UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

GISELLY GABRIELY BARBOSA DE LIRA ARAÚJO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO COMPLEXO Ni(II)-MELOFEN VI EM CAMUNDONGOS SWISS FÊMEAS

João Pessoa - PB

2025

GISELLY GABRIELY BARBOSA DE LIRA ARAÚJO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO COMPLEXO Ni(II)-MELOFEN VI EM CAMUNDONGOS SWISS FÊMEAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biomedicina da Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Biomédicas, Campus I, João Pessoa - PB, em cumprimento às exigências para obtenção do Grau de Bacharel em Biomedicina, da Universidade Federal da Paraíba - Campus I, João Pessoa/PB.

Orientador: Prof. Dr. Wallace Felipe Blohem Pessoa

JOÃO PESSOA - PB
2025

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A663a Araújo, Giselly Gabriely Barbosa de Lira.
Avaliação da toxicidade aguda do complexo Ni(II)-Melofen VI em camundongos Swiss fêmeas / Giselly Gabriely Barbosa de Lira Araújo. - João Pessoa, 2025.
87 f. : il.

Orientação: Wallace Felipe Blohem Pessoa.
TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Base de Schiff. 2. Complexo metálico. 3. Toxicidade aguda. 4. Camundongo. 5. Níquel. I. Pessoa, Wallace Felipe Blohem. II. Título.

UFPB/CCS CDU 577.3:61(043.2)

Elaborado por Jadson Videres Pamplona - CRB-15: PB000366/0

GISELLY GABRIELY BARBOSA DE LIRA ARAÚJO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO COMPLEXO Ni(II)-MELOFEN VI EM CAMUNDONGOS SWISS FÊMEAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biomedicina da Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Biomédicas, Campus I, João Pessoa - PB, em cumprimento às exigências para obtenção do Grau de Bacharel em Biomedicina, da Universidade Federal da Paraíba - Campus I, João Pessoa/PB

APROVADO EM: 28/04/2025

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br
WALLACE FELIPE BLOHEM PESSOA
Data: 07/05/2025 14:02:58-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dr. Wallace Felipe Blohem Pessoa (Orientador)

Universidade Federal da Paraíba

Documento assinado digitalmente
gov.br
LUCIENE SIMOES DE ASSIS TAFURI
Data: 07/05/2025 13:32:54-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dra. Luciene Simões de Assis Tafuri

Universidade Federal da Paraíba

Documento assinado digitalmente
gov.br
RUBENS DA SILVA ARAUJO
Data: 06/05/2025 21:11:02-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Me. Rubens da Silva Araújo

Universidade Federal da Paraíba

Dedico este trabalho à família Teodósio de Araújo, Barbosa de Lira e meu noivo Edilson Júnior por serem minha fonte de amor, força e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, dono da minha vida e fonte inesgotável de sabedoria, graça e misericórdia. Ele me proporcionou força e esperança nos dias em que o medo e o desânimo batiam à porta. Ele estava me guiando ao longo deste processo e protegendo-me nos dias de angústia e incerteza. Foi Ele a esperança de que, no fim, teria riso em meu rosto. Ele quem me fez chegar até aqui, a vitória é dEle!

Agradeço à minha família, toda a minha educação advém deles, eles investiram em minha vida e cada passo culmina em quem sou hoje. Agradeço aos meus pais que nunca mediram esforços para investirem na minha educação, pelos incentivos, por acreditarem em um futuro brilhante para mim e me impulsionar a chegar aonde sempre quis, essa conquista é de vocês!

Agradeço à minha mãe, Luciana, minha inspiração de força, pelos desejos de crescimento, sempre com suas palavras de incentivo e esperança de que valeria a pena todo esforço.

Agradeço ao meu pai, Gilliandre, por investir arduamente em minha formação, por me encorajar, pela paciência durante esse tempo difícil de execução e elaboração do meu trabalho.

Agradeço a meu noivo, Edilson Júnior, por seu apoio inestimável durante a graduação, por ouvir meus medos, enxugar minhas lágrimas, celebrar minhas vitórias, por toda ajuda prestada mesmo sendo de uma área oposta a minha. Sua disponibilidade em me ajudar nas análises estatísticas tornou essa jornada mais leve.

Agradeço aos meus avós, em especial minha avó Genilda que nunca mediu esforços para investir nos meus estudos e por todo apoio e amor dedicado durante minha trajetória.

Agradeço às minhas irmãs, Denise, Danielle e Hanna, por todo amor e incentivo, meu desejo é ser uma inspiração para vocês.

Agradeço a Ana, pelo apoio e incentivo constantes durante a minha vida, tanto na vida pessoal quanto durante a elaboração deste trabalho. Agradeço por acreditar no meu sucesso e contribuir para isso.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Wallace Blohem, pelos longos seis anos de orientação dedicada na iniciação científica. Desde o início, quando eu era uma estudante iniciante, ele acreditou no meu potencial e me guiou com sabedoria. Agradeço pelos valiosos ensinamentos e orientações os quais contribuíram para o meu crescimento científico e formam quem sou hoje. Agradeço a gentileza, disponibilidade e confiança no meu trabalho. Sua amizade e apoio foram essenciais ao longo dessa jornada. A ele a minha admiração, não apenas como orientador, mas como alguém que me inspirou a amar a ciência.

Agradeço ao Prof. Dr. Jailton Ferrari por gentilmente ceder os compostos utilizados nesta pesquisa.

Agradeço ao Prof. Dr. Adriano Francisco por me receber no Laboratório de Imuno Patologia Experimental (LABIPEX), todas as reuniões semanais me fizeram amadurecer no campo científico e foi nesse laboratório que desenvolvi minha pesquisa. Ademais, agradeço a colaboração direta em minha pesquisa através da análise e fotografia das lâminas histológicas.

Agradeço a todos os membros do LABIPEX pelo acolhimento, colaboração e incentivo fundamental durante a execução desta pesquisa. Agradeço em especial a João Pedro por sua contribuição na realização deste trabalho.

Agradeço ao corpo docente do curso de Biomedicina da Universidade Federal da Paraíba pois todos vocês contribuíram de forma positiva em minha formação acadêmica.

Agradeço a todos os amigos que passaram por mim nessa caminhada e marcaram positivamente minha vida, pela companhia nas batalhas vividas, pela amizade e apoio. Em especial às minhas amigas e irmãs na fé, Daniele e Elisa por suas palavras graciosas de incentivo e por todo encorajamento.

Gratidão a todos que contribuíram direta ou indiretamente e que tiveram importância para concretização deste trabalho marcando uma etapa importante em minha vida.

“Esta é minha ordem: Seja forte e corajoso! Não tenha medo nem desanime, pois o Senhor, seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

RESUMO

A formação de complexos metálicos com metais de transição, como o níquel, tem despertado interesse na pesquisa biomédica, especialmente devido às suas propriedades farmacológicas promissoras, incluindo atividades antibacteriana, antifúngica, antitumoral e anti-inflamatória. Um estudo importante para investigar novas moléculas é o teste de toxicidade, sendo o estudo de toxicidade aguda o primeiro realizado pois permite a determinação de faixas de exposição definidas onde a letalidade é esperada. A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), na diretriz 423, estabelece o protocolo de toxicidade aguda com o objetivo de observar a manifestação de possíveis efeitos tóxicos de uma substância fornecendo subsídios referentes aos riscos à saúde após uma exposição de curta duração avaliar. A avaliação toxicológica é realizada por meio de ensaios biológicos em animais e os resultados são extrapolados para humanos e outros animais. Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda do complexo metálico Ni(II)-Melofen VI em camundongos swiss fêmeas, conforme a diretriz 423 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD). Para isso utilizaram-se quinze camundongos fêmeas da linhagem Swiss, distribuídas em cinco grupos experimentais em que foram administradas doses únicas por via gavagem oral do ligante ou do complexo metálico em doses de 300 e 2.000 mg/kg. Os parâmetros analisados incluíram a avaliação da toxicidade aguda, variação de peso corporal, consumo hídrico e alimentar, verificação do peso úmido dos órgãos, além da análise macroscópica e histológica de fígado, rins, baço, pulmões e coração. Os resultados indicaram toxicidade significativa do complexo Ni(II)-Melofen VI na dose de 2.000 mg/kg, com 100% de mortalidade e alterações histopatológicas nos pulmões, fígado e rins. Na dose de 300 mg/kg, a mortalidade foi de 50%. Por outro lado, o ligante isolado não apresentou toxicidade significativa em nenhuma das doses testadas. A análise estatística confirmou diferenças significativas na taxa de sobrevivência entre os grupos. Porém, ao observar o ganho de peso corporal, consumo hídrico, alimentar e peso dos órgãos, os grupos experimentais não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos analisados. Com relação à análise macroscópica, um padrão consistente semelhante ao grupo controle foi observado para os grupos tratados, apenas o pulmão apresentou alterações na cor e textura nos grupos complexo metálico em ambas as dosagens. A análise microscópica indicou alterações histológicas em todos os órgãos avaliados para os grupos complexo metálico na dosagem elevada e na dosagem mais baixa no animal que morreu antes do fim do período experimental. Contudo, os órgãos dos animais dos grupos ligante do complexo e o animal sobrevivente do complexo metálico da dosagem de 300 mg/kg apresentaram achados histológicos semelhantes ao grupo controle. Portanto, conclui-se que o complexo Ni(II)-Melofen VI apresenta toxicidade dose-dependente, enquanto o ligante do complexo não apresentou sinais de toxicidade.

Palavras-Chave: base de Schiff; complexo metálico; toxicidade aguda; camundongo; níquel.

ABSTRACT

The formation of metal complexes with transition metals, such as nickel, has aroused interest in biomedical research, especially due to their promising pharmacological properties, including antibacterial, antifungal, antitumor and anti-inflammatory activities. An important study to investigate new molecules is the toxicity test, with the acute toxicity study being the first performed because it allows the determination of defined exposure ranges where lethality is expected. The Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), in guideline 423, establishes the acute toxicity protocol with the objective of observing the manifestation of possible toxic effects of a substance, providing subsidies regarding health risks after a short-term exposure assessment. The toxicological evaluation is performed through biological tests in animals and the results are extrapolated to humans and other animals. This study aimed to evaluate the acute toxicity of the metal complex Ni(II)-Melofen VI in female Swiss mice, according to guideline 423 of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Fifteen female Swiss mice were used for this purpose and distributed into five experimental groups, in which single doses of the ligand or the metal complex were administered via oral gavage at doses of 300 and 2,000 mg/kg. The parameters analyzed included the evaluation of acute toxicity, body weight variation, water and food consumption, verification of the wet weight of the organs, in addition to macroscopic and histological analysis of the liver, kidneys, spleen, lungs and heart. The results indicated significant toxicity of the Ni(II)-Melofen VI complex at a dose of 2,000 mg/kg, with 100% mortality and histopathological alterations in the lungs, liver and kidneys. At a dose of 300 mg/kg, mortality was 50%. On the other hand, the ligand alone did not show significant toxicity at any of the doses tested. Statistical analysis confirmed significant differences in the survival rate between the groups. However, when observing body weight gain, water and food consumption, and organ weight, the experimental groups did not show statistically significant differences between the groups analyzed. Regarding the macroscopic analysis, a consistent pattern similar to the control group was observed for the treated groups, with only the lung showing changes in color and texture in the metal complex groups at both doses. The microscopic analysis indicated histological changes in all organs evaluated for the metal complex groups at the high dose and at the lowest dose in the animal that died before the end of the experimental period. However, the organs of the animals in the complex ligand groups and the surviving animal of the metal complex at the dose of 300 mg/kg showed histological findings similar to the control group. Therefore, it is concluded that the Ni(II)-Melofen VI complex presents dose-dependent toxicity, while the complex ligand did not show signs of toxicity.

Keywords: Schiff base; metal complex; acute toxicity; mouse; nickel.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1
Estrutura geral das bases de Schiff 19
FIGURA 2
Reação de síntese das bases de Schiff 19
FIGURA 3
Estruturas químicas de compostos do tipo salen/salofen ……..…….....21
FIGURA 4
Estruturas químicas de compostos do tipo melen/melofen …….....22
FIGURA 5
Estrutura química do melofen VI .....…….....33
FIGURA 6
Estrutura química do complexo metálico Ni(II)-melofen VI 33
FIGURA 7
Delineamento experimental do protocolo de toxicidade aguda 35
FIGURA 8
Análise macroscópica do fígado .....…….....50
FIGURA 9
Análise macroscópica dos rins .....…….....51
FIGURA 10
Análise macroscópica do baço ….....….....52
FIGURA 11
Análise macroscópica dos pulmões .....…….....53
FIGURA 12
Análise macroscópica do coração …….....…….....54
FIGURA 13
Cortes histológicos de fígado dos camundongos corados em HE.....56
FIGURA 14
Cortes histológicos dos rins dos camundongos corados em HE.....….....57
FIGURA 15
Cortes histológicos do baço dos camundongos corados em HE ..…….....59
FIGURA 16
Cortes histológicos dos pulmões dos camundongos corados em HE....….....60
FIGURA 17
Cortes histológicos do coração dos camundongos corados em HE..…….....61

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1
Distribuição dos grupos experimentais 32
QUADRO 2
Mortalidade dos camundongos 39

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1
Análise de sobrevivência entre os grupos experimentais 40
GRÁFICO 2
Peso corporal dos animais 43
GRÁFICO 3
Consumo de ração…….....45
GRÁFICO 4
Consumo de água …….....46
GRÁFICO 5
Peso úmido do fígado 47
GRÁFICO 6
Peso úmido dos rins 47
GRÁFICO 7
Peso úmido do baço ….....48
GRÁFICO 8
Peso úmido dos pulmões 48
GRÁFICO 9
Peso úmido do coração 48

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BS – base de Schiff

CM – complexos metálicos

OECD – Organização para a Cooperação a Desenvolvimento Econômico

COX – ciclo-oxigenase

LOX – lipoxigenase

AINEs – anti-inflamatórios não esteroidais

HIV – vírus da imunodeficiência humana

AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida

HSV – vírus herpes simplex

MHV – vírus da hepatite murina

GHS – sistema harmonizado globalmente para a classificação e rotulagem de produtos químicos

SNC – sistema nervoso central

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

IPeFarM – Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos

CBIOTEC – centro de biotecnologia

DMSO – dimetilsulfóxido

LC – ligante do complexo

CCEN – Centro de Ciências Exatas e da Natureza

CONCEA – conselho de experimentação animal

ANOVA – análise de variância

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **16**
1.1 Justificativa e relevância do projeto de pesquisa 18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA **19**
2.1 Bases de Schiff 19
2.2 Complexos metálicos 22
2.3 Atividade biológica dos complexos metálicos 25
2.4 Toxicidade aguda 27
3 OBJETIVOS **30**
3.1 Objetivo geral 30
3.2 Objetivos específicos 30
4 METODOLOGIA **31**
4.1 Aspectos éticos 31
4.2 Grupos experimentais 31
4.3 Obtenção do complexo Ni(II)-melofen VI 33
4.4 Protocolo de toxicidade aguda 34
4.5 Eutanásia 35
4.6 Determinação do peso úmido dos órgãos 36
4.7 Análise macroscópica 36
4.8 Análise histológica 36
4.9 Análise estatística 37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO **38**
5.1 Toxicidade aguda 38
5.2 Peso dos animais 42
5.3 Consumo de ração 44
5.4 Consumo de água 45
5.5 Peso úmidos dos órgãos 46
5.6 Análise macroscópica 49
5.6.1 Fígado 49
5.6.2 Rins 50
5.6.3 Baço 51
5.6.4 Pulmões 52
5.6.5 Coração 53
5.6.6 Análise global 54
5.7 Análise microscópica 55
5.7.1 Fígado 55
5.7.2 Rins 55

5.7.3 Baço 58
5.7.4 Pulmões 58
5.7.5 Coração 58
5.7.6 Análise global 62
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES 64
REFERÊNCIAS 65

1 INTRODUÇÃO

As bases de Schiff (BS) foram sintetizadas pela primeira vez pelo químico alemão Hugo Schiff (1824), a reação de síntese dessas bases é simples e consiste na condensação de uma amina primária com um composto carbonílico. Essa reação é reversível e apresenta como produto a formação de uma imina/azometina (C=N) e tem como subproduto uma molécula de água (Mukhtar *et al*, 2021; Kajal *et al*, 2013; Moldoveanu, 2010).

As BS apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, que são potencializadas quando interagem com íons metálicos, especialmente os metais de transição, sendo a ligação C=N da azometina fundamental para a sua atividade biológica (Tan *et al*, 2014; Parveen, Arjmand, Ahmad, 2014).

Diante disso, as BS são consideradas uma classe de ligantes privilegiados utilizadas para coordenação com diversos íons metálicos, possuindo capacidade única de formar complexos organometálicos estáveis, pois pelo processo de quelação é capaz de diminuir a polaridade dos íons metálicos envolvidos (Shi *et al*, 2007).

Desde a descoberta da cisplatina, um quimioterápico, medicamentos à base de metais têm sido amplamente estudados devido às suas diversas aplicações clínicas, tornando-os promissores para o desenvolvimento de novos compostos com propriedades farmacológicas (Farghadani *et al*, 2019).

Os complexos metálicos (CM) são agentes multifuncionais, amplamente utilizados em diversas aplicações farmacológicas por apresentarem uma variedade de atividades biológicas como aplicações antibacteriana, antitumoral, antioxidante, antiviral e antifúngica, justificando os constantes estudos de suas análises (Lupascu *et al*, 2020; Ibrahim, 2016).

A formação dos CM de coordenação aumenta o efeito biológico dos compostos, através da ligação azometina na base de Schiff e a quelação do íon metálico central. Além disso, a estrutura recém obtida ganha um caráter lipofílico (hidrofóbico) facilitando a sua travessia por meio da membrana plasmática (Ozdemir *et al*, 2020).

De acordo com a literatura, ao coordenar BS a íons metálicos presentes em sistemas biológicos como Zn(II), Cu(II), Co(II), Mn(II), Ni(II) e Fe(II), sua atividade biológica é significativamente aumentada tornando esses complexos metálicos candidatos a fármacos com novos mecanismos de ação (Lupascu *et al*, 2020).

O íon níquel, Ni(II), está presente em determinados processos biológicos tais como: cofator de proteínas, aminoácidos, albumina, atua no transporte de oxigênio, além de atuar na absorção do ferro e estimulante do metabolismo da hemoglobina (Guo *et al*, 2015). Apesar dos benefícios dos complexos metálicos estes podem apresentar efeitos tóxicos no organismo, sendo de suma importância a avaliação da toxicidade desses compostos.

Dessa forma, os testes de toxicidade são métodos utilizados para avaliar a capacidade de uma substância causar efeitos adversos após a sua administração, pois esses testes realizam avaliações quantitativas dos agentes químicos testados (Hayes, 1994). O teste de toxicidade aguda *in vivo* para uma nova substância consiste na administração única ou em frações da substância teste por um período não superior a 24 horas, em doses superiores à terapêutica (Hayes, 1994).

Após a exposição, os animais são avaliados periodicamente durante o período de 24 horas e após isso é realizada avaliação diária durante 14 dias para verificação de possíveis sinais de toxicidade ou ocorrência de mortalidade, fornecendo assim subsídios referentes aos riscos à saúde após uma exposição de curta duração (Andrade *et al*, 2022; Brito, 1994; Dipasquale, Hayes, 2001; OECD, 2002).

Nestes estudos utilizando modelos animais em pesquisas científicas fornecem um guia entre o laboratório e os seres humanos, os resultados dos ensaios iniciais sobre roedores podem ser usados para definir a dose inicial em estudos posteriores utilizando não roedores. Sem modelos animais não haveria maneira de testar hipóteses para validar os achados laboratoriais antes da experimentação humana, sendo então uma forma segura de testar hipóteses e validar achados laboratoriais antes da experimentação humana (Matute-Bello, Frevert, Martin, 2008).

1.1 Justificativa e relevância do projeto de pesquisa

Os complexos metálicos têm sido amplamente estudados e utilizados na medicina para o tratamento de múltiplas doenças devido a suas aplicações biológicas apresentadas como anti-inflamatórias, antitumorais, antifúngicas e antibacterianas (Neto *et al*, 2023).

Apesar da relevância dessa relação, não há estudos *in vivo* de toxicidade aguda para a molécula Ni(II)-Melofen VI, sendo este um estudo inédito. Anteriormente, um estudo "*in vitro"* foi realizado e apresentou resultados promissores, visto que demonstrou efeito antiproliferativo em linhagens celulares de câncer de cólon murino (CT-26) e humano (HCT-116) (Ribeiro, 2022).

Sendo assim, é válido ressaltar a importância de estudos relacionados à toxicidade dessas moléculas, de modo a assegurar o seu uso em pesquisas experimentais. Dentre estes, os estudos toxicológicos não-clínicos fazem parte do processo de desenvolvimento de novos fármacos e antecedem a experimentação clínica de forma a reduzir os efeitos deletérios ao ser humano (Dorato, Buckley, 2006).

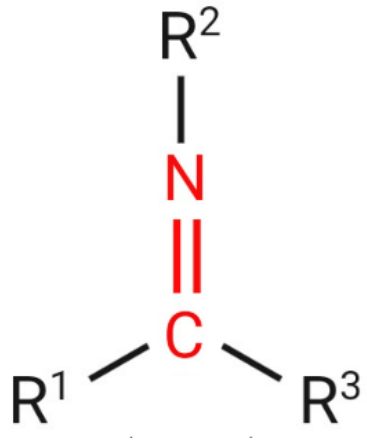
Os estudos toxicológicos podem ser realizados através de testes *in vitro* e *in vivo*, todavia, são os testes *in vivo* que fornecem informações mais precisas sobre a segurança e eficácia dos novos fármacos. Ademais, é por meio dos testes de experimentação *in vivo* que obtemos informações importantes em relação ao metabolismo e aos efeitos da substância sobre órgãos específicos (Silva *et al*, 2021).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Bases de Schiff

As bases de Schiff (BS) apresentam em sua constituição um grupo funcional imina, também chamado de azometina (Kajal *et al*, 2013). Esse grupo é formado por um carbono ligado através de uma ligação dupla ao nitrogênio –C=N– (Figura 1).

