

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

CAROLINE BELLÓ

**PERFIL DA AÇÃO DO CETOPROFENO E DO GUARANÁ (*Paullinia cupana*) E SUA
ASSOCIAÇÃO SOBRE MARCADORES DO METABOLISMO: UM ENFOQUE
HEPÁTICO, RENAL, HEMATOLÓGICO E OXIDATIVO**

PONTA GROSSA-PR

2016

CAROLINE BELLÓ

**PERFIL DA AÇÃO DO CETOPROFENO E DO GUARANÁ (*Paullinia cupana*) E SUA
ASSOCIAÇÃO SOBRE MARCADORES DO METABOLISMO: UM ENFOQUE
HEPÁTICO, RENAL, HEMATOLÓGICO E OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes

PONTA GROSSA-PR

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Belló, Caroline
B446 Perfil da ação do cetoprofeno e do guaraná (Paullinia cupana) e sua associação sobre marcadores do metabolismo: um enfoque hepático, renal, hematológico e oxidativo/ Caroline Belló. Ponta Grossa, 2016.
114f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Fisiologia e Fisiopatologia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso.
Coorientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes.

1.Cetoprofeno. 2.Extrato aquoso de guaraná. 3.Estresse oxidativo. 4.Nefrotoxicidade. I.Velloso, José Carlos Rebuglio. II. Fernandes, Daniel. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências Biomédicas. IV. T.

CDD: 616.075



Universidade Estadual
de Ponta Grossa



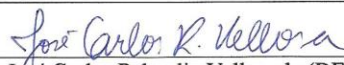
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA, NÚMERO DA ATA 02/2016, DA MESTRANDA CAROLINE BELLÓ REALIZADO NO DIA 19 DE FEVEREIRO DE 2016, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos dezenove dias de fevereiro de dois mil e dezesseis, às 09h00min na sala 93- A, Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência do **Professor Dr. José Carlos Rebuglio Velloso** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **Caroline Belló** na linha de pesquisa; Fisiologia do Metabolismo e do Sistema Imune, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): **Professora Dra. Kátia Sabrina Paludo (UEPG/PR)** e **Professor Dr. Omar Arafat Kdudsi (IFPR/PR)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **Perfil de ação do cetoprofeno e do guaraná (*Paullinia Cupana*) e sua associação sobre marcadores do metabolismo: um enfoque hepático, renal, hematológico e oxidativo**. Encerrado a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como - APROVADO considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em - Ciências Biomédicas. A aluna deverá entregar, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação do programa com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, a aluna terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☐

Novo título: _____


José Carlos Rebuglio Velloso 1- (DECLIN - UEPG)- Presidente


Kátia Sabrina Paludo 2- (DEBIOGEM - UEPG) – Titular


Omar Arafat Kdudsi 3- (DEBIOL - IFPR) – Titular

Dedico esta dissertação aos meus pais, Neivo e Diamantina, e ao meu esposo, José.

Vocês são meu porto-seguro de coragem e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Apenas um singelo gesto diante da importância que tens na construção deste trabalho: agradecer!

À Deus pela Sua presença em todos os dias em minha vida, pela Sua proteção e graça para que este projeto se tornasse realidade, Amém.

Aos meus pais, Neivo e Diamantina, pelo amor e apoio dedicado a mim ao longo de todos esses anos da minha formação. Pelo exemplo que são de perseverança e força. Essa conquista é tão minha quanto de vocês!

Ao meu esposo, José Carlos, pelo incentivo e paciência em todos aqueles dias em que este trabalho me exigia tanto e dentro de mim muitas dúvidas se construía. Pelo amor ímpar e cuidado incondicional, que mesmo na maioria dos dias, longe, jamais hesitou em demonstrar. O mestrado é apenas mais um capítulo da nossa história que começou na graduação, naquela cidade universitária.

Aos meus familiares, em especial meu irmão Joel e minha cunhada Cristiane, por sempre me acolherem tão bem e pela força para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu orientador e professor, Dr. José Carlos Rebuglio Velloso. Talvez aqui não encontre palavras, tamanha é minha gratidão. Agradecer à você que dedicou muitas horas do seu precioso tempo para atender minhas dúvidas, e muitas vezes minhas incertezas. Pela sua paciência e confiança, pois mesmo quando as coisas não evoluíam da maneira adequada dizia: “Calma, Carol, vai dar tudo certo!”...e não é que deu?! Agradecer pelos momentos de troca de conhecimento e experiências de vida, pela sua competência e compreensão, e muito além disso, pelo seu exemplo de professor e pessoa, onde a humildade e simplicidade ocupam um grande lugar!

Ao Professor Dr. Daniel Fernandes, meu co-orientador, pela sua disponibilidade e paciência, especialmente na análise dos resultados dos animais, assim como sua dedicação em me mostrar que havia um caminho para aquilo que para mim, à primeira vista era inexplicável.

À Professora Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz, pela sua essencial contribuição para a construção deste trabalho através do fornecimento do extrato aquoso de guaraná e suas análises. Obrigada pela sua disponibilidade e entusiasmo, e também muito obrigada para toda a equipe do Laboratório Biogenômica que esteve envolvida nesta pesquisa.

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Biomédicas pelos ensinamentos e momentos de aprendizado que tivemos.

Aos amigos que este mestrado me presenteou. Jéssica, muito obrigada por estar logo ali, no laboratório da frente, em todas as disciplinas que com aquele “dedinho bom” escolhemos em fazer, ainda bem que sempre juntas! Obrigada pelos momentos de alegrias e também por aqueles momentos de falta de tudo, inclusive ou principalmente, sorte, que compartilhamos.

Ana...ah, Ana. O que eu seria sem a tua ajuda? Obrigada pelos longos dias de experimentos, e aquelas longas manhãs que rendiam muito além de resultados...boas conversas e uma grande amizade...Pela tua paciência e persistência, pois mesmo sabendo que não conseguia usar dois instrumentos ao mesmo tempo insistia que eu ocupasse, ou pelo menos tentasse, as duas mãos. Anderson, pelos quilômetros de conversas e apoio que trocamos. Pela tua amizade além da universidade. Pelas risadas e ótimas jantas! Josi...sem palavras para agradecer essa minha grande Ic, amiga e parceira, não importava o teste e nem a hora...Obrigada pela tua ajuda sempre, seja nas repetições ou naquelas 5h de banho-maria, onde quem ficava de “banho” éramos nós e a noite era o limite. Obrigada pela tua amizade, disponibilidade, competência e acima de tudo eficiência! Bruno, obrigada pelos longos dias de experimentos, discussões, companhia para o almoço ou café da tarde, e, além disso, pela constante troca de conhecimentos que muitas vezes criavam mais dúvidas do que quando tínhamos iniciado a conversa.

Aos colegas de laboratório, Cris, Leandro, Daniel, Paola, Géssica, Anderson e Lucas, pela ajuda e momentos agradáveis que passamos juntos.

À Marilene e Maria, funcionárias do Biotério. Pela ajuda no manuseio e cuidado com os animais.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas e todos os seus funcionários que contribuíram para a realização deste mestrado.

À CAPES pela bolsa concedida.

À todos que de alguma forma contribuíram para que este projeto se concretizasse!

Muito obrigada!

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

RESUMO

A inflamação está envolvida com diversas doenças que acometem grande parte da população mundial. O cetoprofeno é um medicamento amplamente utilizado no tratamento dos processos inflamatórios. Apesar de sua eficácia, este fármaco apresenta importantes efeitos colaterais. O mecanismo pelo qual tais efeitos indesejados acontecem não são totalmente conhecidos. Pesquisas indicam o envolvimento da inibição de algumas enzimas. Porém, outros alvos têm sido apontados como corroboradores das complicações clínicas do cetoprofeno, como é o caso do estresse oxidativo. O estresse oxidativo é uma condição deletéria para o organismo que pode ser amenizada pela ação de agentes antioxidantes, tais como: catequinas, taninos e outros polifenóis. A relação entre o estresse oxidativo, cetoprofeno e a contribuição de moléculas antioxidantes neste processo precisa ser melhor esclarecida e pode ser um futuro alvo terapêutico quando se trata da melhoria da ação farmacológica e/ou diminuição de efeitos colaterais provocados pelo uso do cetoprofeno. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do cetoprofeno e do extrato aquoso de guaraná, isoladamente e associados, em sistemas oxidativos *in vitro* e modelos *in vivo* de estudos de toxicidade renal e hepática avaliando-se parâmetros laboratoriais bioquímicos e hematológicos. Dentre os modelos utilizados estão: ABTS^{•+}, DPPH[•], HOCl, O₂^{•-}, inibição de peroxidase e hemólise provocada pelo radical AAPH. Para o estudo *in vivo* foram utilizadas ratas (Wistar), que foram assim divididas (n=10 ou 11 animais): grupo controle (salina), grupo cetoprofeno (20mg/kg/dia), grupo extrato aquoso de guaraná 0,1 (0,1mg/g/dia), grupo extrato aquoso de guaraná 1 (1mg/g/dia), grupo associação 0,1 (cetoprofeno 20mg/kg/dia + extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia) e grupo associação 1 (cetoprofeno 20mg/kg/dia + extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia), a administração das amostras se deu por via oral (gavagem) durante 7 dias. Os resultados demonstraram que o extrato aquoso de guaraná apresentou significativa atividade antioxidante em todos os testes *in vitro*. O cetoprofeno apresentou baixa atividade na maioria dos ensaios *in vitro*. A associação destas substâncias demonstrou-se potencialmente benéfica sobre a ação contra radicais livres e agentes oxidantes, assim como na inibição da peroxidase. Nos ensaios *in vivo*, o cetoprofeno provocou alterações significativas nos parâmetros renais: ureia, creatinina e ácido úrico, e a associação com o extrato aquoso de guaraná reverteu esta alteração. Nos parâmetros hematológicos, o cetoprofeno causou anemia que não foi revertida pelo tratamento com o extrato. Sobre os marcadores de estresse oxidativo e defesa antioxidante observou-se variabilidade nos resultados, de acordo com o indicador analisado. De uma maneira geral, o cetoprofeno provoca a diminuição da capacidade antioxidante total bem como dos níveis de catalase dos animais tratados, e o extrato aquoso de guaraná contribuiu para o reestabelecimento desta defesa. Os resultados são promissores e indicam que a associação entre o cetoprofeno e o extrato aquoso de guaraná pode ser uma alternativa para a diminuição dos possíveis danos vinculados ao uso deste fármaco e sob a perspectiva abordada neste estudo. E ainda, é importante a realização de estudos para a avaliação da manutenção da eficácia anti-inflamatória do cetoprofeno quando utilizado associado à outras substâncias.

Palavras- chave: cetoprofeno. extrato aquoso de guaraná. estresse oxidativo. nefrotoxicidade.

ABSTRACT

Inflammation is involved in many diseases affecting much of the world's population. Ketoprofen is a widely used drug in the treatment of these inflammatory processes. However, despite its efficacy, this drug has significant side effects. The mechanism by which these undesired effects occur are not fully known. Research indicates the involvement of inhibition of some enzymes in this process. But nowadays other targets have been identified as corroboradores of the clinical complications by use ketoprofen, such as the oxidative stress. Oxidative stress is a deleterious condition for the organism that may be softened by the action of antioxidants such as catechins, tannins and other polyphenols. The relationship between oxidative stress, ketoprofen and the contribution of antioxidant molecules in this process need to be clarified and may be a future therapeutic target when it comes to improving the pharmacologic action and/or decreased side effects caused by use of ketoprofen. Thus, the aim of this study was to evaluate the action of ketoprofen and the aqueous extract of guarana alone and associates in oxidation *in vitro* and *in vivo* models of renal and hepatic toxicity studies evaluating biochemical and hematological laboratory parameters systems. Among the models used are direct action on ABTS^{•+}, DPPH[•], HOCl, O₂^{•-}, inhibition of peroxidase and hemolysis by AAPH radical. For the *in vivo* study, were used rats (female) (Wistar), which were divided into groups (n=10 or 11 animals): control group (saline), ketoprofen group (20 mg/kg/ day), aqueous extract guarana group 0,1 (0,1 mg/g/day), aqueous extract guarana group 1 (1 mg/g/day), association group 0,1 (ketoprofen (20mg/kg/day + water extract of guarana 0.1 mg/ g/day) and association group 1 (ketoprofen (20mg/kg/day + water extract of guarana 1 mg/g/ day), the administration of the samples was given by oral route (gavage) for 7 days. The results show that the aqueous extract of guarana show significant antioxidant activity in all *in vitro* tests. The ketoprofen virtually showed no activity in *in vitro* assays used in this study. The combination of these substances been shown to be potentially beneficial for action against free radicals and oxidizing agents, as well as in the inhibition of peroxidase . In *in vivo* assays, the ketoprofen caused significant changes in renal parameters: urea, creatinine and uric acid, and the association with the aqueous extract of guarana reversed this change. In hematological parameters, the ketoprofen caused anemia was not reversed by treatment with the extract. On markers of oxidative stress and antioxidant defense we observed variability in results, according to the indicator analyzed. In general, ketoprofen causes a decrease in the total antioxidant capacity and catalase levels of treated animals, and the aqueous extract of guarana contributed to re-establishment of this defense. On markers of oxidative stress and antioxidant defense we observed variability in results, according to the indicator analyzed. In general, the ketoprofen causes a decrease in the total antioxidant capacity and of the catalase levels of treated animals, and the aqueous extract of guarana contributed to re-establishment of this defense. The results are promising and indicate that the association between ketoprofen and the aqueous extract of guarana can be an alternative to reduce the potential damage linked to the use of this drug and considering the perspective addressed in this study. It is important to emphasize the importance of conducting studies to assess the maintenance of ketoprofen anti-inflammatory efficacy when used in combination with other substances.

Key words: ketoprofen. aqueous extract of guarana. oxidative stress. nephrotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura molecular dos enantiômeros R e S do cetoprofeno.....	19
Figura 2 –	Ação da enzima COX e seus subprodutos	21
Figura 3 –	Sistema antioxidante enzimático.....	32
Figura 4 –	Estrutura básica dos flavonóides.....	34
Figura 5 –	<i>Paullinia cupana</i>	36
Figura 6 –	Fluxograma do delineamento experimental.....	39
Figura 7 –	Ação <i>scavenger</i> do cetoprofeno, extrato aquoso de guaraná e resveratrol sobre o ABTS ^{•+} (55µM) em tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,4; λ 734nm.	48
Figura 8 –	Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno na atividade <i>scavenger</i> sobre o ABTS ^{•+}	49
Figura 9 –	Ação <i>scavenger</i> do cetoprofeno, extrato aquoso de guaraná e resveratrol sobre o radical DPPH [•] (60µM) em metanol absoluto; λ 531nm.....	50
Figura 10 –	Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno na atividade <i>scavenger</i> sobre o DPPH [•]	51
Figura 11 –	Ação <i>scavenger</i> do cetoprofeno, extrato aquoso de guaraná e resveratrol sobre o HOCl (30µM); em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; TMB 2,8mM, λ= 652nm.....	52
Figura 12 –	Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno sobre a inibição (%) da oxidação da TMB (2,8mM) pelo HOCl (30µM).....	53
Figura 13 –	Ação <i>scavenger</i> do cetoprofeno, extrato aquoso de guaraná e resveratrol sobre o ânion superóxido quimicamente gerado por NBT (68,4 µM), PMS (9,67 µM) e NADH (118,5µM) em tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,4; λ= 560nm	55
Figura 14 –	Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno na atividade <i>scavenger</i> sobre o O ₂ ^{•-}	56
Figura 15 –	Efeito do cetoprofeno, extrato aquoso de guaraná e resveratrol sobre a oxidação do guaiacol catalisada pela HRP (7 nM/ H ₂ O ₂ 0,1 mM); em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37°C; λ= 470 nm.	57
Figura 16 –	Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno sobre a inibição (%) da oxidação do guaiacol pela peroxidase (HRP)	58
Figura 17 –	Ação hemolítica do cetoprofeno em diferentes concentrações em função do tempo: suspensão de eritrócitos 5%; 5 horas de incubação; 37°C; tampão fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM, pH 7,4; λ= 414 nm.....	62
Figura 18 –	Ação hemolítica do Extrato aquoso de guaraná (Ext. aq. guaraná) em diferentes concentrações, em função do tempo: suspensão de eritrócitos 5%; 5 horas de incubação; 37°C; tampão fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM, pH 7,4; λ= 414 nm.....	63
Figura 19 –	Ação do cetoprofeno em diferentes concentrações sobre a hemólise promovida pelo AAPH (25mM) em função do tempo: suspensão de	

	eritrócitos 5%; 5 horas de incubação; 37°C; tampão fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM, pH 7,4; $\lambda = 414 \text{ nm}$	64
Figura 20 –	Ação do Extrato aquoso de guaraná (Ext. aq. guaraná) em diferentes concentrações sobre a hemólise promovida pelo AAPH (25mM), em função do tempo: suspensão de eritrócitos 5%; 5 horas de incubação; 37°C; tampão fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM, pH 7,4;	65
Figura 21–	Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno sobre a hemólise (A 414nm) durante 1h incubação (37°C) sem AAPH	66
Figura 22 –	Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno sobre a hemólise (A 414nm) durante 3h incubação (37°C) sem AAPH	67
Figura 23 –	Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno sobre a hemólise (A 414nm) durante 5h incubação (37°C) sem AAPH	68
Figura 24 –	Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno sobre a hemólise (A 414nm) promovida pelo AAPH durante 1h incubação (37°C).....	69
Figura 25 –	Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno sobre a hemólise (A 414nm) promovida pelo AAPH durante 3h incubação (37°C).....	70
Figura 26 –	Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno sobre a hemólise (A 414nm) promovida pelo AAPH durante 5h incubação (37°C).....	71
Figura 27 –	Avaliação dos níveis séricos de ureia	73
Figura 28 –	Avaliação dos níveis séricos de creatinina.....	74
Figura 29 –	Avaliação dos níveis séricos de ácido úrico	76
Figura 30 –	Avaliação da contagem de leucócitos totais (número de leucócitos $\times 10^3$)	78
Figura 31 –	Avaliação da contagem de eritrócitos (número de eritrócitos $\times 10^6/\mu\text{L}$).....	79
Figura 32 –	Avaliação da dosagem de hemoglobina.....	80
Figura 33 –	Avaliação do hematócrito	80
Figura 34 –	Avaliação do volume corpuscular médio (VCM).....	81
Figura 35 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a capacidade antioxidante total.....	84
Figura 36 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a atividade da catalase	85
Figura 37 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre os níveis de SH-T	86
Figura 38 –	Determinação dos níveis de SH-NP no fígado	88
Figura 39 –	Determinação da atividade da CAT no fígado.....	89
Figura 40 –	Determinação dos níveis de SH-NP no rim	90
Figura 41 –	Determinação da atividade da CAT no rim	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração dos componentes bioativos no extrato aquoso de guaraná	46
---	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
AAPH	2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride
Abs ou A	Absorbância
ABTS	2,2'-Azino-bis-3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
ALT	Alanina aminotransferase
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina tri-fosfato
C	Concentração
CAT	Catalase
Cet	Cetoprofeno
Cl^-	Íon cloreto
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COEP	Comitê de ética em pesquisa em seres humanos
CoQ	Coenzima Q
CoQH2	Ubiquinol
COX	Ciclooxigenase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB	ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico
EAG	Extrato aquoso de guaraná
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas do oxigênio
Fe^{3+}	Cátion ferro
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione reduzida
GSH-Px	Glutathione peroxidase
$\text{H}^\bullet$	Hidrogênio radicalar
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HCT	Hematócrito
$\text{HO}^\bullet$	Radical hidroxil
HOCl	Ácido hipocloroso
HRP	Peroxidase de raiz forte
IC_{50}	Concentração inibitória de cinquenta por cento
IL-1	Interleucina um
IL-1 β	Interleucina-um beta
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
KCl	Cloreto de potássio
MPO	Mieloperoxidase

NaCl	Cloreto de sódio
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NBT	Nitrobluetetrazolium
NF-κB	Fator nuclear kappa beta
NO$\cdot$	Óxido nítrico radicalar
NOS	Óxido nítrico sintase
O₂	Oxigênio molecular
O₂$\cdot^-$	Ânion superóxido
OAT1	Transportador de ânion orgânico-um
OAT3	Transportador de ânion orgânico-três
OONO$\cdot^-$	Peroxinitrito
PCR	Proteína C reativa
PGD₂	Prostaglandina D dois
PGE₂	Prostaglandina E dois
PGF_{2α}	Prostaglandina F dois alfa
PGG₂	Prostaglandina G dois
PGH₂	Prostaglandina H dois
PGs	Prostaglandinas
PMNs	Polimorfonucleares
ROO$\cdot$	Radical peroxilo
SH-NP	Grupamentos sulfidrílicos não-proteicos
SH-T	Grupamentos sulfidrílicos totais
SOD	Superóxido dismutase
TauCl	TaurinaCloramina
TCA	Ácido tricloroacético
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
TXA₂	Tromboxano A dois
URAT1	Transportador de urato-um
v₀	Velocidade inicial
VCM	Volume corpuscular médio
λ	Lambda, comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 CETOPROFENO	19
3.2 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO	23
3.3 A RELAÇÃO: ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E ANTI-INFLAMATÓRIOS	28
3.4 ANTIOXIDANTES.....	30
3.5 GUARANÁ (<i>Paullinia cupana</i>).....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 MATERIAIS	38
4.2 MÉTODOS.....	39
4.2.1 Delineamento experimental.....	39
4.2.2 Preparação do extrato aquoso de guaraná.....	39
4.2.3 Determinação de componentes bioativos do extrato aquoso de guaraná	40
4.2.4 Avaliação <i>in vitro</i> em sistemas oxidativos	40
4.2.4.1 Ação <i>scavenger</i> das amostras sobre o radical ABTS ^{•+}	41
4.2.4.2 Ação <i>scavenger</i> das amostras sobre radical DPPH [•]	41
4.2.4.3 Atividade <i>scavenger</i> das amostras sobre o HOCl	41
4.2.4.4 Atividade <i>scavenger</i> sobre o ânion superóxido	41
4.2.4.5 Ação na oxidação do guaiacol pela peroxidase (HRP).....	41
4.2.5 Avaliação de toxicidade	42
4.2.5.1 Ação sobre eritrócitos.....	42
4.2.6 Avaliação dos parâmetros hepáticos, renais e hematológicos.....	42
4.2.7 Determinações bioquímicas e hematológicas dos animais.....	43
4.2.8 Avaliação do <i>status</i> antioxidante dos animais.....	43

4.2.8.1 Determinação da capacidade antioxidante total do soro	43
4.2.8.2 Determinação de grupamentos sulfidrílicos totais (SH-T)	43
4.2.8.3 Determinação da atividade da enzima catalase	44
4.2.9 Biomarcadores teciduais do estresse oxidativo	44
4.2.9.1 Determinação de grupamentos sulfidrílicos não-proteicos (SH-NP)	44
4.2.9.2 Determinação da atividade da enzima catalase	44
4.2.10 Análise estatística	44
4.2.11 Representação gráfica e apresentação dos resultados.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 DETERMINAÇÃO DE COMPONENTES BIOATIVOS DO EXTRATO AQUOSO DE GUARANÁ	46
5.2 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> EM SISTEMAS OXIDATIVOS	47
5.2.1 Atividade <i>scavenger</i> sobre o radical ABTS ^{•+}	47
5.2.2 Atividade <i>scavenger</i> sobre o radical DPPH [•]	50
5.2.3 Atividade <i>scavenger</i> sobre o HOCl	52
5.2.4 Atividade <i>scavenger</i> sobre o O ₂ ^{•-}	54
5.2.5 Atividade sobre a inibição da oxidação do guaiacol pela peroxidase (HRP).....	56
5.3 AÇÃO HEMOLÍTICA SOBRE ERITRÓCITOS HUMANOS	61
5.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEPÁTICOS, RENAI E HEMATOLÓGICOS ..	72
5.5 AVALIAÇÃO DO ESTATUS ANTIOXIDANTE DOS ANIMAIS	83
CONCLUSÃO.....	93
REFERÊNCIAS	95
ANEXOS	109

1 INTRODUÇÃO

O processo inflamatório ocorre como uma resposta do tecido à injúria celular e caracteriza-se por um fenômeno complexo e dinâmico que pode ser desencadeado por diferentes estímulos, como: infecções, exposição a alérgenos, radiação e produtos químicos tóxicos, doenças autoimunes e crônicas, obesidade, e dieta de alto teor calórico (SCHETTER et al., 2010). Este processo envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares que incluem extravasamento de fluídos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e reparo (BECKER, 1983).

Os macrófagos e os leucócitos polimorfonucleares desempenham um papel importante no desenvolvimento do processo inflamatório através da liberação de fatores solúveis de regulação da fase aguda denominados de citocinas: interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (CARVALHO; LEMONICA, 1998).

Além disso, os macrófagos e neutrófilos, bem como as células teciduais lesadas liberam uma variedade de substâncias oxidantes, enzimas, e espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERN) são produzidas em abundância, promovendo a indução de um grande número de fatores transcricionais (expressão de enzimas com capacidade de eliminar radicais livres (catalase) e com atividade de reparo tecidual como a collagenase e a estromelisinase (COBB et al., 1996). Pode haver rompimento de mitocôndrias com liberação de enzimas líticas, peroxidação, destruição de membranas e dano no DNA (DRAY, 1995).

A inflamação pode ser classificada em aguda e crônica. A inflamação aguda é uma fase inicial e instala-se rapidamente. Este tipo de inflamação persiste apenas por um curto período de tempo (LIN; KARIN, 2007). Uma vez que o estímulo nocivo é removido, a reação inflamatória pode diminuir e ocorre o restabelecimento da estrutura do tecido e sua função fisiológica (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Já a inflamação crônica persiste por um longo período e pode predispor o indivíduo a doenças crônicas (LIN; KARIN, 2007).

Para o tratamento da inflamação são utilizados fármacos anti-inflamatórios, como por exemplo, o cetoprofeno, um anti-inflamatório não esteroide (AINE). Os AINES estão entre os medicamentos mais vendidos no mundo. Sua comercialização atinge cerca de 73 milhões de prescrições anuais em todo o mundo (HAHN, 2006). Em 2010, no Brasil, foram gastos 1,5 bilhão na compra deste tipo de medicamento (SILVA et al., 2013). O cetoprofeno é amplamente utilizado pela população em geral, desde crianças (FERREIRA et al., 2013) até

idosos (MOTA et al., 2010). Possui sua eficácia estabelecida, o que se dá através da inibição não seletiva da enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) (LEVOIN et al., 2004). Entretanto, após o seu uso, alguns efeitos adversos podem ser observados, seja na mucosa gastrointestinal, nos rins ou até mesmo no fígado (LEE; RODRIGUEZ; DIONNE, 2005; RADI; KHAN, 2006; TOMIC et al., 2008).

O mecanismo pelo qual os efeitos adversos acontecem ainda não está completamente elucidado. Há estudos que apontam a inibição da produção das prostaglandinas (PGs) como fator determinante para o estabelecimento destes efeitos, sob outra perspectiva acredita-se que o estresse oxidativo também possa contribuir para tal, visto que a utilização do cetoprofeno está relacionada com o aumento de ERO e diminuição de algumas enzimas antioxidantes no local em que são observados os principais danos causados pelo uso deste fármaco (LASTRA et al., 2002; LEE; RODRIGUEZ; DIONNE, 2005; RADI; KHAN, 2006; DOMÍGUEZ-LUIS et al., 2013).

Assim, para evitar ou diminuir os danos em que há o envolvimento do estresse oxidativo induzido por xenobióticos pode-se utilizar substâncias antioxidantes exógenas oriundas de fontes naturais (SIWAK et al., 2013). Tendo em vista a grande variedade de plantas brasileiras e ampla aplicabilidade de produtos naturais, seja como coadjuvantes da terapia ou como princípio ativo principal (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI, 2006), novas fontes antioxidantes têm sido alvo de pesquisas, como por exemplo, o guaraná (*Paullinia cupana*) (BITTENCOURT et al., 2013; COSTA et al., 2011).

Além de apresentar propriedades afrodisíacas, auxiliar na perda de peso e na manutenção da memória (ESPINOLA et al., 1997), o guaraná possui atividade antioxidante (BASILE et al., 2005) e torna-se uma potencial fonte de moléculas que podem minimizar os efeitos colaterais provocados pelo cetoprofeno relacionados ao estresse oxidativo.

