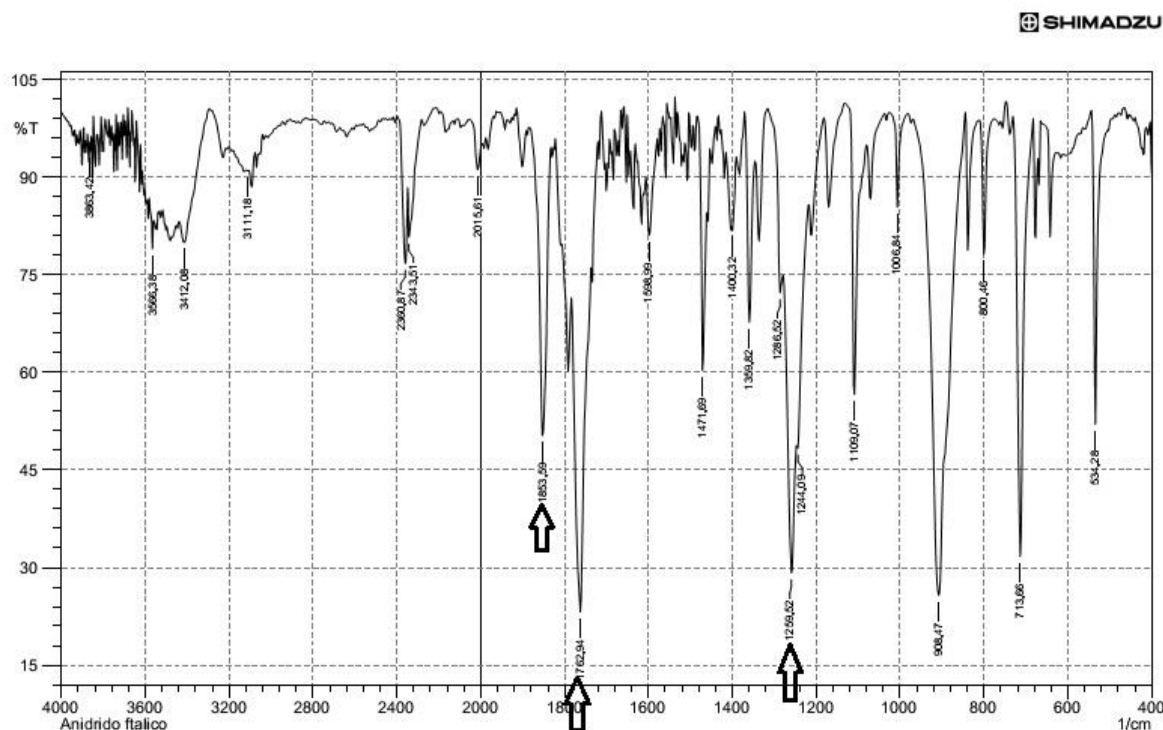


Figura 6: Espectro de absorção no infravermelho anidrido ftálico (KBr)

Os valores de absorção do grupamento anidrido estão indicados na tabela abaixo.

Tabela 3: Valores I.V. anidrido ftálico

Valores absorção	Grupamento característico
1853,59 cm ⁻¹ e 1762,94cm ⁻¹	C=O anidrido
1259,52 cm ⁻¹	C-O anidrido

Os valores apresentados são justificados pela literatura, sendo as faixas de absorção características do grupamento C=O anidrido entre 1830 cm⁻¹-1800 cm⁻¹, e entre 1775 cm⁻¹ -1740 cm⁻¹; e a faixa de absorção característica do grupamento C-O anidrido entre 1300 cm⁻¹- 900 cm⁻¹, no qual o espectro de absorção apresentado pelo anidrido ftálico temos os valores de 1853,59 cm⁻¹ e 1762,94 cm⁻¹, representando o grupamento C=O anidrido, e o valor de absorção 1259,52 cm⁻¹, representando o

grupamento C-O anidrido. A banda de C-O anidrido é dada na região de *fingerprint* da molécula, sendo então de difícil diferenciação nos espectros das reações. O grupamento anidrido é importante para visualização se o produto final está impuro e se ainda pode conter traços de anidrido ftálico indicando a não total reação, o que resulta num fator interferente na análise do ponto de fusão pois o resíduo de anidrido é o possível causador de uma fusão irregular, pois este se sublima em torno de 295°C, como dito anteriormente.

Como não temos o padrão do produto *Lapdesf ibu-ftd* a comparação para confirmação da obtenção do produto desejado foi feita analisando os grupamentos característicos do produto, com base nos reagentes de partida da reação.

Como características principais destacamos a faixa de fusão, que está em torno de 118°C, e os grupamentos característicos que devem estar presentes no espectro de absorção na região do infravermelho, sendo essas as bandas dos grupamentos C=O amida, C=O e N-H imida (ftalimida). Outras bandas para se confirmar a análise do produto da reação são as do grupamento N-N e da substituição na posição *para* no anel aromático. Após processo de purificação temos a ausência das bandas não características do produto final, como do grupamento anidrido, assim como dos grupamentos éster e ácido carboxílico.

3.1.2. Análise por faixa de fusão

O composto *Lapdesf ibu-ftd* teve sua faixa de fusão analisada com auxílio do aparelho digital ponto de fusão MQAPF-301, da Microquímica Equipamentos LTDA. A faixa de fusão obtida foi de 118,2°C - 120,3°C. A confirmação da obtenção do híbrido *Lapdesf ibu-ftd* se deu em comparação com a faixa de fusão e comparação entre os espectros na região do infravermelho entre o produto e reagentes da reação.

3.2. Síntese do híbrido *Lapdesf ibu-tau*

A síntese do composto *Lapdesf ibu-tau* (ácido 2-[[2-(4-isobutilfenil) propanoil] amido} etanosulfônico) foi realizada conforme algumas modificações.

As primeiras modificações para otimização da síntese foram realizadas por um problema na rota sintética, o qual se originou a partir do isolamento do composto precipitado na etapa de adição sobre solução aquosa e saturada de bicarbonato de sódio. Foi observada a formação do composto desejado juntamente com o sal (bicarbonato), alterando a massa de produto obtido, pois existe a porcentagem do sal que está presente além do híbrido, e alterando a faixa de fusão dos compostos, sendo isso observado na análise do ponto de fusão pela carbonização apresentada, ao invés da fusão completa, e por fusão não uniforme, sendo que parte do produto sofria fusão na faixa que caracteriza o híbrido *Lapdesf ibu-tau*. Algumas reações anteriores apresentavam o bicarbonato como um “contaminante” mas esse bicarbonato de sódio não interfere nos resultados dos ensaios biológicos pois com uma análise quantitativa do produto obtido é possível calcular a massa do enredo e do sal. A adição cuidadosa conferindo a mudança de pH, neutralizando a solução, resulta em um produto mais puro portanto o cuidado nesta etapa é fundamental.

Outras modificações se deram para se obter maior rendimento da reação, sendo pela otimização do rendimento e do tempo reacional ou por processos que facilitariam a síntese.

A liofilização da taurina foi proposta pela sua característica de pouca ou nenhuma solubilidade em solventes orgânicos. Ela apresenta uma excelente solubilidade em água mas como na reação com o ibuprofeno temos esta como interferente importante, é necessário modificar a estrutura cristalina da taurina para que tenhamos uma melhor solubilização desse composto. Grande parte das tentativas

de síntese que foram mal sucedidas se deu pela insolubilidade da taurina, não permitindo que essa substância estivesse solúvel e possível de sofrer a reação para síntese do híbrido desejado. A escolha pela liofilização da taurina se baseia nesse princípio de alteração da rede cristalina, alterando características físico-químicas importantes para que a reação ocorra da melhor maneira possível.

A modificação na quantidade de ibuprofeno e de taurina na reação foi baseado no fato de que possivelmente existiria taurina na reação que não seria solubilizada, justificando o excesso desta. Também foi levado em conta que teríamos que otimizar a síntese pelo quantidade de massa necessária para os testes biológicos propostos e pelo rendimento da reação.

A escolha pelo par de agentes acoplantes/aditivo, DIC/HOBt, se baseia na formação da ligação amida, pelo acoplamento entre um ácido carboxílico, função do ibuprofeno, e uma amina, função da taurina. O DIC foi utilizado, ao invés da diciclohexilcarbodiimida (DCC), pela facilidade de manipulação e menor incidência de formação de subprodutos. O HOBt é utilizado com aditivo pois ele diminui o nível de epimerização dos agentes acoplantes (carbodiimidas), e ele reage formando um éster mais ativado e mais reativo. Esses fatores indicam maior rendimento da reação e, pela menor quantidade de etapas de purificação do produto, menor tempo total de reação, pois após 24 horas já temos o produto formado, sendo necessária apenas a separação líquido-líquido para isolar o híbrido.

Com a adição de agente acoplante e aditivo na reação, foi criada uma nova metodologia, acima descrita. O maior problema encontrado nessa metodologia foi a solubilidade da taurina, sendo esse problema não contornado nem com a liofilização desta, sendo necessário maior estudo nesse mecanismo, visando a otimização do processo. O resíduo de taurina que permanece insolúvel não possibilita a formação

eficaz do composto híbrido, ou seja, não se observa a reação entre o ibuprofeno e a taurina mesmo com a maior reatividade conferida pelos agentes acoplantes.

A etapa de adição da solução de bicarbonato era a crucial para precipitação do composto e era a qual originava o sal “contaminante”. Essa etapa foi mantida mesmo com a possível precipitação juntamente com o híbrido pois após não se obter sucesso com a metodologia proposta de número 2 (agentes acoplantes), a precipitação do composto híbrido é efetiva e a reação que utiliza apenas DEPC como catalisador já tinha demonstrado a formação do produto final desejado.

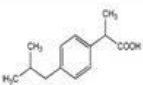
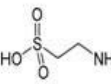
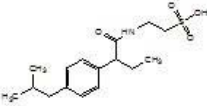
No geral, modificando a quantidade de reagentes envolvidos na reação, visando à otimização da síntese para se atingir a quantidade suficiente para os ensaios biológicos propostos. Também foi estudado dentro da última modificação proposta, a de número 3, os valores dos reagentes de partida para se ter uma menor utilização de massa e manter um bom rendimento da reação, como por exemplo, diminuindo a quantidade de base a ser adicionada e correção da relação entre as massas de ibuprofeno e taurina utilizadas.

O rendimento da reação variou entre 30-50%, sendo mediano. Com isso, os produtos das reações foram agrupados e purificados em um único para realização dos ensaios biológicos.

Foi realizado CCD e revelada com ninidrina. A reação com ninidrina é uma reação corada própria de aminoácidos, pois a ninidrina é um agente oxidante que reage com o aminoácido α da cadeia, dando origem a um composto de cor púrpura. A cromatografia em camada delgada com revelação com ninidrina indicou a ausência de taurina livre, sendo evidenciada pela coloração em roxo do local de aplicação da taurina e a ausência de coloração na mancha correspondente a amostra (padrão *Lapdesf ibu-tau* e produtos reações), sendo utilizada como controle da reação.

3.2.1. Análise por espectroscopia na região do infravermelho

Foram obtidos os espectros de absorção no infravermelho do composto sintetizado e comparado com o espectro de absorção do produto obtido no Lapdesf (Vizioli, 2006), e com os reagentes de partida, ibuprofeno e taurina. O quadro 2 indica as diferentes bandas que caracterizam o composto.

Compostos	Valores absorção no IR		
	C=O ácido carboxílico 1700 a 1725 cm^{-1}	NH ₂ 3100 a 3500 cm^{-1} e 1640 a 1550 cm^{-1}	C=O amida 1680 a 1630 cm^{-1}
	1718,58 cm^{-1}	-	-
	-	3207,62 cm^{-1} e 3045,60 cm^{-1} e 1616,35 cm^{-1}	-
	-	-	1651,07 cm^{-1}
IBU-TAU	-	-	1647,21 cm^{-1}

Quadro 2: Principais bandas determinantes para confirmação do *Lapdesf ibu-tau* com os padrões (pastilha KBr)

A seguir temos os espectros de absorção no infravermelho das substâncias descritas.

O espectro de absorção no infravermelho do ibuprofeno está descrito nesta tese. Baseado nesse espectro foi possível estabelecer a banda característica de ácido carboxílico e da substituição em aromático na posição *para*.