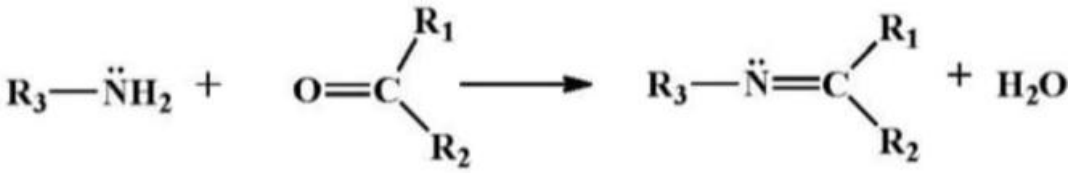
Figura 1 - Estrutura geral das bases de Schiff destacando o grupo funcional imina



Fonte: Elaboração própria (2025).

A reação de síntese desses compostos se dá a partir da condensação entre uma amina primária e compostos carbonílicos, sendo uma cetona ou aldeído sob condições específicas, tendo como produto principal a formação do grupo funcional imina ou azometina e como subproduto uma molécula de água (Figura 2). Esse grupo funcional presente em sua estrutura, é essencial para reações complexas (Paul, 2002).

Figura 2 - Reação de condensação das bases de Schiff



Fonte: Adaptado de Selvaganapathy, Natarajan (2016).

As BS derivadas de aldeídos alifáticos são instáveis por natureza e facilmente se polimerizam. Contudo, compostos contendo aldeídos aromáticos são mais estáveis devido ao sistema de conjugação eficaz (Paul, 2002). Dessa forma, esses ligantes derivados de aldeídos aromáticos e aminas aromáticas são amplamente aplicáveis nos campos da biologia, química inorgânica e analítica (Cimerman, Miljanic, Galic, 2000; Kabak *et al*, 2000).

Essa classe de ligantes, tem despertado atenção como farmacóforos no *design* e desenvolvimento de vários compostos bioativos principais por apresentarem funcionalidade de ligante na química de coordenação, alta estabilidade e ampla gama de propriedades biológicas (Singh, Barwa, Tyagi, 2006; Lupascu *et al*, 2021). Entre estes, o grupo imina representa um farmacóforo versátil para o desenvolvimento de compostos ativos e sua estrutura permite a introdução de grupos que aumentam a bioatividade (Kajal *et al*, 2013; Avila-Sorrosa *et al*, 2020).

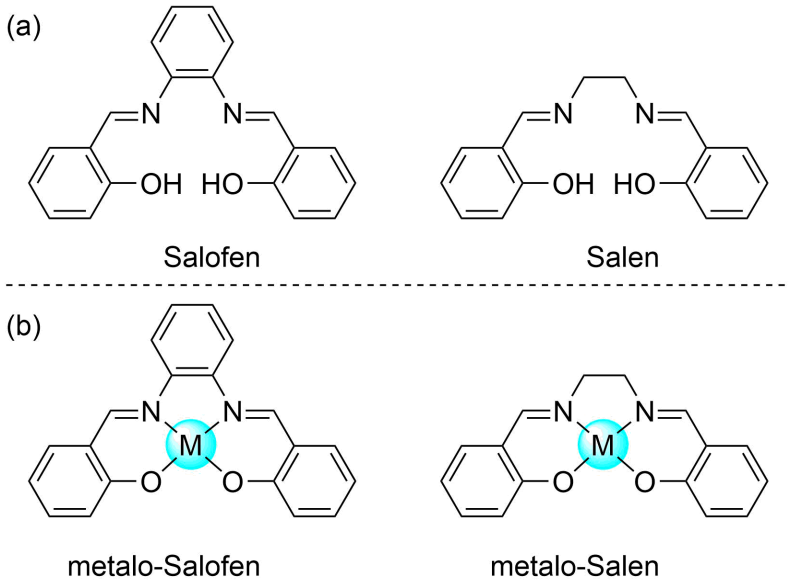
BS são geralmente ligantes bi-, tri-, tetra- ou polidentadas capazes de formar complexos muito estáveis com metais de transição (Arulmurugan, Kavitha, Venkatraman, 2010). O grupo imina ou azometina está presente em vários compostos de ocorrência natural e sintética, onde desempenham papel essencial para suas atividades biológicas (da Silva *et al*, 2011). Adicionalmente, o átomo de nitrogênio das iminas pode participar na formação de ligações de hidrogênio com os centros ativos dos constituintes celulares e interferir nos processos celulares normais (Shanty *et al*, 2017; Kajal *et al*, 2013).

A BS representa um precursor fundamental para o desenvolvimento de diversos complexos metálicos (CM), pois podem facilmente formar complexos estáveis com a maioria dos metais de transição (Kajal *et al*, 2013; Zoubi, 2013; Arulmurugan, Kavitha, Venkatraman, 2010; Dalia, Afsan, 2018; Uddin *et al*, 2018).

Estudos relatam que a atividade das BS pode estar relacionada a duas características: (1) a alta hidrofobicidade, que pode favorecer a interação com a membrana celular (Aragón-Muriel *et al*, 2021); (2) presença de metais complexados na molécula, que podem quelar íons essenciais ou realizar interações com o DNA, promovendo assim danos celulares irreversíveis (Raman, Sakthivel, Pravin, 2014).

As BS do tipo tetradentadas com sistemas de coordenação-N,N,O,O têm mostrado larga empregabilidade como ligantes de diversas espécies metálicas, pois apresentam quatro átomos doadores que podem se ligar simultaneamente ao íon metálico resultando em complexos muito estáveis com metais de transição. As sínteses das bases de Schiff tetradentadas do tipo-N,N,O,O são, em geral, realizadas a partir das condensações de aldeídos/cetonas com diaminas como etilenodiamina (ou seus derivados) e orto-fenilenodiamina (ou seus derivados), resultando na formação de ligantes amplamente conhecidos, respectivamente, como salen e salofen (Figura 3) (Fabbrizzi, 2020; Shaw, White, 2019).

Figura 3 - Estruturas químicas de compostos do tipo salen/salofen

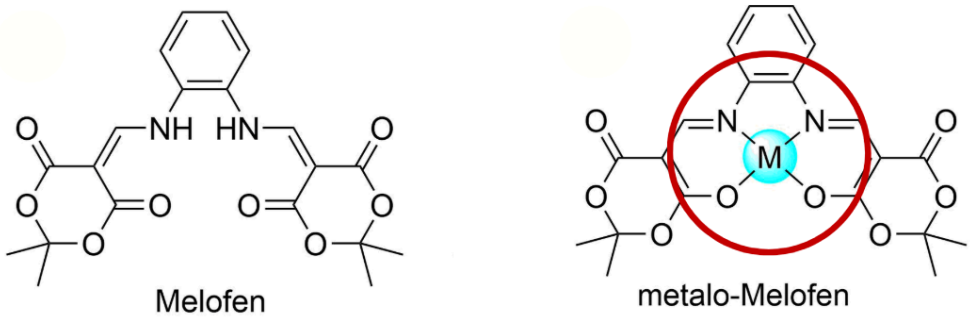


Fonte: Cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Jailton Ferrari (2025).

Outra classe de BS que tem sido sintetizada e caracterizada são as derivadas de diaminoalquilidênicos do ácido de Meldrum (Montalban, 2010). Esses compostos foram empregados como ligantes do tipo tetradentados-N,N,O,O para formar os primeiros exemplos de complexos diamagnéticos do tipo BS de Ni(II) e de Zn(II) designados como complexos do tipo-melen em referência ao ácido de Meldrum. Contudo, levando-se em conta a estrutura feniledíamino desses primeiros complexos sintetizados da série de compostos, pode ser adequado também os denominar de melofen em referência a

presença do ácido de Meldrum (Montalban *et al*, 2010). Fazendo assim uma clara analogia aos complexos de BS conhecidos como salofen (Figura 4) (Arun, Kumar, Kamalesu, 2024; Fabbrizzi, 2020).

Figura 4 - Estruturas químicas de compostos do tipo melofen



Fonte: Cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Jailton Ferrari (2025).

Dessa forma, a síntese de ligantes derivados do ácido de Meldrum (denominados melofen) está sendo reavaliada para criar complexos metálicos dessa classe. Possibilitando assim uma oportunidade para investigar essa classe de compostos e seu potencial para aplicações biológicas e farmacológicas, visando o desenvolvimento de uma nova classe de CM, os metalo-melofens.

2.2 Complexos metálicos

Os complexos metálicos (CM) são compostos que contêm um ligante e íons metálicos em sua constituição, sendo amplamente utilizados no tratamento de diversas doenças (Orvig, Abrams, 1999). Devido às suas propriedades únicas, os metais de transição são frequentemente usados para formar esses complexos, pois apresentam variedades de estruturas e estados de oxidação estáveis em meio fisiológico (Beraldo, 2005; Reisner *et al*, 2008; Rijit, Sadler, 2009).

No ano de 1965, a utilização de metais para o tratamento de doenças entrou em evidência após o físico Barnett Rosemberg descobrir a atividade antitumoral da cis-diaminodicloroplatina (II), a cisplatina, impulsionando dessa forma as pesquisas relacionadas à investigação de complexos metálicos para uso em doenças (Rosemberg, Vancamp, Krigas, 1965). No entanto, mesmo apresentando atividade anticancerígena relevante, a cisplatina apresenta efeitos tóxicos, sendo assim um fator limitante para o seu uso (Sykes, 1988).

Diante disso, a busca por CM elevou-se após essa descoberta, visando um composto metálico que apresentasse baixo ou nenhum efeito tóxico ao organismo (Clarke, 2002; Craver *et al*, 2010).

Os complexos de metais de transição contendo ligantes são de enorme importância, sabe-se também que os ligantes livres de metal apresentam atividade biológica constitutiva, contudo estudos afirmam que os complexos de metal exibem atividades potentes. Portanto, as habilidades de quelação de metal são responsáveis pelas atividades biológicas de um complexo de metal (Chellan *et al*, 2010). Outrossim, a complexação do ligante com um metal ajuda no processo de absorção celular devido à natureza lipofílica do metal (Chellan *et al*, 2010).

Os CM apresentam maior atividade biológica do que os compostos orgânicos livres (Chohan, Praveen, Ghaffar, 1997). O aumento da atividade biológica foi relatado pela implementação de metais de transição em bases de Schiff (Ershad *et al*, 2009).

Devido à fração azometina, as BS funcionam como ligantes importantes nos CM, transformando-os em estruturas estáveis capazes de aumentar o efeito biológico do próprio ligante por meio de sua coordenação com íons metálicos (Lupascu *et al*, 2020).

A potencialização do efeito biológico está relacionada à presença da ligação azometina na BS, complementada pelo efeito de quelação criado com o íon metálico central, contribuindo para uma diminuição significativa na polaridade e explicando o aumento do caráter lipofílico das combinações complexas (Lupascu *et al*, 2020).

Durante os últimos anos, compostos de coordenação de origem biológica ligantes ativos receberam muita atenção. Sob o ponto de vista terapêutico, vários complexos de BS foram testados para o tratamento antibacteriano, antitumoral, anti-inflamatório, relacionada aos seus complexos metais de transição (Kajal, 2013).

Os metais de transição estão envolvidos em diversos processos biológicos, como com aminoácidos, peptídeos e ácidos nucleicos, que são essenciais à vida. Além de que a maioria dos metais que estão presentes em sistemas biológicos envolvem complexos, como a hemoglobina e vitamina B12 (Joseyphus, Nair, 2010).

A ligação de moléculas bio-orgânicas ou fármacos a íons metálicos altera drasticamente suas propriedades biomiméticas, efeitos terapêuticos e propriedades farmacológicas (Chandraleka *et al*, 2014). Derivados de BS de aminoácidos aromáticos são bons agentes quelantes e capazes de formar complexos estáveis com metais de transição (Tobriya, 2014; Al-Garawi, Tomi, Al-Daraji, 2012).

Diversos metais de transição têm sido estudados para formação de complexos metálicos e de acordo com a literatura, ao coordenar o ligante a íons metálicos presentes em sistemas biológicos como o Ni(II) sua atividade biológica é significativamente aumentada, tornando esses compostos metálicos candidatos para campos farmacêuticos que trazem novos mecanismos de ação (Rani *et al*, 2018; Abdel-Rahman *et al*, 2020).

O níquel (Ni) é um oligoelemento essencial para a manutenção de funções biológicas no homem e outras espécies animais, porém o desequilíbrio da homeostase do Ni leva a distúrbios fisiológicos e comportamentais. A deficiência do Ni altera o metabolismo em contraste a exposição exagerada que pode provocar efeitos nocivos em vários órgãos (Das; 2008; Denkhaus, Salnikow, 2002).

O íon níquel, Ni(II), está presente em determinados processos biológicos tais como: cofator de proteínas, aminoácidos, albumina, atua no transporte de oxigênio, além de atuar como estimulante do metabolismo por meio do ferro e da hemoglobina (Guo *et al*., 2015).

A química de coordenação do Ni(II) é diversificada, além disso esse íon apresenta caráter menos tóxico que pode diminuir ainda mais quando coordenado à ligantes, além de que a sua coordenação ao ligante forma complexos metálicos com geometrias diversas (Selvaganapathy, 2016). Diante do exposto, o Ni(II) apresenta-se como uma opção promissora para síntese de complexos metálicos.

2.3 Atividade biológica dos complexos metálicos

As infecções associadas às bactérias multirresistentes continuam sendo um problema de saúde pública e seguem apresentando crescente mortalidade em todo mundo (Brodowska, Lodyga-Chruscinska, 2014; da Silva *et al*, 2011; Bernadette *et al*, 2010), tornando evidente a falta de tratamentos eficazes e a necessidade do desenvolvimento de novos agentes antibacterianos, que apresentem novos mecanismos de ação e mais eficientes (Rice, 2006). Diante disso, a atividade antibacteriana das BS e seus CM têm sido amplamente analisadas.

Estudos têm se comprometido em investigar a ação antibacteriana desses compostos, descrevendo suas ações de inibição contra o crescimento de uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus vulgaris* (Madani *et al*, 2020; Rudrapal, 2013; da Silva *et al*, 2011; Mishra, Soni, 2008).

As infecções fúngicas em sua grande maioria são superficiais, mas recentemente a incidência de infecções fúngicas sistêmicas, potencialmente letais, aumentou consideravelmente (Guo *et al*, 2007). O número restrito de medicamentos antifúngicos, seu uso prolongado no tratamento de infecções fúngicas crônicas e a falta de novos agentes antifúngicos, levaram ao aumento da resistência antimicrobiana com o surgimento de *Candida* spp. resistentes à anfotericina B e azois.

Dessa forma, é evidente a urgência no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos eficazes e estudos apontam que as BS são consideradas promissoras para o desenvolvimento destes medicamentos (Madani *et al*, 2020; Wiederhold, 2017; Qin *et al*, 2013). Estudos relatam que as bases de Schiff derivadas de imina, possuem propriedades antifúngicas contra *Candida albicans, Trichophyton rubrum, T. mentagrophytes, Aspergillus niger, A. flavus* e *Microsporum gypseum* (Madani *et al*, 2020; Brodowska, Lodyga-Chruscinska, 2014).

Os CM podem atuar de várias maneiras para exercer efeitos anti-inflamatórios, seja pela inibição de enzimas inflamatórias como a ciclo-oxigenase e lipoxigenase, modulação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, estabilização da membrana celular, atividade antioxidante ou através da ligação com receptores celulares (Neto,

2023). Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são comumente usados para o tratamento de inflamação, dor e febre, mas em algumas situações o uso desses medicamentos pode ocasionar efeitos tóxicos e colaterais (Deghrigue *et al*, 2015).

A atividade antiviral das BS tem sido investigada para o tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e os resultados mostram-se eficazes contra o vírus (Patel *et al*, 2012), similar a um outro estudo (Sriram *et al.,* 2006) que também demonstrou a mesma atividade contra o HIV. Estudos também se propõem a investigar a atividade anti-HSV, se mostrando eficaz contra infecções pelo vírus herpes simplex (HSV)(Hilmy *et al*, 2012; Rollas, Kuçukguzel, 2007; Padron, Tejedor, 2005). Ademais, Sriram *et al*. (2006) revelaram que o composto de BS testado apresentou eficácia contra o vírus da hepatite do rato (MHV), inibindo seu crescimento em 50%.

O câncer é uma das principais doenças responsáveis por alta mortalidade mundialmente, se caracterizando pela proliferação descontrolada de células devido a interrupção ou disfunção de vias de sinalização regulatórias (Ali *et al*, 2012). Diversas pesquisas acontecem em busca do tratamento da malignidade com o objetivo de descobrir agentes antineoplásicos eficazes. Sendo assim, novos agentes anticancerígenos devem ser sintetizado e diversos estudos se propõem a investigar as atividades anticâncer das BS e demonstrar suas propriedades anticancerígenas (Savcy, Buldurun, Kirkpantur, 2021; Savir *et al*, 2020).

Com relação à investigação de atividade antiparasitária das BS e seus complexos metálicos, estudos se propõem a investigar a sua atividade antimalárica (Ziegler *et al*, 2000). Savir *et al*. (2020) em estudo observaram atividade positiva dos complexos investigados contra *Plasmodium falciparum*. De acordo com o estudo de Riccio *et al*. (1997) o grupo imina das BS demonstrou atividade antimalárica, apresentando-se eficaz contra cepas de *P. falciparum* resistentes a medicamentos antimaláricos convencionais.

Em vista disso, atualmente metalofármacos são utilizados para o tratamento de diversas doenças, como a cisplatina e o rutênio para o tratamento de câncer, auranofina no tratamento de artrite reumatoide e o ferro para o tratamento de anemia ferropriva, aumentando desse modo o interesse clínico em pesquisas envolvendo complexos metálicos (Anthony *et al*, 2020; Junqueira, Silva, Guerra, 2012; Cançado, 2007;

Nikolaou, da Silva, 2018). Contudo, a utilização de complexos metálicos podem estar associados a efeitos tóxicos colaterais, sendo importante a investigação da toxicidade primordialmente.

2.4 Toxicidade aguda

A toxicologia é a ciência que investiga os efeitos nocivos causados por substâncias químicas no organismo, considerando as condições específicas de exposição. Com isso, busca entender a ocorrência, natureza, incidência, mecanismos e fatores de risco associados aos efeitos deletérios dessas substâncias. Os efeitos tóxicos causados por determinada substância podem ser leves, como irritação nos olhos, até casos mais graves como associado a dano hepático, renal, incapacitação permanente de um órgão ou câncer (Oga, Camargo, Batisuzzo, 2021).

Os testes de toxicidade são métodos utilizados para avaliar a capacidade de uma substância causar efeitos adversos após a sua administração. Esses testes visam prever a manifestação de efeitos tóxicos em humanos ou outros animais expostos à substância (Koeter, 1993; Stokes, 2002; Meyer, 2003). Uma substância química é considerada um agente tóxico se, sob certas condições de exposição, causar dano a um sistema biológico, alterando sua função ou levando à morte (Oga, Camargo, Batisuzzo, 2021).

Além disso, os ensaios de toxicidade são frequentemente realizados com animais, pois isso permite determinar possíveis efeitos tóxicos das substâncias em seres humanos. Existem vários testes toxicológicos para fins regulatórios, e entre eles, o teste de toxicidade aguda é particularmente importante, pois fornece resultados precisos em um curto período (Spielmann, 2002; Barros, Davino 2003).

Estudos toxicológicos são sempre solicitados nos processos investigativos, desde o desenvolvimento de novas substâncias, até seu registro e comercialização, pois são fundamentais para avaliar a segurança e o risco associado ao uso de novas substâncias (Ecobichon, 1997; Stokes, 2002; Meyer, 2003). No decorrer do desenvolvimento de um medicamento, a fase pré-clínica é a primeira percorrida e

determinante para as fases subsequentes. Nesta etapa inicial, o estudo toxicológico consiste na avaliação da toxicidade aguda da substância teste (Hayes, 1994).

No teste de toxicidade aguda, à substância em teste é administrada por um período inferior a 24 horas, seguido do monitoramento do modelo experimental durante 14 dias após a administração, que pode ser realizada por meio de uma dosagem única ou por frações da substância em análise (OECD, 2001). Esse teste demonstra informações relevantes acerca da toxicidade aguda e letalidade da substância em estudo, utilizando um número reduzido de animais quando comparado ao teste clássico de DL50 (Dipasquale, Hayes, 2001).

O estudo de toxicidade aguda permite a determinação de faixas de exposição definidas onde a letalidade é esperada. Esse teste é descrito pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), na diretriz 423, apresentando como objetivo observar a manifestação de possíveis efeitos tóxicos de uma substância em um curto período após administração da dose fornecida durante as primeiras 24 horas, fornecendo assim subsídios referentes aos riscos à saúde após uma exposição de curta duração (Brito, 1994; Dipasquale, Hayes, 2001; OECD, 2001).

Este protocolo experimental recomenda que o tratamento seja iniciado com três animais, sendo administrada a dose única de 300 mg/kg para substâncias desconhecidas, podendo ser administrada a dose única de 2.000 mg/kg. De acordo com o resultado obtido nos testes a substância é classificada na sua respectiva categoria segundo o *Globally Harmonized Classification System* (GHS) (OECD, 2001).

Durante a realização dos testes de toxicidade também é realizada uma triagem comportamental que serve para facilitar a identificação de uma possível atividade do composto no Sistema Nervoso Central (SNC), bem como seus efeitos no comportamento dos animais (Almeida, 2006). O *screening* hipocrático fornece uma estimativa geral da toxicidade da substância por meio da observação comportamental sobre a disposição geral, estado consciente, atividade e coordenação do sistema motor e reflexo do animal (Malone, Robichaud, 1983).

Evidências toxicológicas demonstram que toda substância é um agente tóxico em potencial, a depender das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo, frequência e via de administração (Castro, 1993). Portanto, os testes

toxicológicos são realizados para se obter dados sobre as condições em que os agentes químicos produzem efeitos tóxicos, qual a natureza desses efeitos e quais os níveis seguros de exposição (Loomis, Hayes, 1996).

A utilização de modelos animais em pesquisas científicas fornece um guia entre o laboratório e os pacientes, com os ensaios inicialmente são realizados *in vitro* e após isso podem ser testadas diretamente em modelos animais. Sem modelos animais não haveria maneira de testar hipóteses para validar os achados laboratoriais antes da experimentação humana (Matute-Bello, Frevert, Martin, 2008). Ademais, cerca de 30-40% do uso de animais em procedimentos científicos é voltado para o desenvolvimento e para os testes de toxicidade de medicamentos e de produtos biológicos, sendo os roedores as espécies de maior relevância (Matfield, 2003).