Desta forma, este estudo justifica-se, dada a ampla aplicabilidade clínica do cetoprofeno e os efeitos adversos que ainda são observados, e a ausência de dados na literatura que demonstram o efeito da associação entre o cetoprofeno e o guaraná e principalmente, se o guaraná (substância antioxidante natural) altera os efeitos adversos.

Para esclarecer as possíveis interações entre o cetoprofeno, o guaraná, os radicais livres e espécies oxidantes não radicalares, são propostos neste trabalho, ensaios modelos amplamente utilizados para esta finalidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da associação do extrato aquoso do guaraná ao cetoprofeno em sistemas oxidativos *in vitro* e *ex vivo* e modelos de estudos de toxicidade *in vivo*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São objetivos específicos deste trabalho:

- i) avaliar o efeito *in vitro* do cetoprofeno e do extrato aquoso de guaraná associados ou não frente a radicais livres e ERO;
- ii) avaliar a ação *ex vivo* do cetoprofeno e do extrato aquoso de guaraná associados ou não, sobre a hemólise induzida ou não por radicais livres;
- iii) avaliar a hepatotoxicidade e a nefrotoxicidade em animais tratados e não-tratados com cetoprofeno e/ou extrato aquoso de guaraná;
- iv) avaliar a influência do uso de cetoprofeno e/ou extrato aquoso de guaraná nos parâmetros hematológicos dos animais estudados;
- v) avaliar o status antioxidante do soro dos animais tratados e não-tratados com cetoprofeno e/ou extrato aquoso de guaraná, e ainda;
- vi) determinar os efeitos sobre biomarcadores teciduais do estresse oxidativo provocados pelo tratamento dos animais com cetoprofeno e/ou extrato aquoso de guaraná;
- vii) determinar os principais componentes bioativos do extrato aquoso de guaraná.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

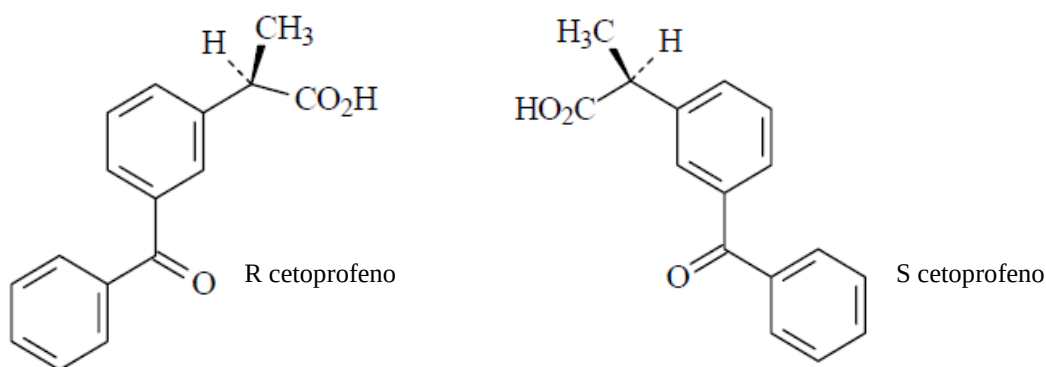
3.1 CETOPROFENO

Para o tratamento da inflamação existem vários fármacos anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais (AINES). Os AINES são subdivididos em grupos, devido às diferenças nas suas estruturas químicas: salicilatos, derivados do ácido fenâmico, ácido indol e indol acéticos, ácidos hetero-aril acéticos, ácidos enólicos, sulfonamida, ácidos arilpropionicos (ROBERTS; MORROW, 2005).

O cetoprofeno (ácido 2- (3-benzoil-fenil) propiônico), é um anti-inflamatório derivado do ácido arilpropionico (LEVOIN et al., 2004). Foi originalmente sintetizado em 1967 na França e lançado como fármaco oral na década de 1970 (KANTOR, 1986). É praticamente solúvel em acetona, etanol e metanol e pouco solúvel em água; sua baixa solubilidade é um fator limitante quando se trata da sua biodisponibilidade (SHENG et al., 2006).

Quimicamente, é um ácido fraco, devido à presença de um átomo de carbono quiral na cadeia lateral do ácido propiônico, resultando em duas formas enantiômeras: R e S, conforme estrutura apresentada na Figura 1 (LEVOIN et al., 2004).

Figura 1- Estrutura molecular dos enantiômero R e S do cetoprofeno



Fonte: Adaptado de Costa et al., 2006.

O enantiômero R é menos ativo terapeuticamente, sendo o isômero S o maior responsável pelos efeitos farmacológicos e farmacodinâmicos do cetoprofeno (RENÇBER; KARAVANA; ÖZYAZICI, 2009). Estudos demonstram que o S-cetoprofeno produz efeitos analgésicos eficazes e é o maior responsável pelo efeito anti-inflamatório (CABRÉ et al., 1998). *In vivo* o isômero R é convertido na forma S em diversas espécies de animais e a uma taxa de 10% em seres humanos (JAMALI; BROCKS, 1990). Atualmente, o cetoprofeno é comercializado como mistura racêmica de R e S enantiômeros (ASENSIO et al., 2007), disponível em diversas formas farmacêuticas: comprimido, xarope, gel tópico, supositório retal, solução oral, solução injetável e cápsula gelatinosa (BRASIL, 2015).

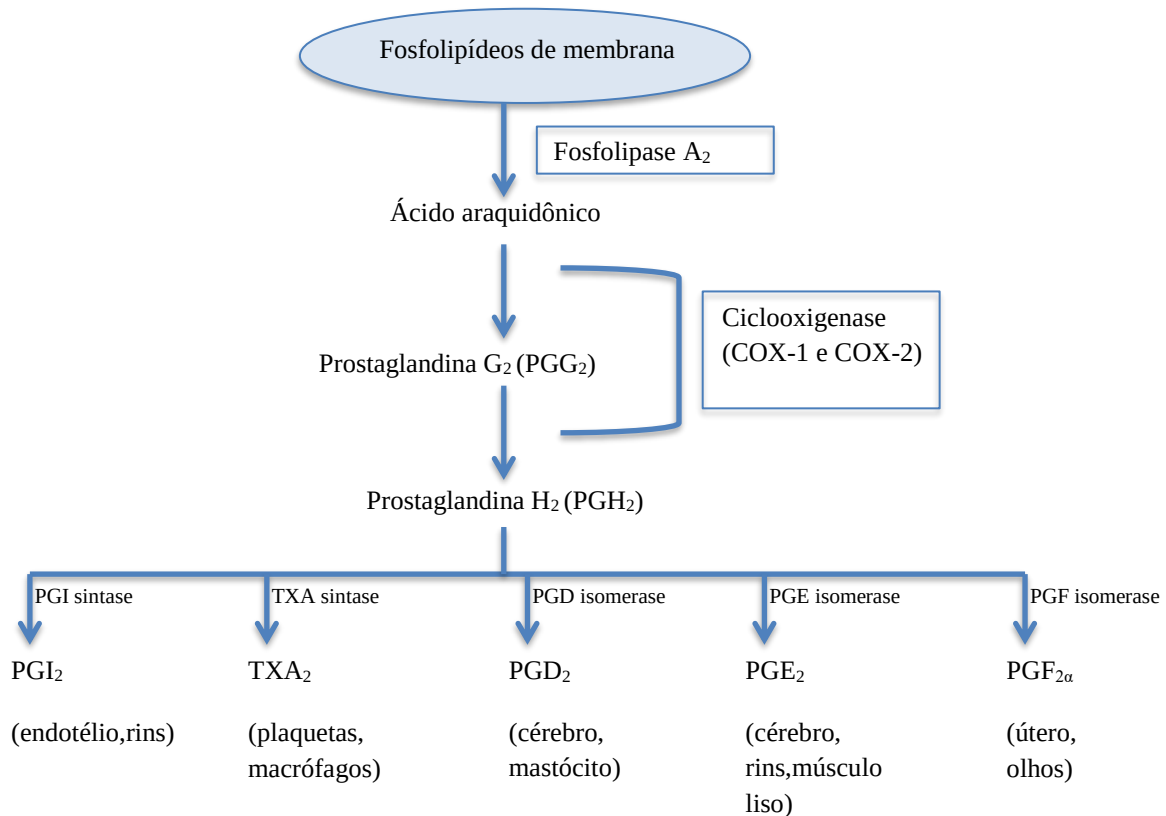
A administração oral do cetoprofeno leva a uma rápida absorção e a sua biodisponibilidade é proporcional à dose. A meia-vida plasmática é de cerca de 2-4 horas, atingindo o pico dos níveis plasmáticos em 1-2 horas. O cetoprofeno apresenta alta afinidade de ligação às proteínas plasmáticas (aproximadamente 99%) e a sua metabolização é hepática, sendo biotransformado em seus metabólitos inativos que são eliminados através da excreção renal (RENÇBER; KARAVANA; ÖZYAZICI, 2009) e biliar (ZHAO et al., 2007).

O cetoprofeno é um fármaco analgésico, antitérmico e anti-inflamatório e o fármaco de escolha no tratamento de artrite reumatóide, traumatismos músculo-esqueléticos, osteoartrite e artrite gotosa aguda (LEE et al., 2007), bursites e tendinites (RENÇBER; KARAVANA; ÖZYAZICI, 2009).

Seu mecanismo de ação está baseado na inibição não seletiva da enzima ciclooxigenase (COX), pois inibe a isoforma 1 (COX-1) e 2 (COX-2) (KAY-MUGFORD; BENN; LAMARRE, 2000), o que provoca a inibição da síntese de diversas prostaglandinas (PGs) (LEVOIN et al., 2004).

A COX é uma enzima ligada à membrana celular e apresenta atividade de endoperoxídeo sintetase (forma prostaglandina G_2 (PGG_2) a partir do ácido graxo precursor não esterificado) e de peroxidase {converte PGG_2 em prostaglandina H_2 (PGH_2)} (Figura 2), e é encontrada no cérebro e tecidos periféricos, como: mucosa gástrica, células endoteliais, rins, útero (ROBERTS; MORROW, 2005). É responsável pelos dois primeiros passos na síntese de prostanóides e as etapas posteriores são dependentes de enzimas tecido-específicas ou de mecanismos não enzimáticos (MENDES et al., 2012).

Figura 2 - Ação da enzima COX e seus subprodutos



Fonte: Adaptado de Mendes et al., 2012

A isoenzima COX-1 é constitutivamente expressa em muitos tecidos. É responsável pela formação de PGH₂ que é precursora da prostaglandina E₂ (PGE₂) e prostaglandina D₂ (PGD₂) na mucosa gástrica. As funções fisiológicas da PGE₂ e PGD₂ incluem a proteção da mucosa gástrica, pois inibem a secreção ácida pelo estômago, aumentam o fluxo sanguíneo local e a secreção de muco citoprotetor. Além disso, através da atividade da COX-1 nas plaquetas é sintetizado tromboxano A₂ (TXA₂) que causa agregação plaquetária, vasoconstrição e proliferação de células musculares lisas. Em diferentes regiões do rim ocorre a formação de PGE₂ e PGD₂ através da ação precursora da COX-1, e estas PGs possuem como função a dilatação vascular, diminuem a resistência vascular renal e aumentam a perfusão do órgão. Isso leva à redistribuição do fluxo sanguíneo do córtex renal para os néfrons na região intramedular. Além disso, PGE₂ e prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) medeiam efeitos diuréticos e natriuréticos (BATLOUNI, 2010). A COX-1 também pode ser induzida em pulmão embrionário humano, fibroblastos e macrófagos alveolares e peritoniais por estímulos inflamatórios.

A COX-2, também é constitutivamente expressa em tipos de células e de tecidos especializados, e auxilia em funções específicas, como a neurotransmissão, secreção de renina e no feedback tubuloglomerular nos rins (LEE; RODRIGUEZ; DIONNE, 2005). A COX-2 é induzível e tipicamente produz prostanóides pró-inflamatórios que medeiam as respostas durante a infecção e inflamação (LEE; RODRIGUEZ; DIONNE, 2005).

As PGs são importantes mediadores durante o processo inflamatório. Por exemplo, a PGE₂ e a PGI₂ são potentes agentes vasodilatadores e potencializam o aumento de permeabilidade induzido por mediadores como bradicinina e histamina. Além disso, tais PGs também estão envolvidas na hiperalgesia (MENDES et al., 2012).

Várias citocinas, especialmente o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-1 (IL-1), são estimulantes da COX-1 e COX-2 o que ocasiona maior síntese de PGs e também aumentam a síntese de PGE₂ no hipotálamo, levando a diversas reações químicas que resultam na elevação da temperatura corpórea (ROBERTS; MORROW, 2005). Assim, com a utilização do cetoprofeno tais efeitos são inibidos e o processo inflamatório resolvido.

Embora o cetoprofeno seja um fármaco seguro e eficaz são comuns alguns efeitos adversos. Conforme Radi e Khan (2006) o bloqueio tanto da COX-1 como da COX-2 provoca a diminuição da síntese das PGs que protegem a mucosa gástrica. Podendo ocorrer: ulceração, hemorragias, aumento na permeabilidade da mucosa intestinal e hipermotilidade gástrica (RADI; KHAN, 2006).

Markiewicz e Pasenkiewicz-Gierula (2011) propuseram uma hipótese alternativa para os efeitos indesejados relacionados à mucosa gástrica: o cetoprofeno pode afetar a hidrofobicidade desta mucosa, o que aumentaria a sua permeabilidade diminuindo a resistência luminal ao ácido gástrico.

Aponta-se também disfunção renal e redução do clearance de creatinina (LEE; RODRIGUEZ; DIONNE, 2005; TOMIC et al., 2008). Alguns desses efeitos colaterais observados na função renal também estão relacionados com a inibição da síntese das PGs que fisiologicamente são produzidas nesta estrutura. Com a inibição da produção da PGE₂ a hemodinâmica medular, o metabolismo do sódio e da água é prejudicado. Desta forma há diminuição do fluxo renal (não há vasodilatação da arteríola eferente) e retenção de sódio (não há inibição da reabsorção de sódio no ramo ascendente da alça de Henle) (MURRAY; BRATER, 1993).

Tomic et al (2008) também observaram possíveis efeitos adversos sob o fígado de animais tratados com cetoprofeno. Os resultados apontaram alteração da estrutura

morfológica do fígado que apresentou infiltração perivascular e discreta degeneração do parênquima (TOMIC et al., 2008).

O mecanismo de ação destes efeitos indesejados ainda não foi totalmente elucidado, e um aspecto importante a se considerar é a participação de radicais livres e espécies reativas (Lastra et al., 2002).

3.2 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO

As espécies reativas do oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são moléculas altamente reativas que podem ser radicais livres ou não. Radical livre é definido como um átomo ou molécula que contem um ou mais elétrons desemparelhados (número ímpar de elétrons na sua última camada eletrônica) e este não emparelhamento de elétrons é responsável pela alta reatividade destes átomos ou moléculas. Já as espécies reativas não radicalares contém apenas elétrons emparelhados na sua última camada eletrônica e são muito reativas, porém todas as ERO e ERN participam de diversas reações de óxido-redução que compõe o sistema biológico (HALLIWELL, 1991).

A formação *in vivo* de ERO ocorre a partir de reações de auto-oxidação, reação fotoquímica e reações enzimáticas (citocromos, oxidases, peroxidases, lipooxigenases, desidrogenases) e pode envolver compostos endógenos e vários xenobióticos (KEHRER, 2000).

Em condições fisiológicas também são produzidas ERO e a mitocôndria é considerada uma importante fonte. Isso se dá porque em organismos aeróbicos a adenosina tri-fosfato (ATP) é obtida a partir da redução completa do oxigênio molecular (O_2) por quatro elétrons. Essa transferência de elétrons ao longo das enzimas da cadeia respiratória não é totalmente eficiente, principalmente nos complexos I, II e III e o O_2 pode receber menos de quatro elétrons, resultando na formação de ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$). Aproximadamente 2% do O_2 que entra na mitocôndria é convertido em ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) (BURTON; JAUNIAUX, 2011).

Em níveis homeostáticos, ERO possuem importantes ações sobre a função celular, incluindo ativação de fatores de transcrição como, por exemplo, o fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) que regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias e outras citocinas, diferenciação celular e apoptose, ativação de proteínas cinases e fagocitose (BURTON; JAUNIAUX, 2011; KEHRER, 2000). Na fagocitose ocorre a ativação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) dos fagócitos (neutrófilos, macrófagos,

eosinófilos) e esta promove o aumento do consumo de oxigênio com consequente produção de $O_2^{\cdot-}$ que é importante para a defesa (atividade antimicrobiana), assim como para a geração de outras ERO. Esse processo é conhecido como "*oxidative burst*" e destaca-se o papel de duas enzimas:

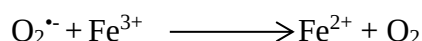
- i) **NADPH oxidase:** um complexo enzimático de membrana, que catalisa a redução monovalente do O_2 a $O_2^{\cdot-}$, e;
- ii) **Mieloperoxidase (MPO):** utiliza o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para oxidar o íon cloreto (Cl^-) a ácido hipocloroso ($HOCl$) com ação microbicida (VELLOSA et al., 2007a; CAPEILLÈRE-BLANDIN, 1998).

De tal forma, diversas ERO são biologicamente importantes, com destaque para:

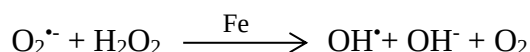
- i) **Ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$):** é gerado continuamente por diversos processos celulares (cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, por meio de enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase), ou pela redução monoelétrica de O_2 . O $O_2^{\cdot-}$ pode sofrer reação de dismutação catalisada pela superóxido dismutase (SOD) ou por dismutação espontânea em solução aquosa (VASCONCELOS et al., 2007):



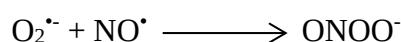
Em solução aquosa é um forte agente redutor e pode acelerar a reação de Fenton (VASCONCELOS et al., 2007):



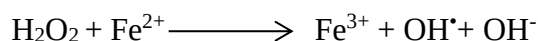
Pode auxiliar na formação do radical hidroxil ($HO^{\cdot}$) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006):



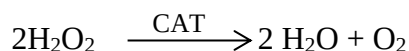
Ao reagir com o óxido nítrico, o $O_2^{\cdot-}$ pode formar peroxinitrito ($OONO^{\cdot-}$), uma ERN permeável às membranas e que possui função microbicida (VASCONCELOS et al., 2007):



- ii) **Peróxido de hidrogênio (H₂O₂):** é um intermediário formado na reação de dismutação espontânea do O₂^{•-} ou catalisada pela SOD, além disso, pode ser gerado por enzimas oxidases ou pela β-oxidação de ácidos graxos e auto-oxidação de produtos químicos durante o ciclo redox (GOETZ; LUCH, 2008; HALLIWELL; CLEMENT; LONG, 2000). Esta molécula não é um radical livre, porém possui alta capacidade de transpor as membranas celulares e gerar o radical peroxil na presença de metais de transição (VASCONCELOS et al., 2007):

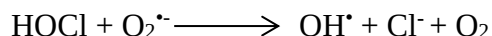


É parcialmente eliminado pela ação de enzimas, como: catalase (CAT), glutational peroxidase e peroxidases ligadas à tioredoxina, mas como essa eliminação tem baixa eficiência, grande parte do H₂O₂ é liberado para a célula (HALLIWELL; CLEMENT; LONG, 2000):



- iii) **Radical hidroxil (OH[•]):** este radical é considerado extremamente tóxico, devido a sua alta reatividade, meia vida extremamente curta (1ns) e porque o organismo humano não dispõe de um mecanismo de defesa específico (VASCONCELOS et al., 2007; GOETZ; LUCH, 2008).

O OH[•] pode ser formado a partir do O₂^{•-}, H₂O₂ e também pela reação (VELLOSA et al., 2007a):



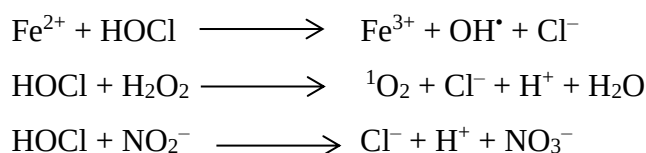
- iv) **Ácido hipocloroso (HOCl):** é uma espécie não radicalar, permeável às membranas biológicas. É formado pela oxidação de íons cloreto, catalisada pela MPO em presença de H₂O₂ (PANASENKO; GORUDKO; SOKOLOV, 2013):



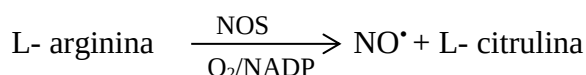
O HOCl pode gerar outras ERO, como: oxigênio singlete e radical hidroxil via sua reação com peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, respectivamente. Não há mecanismos enzimáticos de defesa contra oxidantes clorados, tanto em mamíferos como em bactérias. (LAPENNA; CUCCUROLLO, 1996.)

O HOCl forma grupos de oxidantes conhecidos como cloraminas, através da sua reação com aminas primárias ou secundárias. Essas cloraminas são oxidantes de vida longa e sua reatividade depende de sua lipossolubilidade. O β -aminoácido taurina, de maior abundância em neutrófilos e principal alvo nestas células, reage com o HOCl formando taurina cloramina (TauCl) (BABIOR, 2000).

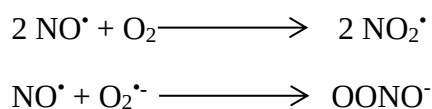
Além disso, há indícios de que o HOCl está envolvido com a formação de outras ERO, através de diferentes reações (PANASENKO; GORUDKO; SOKOLOV, 2013):



v) **Óxido nítrico ($\text{NO}^{\bullet}$) e Peróxinitrito (OONO^{-}):** são sintetizados nos organismos por meio da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (VASCONCELOS et al., 2007):



O $\text{NO}^{\bullet}$, um radical gasoso lipossolúvel e hidrossolúvel, e em meio aquoso, reage com o oxigênio para formar outras espécies reativas:

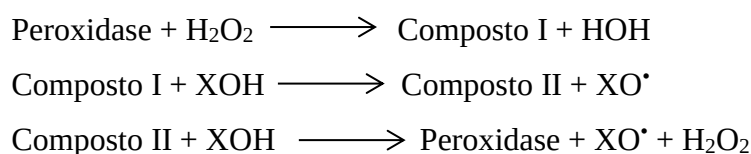


O OONO^{-} é um radical instável com tempo de meia vida curto. É um potente oxidante e forma $\text{OH}^{\bullet}$ independente da presença de metal de transição (VASCONCELOS et al., 2007):



- vi) **Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$):** é a forma excitada de oxigênio molecular, é muito reativo e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Pode ser produzido através da reação H_2O_2 com OCl^- ou ONOO^- ou pela dismutação espontânea do $\text{O}_2^{\cdot-}$ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Além das ERO, é importante salientar a participação das enzimas peroxidases nas reações de oxidação e redução. Dentre as peroxidases humanas citam-se: a MPO, peroxidase eosinofílica (EPO), peroxidase da tireóide, prostaglandina endoperoxídeo sintase e muitas outras. Além disso, as plantas também possuem peroxidases, que são amplamente estudadas, destacando-se a *horseradish peroxidase* (peroxidase de raiz forte (HRP), que possui massa molecular de 42,1 KDa, é uma hemoproteína cujo grupo prostético, a protoporfirina IX, está ligada não covalentemente à parte protéica da molécula. As peroxidases oxidam xenobióticos (X) na presença do H_2O_2 (O'BRIEN, 2000):



As ERO também estão relacionadas com processos fisiopatológicos especialmente quando ocorre um desequilíbrio entre a geração de ERO e a capacidade celular de neutralizar estas moléculas, o que resulta em danos na homeostasia fisiológica (GOETZ; LUCH, 2008). As ERO podem agir sobre a membrana celular, proteínas e DNA.

O $\text{OH}^{\cdot}$ causa modificação no DNA (com modificação das bases e quebras das fitas), danos nas proteínas, principalmente nos aminoácidos cisteína, histidina e triptofano podendo ocasionar clivagens de ligações com consequente perda da atividade enzimática, problemas no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular (VASCONCELOS et al., 2007; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Além disso, pode provocar peroxidação lipídica, que é a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados presentes nos lipídios de membrana, alterando a estrutura e fluidez da membrana celular (GOETZ; LUCH, 2008).

O $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode agir sobre proteínas e liberar Fe^{2+} das proteínas de armazenamento e de ferro-sulfoproteínas, tais como ferritina e aconitase, respectivamente. Também pode oxidar aminoácidos como a cisteína, gerando um tio-radical (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O H_2O_2 oxida proteínas que apresentem resíduos de metionina ou grupos tióis muito reativos, como por exemplo, a glutathiona reduzida (GSH) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O HOCl pode atacar biomoléculas de importância fisiológica, tais como tióis, tioésteres, aminas, fenóis e ligações insaturadas de moléculas com diferentes funções orgânicas, provocando alterações estruturais e funcionais de aminoácidos, nucleotídeos e carboidratos e lipídeos (PANASENKO; GORUDKO; SOKOLOV, 2013).

O $\text{NO}^\bullet$ pode desencadear a desaminação de nucleotídeos e, assim, contribuir para a formação de lesões no DNA, bem como interferir na apoptose celular por meio da sua reação com os resíduos de cisteína das caspases (GOETZ; LUCH, 2008). Já os principais alvos celulares do ONOO^- são grupos de moléculas que contém grupamentos tióis, metais de transição, e dióxido de carbono. Além disso, pode reagir com a guanina, provocando alterações no DNA e formando resíduos 8-hidroxideoxiguanosina (GOETZ; LUCH, 2008).

É através do ataque das ERO a diferentes alvos moleculares do organismo que diversas pesquisas relacionam estas espécies à patogênese de doenças como: câncer, inflamação, doença de Parkinson, Alzheimer, artrite, hipertensão, aterosclerose e outras (BHATT; LOKHANDWALA; BANDAY, 2014; CARNEVALE et al., 2014; TERLECKY; TERLECKY; GIORDANO, 2012; (PANASENKO; GORUDKO; SOKOLOV, 2013).

É importante salientar que o excesso de ERO pode resultar da ineficiência dos mecanismos de combate ou de um excesso de sua produção, sendo esta por mecanismos patológicos ou pelo uso xenobióticos (KEHRER, 2000).

3.3 A RELAÇÃO: ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E ANTI-INFLAMATÓRIOS

O estresse oxidativo é uma condição que resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante com predomínio dos oxidantes (SIES, 1991). Este desequilíbrio leva a danos de biomoléculas e células importantes com potencial impacto sobre todo o organismo (DURACKOVA, 2010).

O estresse oxidativo e a inflamação estão intimamente relacionados, pois além da síntese de prostaglandinas, outros fatores contribuem para a fisiopatologia deste processo, como é o caso das ERO (GAWEL; LIBROWSKI; LIPKOWSKA, 2013).

A proteína C-reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda e marcador de inflamação. Ela pode promover aterogênese e parece induzir o estresse oxidativo *in vivo*, por meio da estimulação da NADPH-oxidase, com consequente produção de radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, juntamente com

aumento da liberação de citocinas e outras moléculas pró-inflamatórias (DEVARAJ et al., 2009; JIALAL.; KAUR; DEVARAJ, 2013).

Durante um processo inflamatório, leucócitos polimorfonucleares (PMNs) e outras células fagocíticas, são ativadas e mobilizadas para o local da inflamação (SWAIN; ROHN; QUINN, 2002). Os PMNs além de atuarem na eliminação de agentes patogênicos por meio de mecanismos independentes de oxigênio (quimiotaxia, fagocitose, degranulação e liberação de enzimas líticas) (QUINN; GAUSS, 2004), também agem por mecanismos dependentes de oxigênio, resultando na produção de ERO (CASCÃO; ROSARIO; FONSECA, 2009), pois o $O_2^{\cdot -}$ produzido é rapidamente convertido ao H_2O_2 espontaneamente ou pela enzima SOD (BABIOR, 2004). O H_2O_2 pode reagir com metais de transição formando o $OH^{\cdot}$, radicais peróxido ($ROO^{\cdot}$), $NO^{\cdot}$, $ONOO^{\cdot}$ e $HOCl$ (COSTA et al., 2006).

O $NO^{\cdot}$ é produzido pelas sintases de óxido nítrico (iNOS ou NOS-2) durante a inflamação, e provoca o aumento da permeabilidade vascular dos tecidos inflamados (COSTA et al., 2006). Além disso, tem sido demonstrado que as citocinas, $TNF-\alpha$ e interleucina-1 beta ($IL-1\beta$), produzidas durante a uma resposta inflamatória, aumentam a síntese de ERO (GAWEL; LIBROWSKI; LIPKOWSKA, 2013).