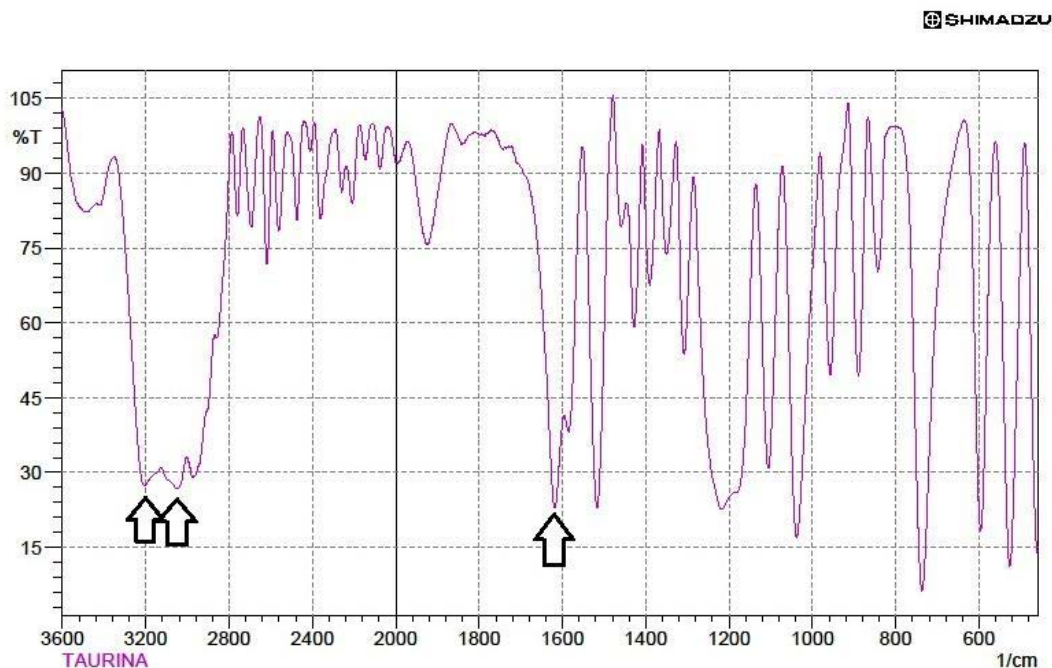


Figura 7: Espectro de absorção infravermelho taurina (KBr)

A taurina é um ácido aminosulfônico, análoga a um aminoácido que ao invés do grupo ácido carboxílico contém um grupo de ácido sulfônico, SO_3H . A banda dupla de absorção de amina, estiramentos $3045,60\text{ cm}^{-1}$ e $3207,62\text{ cm}^{-1}$, e $1616,35\text{ cm}^{-1}$, estão de acordo com a literatura (entre 3100 e 3500 cm^{-1} e entre 1640 e 1550 cm^{-1}), é característica para esse composto, assim como a região que compreende o ácido sulfônico, caracterizado pelo estiramento O-H, $3487,30\text{ cm}^{-1}$, e pelo S=O, na região de fingerprinting (entre 1150 e 1250 cm^{-1} e entre 1000 e 1100 cm^{-1}).

Tabela 4: Valores I.V. taurina

Valores absorção	Grupamento característico
$3207,62\text{ cm}^{-1}$ e $3045,60\text{ cm}^{-1}$	Amina
$1616,35\text{ cm}^{-1}$	
$3487,30\text{ cm}^{-1}$	O-H

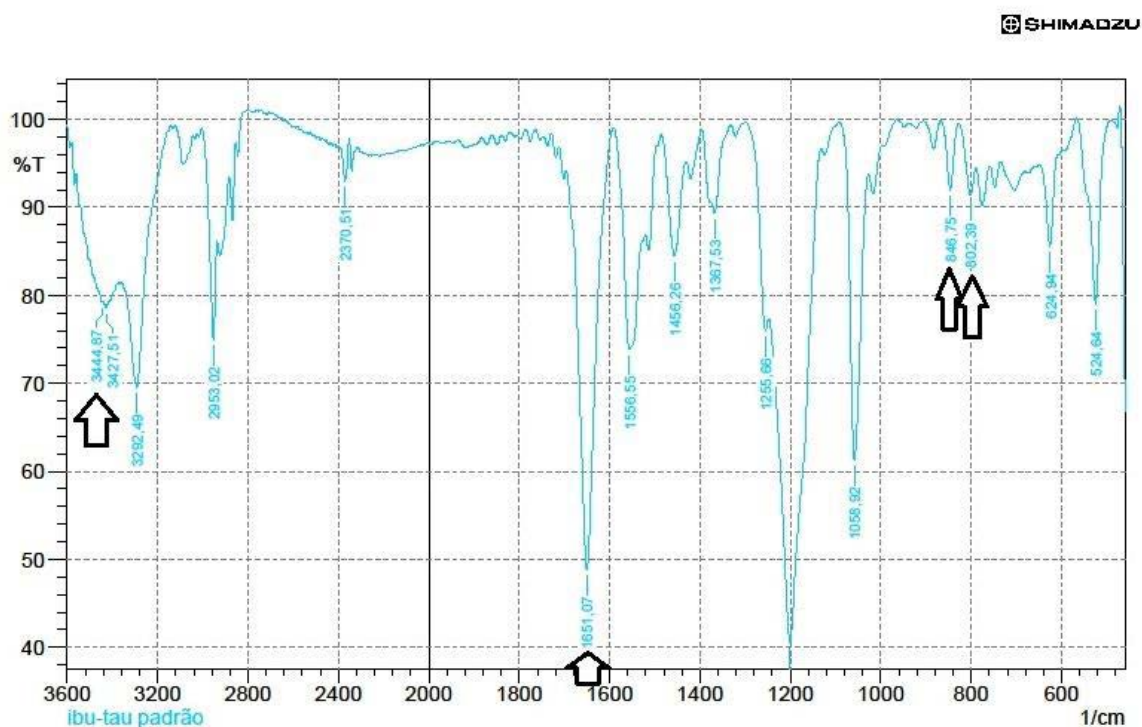


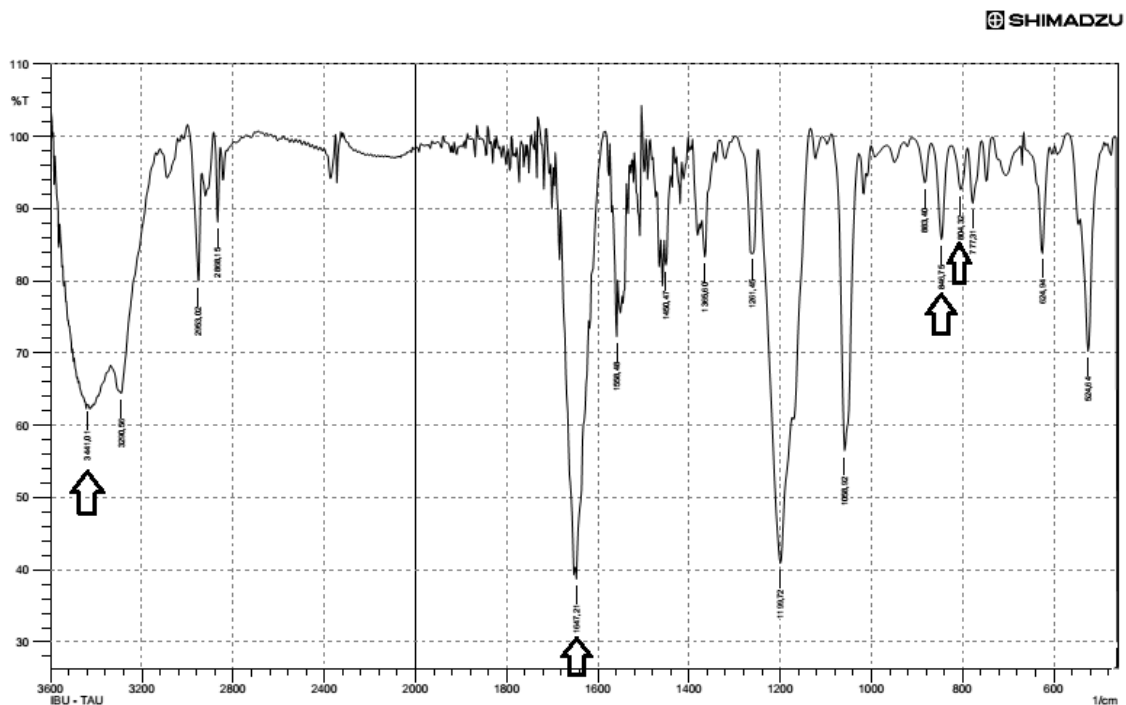
Figura 8: Espectro de absorção infravermelho padrão *Lapdesf ibu-tau* (KBr)

No espectro de absorção do padrão, podemos destacar uma banda característica “nova”, a banda de amida, inexistente na taurina e no ibuprofeno, que corresponde ao estiramento C=O em $1651,07\text{ cm}^{-1}$, que corresponde com a literatura (1680 e 1630 cm^{-1}), ao estiramento de N-H em $3444,81\text{ cm}^{-1}$, que corresponde com a literatura (3500 e 3180 cm^{-1}). Temos a ausência da banda de absorção de amina (estiramentos entre 3100 e 3500 cm^{-1} e entre 1640 e 1550 cm^{-1}) que é característica da taurina, e a presença da região que compreende o ácido sulfônico, caracterizado pelo estiramento O-H, entre 3100 e 3500 cm^{-1} , e pelo S=O, na região de fingerprinting (entre 1150 e 1250 cm^{-1} e entre 1000 e 1100 cm^{-1}). O estiramento de C-H aromático substituído na posição para, característico do ibuprofeno que está presente também no produto final, é observado em $846,75\text{ cm}^{-1}$ e $802,39\text{ cm}^{-1}$.

Tabela 5: Valores I.V. padrão *Lapdesf ibu-tau*

Valores absorção	Grupamento característico
3444,81 cm^{-1}	Amida
1651,07 cm^{-1}	C=O de amida
846,75 cm^{-1} e 802,39 cm^{-1}	C-H aromático posição para

Com os dados dos compostos de origem e do padrão, é possível analisar os espectros I.V. dos produtos obtidos.

Figura 9: Espectro de absorção no infravermelho *Lapdesf ibu-tau* (KBr)

No espectro de absorção do composto *Lapdesf ibu-tau*, podemos identificar bandas características do produto desejado, sendo essas indicadas na tabela abaixo:

Tabela 6: Valores I.V. *Lapdesf ibu-tau*

Valores absorção	Grupamento característico
3441,01 cm^{-1}	Amida
1647,21 cm^{-1}	C=O de amida
804,32 cm^{-1} e 846,75 cm^{-1}	C-H aromático posição para

As bandas apresentadas condizem com os valores do padrão.

Após a análise dos componentes principais necessários para confirmação do produto híbrido com taurina temos a equivalência entre o padrão e composto sintetizado. As bandas mais importantes para a caracterização dos compostos são as que determinam a presença de amida e do anel aromático, sendo esse substituído na posição *para*.

Essa equivalência nas bandas consideradas fundamentais para caracterização do produto nos indica que o produto esperado foi obtido.

3.2.2. Análise por faixa de fusão

O composto *Lapdesf ibu-tau* teve sua faixa de fusão analisada com auxílio do aparelho digital ponto de fusão MQAPF-301, da Microquímica Equipamentos LTDA.

A faixa de fusão obtida foi de 193,0°C-195,3°C. A faixa de fusão apresentada pelo padrão foi de 193,5°C-196°C.

A confirmação da obtenção do híbrido *Lapdesf ibu-tau* se deu em comparação com a faixa de fusão e comparação entre os espectros na região do infravermelho entre o produto, padrão e reagentes da reação.

3.3. Ensaios Biológicos

Para avaliação inicial do perfil toxicológico agudo dos compostos é necessário o ensaio de avaliação de toxicidade aguda de dose única e doses repetidas. É preconizado pela OECD “Guideline for the Testing of Chemicals” a utilização de 6 animais (camundongos) por grupo e a administração de no mínimo 4 doses de cada composto para cada grupo no caso do estudo de toxicidade aguda de dose única e de no mínimo 3 doses de cada composto para cada grupo no estudo de toxicidade de doses repetidas. Os testes foram realizados a partir de determinação de doses únicas fixas, caracterizando o estudo com o foco na toxicidade evidente e não na mortalidade dos animais (ANVISA, 2010; OECD, 1995; OECD, 2001; VALADARES, 2006).

3.3.1. Avaliação comportamental e letalidade

Os animais foram observados diariamente durante quatorze dias após a administração sendo avaliados diversos parâmetros comportamentais, no mínimo, uma vez ao dia (ANVISA, 2010). No dia de administração, os animais foram observados nos momentos: anterior, durante, logo após (até uma hora) e após quatro horas. Os sinais clínicos observados foram anotados em ficha própria e transcritos para uma tabela na qual todas as observações foram categorizadas. Os parâmetros observados foram colocados em forma de quadros, correlacionando o sinal clínico com sua frequência no grupo observado, sendo os resultados apresentados nos próximos tópicos. A frequência diz ao aparecimento daquele sinal clínico entre o grupo, sendo então a média do grupo em relação ao número de observações. O valor máximo considerado é de 14,0; o intermediário de 7,0; o baixo de 3,5; e o muito baixo valores abaixo de 1,75.

A avaliação comportamental dos grupos Controle Negativo foi utilizada para eliminar vieses de comportamentos “naturais” dos ensaios:

Quadro 3: Observações comportamentais e média da frequência observada no Grupo Controle Negativo (n = 4)

Observações \ Grupos	Dose única	Doses repetidas
Alteração respiração	N.O.	2,25
Dor	N.O.	0,5
Ferimentos	N.O.	0,5
Frêmito vocal	N.O.	0,25
Piloereção	N.O.	0,5

N.O.: não observado

O que podemos notar é a ausência de sinais de toxicidade no grupo controle de dose única e também no de doses repetidas, pois os sinais de alteração respiração, dor, frêmito vocal e piloereção podem ser considerados devido à administração por gavagem por período prolongado (dez dias) podendo ocasionar alterações naturais do método de administração, além de ferimentos de mordedura que são considerados comuns em grupos de roedores machos devido à hierarquização social.

Em relação à hierarquização social temos a dominação por um único macho, sendo normalmente o mais agressivo, mas pouco é conhecido desta organização social. O estabelecimento territorial é definido em seu momento inicial de formação, em grupos de machos, sendo então que dois ou mais machos alojados juntos tem como comportamento comum a luta por território. (HARKNESS & WAGNER, 1993).