Os estudos toxicológicos quando aplicados em animais de laboratório e, sob condições previamente estabelecidas permitem determinar os possíveis efeitos de substâncias tóxicas para humanos ou animais expostos (Barros, Davino, 2003). A avaliação toxicológica é realizada por meio de ensaios biológicos em animais e os resultados são extrapolados para humanos e outros animais.

Nestes casos, a necropsia, a histopatologia e a manutenção do grupo controle para fins de comparação são realizadas, bem como a avaliação do estado geral dos animais e a observação dos efeitos tóxicos (Lima *et al*, 2003).

A avaliação da toxicidade visa caracterizar os efeitos adversos inerentes a determinado agente químico (Corrêa, Alonzo, Trevisan, 2003). Portanto, os testes toxicológicos normalmente requeridos com propósito regulatório incluem inicialmente a avaliação da toxicidade aguda.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade aguda experimental do complexo Ni(II)-Melofen VI em modelo murino.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade aguda do complexo Ni(II)-Melofen VI em camundongos swiss fêmeas;
- Avaliar a toxicidade aguda do ligante do complexo metálico em camundongos swiss fêmeas;
- Verificar a variação do peso corporal, consumo de água e ração ao longo do experimento;
- Verificar o peso úmido dos órgãos;
- Analisar macroscopicamente baço, fígado, coração, rins e pulmões nas diversas condições experimentais;
- Analisar histologicamente as alterações presentes no baço, fígado, coração, rins e pulmões nas diversas condições experimentais.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

O presente projeto foi encaminhado para Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB), para a avaliação e aprovação, visando obter a permissão necessária para a execução do experimento. Durante o percorrer do estudo científico, foram seguidos os princípios e critérios estabelecidos para o uso de animais em pesquisas científicas.

Portanto, somente após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) sob protocolo: 4337040125 (ID 002317) a pesquisa foi iniciada (Anexo 1). É válido salientar que para assegurar o bem-estar dos animais, todos os esforços foram realizados para diminuir o desconforto ou dor que possam tê-los acometidos.

4.2 Grupos experimentais

A amostra experimental foi composta por 15 camundongos (*Mus musculus*) fêmeas nulíparas e não prenhes, da linhagem Swiss, com idade de 7 semanas e com peso entre 28-30 g, obtidos e alocados no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamento (IPeFarM), no Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A linhagem Swiss foi empregada por ser amplamente utilizada em pesquisas biomédicas, especialmente em farmacologia. As fêmeas são recomendadas pela OECD, pois apesar de haver pouca diferença na sensibilidade entre os sexos, nos casos em que diferenças são observadas, as fêmeas geralmente apresentam um pouco mais de sensibilidade hormonal (Neves, Mancini, Menezes 2013).

Sendo assim, antes do início do experimento os camundongos passaram pelo período de aclimatação com temperatura média de 23 ± 2°C, em ciclo claro/escuro

de 12/12h (luzes acesas às 7 h e desligadas às 19 h), com acesso à ração adequada (Biotec®) e água potável *ad libitum*, sendo realizada limpeza do ambiente e monitoramento clínico favorecendo o bem-estar do animal e minimizando o estresse dos animais.

Para condução dos experimentos de toxicidade, os camundongos foram divididos em 5 grupos, sendo estes: (1) Grupo Controle Dimetilsulfóxido (DMSO), sendo este veículo utilizado por permitir melhor solubilização dos compostos; (2) Grupo Ligante do Complexo 300 mg/kg (LC 300); (3) Grupo Ligante do Complexo 2.000 mg/kg (LC 2.000); (4) Grupo Complexo Metálico 300 mg/kg (CM 300) e (5) Grupo Complexo Metálico 2.000 mg/kg (CM 2.000) (Quadro 1). Cada grupo foi composto por 1 gaiola com 3 animais (totalizando 5 gaiolas contendo 3 animais cada). Para distinção, todos os animais foram marcados individualmente com caneta permanente na cauda.

Quadro 1 - Distribuição dos grupos experimentais

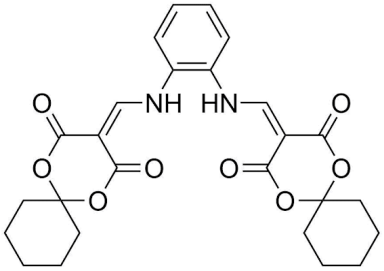
Grupo	**Descrição**	**N**
DMSO	Camundongos sadios que receberam DMSO por gavagem oral	3
LC 300	Camundongos que receberam 300 mg/kg do ligante do complexo por gavagem oral	3
LC 2.000	Camundongos que receberam 2.000 mg/kg do ligante do complexo por gavagem oral	3
CM 300	Camundongos que receberam 300 mg/kg do complexo metálico por gavagem oral	3
CM 2.000	Camundongos que receberam 2.000 mg/kg do complexo metálico por gavagem oral	3
Total		**15**

Fonte: Elaboração própria (2025).

4.3 Obtenção do complexo Ni(II)-melofen VI

Para esta pesquisa, foi utilizado um elemento da primeira série de transição, o Níquel (II). O ligante melofen e o complexo metálico Ni(II)-melofen VI (Figuras 5 e 6) foram sintetizados e cedidos pelo Laboratório Multiusuário de Química, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza e gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Jailton Ferrari.

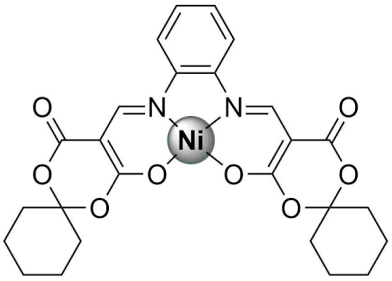
Figura 5 - Estrutura química do melofen VI



Chemical Formula: $C_{26}H_{28}N_2O_8$
Molecular Weight: 496,52

Fonte: Cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Jailton Ferrari (2025).

Figura 6 - Estrutura química do complexo metálico Ni(II)-melofen VI



Chemical Formula: $C_{26}H_{26}N_2NiO_8$
Molecular Weight: 553,19

Fonte: Cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Jailton Ferrari (2025).

4.4 Protocolo de toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade aguda foi conduzido de acordo com a metodologia preconizada pelo Guia para Testes de Químicos da OECD 423 (OECD, 2001) (Anexo II), que não traz restrições quanto ao uso de camundongos, dessa maneira, a escolha deste modelo animal prosseguiu baseado em estudos anteriores e por estes possuírem massa corporal menor, apresentando melhor manejo e sendo necessários menos insumos.

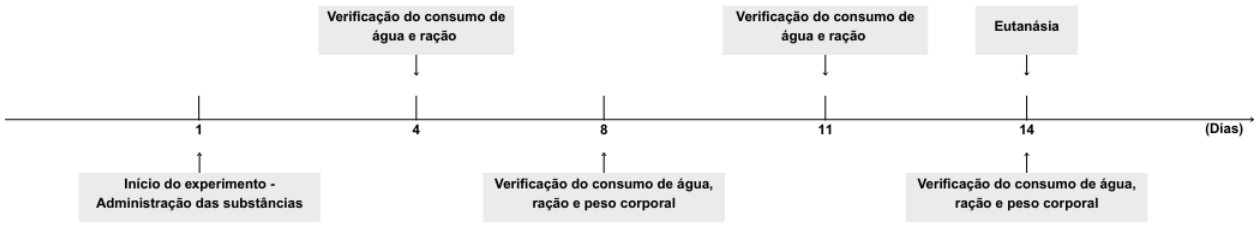
Com relação às doses empregadas com base no protocolo proposto pela OECD para substâncias não testadas ou com histórico de toxicidade desconhecida, a dose inicial selecionada para o ligante do complexo e complexo metálico foi de 300 mg/kg, seguida pela dose mais alta recomendada pelo mesmo protocolo 2.000 mg/kg. De acordo com o resultado obtido este protocolo permite classificar a substância teste na sua respectiva categoria segundo o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS).

Sendo assim, os camundongos passaram por distribuição aleatória em 5 grupos, sendo um grupo controle, dois grupos tratados com o ligante do complexo, sendo na concentração inicial de 300 mg/kg e 2.000 mg/kg, e dois grupos tratados com o complexo metálico nas mesmas concentrações anteriores. Ao grupo controle foi administrado dimetilsulfóxido (DMSO) por via oral mediante gavagem com o uso de cânula rígida adequada (25,8 mm) e seringa descartável não ultrapassando o volume máximo de 1 mL/peso corpóreo. Nos grupos tratados foram administradas, doses únicas de 300 mg/kg e 2.000 mg/kg do ligante do complexo e do complexo metálico diluídos em DMSO por via oral mediante gavagem, não ultrapassando o volume máximo de 1 mL/peso corpóreo.

Após administração, os animais foram avaliados no 1° dia após os 30 minutos iniciais e periodicamente percorrendo 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h e 24 h e, por conseguinte passaram por avaliação diária até o 14º dia após o tratamento para verificar a

ocorrência de mortalidade e sinais clínicos de toxicidade (figura 7), sendo registrados o peso corporal dos animais, assim como o consumo de água e ração de acordo com o Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos (ANVISA, 2020). Foram avaliados os seguintes sinais seguindo o *screening* hipocrático: atividade geral, tremores, convulsões, lacrimação, defecação, piloereção, respiração, hiperemia e morte (Malone, Robichaud, 1962). Em casos de mortalidade os animais seriam recolhidos, realizado a laparotomia e excisão dos órgãos de interesse para avaliação macroscópica e posteriores análises histopatológicas.

Figura 7 - Delineamento experimental do protocolo de toxicidade aguda



Fonte: Elaboração própria (2025).

4.5 Eutanásia

Ao término do experimento, os animais foram eutanasiados conforme as diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho de Experimentação Animal (CONCEA, 2018). O experimento de toxicidade aguda foi realizado ao longo de 14 dias, com ponto de eutanásia planejado para o 14º dia, ao final do experimento.

Para a eutanásia, foi administrada uma combinação de Cetamina (180 mg/kg) e Xilazina (30 mg/kg) por via intramuscular, caracterizando uma sobredose de anestésico com efeito letal. A eutanásia foi realizada individualmente, e após isso os animais foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos a -20 ºC. Posteriormente, foram recolhidos por uma empresa especializada no descarte de material biológico.

4.6 Determinação do peso úmido dos órgãos

Foi realizada a coleta dos órgãos de interesse seguindo as recomedações da OECD sendo estes: fígado, baço, coração, rins e pulmões. A primeira análise realizada dos órgãos foi a determinação do peso úmido dos órgãos, com o auxílio de uma balança analítica procedeu-se a pesagem de cada órgão.

4.7 Análise macroscópica

Os órgãos foram analisados macroscopicamente incluindo uma descrição detalhada das alterações na superfície, na cor e textura. Todos os resultados foram fotografados para registro e análise detalhada. Ao fim desta etapa os órgãos foram acondicionados em frascos coletores (50mL) identificados com o código correspondente ao animal e fixados em formalina tamponada 10%.

4.8 Análise histológica

Os órgãos foram clivados e inseridos em cassetes identificados e fixados em formalina tamponada 10% por 72 horas. Após isso, as amostras foram lavadas em água corrente por 1 hora. Em seguida, passaram para etapa de processamento histológico, onde as amostras foram desidratados em álcool etílico com concentrações crescentes (70, 80, 90, 95 e 100%), diafanizados em xilol e impregnados em parafina líquida, com duração de 1 hora em cada.

Posteriormente, houve a etapa da inclusão, onde foi formado o bloco de parafina contendo o órgão ou fragmento de tecido em seu interior. Por fim, foi realizado a

microtomia, onde os cortes histológicos foram realizados com espessura de 3 a 5µm com o auxílio de um micrótomo (Leica Biosystems - Leica RM2125 RTS), as fitas foram então distendidas em banho-maria com temperatura em torno de 40ºC, e retiradas com o auxílio de uma lâmina, onde os cortes ficaram aderidos para serem desparafinados, reidratados em álcool etílico com gradações decrescentes (70, 80, 90, 95 e 100%) e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para observação das células e componentes estruturais.

4.9 Análise estatística

Os dados das análises serão organizados e observados mediante análise de normalidade, análise de variância (ANOVA) *one way* e pós-teste de *Tukey*, com nível de significância estatística de 5% ($p<0.05$) de modo a estabelecer as diferenças significativas encontradas entre os grupos experimentais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Toxicidade aguda

Após a administração dos compostos testados, os animais passaram por observações periódicas durante as primeiras 24 horas e após isso sucedeu-se avaliações diárias até o 14º dia, a fim de se observar manifestações de possíveis efeitos tóxicos ou mortalidade nos grupos experimentais.

Diante disso, foi observado a morte de 4 animais durante a avaliação periódica inferior à 24 horas. No grupo CM 2.000, composto pelo complexo metálico na concentração 2.000 mg/kg, após a administração os animais apresentaram sinais de toxicidade como reação de coçar o focinho e ao avaliar o comportamento desses animais foi observado sinais de diminuição da atividade geral, sendo sempre comparados ao grupo controle. Ao longo das 24 h iniciais do experimento, foi evidenciado a morte de dois animais deste grupo na análise periódica de 2 h após a administração e após isso na análise de 4 h após a administração o animal remanescente deste grupo veio a óbito. Diante do exposto, foi evidenciado que a dosagem de 2.000 mg/kg do complexo metálico Ni(II)-melofen VI apresentou alta toxicidade em camundongos, sendo recomendado a avaliação de dosagens inferiores.

Ao avaliar o grupo CM 300, durante a administração da substância um animal do grupo CM 300 morreu por aspiração da formulação, sendo desconsiderado para as análises dos resultados pois sua morte não foi provocada pelo efeito das substâncias em teste. Diante disso, esse grupo seguiu com 2 animais onde foram administrados o complexo metálico na concentração 300 mg/kg, após a administração um animal do grupo apresentou diminuição da atividade geral e durante a avaliação periódica na análise de 8 h após a administração, este animal foi encontrado morto, restando apenas 1 animal neste grupo que durante o decorrer experimental até o 14º dia não apresentou nenhuma alteração em relação a manifestação de sinais tóxicos, sendo o seu comportamento semelhante ao do grupo controle.

Por outro lado, não foi observado a presença de sinais tóxicos, alterações comportamentais e nem morte dos animais em nenhum outro grupo experimental. O

grupo ligante do complexo, seja na concentração de 300 mg/kg ou 2.000 mg/kg, não apresentou quaisquer alterações ou manifestações de toxicidade, sendo atóxicos no modelo experimental testado e podendo ser utilizado dosagens maiores que 2.000 mg/kg. Ademais, como esperado não houve morte no grupo controle DMSO, e nenhuma alteração foi observada no período de 14 dias experimental.

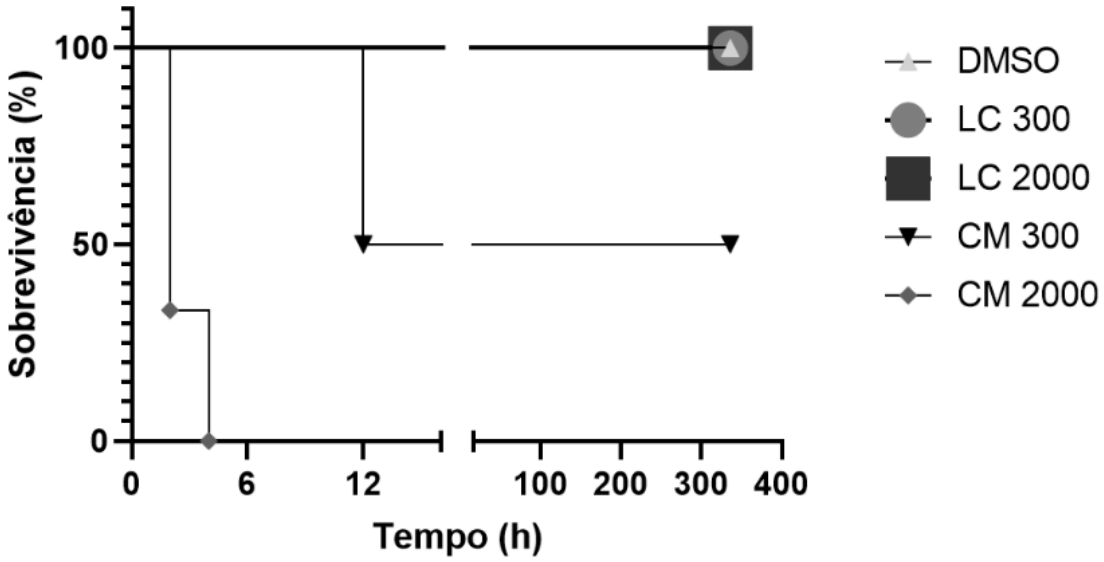
Quadro 2 - Mortalidade de camundongos

Grupo	Número de animais	Número de animais mortos	Sinais
DMSO	3	0	-
LC 300mg/kg	3	0	-
LC 2.000mg/kg	3	0	-
CM 300mg/kg	2	1	Baixa mobilidade, letargia, dificuldade respiratória.
CM 2.000mg/kg	3	3	Baixa mobilidade, letargia, tremores.

Fonte: Elaboração própria (2025).

Por fim, foi avaliada a taxa de sobrevivência entre os grupos experimentais. Como resultado obtivemos um valor de $p<0.0001$, demonstrando diferença significativa entre os grupos em estudo (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Análise de sobrevivência entre os grupos experimentais



Fonte: Elaboração própria (2025).

O gráfico 1 expressa o percentual de sobrevivência de cada grupo experimental, os grupos DMSO, LC 300 e LC 2000 apresentaram percentual de sobrevivência de 100% pois não foi constatada nenhuma mortalidade para esses grupos. Por outro lado, no grupo CM 300 dois animais seguiram para o experimento, destes 1 morreu, sendo observado um percentual de sobrevivência de 50%. Por fim, o grupo CM 2000 apresentou 100% mortalidade, pois todos os animais deste grupo morreram antes de 24 h após a administração do complexo metálico.

Diante disso, segundo a OECD é possível categorizar as substâncias testadas seguindo a classificação do GHS sendo o ligante do complexo classificado na categoria 5 (DL50 > 2.000 mg/kg - 5.000 mg/kg), uma vez que não houve mortalidade de nenhum dos animais na dosagem mais alta (OECD, 2001). Por outro lado, a classificação do complexo metálico seguiu com 2 animais no grupo de menor dose, uma vez que houve a morte súbita de um animal no ato da gavagem, já no grupo de alta concentração houve a mortalidade de todos os animais, sendo classificados na categoria 4 (300 mg/kg < DL50< 2000 mg/kg) (OECD, 2001).

Andrade *et al*. (2022) realizaram um ensaio de toxicidade aguda em camundongos para avaliação da atividade antitumoral de um novo complexo de rutênio e seus resultados indicaram que o complexo Ru-Mal (rutênio e ligante malonato) apresentou baixa toxicidade sendo classificado na categoria 4 do GHS (300 mg/kg < DL50< 2000 mg/kg). Este estudo avaliou os compostos teste nas dosagens de 300 mg/kg e 2.000 mg/kg. De forma semelhante, nenhuma mortalidade foi observada para a dosagem de 300 mg/kg, porém para a dosagem de 2.000 mg/kg houve a morte de 2 animais, sendo esta considerada tóxica.

Por outro lado, um estudo de Aroua *et al.* (2022), ao avaliar sete complexos de BS de ureia citotóxica, dentre eles o complexo contendo Ni(II) utilizando ratos, foram avaliadas 4 dosagens diferentes: 175, 550, 1000 e 2000 mg/kg via gavagem oral. Onde nenhum dos complexos avaliados induziu toxicidade significativa, pois nenhuma mortalidade foi observada sendo a DL50 maior que 2000 mg/kg para ratos fêmeas.

Em seu estudo, Lima *et al*. (2021) investigaram a avaliação da toxicidade aguda do complexo óxido vanádio e BS, em modelo murino utilizando camundongos fêmeas e nessa pesquisa o complexo avaliado em 2 doses, baixa dose de 300 mg/kg e alta dose de 2.000 mg/kg. A administração de alta dose do complexo resultou na morte de todos os animais deste grupo durante as primeiras 24 h, semelhantemente aos nossos resultados.

Por outro lado, Ibrahim *et al*. (2012) ao avaliar a toxicidade aguda do complexo metálico Nil(II) e a base de Schiff TNS obteve resultados divergentes ao encontrado neste estudo, onde nenhuma mortalidade foi observada com níveis de dose de 2.000 e 5.000 mg/kg. Também não houve alterações comportamentais sugestivas de toxicidade.

Khaldoune *et al*. (2023), ao avaliar a toxicidade aguda de dois ligantes de BS e seu complexo de paládio verificou que a BS estudada na administração de 2.000 mg/kg não causou nenhuma mortalidade nos animais administrados com L1 indicando baixa toxicidade, contudo no L2 resultou na morte de um único animal indicando ser ligeiramente mais tóxico.

O estudo de Bouchoucha *et al*. (2013), ao avaliar, os camundongos expostos à complexos de níquel a uma dose única de 250, 750, 1250, 1500, 1750 mg/kg de peso

corporal por gavagem oral, observou como resultado uma DL50 variando de 600 a 835 mg/kg.

Diante disso, no estudo de Maia *et al*. (2022) foi avaliado a toxicidade do complexo base de Schiff com íon Ni, usando modelo *in vivo* de *Artemia salina*, como resultado o complexo apresentou toxicidade em todos os tempos avaliados e foi observado que a mortalidade aumenta com o aumento da concentração e exposição, apresentando toxicidade moderada.

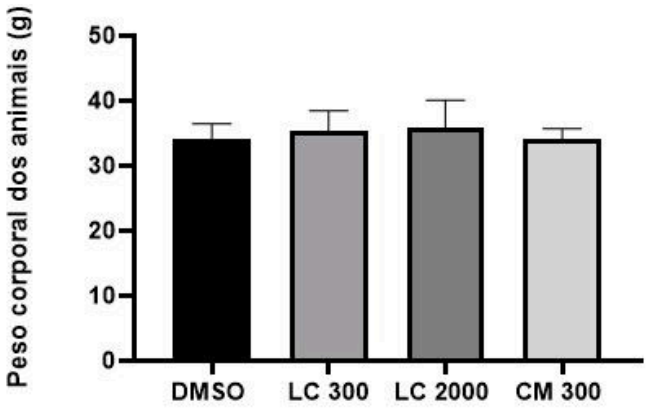
Portanto, diante do exposto a alta dosagem do complexo metálico administrado apresentou efeito tóxico nos camundongos fêmeas deste grupo avaliado. Por outro lado, a dosagem mais baixa utilizada do complexo metálico apresentou mortalidade de 50% dos animais neste grupo. É válido salientar que este estudo trata-se da primeira avaliação de toxicidade aguda do complexo Ni(II)-Melofen VI em modelo murino.