Assim, o excesso de radicais livres e enzimas proteolíticas usadas como defesas no processo inflamatório podem ser altamente tóxicos para as células e os tecidos circundantes (PELLETIER et al., 2001).

Diante disso, estudos apontam novas perspectivas quanto à atividade dos AINES (DOMÍGUEZ-LUIS et al., 2013; FERNANDES et al., 2003). Há controvérsias quanto à ação pró ou antioxidante destes fármacos. Alguns AINES afetam uma variedade de sistemas enzimáticos incluindo a glutatona peroxidase (GSH-Px), glutatona redutase (GR), xantina oxidase e SOD, o que provoca alterações nas concentrações de ERO dentro da célula, assumindo um papel importante na patogênese dos danos (VILLEGAS et al., 2000).

Ansensio et al. (2007) demonstraram a redução dos níveis de NADPH e GSH após a administração de AINES, como por exemplo, o cetoprofeno. Estes dados sugerem a contribuição deste xenobiótico para o aumento do estresse oxidativo durante a inflamação.

Lastra et al. (2002) sugerem que ERO podem desempenhar um papel importante na patogênese dos danos causados pelo uso de cetoprofeno, uma vez que observaram o aumento de ERO possivelmente gerado pela via da enzima xantina oxidase, bem como a diminuição nos níveis da SOD.

Domínguez-Luis et al. (2013) demonstraram que os AINES podem gerar o $O_2^{\cdot-}$ na membrana plasmática através da ativação da NADPH-oxidase. O grupo destaca que a ERO poderiam servir como um alvo potencial para a gestão das condições inflamatórias.

Por outro lado tem sido sugerido que alguns AINES possuem atividade anti-inflamatória devido à sua capacidade de sequestrar ERO, bem como inibir o “*oxidative burst*” de neutrófilos que é desencadeado por vários fatores de ativação, desempenhando assim um papel protetor contra os danos oxidativos (FERNANDES et al., 2003).

Costa et al. (2006) demonstraram que o cetoprofeno possui ação efetiva na eliminação de radicais $HO^{\cdot}$. Esta atividade pode ser explicada devido à reatividade direta do anel arilo com este radical (NG; LIU; ZHAO, 2000). Além disso, o cetoprofeno também se mostrou eficaz na eliminação de H_2O_2 , resultados também encontrados por Kladna et al. (2006). Esta propriedade pode ser muito importante para o cetoprofeno porque a peroxidação lipídica parece estar aumentada em doenças inflamatórias (SPITELLER, 2003). O cetoprofeno também mostrou-se eficaz na inibição do “*oxidative burst*” de neutrófilos, via ERO (COSTA et al., 2006). Costa et al. (2006) e Kladna et al. (2006) sugerem que o cetoprofeno não possui efeito pró-oxidante.

Sob outra perspectiva observa-se que a modificação da estrutura química do cetoprofeno também pode contribuir na sua ação quando se trata da relação entre a inflamação e o estresse oxidativo. Em estudo conduzido por Manente et al. (2011), o cetoprofeno foi complexado a diferentes metais. A complexação do cetoprofeno ao cobre mostrou-se eficaz na captura de oxidantes não radicalares, enquanto a complexação ao cério é mais efetiva sobre radicais livres.

Tendo em vista que o processo inflamatório está relacionado com uma condição oxidativa, é importante diminuir os efeitos pró-oxidativos deletérios relacionados à ela, pois sua persistência durante um longo período de tempo pode levar a carcinogênese (FEDERICO et al., 2007). Isso pode ser possível através de moléculas com capacidade antioxidante, seja ela endógena ou não.

3.4 ANTIOXIDANTES

Para a manutenção da homeostase é importante que os níveis de substâncias oxido-redutoras (como as ERO) e o sistema antioxidante estejam em equilíbrio. Antioxidantes são substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparada à do substrato

oxidável, regeneram o substrato ou previnem significativamente a oxidação do mesmo (HALLIWELL; CLEMENT; LONG, 2000).

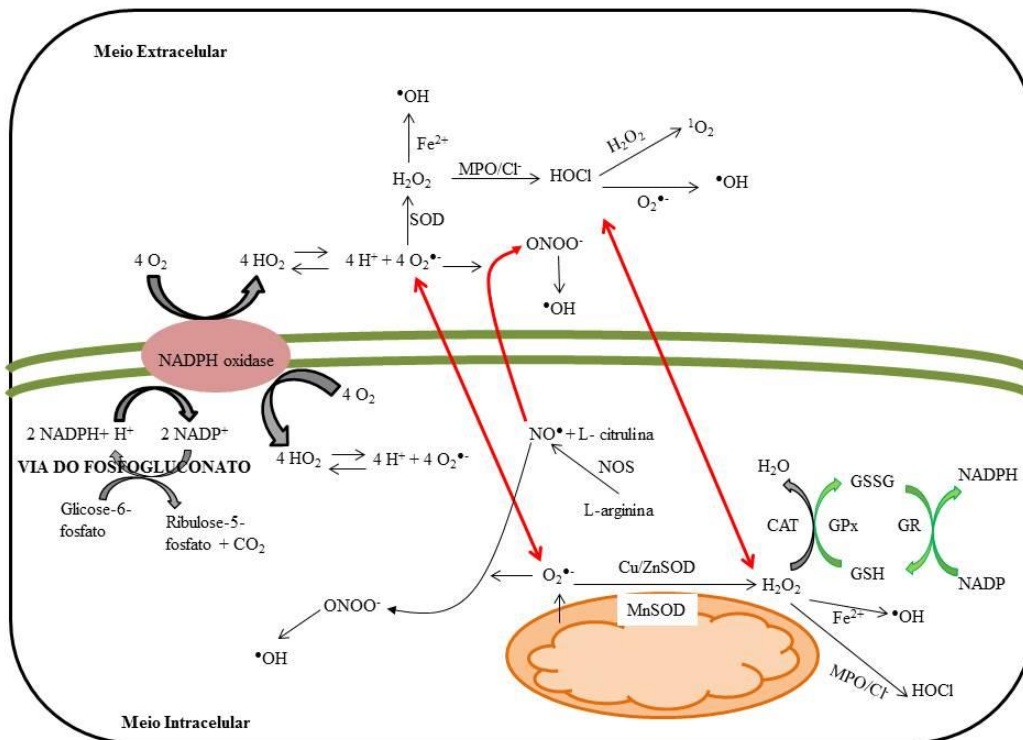
Para diminuir ou prevenir os danos causados pelo excesso de ERO, o organismo dispõe de dois principais sistemas antioxidantes: enzimático e não enzimático (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

As principais enzimas constituintes do sistema antioxidante enzimático estão:

- i) **Superóxido dismutase (SOD)** (EC 1.15.1.1): favorece a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio. As principais SOD, classificadas de acordo com o seu centro redox e localização celular são: SOD1 é dependente de Cu^{2+} e Zn^{2+} e é encontrada no citosol de células eucariotas; SOD2, dependente de Mn^{3+} e encontrada na mitocôndria. (VASCONCELOS et al., 2007; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006);
- ii) **Catalase (CAT)** (EC 1.11.1.6): decompõe o peróxido de hidrogênio a água, de forma extremamente rápida: a velocidade da reação é de aproximadamente $1.7 \times 10^7 \text{ m}^{-1}\text{s}^{-1}$. (SCANDALIOS, 2005);
- iii) **Glutathione peroxidase (GPx)** (EC 1.11.1.9): amplamente distribuída nos tecidos humanos e animais, sendo produzida em grande quantidade nos rins, fígado e sangue total, em nível moderado nos eritrócitos e em baixos níveis no plasma sanguíneo. Apresenta um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima, componente importante para sua atividade antioxidante. Catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio a água, e atua de forma conjunta com a glutathione redutase (GR) (EC 1.6.4.2), enzima responsável pela regeneração da glutathione à sua forma reduzida na presença de NADPH (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O sistema antioxidante enzimático está representado na Figura 3.

Figura 3 - Sistema antioxidante enzimático de uma célula modelo



Fonte: Adaptado de KHALIL, 2002.

O sistema antioxidante não enzimático é constituído por substâncias produzidas pelo organismo, como a glutathiona, a ubiquinona e o ácido úrico, e em substâncias obtidas da dieta como as vitaminas C e E, carotenóides, polifenóis e muitos outros (VASCONCELOS et al., 2007).

A *L*- γ -glutamil-*L*-cisteinilglicina (GSH) é um tripeptídeo que exerce funções essenciais na célula, destacando-se sua função como cofator da GPx. Desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a dissulfeto da glutathiona (GSSG). É um tampão redox sulfidrílico que mantém os resíduos cisteinila da hemoglobina e de outras proteínas do eritrócito no estado reduzido. A GSH é o único tiol não protéico presente em espécies aeróbias e seu papel intracelular antioxidante inclui a desintoxicação de xenobióticos e de ERO (VASCONCELOS et al., 2007).

A ubiquinona ou Coenzima Q₁₀ é o único lipídeo endogenamente sintetizado através da via do mevalonato, que apresenta função redox (VASCONCELOS et al., 2007). Desempenha papel central na cadeia respiratória mitocondrial, na cadeia de transporte de elétrons extra-mitocondrial, participa da regulação da permeabilidade da membrana celular, diminui a oxidação de proteínas de membrana, previne a oxidação do DNA e impede a

disfunção endotelial, provavelmente por aumentar a disponibilidade de NO. Sua forma antioxidante, o ubiquinol (CoQH₂), produto da redução da coenzima Q (CoQ), inibe a iniciação e propagação da peroxidação lipídica, com consequente impedimento da formação de ROO[•]. Além disso, a coenzima Q regenera a vitamina E do radical tocoferila. Assim, sua atividade antioxidante ocorre por meio do sequestro de radicais livres, e por interrupção de reações radicalares em cadeia. Tal atividade está limitada ao meio lipossolúvel, devido a sua longa cadeia lateral (VASCONCELOS et al., 2007).

O ácido úrico deriva do metabolismo das purinas e é produzido pela oxidação de hipoxantina e xantina pela xantina oxidase e xantina desidrogenase. Em pH fisiológico (7,35-7,45), o ácido úrico é dissociado a urato e é esta molécula que apresenta atividade sobre os radicais ROO[•], NO₂[•] (gerando NO₂⁻), e OH[•], impedindo que estas ERO causem danos em lipídeos e DNA da célula (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VASCONCELOS 2007).

O ácido ascórbico ou vitamina C é encontrado no organismo na forma de ascorbato, forma que atua como antioxidante, ao doar um H[•] ou [H⁺ + e⁻] para um radical (VASCONCELOS et al., 2007). É hidrossolúvel e está localizado nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos. O ascorbato desempenha papéis fundamentais no organismo, atuando sobre o O₂^{-•}, o H₂O₂ e o OH[•] entre outros (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A vitamina E é constituída principalmente por tocoferóis e tocotrienóis, sendo o α -tocoferol o mais ativo (THERIAULT et al., 1999). O tocoferol é um antioxidante lipossolúvel que atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas e lipoproteínas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os carotenóides são moléculas coloridas (vermelho e laranja), lipossolúveis, sintetizados por plantas e microrganismos e presentes em muitos alimentos, particularmente frutas, vegetais e peixes. Dentre os carotenóides, o β -caroteno é a mais importante fonte de vitamina A. Apenas 10% dos carotenóides têm atividade pró-vitamina A, que é a capacidade de conversão dos carotenóides em retinol. As propriedades antioxidantes dos carotenóides estão associadas com sua capacidade de capturar radicais e outras espécies, como oxigênio singlete, em baixas concentrações e em baixa pressão parcial de oxigênio, tais como aquelas da maioria dos tecidos sob condições fisiológicas (VASCONCELOS et al., 2007).

Os polifenóis são um grupo diversificado de compostos encontrados em plantas. São metabólitos secundários que desempenham papéis de defesa do hospedeiro contra agentes patógenos e radiação ultravioleta e estão envolvidos na transdução de sinal celular. Os polifenóis estão presentes em alimentos e bebidas de origem vegetal como: frutas, legumes,

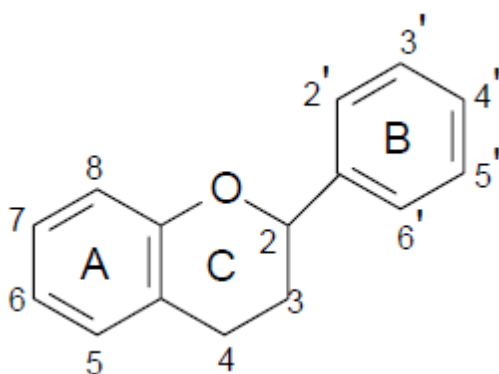
cereais, nozes, azeitonas, chocolate, chá, café e vinho e são os antioxidante mais abundantes da dieta humana (FANTINI et al., 2015).

De acordo com Quideau et al. (2011), polifenóis são substâncias que possuem um grande número de unidades de anéis fenol (com pelo menos duas ou três hidroxilas ligadas ao anel benzeno ou outro anel) e que mesmo assim possuem solubilidade em água.

Desta forma, os polifenóis são classificados de acordo com o número de anéis fenóis que contêm, por elementos estruturais que ligam estes anéis entre si e pelos substituintes nos respectivos anéis. Há diversas classes de polifenóis, como os ácidos fenólicos, proantocianidinas, estilbenos, e flavonóides (FANTINI et al., 2015).

Os flavonóides possuem uma estrutura química básica, composta por três anéis (A, B e C) e apresentam-se, geralmente, na forma de glicosídeos (Figura 4). São obtidos da dieta e absorvidos no intestino, via micelas, por transporte passivo ou ainda através de transportadores (MEOTI, 2006; MOTA et al., 2009).

Figura 4 - Estrutura básica dos flavonóides



Fonte: Adaptado de MOTA et al, 2009.

Geralmente os flavonóides sofrem hidroxilação nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5' e algumas destas hidroxilas podem ser metiladas, acetiladas ou sulfatadas (VELLOSA, 2008). Estas diferenças estruturais permitem a classificação dos flavonóides em algumas classes principais:

- i) **Flavonóis:** estão presentes em plantas na forma glicosilada, sendo que o carboidrato geralmente ligado é a glicose ou ramnose. Estão presentes em frutas, chás e vinho tinto. São representantes desta classe: quercetina, kaempferol, e miricetina (FANTINI et al., 2015);

- ii) **Flavonas:** podem apresentar diferentes substituições, incluindo hidroxilação, metilação, alquilação, e glicosilação. Uma das flavonas mais abundantes nos alimentos é a apigenina presente na salsa, cebola, alho, pimenta, chá de camomila (FANTINI et al., 2015);
- iii) **Flavan-3-óis:** existem em formas monoméricas, oligoméricas e poliméricas e não são glicosilados. Os monómeros mais simples são (+) catequina e o seu isômero (-) epicatequina, cuja hidroxilação gera (+) galocatequina e (-) epigallocatequina. As proantocianidinas são dímeros e polímeros de catequinas. As flavan-3-óis são encontradas no chocolate, vinho tinto, cereais (FANTINI et al., 2015);
- iv) **Isoflavonas:** são fitoestrógenos encontrados principalmente na soja e produtos derivados da soja e em plantas leguminosas. São exemplos: daidzeína, genisteína (FANTINI et al., 2015).

A atividade antioxidante dos flavonóides depende de fatores como: reatividade com o agente doador de hidrogênio e elétrons (quanto menor o potencial de oxidação do flavonóide, maior é sua atividade como sequestrador de radicais livres e quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de hidrogênio e de elétrons); estabilidade do radical flavanoil formado (depende da habilidade do flavonóide em deslocar o electrón desemparelhado); reatividade frente a outros antioxidantes (alta capacidade antioxidante quando comparado com outras substâncias, devido à presença de múltiplas hidroxilas); capacidade de quelar metais de transição, solubilidade e interação com as membranas (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Diante da promissora atividade benéfica destes compostos no organismo, estudos investigam a ação dos flavonóides sobre patologias que apresentam indícios do envolvimento do estresse oxidativo, por exemplo: o uso de flavonóides pode contribuir no tratamento do câncer (SERRA et al., 2014) e diabetes (ARUOMA et al., 2012), diminuir danos gástricos (CHENG et al., 2013), auxiliar no combate de doenças alérgicas (TANAKA, 2014) e inflamatórias (HAVSTEEN, 2002) e auxiliar na prevenção de doenças neurodegenerativas como o Parkinson (KUKULL, 2012). A busca por novas fontes de flavonóides está crescendo, visto a diversidade de plantas disponíveis e a potencial contribuição destas substâncias para a prevenção ou melhoria do tratamento de diversas doenças. No Brasil pesquisas apontam novas fontes antioxidantes compostas por flavonóides, como por exemplo, o guaraná (BASILE et al., 2005; BITTENCOURT et al., 2013).

3.5 GUARANÁ (*Paullinia cupana*)

O guaraná pertence à família Sapindaceae, subfamília Sapindoideae. No Brasil há diversas espécies de *Paullinia*, porém, a *Paullinia cupana* var. *Sobillia* é a única usada comercialmente e tem sido a mais estudada (SCHIMPL et al., 2013). Esta variedade predomina no estado do Amazonas, na região de Maués, que parece ser seu habitat natural, porém com a expansão do uso comercial do guaraná, seja pela indústria de bebidas, medicamentos ou cosméticos, o cultivo desta planta se espalhou para outras regiões do país como Bahia, Mato Grosso e Pará (BRASIL, 2011).

Figura 5 - *Paullinia cupana*



Fonte: Instituto Amazônia

Para a obtenção do guaraná são utilizadas as sementes da planta, devido ao seu alto teor de cafeína (1,3,7-tri-metilxantina). As indústrias de bebidas absorvem a maior parte da produção destas sementes. É através do processamento destas sementes que é obtido o pó de guaraná que é vendido comercialmente (SCHIMPL et al., 2013).

A composição química do guaraná ainda não foi totalmente elucidada, mas diversas pesquisas apontam a presença de metilxantinas, taninos condensados ou proantocianidinas (flavan-3-ol), catequinas, epicatequinas, saponinas (MATTEI et al., 1998; BASILE et al., 2005). É importante salientar que após o processamento das sementes diversas formas de tratamento podem ser aplicadas, dependendo da finalidade de uso. Desta forma pode-se utilizar enzimas durante um pré-tratamento das sementes para posterior obtenção de um extrato, ou utilizar extratos hidroalcoólicos e aquosos. Estes processos interferem no tipo e na quantidade de compostos bioativos identificados (SCHIMPL et al., 2013).

A presença destas moléculas bioativas conferem ao guaraná diferentes propriedades funcionais, que além de apresentar propriedades afrodisíacas e energéticas (SMITH; ATROCH, 2007), auxiliar na perda de peso e na manutenção da memória (ESPINOLA et al., 1997), apresenta atividade antioxidante (BASILE et al., 2005), ação antimicrobiana (YAMAGUTI- SASKI et al., 2007) e antiplaquetária (BYDŁOWSKI; D'AMICO; CHAMONE, 1991), efeito antialérgico (JIPPO et al., 2009), efeito genoprotetor contra dano no DNA (FUKUMASU et al., 2006), efeito gastroprotetor (CAMPOS et al., 2005), e prevenção de alterações provocadas no metabolismo lipídico (PORTELLA et al., 2013) e doenças metabólicas (KREWER et al., 2011).

Além disso, a utilização do guaraná em pesquisas têm se mostrado bastante segura, pois não apresenta toxicidade quando administrado em doses altas e de forma aguda e nem em doses mais baixas e de forma crônica (MATTEI et al., 1998). De acordo com pesquisa conduzida por Mattei et al. (1998), o extrato hidroalcoólico não provocou mudanças no peso, na mortalidade, na atividade motora e nem provocou alterações histopatológicas em diferentes tecidos: fígado, coração, pulmão, pâncreas, rins, estômago em nenhum dos tempos (agudo ou crônico) e doses utilizadas no tratamento.

Diante destes apontamentos, o guaraná pode ser um promissor coadjuvante para a melhoria do tratamento anti-inflamatório com o uso do cetoprofeno visando à diminuição dos efeitos oxidantes que envolvem a inflamação e os possíveis efeitos colaterais deste fármaco.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes reagentes de alta qualidade com elevado grau de pureza: 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), persulfato de potássio, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), etanol, hipoclorito de sódio, tetrametilbenzidina (TMB), ácido acético, dimetilformamida, 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH), fosfato de sódio mono e bibásico, metassulfato de fenazina, nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida, nitrobluetetrazolium (NBT), glutathione reduzida (GSH), ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico (DTNB), guaiacol, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), peroxidase de raiz forte (HRP tipo VI), ácido tricloroacético (TCA), etilenodiaminotetraacético (EDTA), TRIS/HCl, iodeto de potássio, resveratrol, metanol.

Também foram utilizados materiais de coleta de sangue como seringa, agulhas, tubos com e sem anticoagulante.

Dentre os equipamentos, foram utilizadas balanças analíticas, centrífugas, estufas, banho-maria, agitadores, microscópio óptico, espectrofotômetro de cubetas PerkinElmer Lambda[®], espectrofotômetro de placas BioTeck µQuant[®] (Synergy H1 Hybrid Reader), Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu LC proeminência - 20^a), condensador (Terroni Modelo LD1500), Hemocounter, Respons 920 (Biosys/Diasys), Centrífuga (Hermle[®] Z 326K), liofilizador (Terroni).

Para a realização dos ensaios *in vitro*, o cetoprofeno (FAGRON[®]) foi dissolvido em metanol, visto sua alta solubilidade neste solvente (SHENG et al., 2006). Já para os ensaios *in vivo* o cetoprofeno foi utilizado na forma de suspensão e o veículo utilizado foi a solução fisiológica. Em todos os ensaios foram realizados controles com os solventes para certificar que este não influenciava nos resultados obtidos.

O guaraná em pó utilizado para a elaboração do extrato aquoso foi obtido na região de Maués- AM na safra 2014/2015. Para a obtenção do extrato aquoso de guaraná procedeu-se a extração aquosa do pó, seguida de liofilização. O liofilizado foi dissolvido em água para a realização de todos os testes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

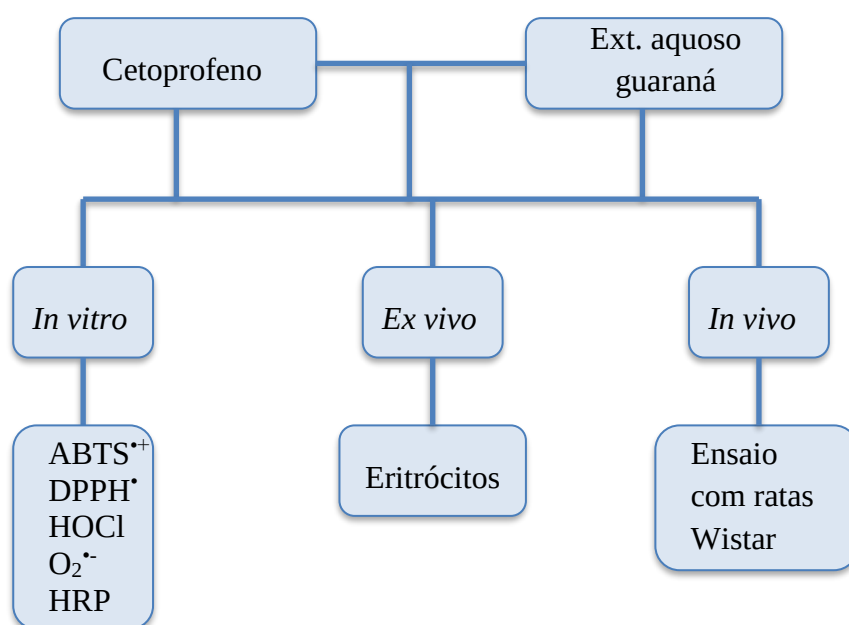
O resveratrol foi utilizado como substância antioxidante padrão para a realização dos testes *in vitro*.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental geral deste trabalho é demonstrado na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma do delineamento experimental



Fonte: A autora

4.2.2 Preparação do extrato aquoso de guaraná

O guaraná em pó foi fornecido pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), localizada na Amazônia Ocidental em Maués, no estado de Amazonas (Brasil) e foi armazenado em condições secas, a - 20 °C até o momento da preparação do extrato. O extrato aquoso de guaraná foi obtido através da infusão de 100g de pó de guaraná em 1L de água destilada e deionizada, a uma temperatura de 90°C, durante 10 minutos. Nos tempos 0, 5 e 10 minutos procedeu-se uma agitação suave. Após extração, a solução resultante foi filtrada através de papel Whatman N° 8, colocado em vidro âmbar (capacidade de 1,5 L) e, armazenados a -8 ° C, e a seguir liofilizado. A liofilização foi realizada sob condições de congelamento (-20 ° C), a pressão de vácuo de 0.120 mB e uma temperatura de condensador de -50 ° C (NISCHIYAMA et al., 2010). O guaraná foi utilizado na forma de extrato aquoso

como uma possível alternativa antioxidante de fácil acesso (como o chá) e uso etnofarmacológico.

4.2.3 Determinação de componentes bioativos do extrato aquoso de guaraná

Para a determinação dos componentes bioativos foram utilizadas as amostras do extrato aquoso de guaraná obtidas após a filtração e para cada determinação foram construídas curvas com a substância padrão referentes a cada análise realizada.

A quantificação de componentes fenólicos totais foi realizada espectrofotometricamente em 730nm, de acordo com Folin; Ciocalteau (1927). Os resultados são expressos em mg equivalentes de ácido gálico/100g de extrato aquoso de guaraná.

A estimativa de taninos condensados foi realizada conforme Morrison et al. (1995), em 500nm. Os resultados são expressos em mg equivalentes de ácido gálico/100g de extrato aquoso de guaraná.

A determinação de taninos hidrolisáveis seguiu a metodologia proposta por Brune; Hallberg e Skanberg (1991). Os resultados são expressos em mg equivalentes de catequina/100g de extrato aquoso de guaraná.

Para a quantificação dos alcalóides totais, procedeu-se a acidificação da amostra, com posterior adição do Reagente de Dragendorff e centrifugação. Após a absorvância foi lida em 435nm. Os resultados são expressos em mg equivalentes de berberina/100g de extrato aquoso de guaraná (SREEVIDYA; MEHROTRA, 2003).

A quantificação de cafeína, teobromina e catequinas foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu LC proeminência - 20A, com bomba quaternária LC-20AT, injetor automático- SIL 20 A, degaseificador em linha DGU-20A5 e detector SPD-20AV DAD), com detecção em 272nm. Para a separação dos componentes foi utilizada a coluna ODS-3 (Phenomenex Prodigy ODS-3 100 ;150mm x 4,6mm, 5µm). Para a eluição foram utilizadas como fase móvel: A, ácido fosfórico (H₃PO₄) 0,1% em água; B, 100% acetonitrila (ACN), com taxa de fluxo 1mL/minuto. A amostra de extrato aquoso de guaraná foi filtrado em um filtro de 0,45 microns para posterior injeção no equipamento. (ANDREWS et al., 2007; ALVES; BRAGAGNOLO, 2002).

4.2.4 Avaliação *in vitro* em sistemas oxidativos

4.2.4.1 Ação *scavenger* das amostras sobre o radical ABTS^{•+}

A ação das amostras frente ao radical ABTS^{•+} (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6'-sulfonic acid) - Sigma-Aldrich®) (55µM) foi verificada conforme metodologia descrita por Pellegrini et al. (1999), com modificações. Desta forma, os ensaios foram realizados em tampão fosfato de sódio 10mM (pH 7,4) e a ação das amostras em teste foi quantificada por meio do decréscimo da absorbância em 734 nm (Velloso et al. 2007b).

4.2.4.2 Ação *scavenger* das amostras sobre radical DPPH[•]

A ação das amostras sobre radicais livres foi avaliada por meio do decréscimo da absorbância da solução de DPPH[•] (2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl - Sigma-Aldrich) (60 µM) em 531nm, segundo Soares et al. (1997).

4.2.4.3 Atividade *scavenger* das amostras sobre o HOCl

A concentração da solução de HOCl preparado em água foi determinada espectrofotometricamente através de seu coeficiente de extinção molar em 295nm ($350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (ZGLICZYNSKI et al., 1971).

As reações foram realizadas de acordo com Costa et al. (2004), com algumas modificações, em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4. Ao tampão foram adicionadas as amostras e o HOCl (30µM) seguindo-se a incubação por 10 minutos na ausência de luz. A seguir, adicionou-se o TMB (2,8 mM) e procedeu-se a incubação por mais 5 minutos. A leitura das absorbâncias foi realizada em 652nm.