Os ferimentos observados são advindos de mordedura e podem ser também agravados por agressão frequente ou quando associados a traumatismo pela própria caixa (contato com maravalha, comedouro), sendo o animal isolado se a agressão é continuada. Feridas por mordeduras são frequentes em grupos de camundongos machos devido à hierarquização social e também estresse/agressividade causado por diversas fontes, desde alimentação e ruídos no biotério até possivelmente pela administração dos compostos, o que pode ocasionar dor e outras alterações

comportamentais. A hierarquização dos machos em uma caixa pode ser identificada através do número e gravidade das feridas na região lombar, oriundas de mordeduras.

As observações comportamentais dos ensaios com os compostos híbridos de ibuprofeno estão apresentados nos quadros a seguir:

Quadro 4: Observações comportamentais e média da frequência observada com administração de dose única do composto *Lapdesf ibu-tau* por via oral (gavage)

Observações \ Grupos	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg	Controle dose única
Agressividade	0,5	0,8	0,5	N.O.	N.O.
Alteração da locomoção	0,2	N.O.	0,3	N.O.	N.O.
Alteração respiração	0,7	N.O.	N.O.	1,7	N.O.
Dor	0,2	0,2	0,2	1,3	N.O.
Estimulações sexuais	0,5	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.
Frêmito vocal	N.O.	0,2	N.O.	N.O.	N.O.
Incoordenação	N.O.	0,7	0,5	0,5	N.O.
Letargia	N.O.	N.O.	0,5	N.O.	N.O.
Tremores	N.O.	0,3	N.O.	0,2	N.O.

N.O.: não observado

De acordo com o quadro 4, apresentado acima indicando as observações do ensaio de dose única por via oral do composto *Lapdesf ibu-tau*, podemos perceber que a agressividade, como possível intermédio de disputa territorial teve uma frequência maior no grupo que recebeu a menor dose (250 mg/kg) sendo então a hipótese de que esse sinal esteja relacionado à hierarquia social mais plausível. Os animais que receberam maior dose (2000 mg/kg) apresentaram maior frequência de incoordenação e tremores, podendo estes sinais apresentar relação com toxicidade renal, sendo investigado a função renal (pela bioquímica) e feita biópsia (após 14 dias, com o sacrifício).

Quadro 5: Observações comportamentais e média da frequência observada com administração de dose única do composto *Lapdesf ibu-ftd* por via oral (gavage)

Observações \ Grupos	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg	Controle dose única
Agressividade	1,2	0,2	N.O.	N.O.	N.O.
Alteração da locomoção	N.O.	N.O.	N.O.	0,2	N.O.
Alteração respiração	0,7	N.O.	0,3	0,2	N.O.
Dor	N.O.	N.O.	N.O.	0,2	N.O.
Ferimentos	2,2	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.
Incoordenação	N.O.	N.O.	N.O.	0,3	N.O.
Letargia	0,2	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.
Piloereção	N.O.	N.O.	0,2	N.O.	N.O.

N.O.: não observado

De acordo com o quadro 5, apresentado acima indicando as observações do ensaio de dose única por via oral do composto *Lapdesf ibu-ftd*, também podemos identificar agressividade maior no grupo de menor dose e, como consequência da maior agressividade neste grupo, a presença de ferimentos por mordedura é mais acentuada em relação aos demais grupos deste ensaio. A piloereção identificada na dose de 1000 mg/kg foi não persistente, sendo então mais relacionada ao estresse gerado pela administração.

Quadro 6: Observações comportamentais e média da frequência observada com administração de dose única do composto *Lapdesf ibu-tau* por via intraperitoneal

Observações \ Grupos	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg	Controle dose única
Agressividade	1,7	0,5	1,3	0,2	N.O.
Alteração da locomoção	N.O.	N.O.	0,7	0,2	N.O.
Alteração respiração	0,5	N.O.	N.O.	0,2	N.O.
Dor	0,5	1,2	1,5	2,2	N.O.
Estimulações sexuais	N.O.	N.O.	0,2	N.O.	N.O.
Ferimentos	N.O.	N.O.	0,3	0,2	N.O.
Frêmito vocal	0,7	N.O.	N.O.	0,7	N.O.
Incoordenação	1,3	0,7	0,3	0,5	N.O.
Letargia	0,3	N.O.	N.O.	0,5	N.O.
Piloereção	0,2	N.O.	0,8	0,8	N.O.
Sangramento administração	0,3	0,5	0,3	N.O.	N.O.

N.O.: não observado

As observações comportamentais e frequência dos sinais clínicos observados no grupo que recebeu única dose do composto *Lapdesf ibu-tau* por via intraperitoneal estão indicadas no quadro 6, acima. Neste grupo foi apresentado óbito de um animal, sendo o animal encontrado morto e os órgãos coletados à tarde, no 5º dia de observação, quatro dias após a administração da substância. Como a administração deste ensaio foi feita por via intraperitoneal, em alguns casos tiveram um pequeno sangramento no local da administração logo após a mesma. A administração intraperitoneal é mais invasiva e traumática ao animal, sendo sinais de dor (piloereção, alterações posturais e na locomoção) identificados com maior intensidade nestes grupos quando comparados à administração de dose única por via oral.

Quadro 7: Observações comportamentais e média da frequência observada com administração de dose única do composto *Lapdesf ibu-ftd* por via intraperitoneal

Observações \ Grupos	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg	Controle dose única
Agressividade	N.O.	0,3	N.O.	N.O.	N.O.
Alteração da locomoção	N.O.	0,2	N.O.	0,2	N.O.
Alteração respiração	1,7	0,3	N.O.	N.O.	N.O.
Dor	N.O.	0,2	N.O.	N.O.	N.O.
Ferimentos	0,2	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.
Incoordenação	N.O.	N.O.	0,2	N.O.	N.O.
Letargia	N.O.	N.O.	N.O.	0,2	N.O.
Piloereção	N.O.	0,2	N.O.	0,2	N.O.
Sangramento administração	0,3	0,3	0,3	0,3	N.O.

N.O.: não observado

As observações comportamentais e frequência dos sinais clínicos observados no grupo que recebeu única dose do composto *Lapdesf ibu-ftd* por via intraperitoneal estão indicadas no quadro 7, acima. Neste grupo foi apresentado óbito de um animal, sendo o animal encontrado morto e os órgãos coletados pela manhã, no 3º dia de observação, dois dias após a administração da substância. Foi notado o sangramento no local de aplicação após a administração do composto em 1 animal de cada dose, podendo ser possivelmente a causa de morte do animal neste grupo, sendo avaliado nas análises posteriores essa hipótese.

Durante o período de observação dos animais foram identificados alguns sinais sugestivos de efeitos adversos como dor, determinada juntamente com sinais de piloereção, alteração locomoção, letargia e frêmito vocal. A agressividade foi notada em todos os ensaios e, como consequência, ferimentos por mordedura e comportamento sexual. Alterações na frequência respiratória e piloereção foram mais observadas após administração das substâncias, tanto devido à gavagem quando à administração via intraperitoneal, podendo ser relacionadas ao estresse relativo à manipulação e procedimento invasivo. A incoordenação é um achado comum entre os animais, mas anormal, pois o animal apresentava algum padrão de movimento

anormal que não chegava a se classificar como tremor ou convulsão já que não se enquadrava em um movimento padrão.

Os sinais observados podem caracterizar efeito tóxico dos compostos mas sendo esta subjetiva e possivelmente variável, dependendo de fatores como o observador, frequência e respeito ao regime estabelecido de observações, sendo a investigação aprofundada com dados mais objetivos como avaliação bioquímica e histopatológica.

O percentual de letalidade observado para os ensaios de dose única foram de 0% em administração por via oral e 16,7% em administração via intraperitoneal, para ambos compostos (n = 6).

Quadro 8: Observações comportamentais e média da frequência observada com administração de doses repetidas (10 dias) do composto *Lapdesf ibu-ftd* por via oral (gavage)

Observações \ Grupos	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	Controle doses repetidas
Agressividade	0,3	2	N.O.	N.O.
Alteração da locomoção	N.O.	0,7	0,7	N.O.
Alteração respiração	2,8	0,5	2,2	2,25
Dor	1,3	1,2	3,2	0,5
Ferimentos	0,3	1,3	0,3	0,5
Frêmito vocal	0,2	N.O.	N.O.	0,25
Incoordenação	0,3	0,5	0,7	N.O.
Letargia	0,3	0,7	2,2	N.O.
Piloereção	0,5	0,7	0,8	0,5
Sangramento nasal-oral	N.O.	0,2	N.O.	N.O.

N.O.: não observado

No quadro 8, acima, podemos perceber a observação de mais sinais clínicos que no caso dos ensaios de dose única devido ao maior tempo de exposição dos animais (10 dias seguidos de administração). Sinais como dor e letargia foram observados, sendo estes pensados que relacionados à toxicidade do composto *Lapdesf ibu-ftd*, sendo esta hipótese estudada pela análise bioquímica e histopatológica.

Quadro 9: Observações comportamentais e média da frequência observada com administração de doses repetidas (10 dias) do composto *Lapdesf ibu-tau* por via oral (gavage)

Observações \ Grupos	500 mg/kg	1000 mg/kg	1500 mg/kg	Controle doses repetidas
Agressividade	1,2	N.O.	0,5	N.O.
Alteração respiração	1	4,8	8,2	2,25
Dor	0,3	1,2	1,2	0,5
Ferimentos	0,3	0,5	0,2	0,5
Frêmito vocal	1	0,2	0,3	0,25
Incoordenação	1	0,3	1,2	N.O.
Irritabilidade	N.O.	N.O.	0,2	N.O.
Letargia	0,3	N.O.	0,8	N.O.
Piloereção	0,7	1	1,7	0,5
Sangramento nasal-oral	0,2	N.O.	1	N.O.

N.O.: não observado

Conforme o quadro 9, acima, foram observados sinais de dor e letargia assim como no caso de administração de doses repetidas do composto *Lapdesf ibu-ftd* mas sendo menos frequentes no caso da administração de doses repetidas do composto *Lapdesf ibu-tau*.

Durante o período de observação dos animais foram identificados alguns sinais sugestivos de efeitos adversos como dor, letargia, alterações de locomoção, incluindo incoordenação, sendo estes possíveis sinais de alguma toxicidade, sendo então a investigação aprofundada com ensaios menos subjetivos.

Sinais referentes à problemas hepáticos graves, como insuficiência hepática, incluem confusão mental (encefalopatia hepática) e falta de reação (coma hepático). Sinais referentes à problemas renais, como doença renal progressiva, podem ser notados sinais cardiovasculares (hipertensão, arritmia, ataque cardíaco congestivo), hematológicos (anemia, sangramentos), gastrointestinais (náusea, sangramento gastrointestinal, úlceras), neurológicos (letargia, tremores, fraqueza, neuropatia periférica, coma), e fisiológicos (depressão, ansiedade) (BURTIS *et al*, 2008; YODA & KODA-KIMBLE, 1995).

O percentual de letalidade observado para os ensaios de doses repetidas foi nulo em administração por via oral de ambos compostos (n = 6).

Quadro 10: Observações comportamentais e média da frequência observada no grupo ibuprofeno doses repetidas de 620 mg/kg (equimolar à dose 1000 mg/kg do composto *Lapdesf ibu-tau*) administrado por gavagem (n = 6)

Observações \ Grupo	Ibuprofeno 620 mg/kg	Controle doses repetidas
Agressividade	1,2	N.O.
Alteração da locomoção	1,3	N.O.
Alteração respiração	2,8	2,25
Dor	2,3	0,5
Ferimentos	1,3	0,5
Frêmito vocal	0,7	0,25
Incoordenação	0,5	N.O.
Letargia	3,5	N.O.
Piloereção	1,3	0,5
Sangramento nasal-oral	0,7	N.O.

N.O.: não observado

De acordo com o quadro 10, apresentado acima, é possível notarmos a maior frequência de sinais de toxicidade do que observada na administração, tanto de dose única quanto doses repetidas, dos compostos. A dose equimolar à este grupo do ibuprofeno apresentou característica de menor aparecimento de sinais clínicos sugestivos de toxicidade do que este grupo padrão delineado.

Normalmente, a gravidade e incidência de sinais clínicos de toxicidade são proporcionais à concentração e a duração da exposição dos compostos.

3.3.2. Análise ponderal e Avaliação do consumo de água e ração

Durante o tempo de experimentação foram realizados controle de peso e consumo de água e ração, sendo a análise ponderal feita semanalmente e avaliação da alimentação feita diariamente.

Peso corporal já está descrito como um parâmetro avaliado nos ensaios de toxicidade como um indicador, sendo a toxicidade sistêmica evidenciada por intermédio da diminuição de peso corporal e alterações no consumo de alimento e água, refletindo alteração no estado geral do animal (TEO, 2002; VALADARES, 2006).

A análise ponderal está apresentada em quadros para facilitar a visualização dos resultados obtidos. Os ensaios foram comparados com os respectivos grupos controle

sendo relevantes diferenças estatísticas observadas na diferença entre o peso inicial e o final de cada grupo.