5.2 Peso dos animais

O peso dos animais foi verificado antes da administração dos compostos (1º dia) e verificados após uma semana da administração (7º dia) e posteriormente ao fim do período experimental (14º dia).

Ao avaliar os dados obtidos, o ganho de peso entre os grupos avaliados não teve alterações significativas ($p>0,05$), sendo os resultados obtidos dos grupos tratados semelhantes ao do grupo controle, evidenciando a não influência dos compostos testados neste parâmetro (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Peso corporal dos animais



Fonte: Elaboração própria (2025).

O peso corporal é um dos parâmetros mais empregados em avaliações toxicológicas para indicar o aparecimento, às vezes precoce, de efeitos tóxicos de uma determinada substância no organismo animal (Gonzaléz, Silva, 2003). Logo, a ausência de alteração neste parâmetro fisiológico avaliado aponta para baixa toxicidade do complexo e a base de Schiff estudada.

No estudo de Khadoune *et al*. (2023) que avaliou a toxicidade aguda de dois ligantes de BS e seu complexo de paládio, ao proceder a avaliação do peso corporal, observou que todos os animais de todos os grupos experimentais exibiram um ligeiro aumento no peso corporal, indicando que os compostos não causaram perda de peso significativa ou interferiram no ganho de peso normal dos animais, semelhantemente aos nossos resultados obtidos.

De forma semelhante, no estudo de Lima *et al*. (2021) ao avaliar a toxicidade aguda do complexo metálico óxido vanádio e BS, foi observado que não houve diferença estatística no peso corporal dos animais avaliados, mas houve ganho de peso em todos os grupos.

Ademais, Andrade *et al*. (2022) ao avaliar o complexo Ru-mal e observar os dados de massa corporal inicial e final, obteve como resultado que todos os animais dos grupos Ru-Mal e controle apresentaram ganho de massa ponderal em relação ao peso inicial. O grupo controle apresentou aproximadamente aumento de 5 g de peso corporal e o grupo tratamento 3 g, não apresentando diferenças estatísticas significativas, de modo similar ao nosso estudo o peso final apresentou aumento de

peso corporal entre 4-10 g entre os grupos avaliados, como também não apresentou diferenças significativas.

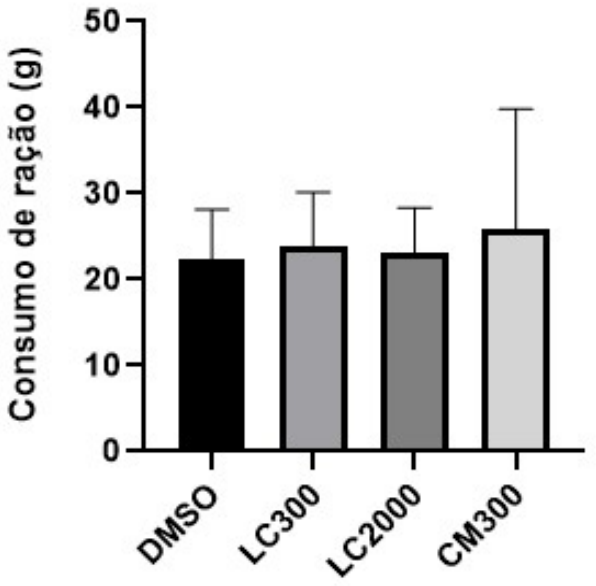
Zhou *et al*. (2023) em estudo com nanopartículas de níquel considerou que a redução do peso corporal mediada por nanomateriais é um importante biomarcador de nanotoxicidade em animais. No entanto, em seu estudo seus resultados mostraram que o peso corporal não apresentou diferenças estatísticas em camundongos controle e tratados com NiNPs.

Dessa forma, o aumento de massa corpórea dos grupos tratados foi um resultado positivo, pois indica que a toxicidade do composto foi baixa, uma vez que a redução de peso é considerada um sinal de toxicidade e a perda de peso corporal é uma expressão centralizada de disfunção do sistema metabólico e doença crônica (Andrade *et al*, 2022; Zhou *et al*, 2023).

5.3 Consumo de ração

O consumo de ração foi avaliado durante 4 intervalos de tempo (4º, 8º, 11º e 14º dias) após administração dos compostos. Não foi observada recusa alimentar em nenhum dos grupos avaliados, pois foi acompanhado um aumento na ingestão alimentar, sendo esse perfil evidenciado ao observar o ganho de peso corporal dos animais ao fim do experimento. Os resultados da avaliação periódica indicaram que não houve diferenças significativas ($p>0,05$) em relação ao consumo de ração dos camundongos fêmeas em ambos os grupos experimentais (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Consumo de ração dos animais



Fonte: Elaboração própria (2025).

A avaliação de parâmetros envolvendo consumo alimentar é importante para ensaios experimentais envolvendo avaliação de toxicidade, pois a toxicidade sistêmica de uma substância pode se manifestar não apenas por meio de alterações físicas ou comportamentais, mas também pode ser manifestada por meio da diminuição da ingestão de alimentos (Gonzaléz, Silva, 2003).

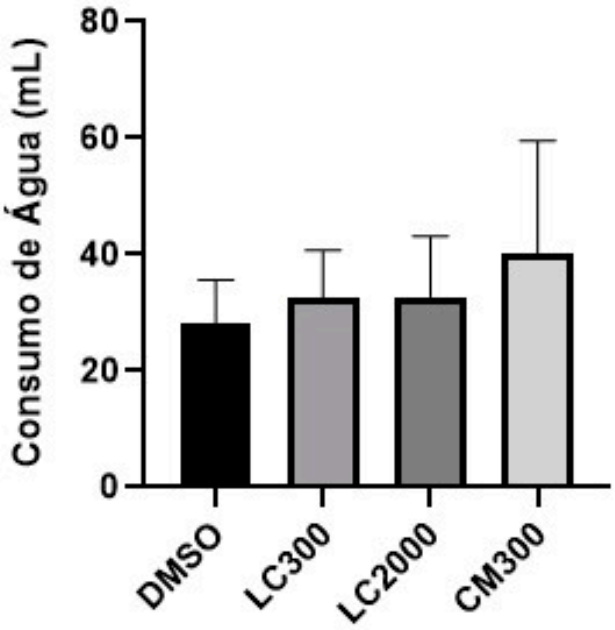
Dessa forma, a avaliação do consumo alimentar é um parâmetro frequentemente utilizado em estudos toxicológicos, uma vez que aponta para detecção de efeitos tóxicos de uma substância no organismo animal. Com isso, a ausência de alterações nesse parâmetro fisiológico sugere que o complexo metálico e a base de Schiff avaliados neste estudo apresentaram baixa toxicidade (Hayes, 1994).

5.4 Consumo de água

Outro parâmetro avaliado foi o consumo de água dos animais, sendo esta determinação também realizada em 4 intervalos de tempo (4º, 8º, 11º e 14º dias). Ao

avaliar os resultados obtidos estatisticamente não foi encontrado diferenças significativas (p>0,05) entre os grupos experimentais (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Consumo de água dos animais



Fonte: Elaboração própria (2025).

A toxicidade sistêmica de uma substância também pode ser manifestada pela redução do consumo de água dos grupos tratados em comparação ao grupo controle (Gonzaléz, Silva, 2003). No entanto, neste presente estudo esse padrão não foi observado uma vez que nos grupos tratados foi visto um aumento do consumo de água em comparação ao grupo controle.

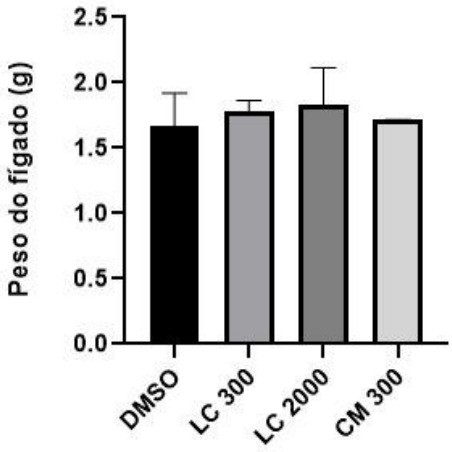
5.5 Peso úmidos dos órgãos

Ao fim do período experimental, no 14º dia, foi realizado a eutanásia e posteriormente a laparotomia para remoção dos órgãos de interesse. O primeiro parâmetro avaliado nos órgãos após excisão destes foi a determinação imediata do

peso úmido de cada órgão de interesse com o auxílio de uma balança de precisão analítica.

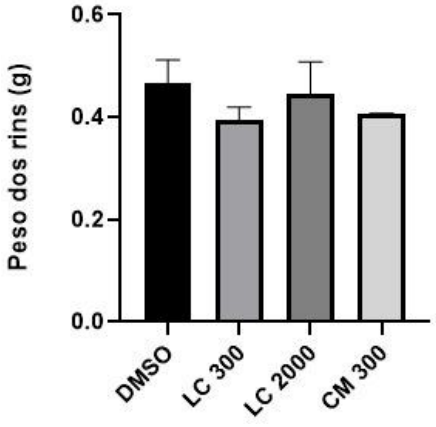
Todos os resultados obtidos referente ao peso úmido de cada órgão de todos os grupos em estudo foram analisados estatisticamente e não foi observado diferenças significativas (p>0,05) entre os grupos avaliados para nenhum dos órgãos em análise, demonstrando que para essa análise nenhum dos órgãos avaliados foi alterado pelo tratamento (Gráficos 5 a 9).

Gráfico 5 - Peso úmido do fígado



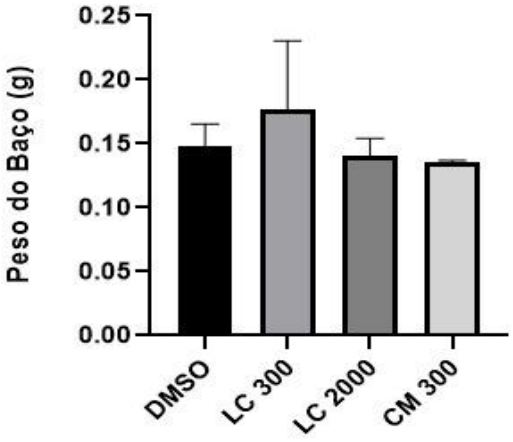
Fonte: Elaboração própria (2025).

Gráfico 6 - Peso úmido dos rins



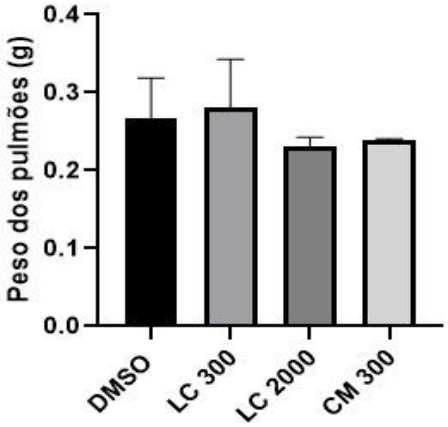
Fonte: Elaboração própria (2025).

Gráfico 7 - Peso úmido do baço



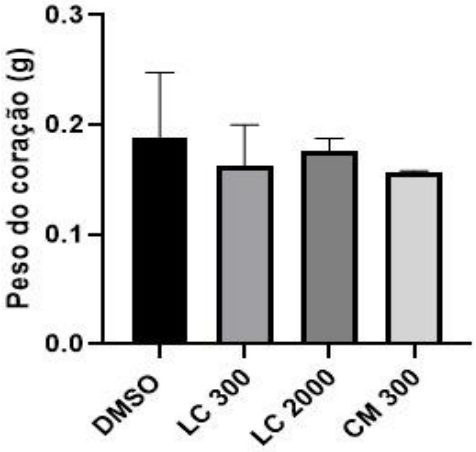
Fonte: Elaboração própria (2025).

Gráfico 8 - Peso úmido dos pulmões



Fonte: Elaboração própria (2025).

Gráfico 9 - Peso úmido do coração



Fonte: Elaboração própria (2025).

A toxicidade sistêmica de determinada substância pode se manifestar também pela alteração da massa relativa dos órgãos, contudo não foi este o padrão observado em nossos resultados (González, Silva, 2003).

De forma semelhante, o estudo de Olson e*t al.* (2000) destaca que órgãos como o fígado e os rins são mais sensíveis a graus de toxicidade quando os expostos a substâncias relativamente tóxicas. Ao realizar a média do peso relativo do coração, do baço, da bexiga, do tecido adiposo retroperitoneal, do tecido adiposo inguinal e do músculo sóleo não houve diferença estatística entre os grupos avaliados.

Ademais, Khaldoune *et al*. (2023) em estudo de toxicidade aguda de dois ligantes de BS e seu complexo de paládio, avaliaram o peso úmido do fígado, rim e baço. Como resultado observou que a proporção do peso do animal em relação ao peso do órgão foi considerada consistente em todos os animais, independentemente do grupo, seja ele tratado ou controle.

5.6 Análise macroscópica

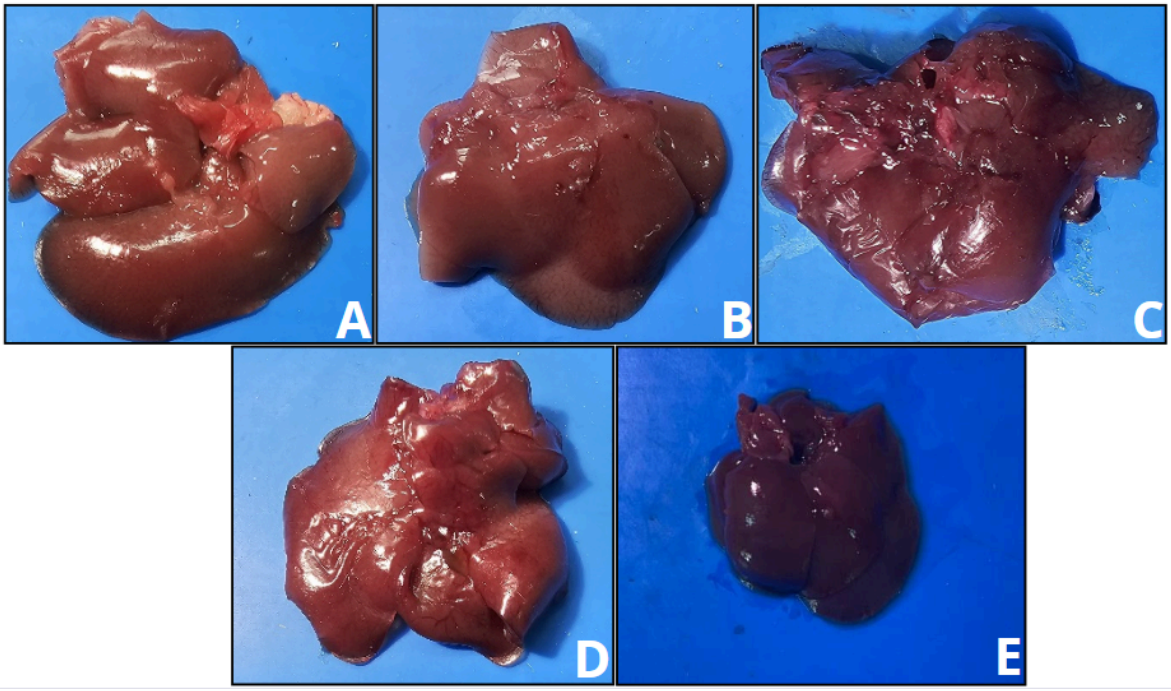
Após determinação do peso úmido, foi realizada a macroscopia dos órgãos em análise e por fim a comparação entre os grupos experimentais. A análise macroscópica consistiu na observação de possíveis alterações na superfície, na cor, no tamanho e no aspecto encontrados em cada órgão.

5.6.1 Fígado

Ao realizar a análise macroscópica do fígado dos animais, este apresentou coloração típica avermelhado escuro, devido à grande vascularização. Com relação à consistência, o fígado apresentou consistência firme. O fígado de todos os grupos se apresentou com a morfologia típica, anatomicamente dividido em quatro lobos: direito, esquerdo, mediano e caudal, subdividido em metade dorsal e metade ventral (Covelli, 1999).

Macroscopicamente não foram observadas alterações significativas entre os grupos analisados, sendo todos os grupos tratados semelhantes ao grupo controle quanto à cor e aspecto do fígado (Figura 8).

Figura 8 - Análise macroscópica do fígado



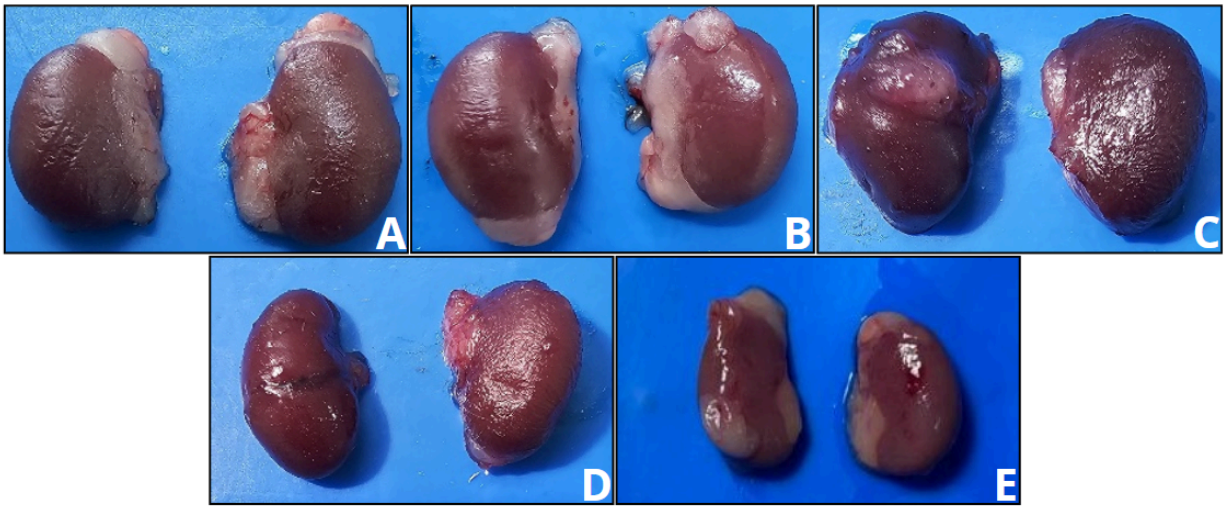
(A) Grupo DMSO; (B) Grupo LC 300; (C) Grupo CM 300; (D) Grupo LC 2.000; (E) Grupo CM 2.000.
Fonte: Elaboração do autor (2025).

5.6.2 Rins

Ao realizar a macroscopia dos rins dos animais de todos os grupos experimentais, foi possível observar semelhanças, dispondo-se em órgãos pares, com morfologia típica semelhante a um grão de feijão, apresentando coloração característica avermelhada e consistência compacta e dura (Covelli, 1999).

Macroscopicamente não foram observadas alterações significativas nos rins dos grupos analisados, sendo os grupos tratados semelhantes ao grupo controle na cor e aspecto destes órgãos (Figura 9).

Figura 9 - Análise macroscópica dos rins



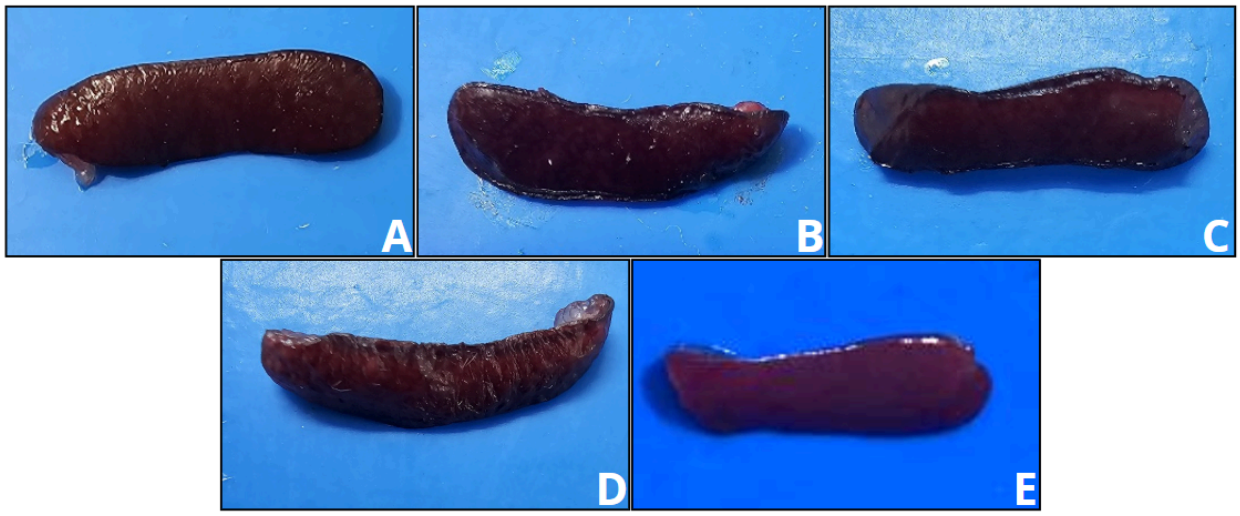
(A) Grupo DMSO; (B) Grupo LC 300; (C) Grupo CM 300; (D) Grupo LC 2.000; (E) Grupo CM 2.000.
Fonte: Elaboração própria (2025).

5.6.3 Baço

Macroscopicamente o baço apresentou forma característica em todos os animais dos grupos analisados, com forma alongada, oval e ligeiramente curva, com coloração vermelho escuro (Covelli, 1999).

Ademais, não foram observadas alterações significativas no baço dos animais analisados, sendo ambos os grupos tratados semelhantes ao grupo controle quanto a cor e aspecto (Figura 10).

Figura 10 - Análise macroscópica do baço



(A) Grupo DMSO; (B) Grupo LC 300; (C) Grupo CM 300; (D) Grupo LC 2.000; (E) Grupo CM 2.000.
Fonte: Elaboração própria (2025).