4.2.4.4 Atividade *scavenger* sobre o ânion superóxido

Este ensaio foi realizado de acordo com Robak & Gryglewski (1988). O ânion superóxido reage com o NBT (68,4 µM) para formar o cromóforo (formazana) cuja intensidade de cor, medida em 560 nm, é diretamente proporcional à concentração do radical.

4.2.4.5 Ação na oxidação do guaiacol pela peroxidase (HRP)

As concentrações da HRP e do H₂O₂ em solução foram determinadas por meio de seus coeficientes de extinção molar: respectivamente $1,02 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (em 403nm; OHLSON; PAUL, 1976) e $80 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (em 230nm; BRESTEL, 1985).

A cinética de oxidação do guaiacol (4 mM) pela HRP (7 nM), em presença de H₂O₂ (0,1 mM), foi realizada em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4, 37°C, conforme Khalil (2002) com alterações. A reação foi acompanhada em 470nm durante 1 minuto. Determinou-

se a velocidade de reação quando o tempo tende a zero (velocidade inicial - v_0) na presença e na ausência e das amostras.

4.2.5 Avaliação de toxicidade

4.2.5.1 Ação sobre eritrócitos

O ensaio foi realizado segundo Velloso (2008) com algumas modificações. O sangue total foi coletado de voluntários hígidos e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. Após a retirada do plasma as hemácias foram lavadas com uma solução de tampão fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM. Após a obtenção de uma suspensão de eritrócitos 5%, foi determinada a hemólise (liberação da hemoglobina das células para o meio reacional) na presença das amostras (cetoprofeno e extrato aquoso de guaraná, isoladamente ou em associação) e ausência de radical AAPH. Também foram avaliadas as ações das amostras na presença do radical AAPH (25 mM), em suspensão de eritrócitos 5%.

Estas amostras foram incubadas por 5h/37°C e o sobrenadante teve a absorbância lida em 414 nm após 1h, 3h e 5h de incubação. Este protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (COEP), sob o número 698.795.

4.2.6 Avaliação dos parâmetros hepáticos, renais e hematológicos

Foram avaliados os efeitos renais e hepáticos do cetoprofeno e do extrato aquoso de guaraná, utilizando-se ratas Wistar (*Rattus Norvegicus* var. *albinus*) com aproximadamente 90 dias de idade, pesando 150-250g. Os animais foram mantidos durante todo o período do experimento em gaiolas específicas para roedores, em ambiente com temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo de claro/escuro (12/12h) controlado automaticamente, bem como tiveram livre acesso à água e comida (ração Nubilab, específica para roedores) e com exaustão adequada.

A manipulação dos animais seguiu as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e este protocolo foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa no uso de animais (CEUA) sob o número 039/2014.

Para a realização deste protocolo os animais foram divididos em grupos:

G1) 11 animais tratados v.o durante 7 dias somente com o veículo (salina 0,9%);

G2) 11 animais tratados v.o com cetoprofeno 20mg/kg/dia durante 7 dias;

G3) 10 animais tratados v.o extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia durante 7 dias;

G4) 10 animais tratados v.o extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia durante 7 dias;

G5) 11 animais tratados v.o com cetoprofeno 20mg/kg/dia e v.o. com extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia durante 7 dias;

G6) 11 animais tratados via v.o cetoprofeno 20mg/kg/dia e v.o com extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia durante 7 dias.

No oitavo dia os animais foram anestesiados com a mistura de anestésicos (cloridrato de cetamina 75mg/kg e xilasina 15mg/kg via intraperitoneal) para coleta de sangue através da veia cava. Após os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia e então foram retirados os rins e o fígado para as determinações de biomarcadores do estresse oxidativo.

Os animais foram tratados com cetoprofeno (20mg/kg/dia) dissolvido em salina, conforme Zaho et al. (2007). O extrato aquoso de guaraná foi testado nas doses de 1mg/g/dia e 0,1mg/g/dia, doses propostas por Fukumasu et al. (2006) que também utilizou o extrato aquoso de guaraná. As administrações destas substâncias ocorreram por via oral (v.o) através de gavagem, mas obedeceram a um intervalo de 6h entre a administração do extrato aquoso de guaraná e do cetoprofeno.

4.2.7 Determinações bioquímicas e hematológicas dos animais

As funções renais e hepáticas foram avaliadas através da determinação laboratorial dos níveis séricos de ácido úrico, ureia e creatinina e de transaminases hepáticas (AST e ALT). Foram utilizados kits comerciais (Kovalent do Brasil Ltda., São Gonçalo – RJ) e as amostras processadas no equipamento Respons 920® (Miosys/Diasys).

As contagens hematológicas do sangue total (EDTA) - leucócitos totais, eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e plaquetas - foram realizadas no contador eletrônico Hemacouter 60® (Hemogram). Foram ainda realizadas as contagens diferenciais dos leucócitos por meio da microscopia óptica.

4.2.8 Avaliação do *status* antioxidante dos animais

4.2.8.1 Determinação da capacidade antioxidante total do soro

A capacidade antioxidante total sérica foi determinada através da ação *scavenger* do soro dos animais (diluído 1:30), frente ao radical ABTS^{•+} conforme metodologia descrita por Pellegrini et al. (1999), com modificações.

4.2.8.2 Determinação de grupamentos sulfidrílicos totais (SH-T)

A determinação dos grupamentos sulfidrílicos totais foi feita conforme metodologia

proposta por Ellman (1959). A análise baseia-se na capacidade dos grupos sulfidrilas presentes na amostra (soro dos animais) em meio tamponado (tampão TRIS/HCl 0,1M), reduzir o DTNB (0,124mM) ao ácido 2-nitro-5-mercaptopbenzóico que apresenta coloração amarela. Após a reação ser completada a absorbância foi medida em 412nm.

4.2.8.3 Determinação da atividade da enzima catalase

A atividade da catalase nas amostras (eritrócitos dos animais) foi determinada através da diminuição da absorbância (degradação do substrato) durante 2 minutos, em 240 nm, de acordo com Aebi (1984). A reação foi realizada em tampão fosfato (50mM, pH:7,4) e utilizou-se H₂O₂ (10,5mM) como substrato da enzima. A atividade desta enzima é definida como uma unidade de enzima capaz de degradar 1μMol de H₂O₂ em um minuto. Os resultados são expressos em μMol H₂O₂/ mL de eritrócitos/min.

4.2.9 Biomarcadores teciduais do estresse oxidativo

4.2.9.1 Determinação de grupamentos sulfidrílicos não-proteicos (SH-NP)

Inicialmente foram preparados os homogenatos do fígado e dos rins. Estes tecidos foram homogeneizados em EDTA (0,02M) e após precipitação das proteínas com TCA (50%) obteve-se o sobrenadante que foi utilizado para a determinação dos grupamentos tióis não-proteicos. A reação foi realizada em tampão TRIS/HCl (0,4M; pH: 8,9) e a absorbância lida em 412nm, conforme Sedlak; Lindsay (1968). A curva padrão foi construída utilizando-se glutathiona reduzida. Os resultados foram expressos em μMol SH-NP/g tecido.

4.2.9.2 Determinação da atividade da enzima catalase

O homogenato do fígado e rins foram preparados de acordo com Tabei et al. (2015). Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio 50mM pH: 7,4/ KCl 150mM / EDTA 200mM e após centrifugação o sobrenadante foi utilizado para a realização da reação conforme metodologia proposta por Aebi (1984). Os resultados foram expressos em μMol H₂O₂/ g de tecido/min.

4.2.10 Análise estatística

As análises *in vitro* e *ex vivo* foram realizadas em triplicatas e apresentadas como Média ± Desvio padrão (SD). Para estes resultados a análise estatística foi realizada pela

Análise de Variância de uma via (ANOVA de uma via) seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni.

Os resultados obtidos através das análises de amostras biológicas dos animais (*in vivo*) foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M). Os dados apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas, estas condições foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. O nível de significância aceito para os testes foi de $p < 0,05$. Para todas as análises estatísticas foi utilizado o software estatístico GraphPadPrism (versão 5.01, San Diego, Califórnia, EUA). Para os resultados *in vivo* a análise estatística foi realizada pela Análise de Variância de uma via (ANOVA de uma via) seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

4.2.11 Representação gráfica e apresentação dos resultados

Os resultados obtidos a partir das análises em modelos oxidativos *in vitro* (ABTS⁺, DPPH[•], HOCl e O₂^{•-}) foram representados em gráficos “Concentração (mg/mL) x Absorbância (nm). A atividade antioxidante de cada amostra foi representada em gráficos de colunas “ % de inibição x amostra testada” para cada ensaio realizado. A atividade *scavenger* indica a capacidade de captura de radical livre e/ou agentes oxidantes que determinada amostra apresenta no modelo experimental adotado. A atividade *scavenger* foi expressa em inibição máxima e/ou IC₅₀.

A inibição máxima representa a maior porcentagem (%) de inibição do sistema testado (por exemplo, hemólise) ou maior porcentagem de captura do oxidante (por exemplo, HOCl) ou radical (por exemplo, O₂^{•-}) na menor concentração possível da amostra em teste.

A concentração inibitória de cinquenta por cento (IC₅₀) das substâncias aqui testadas foi obtida a partir de modelos matemáticos baseados nos dados experimentais de cada ensaio e corresponde a concentração teórica em que a substância em questão provoca 50% da captura do radical ou oxidante estudado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DE COMPONENTES BIOATIVOS DO EXTRATO AQUOSO DE GUARANÁ

No extrato aquoso de guaraná foram quantificadas diferentes substâncias e grupos de substâncias que são responsáveis por uma ampla gama de efeitos biológicos provocadas pelo uso deste extrato. Dentre elas: compostos polifenólicos totais, alcalóides, taninos hidrolisados e condensados, cafeína, teobromina e catequinas totais, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1- Concentração dos componentes bioativos no extrato aquoso de guaraná

Componentes	Extrato aquoso de guaraná	Método
Polifenóis totais	452.7 ± 19.1 (mg Eq ácido gálico/100g)	Espectrofotometria
Alcalóides	77.5 ± 23.9 (mg Eq berberina/100g)	Espectrofotometria
Taninos hidrolisados	169.2 ± 5.3(mg Eq catequina/100g)	Espectrofotometria
Taninos condensados	1198.0 ± 121.4 (mg Eq ácido gálico/100 g)	Espectrofotometria
Cafeína	223.5 ± 13.8 (µg/0.002 g)	CLAE
Teobromina	3.67 ± 1.1(µg/0.002 g)	CLAE
Catequinas totais	39.9 ± 2.3(µg/0.002 g)	CLAE

Embora a composição de cada produto derivado do guaraná (pó, extrato aquoso, extrato hidroalcoólico, extrato alcoólico) seja afetada por fatores como condições climáticas, plantio e manejo das plantas, variações genéticas, bem como variações no processo de obtenção da forma de consumo do guaraná, a composição do extrato de guaraná utilizado neste estudo foi semelhante à pesquisas que utilizaram o guaraná como produto natural (SCHIMPL et al, 2013; BITTENCOURT et al., 2013).

Altos teores de cafeína foram detectados no extrato aquoso de guaraná. A cafeína é um alcalóide purínico e predominante em diferentes formas de utilização do guaraná, seja em pó ou na forma de extrato. Altas concentrações deste alcalóide foram encontradas no extrato hidroalcoólico do pó de guaraná (BITTENCOURT et al., 2013), assim como nas sementes de guaraná (WECKERLE; STUTZ; BAUMANN, 2003). Estudos demonstram que esta substância é fundamental para a atividade estimulante atribuída ao guaraná (SMITH;

ATROCH, 2007; SCHIMPL et al, 2013). A cafeína e a teobromina são classificadas como metilxantinas e, de uma maneira geral, sua ação estimulante está baseada no fato de atuarem sobre os receptores da adenosina como antagonistas competitivos, por produzirem a inibição da fosfodiesterase, aumentando níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Possuem também outras ações sobre diferentes sistemas onde atuam como broncodilatadora, provocam aumento da contratilidade cardíaca, vasodilatação em nível muscular (aumento do rendimento físico), estimulam a secreção gástrica e possuem efeito diurético (LOZANO et al., 2007; LOVALLO et al., 2004).

Também foram encontradas quantidades significativas de outras substâncias bioativas como catequinas e taninos. Estes resultados estão de acordo com Fukumasu et al. (2006), Werlecke; Stutz; Baumann (2003) e Bittencourt et al. (2013). As catequinas e os taninos são polifenóis conhecidos pela sua atividade antioxidante, pois são compostos que possuem ação sobre a captura de radicais e sobre a inibição da peroxidação lipídica. Além de inibir o crescimento de micro-organismos indesejáveis em alimentos (YILMAZ, 2006).

Basile et al. (2005) utilizaram extrato etanólico de guaraná, entretanto a concentração de polifenóis totais foi semelhante à concentração deste grupo de substâncias quantificadas no extrato aquoso em questão, e a pequena diferença notada pode estar relacionada com o tipo de solvente utilizado durante a preparação do extrato.

Embora muitas ações benéficas alcançadas pelo uso do guaraná já tenham sido elucidadas, ainda há uma lacuna na avaliação do efeito do extrato aquoso de guaraná quando associado a um xenobiótico. Desta forma, a seguir serão mostrados os resultados da associação deste extrato ao cetoprofeno, em modelos *in vitro* e *in vivo*.

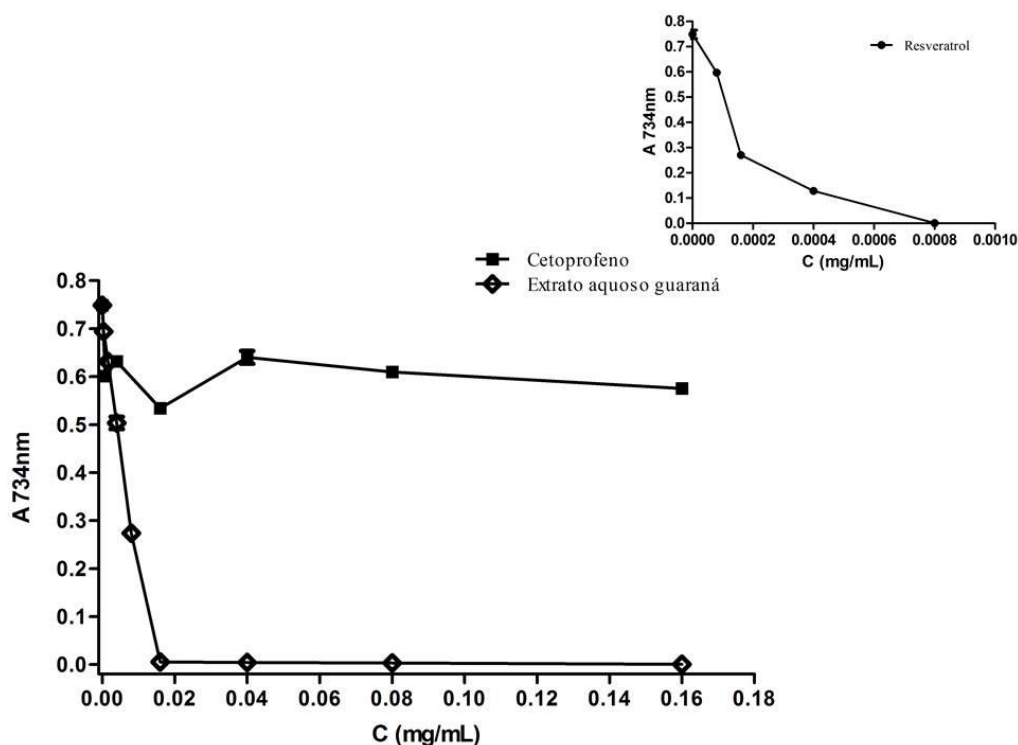
5.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* EM SISTEMAS OXIDATIVOS

5.2.1 Atividade *scavenger* sobre o radical ABTS^{•+}

A ação *scavenger* do extrato aquoso de guaraná sobre o radical ABTS^{•+} foi bastante pronunciada ($IC_{50} = 0,007 \pm 0,0003 \text{ mg/mL}$), o que não foi observado para o cetoprofeno. O extrato aquoso de guaraná alcançou a atividade *scavenger* máxima de $99,25 \pm 0,10\%$ ($0,016 \text{ mg/mL}$), já o cetoprofeno atingiu sua capacidade máxima em $28,70 \pm 0,51\%$ ($0,016 \text{ mg/mL}$). Como padrão antioxidante utilizou-se o resveratrol, um polifenol sintetizado por diversas plantas em resposta à injúria causada por patógenos. É um antioxidante eficaz, pois atua inibindo a peroxidação lipídica, possui ação quelante sobre o ferro e de captura de diferentes radicais (FRÉMONT, 2000). Neste ensaio o resveratrol apresentou $IC_{50} =$

$0,0001 \pm 0,00001 \text{ mg/mL}$ demonstrando alta eficiência sobre o modelo oxidativo em teste (Figura 7).

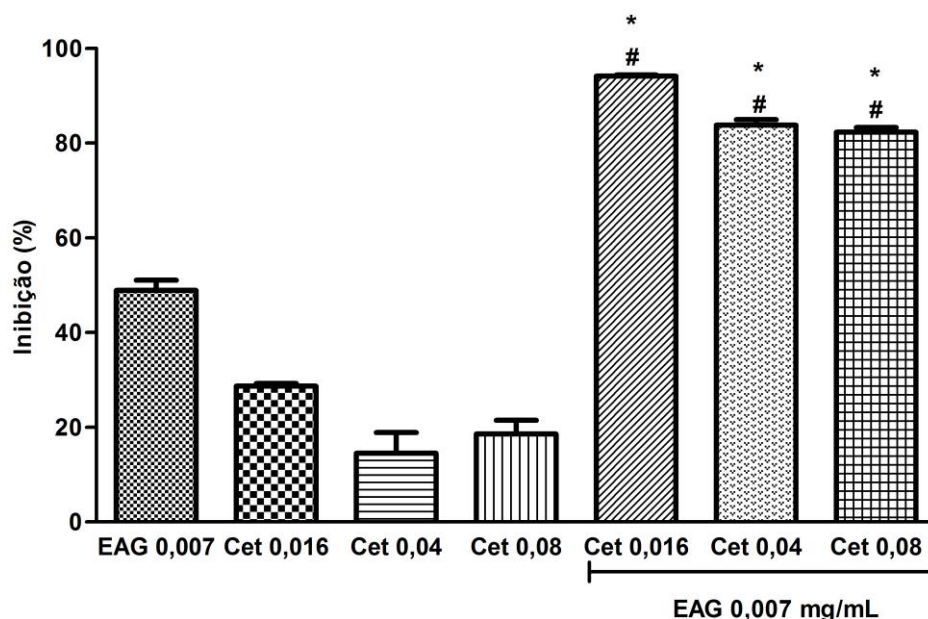
Figura 7 - Ação *scavenger* do cetoprofeno, extrato aquoso de guaraná e resveratrol sobre o ABTS^{*+} ($55 \mu\text{M}$) em tampão fosfato de sódio 10 mM , $\text{pH } 7,4$; $\lambda \text{ } 734 \text{ nm}$.



Há poucos estudos envolvendo a ação do cetoprofeno sobre o radical ABTS^{*+} , que apesar de ser ausente em organismos vivos é um modelo bastante utilizado para ensaios oxidativos. Os resultados desta pesquisa estão de acordo com Manente et al. (2011), que também demonstrou pouca ação deste xenobótico sobre o radical ABTS^{*+} . Entretanto a alta capacidade de captura do radical ABTS^{*+} , observada para o extrato aquoso de guaraná também foi relatada por Jimoh; Sofidiya e Afolayan (2007), que embora tenham estudado um extrato metanólico observaram aproximadamente 100% de captura neste mesmo ensaio modelo.

Entretanto, além de avaliar a ação do extrato aquoso de guaraná e do cetoprofeno isoladamente, também se buscou entender qual a ação provocada pela associação destas substâncias. Para observar o efeito do extrato aquoso de guaraná sobre a ação do cetoprofeno na captura do radical ABTS^{*+} utilizou-se o cetoprofeno em diferentes concentrações e para o extrato aquoso de guaraná foi utilizada a concentração correspondente ao seu $\text{IC}_{50} = 0,007 \pm 0,0003 \text{ mg/mL}$ (Figura 8).

Figura 8 - Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno na atividade *scavenger* sobre o ABTS^{•+}



Nota: EAG (extrato aquoso de guaraná 0,007mg/mL); Cet 0,016 (cetoprofeno 0,016mg/mL); Cet 0,04 (cetoprofeno 0,04mg/mL); Cet 0,08 (cetoprofeno 0,08mg/mL). # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação à respectiva concentração de cetoprofeno testada; *indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao extrato aquoso de guaraná (0,007mg/mL).

Pode-se observar que houve alterações significativas nas absorvâncias resultantes da associação do cetoprofeno com o extrato aquoso de guaraná quando comparadas com as substâncias isoladas. Em todas as concentrações testadas o cetoprofeno interferiu no efeito *scavenger* do extrato aquoso de guaraná sobre o radical ABTS^{•+}, pois se observou o aumento da atividade antioxidante da associação quando comparada apenas com o resultado do extrato aquoso de guaraná isoladamente. Da mesma forma, o extrato também favoreceu a ação *scavenger* do cetoprofeno.

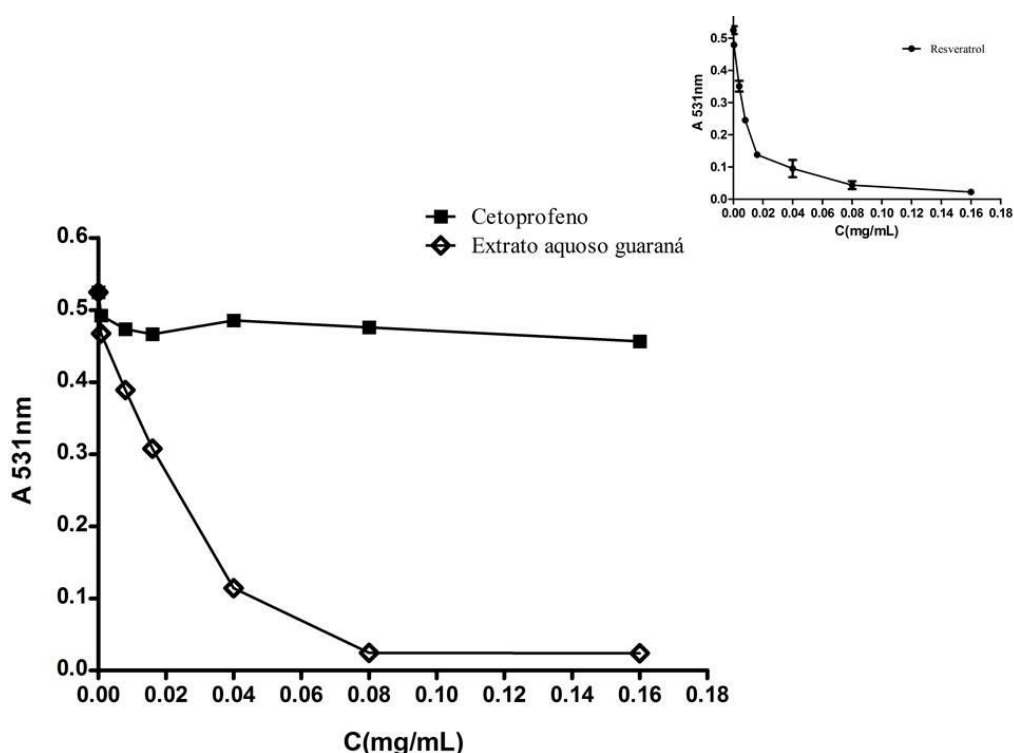
Na associação destas substâncias a inibição máxima foi de $94,10 \pm 0,25\%$ (0,016mg/mL do cetoprofeno). Este resultado demonstra que a inibição máxima da associação foi melhor do que aquela alcançada pelo cetoprofeno isoladamente sugerindo efeitos positivos provocados pela associação destas substâncias quando busca evitar danos oxidativos.

Estes resultados indicam possível efeito sinérgico das substâncias em teste quando associadas na ação de captura sobre o ABTS^{•+} e suportam uma provável aplicação da associação entre o antioxidante e o cetoprofeno com o objetivo de minimizar o potencial estresse oxidativo decorrente de seu uso.

5.2.2 Atividade *scavenger* sobre o radical DPPH[•]

O cetoprofeno apresentou menor ação *scavenger* sobre o radical DPPH[•] do que sobre o radical ABTS^{•+}. Neste ensaio o cetoprofeno promoveu $11,08 \pm 1,3\%$ de captura do radical, na concentração de 0,016mg/mL. O extrato aquoso de guaraná apresentou elevada capacidade de captura deste radical ($IC_{50} = 0,017 \pm 0,001 \text{ mg/mL}$) e atingiu $95,25 \pm 1,01\%$ de atividade *scavenger* máxima na concentração de 0,08mg/mL. O resveratrol também demonstrou alta capacidade antioxidante ($IC_{50} = 0,00765 \pm 0,00067 \text{ mg/mL}$), conforme observa-se na Figura 9.

Figura 9 - Ação *scavenger* do cetoprofeno, extrato aquoso de guaraná e resveratrol sobre o radical DPPH[•] (60 μ M) em metanol absoluto; λ 531nm



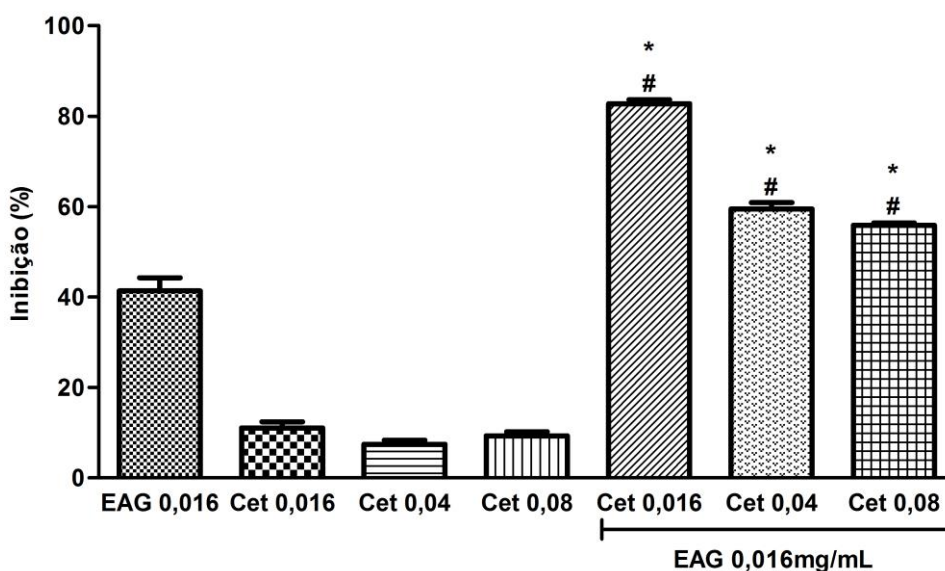
A baixa ação *scavenger* do cetoprofeno sobre o radical DPPH[•] também foi observada na pesquisa conduzida por Manente et al. (2011). Koncic et al. (2009) demonstraram que o diclofenaco apresenta significativa atividade antioxidante sobre o radical DPPH[•] quando comparada com a atividade do cetoprofeno sobre este radical. Por outro lado Koncic et al. (2009), demonstrou que a derivatização do cetoprofeno (moléculas obtidas a partir do cetoprofeno após hidrogenação catalítica) pode aumentar a sua ação sobre este radical.

Yamaguti-Sasaki et al. (2007), demonstraram que o extrato aquoso de guaraná possui atividade antioxidante, pois o extrato utilizado por eles apresentou significativa ação *scavenger* contra o radical DPPH[•] e também sobre outros modelos de estudo. Estes dados são

condizentes com os obtidos nesta pesquisa, em que extrato aquoso de guaraná utilizado mostrou-se efetivo na captura de radicais DPPH[•]. É importante salientar que o extrato utilizado por Yamaguti-Sasaki et al. (2007) e a metodologia do ensaio do DPPH[•] foram muito semelhantes às acima descritas.

Também se buscou avaliar o efeito do extrato aquoso de guaraná sobre a ação do cetoprofeno na captura do radical DPPH[•]. Foram utilizadas diferentes concentrações de cetoprofeno e para o extrato aquoso de guaraná foi utilizada a concentração de 0,016mg/mL (aproximadamente seu IC₅₀= 0,017±0,0001mg/mL) (Figura 10).