Camundongos, assim como outros roedores, precisam de ração peletizada nutritiva, limpa e seca para melhor satisfazer as necessidades fisiológicas do animal (devido aos dentes), além de água limpa e de boa procedência à vontade. De acordo com Harkness & Wagner (1993), o consumo de ração e água é de 15g ração/100 g de animal e 15mL água/100g de animal, sendo que um adulto jovem pesando 30 g consumiria em torno de 4,5 g de ração e 4,5 mL de água. De acordo com Lewis (2008), um camundongo macho de 8 semanas, com 25 g de peso corpóreo, consome 3 g de ração por dia e 5 mL de água por dia.

No quadro 11, a seguir, temos a média $\pm$ desvio padrão do consumo de água e ração nos ensaios, sendo estes comparados ao respectivo grupo controle. O acompanhamento da ingestão de alimentos foi feito diariamente.

Foi possível a observação da redução do consumo de água nos grupos administrados por via oral o composto *Lapdesf ibu-tau* que receberam maior dose, tanto na dose única (2000 mg/kg) quanto nas doses repetidas (1500 mg/kg), podendo ser associada a algum tipo de efeito indesejado devido a alta dose mas esse tipo de informação só é confirmada ou excluída com ensaios mais aprofundados e diretos. Essa redução também foi observada no grupo de administração doses repetidas com ibuprofeno porém estando associada à maior aparecimento de sinal clínico caracterizado como dor.

Em relação ao consumo de ração apenas um grupo teve diferença significativa quando comparado ao controle, que foi o grupo do ibuprofeno, o que é mais esperado pois os animais apresentaram mais sinais clínicos sugestivos à toxicidade como dor e letargia.

Quadro 11: Consumo de água e ração dos ensaios de toxicidade

Ensaio	Consumo	Água (mL)	Ração (g)
	Dose		
Controle dose única		13,57 ± 0,96	7,00 ± 0,66
Dose única <i>ibu-tau</i> por via oral (gavage)	250 mg/kg	13,69 ± 1,16	8,02 ± 0,92
	500 mg/kg	12,14 ± 2,01	6,52 ± 1,15
	1000 mg/kg	13,69 ± 1,16	6,95 ± 1,33
	2000 mg/kg	10,12 ± 1,38*	5,55 ± 1,42
Dose única <i>ibu-tau</i> por via intraperitoneal	250 mg/kg	15,48 ± 1,37 *	7,74 ± 2,13
	500 mg/kg	15,00 ± 1,31	6,93 ± 1,73
	1000 mg/kg	15,12 ± 1,66	7,09 ± 1,83
	2000 mg/kg	12,26 ± 1,92	5,64 ± 1,39
Dose única <i>ibu-ftd</i> por via oral (gavage)	250 mg/kg	14,40 ± 1,24	8,05 ± 3,77
	500 mg/kg	13,09 ± 1,71	6,78 ± 2,06
	1000 mg/kg	12,98 ± 2,08	6,90 ± 3,23
	2000 mg/kg	13,45 ± 1,53	6,64 ± 2,83
Dose única <i>ibu-ftd</i> por via intraperitoneal	250 mg/kg	14,88 ± 1,22	7,74 ± 2,15
	500 mg/kg	13,81 ± 1,78	6,68 ± 1,39
	1000 mg/kg	14,76 ± 1,71	7,46 ± 1,70
	2000 mg/kg	12,86 ± 2,65	5,95 ± 1,20
Controle doses repetidas		14,02 ± 1,22	7,32 ± 1,01
Doses repetidas <i>ibu-tau</i> por via oral (gavage)	500 mg/kg	15,30 ± 1,78	8,96 ± 1,67
	1000 mg/kg	13,09 ± 3,26	7,75 ± 2,31
	1500 mg/kg	9,40 ± 2,52*	5,53 ± 1,67
Doses repetidas <i>ibu-ftd</i> por via oral (gavage)	250 mg/kg	14,88 ± 0,79	8,06 ± 0,88
	500 mg/kg	15,95 ± 0,85*	7,74 ± 1,22
	1000 mg/kg	13,45 ± 1,38	6,23 ± 1,35
Doses repetidas ibuprofeno por via oral (gavage)	620 mg/kg	8,33 ± 1,35*	5,33 ± 1,59*

* Estatisticamente diferente do grupo controle (Mann-Whitney, $p < 0.05$)

O consumo de água e alimento pode variar de acordo com diversos parâmetros, desde variações na temperatura e luminosidade até como indicativo de alterações na saúde dos animais. Uma menor ingestão de alimento e água (inanição) leva à morte de um animal que, por exemplo, apresenta sinal de toxicidade elevada. Quando o sinal de dor é observado, notamos que o animal tem menor vitalidade e, com isso, sua atividade geral é mais reduzida, sendo um parâmetro indireto para observação ou confirmação deste sinal as alterações alimentares.

O acompanhamento do peso dos ensaios dose única foram feitas no início e no término do experimento, e o acompanhamento do peso dos ensaios doses repetidas foram feitas em regime semanal, sendo a média ± desvio padrão de cada grupo apresentada no quadro 12, a seguir.

A evolução ponderal com a administração doses repetidas do composto *Lapdesf ibu-tau* é significativa pois existe uma diminuição no peso principalmente no grupo que recebeu a dose mais alta (1500 mg/kg). Este fato pode ser relacionado ao menor consumo de água (significante) e ração observado anteriormente neste grupo.

No caso da administração de doses repetidas do composto *Lapdesf ibu-ftd* foi observada aumento significativo no peso dos animais tratados com dose de 500 mg/kg, considerando aumento médio de 4 g durante o início e o término do experimento em relação ao controle, indicando que neste grupo os animais “engordaram” mas aparentemente sem relação ao tamanho dos órgãos (fígado), visto que o peso relativo não apresenta significância comparado ao controle.

No caso da administração de doses repetidas do ibuprofeno foi constatado diminuição no peso dos animais e diferenças significativamente importantes na evolução ponderal dos animais, além de diferença no tamanho do fígado.

Os camundongos podem perder peso devido à desidratação, inanição, dor, neoplasias e doenças (não) infecciosas (HARKNESS & WAGNER, 1993).

Quadro 12: Evolução ponderal (em gramas) dos camundongos machos tratados com os compostos híbridos de ibuprofeno, dos grupos controle (salina) e do grupo padrão (ibuprofeno) & peso relativo do fígado nos ensaios de toxicidade doses repetidas

Ensaio	n	Dose	Inicial	1 semana	Final	Varição	Fígado	Peso relativo
Controle dose única	4		25,29 ± 5,71	N.R.	39,93 ± 4,76	14,64 ± 5,31	N.R.	N.R.
Dose única <i>ibu-tau</i> por via oral (gavage)	6	250 mg/kg	24,83 ± 3,56	N.R.	35,48 ± 9,17	10,66 ± 7,24	N.R.	N.R.
	6	500 mg/kg	23,49 ± 1,56	N.R.	34,56 ± 5,99	11,07 ± 4,91	N.R.	N.R.
	6	1000 mg/kg	21,86 ± 1,87	N.R.	36,43 ± 4,00	14,57 ± 2,24	N.R.	N.R.
	6	2000 mg/kg	20,53 ± 1,63	N.R.	31,50 ± 8,46	10,95 ± 7,08	N.R.	N.R.
Dose única <i>ibu-tau</i> por via intraperitoneal	6	250 mg/kg	19,6 ± 2,77	N.R.	37,72 ± 8,25	17,62 ± 7,07	N.R.	N.R.
	6	500 mg/kg	19,86 ± 2,5	N.R.	37,16 ± 3,28	14,43 ± 1,87	N.R.	N.R.
	6	1000 mg/kg	19,48 ± 4,23	N.R.	36,39 ± 4,03	16,91 ± 3,63	N.R.	N.R.
	6	2000 mg/kg	17,41 ± 1,81 *	N.R.	32,20 ± 10,59	15,79 ± 9,26	N.R.	N.R.
Dose única <i>ibu-ftd</i> por via oral (gavage)	6	250 mg/kg	30,9 ± 3,62	N.R.	42,49 ± 7,08	10,43 ± 7,25	N.R.	N.R.
	6	500 mg/kg	30,97 ± 4,29	N.R.	41,47 ± 8,65	9,84 ± 5,81	N.R.	N.R.
	6	1000 mg/kg	30,52 ± 2,55	N.R.	38,43 ± 7,58	7,92 ± 7,34	N.R.	N.R.
	6	2000 mg/kg	28,13 ± 1,75	N.R.	35,85 ± 4,19	7,72 ± 4,22	N.R.	N.R.
Dose única <i>ibu-ftd</i> por via intraperitoneal	6	250 mg/kg	24,36 ± 1,86	N.R.	39,21 ± 9,01	14,85 ± 8,98	N.R.	N.R.
	6	500 mg/kg	21,64 ± 2,14	N.R.	38,23 ± 7,79	16,61 ± 6,99	N.R.	N.R.
	6	1000 mg/kg	23,34 ± 2,58	N.R.	41,51 ± 4,16	18,55 ± 3,61	N.R.	N.R.
	6	2000 mg/kg	20,49 ± 2,17	N.R.	35,85 ± 9,87	15,37 ± 8,94	N.R.	N.R.
Controle doses repetidas	4		33,29 ± 3,86	39,56 ± 3,40	42,3 ± 3,08	9,00 ± 1,39	2,20 ± 0,23	0,053 ± 0,01
Doses repetidas <i>ibu-tau</i> por via oral (gavage)	6	500 mg/kg	37,27 ± 1,70	44,05 ± 1,14 *	46,73 ± 3,36	8,95 ± 3,82	2,62 ± 0,33	0,056 ± 0,00
	6	1000 mg/kg	35,11 ± 3,09 *	40,54 ± 5,15	37,99 ± 9,19 *	2,88 ± 6,74	2,08 ± 0,49	0,055 ± 0,00
	6	1500 mg/kg	32,64 ± 3,49	32,87 ± 4,58 *	34,35 ± 3,72 *	1,67 ± 3,62 *	1,86 ± 0,39	0,054 ± 0,01
Doses repetidas <i>ibu-ftd</i> por via oral (gavage)	6	250 mg/kg	30,61 ± 3,92	35,83 ± 4,93	39,48 ± 3,93	8,95 ± 2,50	2,37 ± 0,26	0,060 ± 0,00
	6	500 mg/kg	30,73 ± 3,37	37,97 ± 4,08	43,78 ± 5,15	13,05 ± 2,51 *	2,57 ± 0,44	0,059 ± 0,01
	6	1000 mg/kg	30,49 ± 3,78	34,24 ± 5,92	38,64 ± 6,35	8,15 ± 3,20	2,40 ± 0,48	0,063 ± 0,01
Doses repetidas ibuprofeno por via oral (gavage)	6	620 mg/kg	30,15 ± 1,98	29,67 ± 2,00 *	32,34 ± 2,60 *	2,18 ± 1,72 *	1,73 ± 0,22 *	0,053 ± 0,00

n: número de animais; N.R.: não realizado. * Estatisticamente diferente do grupo controle (Mann-Whitney, p < 0.05).

3.3.3. Análise bioquímica do sangue

Os animais que permaneceram vivos até o final dos quatorze dias de experimentação foram sacrificados e, através da decapitação, foi realizada a coleta do sangue em *eppendorf* contendo heparina para obtenção do plasma.

Os ensaios bioquímicos foram realizados no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP/Araraquara), com kits comerciais Labtest. As enzimas analisadas são representativas de dano hepático e renal, sendo utilizadas para investigação da toxicidade de possíveis órgãos alvo, de acordo com a quantidade de amostra obtida.

A medida da atividade da transaminase glutâmica oxalacética (TGO) foi feita com amostra de sangue (plasma obtido com anticoagulante heparina), com o kit Labtest Transaminase Oxalacética (Ref. 52-200) por método cinético de tempo fixo e medição ponto final, com aplicação manual.

A TGO é encontrada em abundância do tecido cardíaco e hepático e, em concentração moderada, nos músculos esqueléticos, rins e pâncreas, tanto formas mitocondriais quanto citoplasmáticas. É mais relacionada, na clínica, à investigação de lesões cardíacas. A TGO catalisa a reação de transaminação de L-aspartato a 2-oxoglutarato para formação de oxalacetato e L-glutamato. Devido à presença, em grande quantidade, da enzima em diversos tecidos além do hepático, é necessária a avaliação simultânea da transaminase glutâmica pirúvica (TGP) para avaliação de alteração da função hepática, pois, se houver o aumento simultâneo nos níveis destas enzimas, a origem deve ser hepática (YODA & KODA-KIMBLE, 1995; BURTIS *et al*, 2008).

A medida da atividade da transaminase glutâmica pirúvica (TGP) foi feita com amostra de sangue (plasma obtido com anticoagulante heparina), com o kit Labtest Transaminase Pirúvica (Ref. 53-200) por método cinético de tempo fixo e medição ponto final, com aplicação manual.

A TGP é uma enzima praticamente citoplasmática (presente também nas mitocôndrias), proveniente do fígado e do rim, principalmente, mas também é encontrada em menor quantidade em outros tecidos. Catalisa a reação de transaminação de L-alanina a 2-oxoglutarato(2-cetoglutarato), originando L-glutamato e piruvato. É importante marcador de lesão hepática por sua grande disponibilidade nos hepatócitos (citoplasma), pois, quando há lesão, o conteúdo citoplasmático entra em contato com a corrente sanguínea, aumentando os níveis da TGP no soro. Quando existe uma lesão dos hepatócitos, é notada alterações significativas nos níveis de TGO e TGP, entretanto em episódios de lesão muscular aguda a TGP não possui aumento significativo, caracterizando-a como de maior especificidade em doenças parenquimais hepáticas. A elevação na atividade da TGP possui característica de persistir por maior período em comparação a TGO (KANEKO & HARVEY, 2008; YODA & KODA-KIMBLE, 1995; BURTIS *et al*, 2008).