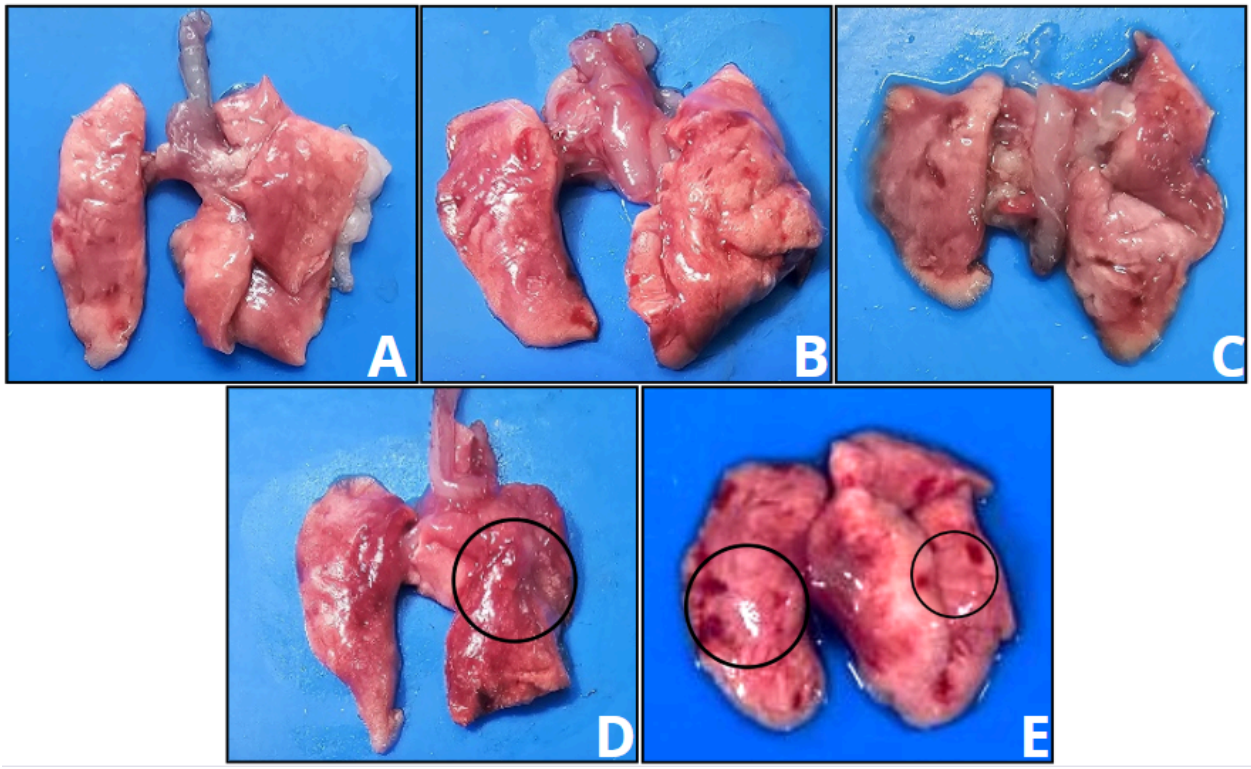
5.6.4 Pulmões

Ao realizar a análise macroscópica dos pulmões, foi observado a manutenção da anatomia deste órgão em todos os grupos analisados. Sendo assim, se apresentaram em órgãos pares, sendo o pulmão direito maior com a presença dos quatro lobos: superior, médio, pós cava e o meio, enquanto o pulmão esquerdo apresentou-se menor devido à projeção do ápice do coração e apresentando um único lobo (Covelli, 1999).

Foram observadas alterações na coloração e aspectos dos pulmões, em comparação entre os grupos tratados e o grupo controle. Ao avaliar a coloração, o grupo controle apresentou coloração característica rosa pálido, além da consistência esponjosa de forma semelhante os grupos tratados com baixa dosagem LC 300 e CM 300 seguiram essa mesma apresentação (Covelli, 1999).

Contudo, ao observar os grupos tratados com a dose mais alta notamos a presença de áreas hiperemiadas. Com relação às alterações na superfície, os grupos tratados com a dosagem mais alta mostraram-se edemaciados, em comparação ao grupo controle, conforme representados pelo círculo em preto (Figura 11).

Figura 11 - Análise macroscópica do pulmão

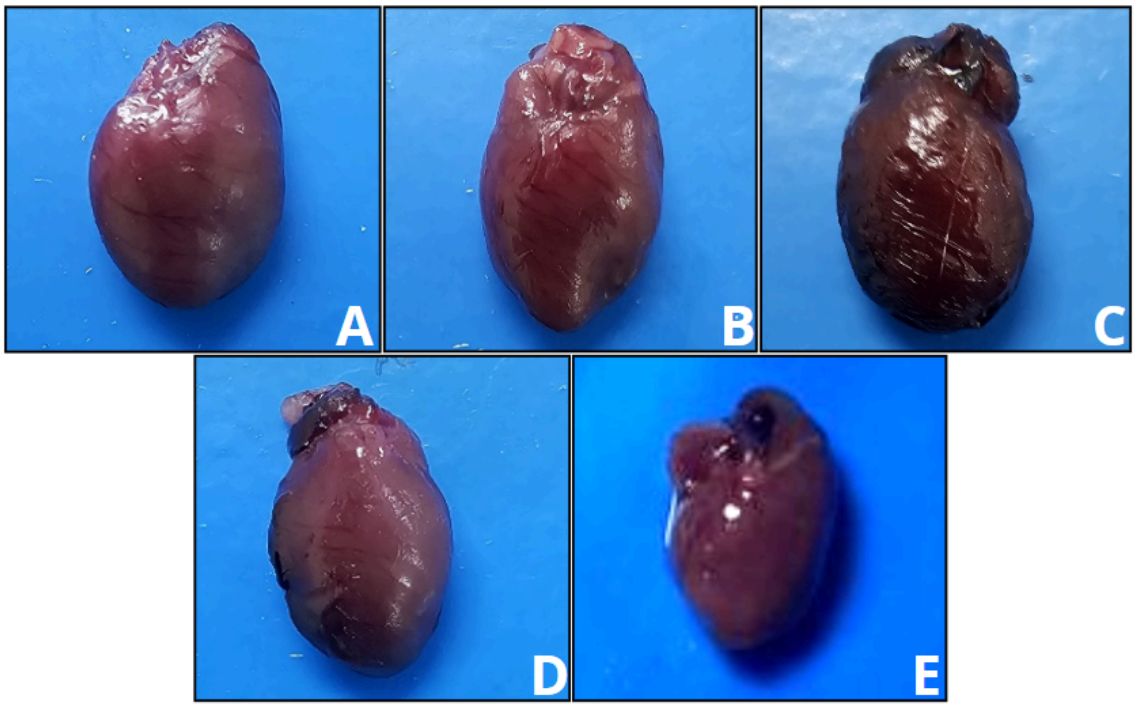


(A) Grupo DMSO; (B) Grupo LC 300; (C) Grupo CM 300; (D) Grupo LC 2.000; (E) Grupo CM 2.000.
Fonte: Elaboração própria (2025).

5.6.5 Coração

Na análise macroscópica, o coração apresentou morfologia habitual com coloração avermelhada em todos os grupos avaliados, não apresentando alterações na superfície, coberto por uma membrana serosa chamada pericárdio (Figura 12) (Covelli, 1999).

Figura 12 - Análise macroscópica do coração



(A) Grupo DMSO; (B) Grupo LC 300; (C) Grupo CM 300; (D) Grupo LC 2.000; (E) Grupo CM 2.000.
Fonte: Elaboração própria (2025).

5.6.6 Análise global

Com isso, a análise macroscópica revelou que o fígado, baço, rins e coração dos animais não apresentaram diferenças entre cor e aspecto em comparação do grupo tratamento com o grupo controle. Por outro lado, a macroscopia dos pulmões revelou alterações na cor e aspecto dos grupos tratados com a maior dose quando comparados ao grupo controle.

De forma semelhante, Khaldoune *et al.* (2023) em estudo de avaliação da toxicidade aguda de dois ligantes de BS e seu complexo de paládio, avaliou o fígado, rim e baço dos animais. Como resultado, não observou nenhuma alteração macroscópica em termos de cor e aspecto nos órgãos de nenhum dos grupos avaliados.

Ademais, Aroua *et al*. (2022) ao avaliar complexos metálicos de base de Schiff de ureia citotóxica, dentre eles o complexo contendo Ni(II), utilizando ratos, não observou nenhuma alteração na aparência bruta do fígado e rins nos animais experimentais. O estudo de Ibrahim *et al*. (2012) também não observaram nenhuma alteração macroscópica após necropsia nos órgãos analisados.

5.7 Análise microscópica

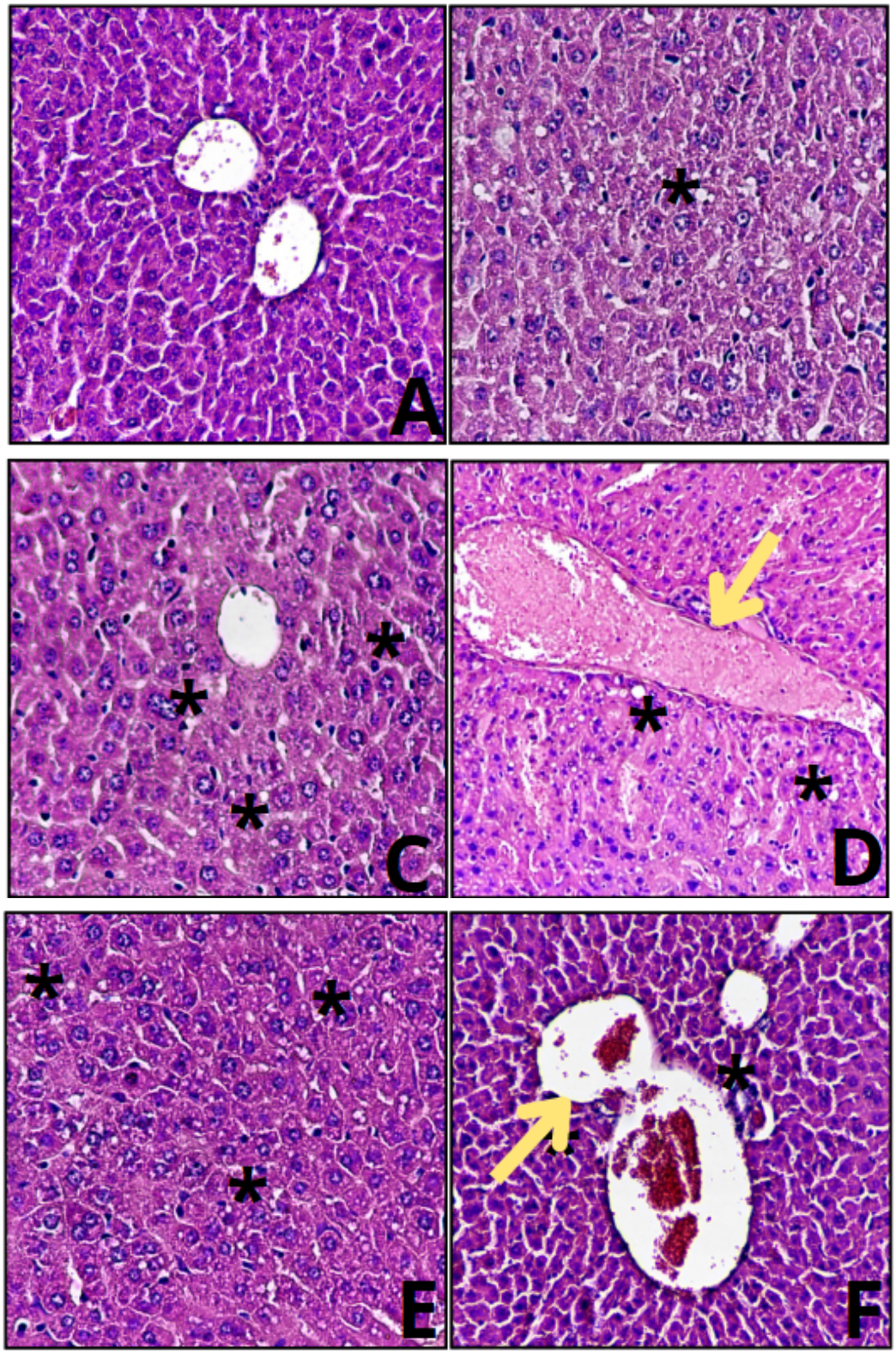
5.7.1 Fígado

O fígado histologicamente é um órgão formado por hepatócitos que se distribuem em cordão em direção a veia centrolobular, esse padrão foi evidenciado no grupo controle (A), no entanto nos animais dos grupos tratados observa-se a presença de hepatócitos vacuolizados com núcleo excêntrico marcados com asterisco preto, sendo este padrão compatível com esteatose hepática. Ademais, nos animais do grupo D e F observamos a presença de vasos dilatados repletos de sangue no seu interior, marcados com seta amarela achado esse compatível com congestão (Figura 13).

5.7.2 Rins

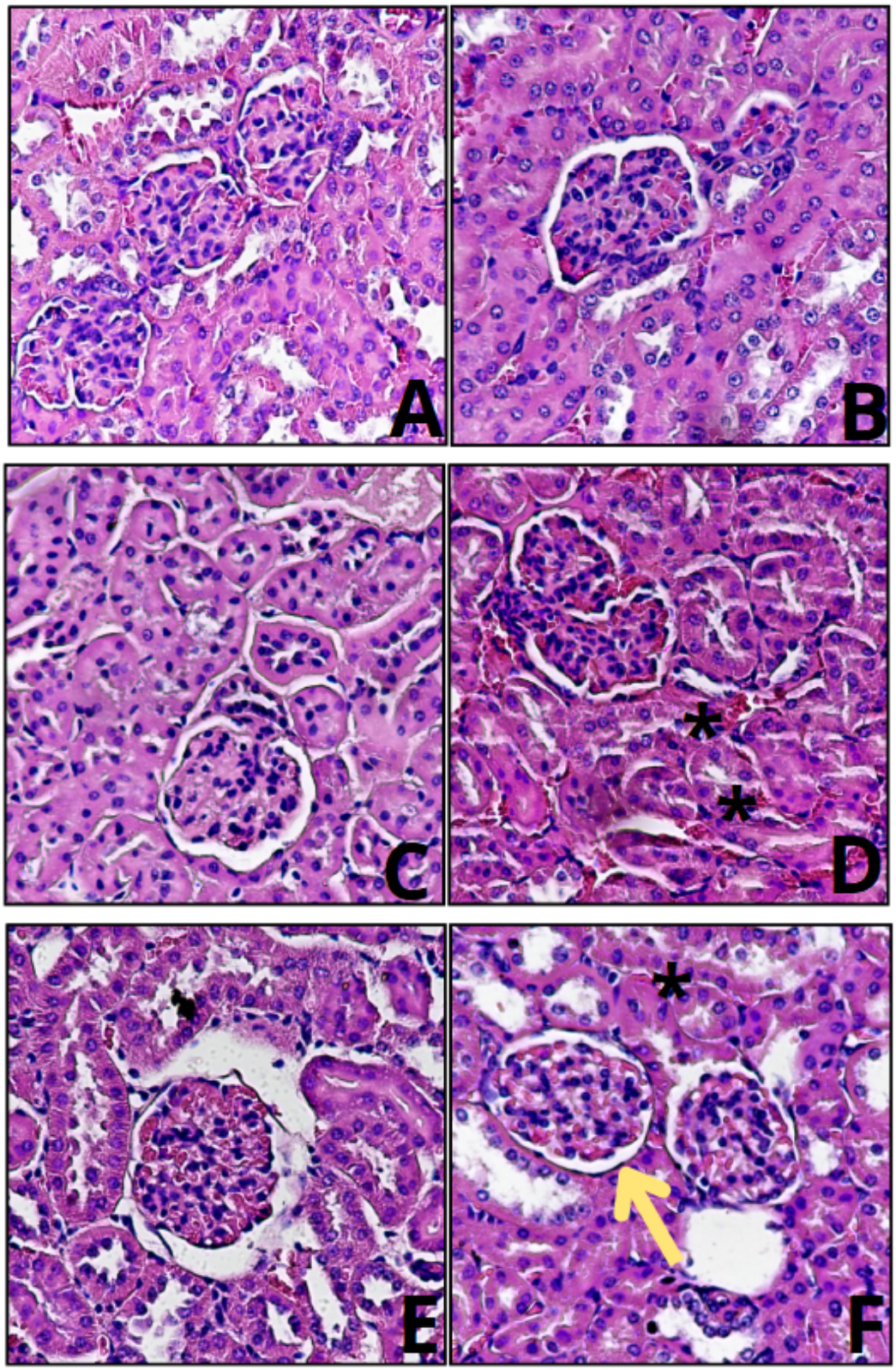
No parênquima renal foi evidenciado a presença dos glomérulos renais e dos túbulos renais, os glomérulos se caracterizam pela presença de uma região circular repleta de vasos sanguíneos chamada mesângio, esse padrão foi visto em todos grupos. No entanto, nos grupos D e F vemos a presença de hemácias extravasculares marcadas com asterisco preto, acho este compatível com hemorragia tubular, ainda mais no grupo F vemos a presença do espessamento das células mesangiais, marcado com seta amarela, sugestivo de uma glomerulonefrite membranosa (Figura 14).

Figura 13 – Cortes histológicos de fígado dos camundongos corados em HE



Grupo DMSO (10X); (B) Grupo LC 300 (10X); (C) Grupo CM 300 vivo (20X); (D) Grupo CM 300 morto (10X); (E) Grupo LC 2.000 (10X); (F) Grupo CM 2.000 (10X).
Fonte: Elaboração própria (2025).

Figura 14 - Cortes histológicos dos rins dos camundongos corados em HE



(A) Grupo DMSO (20X); (B) Grupo LC 300 (20X); (C) Grupo CM 300 vivo (20X); (D) Grupo CM 300 morto (20X); (E) Grupo LC 2.000 (20x); (F) Grupo CM 2.000 (20x).
Fonte: Elaboração própria (2025).

5.7.3 Baço

Na análise microscópica do baço é evidenciado o nódulo linfático compatível com a polpa branca, o nódulo linfático fisiologicamente deve ser todo enegrecido e compacto como visto nos grupos A, C e E, marcado com asterisco amarelo. No entanto, nos grupos B, D e E vemos um aspecto mais claro, marcado com asterisco preto, significando que houve ativação do nódulo linfático (Figura 15).

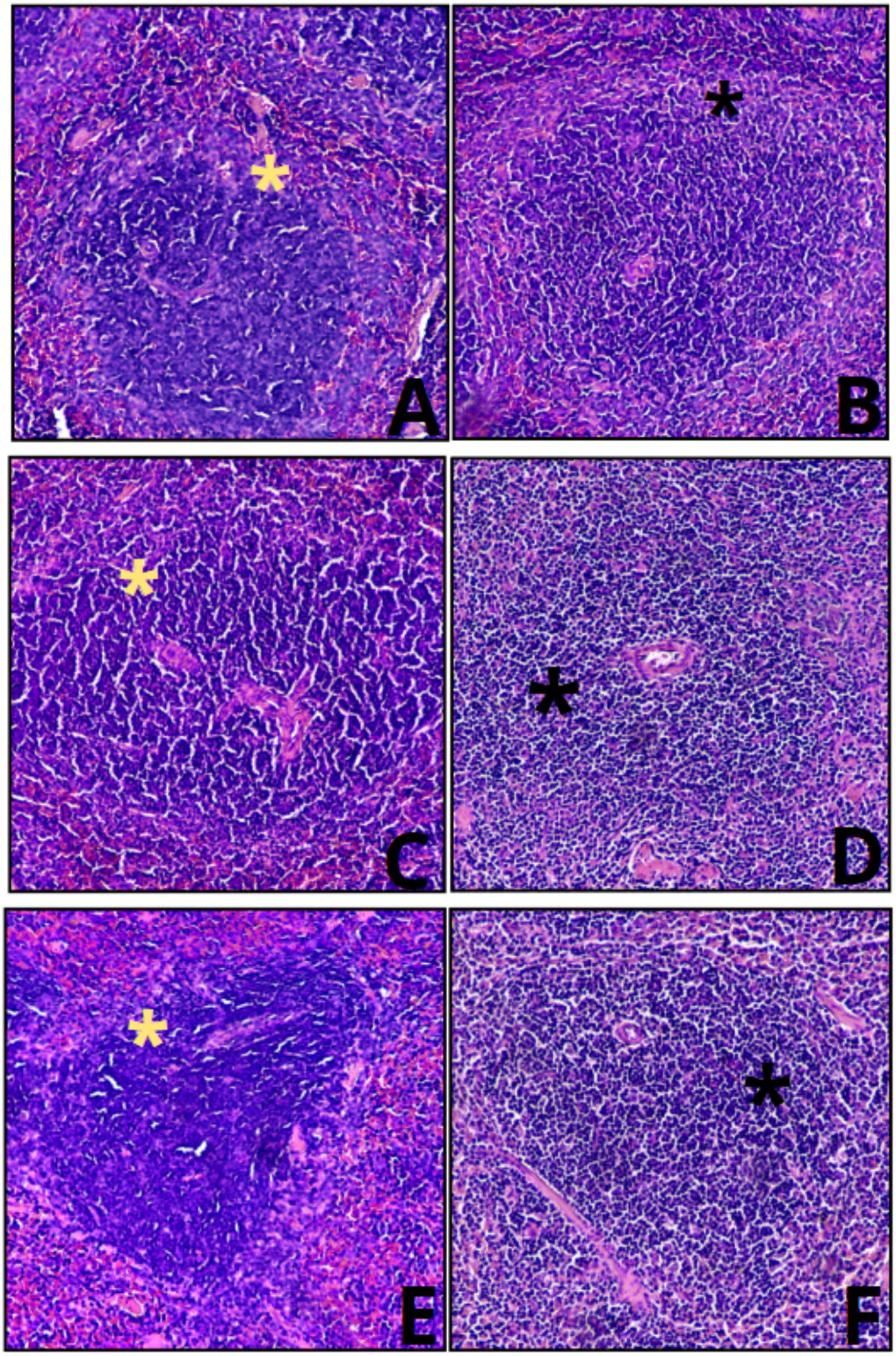
5.7.4 Pulmões

No pulmão a morfologia normal é caracterizada por espaços aéreos livres e manutenção do arcabouço pulmonar como visto em A, B e E marcados com asterisco preto. Por outro lado, nos grupos C, D e F é visto a presença de hemácias intra-alveolares, marcados com asterisco amarelo, achado este compatível com hemorragia (Figura 16).