Figura 10 - Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno na atividade *scavenger* sobre o DPPH[•]



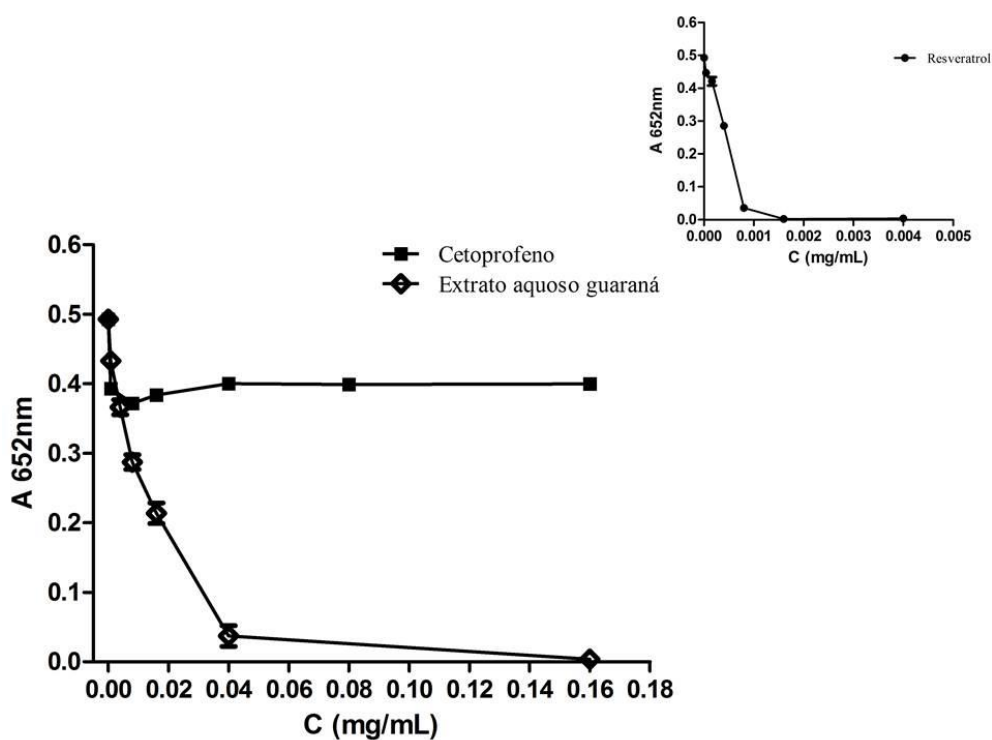
Nota: EAG (extrato aquoso de guaraná 0,016mg/mL); Cet 0,016 (cetoprofeno 0,016mg/mL); Cet 0,04 (cetoprofeno 0,04mg/mL); Cet 0,08 (cetoprofeno 0,08mg/mL). # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação à respectiva concentração de cetoprofeno testada; * indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao extrato aquoso de guaraná (0,016mg/mL).

A associação entre cetoprofeno e extrato aquoso de guaraná provocou mudanças na capacidade *scavenger* das amostras. Em todas as concentrações da associação que foram testadas, a atividade *scavenger* alcançada foi maior do que quando se utilizou a substância isolada nas correspondentes concentrações. Este resultado demonstra uma potencialização da ação de captura sobre o DPPH[•] das substâncias testadas quando atuam em conjunto. A inibição máxima alcançada pela associação do cetoprofeno e do extrato aquoso de guaraná foi de 82,78±0,89%, sendo esta na menor concentração de cetoprofeno.

5.2.3 Atividade *scavenger* sobre o HOCl

O HOCl não é um radical livre, porém está relacionado com a formação de espécies radicalares através de reações com compostos inorgânicos, lipídeos, proteínas, carboidratos, e outros biopolímeros, além de ser considerado um forte oxidante (PANASENKO; GORUDKO; SOKOLOV, 2013). Diante de sua importante contribuição para o ambiente oxidativo, observou-se que o cetoprofeno possui baixa ação *scavenger* sobre esta molécula, quando comparado com a ação *scavenger* do extrato de guaraná (Figura 11).

Figura 11 - Ação *scavenger* do cetoprofeno, extrato aquoso de guaraná e resveratrol sobre o HOCl (30 μ M); em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; TMB 2,8mM, λ = 652nm



Neste ensaio os resultados são expressos em % da inibição de oxidação da TMB, pois esta molécula também é oxidada pelo HOCl presente no meio reacional e o aumento da absorbância é diretamente proporcional ao aumento desta oxidação. A inibição máxima alcançada pelo cetoprofeno foi 23,84 $\pm$ 4,99% (0,0004 mg/mL), enquanto que o extrato aquoso de guaraná inibiu 99,52 $\pm$ 1,73% (0,08mg/mL) da oxidação da TMB e apresentou IC₅₀= 0,015 $\pm$ 0,003mg/mL. O resveratrol apresentou IC₅₀= 0,000458 $\pm$ 0,000005mg/mL.

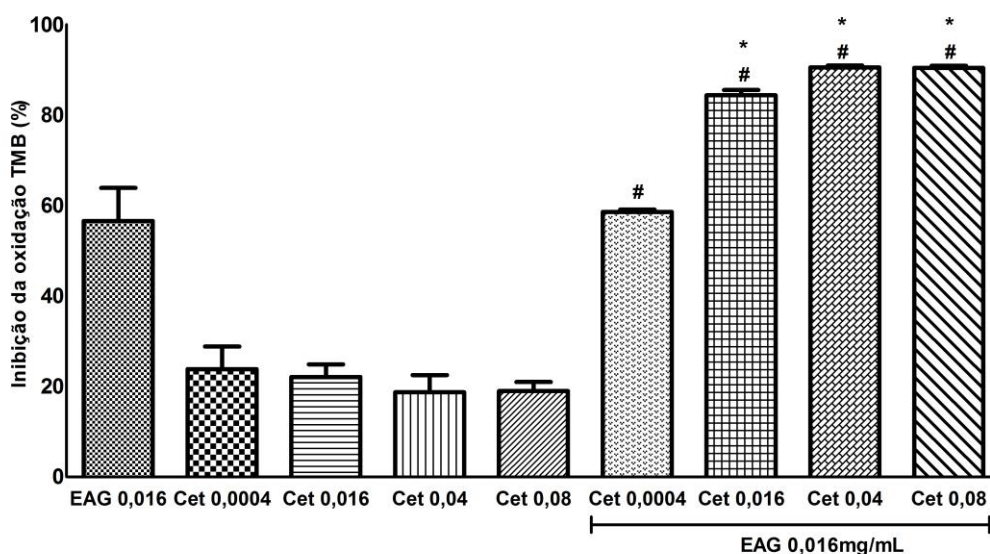
Costa et al. (2006), pesquisaram a ação antioxidante de fármacos anti-inflamatórios em diversos modelos de estudos *in vitro*, e também observaram pouca ou nenhuma atividade

do cetoprofeno na inibição da oxidação do TMB. Em contrapartida demonstraram que este AINE possui ação efetiva contra o H_2O_2 . Estes resultados embasam a hipótese da seletividade de ação antioxidante de substâncias frente a diferentes radicais livres ou espécies reativas.

Em uma pesquisa desenvolvida por Siwak et al. (2013) foi observado que diferentes flavonóides apresentam uma ação característica diante das mudanças provocadas pelo HOCl em sistemas *in vitro*, com ou sem células. Neste estudo a quercetina mostrou-se ser mais eficiente contra os danos oxidativos em grupamentos tióis provocados pelo HOCl *in vitro*, enquanto que as catequinas provocaram maior proteção contra a citotoxicidade e cloração de proteínas provocadas pelo HOCl em células vivas. Os autores acreditam que estas diferenças de ação estejam relacionadas com a estrutura de cada molécula antioxidante analisada, visto a diferença de grupamentos hidroxilas, tanto em número como em localização destes na sua estrutura. Estes grupamentos são fundamentais para a sua atividade antioxidante. No extrato aquoso de guaraná utilizado neste estudo identificou-se a presença de diferentes polifenóis, portanto a ótima ação de inibição encontrada neste ensaio pode estar relacionada à sua composição, visto que individualmente estas substâncias já apresentam boa ação antioxidante.

Quando se associou o cetoprofeno e o extrato aquoso de guaraná foram alcançadas inibições mais significativas do que àquelas alcançadas pelas substâncias isoladas. Neste ensaio utilizou o extrato aquoso de guaraná 0,016 mg/mL (aproximadamente seu $IC_{50} = 0,015 \pm 0,003 \text{ mg/mL}$), e diferentes concentrações do cetoprofeno, inclusive aquela em que foi observada maior inibição, conforme demonstra a Figura 12.

Figura 12 - Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno sobre a inibição (%) da oxidação da TMB (2,8mM) pelo HOCl (30 μ M)



Nota: EAG (extrato aquoso de guaraná 0,016mg/mL);); Cet 0,0004; Cet 0,016 (cetoprofeno 0,016mg/mL); Cet 0,04 (cetoprofeno 0,04mg/mL); Cet 0,08 (cetoprofeno 0,08mg/mL). # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação à respectiva concentração de cetoprofeno testada; * indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao extrato aquoso de guaraná (0,016mg/mL).

A menor concentração do cetoprofeno associada ao extrato aquoso de guaraná não apresentou diferença estatística em relação à inibição resultante somente do extrato o que sugere que o cetoprofeno não interfere na ação provocada pelo extrato, e este valor representa apenas o efeito do extrato aquoso de guaraná. Já quando são observados os demais resultados nota-se que as diferenças encontradas são provocadas pela ação conjunta das duas substâncias em teste.

A potencialização da inibição provocada pela associação das substâncias foi parcialmente dependente da concentração, pois a maior inibição $90,56 \pm 0,40\%$ foi alcançada na concentração de 0,04mg/mL de cetoprofeno, e mesmo após o aumento da concentração esta inibição se manteve. Estes resultados demonstram a importância da concentração testada visando efeitos máximos com a menor dose possível.

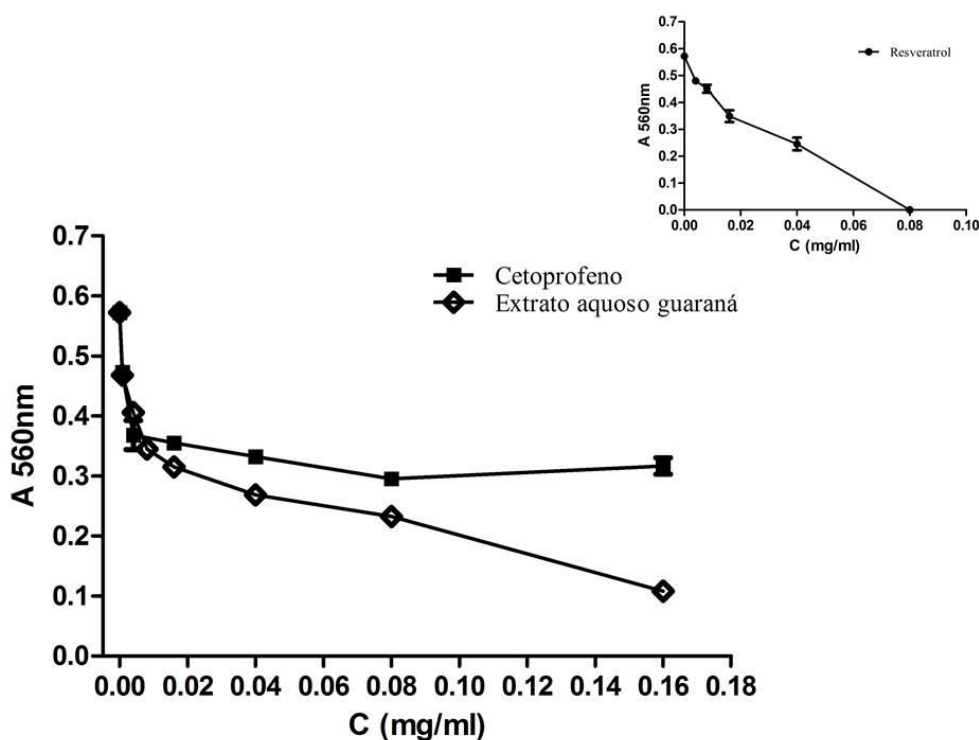
5.2.4 Atividade *scavenger* sobre o $O_2^{\cdot-}$

No processo inflamatório ocorre a ativação de diferentes formas de defesa na tentativa de resolução desta patologia. Uma das formas de defesa do organismo é a ativação de células fagocíticas que produzem radicais livres, como o $O_2^{\cdot-}$ (KLADNA et al., 2006). Sabendo-se da presença desta molécula durante o processo inflamatório é relevante avaliar a ação do cetoprofeno sobre ela (Figura 13). Neste ensaio o cetoprofeno alcançou a atividade *scavenger* máxima de $48,33 \pm 3,10\%$ na concentração de 0,08mg/mL. Embora Kladna et al. (2006) tenham utilizado uma metodologia diferente, também observam significativa atividade *scavenger* do cetoprofeno sobre o $O_2^{\cdot-}$. Porém Manente et al. (2011), que não observaram nenhuma ação *scavenger* do cetoprofeno sobre este radical.

O extrato aquoso de guaraná apresentou atividade *scavenger* máxima sobre o $O_2^{\cdot-}$ na concentração de 0,16mg/mL, sendo que esta atividade atingiu $81,14 \pm 1,46\%$, e seu IC_{50} foi de $0,014 \pm 0,005$ mg/mL. O resveratrol apresentou $IC_{50} = 0,035 \pm 0,01$ mg/mL. Estes resultados indicam uma ótima atividade *scavenger* do extrato sobre o $O_2^{\cdot-}$, pois apresentou uma concentração de IC_{50} menor do que o padrão testado, um potente antioxidante. Esta ação antioxidante do extrato aquoso de guaraná provavelmente está relacionada com a presença de diversos componentes bioativos na sua composição, como: polifenóis totais, catequinas e taninos totais.

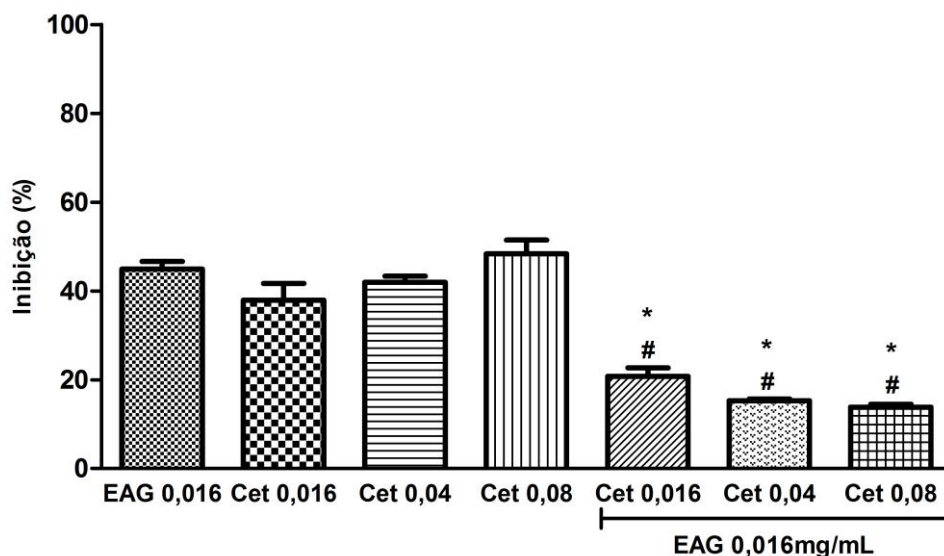
O $O_2^{\bullet-}$ pode interagir com o $NO^{\bullet}$ e formar outros radicais extremamente lesivos. Portanto, inibir a ação oxidativa do $O_2^{\bullet-}$ pode ser uma alternativa na prevenção de danos em membranas celulares e DNA provocados por ele mesmo ou por radicais que derivam de reações nas quais é elemento fundamental. Em um estudo conduzido por Bittencourt et al. (2013), foi observado que em células tratadas com nitroprussiato de sódio (agente gerador de NO) e extrato hidroalcolico de guaraná os níveis de estresse oxidativo diminuíram em relação àquelas não tratadas com o extrato.

Figura 13 - Ação *scavenger* do cetoprofeno, extrato aquoso de guaraná e resveratrol sobre o ânion superóxido quimicamente gerado por NBT (68,4 μ M), PMS (9,67 μ M) e NADH (118,5 μ M) em tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,4; λ = 560nm



Na associação do cetoprofeno e do extrato aquoso de guaraná foram observadas mudanças significativas na atividade *scavenger*. Para o ensaio da ação *scavenger* sobre o $O_2^{\bullet-}$ utilizou-se a concentração mais próxima do IC_{50} do extrato (0,016mg/mL) e para o cetoprofeno foram utilizadas concentrações menores e igual aquela em que foi alcançada a atividade *scavenger* máxima (Figura 14).

Figura 14 - Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno na atividade *scavenger* sobre o $O_2^{\bullet-}$



Nota: EAG (extrato aquoso de guaraná 0,016mg/mL); Cet 0,016 (cetoprofeno 0,016mg/mL); Cet 0,04 (cetoprofeno 0,04mg/mL); Cet 0,08 (cetoprofeno 0,08mg/mL). # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação à respectiva concentração de cetoprofeno testada; * indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao extrato aquoso de guaraná (0,016mg/mL).

Os resultados apresentados acima indicam efeito diferente ao observado frente às espécies anteriores para a associação das substâncias quando se trata da ação sobre o $O_2^{\bullet-}$. Pode-se notar que ao contrário dos demais ensaios, a associação do cetoprofeno e do extrato aquoso de guaraná, independentemente da concentração, resultou em menor efetividade na atividade *scavenger* sobre o $O_2^{\bullet-}$.

Em todas as concentrações de cetoprofeno testadas na associação foi observada a diminuição da atividade *scavenger* quando comparada com a substância isolada. A maior atividade *scavenger* na associação foi de $20,76 \pm 1,90\%$ na menor concentração do cetoprofeno. Diante deste resultado percebe-se que a associação das substâncias em teste piora a atividade *scavenger* sobre o $O_2^{\bullet-}$, portanto tanto o extrato aquoso de guaraná interfere negativamente na ação do cetoprofeno sobre este radical, como o cetoprofeno interfere de forma negativa na ação antioxidante do extrato.

5.2.5 Atividade sobre a inibição da oxidação do guaiacol pela peroxidase (HRP)

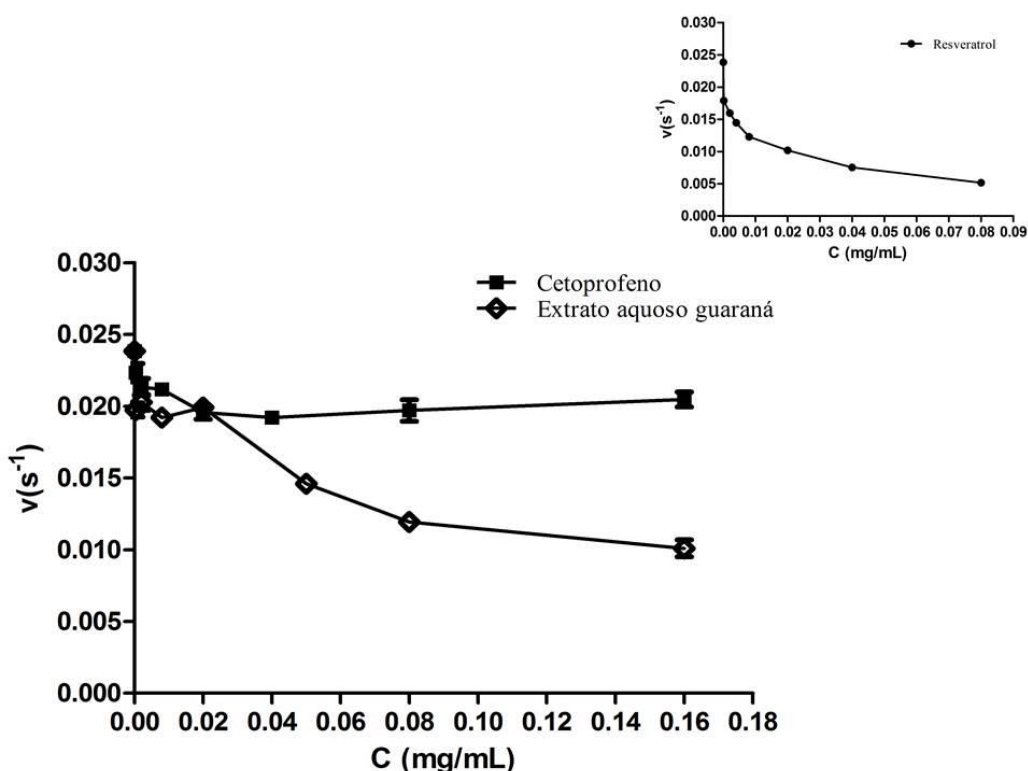
A HRP é uma peroxidase muito útil em estudos que envolvam a oxidação de xenobióticos por peroxidases (VELLOSA, 2008). É de fácil obtenção e se tornou um modelo clássico para a avaliação de diferentes compostos que possam inibir esta enzima (KHALIL, 2002). De tal forma observa-se na Figura 15 que o extrato aquoso de guaraná apresentou

significativa capacidade de inibir a HRP. A inibição máxima alcançada foi de $57,62 \pm 4,25\%$ na concentração de $0,16 \text{ mg/mL}$ e apresentou $\text{IC}_{50} = 0,05 \pm 0,001 \text{ mg/mL}$. Velloso (2008) demonstrou que alguns flavonóides, como a quercetina e afzelina, são bons inibidores da HRP. Esta atividade poderia estar relacionada com a presença de hidroxilas livres no anel B das moléculas dos compostos antioxidantes (VELLOSA, 2008). O extrato aquoso de guaraná é composto por diferentes polifenóis, tais como a catequina, que apresenta as referidas hidroxilas em sua estrutura, sendo, portanto, uma potencial fonte inibidora da HRP.

O cetoprofeno não apresentou a mesma eficiência e provocou a inibição máxima de $17,90 \pm 3,49\%$ na concentração de $0,02 \text{ mg/mL}$. Alguns AINES, como por exemplo, o diclofenaco, são inibidores da peroxidase de neutrófilos, mieloperoxidase (MPO) (ZUURBIER et al., 1992). Porém o AINE investigado neste estudo não apresentou alta capacidade de inibição sobre a HRP.

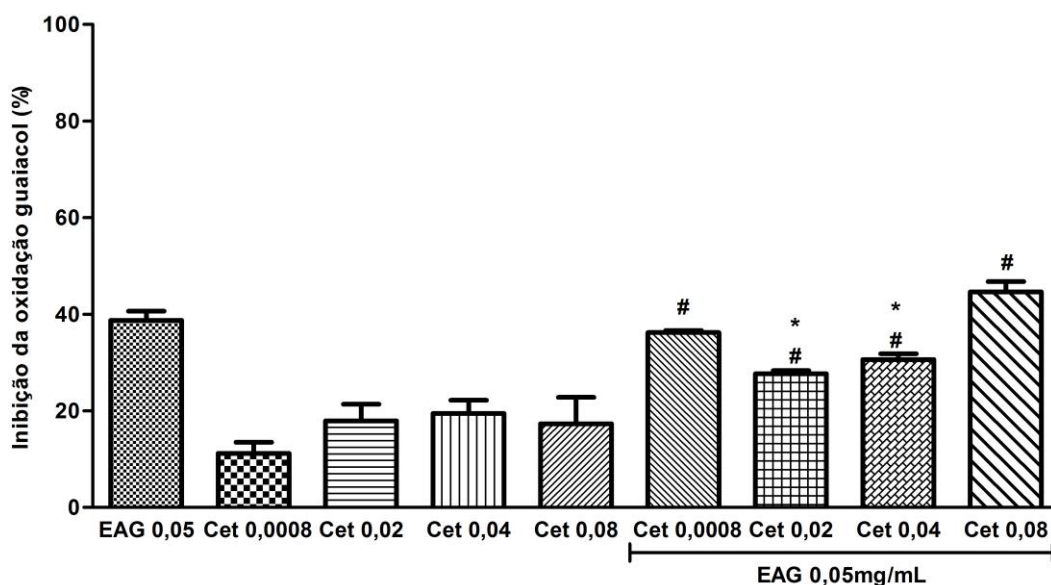
O resveratrol, utilizado neste estudo como antioxidante padrão, apresentou $\text{IC}_{50} = 0,018 \pm 0,003 \text{ mg/mL}$, demonstrando significativa eficiência como inibidor sobre este sistema modelo, assim como outros antioxidantes anteriormente estudados, como a quercetina (VELLOSA 2008).

Figura 15 – Efeito do cetoprofeno, extrato aquoso de guaraná e resveratrol sobre a oxidação do guaiacol catalisada pela HRP (7 nM/ H_2O_2 0,1 mM); em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37°C ; $\lambda = 470 \text{ nm}$.



Além da ação do cetoprofeno e do extrato aquoso de guaraná isolado, buscou-se avaliar a ação destas substâncias associadas sobre a inibição da HRP. Da mesma forma que nos ensaios anteriores, utilizou-se a concentração do IC₅₀ do guaraná, e para o cetoprofeno foram testadas concentrações superiores, igual e menor àquela em que se obteve a inibição máxima (Figura 16).

Figura 16 - Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno sobre a inibição (%) da oxidação do guaiacol pela peroxidase (HRP)



Nota: EAG (extrato aquoso de guaraná 0,05mg/mL); Cet 0,0008 (cetoprofeno 0,0008mg/mL); Cet 0,02 (cetoprofeno 0,02mg/mL); Cet 0,04 (cetoprofeno 0,04mg/mL); Cet 0,08 (cetoprofeno 0,08mg/mL). # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação à respectiva concentração de cetoprofeno testada; *indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao extrato aquoso de guaraná (0,05mg/mL).

A v_0 das diferentes associações sofreram alterações em relação às v_0 das substâncias isoladas. Na menor e na maior concentração do cetoprofeno associado ao extrato não houve diferença com relação à v_0 do extrato aquoso de guaraná, portanto o cetoprofeno não interferiu no resultado final. Já quando se compara a ação do extrato aquoso de guaraná sobre a ação do cetoprofeno, pode-se notar que em todas as concentrações testadas houve diferença estatística e o extrato aquoso de guaraná promoveu significativa inibição da HRP independente da concentração de cetoprofeno utilizada na associação.

Observa-se que a inibição máxima para a associação foi alcançada na maior concentração do cetoprofeno (0,08mg/mL), atingindo-se $44,61 \pm 2,18\%$. Entretanto, esse valor não foi estatisticamente diferente da inibição alcançada pelo extrato aquoso de guaraná. Nas concentrações intermediárias mesmo com o aumento da inibição provocada pela associação em relação à concentração correspondente do cetoprofeno, estes valores foram menores

daqueles obtidos pelo extrato aquoso de guaraná. De uma maneira geral, a associação aumentou a inibição provocada quando se considera apenas o cetoprofeno, porém em relação ao extrato aquoso de guaraná não provoca nenhum efeito aditivo significativo.

A inibição da oxidação do guaiacol pela HRP pode estar relacionada à presença de substâncias: 1) que atuem como substrato da enzima (caracterizando inibição competitiva); 2) que possuam ação *scavenger* sobre o H_2O_2 , que é o co-substrato da enzima; 3) que capturem o guaiacol oxidado (produto da reação catalisada pela HRP) ou 4) que atuem como inibidores da enzima HRP. Esta última hipótese, talvez seja a mais promissora para os resultados apresentados neste trabalho, pois a concentração de guaiacol e de H_2O_2 presentes nesta reação é bem maior do que aquela necessária para assegurar que a reação aconteça na sua velocidade máxima. Embora Velloso (2008) tenha observado que flavonóides como afzelina, kaempferol e quercetina não interagem com o H_2O_2 e são potenciais substratos da HRP, quando se trata do extrato aquoso de guaraná, há uma mistura de compostos polifenólicos o que dificulta a confirmação de tal hipótese, uma vez que não se pode saber qual substância atua desta maneira na reação e, para isso, seria necessário um estudo para cada substância presente neste extrato.

Em relação aos resultados obtidos para o cetoprofeno estudos envolvendo essa investigação deverão ser desenvolvidos, pois na literatura os dados ainda são controversos sobre sua ação *scavenger* sobre o H_2O_2 . Enquanto Manente et al. (2011) não encontraram nenhuma ação, Costa et al. (2006), demonstraram uma promissora atividade *scavenger* deste AINE sobre o H_2O_2 . Estes estudos utilizaram metodologias diferentes, demonstrando a importância do meio reacional considerado. E ainda, não se pode descartar a possibilidade deste fármaco inibir a peroxidase, assim como outros AINES (ZUURBIER et al., 1992).