A medida da atividade da gama glutamil transferase (GGT) foi feita com amostra de sangue (plasma obtido com anticoagulante heparina), com o kit Labtest Gama GT Liquiform (Ref. 105-2/30) por método cinético com aplicação manual.

A GGT está presente no citoplasma (microsomas) do túbulo renal, fígado, pâncreas e intestino, sendo o sistema hepatobiliar a maior fonte da enzima encontrada no soro. O aumento da GGT é notado em casos de doença hepática,

independente da causa. Esta enzima é uma das enzimas hepáticas mais sensíveis visualização de obstrução biliar e colecistite. (BURTIS *et al*, 2008; YODA & KODA-KIMBLE, 1995).

A medida da atividade da ureia foi feita com amostra de sangue (plasma obtido com anticoagulante heparina), com o kit Labtest Uréia CE (Ref.27-500) por sistema enzimático-colorimétrico com reação de ponto final com aplicação manual.

A ureia é produzida somente pelo fígado, como produto final do metabolismo de proteínas, sendo transportada para a corrente sanguínea e depois excretada pelos rins, sendo sua concentração plasmática determinante para avaliação da função renal, pois ela é completamente filtrada no glomérulo renal e depois é reabsorvida e secretada pelos túbulos nos néfrons. A utilidade clínica é quanto associada à avaliação da creatinina, visto que a ureia tem valor preditivo de desordens hepáticas e insuficiência renal, mas sendo influenciada por alimentação proteica, estado de hidratação e alterada se existir a presença de sangramento no trato gastrointestinal superior (YODA & KODA-KIMBLE, 1995; GARCIA & KANAAN, 2008).

A medida da atividade da creatinina foi feita com amostra de sangue (plasma obtido com anticoagulante heparina), com o kit Labtest Creatinina (Ref.35-100) por sistema colorimétrico com reação de ponto final com aplicação manual.

A creatinina é derivada da creatina e da fosfocreatina, principais constituintes dos músculos, sendo sintetizada nos rins, fígado e pâncreas. Possui taxa constante de formação, sendo um interessante parâmetro para avaliação, pois alterações são facilmente observadas. A concentração sérica da creatinina pode

ser relacionada à musculatura, mas, diferentemente da ureia, não é tão afetada por fatores exógenos e hepáticos. A excreção é exclusivamente renal, já que ela não é reabsorvida, refletindo a taxa de filtração renal. Deficiência na função renal é possivelmente indicada por aumento dos níveis de creatinina, entretanto este aumento no sangue é mais tardio que o da ureia (YODA & KODA-KIMBLE, 1995; KIRSZTAJN, 2007; OTTO, 1977; BURTIS *et al*, 2008).

O conjunto de enzimas para avaliação de possível dano hepático é então dado por TGO, TGP e GGT, e o conjunto para avaliação de possível dano renal é dado por creatinina e ureia.

A toxicidade de uma substância, costumeiramente, é observada em órgãos específicos. Um órgão que é muito suscetível aos efeitos tóxicos das substâncias é o fígado, tanto por ocupar uma posição central na administração por via oral ou intraperitoneal (veia porta hepática) quanto por estar intimamente ligado com metabolismo (LORA, 2007).

Os rins têm papel central na homeostasia e alterações da função renal, como sua redução, tem correlação com aumento da mortalidade e morbidade (BURTIS *et al*, 2008).

No quadro 13, abaixo, podemos observar os resultados da análise bioquímica do sangue dos camundongos.

Quadro 13: Resultados análise bioquímica do sangue dos Ensaios de Toxicidade dose única e doses repetidas dos híbridos de ibuprofeno, comparados estatisticamente com grupo controle (salina)

Ensaio	Enzimas		TGO	TGP	GGT	Uréia	Creatinina
	Dose						
Controle dose única			100,02 ± 20,98	24,86 ± 10,09	80,29 ± 29,95	42,55 ± 15,07	0,32 ± 0,13
	250 mg/kg		100,22 ± 18,84	24,37 ± 5,73	76,91 ± 20,11	48,16 ± 17,53	0,31 ± 0,13
	500 mg/kg		108,38 ± 24,39	25,94 ± 3,77	76,79 ± 51,11	47,20 ± 22,21	0,32 ± 0,20
	1000 mg/kg		98,59 ± 38,72	19,61 ± 6,53	85,54 ± 21,50	47,81 ± 18,92	0,33 ± 0,14
Dose única <i>ibu-tau</i> por via oral (gavage)	2000 mg/kg		122,62 ± 19,30	24,10 ± 10,18	88,14 ± 27,76	49,81 ± 12,59	0,31 ± 0,04
	250 mg/kg		118,42 ± 30,07	21,52 ± 10,55	117,19 ± 39,32	39,50 ± 10,40	0,36 ± 0,09
	500 mg/kg		127,05 ± 29,81	21,65 ± 10,85	117,19 ± 82,19	42,42 ± 12,23	0,41 ± 0,24
	1000 mg/kg		126,65 ± 35,37	34,96 ± 16,83	118,75 ± 26,14	44,33 ± 4,91	0,43 ± 0,16
Dose única <i>ibu-tau</i> por via intraperitoneal	2000 mg/kg		126,96 ± 22,70	35,02 ± 11,42	125,00 ± 44,19	47,38 ± 10,18	0,46 ± 0,13
	250 mg/kg		125,50 ± 54,04	27,55 ± 5,51	106,25 ± 52,30	45,33 ± 10,80	0,31 ± 0,10
	500 mg/kg		102,39 ± 35,93	34,99 ± 13,25	117,19 ± 15,62	52,79 ± 9,45	0,39 ± 0,18
	1000 mg/kg		118,45 ± 43,28	39,78 ± 4,84	120,66 ± 19,10	46,27 ± 16,09	0,40 ± 0,13
Dose única <i>ibu-ftd</i> por via oral (gavage)	2000 mg/kg		115,01 ± 39,72	45,49 ± 15,06*	125,00 ± 49,41	44,70 ± 7,47	0,38 ± 0,16
	250 mg/kg		123,64 ± 14,10	35,13 ± 5,23	101,56 ± 46,88	41,35 ± 3,34	N.R.
	500 mg/kg		126,85 ± 33,91	36,63 ± 20,28	101,56 ± 64,42	43,37 ± 9,11	0,33 ± 0,13
	1000 mg/kg		137,95 ± 30,56	33,29 ± 16,79	109,38 ± 74,39	44,24 ± 14,94	0,40 ± 0,16
Dose única <i>ibu-ftd</i> por via intraperitoneal	2000 mg/kg		133,15 ± 23,13	33,90 ± 6,46	125,00 ± 51,03	36,71 ± 7,50	N.R.
	Controle doses repetidas		116,92 ± 62,10	26,17 ± 12,76	93,75 ± 34,55	46,49 ± 15,43	0,36 ± 0,12
	500 mg/kg		130,60 ± 63,63	30,95 ± 7,79	118,75 ± 109,15	58,47 ± 5,64	0,40 ± 0,17
	1000 mg/kg		159,67 ± 24,30	18,20 ± 6,12	122,35 ± 44,97	57,62 ± 18,63	0,42 ± 0,15
Doses repetidas <i>ibu-tau</i> por via oral (gavage)	1500 mg/kg		156,31 ± 57,58	29,31 ± 7,94	131,25 ± 51,35	57,99 ± 5,09	0,44 ± 0,17
	250 mg/kg		126,37 ± 74,43	25,30 ± 8,21	104,17 ± 24,55	49,34 ± 11,22	0,39 ± 0,20
	500 mg/kg		140,56 ± 66,18	39,96 ± 11,51	118,05 ± 31,06	54,46 ± 10,84	0,42 ± 0,13
	1000 mg/kg		140,95 ± 48,53	31,12 ± 13,16	121,53 ± 66,49	54,59 ± 16,26	0,44 ± 0,09
Doses repetidas <i>ibu-ftd</i> por via oral (gavage)	620 mg/kg		138,07 ± 38,32	34,30 ± 12,40	159,73 ± 119,46	60,20 ± 23,28	0,72 ± 0,35

N.R.: Não realizado. *Diferente estatisticamente do grupo controle (Mann-Whitney, $p < 0,05$)

Não houve diferença estatística na avaliação das enzimas do sistema hepático (TGO, TGP e GGT) nos grupos tratados com os compostos, exceto na avaliação da enzima TGP, no grupo que recebeu *Lapdesf ibu-ftd* dose única de 2000 mg/kg por via oral, contudo, o valor encontrado não atinge níveis desta enzima considerados indicativo de toxicidade hepática, ou seja, no mínimo 3 vezes maior do que o limite superior considerado normal para camundongos (quadro 14).

Os valores das enzimas representativas do sistema renal (creatinina e ureia) se encontram dentro da faixa de valores considerados basais para esta espécie, portanto sem diferenças significativas em relação aos respectivos controles.

Por via oral, apesar da facilidade de administração, existe um maior impacto das variações fisiológicas e interferência na absorção dependente de presença ou ausência de alimento. Pela via intraperitoneal é evitada a barreira intestinal, permitindo também efeito de primeira passagem. A cavidade peritoneal possui grande superfície de absorção, sendo a substância absorvida mais rapidamente e entrando na circulação através da veia porta hepática. Esta via é um adicional para auxiliar na interpretação dos resultados pela via pretendida de administração (KLAASEN, 2012; VALLE, 1991).

Mesmo com a maior exposição e diferença na via de administração, não houve diferenças na toxicidade, segundo parâmetros avaliados.

A ureia, creatinina e ácido úrico são metabólitos nitrogenados de origem não proteica que são depurados após a filtração glomerular, através do sistema renal. A avaliação destes metabólitos é utilizada com foco no sistema renal, mensurando a situação da função renal (BURTIS *et al*, 2008).

Aumento de diversas enzimas hepáticas (TGO, TGP, GGT e fosfatase alcalina) pode advir de alterações reversíveis ou não às células hepáticas, podendo estar associadas com inflamação, hipóxia, colestase, necrose, agentes infecciosos e toxinas. No caso de desordens relacionadas ao sistema hepatobiliar, as enzimas mais importantes a serem avaliadas são a GGT e ALP por serem glicoproteínas ligadas à membrana, localizada na membrana dos canalículos dos hepatócitos. Quando ocorre uma lesão hepática, o conteúdo citoplasmático dos hepatócitos é exposto a corrente sanguínea, sendo as enzimas TGO e TGP são mais importantes neste caso por sua localização citosólica e mitocondrial.

Grandes quantidades de transaminases são liberadas na circulação sanguínea em caso de lesões aos hepatócitos, sendo importantes marcadores indiretos para determinação de danos hepáticos. (BURTIS *et al*, 2008).

Lesões colestáticas canaliculares e hepatocanaliculares induzidas por fármacos possuem sinais clínicos e bioquímicos similares a icterícia obstrutiva extra-hepática, sendo que é notado presença de icterícia, prurido, fezes claras e urina escura, com níveis altos de GGT (5 a 30 vezes o limite superior) e ALP, mas, geralmente, com nível de transaminases moderadamente alto. Elevações pequenas nos níveis de GGT são observadas em casos de fígado gordo e, quando transientes estes aumentos, intoxicação por fármacos (NAVARRO, 2006; LEE, 2003; ZIMMERMAN, 1999; ABOUD, 2007; BURTIS *et al*, 2008).

De acordo com guias adotados pelo FDA, American Pharmaceutical Manufactures, e American Association of the Study of Liver Diseases (AASLD), os níveis da TGP são considerados clinicamente significativos quando estão três vezes ou mais acima do limite superior do valor de referência e pode ser

associado aos níveis de bilirrubina para indicar anormalidades hepáticas, sendo que o nível total de bilirrubina tem que estar no mínimo duas vezes maior que o limite superior do valor de referência. Os níveis séricos de TGO e TGP podem estar aumentados em 100 vezes ou mais na presença de doença hepática parenquimal. (YODA & KODA-KIMBLE, 1995).

O equilíbrio entre TGO e TGP é importante para manter a homeostasia, sendo este equilíbrio representado por maior nível de TGO plasmática do que de TGP. No caso de injúria ao tecido hepático, ocorre a inversão da relação TGO/TGP. A TGP, mais específica para tecido hepático, é encontrada em maior nível que a TGO, indicando dano tissular, sendo um sinal clássico de hepatotoxicidade (BURTIS *et al*, 2008).

Algumas outras interpretações podem ser realizadas a partir do aumento das transaminases e da relação TGO/TGP, sendo que casos de aumento com inversão dos níveis podem caracterizar hepatite, e em casos de aumento sem inversão dos níveis podem ocorrerem em diversas patologias que afetam o tecido hepático, como hepatites alcoólicas, neoplasias e cirrose hepática (BURTIS & ASHWOOD, 2005).

Desordens hepatocelulares agudas são caracterizadas por aumento significativo de TGO e TGP. Já em quadros de necrose hepática extensa são encontrados níveis elevados destas enzimas, podendo este aumento ser de 8 a 200 vezes maior que o limite superior de referência. Na esteatose hepática é observado níveis moderados das transaminases, sendo comum a exposição crônica ao etanol, diabetes e obesidade. Outras patologias geralmente possuem elevação de 10 a 40 vezes em relação ao limite superior de referência para as transaminases (MOTA, 2003; BURTIS *et al*, 2008).