5.7.5 Coração

Ao avaliar histologicamente o coração vemos o músculo cardíaco com presença de fibras alongadas que apresentam um ou dois núcleos e essas fibras apresentam-se na forma de sincícios ou seja uma célula aderida a outra, esse padrão foi evidenciado nos grupos A, B, C e E marcados com asterisco preto. Contudo, no grupo D vemos a redução da área das células, achado este compatível com atrofia, demarcado pelo asterisco amarelo. Ademais, no grupo F vemos a presença de um infiltrado inflamatório compatível com uma miocardite, marcado pela seta verde (Figura 17).

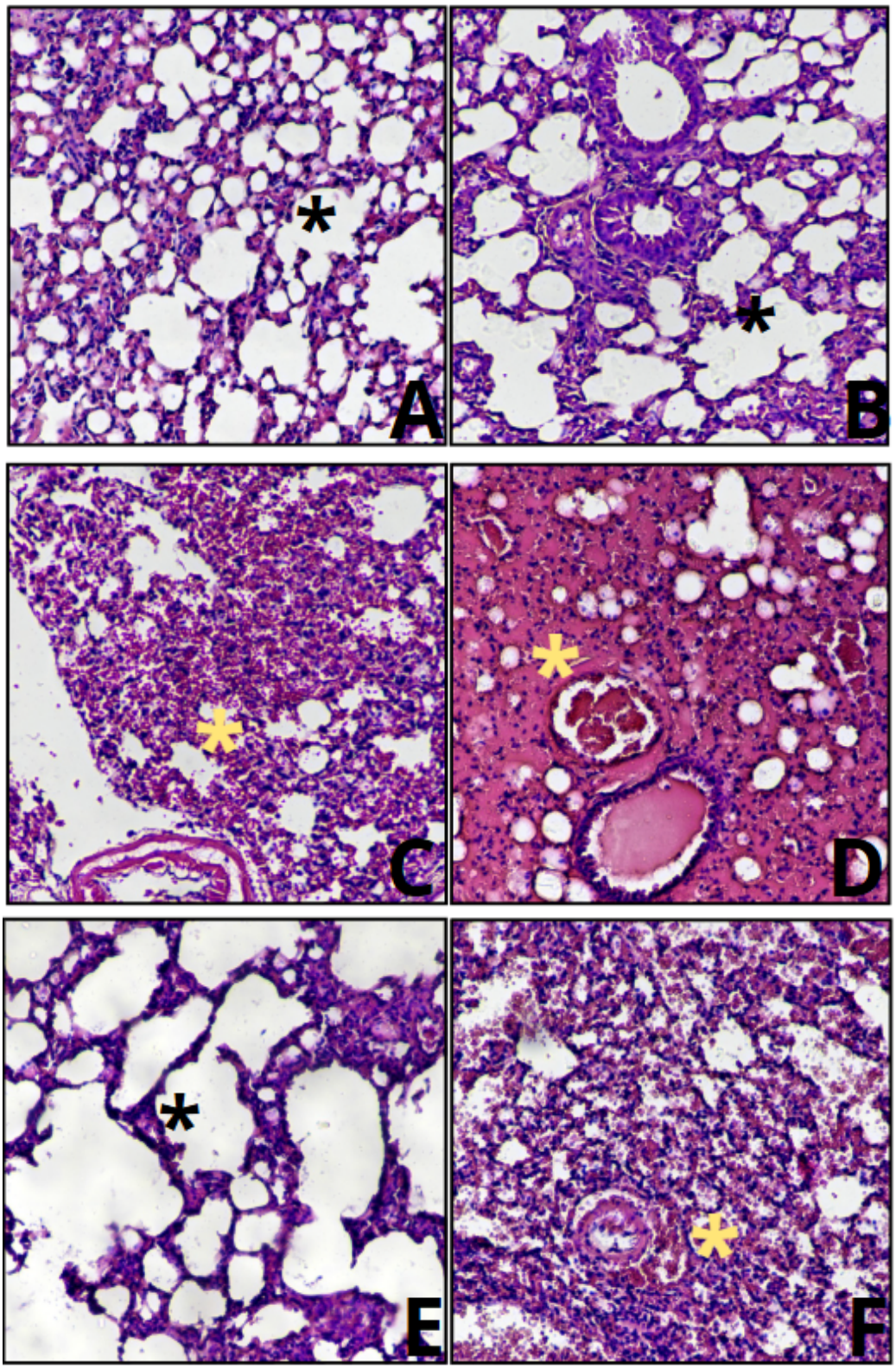
Figura 15 - Cortes histológicos do baço dos camundongos corados em HE



(A) Grupo DMSO (10x); (B) Grupo LC 300 (10x); (C) Grupo CM 300 vivo (10x); (D) Grupo CM 300 morto (10x); (E) Grupo LC 2.000 (10x); (F) Grupo CM 2.000 (10x).

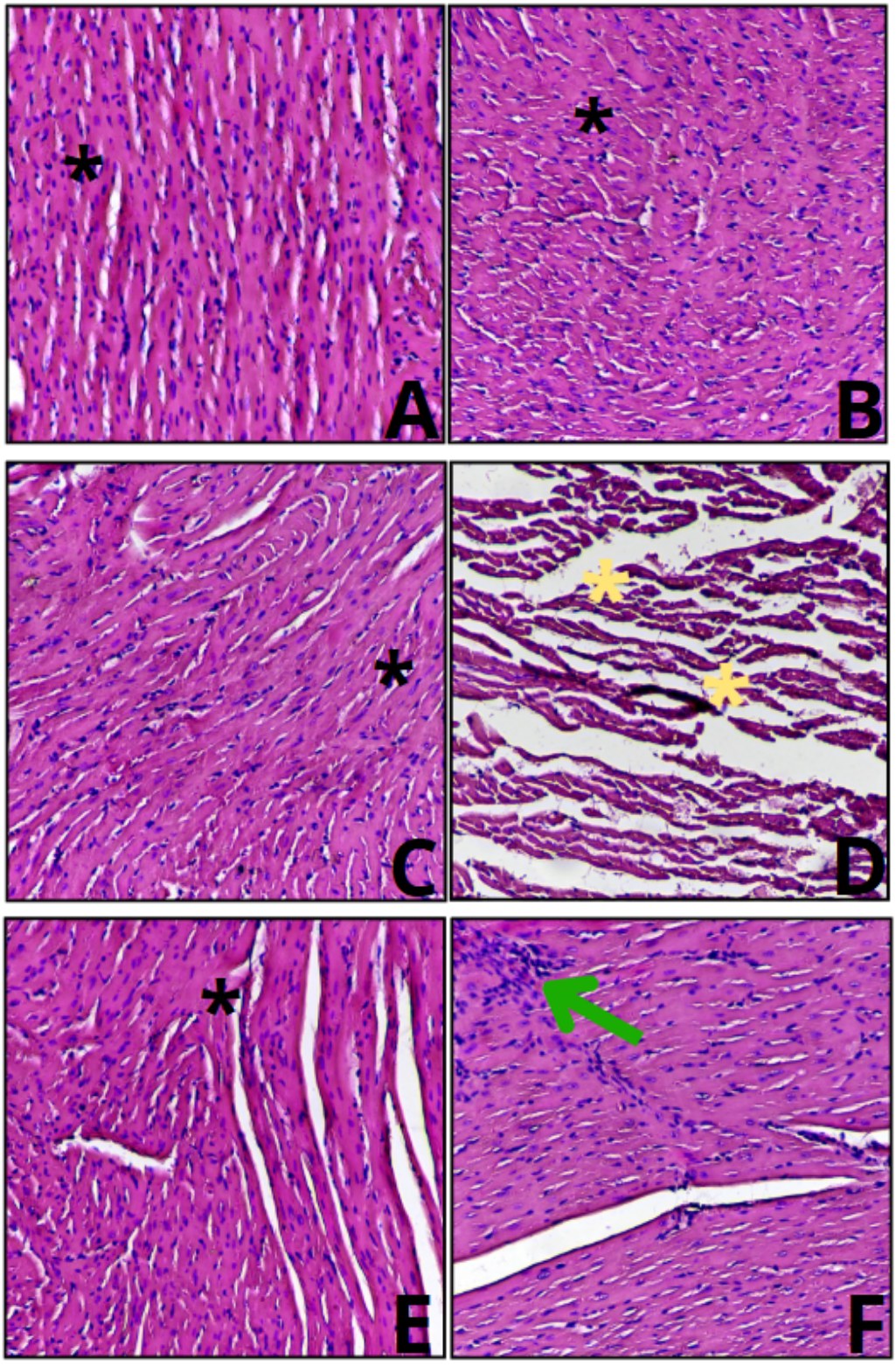
Fonte: Elaboração própria (2025).

Figura 16 - Cortes histológicos dos pulmões dos camundongos corados em HE



Grupo DMSO (10x); (B) Grupo LC 300 (10x); (C) Grupo CM 300 vivo (10x); (D) Grupo CM 300 morto (10x); (E) Grupo LC 2.000 (10x); (F) Grupo CM 2.000 (10x).
Fonte: Elaboração própria (2025).

Figura 17 - Cortes histológicos do coração dos camundongos corados em HE



Grupo DMSO (10x); (B) Grupo LC 300 (10x); (C) Grupo CM 300 vivo (10x); (D) Grupo CM 300 morto (10); (E) Grupo LC 2.000 (10x); (F) Grupo CM 2.000 (10x).
Fonte: Elaboração própria (2025).

5.7.6 Análise global

Diante do apresentado no fígado, observamos a presença de hepatócitos vacuolizados com núcleo excêntrico em todos os grupos de tratamento, achado este compatível com esteatose hepática. Além disso, o grupo CM 2.000 e o animal do grupo CM 300 que morreu espontaneamente apresentaram alterações morfológicas, podendo ser indicativo de lesão hepática por toxicidade.

Por outro lado, as alterações presentes no parênquima renal, esplênico e cardíaco também só foram evidentes na dosagem mais alta do CM e no animal do grupo CM 300 que morreu espontaneamente, evidenciando lesão renal, esplênica e cardíaca nos animais destes grupos por ação do complexo metálico.

Como também lesões pulmonares foram evidenciadas nos grupos tratados com o complexo metálico CM 300 vivo (C), CM 2.000 (F) e grupo CM 300 morto (E) apresentando graus variados de hemorragia culminando na perda da arquitetura pulmonar. Contudo, os grupos tratados com o ligante do complexo mantiveram a preservação do arcabouço pulmonar.

Perante isso, a partir da análise microscópica dos órgãos, não foram reveladas alterações significativas no fígado e rins para o grupo CM 300, nem para os grupos LC 300 e LC 2.000. Diante disso, pelo fígado e rim serem órgãos importantes no metabolismo e excreção de xenobióticos não foi observado hepatotoxicidade e nefrotoxicidade para esses grupos (Hayes, 2001).

De forma semelhante, Hajrezaie *et al*. (2012) em estudo de toxicidade aguda e gastroproteção de um novo complexo de cobre (II) derivado da base de Schiff contra lesões gástricas agudas induzidas por etanol em ratos. Não observou diferenças significativas nas estruturas do fígado e rim entre os grupos tratados e controle.

Outro estudo de Farghadani (2019), avaliando a toxicidade aguda de um novo complexo metálico de Indol e Mg (II), não observou diferenças significativas entre o grupo tratado e o grupo controle ao avaliar o fígado e rim em seu estudo com ratas *Sprague-Dawley*. Similarmente, Ibrahim *et al*. (2012) em estudo também não observaram nenhuma alteração macroscópica e microscópica anormal dos órgãos analisados.

Em contraste, Magaye *et al.* (2014) observaram que nanopartículas de níquel induziram inflamação hepática em ratos. O fígado, como principal órgão de metabolização biológica, é responsável por sequestrar e biodegradar substâncias exógenas, incluindo medicamentos e nanomateriais. De forma semelhante, a administração da dose mais alta do complexo metálico neste estudo resultou em hepatite nos camundongos, sugerindo um efeito hepatotóxico.

Zhou (2023) observou em seu estudo que nanopartículas de níquel induziram hepatotoxicidade em camundongos pela disfunção do metabolismo lipídico. Na análise histopatológica a exposição a NiNPs aumentou o dano hepático em camundongos e induziu esteatose hepática. Em nosso estudo também evidenciamos esteatose hepática variando de discreta nos grupos LC 300 e CM 300 e pronunciada nos grupos de maior dosagem LC 2.000 e CM 2.000. Como também, Weber (1969) em estudo com ratos também mostrou sinais de insuficiência hepática e renal devido à exposição à ingestão oral de níquel em um estudo de toxicidade subcrônica.

Adicionalmente, o rim é um órgão alvo importante onde o Ni se acumula e desencadeia intoxicação. Ali *et al*. (2021) sugeriram que o tratamento com nanopartículas de óxido de níquel (NiONPs) danificou o rim e o fígado do rato. No grupo tratado com alta dosagem do complexo metálico foi evidenciado nefrotoxicidade, pela disfunção renal apresentada caracterizada por hemorragia nas alças renais e no glomérulo, além da suspeita de glomerulonefrite membranosa.

Guo *et al*. (2015) demonstraram que $NiCl_2$ em alimentos excedendo 300 mg/kg pode induzir lesão da função renal, degeneração epitelial tubular, necrose e apoptose. Com isso, $NiCl_2$ resultou em alterações histopatológicas do rim dependendo do tempo e da dose.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

A avaliação da toxicidade aguda do complexo Ni(II)-Melofen VI em modelo murino demonstrou que, na menor dosagem administrada, houve uma mortalidade de 50% dos animais, caracterizando toxicidade moderada. Já na dosagem mais elevada, a taxa de mortalidade foi de 100%, indicando alta toxicidade do composto nessa concentração. Em contraste, a administração isolada do ligante não resultou em mortes, mesmo nas maiores dosagens, sugerindo ausência de toxicidade significativa. O que sugere que a toxicidade observada está diretamente relacionada à complexação com o íon metálico Ni(II).

Quanto aos parâmetros fisiológicos, como variação do peso corporal, consumo de água e ração, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais e o grupo controle. De modo geral, todos os grupos apresentaram aumento de peso ao longo do experimento. Além do mais, ao avaliar a determinação do peso úmido dos órgãos analisados não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

Na análise macroscópica dos órgãos (fígado, rins, baço, pulmões e coração), não foram identificadas alterações evidentes de coloração ou textura, exceto nos pulmões dos animais expostos à dose mais alta do complexo metálico, nos quais foi observado áreas hiperemiadas e textura irregular.

A avaliação histológica corroborou os achados macroscópicos, demonstrando preservação tecidual nas menores concentrações e na administração do ligante isolado. O ligante, mesmo em concentração elevada, não apresentou alterações microscópicas relevantes. No entanto, a administração da dose mais elevada do complexo metálico resultou em alterações histopatológicas relevantes nos tecidos hepático, renal, esplênico, pulmonar e cardíaco, tais alterações também foram vistas no animal que veio a óbito de forma espontânea no grupo tratado com 300 mg/kg.

Diante disso, espera-se contribuir com estudos posteriores avaliando a atividade biológica deste complexo em estudo mediante direcionamento no uso de uma dose segura. Além disso, estudos complementares se fazem necessários para esclarecimento dos achados neste estudo.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, L. H. et al. Non-Linear Optical Property and Biological Assays of Therapeutic Potentials Under In Vitro Conditions of Pd(II), Ag(I) and Cu(II) Complexes of 5-Diethyl amino-2-({2-[(2-hydroxy-Benzylidene)-amino]-phenylimino}-methyl)-phenol. *Molecules*, 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Versão 2. ANVISA, 2020.

AL-GARAWI, Z.; TOMI, I.; AL-DARAJI, A. Synthesis and Characterization of New Amino Acid-Schiff Bases and Studies their Effects on the Activity of ACP, PAP and NPA Enzymes (In Vitro). *Journal of Chemistry*, 2012.

ALI, A.; MANSOUR, A.; ATTIA, S. The potential protective role of apigenin against oxidative damage induced by nickel oxide nanoparticles in liver and kidney of male Wistar rat, *Rattus norvegicus*. *Environmental Science and Pollution Researchs*, 2021.

ALI, S. M. et al. In vivo anticancer activity of vanillin semicarbazone. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012.

ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia: fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ANDRADE, M. et al. Estudo da atividade antitumoral de um novo complexo de Ru3+: uma proposta para o design de metalofármacos de baixa toxicidade. *Química Nova*, 2022.

ANTHONY, E. et al. Metallodrugs are unique: opportunities and challenges of discovery and development. *Chemical Science*, 2020.

ARAGÓN-MURIEL, A. et al. In Vitro Evaluation of the Potential Pharmacological Activity and Molecular Targets of New Benzimidazole-Based Schiff Base Metal Complexes. *Antibiotics (Basel)*, 2021.

AROUA, L. et al. Cytotoxic urea Schiff base complexes for multidrug discovery as anticancer activity and low in vivo oral assessing toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 2022.

ARULMURUGAN, S.; KAVITHA, H.; VENKATRAMAN, B. R. Biological activities of Schiff base and its complexes: A review. *Rasayan Journal of Chemistry*, 2010.

ARUN, T. R.; KUMAR, H. P.; KAMALESU, S. Exploring the utilization of Schiff base metal complexes in biological settings: A review. *Inorganic Chemistry Communications*, 2024.

AVILA-SORROSA, A. et al. Synthesis, characterization and preliminary in vitro trypanocidal activity of N-arylfluorinated hydroxylated-Schiff bases. *Journal of Molecular Structure*, 2020.

AZAM, M. et al. Cu(II) salen complex with propylene linkage: An efficient catalyst in the formation of CX bonds (X = N, O, S) and biological investigations. *Journal of Molecular Structure*, 2016.

BARROS, S. B. M; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. 2.ed., p. 57-68, 2003.

BERALDO, H. Contribuições da química inorgânica para a química medicinal. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, 2005.

BERNADETTE, S. et al. Anticancer and antifungal activity of copper(II) complexes of quinolin-2(1H)-one-derived Schiff bases. *Inorganica Chimica Acta*, 2010.

BHUVANESWARI, S.; UMADEVI, M.; VANAJOTHI, R. Effects on anti-inflammatory, DNA binding and molecular docking properties of 2-chloroquinolin-3-yl-methylene-pyridine/pyrazole derivatives and their palladium(II) complexes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2020.

BOUCHOUCHA, A. et al. Iron and nickel complexes with heterocyclic ligands: stability, synthesis, spectral characterization, antimicrobial activity, acute and subacute toxicity. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2013.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC). Resolução CONCEA nº 37, de 15 de fevereiro de 2018.

BRITO, A. Toxicidade aguda (dose simples). *Manual de ensaios toxicológicos in vivo*. Campinas: UNICAMP; Rio de Janeiro: Editora Três; p. 15-22, 1994.

BRODOWSKA, K.; LODYGA-CHRUSCINSKA, E. Schiff bases - Interesting range of applications in various fields of science. *Chemik*, 2014.

CANÇADO, R. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2010.

CASTRO, J. A. Toxicologia básica: mecanismos de toxicidade y sus applicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 1993.

CHANDRALEKA, S. et al. Antimicrobial mechanism of copper (II) 1,10-phenanthroline and 2,2′-bipyridyl complex on bacterial and fungal pathogens. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2014.

CHELLAN, P. et al. Cyclopalladated complexes containing tridentate thiosemicarbazone

ligands of biological significance: Synthesis, structure and antimalarial activity. *Journal of Organometallic Chemistry*, 2010.

CHOHAN, Z. H.; PRAVEEN, M.; GHAFFAR, A. Structural and biological behavior of Co(II), Cu(II) and Ni(II) metal complexes of some amino acid-derived Schiff bases. *Metal-Based Drugs*, 1997.

CIMERMAN, Z.; MILJANIC, S.; GALIC, N. Schiff Bases Derived from Aminopyridines as Spectrofluorimetric Analytical Reagents. *Croatica Chemica Acta*, 2000.

CLARKE, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002.

CORRÊA, C. L.; ALONZO, H. G. A.; TREVISAN, R. M. S. Avaliação do risco. In: OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

COVELLI, V. *Guia para a necropsia do camundongo*. Universidade Federal de Alagoas. Maceió, [s.d.]. Disponível em: https://ufal.br/ufal/pesquisa-e-inovacao/bioterios-setoriais/cursos-e-treinamentos/necropsia-em-murinos.pdf/view. Acesso em: 19 abr. 2025.

CRAVER, E. et al. Trisruthenium(II)/copper(II) multimetallic porphyrin: Synthesis, characterization, DNA binding and supercoiled DNA photocleavage studies. *Inorganica Chimica Acta*, 2010.

DALIA, S.; AFSAN, F. Spectral and Thermal Characterization of Mn(II), Ni(II) and Zn(II) Complexes Containing Schiff Base Ligands Towards Potential Biological Application. *Asian Journal of Chemical Sciences*, 2018.

DAS, K. et al. Primary concept of nickel toxicity - an overview. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 2018.

DA SILVA, C. M. et al. Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced Research*, 2011.

DEGHRIGUE, M. et al. Evaluation of anti-inflammatory, analgesic and gastroprotective activities of *Eunicella singularis* fractions using in vivo assays. *Annals of Medical and Biomedical Sciences*, 2015.

DENKHAUS, E.; SALNIKOW, K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2002.

DIPASQUALE, L. C.; HAYES, A. W. Acute toxicity and eye irritancy. In: HAYES, A. W. *Principles and methods of toxicology*. 4.ed. London: Taylor & Francis, 2001. cap. 18, p. 853–916.

DORATO, M. A.; BUCKLEY, L. A. Toxicology in the Drug Discovery and Development

Process. *Current Protocols in Pharmacology*, 2006.

DUARTE, H. E. *Anatomia humana*. 1ª ed., 2. reimp. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2014. 175 p. ISBN 978-85-61485-14-6.

ECOBICHON, D. J. The basis of toxicity testing. New York: RC Press, 1997.

ERSHAD, S. et al. Electrochemical behavior of N2SO Schiff-base Co(II) complexes in non-aqueous media on the surface of solid electrodes. *International Journal of Electrochemical Science*, 2009.