Sob um aspecto geral os dados até aqui apresentados indicam que o cetoprofeno possui pouca atividade *scavenger* contra ERO, porém esta atividade é dependente do tipo de ERO presente no modelo de ensaio. A maior atividade foi observada sobre o $O_2^{\bullet-}$, e estes resultados corroboram com os resultados obtidos por Costa et al. (2006). A presença de alguma atividade antioxidante do cetoprofeno pode estar relacionada com a sua estrutura química, pois a presença da porção benzofenona contribui para a sua capacidade redox (NG; LIU; ZHAO, 2000).

Além disso, não foi observada atividade pró-oxidante em nenhum dos ensaios já demonstrados aqui, a qual é relevante uma vez que o estabelecimento do estresse oxidativo está relacionado com o aumento de ERO e/ou diminuição dos sistemas de defesa antioxidante. Portanto, se durante a inflamação ocorre a exacerbação da produção e liberação de ERO, por

exemplo, através do “*burst oxidative*” (GAWEL; LIBROWSKI; LIPKOWSKA, 2013), a utilização de um AINE, como o cetoprofeno, que atue através da inibição da COX, mas além disso possua atividade antioxidante pode diminuir os efeitos adversos possivelmente relacionados com o estresse oxidativo. Entretanto, a atividade deste fármaco em alvos que não estejam sob o processo inflamatório e desta forma sob a produção aumentada de ERO ainda permanece desconhecida. Os ensaios *in vitro* contribuem para o *screening* inicial do comportamento desta molécula frente a diferentes ERO, porém estudos *in vivo* podem elucidar o que de fato acontece em outros locais do organismo, que muitas vezes são alvos dos efeitos adversos provocados pelo cetoprofeno.

Já o extrato aquoso de guaraná demonstrou atividade bastante satisfatória diante das ERO testadas. Embora poucos estudos utilizem o mesmo extrato em questão, a atividade antioxidante dos produtos derivados das sementes do guaraná é bem estabelecida (BITTENCOURT et al., 2013; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007; MATTEI et al., 1998). Esta atividade está diretamente relacionada com a presença de componentes bioativos como: cafeína, teobromina, catequinas, taninos e outros componentes (BELLINARDO; MARTELLI; VALLE, 1985). Estas moléculas atuam como potentes antioxidantes, pois suas estruturas são composta por hidroxilas livres e anéis aromáticos, possibilitando reações do tipo redox com alta capacidade de doar átomos de hidrogênio, fundamental para a atividade *scavenger* sobre muitos radicais (QUIDEAU et al., 2011).

Em relação à associação entre o cetoprofeno e o extrato aquoso de guaraná ainda não há relatos da literatura de estudos nestes modelos: ABTS^{•+}, DPPH[•], HOCl, O₂^{•-} e HRP, porém pode-se observar atividade *scavenger* dependente da ERO testada. Estes modelos *in vitro* indicaram que apenas na presença do O₂^{•-} a associação não foi efetiva. O que sugere que as interações entre as substâncias podem assumir diferentes comportamentos, dependendo especialmente do meio reacional, pois diante de alguns radicais e agentes oxidantes a interação parece favorecer a atividade antioxidante seja através da formação de novos compostos antioxidantes, potencialização da ação através de interações ou ainda outros mecanismos que precisam ser investigados. Entretanto, a associação também pode diminuir a capacidade antioxidante das substâncias em testes, como por exemplo, diante do O₂^{•-}, o que neste caso pode estar relacionado com a formação de compostos com menor efetividade sobre este radical como dímeros ou outras estruturas que tornam menos ativas as moléculas antioxidantes (SCOTTI et al., 2007). A partir destes resultados observa-se a importância da realização de maiores investigações acerca deste assunto, pois diferentes ERO e técnicas que

não foram investigadas neste estudo podem ser alternativas complementares para a elucidação do mecanismo de ação que envolve a associação destas substâncias.

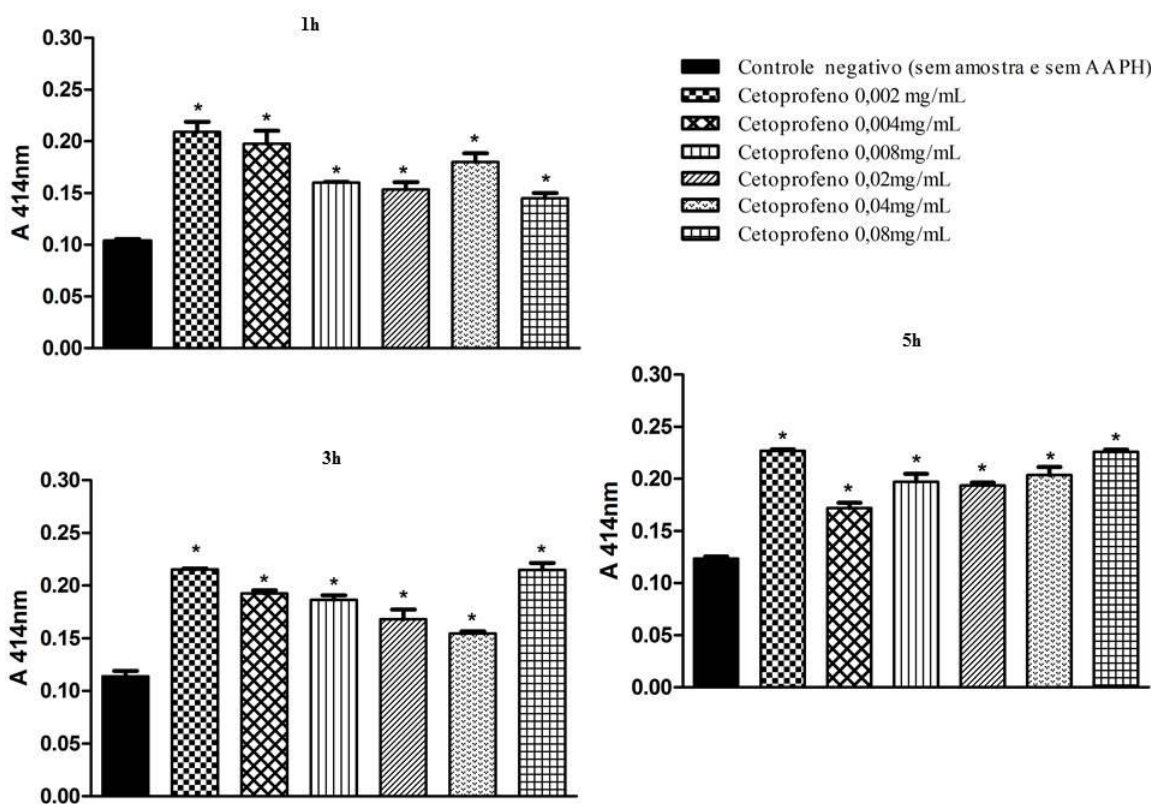
5.3 AÇÃO HEMOLÍTICA SOBRE ERITRÓCITOS HUMANOS

Além da realização dos ensaios *in vitro* com modelos de sistemas oxidativos, é importante avaliar o perfil das substâncias testadas sobre a toxicidade que pode ser provocada em eritrócitos humanos, como modelo de estudo celular. Estas diferentes metodologias fornecem dados importantes quando se visa observar o perfil do extrato aquoso de guaraná e do cetoprofeno, tanto isolados como associados, diante de diferentes agentes que podem contribuir para o estabelecimento do estresse oxidativo. A ação sobre eritrócitos é de grande utilidade visto que estas células desempenham funções essenciais para o bom funcionamento do organismo, como por exemplo, o transporte de oxigênio para os tecidos e é alvo do ataque oxidativo de muitas ERO (VELLOSA, 2008).

A hemólise dos eritrócitos é um modelo *ex vivo* de estudo, relacionado com os danos provocados por ERO e outras moléculas em membranas celulares e os efeitos provocados por xenobióticos. Este modelo utiliza o radical AAPH, que, em 37°C, se decompõe gerando um radical alquilo ($R^{\bullet}$) e na presença de oxigênio molecular é convertido para um radical peroxilo ($ROO^{\bullet}$). A hemólise neste caso está associada com os danos que os radicais derivados do AAPH causam na membrana do eritrócito, como a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas da membrana (NIKI, 1990; SATO et al., 1995).

Inicialmente verifico-se a ação de cada substância sobre os eritrócitos durante 5 horas. Conforme pode se observar na Figura 17, o cetoprofeno provoca o aumento discreto, da hemólise em relação ao controle negativo (sem a amostra em teste, apenas com eritrócitos) em todas as concentrações testadas e em todos os tempos analisados. Estes resultados estão de acordo com Manente et al. (2011). A maior taxa de hemólise foi provocada pela menor concentração do cetoprofeno, independentemente do tempo considerado.

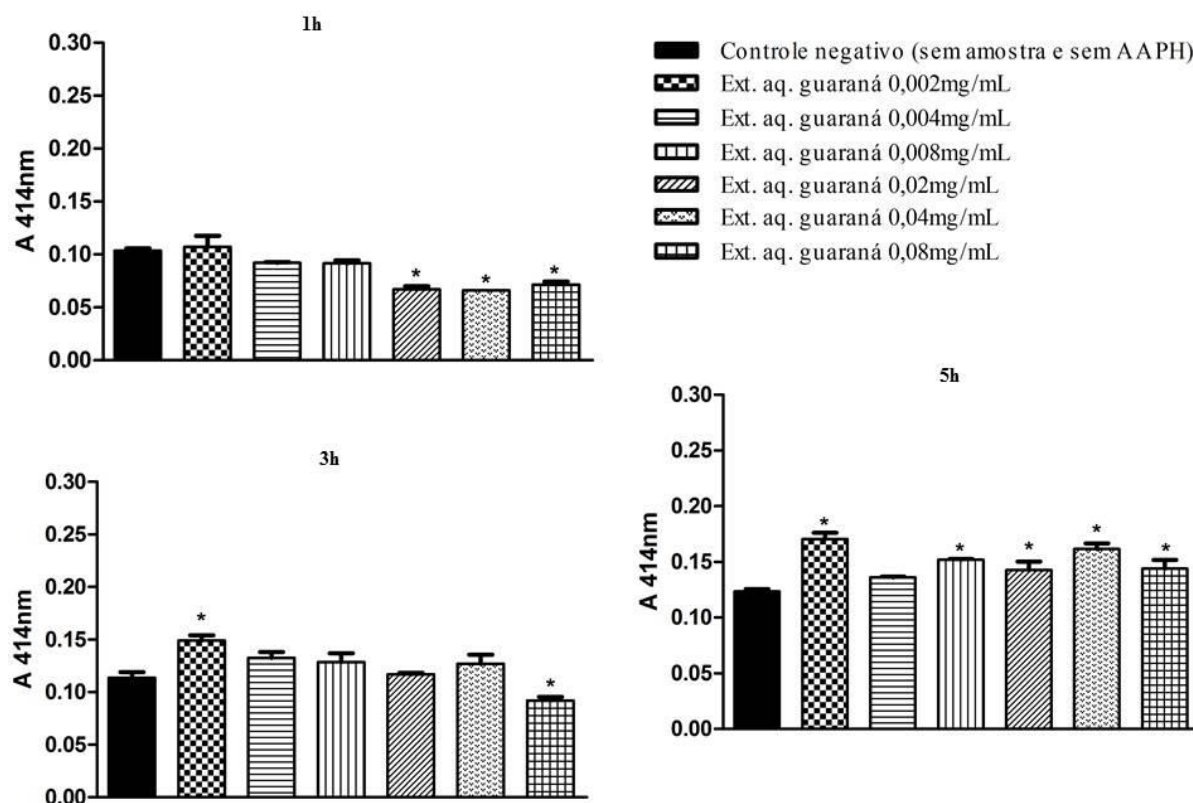
Figura 17 - Ação hemolítica do cetoprofeno em diferentes concentrações em função do tempo: suspensão de eritrócitos 5%; 5 horas de incubação; 37°C; tampão fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM, pH 7,4; $\lambda = 414$ nm



Nota: * Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao controle negativo (sem amostra e sem AAPH).

O extrato aquoso de guaraná apresentou resultados que foram dependentes do tempo (Figura 18). Na primeira hora de incubação observou-se uma diminuição da hemólise nas três maiores concentrações. A inibição máxima da hemólise foi de $35,26 \pm 1,3\%$ na concentração de 0,02mg/mL, sendo que esta inibição não foi estatisticamente diferente das inibições provocadas pelas concentrações de 0,04 e 0,08mg/mL. Nas demais concentrações não foram observados quaisquer efeitos, sendo que a hemólise permaneceu igual àquela do controle. Já na terceira hora de incubação, observou-se que a maior concentração do extrato provocou $19,12 \pm 3,10\%$ de inibição da hemólise, enquanto que a menor concentração (0,002mg/mL) aumentou a hemólise, em relação ao controle. Na última hora de incubação não foram observados efeitos inibitórios sobre a hemólise de eritrócitos e o maior aumento da hemólise foi provocado pela menor concentração do extrato.

Figura 18 - Ação hemolítica do Extrato aquoso de guaraná (Ext. aq. guaraná) em diferentes concentrações, em função do tempo: suspensão de eritrócitos 5%; 5 horas de incubação; 37°C; tampão fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM, pH 7,4; $\lambda = 414 \text{ nm}$

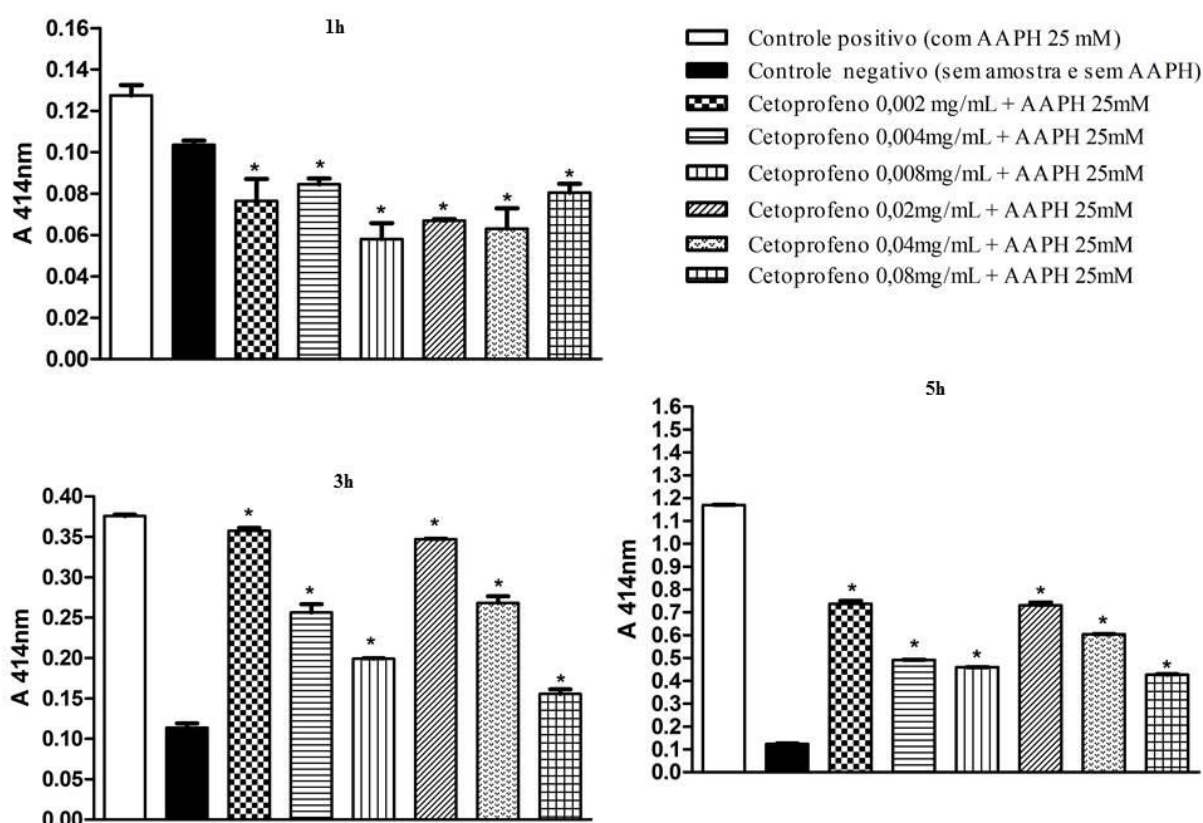


Nota: * Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao controle negativo (sem amostra e sem AAPH).

Além disso, buscou-se avaliar a ação destas substâncias diante da hemólise de eritrócitos humanos provocada pelo radical formado a partir do AAPH. Como pode ser observado na Figura 19, o oxidante AAPH provoca forte ação hemolítica (controle positivo) em comparação ao controle negativo, onde só é encontrada a hemólise proveniente da execução da técnica. Neste caso, o cetoprofeno provocou um efeito contrário àquele observado na ausência do radical. Em todos os tempos analisados o cetoprofeno independentemente das concentrações, inibiu a hemólise induzida pelo AAPH. Na primeira hora a maior inibição alcançada foi de $54,50 \pm 1,66\%$ na concentração de 0,008mg/mL. Na terceira hora a concentração de 0,08mg/mL inibiu $58,61 \pm 1,50\%$ da hemólise e na quinta hora a maior inibição também se deu nesta concentração, porém atingiu $63,50 \pm 0,18\%$. Estes resultados indicam a presença de atividade anti-radicalar do cetoprofeno em relação ao AAPH, efeito positivo quando se trata de um fármaco que é utilizado no tratamento de patologias envolvidas com o estresse oxidativo. Portanto, estes dados sugerem que o cetoprofeno não provoca danos nas membranas de eritrócitos quando presente em um

ambiente oxidativo. Isso é importante quando se considera que a lise de eritrócitos pode estar relacionada com efeitos colaterais de medicamentos, como a anemia hemolítica.

Figura 19 - Ação do cetoprofeno em diferentes concentrações sobre a hemólise promovida pelo AAPH (25mM) em função do tempo: suspensão de eritrócitos 5%; 5 horas de incubação; 37°C; tampão fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM, pH 7,4; $\lambda = 414 \text{ nm}$

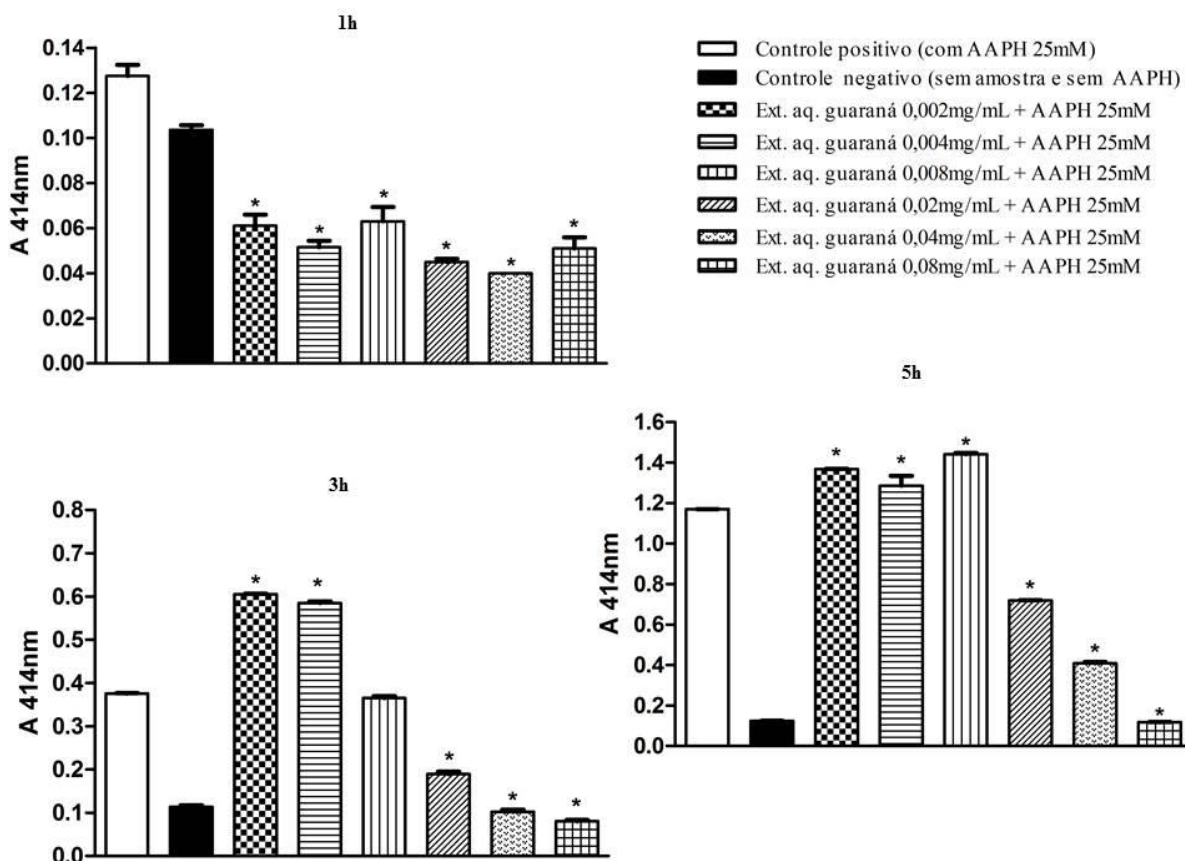


Nota: * Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao controle positivo (com AAPH 25mM e sem amostra).

A ação do extrato aquoso de guaraná sobre a hemólise promovida pelo radical AAPH também foi diferente daquela provocada na ausência deste radical. Observa-se na Figura 20, que a inibição da hemólise está relacionada com o tempo de incubação com a concentração do extrato no meio reacional. Na primeira hora todas as concentrações diminuíram a hemólise, em relação ao controle positivo, sendo a inibição máxima ($68,62 \pm 0,5\%$) na concentração de 0,04mg/mL que foi semelhante à concentração de 0,08mg/mL. Na terceira hora as três maiores concentrações de extrato aquoso de guaraná provocaram significativa inibição da hemólise, enquanto que as demais concentrações não demonstraram tal efeito. A inibição máxima alcançada nesta hora foi $78,70 \pm 1,31\%$ (0,08mg/mL). Na última hora deste ensaio a maior concentração do extrato provocou $90 \pm 0,18\%$ de inibição da hemólise, enquanto que as

concentrações (0,002; 0,004 e 0,008mg/mL) aumentaram o efeito hemolítico do AAPH sobre os eritrócitos.

Figura 20 - Ação do Extrato aquoso de guaraná (Ext. aq. guaraná) em diferentes concentrações sobre a hemólise promovida pelo AAPH (25mM), em função do tempo: suspensão de eritrócitos 5%; 5 horas de incubação; 37°C; tampão fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM, pH 7,4;



Nota: * Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao controle positivo (com AAPH 25mM e sem amostra).

O mecanismo pelo qual substâncias antioxidantes atuam na inibição da hemólise provocada pelo radical AAPH não foi elucidado, porém Banerjee et al. 2008 aponta que os antioxidantes podem provocar a neutralização química direta dos radicais peróxilos gerado a partir de AAPH ou atuar por meio da sua absorção celular (BANERJEE et al., 2008).

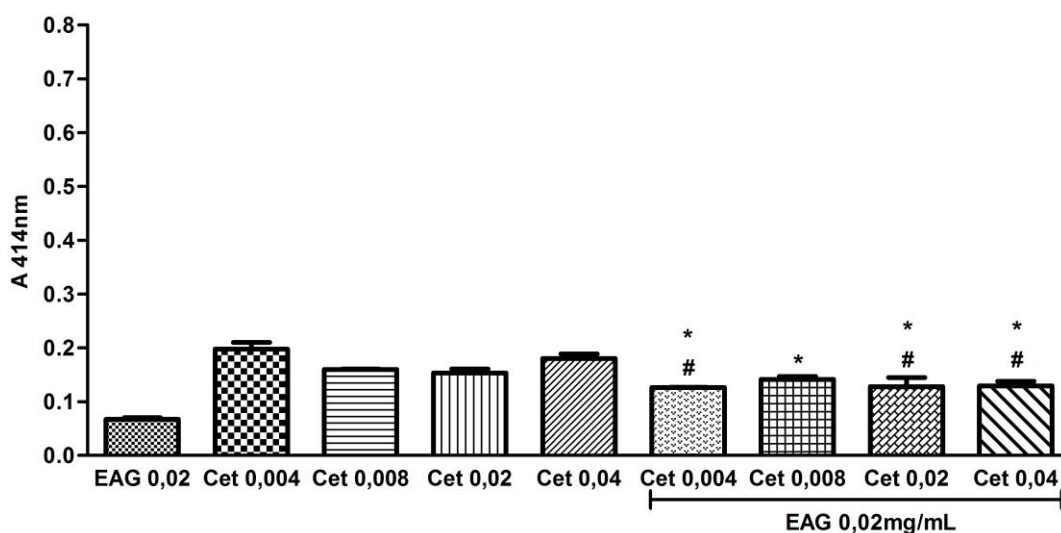
Velloso et al. (2015) observaram que os flavonóides afzelina, kaempferol e pteroginoside foram capazes de inibir a hemólise provocada pelo AAPH e estes resultados foram dependentes da dose utilizada. Além disso, sugerem que estes flavonóides podem ter atividade contra o radical AAPH impedindo-o de agir sobre a membrana celular dos

eritrócitos. Estas observações suportam os resultados encontrados na ação do extrato aquoso de guaraná, que contém vários flavonóides, que poderiam assim, agir sobre o radical AAPH e exercer seu efeito antioxidante neste sistema, desencadeando a proteção dos eritrócitos e suas atividades essenciais. Estes resultados também foram concentração-dependentes, sendo que em concentrações muito baixas e ao longo do tempo a hemólise foi intensificada, demonstrando a importância de concentrações adequadas de substâncias antioxidantes para que esta ação seja alcançada. E ainda, Velloso et al. (2015), destacam que o aumento da hemólise dependente do tempo poderia estar relacionado com o maior contato das substâncias no meio reacional com a membrana do eritrócito, o que facilita a remodelação estrutural das membranas e interrupção da homeostase do eritrócito.

Também se verificou a ação do cetoprofeno e do extrato aquoso de guaraná associadas. Foram utilizadas as concentrações do cetoprofeno que apresentaram uma ação intermediária tanto no ensaio com AAPH quanto sem este oxidante: 0,004; 0,008; 0,02 e 0,04 mg/mL. O extrato aquoso de guaraná foi testado na sua $IC_{50} = 0,02\text{mg/mL}$. As concentrações de ambas as substâncias foram escolhidas para que fosse possível observar a inibição ou exacerbação da hemólise (caso houvesse) pela associação das amostras.

Na Figura 21 observa-se que em todas as concentrações a associação resultou em um aumento da absorbância, e, portanto, aumento da hemólise, quando comparada apenas com a hemólise provocada pelo extrato aquoso de guaraná. Isto indica que o cetoprofeno interferiu negativamente na ação provocada pelo extrato quando se trata da hemólise provocada na ausência do radical AAPH na primeira hora de incubação.

Figura 21 - Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno sobre a hemólise (A 414nm) durante 1h incubação (37°C) sem AAPH

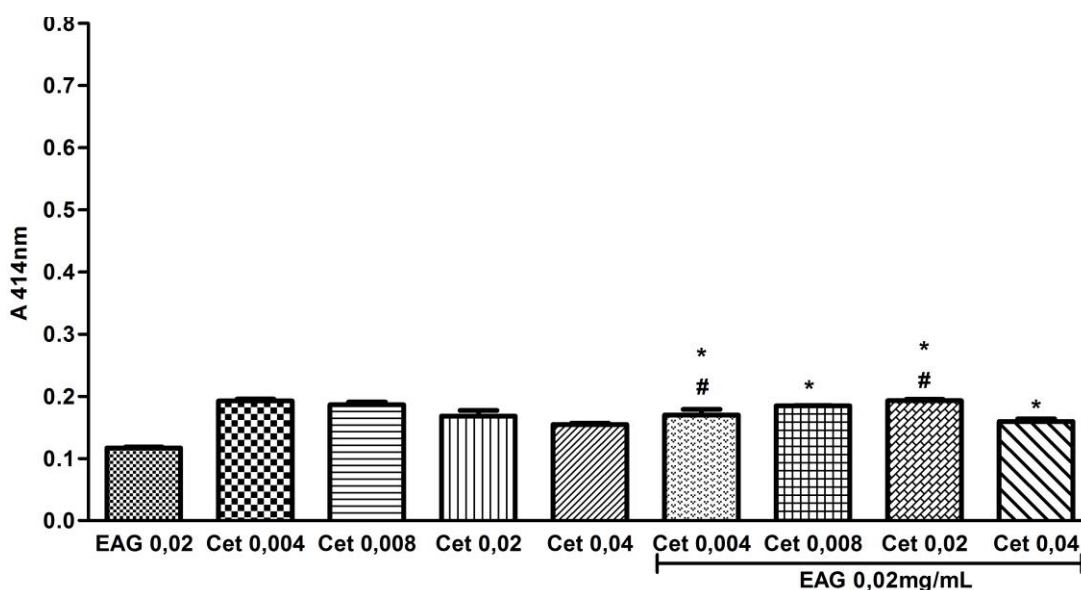


Nota: EAG (extrato aquoso de guaraná 0,02mg/mL); Cet 0,0004 (cetoprofeno 0,0008mg/mL); Cet 0,008(cetoprofeno 0,008mg/mL); Cet 0,02 (cetoprofeno 0,02mg/mL); Cet 0,04 (cetoprofeno 0,04mg/mL). # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação à respectiva concentração de cetoprofeno testada; *indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao extrato aquoso de guaraná (0,02mg/mL).