Para avaliar se os resultados dos ensaios bioquímicos são concordantes com os dados descritos na literatura (Quadro 14), foi feita uma revisão de algumas das principais referências de parâmetros bioquímicos específicos para camundongos.

Quadro 14: Parâmetros Bioquímicos - Valores de referência literatura

	Transaminase oxalacética (TGO)	Transaminase pirúvica (TGP)	Gama-glutamil transpeptidase (GGT)	Creatinina	Uréia
Canadian Council Animal Care ^a	55.0 - 251.0	28.0 - 184.0	-	-	12.14 - 20.59
Harkness & Wagner ^b	-	-	-	0.3 - 1.0	12.0 - 28.0
Research Animal Resources ^c	54.0 - 298.0	17.0 - 77.0	-	0.2 - 0.9	8.0 - 33.0
Charles River Laboratories International ^d	47.0 - 120.0	28.0 - 64.0	0.0 - 13.0	0.3	16.0 - 22.0
Danneman, Suckow & Brayton ^e	69.0 - 191.0	26.0 - 120.0	-	0.5 - 0.8	19.0 - 34.0
Loeb & Quimby ^f	63.4 - 328.6	12.7 - 185.3		0.65 - 1.55	17.9 - 58.1
Hrapkiewicz & Medina ^{g b h}	54.0 - 269.0	26.0 - 77.0	-	0.3 - 1.0	12.0 - 28.0

^a Ambos os sexos 19-21 semanas; ^b HARKNESS & WAGNER (1993); ^c *Reference Values for Laboratory Animals*, University of Minnesota; ^d Machos 8-10 semanas; ^e DANNEMAN *et al* (2001); ^f LOEB & QUIMBY (1999); ^g HRAPKIEWICZ & MEDINA (1998); ^h ANDERSON (1994)

Logo no início já é percebido a falta de referências em relação a GGT, sendo este um exame ainda não tão explorado em outros trabalhos. Por ser um ensaio mais sensível, o que se é mais utilizado para investigação de toxicidade hepática relacionada ao sistema hepatobiliar, como obstrução biliar, é a fosfatase alcalina (ALP), sendo a associação da investigação com estas duas enzimas uma boa opção, se não tivéssemos problemas relacionados à quantidade de sangue no modelo animal utilizado. A ALP tem procedência de vários tecidos, mas principalmente relacionada ao sistema ósseo e hepático (BURTIS *et al*, 2008).

Ao compararmos os dados da literatura, percebe-se diferenças notáveis em relação às enzimas para avaliação da atividade hepática, sendo que alguns

limites superiores seriam considerados alterados se comparados entre si. Além disso, quando comparamos os dados da literatura com os controles de nossos ensaios, pudemos observar coerência entre a maioria das enzimas, exceto em relação à GGT pela deficiência de dados na literatura. No caso da ureia encontramos um limite mais próximo de nossos controles, chegando estes a estarem quase superiores ao limite máximo, na maioria das comparações.

Diversos fatores são elencados como hipóteses para discrepância nos parâmetros bioquímicos intraespécie, sendo alguns destes: sexo e idade dos animais, regime alimentar e hídrico, local de coleta do material analisado, jejum, categoria sanitária, metodologia utilizada, entre outros (BOEHM *et al*, 2007; SANTOS *et al*, 2010).

Os parâmetros bioquímicos avaliados por este estudo visaram determinar toxicidade dos compostos híbridos de ibuprofeno em modelo animal pequeno e de fácil manuseio, iniciando os estudos pré-clínicos, procurando estabelecer relação entre dose, via e tempo de exposição *versus* efeito. Estes resultados podem ser extrapolados para espécie humana se realizados os ajustes e considerações interespécies, fornecendo uma visão futura dos ensaios toxicológicos destes compostos.

3.3.4. Análise histopatológica

Análise dos estômagos

O comprimento dos estômagos analisados variou de 1,2 a 2,2 cm com média de 1,7 e desvio padrão de 0,26. Para a altura variou de 1 a 2,1cm com média de 1,5cm e desvio padrão de 0,25 cm. Já a largura variou de 0,4 a 0,6cm

com média de 0,5cm e desvio padrão de 0,08cm. A coloração apresentou-se em tom de bege em todos os grupos analisados.

Já a análise histopatológica demonstrou epitélio glandular normal com células principais volumosas e de formas anguladas, citoplasma basofílico e aparência secretória. E as células parietais de forma angulada tendendo a serem arredondas e citoplasma eosinofílico. Já na região não glandular (pança), observamos epitélio pavimentoso queratinizado. Nenhum animal apresentou perda de continuidade do epitélio glandular (estômago) ou não glandular (pança), o que clinicamente demonstra ausência de úlceras. Além disso, foi observado leve infiltrado inflamatório crônico e apenas áreas focais de infiltrado inflamatório moderado. A exceção se fez presente no grupo *Lapdesfibu-tau* dose única de 2000mg/Kg intraperitoneal onde verificamos alteração de estrutura do parênquima, infiltrado inflamatório intramuscular e células eosinofílicas.

Na análise de presença de edema submucoso não foram observadas diferenças entre os grupos analisados. O mesmo ocorrendo para a análise da camada muscular submucosa (Figuras 10, 11, 12 e 13).

A ausência de úlceras é um achado que confirma os resultados obtidos por Vizioli (2009) e demonstra o efeito gastroprotetor dos híbridos de ibuprofeno, sendo uma característica interessante de compostos anti-inflamatórios destituídos de gastroulceração.

Análise dos fígados

O comprimento dos lobos hepáticos analisados variou de 1,5 a 2,3 cm com média de 1,8 e desvio padrão de 0,23. Para a altura variou de 0,7 a 1,8 cm com média de 1,3cm e desvio padrão de 0,21 cm. Já a largura variou de 0,3 a

0,6cm com média de 0,5cm e desvio padrão de 0,07cm. A coloração apresentou-se em tom de bege com tons amarelados ou acinzentados. A consistência dos órgãos ao corte demonstrou-se semelhante nos diferentes grupos.

Já na análise histológica, não foram evidenciadas grandes alterações histológicas nos fígados analisados (Figuras 10, 12 e 13), exceto no *Lapdesf* ibu-tau dose única de 2000mg/Kg intraperitoneal (Figura 11) onde verificamos células com alteração de coloração e picnose, evidenciando processo necrótico. Todavia, convém salientar que foi observada congestão em vasos hepáticos em todos os grupos analisados, tanto em espaço porta quanto em veia centrolobular. Também convém salientar que não foi evidenciada característica histológica de lipidose nos fígados analisados, mas variação de tamanho celular demonstrando possível acúmulo citoplasmático.

Análise dos rins

O comprimento dos rins analisados variou de 0,9 a 1,4 cm com média de 1,2 e desvio padrão de 0,13. Para a altura variou de 0,7 a 0,9 cm com média de 0,7cm e desvio padrão de 0,09 cm. Já a largura variou de 0,5 a 0,6cm com média de 0,56cm e desvio padrão de 0,05cm. A coloração apresentou-se em tom de bege com tons amarelados ou acinzentados.

Já na análise histológica, não foram evidenciadas alterações histológicas tanto na região cortical quanto na região medular (Figura 10, 12 e 13). De fato, observamos preservação unidades filtradoras com presença de cápsula de Bowman e manutenção de espaço urinário. Também observamos ductos proximais e distais normais e ausência de processos hemorrágicos. A exceção se fez em *Lapdesf* ibu-tau dose única de 2000 mg/kg intraperitoneal (Figura 11)

que apresentaram presença de hemorragia, espaço urinário diminuído e ductos proximais e distais com hiperchromasia, picnose e edema, denotando processo necrótico.

Análise dos Corações

O comprimento dos corações analisados variou de 0,7 a 1,0 cm com média de 0,9 e desvio padrão de 0,08. Para a altura variou de 0,5 a 0,8 cm com média de 0,65cm e desvio padrão de 0,07 cm. Já a largura variou de 0,4 a 0,7cm com média de 0,5cm e desvio padrão de 0,06cm. A coloração apresentou-se em tom de bege em todos os grupos analisados.

Já na análise histológica, não foram evidenciadas alterações histológicas nos corações analisados. De fato, observamos células musculares cardíacas com manutenção da estrutura geral e células cardíacas eucromáticas com núcleo central. Também observamos ausência de hipertrofia e preservação de discos intercalares. Os vasos demonstraram-se íntegros e não havia infiltrado inflamatório (Figuras 10, 11, 12 e 13).

Os achados histopatológicos dos animais que foram encontrados mortos, tanto no grupo *Lapdesf ibu-ftd* quanto no grupo *Lapdesf ibu-tau* que receberam dose única de 2000 mg/kg por via intraperitoneal, podem estar relacionados à toxicidade dos compostos mas também temos que levar em consideração o fato de que estes animais foram encontrados mortos, o que implicaria em alterações causadas devido à autólise *post-mortem*.

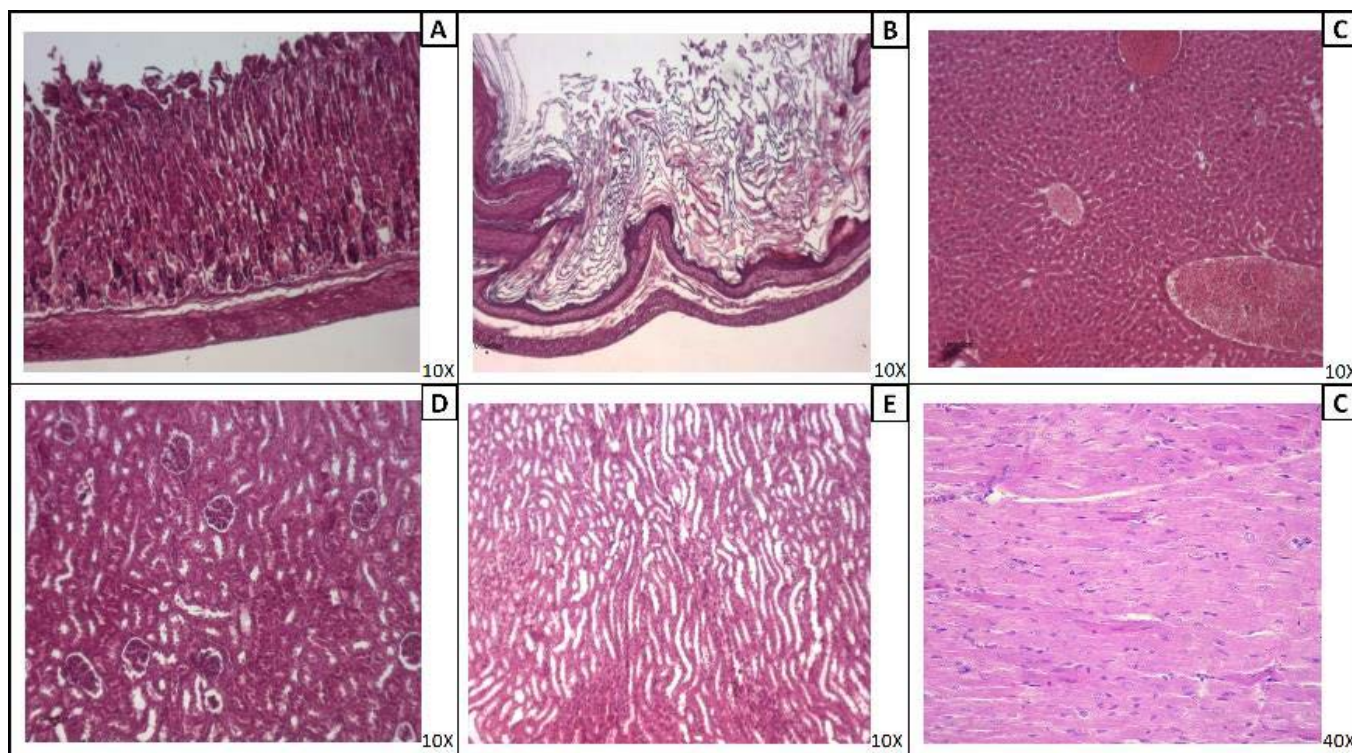
A autólise de tecidos normais em um corpo morto é denominada *post-mortem*, sendo que esta é distinguida da autólise em um corpo vivo devido pois, o *post-mortem*, é apresenta característica difusa, não focal e não inclui o

processo inflamatório. O processo autolítico *post-mortem* depende de diversos fatores, incluindo ambiente, temperatura e umidade. Diversos ensaios morfológicos com intervalos *post-mortem* diferentes foram realizados com o intuito de tentar estabelecer quais as alterações notadas pela diferença no tempo em que os tecidos foram coletados e armazenados em relação ao óbito e ao período entre extirpação e armazenamento adequado (SCARPELLI, 1990; JANSSEN, 1984; TOMITA, 2004).