FABBRIZZI, L. Beauty in chemistry: Making artistic molecules with Schiff bases. *The Journal of Organic Chemistry*, 2020.

FARGHADANI, R. et al. In vivo acute toxicity evaluation and in vitro molecular mechanism study of antiproliferative activity of a novel indole Schiff base β-diiminato manganese(III) complex in hormone-dependent and triple negative breast cancer cells. *PeerJ*, 2019.

FERREIRA, P. A. Otimização da obtenção da Associação em Dose Fixa do Sulfato de Hidroxicloroquina e o Liófilo de *Baccharis trimera* (Less.) DC.: Avaliação da Toxicidade Experimental Aguda e Crônica. 2017. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

GERONIKAKI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; AMOURGIANOU, M. Novel thiazolyl, thiazolinyl and benzothiazolyl Schiff bases as possible lipoxygenase's inhibitors and anti-inflammatory agents. *Farmaco*, 2003.

GONZALEZ, F.; SILVA, S. *Introdução à Bioquímica Clínica Animal*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

GUO, H. et al. Nickel chloride ($NiCl_2$)-caused inflammatory responses via activation of NF-κB pathway and reduction of anti-inflammatory mediator expression in the kidney. *Oncotarget*, 2015.

GUO, H. et al. Research Advances on Pathways of Nickel-Induced Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015.

GUO, Z. et al. Antifungal properties of Schiff bases of chitosan, N-substituted chitosan and quaternized chitosan. *Carbohydrate Research*, 2007.

HAJREZAIE, M. et al. Acute toxicity and gastroprotection studies of a new schiff base derived copper (II) complex against ethanol-induced acute gastric lesions in rats. *PloS One*, 2012.

HAYES, W. A. *Principles and Methods of Toxicology*. 3. ed. Raven Press, 1994. p. 579–600.

HAYES, W. A. *Principles and Methods of Toxicology*. 4. ed. London: Taylor & Francis, 2001. cap. 18, p. 853–916.

HILMY, K. et al. Synthesis and molecular modeling study of novel pyrrole Schiff Bases as anti-HSV-1 agents. *Life Science Journal*, 2012.

IBRAHIM, M. M. et al. Acute toxicity and gastroprotective effect of the Schiff base ligand ¹H-indole-3-ethylene-5-nitrosalicylaldimine and its nickel (II) complex on ethanol induced gastric lesions in rats. *Molecules*, 2012.

JOSEYPHUS, R. S.; NAIR, M. S. Synthesis, Characterization and Biological Studies of Some Co(II), Ni(II) and Cu(II) Complexes Derived from Indole-3-Carboxylate and Glycylglycine as Schiff Base Ligand. *Arabian Journal of Chemistry*, 2010.

JUNQUEIRA, J.; SILVA, P.; GUERRA, W. Ouro. *Química Nova Escola*, 2012.

KABAK, M. et al. Conformational study and structure of bis-N,N′-p-bromo-salicylideneamine-1,2-diaminobenzene. *Journal of Molecular Structure*, 2000.

KAJAL, A. et al. Schiff Bases: A Versatile Pharmacophore. *Journal of Catalysts*, 2013.

KHALDOUNE, K. et al. Exploring anticancer activity, acute toxicity, and molecular docking of synthesized schiff bases and schiff base-palladium complex. *Inorganic Chemistry Communications*, 2023.

KOETER, H. B. Test guideline development and animal welfare: regulatory acceptance of in vitro studies. *Reproductive Toxicology*, 1993.

LIMA, L. et al. Acute Toxicity Evaluation of Non-Innocent Oxidovanadium(V) Schiff Base Complex. *Inorganics*, 2021.

LOOMIS, M. D.; HAYES, A. W. *Loomis essentials of toxicology*. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1996. 282 p.

LUPASCU, G. et al. Synthesis, characterization, crystal structure and toxicity evaluation of Co (II), Cu (II), Mn (II), Ni (II), Pd (II) and Pt (II) complexes with Schiff base derived from 2-chloro-5-(trifluoromethyl)aniline. *Applied Organometallic Chemistry*, 2020.

LUPASCU, P. et al. Co (II), Cu (II), Mn (II), Ni (II), Pd (II), and Pt (II) complexes of bidentate Schiff base ligand: Synthesis, crystal structure, and acute toxicity evaluation. *Applied Organometallic Chemistry*, 2021.

MAGAYE, R. et al. Acute toxicity of nickel nanoparticles in rats after intravenous injection. *International Journal of Nanomedicine*, 2014.

MADANI, S. et al. Synthesis, Characterization and In vitro evaluation of antibacterial and antifungal activities of New Schiff Base and Its Metal Complexes. *Materials and Biomaterials Science*, 2020.

MAIA, D. O. et al. Nickel (II) chloride schiff base complex: Synthesis, characterization, toxicity, antibacterial and leishmanicidal activity. *Chemico-Biological Interactions*, 2022.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. 1962.

MATFIELD, M. Research Defence Society (RDS): Understanding animal research in medicine. London, 2003.

MATSUMOTO, M. Y. Síntese, caracterização, atividade antineoplásica e catalítica de complexos de níquel (II) derivados de bases de Schiff. 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados.

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2008.

MAZLAN, N. et al. Optical biosensing using newly synthesized metal salphen complexes: A potential DNA diagnostic tool. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017.

MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicology Letters*, 2003.

MISHRA, A. P.; SONI, M. Metal-Based Drug. *Hindawi Publishing Corporation*, 2008.
MOLDOVEANU, S. C. Pyrolysis of Amines and Imines. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, 2010.

MONTALBAN, A. G. et al. Melen complexes: a new family of Schiff base metal chelates derived from di-Meldrum's acid derivatives. *Tetrahedron Letters*, 2010.

MUKHTAR, S. et al. Overview on Synthesis, Reactions, Applications, and Biological Activities of Schiff Bases. *Egyptian Journal of Chemistry*, 2021.

NASCIMENTO-JÚNIOR, B. J. do. *Anatomia humana sistemática básica*. Ilustrações de Orlando Matos de Almeida Neto. Petrolina, PE: UNIVASF, 2020. 228 p. ISBN 978-65-991384-4-7.

NETO, I. et al. Aplicação dos metalofármacos na terapia de cânceres: uma revisão de literatura. *Estação Científica*, 2023.

NEVES, S. M. P.; MANCINI FILHO, J.; MENEZES, E. W. *Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP*. Universidade de São Paulo, 2013.

NIKOLAOU, S.; DA SILVA, C. Considerações sobre textos que tratam do desenvolvimento de metalofármacos de rutênio. *Química Nova*, 2018.

OECD. *Guideline 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method*, 2002.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISUZZO, J. A. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo, 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2021.

OLSON, H. et al. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2000.

ORVIG, C.; ABRAMS, M. J. Medicinal inorganic chemistry: introduction. *Chemical Reviews*, 1999.

OZDEMIR, O. et al. Novel palladium(II) complexes of N-(5-nitro-salicylidene)-Schiff bases: Synthesis, spectroscopic characterization and cytotoxicity investigation. *Journal of Molecular Structure*, 2020.

PADRON, J. M.; TEJEDOR, D. A New Approach to the Synthesis of 1,2,3,5-Tetrasubstituted Pyrroles. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 2005.

PARVEEN, S.; ARJMAND, F.; AHMAD, L. Enantiomeric in vitro DNA binding, pBR322 DNA cleavage and molecular docking studies of chiral l- and d-ternary copper(II) complexes of histidine and picolinic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2014.

PATEL, R. et al. Synthesis of new heterocyclic Schiff base, thiazolidinone and azetidinone compounds and their antibacterial activity and anti–HIV activities. *Heterocyclic Letters*, 2012.

PAUL, P. Ruthenium, osmium and rhodium complexes of polypyidyl ligands: Metal-promoted activities, stereochemical aspects and eletrochemical. *Journal of Chemical Sciences*, 2002.

QIN, W. et al. Schiff Bases: A Short Survey on an Evergreen Chemistry Tool. *Molecules*, 2013.

RAMAN, N.; SAKTHIVEL, A.; PRAVIN, N. Exploring DNA binding and nucleolytic activity of few 4-aminoantipyrine based amino acid Schiff base complexes: a comparative approach. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014.

RANI, S. V. et al. Synthesis, Characterization of Cu(II) Schiff base complexes: Optical and Magnetic Studies. *Materials Today: Proceedings*, 2018.

REISNER, E. et al. Electron transfer activated metal-based anticancer drugs. *Inorganica Chimica Acta*, 2008.

RIBEIRO, N. et al. Metal coordination and biological screening of a Schiff base derived from 8-hydroxyquinoline and benzothiazole. *Pharmaceutics*, 2022.

RICCIO, E. S. et al. Genetic toxicology testing of the antimalarial drugs chloroquine and a new analog, AQ-13. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2001.

RICE, L. B. Unmet medical needs in antibacterial therapy. *Biochemical Pharmacology*, 2006.

RIJIT, S. H. V.; SADLER, P. J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discovery Today*, 2009.

ROLLAS, S.; KUÇUKGUZEL, S. G. Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules*, 2007.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 1965.

RUDRAPAL, M. Chemistry and Biological Importance of Heterocyclic Schiff's Bases. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, 2014.

SALGIN-GOKSEN, U. et al. 1-Acylthiosemicarbazides, 1,2,4-triazole-5(4H)-thiones, 1,3,4-thiadiazoles and hydrazones containing 5-methyl-2-benzoxazolinones: synthesis, analgesic-anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007.

SAVCI, A.; BULDURUN, K.; KIRKPANTUR, G. A new Schiff base containing 5-FU and its metal complexes: Synthesis, characterization, and biological activities. *Inorganic Chemistry Communications*, 2021.

SAVIR, S. et al. Synthesis, cytotoxicity and antimalarial activities of thiosemicarbazones and their nickel(II) complexes. *Journal of Molecular Structure*, 2020.

SCHIFF, H. Mittheilungen aus dem Universitats Laboratorium in Pisa: Eine neue Reihe organischer Basen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1864.

SELVAGANAPATHY, M.; NATARAJAN, R. Pharmacological activity of a few transition metal complexes: a short review. *Journal of Chemical Biology & Therapeutics*, 2016.

SHAW, S.; WHITE, J. D. Asymmetric Catalysis Using Chiral Salen–Metal Complexes: Recent Advances. *Chemical Reviews*, 2019.

SHANTY, A. A. et al. Synthesis, characterization and biological studies of Schiff bases derived from heterocyclic moiety. *Bioorganic Chemistry*, 2017.

SHI, L. et al. Synthesis and antimicrobial activities of Schiff bases derived from

5-chloro-salicylaldehyde. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2007.

SILVA, M. G. et al. The importance of toxicity tests for development and phytotherapy registration. *Research, Society and Development*, 2021.

SILVA, P. L. B. Efeito renais dos metalofármacos FOR011B e FOR811B em modelos de rim isolado de ratos e isquemia/perfusão (I/R) celular. 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SINGH, K.; BARWA, M.; TYAGI, P. Synthesis, characterization and biological studies of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes with bidentate Schiff bases derived by heterocyclic ketone. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2006.

SPIELMANN, H. Animal use in the safety evaluation of chemicals: harmonization and emerging needs. *ILAR Journal*, 2002.

SRIRAM, D. et al. Abacavir prodrugs: microwave-assisted synthesis and their evaluation of anti-HIV activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006.

STOKES, W. S. Humane endpoint for laboratory animals used in regulatory testing. *ILAR Journal*, 2002.

SYKES, A. G. Reactions of Complexes of Platinum Metals with Bio-Molecules. *Platinum Metals Review*, 1988.

TAN, X. et al. Synthesis, characterization and in vitro cytotoxic properties of new silver(I) complexes of two novel Schiff bases derived from thiazole and pyrazine. *Polyhedron*, 2014.

TOBRIYA, S. Biological Applications of Schiff base and its Metal Complexes – A Review. *International Journal of Food and Nutritional Sciences*, 2014.

UDDIN, M. N. et al. Synthesis, characterization, molecular modeling, antioxidant and microbial properties of some Titanium(IV) complexes of schiff bases. *Journal of Molecular Structure*, 2018.

WIEDERHOLD, N. P. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infection and Drug Resistance*, 2017.

ZIEGLER, J. et al. The propionate of heme binds N_4O_2 Schiff base antimalarial drug complexes. *Inorganic Chemistry*, 2000.

ZHOU, S. et al. Nickel nanoparticles induced hepatotoxicity in mice via lipid-metabolism-dysfunction-regulated inflammatory injury. *Molecules*, 2023.

ZOUBI, W. A. Biological Activities of Schiff Bases and Their Complexes: A Review of Recent Works. *International Journal of Organic Chemistry*, 2013.

ANEXO 1 – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais/UFPB

Universidade Federal da Paraíba

CEUA

Universidade Federal da Paraíba

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO COMPLEXO DE NI(II)-MELOFEN VI EM MODELO MURINO", protocolada sob o CEUA nº 4337040125 (ID 002317), sob a responsabilidade de **Wallace Felipe Blohem Pessoa** *e equipe; GISELLY GABRIELY BARBOSA DE LIRA ARAÚJO* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 06/02/2025.

We certify that the proposal "EVALUATION OF ACUTE TOXICITY OF NI(II)-MELOFEN VI COMPLEX IN A MURINE MODEL", utilizing 15 Heterogenics mice (15 females), protocol number CEUA 4337040125 (ID 002317), under the responsibility of **Wallace Felipe Blohem Pessoa** *and team; GISELLY GABRIELY BARBOSA DE LIRA ARAÚJO* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 02/06/2025.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 02/2025 a 03/2025 Área: Fisiologia E Patologia

Origem: Unidade de Produção Animal IPeFarM

Espécie: Camundongos heterogênicos sexo: Fêmeas idade: 08 a 12 semanas Quantidade: 15

Linhagem: Mus musculus - Swiss Peso: 35 a 40 g

João Pessoa, 06 de fevereiro de 2025

Profa. Dra. Juliana Késsia Barbosa Soares Moreira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

ANEXO 2 - PROTOCOLO OECD

OECD/OCDE **423**

Adopted:
17th December 2001

OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS

Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method

INTRODUCTION

1. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals are periodically reviewed in the light of scientific progress or changing assessment practices. The original Guideline 423 was adopted in March 1996 as the second alternative to the conventional acute toxicity test, described in Test Guideline 401. Based on the recommendations of several expert meetings, revision was considered timely because: i) international agreement has been reached on harmonised LD50 cut-off values for the classification of chemical substances, which differ from the cut-offs recommended in the 1996 version of the Guideline, and ii) testing in one sex (usually females) is now considered sufficient.

2. The acute toxic class method (1) set out in this Guideline is a stepwise procedure with the use of 3 animals of a single sex per step. Depending on the mortality and/or the moribund status of the animals, on average 2-4 steps may be necessary to allow judgement on the acute toxicity of the test substance. This procedure is reproducible, uses very few animals and is able to rank substances in a similar manner to the other acute toxicity testing methods (Test Guidelines 420 and 425). The acute toxic class method is based on biometric evaluations (2)(3)(4)(5) with fixed doses, adequately separated to enable a substance to be ranked for classification purposes and hazard assessment. The method as adopted in 1996 was extensively validated *in vivo* against LD50 data obtained from the literature, both nationally (6) and internationally (7).

3. Guidance on the selection of the most appropriate test method for a given purpose can be found in the Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (8). This Guidance Document also contains additional information on the conduct and interpretation of Test Guideline 423.

4. Definitions used in the context of this Guideline are set out in Annex 1.

INITIAL CONSIDERATIONS

5. Test substances, at doses that are known to cause marked pain and distress due to corrosive or severely irritant actions, need not be administered. Moribund animals, or animals obviously in pain or showing signs of severe and enduring distress shall be humanely killed, and are considered in the interpretation of the test results in the same way as animals that died on test. Criteria for making the decision to kill moribund or severely suffering animals, and guidance on the recognition of predictable or impending death, are the subject of a separate Guidance Document (9).

6. The method uses pre-defined doses and the results allow a substance to be ranked and classified according to the Globally Harmonised System for the classification of chemicals which cause acute toxicity (10).

7. In principle, the method is not intended to allow the calculation of a precise LD_{50}, but does allow for the determination of defined exposure ranges where lethality is expected since death of a proportion of the animals is still the major endpoint of this test. The method allows for the determination of an LD50 value only when at least two doses result in mortality higher than 0% and lower than 100%. The use of a selection of pre-defined doses, regardless of test substance, with classification explicitly tied to number of animals observed in different states improves the opportunity for laboratory to laboratory reporting consistency and repeatability.

8. The testing laboratory should consider all available information on the test substance prior to conducting the study. Such information will include the identity and chemical structure of the substance; its physico-chemical properties; the result of any other *in vivo* or *in vitro* toxicity tests on the substance; toxicological data on the structurally related substances; and the anticipated use(s) of the substance. This information is necessary to satisfy all concerned that the test is relevant for the protection of human health and will help in the selection of the most appropriate starting dose.

PRINCIPLE OF THE TEST

9. It is the principle of the test that, based on a stepwise procedure with the use of a minimum number of animals per step, sufficient information is obtained on the acute toxicity of the test substance to enable its classification. The substance is administered orally to a group of experimental animals at one of the defined doses. The substance is tested using a stepwise procedure, each step using three animals of a single sex (normally females). Absence or presence of compound-related mortality of the animals dosed at one step will determine the next step, i.e.;

- no further testing is needed,
- dosing of three additional animals, with the same dose
- dosing of three additional animals at the next higher or the next lower dose level.

10. Details of the test procedure are described in Annex 2. The method will enable a judgement with respect to classifying the test substance to one of a series of toxicity classes defined by fixed LD50 cut-off values.

DESCRIPTION OF THE METHOD

Selection of animal species

11. The preferred rodent species is the rat, although other rodent species may be used. Normally females are used (9). This is because literature surveys of conventional LD50 tests show that, although there is little difference in sensitivity between the sexes, in those cases where differences are observed females are generally slightly more sensitive (11). However if knowledge of the toxicological or toxicokinetic properties of structurally related chemicals indicates that males are likely to be more sensitive, then this sex should be used. When the test is conducted in males adequate justification should be provided.

12. Healthy young adult animals of commonly used laboratory strains should be employed. Females should be nulliparous and non-pregnant. Each animal, at the commencement of its dosing, should be between 8 and 12 weeks old and its weight should fall in an interval within $\pm$ 20 % of the mean weight of any previously dosed animals.

Housing and feeding conditions

13. The temperature in the experimental animal room should be 22ºC (± 3ºC). Although the relative humidity should be at least 30% and preferably not exceed 70% other than during room cleaning the aim should be 50-60%. Lighting should be artificial, the sequence being 12 hours light, 12 hours dark. For feeding, conventional laboratory diets may be used with an unlimited supply of drinking water. Animals may be group-caged by dose, but the number of animals per cage must not interfere with clear observations of each animal.

Preparation of animals

14. The animals are randomly selected, marked to permit individual identification, and kept in their cages for at least 5 days prior to dosing to allow for acclimatisation to the laboratory conditions.

Preparation of doses

15. In general test substances should be administered in a constant volume over the range of doses to be tested by varying the concentration of the dosing preparation. Where a liquid end product or mixture is to be tested however, the use of the undiluted test substance, ie at a constant concentration, may be more relevant to the subsequent risk assessment of that substance, and is a requirement of some regulatory authorities. In either case, the maximum dose volume for administration must not be exceeded. The maximum volume of liquid that can be administered at one time depends on the size of the test animal. In rodents, the volume should not normally exceed 1mL/100g of body weight: however in the case of aqueous solutions 2 mL/100g body weight can be considered. With respect to the formulation of the dosing preparation, the use of an aqueous solution/suspension/emulsion is recommended wherever possible, followed in order of preference by a solution/suspension/emulsion in oil (e.g. corn oil) and then possibly solution in other vehicles. For vehicles other than water the toxicological characteristics of the vehicle should be known. Doses must be prepared shortly prior to administration unless the stability of the preparation over the period during which it will be used is known and shown to be acceptable.

PROCEDURE

Administration of doses.

16. The test substance is administered in a single dose by gavage using a stomach tube or a suitable intubation canula. In the unusual circumstance that a single dose is not possible, the dose may be given in smaller fractions over a period not exceeding 24 hours.

17. Animals should be fasted prior to dosing (e.g. with the rat, food but not water should be withheld over-night, with the mouse, food but not water should be withheld for 3-4 hours). Following the period of fasting, the animals should be weighed and the test substance administered. After the substance has been administered, food may be withheld for a further 3-4 hours in rats or 1-2 hours in mice. Where a dose is administered in fractions over a period it may be necessary to provide the animals with food and water depending on the length of the period.

Number of animals and dose levels

18. Three animals are used for each step. The dose level to be used as the starting dose is selected from one of four fixed levels, 5, 50, 300 and 2000 mg/kg body weight. The starting dose level should be that which is most likely to produce mortality in some of the dosed animals. The flow charts of Annex 2 describe the procedure that should be followed for each of the starting doses.

19. When available information suggests that mortality is unlikely at the highest starting dose level (2000 mg/kg body weight), then a limit test should be conducted. When there is no information on a substance to be tested, for animal welfare reasons it is recommended to use the starting dose of 300 mg/kg body weight.

20 The time interval between treatment groups is determined by the onset, duration, and severity of toxic signs. Treatment of animals at the next dose, should be delayed until one is confident of survival of the previously dosed animals.

21. Exceptionally, and only when justified by specific regulatory needs, the use of additional upper dose level of 5000 mg/kg body weight may be considered (see Annex 3). For reasons of animal welfare concern, testing of animals in GHS Category 5 ranges (2000-5000mg/kg) is discouraged and should only be considered when there is a strong likelihood that results of such a test have a direct relevance for protecting human or animal health or the environment.

Limit test

22. The limit test is primarily used in situations where the experimenter has information indicating that the test material is likely to be nontoxic, i.e., having toxicity only above regulatory limit doses. Information about the toxicity of the test material can be gained from knowledge about similar tested compounds or similar tested mixtures or products, taking into consideration the identity and percentage of components known to be of toxicological significance. In those situations where there is little or no information about its toxicity, or in which the the test material is expected to be toxic, the main test should be performed.

23. A limit test at one dose level of 2000 mg/kg body weight may be carried out with six animals (three animals per step). Exceptionally a limit test at one dose level of 5000 mg/kg may be carried out with three animals (see Annex 3). If test substance-related mortality is produced, further testing at the next lower level may need to be carried out.