Em contrapartida, o extrato aquoso de guaraná influencia de forma diferente na ação hemolítica do cetoprofeno. O extrato utilizado nesta pesquisa provocou a diminuição da hemólise que o cetoprofeno sozinho não alcançava, exceto na concentração de 0,008mg/mL. O melhor efeito da associação foi observado na menor concentração de cetoprofeno (0,004mg/mL), onde a hemólise teve uma redução de aproximadamente 36%.

Na terceira hora de incubação na ausência de AAPH, a associação das amostras também provocou o aumento da hemólise quando comparada com àquela provocada apenas pelo extrato aquoso do guaraná, demonstrando que o cetoprofeno, independente da concentração, interfere negativamente no efeito provocado pelo extrato (Figura 22).

Figura 22 - Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno sobre a hemólise (A 414nm) durante 3h incubação (37°C) sem AAPH

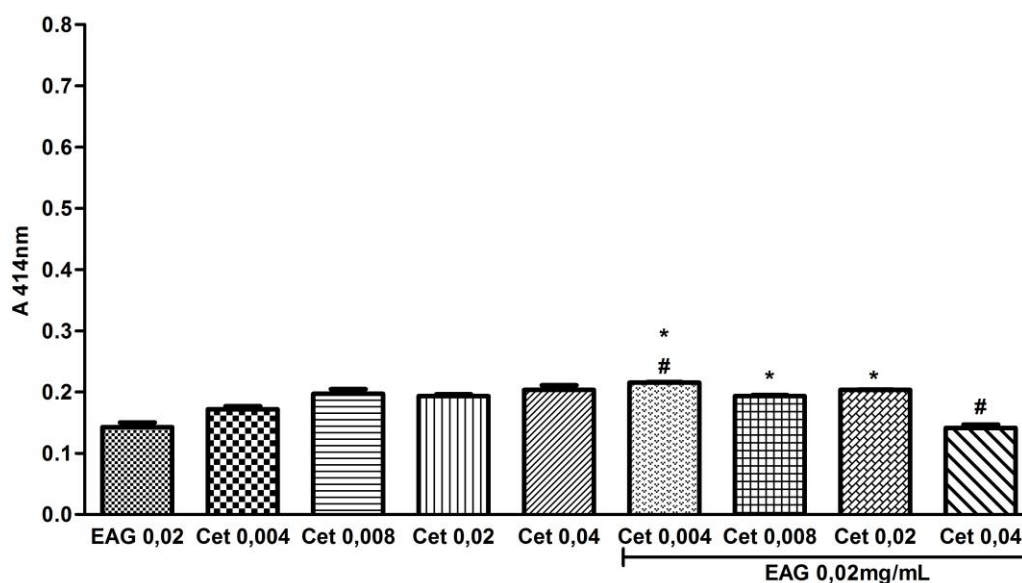


Nota: EAG (extrato aquoso de guaraná 0,02mg/mL); Cet 0,0004(cetoprofeno 0,0008mg/mL); Cet 0,008(cetoprofeno 0,008mg/mL); Cet 0,02 (cetoprofeno 0,02mg/mL); Cet 0,04 (cetoprofeno 0,04mg/mL). # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação à respectiva concentração de cetoprofeno testada; *indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao extrato aquoso de guaraná (0,02mg/mL).

O extrato aquoso de guaraná promoveu a diminuição da hemólise e 12% apenas quando associado a menor concentração do cetoprofeno, sendo que nas demais concentrações não provocou alteração ou até mesmo piorou a hemólise que foi provocada pelo cetoprofeno quando testado nestas mesmas condições, porém de forma isolada.

Após cinco horas de incubação das amostras associadas e na ausência do AAPH observa-se que o cetoprofeno continuou interferindo na ação do extrato aquoso de guaraná, provocando o aumento da hemólise. Apenas a maior concentração de cetoprofeno não provocou alterações na ação do extrato (Figura 23).

Figura 23 - Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno sobre a hemólise (A 414nm) durante 5h incubação (37°C) sem AAPH



Nota: EAG (extrato aquoso de guaraná 0,02mg/mL); Cet 0,0004(cetoprofeno 0,0008mg/mL); Cet 0,0008(cetoprofeno 0,0008mg/mL); Cet 0,02 (cetoprofeno 0,02mg/mL); Cet 0,04 (cetoprofeno 0,04mg/mL). # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação à respectiva concentração de cetoprofeno testada; *indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao extrato aquoso de guaraná (0,02mg/mL).

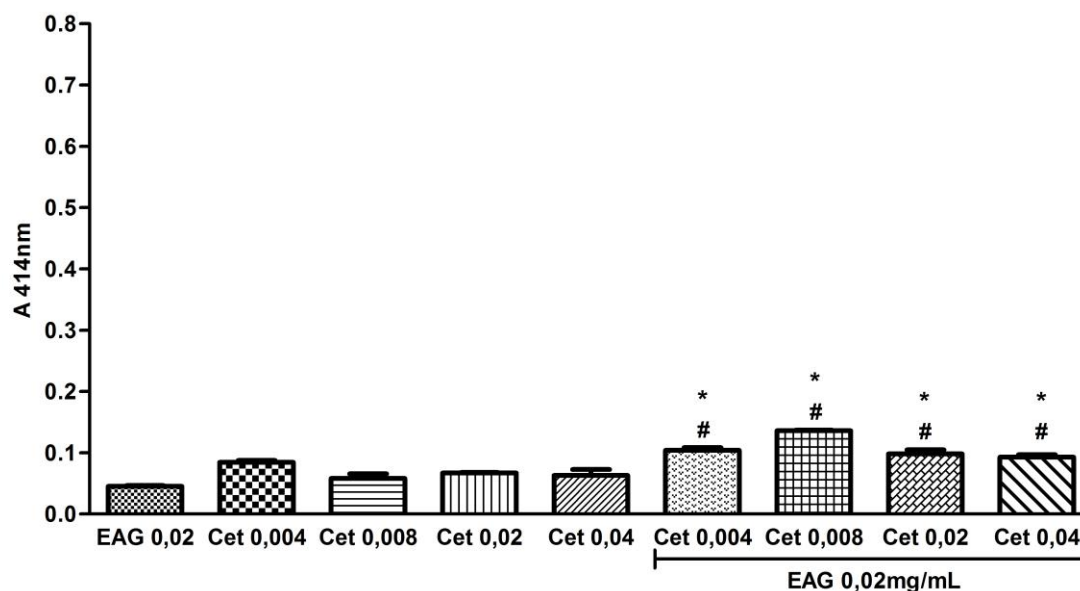
Quando se observa o efeito do extrato aquoso de guaraná sobre a hemólise provocada pelo cetoprofeno, na última hora de incubação, há uma inversão dos efeitos alcançados na terceira hora. O extrato prejudicou a ação hemolítica do cetoprofeno na menor concentração e provocou a redução de 30,54% da hemólise na maior concentração.

Estes resultados indicam que a ação do extrato aquoso de guaraná pode ser benéfica quando se trata da redução da hemólise provocada pelo cetoprofeno na ausência de um radical. Entretanto esta ação é dependente do tempo e também da concentração do cetoprofeno no meio reacional. Quanto maior o tempo de incubação, maior foi a concentração de cetoprofeno necessária para que se alcançasse a diminuição da hemólise, sugerindo possíveis interações entre as moléculas destas substâncias e até formação de novos compostos que não interfiram na homeostase da membrana do eritrócito, exercendo efeito protetor.

Devido ao envolvimento das ERO em diversas funções e patologias que acometem o organismo foi importante também, neste estudo, a avaliação da ação da associação das substâncias em teste diante de radicais livres. Então, além dos resultados demonstrados até aqui, investigamos a ação do cetoprofeno e do extrato aquoso de guaraná associados sobre a hemólise induzida pelo radical AAPH.

Após a primeira hora de incubação, observou-se que o cetoprofeno, independente da concentração testada, prejudicou a ação do extrato aquoso de guaraná, pois aumentou significativamente a hemólise quando comparada com a ação provocada somente pelo extrato (Figura 24).

Figura 24 - Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno sobre a hemólise (A 414nm) promovida pelo AAPH durante 1h incubação (37°C)



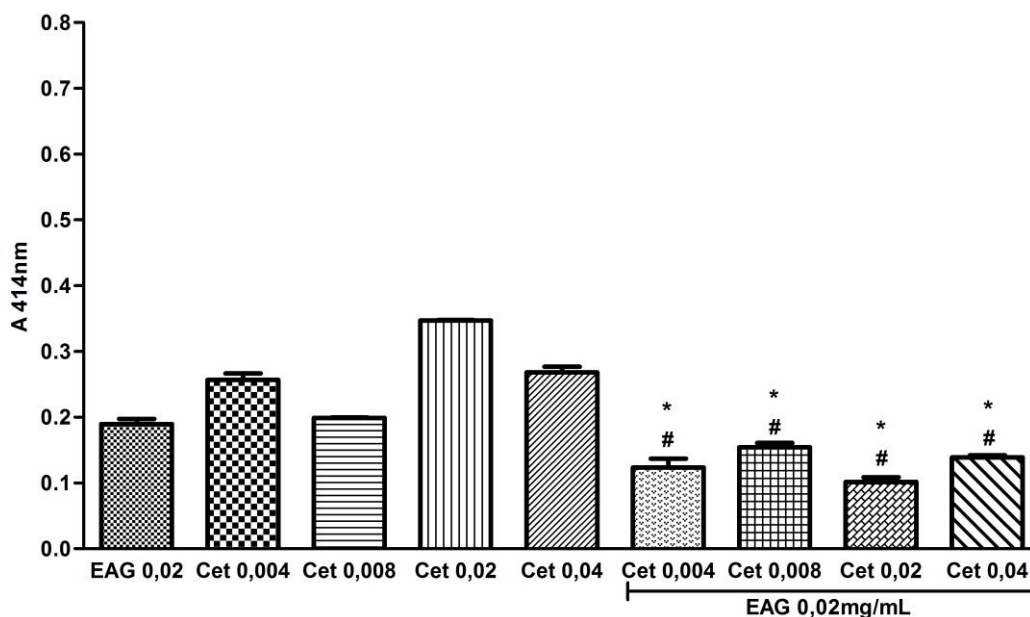
Nota: EAG (extrato aquoso de guaraná 0,02mg/mL); Cet 0,0004 (cetoprofeno 0,0008mg/mL); Cet 0,008 (cetoprofeno 0,008mg/mL); Cet 0,02 (cetoprofeno 0,02mg/mL); Cet 0,04 (cetoprofeno 0,04mg/mL). # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação à respectiva concentração de cetoprofeno testada; *indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao extrato aquoso de guaraná (0,02mg/mL).

O efeito do extrato aquoso de guaraná sobre a ação do cetoprofeno também mostra o aumento da hemólise na associação em relação ao cetoprofeno isolado, na respectiva concentração. O maior aumento da hemólise foi provocado na concentração de 0,008mg/mL de cetoprofeno e resultou em um acréscimo de 134, 48% na hemólise, indicando que a associação não é eficiente na diminuição da hemólise provocada pelo radical AAPH na primeira hora de incubação.

Após três horas de incubação a ação provocada pela associação do extrato aquoso de guaraná e o cetoprofeno sobre a hemólise promovida pelo AAPH demonstra um

comportamento diferente daquele observado na primeira hora do ensaio. Em todas as concentrações da associação o cetoprofeno provoca uma diminuição da hemólise promovida apenas pelo extrato (Figura 25).

Figura 25 - Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno sobre a hemólise (A 414nm) promovida pelo AAPH durante 3h incubação (37°C)



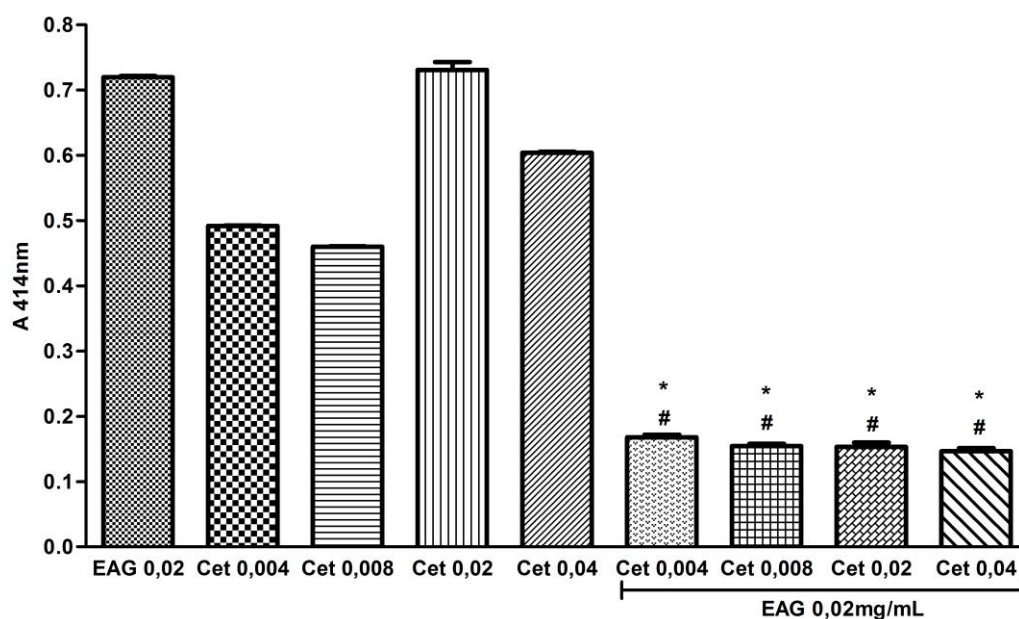
Nota: EAG (extrato aquoso de guaraná 0,02mg/mL); Cet 0,0004(cetoprofeno 0,0008mg/mL); Cet 0,008(cetoprofeno 0,008mg/mL); Cet 0,02 (cetoprofeno 0,02mg/mL); Cet 0,04 (cetoprofeno 0,04mg/mL). # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação à respectiva concentração de cetoprofeno testada; *indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao extrato aquoso de guaraná (0,02mg/mL).

O extrato provoca diminuição da hemólise em todas as concentrações de cetoprofeno testadas, quando se compara com a hemólise resultante da ação individual do cetoprofeno. Neste caso o melhor efeito da associação foi observado na concentração de 0,02mg/mL do cetoprofeno, onde a inibição da hemólise foi de $70 \pm 0,15\%$.

Portanto, a associação do extrato e do cetoprofeno indica um efeito protetor em relação à hemólise promovida por cada substância isolada durante 3 horas de incubação.

E na última hora de incubação o que se observa é uma diminuição ainda maior da hemólise. Quando comparamos o efeito do cetoprofeno sobre o extrato aquoso de guaraná esta inibição é perceptível em todas as concentrações associadas, portanto ao longo do tempo o cetoprofeno parece contribuir para a ação do extrato aquoso de guaraná sobre a hemólise provocada pelo radical AAPH (Figura 26).

Figura 26 - Efeito da associação entre extrato aquoso de guaraná e cetoprofeno sobre a hemólise (A 414nm) promovida pelo AAPH durante 5h incubação (37°C)



Nota: EAG (extrato aquoso de guaraná 0,02mg/mL); Cet 0,0004 (cetoprofeno 0,0008mg/mL); Cet 0,008 (cetoprofeno 0,008mg/mL); Cet 0,02 (cetoprofeno 0,02mg/mL); Cet 0,04 (cetoprofeno 0,04mg/mL). # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação à respectiva concentração de cetoprofeno testada; *indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao extrato aquoso de guaraná (0,02mg/mL).

O efeito do extrato sobre a ação do cetoprofeno também foi positivo na medida em que promoveu uma diminuição significativa na hemólise provocada em cada concentração testada. A maior inibição da hemólise foi observada na concentração de 0,02mg/mL de cetoprofeno associada ao guaraná, a qual resultou em uma redução de aproximadamente 79,06%.

Os resultados dos ensaios da hemólise promovida pelo AAPH utilizando a associação de cetoprofeno e extrato aquoso de guaraná mostraram efeitos que foram dependentes principalmente do tempo de incubação das amostras. A associação demonstrou ser potencialmente eficaz quanto maior for o tempo de contato entre as moléculas das substâncias, potencializando o efeito que é encontrado quando ambas são utilizadas isoladamente.

Quanto maior a interação das substâncias associadas mais notável é a redução dos danos causados pelo APPH sobre a membrana dos eritrócitos. Estes resultados sugerem potencial ação protetora das células, isto é relevante quando se busca diminuir possíveis efeitos indesejados dessas substâncias que estejam relacionados com a toxicidade celular e suas consequências.

5.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEPÁTICOS, RENAIIS E HEMATOLÓGICOS

A realização dos ensaios *in vitro* e *ex vivo* são importantes para a compreensão de como o cetoprofeno e o extrato aquoso de guaraná podem se comportar sob determinadas condições, porém ensaios *in vivo* são extremamente importantes para a compreensão da ação do cetoprofeno e do extrato aquoso de guaraná associados ou não sobre sistemas biológicos. Desta forma os animais foram tratados com cetoprofeno (20mg/kg/dia) e ou extrato aquoso de guaraná (1 ou 0,1 mg/g/dia), e o grupo controle com salina, durante 7 dias.

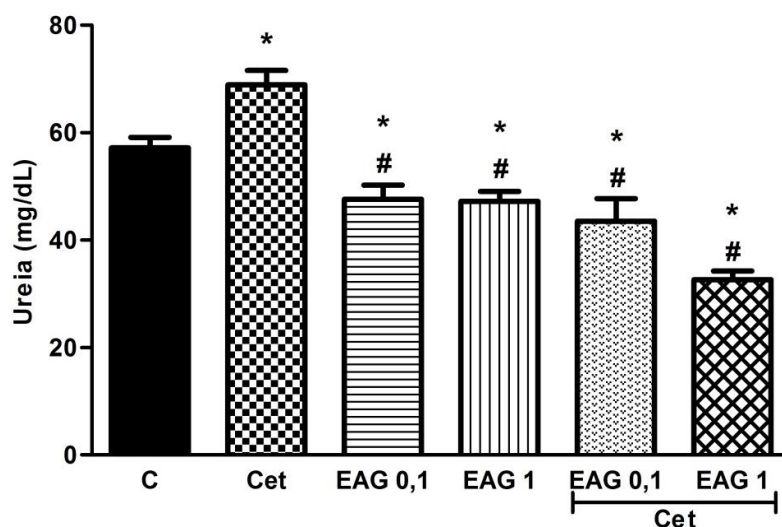
Foram analisados os níveis séricos de transaminases (ALT e AST) relacionados com a função hepática. A ALT catalisa a transaminação da L-alanina e 2-oxoglutarato a piruvato e glutamato no citoplasma dos hepatócitos, enquanto que a AST catalisa a transaminação do L-aspartato e 2-oxoglutarato a glutamato e oxalacetato. A AST, entretanto, não é específica do tecido hepático, pois está presente também em outros tecidos tais como: no coração e músculos (SILVA, 2004).

Nenhum dos tratamentos realizados neste trabalho provocou alterações significativas tanto na ALT quanto na AST, em relação ao grupo controle (dados não apresentados). Esse resultado indica que o cetoprofeno e o extrato aquoso de guaraná não provocam hepatotoxicidade relacionada a danos celulares que é expressa pelo aumento das duas enzimas (BERTOLAMI, 2005). Estes resultados corroboram com a pesquisa de Khoshnegah; Kamrani e Mohri (2011), que, embora tenham utilizado diferentes doses de cetoprofeno em cães, não observaram alterações nas enzimas hepáticas.

Para a avaliação da ação das substâncias sobre a função renal analisaram-se os níveis séricos de ureia, creatinina e ácido úrico.

A ureia é sintetizada no fígado e resulta do catabolismo proteico. É transportada para os rins através da circulação sanguínea e nos rins é filtrada nos glomérulos e excretada na urina. O nível de ureia sérica pode ser afetado pela função renal, presença de sangramento intestinal, hidratação do indivíduo, conteúdo proteico da dieta e nível do catabolismo das proteínas (SILVA; BARBOSA; SOUSA, 2008).

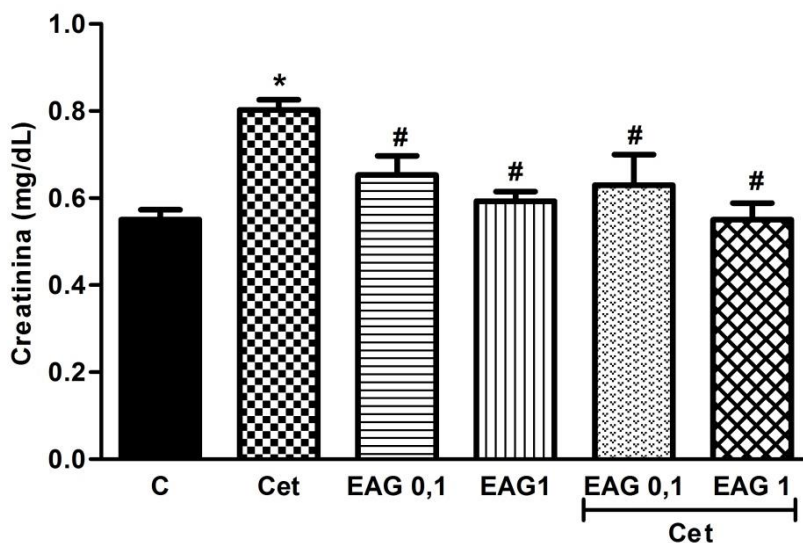
Conforme demonstra a Figura 27, pode-se observar que o cetoprofeno provocou aumento no nível de ureia sérica quando comparado com os valores deste parâmetro no grupo controle. Entretanto, em todos os grupos que receberam o extrato aquoso de guaraná, associado ou não ao cetoprofeno os níveis de ureia foram significativamente diminuídos.

Figura 27 - Avaliação dos níveis séricos de ureia

Nota: Análise bioquímica do parâmetro ureia em ratos Wistar que receberam C (salina); Cet (cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 0,1 (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia); EAG 1 (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia); EAG 0,1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia), durante 7 dias por via oral. * Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle. # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo cetoprofeno.

Estes resultados indicam a presença de substâncias no extrato aquoso de guaraná que podem interferir na homeostase renal, principalmente relacionada ao estímulo para a eliminação da ureia, seja por alterações diretas ou indiretas na filtração glomerular. Os resultados obtidos demonstram que o extrato possui sugestiva capacidade de reverter os efeitos deletérios provocados pelo cetoprofeno sobre este parâmetro bioquímico, pois provoca significativa diminuição dos níveis de ureia sérica.

A creatinina é um derivado de aminoácido resultante da degradação da creatina, sua eliminação ocorre por filtração glomerular e também pode ser secretada pelos túbulos proximais, em menor proporção. Os níveis séricos da creatinina são mantidos pelo equilíbrio entre sua produção e sua eliminação (SODRÉ; COSTA; LIMA, 2007). Conforme demonstra a Figura 28, os resultados obtidos na avaliação da creatinina sérica indicam diferença significativa entre os grupos analisados.

Figura 28 - Avaliação dos níveis séricos de creatinina

Nota: Análise bioquímica do parâmetro creatinina em ratos Wistar que receberam C (salina); Cet (cetopropeno 20mg/kg/dia); EAG 0,1 (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia); EAG 1 (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia); EAG 0,1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia+ cetopropeno 20mg/kg/dia); EAG 1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia+ cetopropeno 20mg/kg/dia), durante 7 dias por via oral. * Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle. # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo cetopropeno.

O grupo de animais que recebeu apenas o cetopropeno apresentou aumento significativo nos níveis de creatinina sérica, enquanto que aqueles que receberam extrato aquoso de guaraná independente da dose não apresentaram esta elevação. O aumento nos níveis séricos de ureia e creatinina provocados pelo cetopropeno são indicativos de alteração na função renal provocada por danos na sua estrutura e/ou funcionalidade. Estes resultados também foram observados por Somchit et al. (2014) através do tratamento de animais (ratos) com ácido mefenâmico, e sugerem que estes danos estejam relacionados com a ação deste anti-inflamatório sobre as PGE_2 e PGI_2 , pois com a inibição destas prostaglandinas o suprimento sanguíneo renal é comprometido e consequentemente as funções renais são acometidas.

Entretanto, os grupos que receberam as duas substâncias não apresentaram mudanças nos níveis de creatinina quando comparados com o grupo controle. Este resultado reforça os indícios apontados nos resultados obtidos através da ureia sérica, na qual o extrato aquoso de guaraná também provocou a reversão das alterações provocadas pelo cetopropeno.

O mecanismo pelo qual o extrato aquoso de guaraná promove a reversão dos aumentos, da ureia e da creatinina, no soro dos animais ainda não foi elucidado. Tendo em vista que estas substâncias são excretadas através da filtração glomerular e o extrato utilizado

na presente pesquisa é composto por diversas substâncias, dentre elas as metilxantinas, é relevante o fato de que estas possam interferir na taxa de excreção de algumas substâncias.

A cafeína e a teobromina são metilxantinas e estão presentes no extrato aquoso de guaraná utilizado neste trabalho. Estas substâncias tem efeito diurético, o qual parece ser dependente da dose e do tempo de exposição (BOLIGNANO et al., 2007). Vários mecanismos tem sido propostos para explicar este efeito, como por exemplo, aumento da liberação de cálcio intracelular, inibição de enzimas fosfodiesterases que hidrolisam o AMPc, inibição da reabsorção tubular e inibição dos receptores de adenosina (A_1) (BOLIGNANO et al., 2007; RIEG et al., 2005). A inibição de receptores A_1 parece exercer papel fundamental sobre este efeito. Estes receptores estão presentes em diferentes estruturas: na arteríola aferente, células justaglomerulares, túbulo proximal, alça de Henle e ducto coletor (VALLON; HLBAUER; OSSWALD, 2006). Rieg et al. (2005), demonstraram que a ação diurética e natriurética da cafeína e teofilina é provocada pela inibição de receptores A_1 , portanto, além da presença destes receptores é importante se considerar a localização dos mesmos que parece exercer papel fundamental no efeito observado. A natriurese provocada pelas metilxantinas parece estar relacionada com a inibição dos efeitos mediados pelos receptores A_1 no túbulo proximal (OSSWALD; SCHNERMANN, 2011), enquanto que o efeito diurético é observado quando a ação das metilxantinas predomina sobre os receptores A_1 na arteríola aferente. Isso porque a inibição dos receptores A_1 , principalmente no córtex externo, inibe a constrição sustentada da arteríola aferente provocada normalmente pela adenosina, e consequentemente não ocorre a redução da taxa de filtração glomerular (VALLON; HLBAUER; OSSWALD, 2006).