No estudo de Tomita *et al* (2004) foram identificadas alterações ultra estruturais em diversos órgãos *in situ*, sendo os rins mais previamente acometidos, seguido de alteração hepática e pancreática, mas alterações também notadas no coração e músculo esquelético de ratos Wistar machos. As observações variam de edema celular (inchaço), aparecimento de densos depósitos amorfos nas mitocôndrias, perda de grânulos de glicogênio, dilatação do retículo endoplasmático, aglutinação e marginação da cromatina nuclear e/ou condensação da cromatina. Neste trabalho foi estabelecido qual alteração e o tempo de aparecimento de cada uma delas. No caso do fígado, após uma hora depois da morte do animal, já foi observado inchaço dos hepatócitos (edema celular), acúmulo de cromatina nuclear e perda de cristais mitocondriais. A demora na extirpação pode resultar na decomposição estrutural e funcional dos hepatócitos. Nos rins, no epitélio do túbulo proximal após três horas da morte dos animais foi notado ligeiro intumescimento mitocondrial e irregularidade na disposição das microvilosidades. No coração, após três horas da morte, foi observado inchaço das mitocôndrias, ligeiro edema celular e perda de grânulos de glicogênio no miocárdio ventricular (TOMITA, 2004; NUNLEY *et al*, 1972).

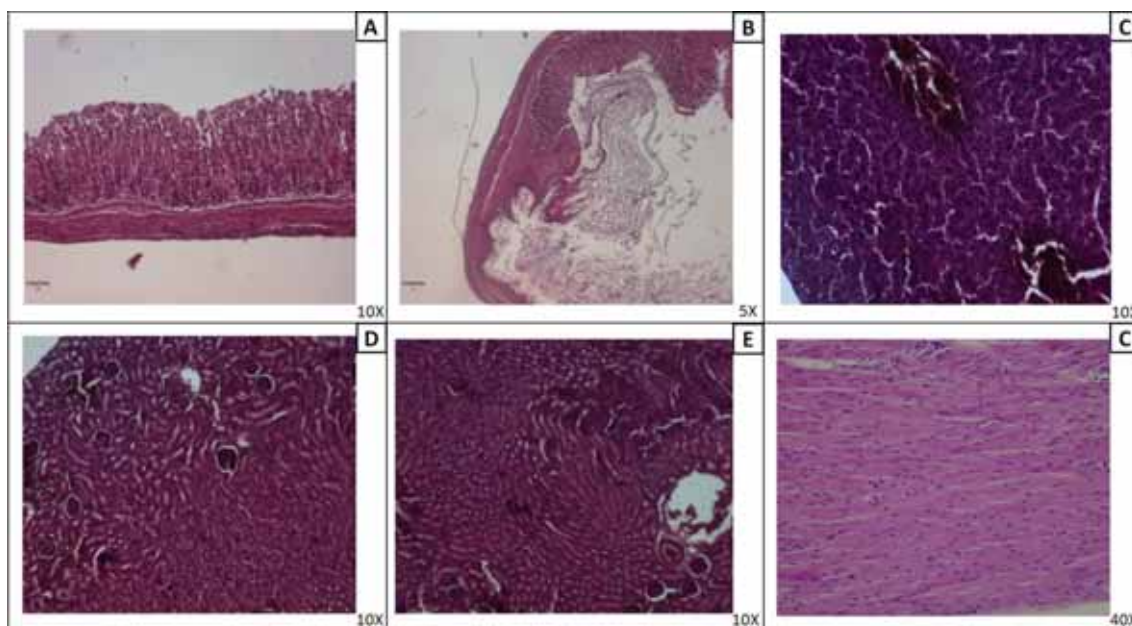
Estes fatores devem estar em mente enquanto analisamos as lâminas dos dois animais encontrados mortos. Apesar de os achados histopatológicos terem diversas hipóteses, é de extrema importância a continuação dos estudos, variando doses, regime e exposição para esclarecimento dos possíveis mecanismos de toxicidade.

Figura 10 – Lâminas da análise histopatológica (coradas por H.E.)



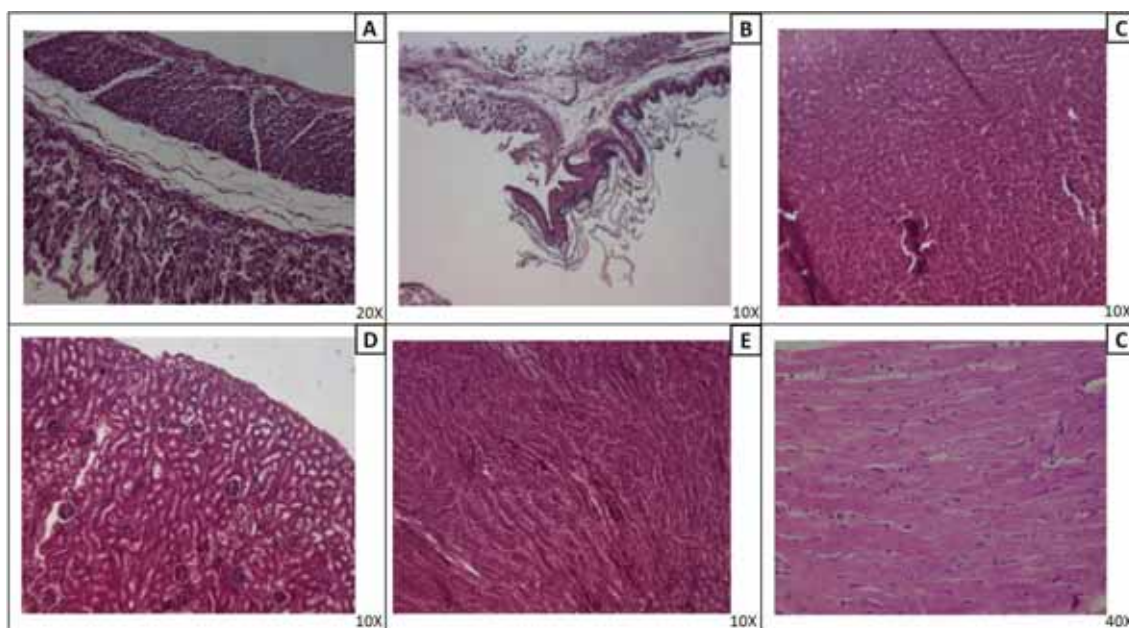
A- Área glandular de estômago, observe a presença de epitélio glandular normal com células principais de citoplasma basofílico e células parietais arredondadas e com citoplasma eosinofílico; **B-** Área não-glandular de estômago, observe a presença de epitélio pavimentoso queratinizado; **C-** Fígado demonstrando manutenção da estrutura e de sinusóides hepáticos. Observe também a presença de congestão em veia centro-lobular. **D-** Região cortical de Rim, observe ductos proximais e distais além de unidades filtradoras com presença de cápsula de Bowman e manutenção do espaço urinário. **E-** Região medular de Rim, observe ausência de edema celular e de infiltrado inflamatório; **F** – Coração, observe a presença de cardiomiócitos mantendo estrutura geral e de coloração eucromática com núcleo central. Também observe a presença de discos intercalares.

Figura 11: Lâminas da análise histopatológica animal encontrado morto do grupo *Lapdesf ibu-tau* dose única de 2000 mg/kg administrado intraperitonealmente (coradas por H.E.)



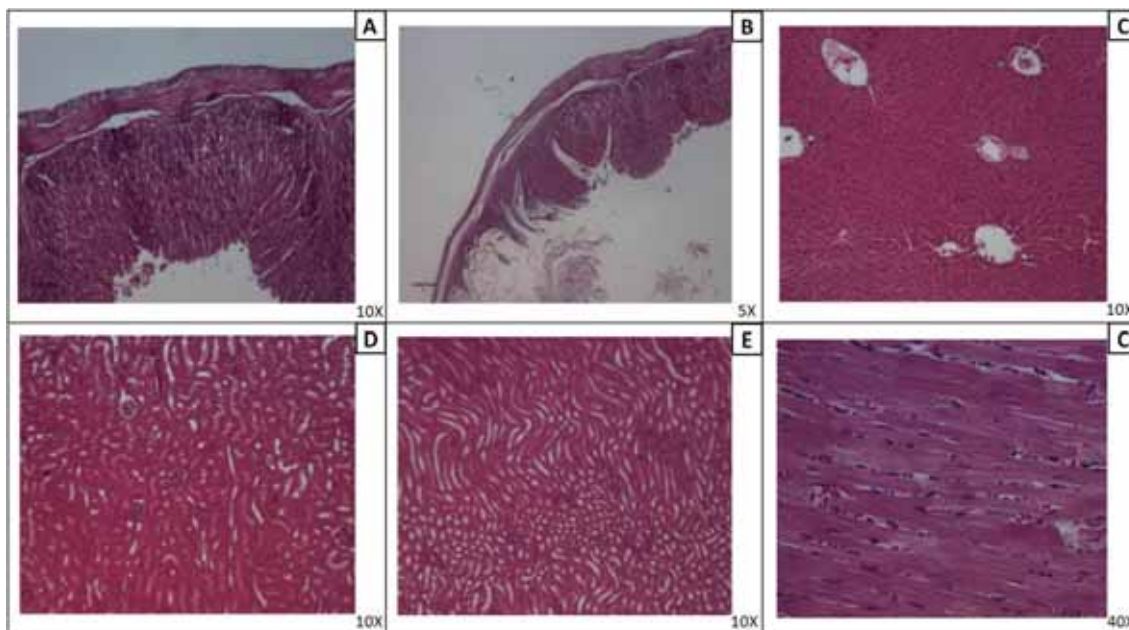
A - Área glandular de estômago, observe hiper cromasia, maior eosinofilia e presença de infiltrado inflamatório; **B**- Área não-glandular de estômago, sem alterações evidentes na região não glandular; **C**- Fígado, observe hiper cromasia, núcleos picnóticos e perda da estrutura hepática. **D**- Região cortical de Rim, observe hiper cromasia nas unidades filtradoras e em ductos proximais e distais, também se verifica hiper cromasia e edema celular em ductos, evidenciados pela redução da luz do ducto. **E**- Região medular de Rim, observe hiper cromasia, edema celular e núcleos picnóticos; **F** – Coração, sem sinais de alteração evidentes.

Figura 12: Lâminas da análise histopatológica animal encontrado morto do grupo *Lapdesf ibu-ftd* dose única de 2000 mg/kg administrado intraperitonealmente (coradas por H.E.)



A- Área glandular de estômago, observe perda de estrutura do parênquima glandular que se encontra eosinofílico e, na camada muscular, infiltrado inflamatório entremeando células musculares com núcleos picnóticos ; **B-** Área não-glandular de estômago, sem alterações evidentes na região não glandular ; **C-** Fígado, observe perda de sinusóides hepáticos e hepatócitos com núcleo picnótico . **D-** Região cortical de Rim, observe hipercromasia nas unidades filtradoras e em ductos proximais e distais, além de hipercromasia e edema de células dos ductos, evidenciado pela redução do espaço da luz do ducto. **E-** Região medular de Rim, observe hipercromasia, edema celular e núcleos picnóticos; **F** – Coração, sem sinais de alteração evidentes.

Figura 13: Lâminas da análise histopatológica do grupo ibuprofeno doses repetidas de 620 mg/kg (equimolar à dose 1000 mg/kg do composto *Lapdesf ibu-tau*) administrado por gavage (coradas por H.E.)



A- Área glandular de estômago, observe a presença de epitélio glandular normal com células principais de citoplasma basofílico e células parietais arredondadas e com citoplasma eosinofílico; **B-** Área não-glandular de estômago, observe a presença de epitélio pavimentoso queratinizado; **C-** Fígado demonstrando manutenção da estrutura e de redução de nitidez de sinusóides hepáticos. Observe também a presença de congestão em veia centro-lobular. **D-** Região cortical de Rim, observe ductos proximais e distais com células com edema e unidades filtradoras com redução do espaço urinário. **E-** Região medular de Rim, observe ausência de edema celular e de infiltrado inflamatório; **F** – Coração, observe a presença de cardiomiócitos mantendo estrutura geral e de coloração eucromática com núcleo central.

4. CONCLUSÃO

A síntese dos compostos apresentou relativa dificuldade devido ao rendimento e obtenção do produto em forma de líquido viscoso na primeira etapa de obtenção do composto *Lapdesf ibu-ftd* e à difícil solubilização da taurina e interferências na etapa de precipitação do composto *Lapdesf ibu-tau* com bicarbonato. As modificações foram realizadas visando a otimização destas sínteses, possibilitando quantidade de amostra para investigação da toxicidade.

Os achados comportamentais, bioquímicos e histopatológicos permitem concluir que não foi observada toxicidade nos modelos estudados.

A exceção é o grupo de administração dose única de 2000 mg/kg via intraperitoneal do composto *Lapdesf ibu-tau*. Entretanto, não foi possível avaliar se a morte dos animais que receberam dose única máxima intraperitoneal em ambos os compostos é relativo à possível toxicidade destes, já que não investigamos o mecanismo de toxicidade dos híbridos de ibuprofeno e sim os parâmetros para este início do estudo de avaliação pré-clínica dos compostos.

Com os resultados obtidos podemos prosseguir com realização de outros ensaios, alterando metodologias, tempo de exposição e também outros modelos animais, continuando a investigação da toxicidade destes candidatos a fármacos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOUD, G.; KAPLOWITZ, N. Drug-induced liver injury. **Drug Safety**, v. 30, n. 4, p. 277-294, 2007.

ADAMS, S. S. *et al.* Absorption, distribution and toxicity of ibuprofen. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 15, n. 2, p. 310-330, 1969.

ANDERSON, N. L. Basic husbandry and medicine of pocket pets. In **Saunders Manual of Small Animal Practice**, S. J. Birchard and R. G. Sherding (eds.), p. 1363 – 1389, 1994.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Guia Para A Condução de Estudos Não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento De Medicamentos**, Brasília, 2010.