OBSERVATIONS

24. Animals are observed individually after dosing at least once during the first 30 minutes, periodically during the first 24 hours, with special attention given during the first 4 hours, and daily thereafter, for a total of 14 days, except where they need to be removed from the study and humanely killed for animal welfare reasons or are found dead. However, the duration of observation should not be fixed rigidly. It should be determined by the toxic reactions, time of onset and length of recovery period, and may thus be extended when considered necessary. The times at which signs of toxicity appear and disappear are important, especially if there is a tendency for toxic signs to be delayed (12). All observations are systematically recorded with individual records being maintained for each animal.

25. Additional observations will be necessary if the animals continue to display signs of toxicity. Observations should include changes in skin and fur, eyes and mucous membranes, and also respiratory, circulatory, autonomic and central nervous systems, and somatomotor activity and behaviour pattern. Attention should be directed to observations of tremors, convulsions, salivation, diarrhoea, lethargy, sleep and coma. The principles and criteria summarised in the Humane Endpoints Guidance Document (9) should be taken into consideration. Animals found in a moribund condition and animals showing severe pain or enduring signs of severe distress should be humanely killed. When animals are killed for humane reasons or found dead, the time of death should be recorded as precisely as possible.

Body weight

26. Individual weights of animals should be determined shortly before the test substance is administered, and at least weekly thereafter. Weight changes should be calculated and recorded. At the end of the test surviving animals are weighed and humanely killed.

Pathology

27. All test animals (including those that die during the test or are removed from the study for animal welfare reasons) should be subjected to gross necropsy. All gross pathological changes should be recorded for each animal. Microscopic examination of organs showing evidence of gross pathology in animals surviving 24 or more hours may also be considered because it may yield useful information.

DATA AND REPORTING

Data

28. Individual animal data should be provided. Additionally, all data should be summarised in tabular form, showing for each test group the number of animals used, the number of animals displaying signs of toxicity, the number of animals found dead during the test or killed for humane reasons, time of death of individual animals, a description and the time course of toxic effects and reversibility, and necropsy findings.

Test report

29. The test report must include the following information, as appropriate:

Test substance:

- physical nature, purity, and, where relevant, physico-chemical properties (including isomerisation);
- identification data, including CAS number.

Vehicle (if appropriate):

- justification for choice of vehicle, if other than water.

Test animals:

- species/strain used;
- microbiological status of the animals, when known;
- number, age, and sex of animals (including, where appropriate, a rationale for the use of males instead of females);
- source, housing conditions, diet etc.

Test conditions:

- details of test substance formulation including details of the physical form of the material administered;
- details of the administration of the test substance including dosing volumes and time of dosing;
- details of food and water quality (including diet type/source, water source);
- the rationale for the selection of the starting dose.

Results:

- tabulation of response data and dose level for each animal (i.e. animals showing signs of toxicity including mortality; nature, severity, and duration of effects);
- tabulation of body weight and body weight changes;
- individual weights of animals at the day of dosing, in weekly intervals thereafter, and at the time of death or sacrifice;
- date and time of death if prior to scheduled sacrifice;
- time course of onset of signs of toxicity, and whether these were reversible for each animal;
- necropsy findings and histopathological findings for each animal, if available.

Discussion and interpretation of results.

Conclusions.

LITERATURE

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610.

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alternatives to LD/LC50 Tests. ALTEX 16, 129-134.

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method – An Alternative to the LD50 Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.

(8) OECD (2000) Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50} and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

ANNEX 1

DEFINITIONS

Acute oral toxicity refers to those adverse effects occurring following oral administration of a single dose of a substance, or multiple doses given within 24 hours.

Delayed death means that an animal does not die or appear moribund within 48 hours but dies later during the 14-day observation period.

Dose is the amount of test substance administered. Dose is expressed as weight of test substance per unit weight of test animal (e.g. mg/kg).

GHS: Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures. A joint activity of OECD (human health and the environment), UN Committee of Experts on Transport of Dangerous Goods (physical–chemical properties) and ILO (hazard communication) and co-ordinated by the Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC).

Impending death: when moribund state or death is expected prior to the next planned time of observation. Signs indicative of this state in rodents could include convulsions, lateral position, recumbence, and tremor (See the Humane Endpoint Guidance Document (9) for more details).

LD50 (median lethal oral dose) is a statistically derived single dose of a substance that can be expected to cause death in 50 per cent of animals when administered by the oral route. The LD50 value is expressed in terms of weight of test substance per unit weight of test animal (mg/kg).

Limit dose refers to a dose at an upper limitation on testing (2000 or 5000 mg/kg).

Moribund status: being in a state of dying or inability to survive, even if treated (See the Humane Endpoint Guidance Document (9) for more details).

Predictable death: presence of clinical signs indicative of death at a known time in the future before the planned end of the experimen ; for example: inability to reach water or food. (See the Humane Endpoint Guidance Document (9) for more details).

ANNEX 2

PROCEDURE TO BE FOLLOWED FOR EACH OF THE STARTING DOSES

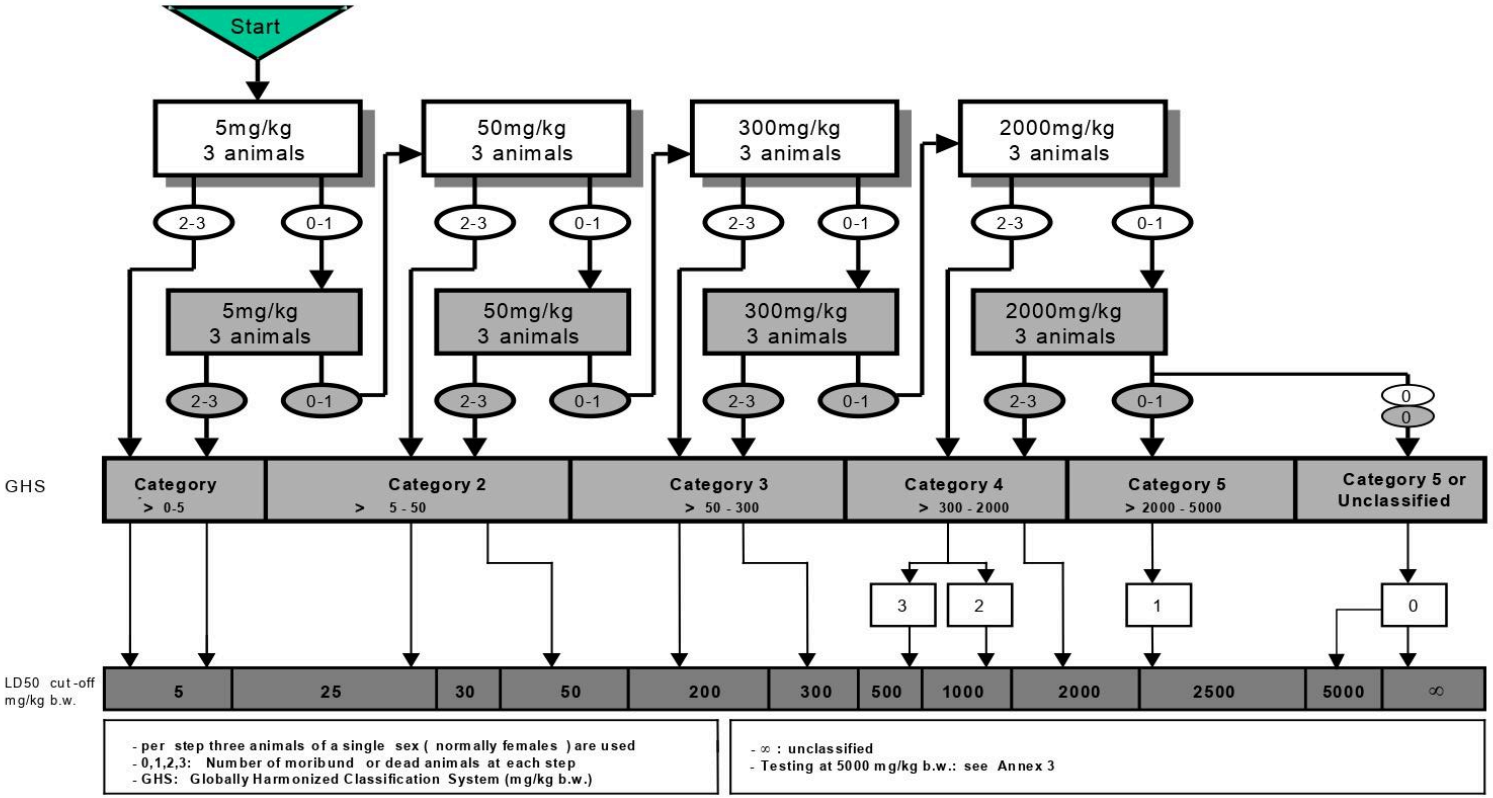
GENERAL REMARKS

1. For each starting dose, the respective testing schemes as included in this Annex outline the procedure to be followed.

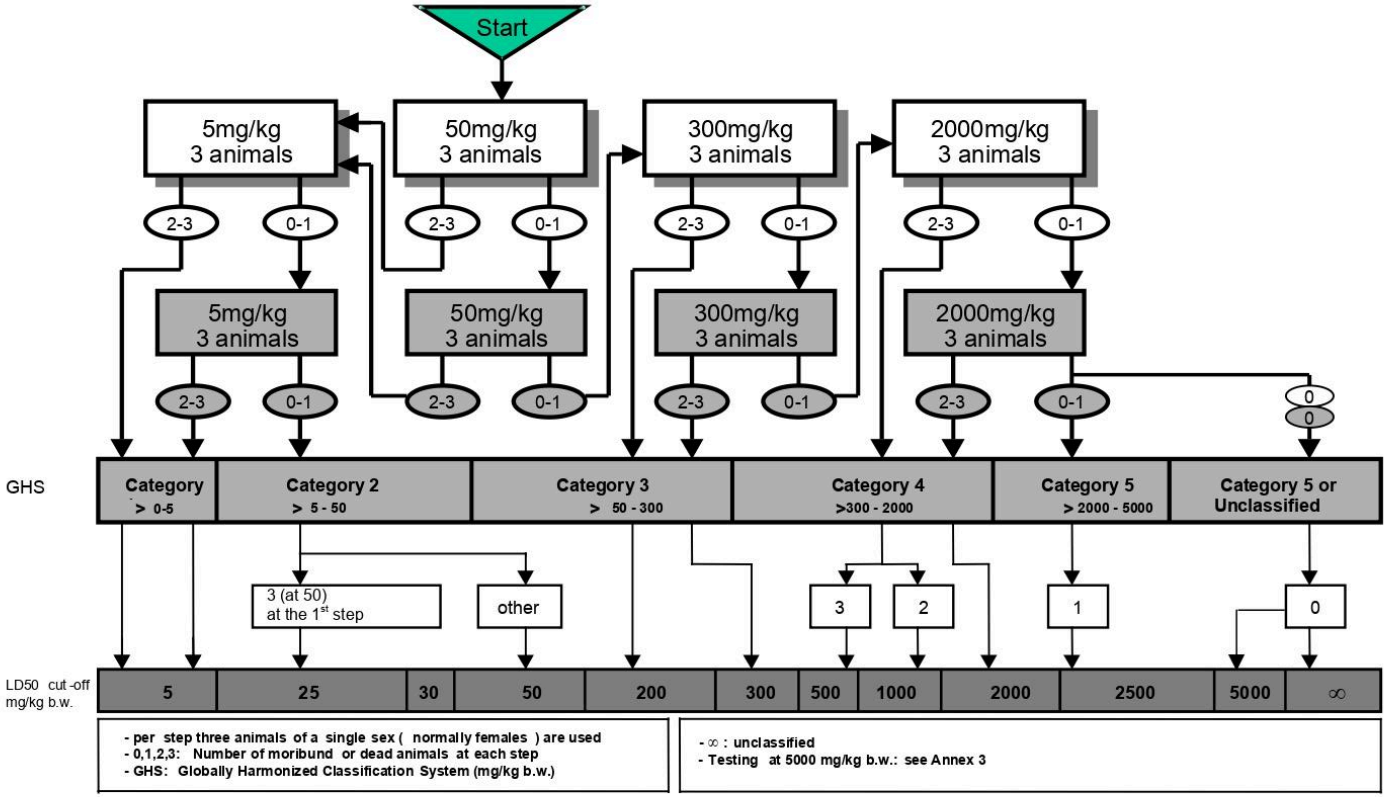
- Annex 2 a: Starting dose is 5 mg/kg bw
- Annex 2 b: Starting dose is 50 mg/kg bw
- Annex 2 c: Starting dose is: 300 mg/kg bw
- Annex 2 d: Starting dose is: 2000 mg/kg bw

Depending on the number of humanely killed or dead animals, the test procedure follows the indicated arrows.

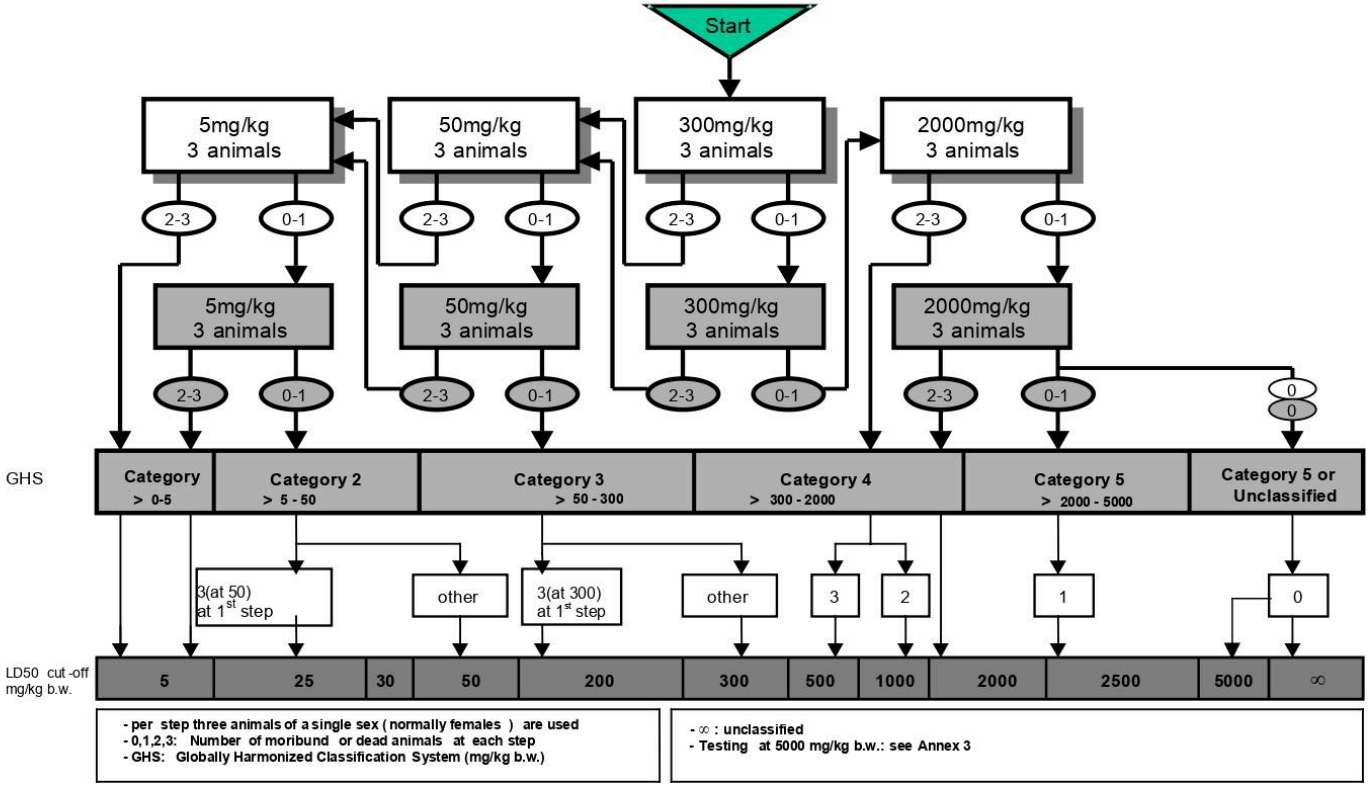
ANNEX 2a: TEST PROCEDURE WITH A STARTING DOSE OF 5 MG/KG BODY WEIGHT



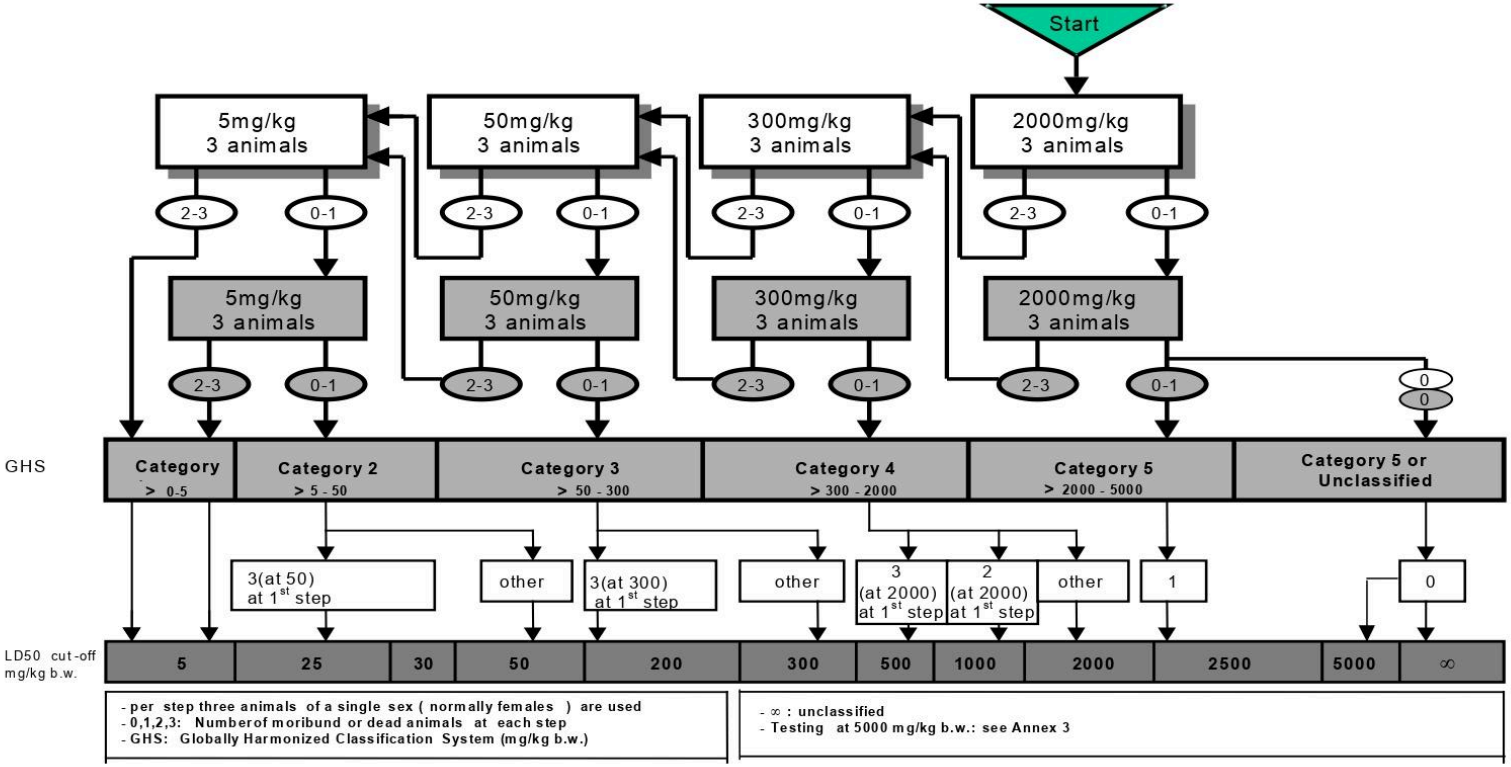
ANNEX 2b: TEST PROCEDURE WITH A STARTING DOSE OF 50 MG/KG BODY WEIGHT



ANNEX 2c: TEST PROCEDURE WITH A STARTING DOSE OF 300 MG/KG BODY WEIGHT



ANNEX 2d: TEST PROCEDURE WITH A STARTING DOSE OF 2000 MG/KG BODY WEIGHT



ANNEX 3

CRITERIA FOR CLASSIFICATION OF TEST SUBSTANCES WITH EXPECTED LD50 VALUES EXCEEDING 2000 MG/KG WITHOUT THE NEED FOR TESTING

1. Criteria for hazard Category 5 are intended to enable the identification of test substances which are of relatively low acute toxicity hazard but which, under certain circumstances may present a danger to vulnerable populations. These substances are anticipated to have an oral or dermal LD50 in the range of 2000-5000 mg/kg or equivalent doses for other routes. The test substance should be classified in the hazard category defined by: 2000mg/kg<LD50<5000mg/kg (Category 5 in the GHS) in the following cases:

a) If directed to this category by any of the testing schemes of Annex 2a-2d, based on mortality incidences;

b) if reliable evidence is already available that indicates the LD50 to be in the range of Category 5 values, or other animal studies or toxic effects in humans indicate a concern for human health of an acute nature.

c) Through extrapolation, estimation or measurement of data if assignment to a more hazardous category is not warranted, and

- reliable information is available indicating significant toxic effects in humans, or
- any mortality is observed when tested up to Category 4 values by the oral route, or
- where expert judgement confirms significant clinical signs of toxicity, when tested up to Category 4 values, except for diarrhoea, piloerection or an ungroomed appearance, or
- where expert judgement confirms reliable information indicating the potential for significant acute effects from the other animal studies.

TESTING AT DOSES ABOVE 2000 MG/KG

2. Recognising the need to protect animal welfare, testing of animals in Category 5 (5000 mg/kg) ranges is discouraged and should only be considered when there is a strong likelihood that results of such a test have a direct relevance for protecting human or animal health (10). No further testing should be conducted at higher dose levels.

3. When testing is required a dose of 5000mg/kg, only one step (i.e. three animals) is required. If the first animal dosed dies , then dosing procedes at 2000mg/kg in accordance with the flow charts in Annex 2. If the first animal survives, two further animals are dosed. If only one of the three animal dies , the LD50 value is expected to exceed 5000mg/kg. If both animals die, then dosing proceeds at 2000mg/kg.