BEAUCHAMP G.K.; KEAST, R.S.; MOREL, D.; LIN, J.; PIKA, J.; HAN, Q.; LEE, C.H.; SMITH, A.B.; BRESLIN, P.A., Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. **Nature**, v. 437: p. 45-46, 2005.

BESSONE, F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: What is the actual risk of liver damage? **World J Gastroenterol**, 16: 5651-61, 2010.

BOEHM, O.; ZUR, B.; KOCH, A.; TRAN, N.; FREYENHAGEN, R.; HARTMANN, M.; ZACHAROWSKI, K. Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57Bl/6 mice. **Biol Chem.** May;388(5):547-554. 2007

BOGATCHEVA, N. V.; SERGEEVA, M. G.; DUDEK, S. M.; VERIN, A. D. Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. **Microvasc Res**, v. 69 (3): p. 107-27, 2005.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C.. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. McGraw Hill Brasil, , 12 ed, 2012.

BUCKLEY, Christopher D. et al. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. **Trends in immunology**, v. 22, n. 4, p. 199-204, 2001.

BURTIS C, ASHWOOD E. **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry**. V. 5, Elsevier, 2005.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **TIETZ Fundamentos de Química Clínica**. Tradução da 6 ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2008.

CARVALHO, W.A.; CARVALHO, R.D.S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 54, p. 448-464, 2004.

CASTRO, L.F. Obtenção de candidatos a fármacos anti-inflamatórios não esteroidais destituídos de gastrotoxicidade, Araraquara: Unesp-FCF, 2008 **(Dissertação de Doutorado)**.

DANNEMAN, P.; SUCKHOW, M.A.; BRAYTON, C. **The Laboratory Mouse**. CRC Press, 2001.

DE MELO, Mônica Santos et al. A Systematic Review for Anti-Inflammatory Property of Clusiaceae Family: A Preclinical Approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

FERREIRA, S.H.; MONCADA, S.; VANE, J.R. Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. **Br. J. Pharmacol.**, v. 49, p 86-97, 1973.

FIORUCCI, S. & DISTRUTTI, E. COXIBs, CINODs and H₂S-releasing NSAIDs: current perspectives in the development of safer non steroidal anti-inflammatory drugs. **Curr Med Chem.**,v. 18 (23): p. 3494-505, 2011.

GABRIEL, S.E. & MATTESON, E.L. Economic and quality-of-life impact of NSAIDs in rheumatoid arthritis. A conceptual framework and selected literature review. **Pharmacoeconomics**. 1995;8(6):479-490.

HARKNESS J. E. ; WAGNER J. E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. 3rd ed. São Paulo: Livraria Roca Ltda; 1993.

HRAPKIEWICZ, K., L. M. & HOLMES, D. D. **Clinical Laboratory Animal Medicine: An Introduction**, 2nd ed, Iowa State University Press, Ames, IA. 1998.

JANSSEN, Werner. **Forensic histopathology**. Berlin: Springer-Verlag, 1984.

JAWABRAH AL-HOURANI B, SHARMA SK, SURESH M, WUEST F. Cyclooxygenase-2 inhibitors: a literature and patent review (2009 - 2010). **Expert Opin Ther Pat.**, v. 21 (9): p. 1339-432, 2011.

KANECO J.J.; HARVEY J.W.; BRUSS M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, v.6, p.388-400, 2008

KANAAN, S.; GARCIA, M. A. T. **Bioquímica clínica**. São Paulo: Atheneu, v. 241, 2008.

KIRSZTAJN, G.M. Avaliação do ritmo de Filtração Glomerular. **Jornal Brasileiro Patologia Med.**, v.3, p.257-264, 2007.

KLAASSEN, C.D. (Ed.). **Fundamentos em Toxicologia de Casarett and Doull**. 2a. ed. Porto Alegre: Mac Graw- Hill, 2012. 460 p

KUMMER, C.L.; COELHO, T.C.R.B. Anti-inflamatórios não-esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos atuais. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 52, p. 498-512, 2002.

LEE W.M. Drug-induced hepatotoxicity. **N Engl J Med**. 349:474; 2003.

LEWIS, R. J. **Hazardous chemicals desk reference**. John Wiley & Sons, 2008.

LEWIS, R. J. **Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials**. 8th ed. V. 3. New York, NY: Van Nostrand Reinhold, p. 2019, 1992.

LOEB, W.F., QUIMBY, F.W. **The Clinical Chemistry of Laboratory Animals**. 2 ed. Filadélfia, Taylor and Francis; 1999.

LORA, J.; CRICIÚMA, S. C. Avaliação da Toxicidade Aguda do Extrato Hidroalcoólico de Folhas de *Eugenia uniflora* L.(MYRTACEAE). UNESC, Criciúma/SC, 2007 **(Dissertação de Mestrado)**.

MEDZHITOV, Ruslan. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008

MILLER, O. G.; FERREIRA, A. C.; NERY, AL B. **Laboratório para o Clínico**. 3 ed. Atheneu, 1977

NAVARRO V.J. *et al*. Drug-related hepatotoxicity. **N Engl J Med**. 2006;354:731.

Non-clinical safety testing handbook – UNICEF/UNDP/World Bank/WHO – Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) NSAIDs in rheumatoid arthritis: A conceptual framework and selected literature review. **Pharmacoeconomics**. v. 8 (6), p. 479-490, 1995.

NUNLEY, W. C. et al. Delayed, in vivo hepatic post-mortem autolysis. **Virchows Archiv B**, v. 11, n. 1, p. 289-302, 1972

OECD (2001) Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method nº 423 < <http://www.oecd.org/dataoecd/17/50/1948370.pdf>> Acessado em 03 de Fevereiro de 2012.

OECD (1995) Guideline for Testing of Chemicals: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents nº 407 <<http://www.oecd.org/dataoecd/17/52/1948386.pdf>> Acessado em 07 de Fevereiro de 2012.

RANG, H. P.; DALE, M. M. & RITTER, J. M. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 227-231, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M. et al. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 318-326, 2011.

REIS, F.J.; ROCHA, N.P. Efeito analgésico de longa duração da dipirona sobre a hiperalgesia persistente induzida pela constrição do nervo ciático em ratos: participação do óxido nítrico. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 42, p. 513-522, 2006.

Research Animal Resources, *Reference Values for Laboratory Animals*, University of Minnesota. Disponível em <<http://www.ahc.umn.edu/rar/refvalues.html>>, acessado em 01/02/2014.

RICCIOTTI E, FITZGERALD GA. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 31(5): p. 986-1000, 2011.

ROLAND I, DE LEVAL X, EVRARD B, PIROTTE B, DOGNÉ JM, DELATTRE L. Modulation of the arachidonic cascade with omega3 fatty acids or analogues: potential therapeutic benefits. **Mini Rev Med Chem.** 4(6):659-68; 2004

SANTOS, M.R.V; SOUZA, V.H.; MENEZES, I.A.C.; BITENCURT, J.L.; REZENDE NETO, J.M.R.; BARRETO, A.S.; CUNHA, F.A.; MARÇAL, R.M.; TEIXEIRA SILVA, F. WUÍTANS JÚNIOR, L.J. BARBOSA, A.P.O. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena.** 6(10):1-6; 2010

SCARPELLI, D. G.; IANNACCONE, P. M. Cell death, autolysis and necrosis. **Anderson's pathology, 9th ed. St Louis, MO: Mosby**, p. 13, 1990.

SCARPIGNATO, Carmelo; HUNT, Richard H. Nonsteroidal antiinflammatory drug-related injury to the gastrointestinal tract: clinical picture, pathogenesis, and prevention. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 39, n. 3, p. 433-464, 2010.

SERHAN CN, HAEGGSTRÖM JZ, LESLIE CC. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. **FASEB J.** Aug;10(10):1147-58; 1996.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J.. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 77-104, 2006.

SHIN, J. ; BAEK, S.R.; SOHN, S.; CHO, Y.; LEE, K., Anti-inflammatory effect of pelubiprofen, 2-[4-(oxocyclohexylidenemethyl)-phenyl]propionic acid, mediated by dual suppression of COX activity and LPS-induced inflammatory gene expression via NF- κ B inactivation. **J. Cell. Bioch.**, Aug 1. doi: 10.1002/jcb.23290; 2011.

SOUZA BRITO, A.R.M. **Manual de Ensaios Toxicológicos In Vivo**, Ed. Da UNICAMP, 122p., 1995.

TEO S. STIRLING D, THOMAS S, HOBERMAN A, KIORPES A, KHETANI V. A 90-day oral gavage toxicity study of Dmethylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. **Toxicology** 179 (30): 183-196. 2002.

TOMITA, Yukari et al. Ultrastructural changes during in situ early postmortem autolysis in kidney, pancreas, liver, heart and skeletal muscle of rats. **Legal medicine**, v. 6, n. 1, p. 25-31, 2004

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégia após a “Era do Teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 3(2): 93-98, 2006.

VALLE, L.B.S. *et al*, **Farmacologia Integrada** . Vol. I — Fundamentos Farmacológicos da Terapêutica. RJ/SP. Atheneu, 1991.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Am. J. Med.**, v. 104: p. 2S-8S, 1998.

VIZIOLI, E.O.: Síntese de pró-fármacos recíprocos antiinflamatórios derivados de taurina como adjuvantes para o tratamento de artrite reumatóide. Araraquara: Unesp-FCF, 2006 (**Dissertação de Mestrado**).

VIZIOLI, E.O.: Ensaios pré-clínicos de híbridos ftalimídicos e pró-fármacos taurínicos derivados de anti-inflamatórios não esteróides. Araraquara: Unesp-FCF, 2009 (**Dissertação de Doutorado**).

WILCOX, C. Mel; CRYER, Byron; TRIADAFILOPOULOS, George. Patterns of use and public perception of over-the-counter pain relievers: focus on nonsteroidal antiinflammatory drugs. **The Journal of rheumatology**, v. 32, n. 11, p. 2218-2224, 2005.

YOUNG, L. Y., M.A. KODA-KIMBLE. **Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs**. 6th ed. Vancouver, WA., Applied Therapeutics, p. 29-12; 1995.

ZIMMERMAN, H.J. Hepatotoxicity: **Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver**. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 1999.

6. APÊNDICES

Aprovação Protocolo Comitê de Ética no Uso de Animais

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 03/2012

Pesquisador: CARLA MARIA RIBEIRO FERREIRA

Orientador: Prof^{Dr} Chung Man Chin

Projeto: Preparação de derivados de ibuprofeno e ensaio de toxicidade pré-clínica dose única (aguda) e doses repetidas em ratos.

Experimento: Ensaios de toxicidade pré-clínica dose única (aguda) e doses repetidas em ratos para verificação da segurança e caracterização do perfil toxicológico dos derivados de ibuprofeno.

Parecer nº 15/2012 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais, em reunião do dia 18 de maio de 2012, verificou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Ensaios de toxicidade pré-clínica dose única (aguda) e doses repetidas em ratos para verificação da segurança e caracterização do perfil toxicológico dos derivados de ibuprofeno.", apresentado pela acadêmica Carla Maria Ribeiro Ferreira, sob orientação da Prof^{Dr} Chung Man Chin, do Departamento de Fármacos e Medicamentos desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em FEVEREIRO de 2012, em formulário próprio para esse fim.

Araraquara, 21 de maio de 2012.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Aprovação Alteração Protocolo Comitê de Ética no Uso de Animais

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 03/2012

Interessado: CARLA MARIA RIBEIRO FERREIRA

Orientador: Profª Drª Chung Man Chin

Projeto: Preparação de derivados de ibuprofeno e ensaio de toxicidade pré-clínica dose única (aguda) e doses repetidas em ratos

Parecer nº 41/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 14 de Agosto de 2013, analisou o pedido de alteração do título e do modelo animal do protocolo para uso de animais na pesquisa: "Preparação de derivados de ibuprofeno e ensaio de toxicidade pré-clínica dose única (aguda) e doses repetidas em ratos" para "Preparação de derivados de ibuprofeno e ensaio de toxicidade pré-clínica dose única (aguda) e doses repetidas em camundongos", apresentado pela graduanda Carla Maria Ribeiro Ferreira, sob orientação da Profª Drª Chung Man Chin, do Departamento de Princípios Fármacos e Medicamentos desta Faculdade.

Diante da justificativa apresentada, foi verificado que o protocolo está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, sendo esta Comissão FAVORÁVEL à alteração.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em JANEIRO de 2014, em formulário para este fim.

Araraquara, 14 de agosto de 2013.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRSTANI
Coordenador da CEUA

Ficha de acompanhamento comportamental (FERREIRA, CMR)

TOXICIDADE AGUDA														
Grupo														
n° animal														
Peso (g)														
Sangramento administração														
Sangramento nasal-oral														
Agressividade														
Alteração da locomoção														
Alteração respiração														
Alteração tônus muscular														
Coma														
Convulsões														
Dor														
Estimulações sexuais														
Ferimentos														
Fretido vocal														
Incoordenação														
Insuficiência cardíaca														
Insuficiência respiratória														
Iritabilidade														
Letargia														
Piloereção														
Ptozes														
Tremores														

Data: _____ Amostra: _____ Dose: _____

Via: _____ Tempo de observação: _____

Investigador: _____

7. DADOS FINAIS

De acordo,

Carla Maria Ribeiro Ferreira

Profa. Dra. Chung Man Chin

Araraquara, ____ de _____ de 2014