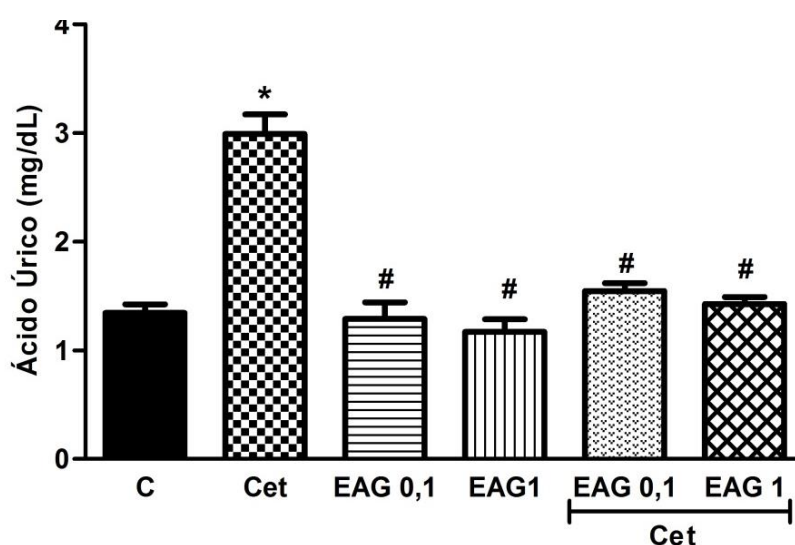
Embora ainda não haja uma definição exata do mecanismo de ação das metilxantinas sobre a função renal, os resultados deste estudo não descartam as hipóteses de mecanismos acima citados, visto que há redução de níveis plasmáticos de substâncias que são excretas pela via renal. Mesmo com as limitações de um estudo em modelo animal, os resultados sugerem efeito benéfico do extrato aquoso de guaraná quando associado ao uso do cetoprofeno indicando efeito protetor da função renal.

O ácido úrico é o produto da degradação oxidativa das purinas e aproximadamente um terço é excretado através do trato gastrointestinal, enquanto o restante é excretado na urina. A maior parte do ácido úrico é dissociado até urato de sódio que é transportado pelo plasma, mas apenas 5% está ligado à proteínas plasmáticas, e isto facilita a sua filtração renal (ROCH-RAMEL; GUIBAN, 1999).

A Figura 29 demonstra os resultados obtidos a partir dos tratamentos utilizados sobre os níveis séricos de ácido úrico, sendo que o grupo que recebeu apenas cetoprofeno sofreu

significativo aumento deste parâmetro. Em contrapartida os grupos que receberam o extrato aquoso de guaraná não sofreram alterações em relação ao grupo controle, e aqueles que receberam as duas substâncias também apresentaram níveis séricos de ácido úrico estatisticamente igual ao grupo controle. Estes resultados sugerem que o extrato aquoso de guaraná, independente da dose, quando isolado não provoca alterações sobre os níveis de ácido úrico plasmáticos, porém exerce efeito benéfico quando em associação ao cetoprofeno, um AINE, pois conseguiu reverter as alterações sobre este parâmetro.

Figura 29 - Avaliação dos níveis séricos de ácido úrico



Nota: Análise bioquímica do parâmetro ácido úrico em ratos Wistar que receberam C (salina); Cet (cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 0,1 (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia); EAG 1 (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia); EAG 0,1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia), durante 7 dias por via oral. * Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle. # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo cetoprofeno.

Estes resultados indicam possíveis alterações na excreção renal do ácido úrico. Sabe-se que a excreção do ácido úrico resulta de quatro processos: filtração glomerular, reabsorção quase completa, secreção e reabsorção pós-secretória. Após a filtração, o ácido úrico, na forma de urato de sódio entra no túbulo proximal e as demais etapas da sua excreção são dependentes de transportadores localizados ao longo do túbulo proximal (LIPKOWITZ, 2012). Diversos transportadores foram identificados e outros ainda estão sendo pesquisados para a elucidação da contribuição de cada um nas diferentes etapas da excreção do ácido úrico. O transportador de urato (URAT1) está na membrana apical das células do túbulo proximal e exerce papel fundamental na reabsorção do urato. Já os transportadores de íons

orgânicos (OAT1 e OAT3), estão presentes na membrana basolateral destas células e através da troca iônica participam da secreção de urato (LIPKOWITZ, 2012).

Em um estudo conduzido por Khamdang et al. (2002) observou-se que diversos AINES, dentre eles o cetoprofeno, são transportados por OAT1 e OAT3 sugerindo a participação destes transportadores na excreção destes fármacos. Além disso, os autores propõem a participação destes transportadores nos efeitos adversos provocados pelos AINES no rim. Isto pode estar relacionado com fato da acumulação dos AINES sobre as regiões dos transportadores e também após a sua secreção, quando elevadas concentrações são encontradas nas papilas renais, a qual pode ser associado à necrose papilar. Além disso, há indícios de que os AINES possam inibir de maneira competitiva os transportadores OAT1 (APIWATTANAKUL et al., 1999). Portanto, conforme se observa no grupo tratado somente com cetoprofeno, o aumento do ácido úrico sérico pode estar relacionado com a atividade competitiva do fármaco sobre os receptores envolvidos com a secreção do ácido úrico, provocando o aumento da concentração deste no plasma dos animais estudados.

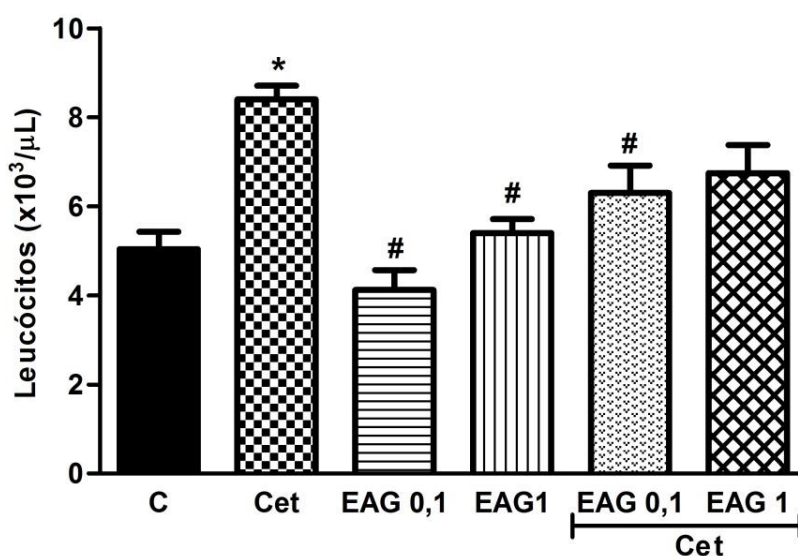
Em contrapartida, há estudos que demonstram que flavonóides podem exercer efeito contrário ao provocado pelo cetoprofeno. Hu et al. (2012) demonstraram que a quercetina provocou efeitos benéficos na função renal, protegendo disfunções renais em animais hiperuricêmicos. Neste estudo a quercetina diminuiu os níveis de creatinina e produtos nitrogenados séricos e aumentou a excreção de ácido úrico somente nos animais hiperuricêmicos, sem provocar alterações no grupo controle. Hu et al. (2012) acreditam que estes resultados estejam relacionados com a expressão de transportadores de íons orgânicos no rim, pois a quercetina provocou um aumento na expressão dos transportares OAT1 e diminuição na expressão de URAT1 resultando no favorecimento da excreção de ácido úrico. Estes resultados não foram observados no grupo tratado apenas com quercetina, sem a indução da hiperuricemia. Estes resultados corroboram com Wang et al. (2010), que também mostraram esta ação sobre a expressão destes receptores, porém com outro flavonóide: a morina. Os resultados demonstrados pela Figura 29 estão de acordo com estes estudos e a expressão de transportadores renais envolvidos com a excreção do ácido úrico parece ser uma via da ação do extrato aquoso de guaraná, visto a presença de flavonóides na sua composição e a semelhança de resultados encontrados. Entretanto são necessárias maiores investigações acerca desta relação para o esclarecimento do mecanismo de ação do extrato e também do cetoprofeno sobre a homeostase renal.

Dentre os parâmetros hematológicos avaliados não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos na contagem diferencial de leucócitos e na contagem de

plaquetas (dados não apresentados). Entretanto, para os parâmetros: contagem de leucócitos totais, contagem de eritrócitos, hemoglobina (Hb), hematócrito (HCT) e volume corpuscular médio (VCM), foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Na contagem de leucócitos totais observou-se que o tratamento com cetoprofeno causou leucocitose, porém nos grupos que receberam somente o extrato aquoso de guaraná não foi observado este efeito (Figura 30).

Figura 30 - Avaliação da contagem de leucócitos totais (número de leucócitos $\times 10^3$)



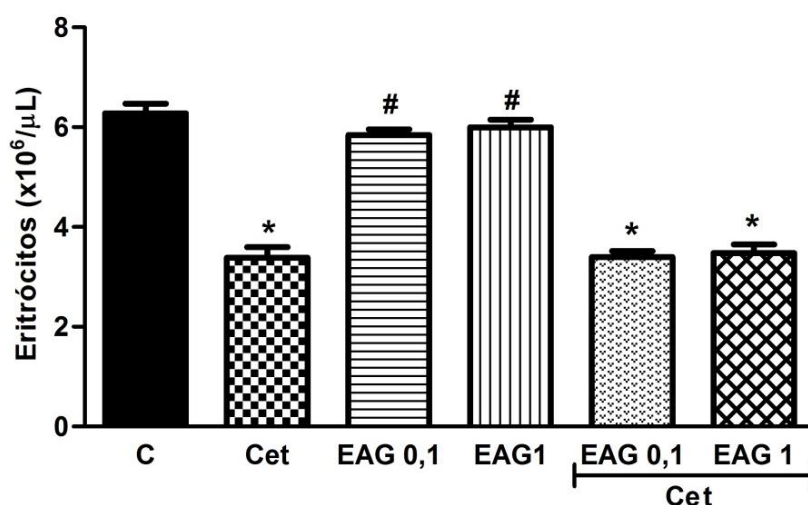
Nota: Análise hematológica do parâmetro leucócitos totais em ratos Wistar que receberam C (salina); Cet (cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 0,1 (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia); EAG 1 (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia); EAG 0,1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia), durante 7 dias por via oral. * Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle. # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo cetoprofeno.

O aumento do número de leucócitos pode estar relacionado com a ação dos AINES, e neste caso do cetoprofeno, sobre estas células. Yamamura et al. (1996) demonstraram que AINES, como a indometacina e o cetoprofeno, provocam aumento no número de granulócitos e linfócitos na corrente sanguínea, na medula óssea e outros tecidos de ratos. Sugerem também que os AINES podem induzir o sistema simpático, pois paralelo ao aumento de leucócitos observaram o aumento de noradrenalina no plasma. Portanto, a granulocitose é uma resposta do organismo frente a diferentes estímulos, como: estresse, adrenalina e AINES e ocorre de uma maneira muito rápida devido ao grande potencial, da medula óssea, na produção destas células num curto espaço de tempo. Conforme Yamamura et al. (1996) os AINES também podem estimular a diferenciação, a migração e a ativação de granulócitos (YAMAMURA et al., 1996).

A utilização isolada do extrato aquoso de guaraná não provocou alterações significativas no número de leucócitos totais em relação ao controle. Quando associou-se o cetoprofeno ao extrato aquoso de guaraná, o número de leucócitos totais foi reestabelecido ao nível do grupo de animais controle.

Na Figura 31 podemos observar as alterações na contagem de eritrócitos nos diferentes grupos estudados.

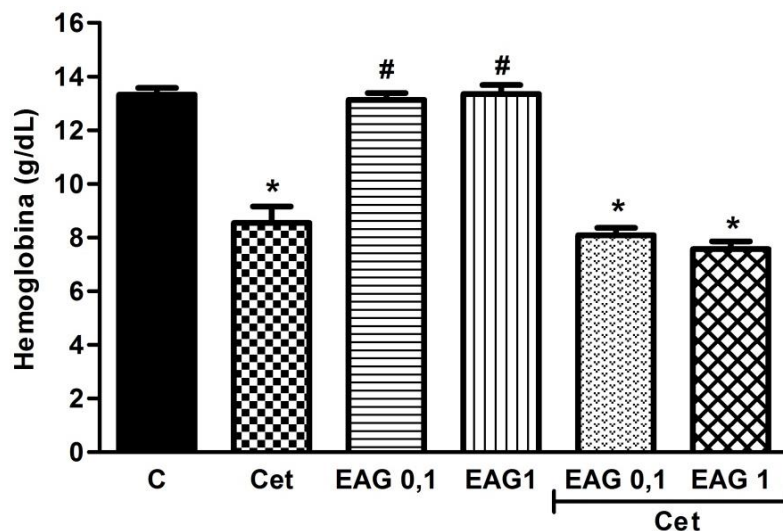
Figura 31 - Avaliação da contagem de eritrócitos (número de eritrócitos $\times 10^6/\mu\text{L}$)



Nota: Análise hematológica do parâmetro número de eritrócitos em ratos Wistar que receberam C (salina); Cet (cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 0,1 (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia); EAG 1 (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia); EAG 0,1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia), durante 7 dias por via oral. * Indica diferença estatística ($p<0,0001$) em relação ao grupo controle. # Indica diferença estatística ($p<0,0001$) em relação ao grupo cetoprofeno.

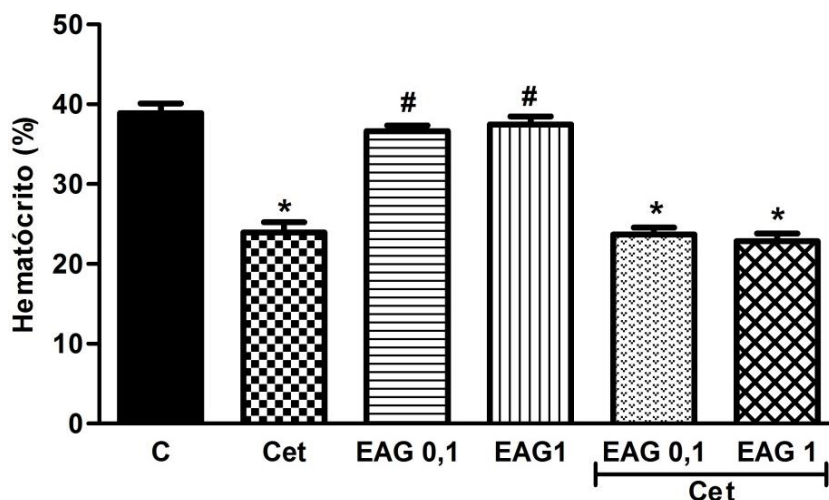
O cetoprofeno provocou significativa diminuição do número de eritrócitos e o tratamento com extrato aquoso de guaraná não conseguiu impedir esta redução em nenhuma das doses testadas. Quando o extrato aquoso de guaraná foi utilizado isoladamente esta redução não foi observada, sendo indicativo de que este efeito é exclusivo do cetoprofeno Barbosa et al. (2010) demonstraram que este efeito também foi observado em animais tratados com o diclofenaco de sódio, um AINE.

Além disso, foram constatadas outras alterações nos parâmetros hematológicos. Os níveis de hemoglobina foram diminuídos em todos os grupos que receberam o cetoprofeno, e embora o extrato aquoso de guaraná não provoque esta ação, também não foi eficiente para impedir que este dano acontecesse, conforme se observa na Figura 32.

Figura 32 - Avaliação da dosagem de hemoglobina

Nota: Análise hematológica do parâmetro hemoglobina em ratas Wistar que receberam C (salina); Cet (cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 0,1 (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia); EAG 1 (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia); EAG 0,1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia), durante 7 dias por via oral. * Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle. # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo cetoprofeno.

O hematócrito, que avalia a porcentagem de células vermelhas no volume total de sangue, apresentou alterações significativas que foram dependentes do uso do cetoprofeno (Figura 33).

Figura 33 - Avaliação do hematócrito

Nota: Análise hematológica do parâmetro hematócrito em ratas Wistar que receberam C (salina); Cet (cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 0,1 (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia); EAG 1 (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia); EAG 0,1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia), durante 7 dias por via oral.

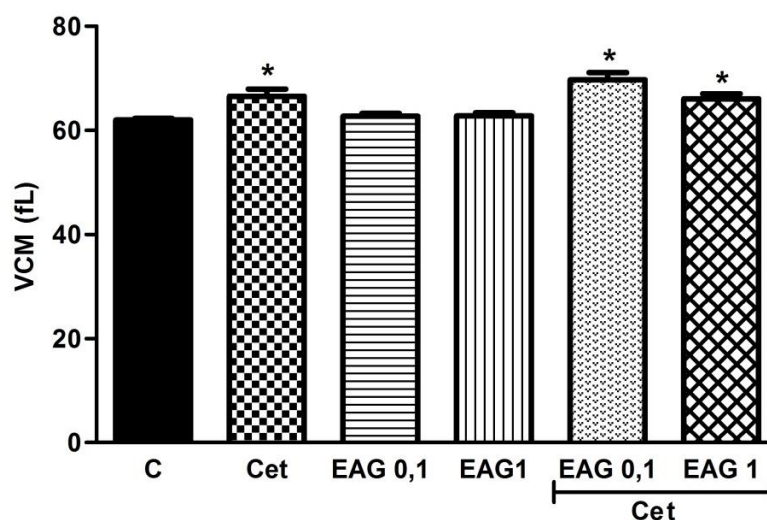
1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia), durante 7 dias por via oral. * Indica diferença estatística ($p<0,0001$) em relação ao grupo controle. # Indica diferença estatística ($p<0,0001$) em relação ao grupo cetoprofeno.

Conforme Barbosa et al. (2010) a diminuição do hematócrito também é encontrada quando utiliza-se o diclofenaco de sódio. Estes resultados sugerem que alguns AINES são capazes de provocar alterações tóxicas nos parâmetros hematológicos relacionados com a instalação e diagnóstico da anemia.

O extrato aquoso de guaraná não provocou alterações no hematócrito quando utilizado sozinho, e também não impediu a diminuição do hematócrito provocada pelo cetoprofeno.

Em relação ao VCM (que está relacionado com o volume das hemácias), o cetoprofeno provocou aumento significativo, independente da sua associação com o extrato aquoso de guaraná, conforme se pode observar na Figura 34.

Figura 34 - Avaliação do volume corpuscular médio (VCM)



Nota: Análise hematológica do parâmetro volume corpuscular médio em ratas Wistar que receberam C (salina); Cet (cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 0,1 (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia); EAG 1 (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia); EAG 0,1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia), durante 7 dias por via oral. * Indica diferença estatística ($p<0,0001$) em relação ao grupo controle. # Indica diferença estatística ($p<0,0001$) em relação ao grupo cetoprofeno.

Na análise microscópica (análise da morfologia celular) foi observada a presença intensa de policromatofilia caracterizada por macrócitos policromáticos, que é definida como a presença de eritrócitos grandes recém-saídos da medula na circulação periférica. Estes eritrócitos possuem resíduos de RNA na sua estrutura e denotam hiper-regeneração eritróide.

Isto é um indicativo de que a medula óssea está respondendo ao estado anêmico dos animais, aumentando a produção de eritrócitos e liberando-os mais rapidamente na circulação sanguínea, ainda na sua forma imatura, caracterizando uma anemia regenerativa nos grupos que receberam cetoprofeno, o que possivelmente influenciou na elevação dos valores de VCM (MEDEIROS; DITTRICH, 2014).

Portanto, ao se analisar o conjunto de parâmetros hematológicos é possível observarmos que o cetoprofeno provoca diminuição significativa do número de eritrócitos, da hemoglobina e do HCT confirmando a presença de anemia nestes grupos e este resultado corrobora com Barbosa et al. (2010) que observaram o estabelecimento da anemia em animais tratados com diclofenaco de sódio. Além disso, Goldstein et al. (2011) demonstraram que o uso de AINES provoca o agravamento da anemia, com diminuição dos níveis de hemoglobina ao longo do tempo.

Há estudos que indicam a presença da anemia relacionada ao tratamento medicamentoso, e esta anemia é classificada como anemia hemolítica induzida por fármacos, como por exemplo, antimicrobianos, antineoplásicos e inclusive AINES como o diclofenaco de sódio, ácido mefenâmico, naproxeno e aspirina. Estes medicamentos ou seus metabólitos induzem uma resposta autoimune contra os eritrócitos e a confirmação da anemia hemolítica induzida por medicamentos requer a confirmação sorológica (JOHNSON, 2009). Entretanto, não foram encontrados dados que confirmem esta ação hemolítica provocada pelo cetoprofeno.

Além disso, pesquisas sugerem que o estabelecimento da anemia provocada por diversos AINES está relacionado com os danos provocados por estes fármacos no trato gastrointestinal (SCARPIGNATO; HUNT, 2010; MARLICZ et al., 2014). Na mucosa gástrica os AINES provocam danos através da sua ação direta sobre a mucosa causando alterações físico-químicas e efeitos mediados pela inibição da síntese de PGs: diminuição da produção de muco, bicarbonato e da proliferação celular. Estes efeitos associados a alterações da microcirculação e liberação de radicais livres, resultam em danos na função e estrutura da mucosa gástrica (SCARPIGNATO; HUNT, 2010).

Na mucosa intestinal os AINES podem diminuir as PGs que exercem ação benéfica sobre a mucosa, resultando na redução do muco intestinal, perturbações microcirculatórias, aumento da motilidade intestinal, ruptura das junções intercelulares e aumento da permeabilidade da mucosa que pode ser agravada pela penetração de ácidos biliares, enzimas proteolíticas, bactérias intestinais ou toxinas (SCARPIGNATO; HUNT, 2010; MARLICZ et al., 2014).

Tachecí et al. (2013) observaram alta prevalência de anemia em pacientes com lesões no intestino delgado, e conforme Buttgereit; Burmester e Simon (2001), e exposição crônica aos AINES aumenta o risco de lesões no trato gastrointestinal superior, provando úlceras e erosões que podem evoluir para hemorragia, perfuração e obstruções.

Pacientes que utilizam AINES, frequentemente apresentam anemia com o hematócrito reduzido, porém muitas vezes não há a presença de lesões visíveis no trato gastrointestinal. Apesar disso, as microlesões provocadas pelos AINES nos diferentes órgãos do trato gastrointestinal podem resultar no quadro anêmico (SCARPIGNATO; HUNT, 2010). Diante destas considerações, os resultados obtidos neste estudo podem indicar que o cetoprofeno provoca anemia que está relacionada com as alterações estruturais e funcionais do trato gastrointestinal.

O extrato aquoso de guaraná não provocou nenhuma alteração sobre a anemia relacionada ao uso de cetoprofeno. Afsana et al. (2004) demonstraram que a utilização de ácido tânico (um polifenol), prejudicou a absorção de ferro e induziu anemia nos animais em estudo. Considerando a grande quantidade de polifenóis encontrados no extrato aquoso de guaraná, é possível que este mecanismo tenha contribuído para os resultados observados. Apesar do envolvimento de espécies reativas nos possíveis danos causados pelo cetoprofeno no trato gastrointestinal, a alta capacidade antioxidante do extrato parece não impedir este efeito e conseqüentemente o estabelecimento da anemia.

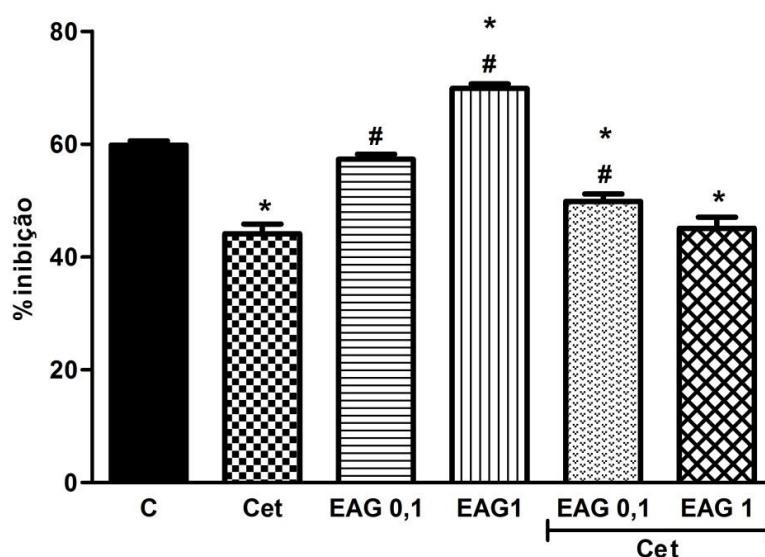
5.5 AVALIAÇÃO DO ESTATUS ANTIOXIDANTE DOS ANIMAIS

Por meio dos resultados apresentados até aqui, é possível se perceber que alterações importantes aconteceram em diferentes sistemas orgânicos dos animais em estudo. Diferentes mecanismos podem estar envolvidos quando se trata das alterações renais e hematológicas, como por exemplo o estresse oxidativo, condição que provoca danos em células e tecidos (DURACKOVA, 2010). Desta forma também foram avaliados alguns parâmetros antioxidantes nos animais, visando-se entender a contribuição deste fator de uma maneira ampla, através da capacidade antioxidante total, da atividade enzimática da catalase em eritrócitos e da dosagem de grupamentos sulfidrílicos totais (SH-T), e também de maneira direcionada onde avaliou-se os níveis dos grupamentos sulfidrílicos não proteicos (SH-NP) e a atividade da enzima catalase no fígado e nos rins.

A capacidade antioxidante total foi avaliada através da captura de radicais ABTS^{•+} exercida pelas substâncias antioxidantes presentes no soro dos animais. Os resultados são

expressos em porcentagem de inibição sobre este radical. Na Figura 35, observa-se que os animais que receberam apenas o cetoprofeno apresentam significativa redução na capacidade antioxidante total, em relação ao grupo controle, indicando possível elevação no consumo de agentes antioxidantes, principalmente daqueles advindos da dieta. O grupo de animais que recebeu apenas o extrato aquoso de guaraná na maior dose aumentou em aproximadamente 10% sua capacidade antioxidante total. A associação do cetoprofeno e do extrato aquoso de guaraná demonstrou que apenas na menor dose do extrato a capacidade antioxidante total foi parcialmente alterada, porém embora tenha apresentado maior inibição sobre o radical do que o grupo cetoprofeno não houve o reestabelecimento os níveis até àqueles encontrados no grupo controle.

Figura 35 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a capacidade antioxidante total



Nota: Capacidade antioxidante total é expressa em porcentagem de inibição do radical ABTS^{•+} em ratas Wistar que receberam C (salina); Cet (cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 0,1 (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia); EAG 1 (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia); EAG 0,1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia), durante 7 dias por via oral. * Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle. # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo cetoprofeno.

Estes resultados sugerem a interferência do cetoprofeno nas defesas antioxidantes do soro, pois nem com uma alta concentração de antioxidante associado (extrato aquoso de guaraná), foram observados resultados iguais ao grupo controle. Estes dados demonstram de uma maneira mais ampla o status antioxidante do sistema biológico analisado, e podem estar relacionados com a combinação de efeitos provocados pelo cetoprofeno em alvos específicos. Isto pode ser observado, por exemplo, nos resultados *in vitro* do cetoprofeno sobre este radical, onde não apresentou atividade antioxidante significativa. Somado a isto, pode-se

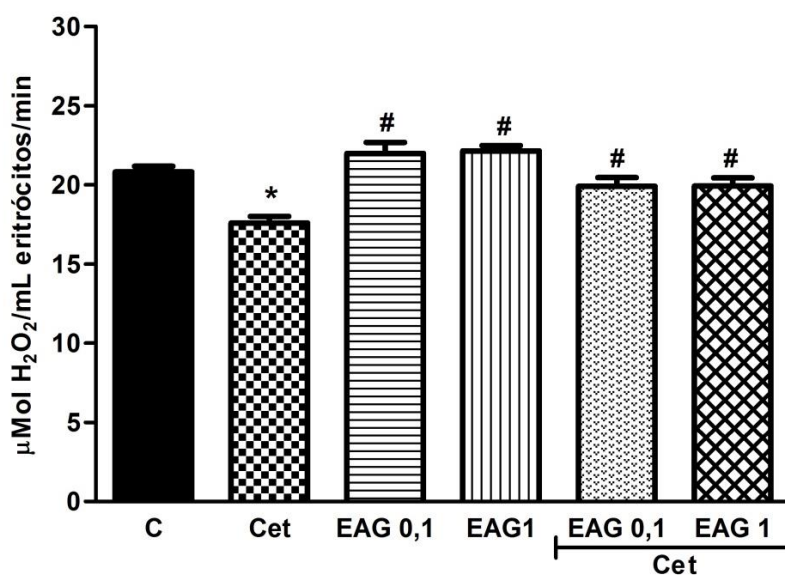
observar o efeito do cetoprofeno sobre a CAT em diferentes alvos (células e tecidos), no qual este xenobiótico também provocou alterações negativas, contribuindo para este resultado mais parcial.

Além disso, buscou-se avaliar alguns parâmetros antioxidantes individualmente para corroborar com resultados obtidos acima. Para isso, foi mensurada a atividade da enzima CAT em eritrócitos, uma importante defesa antioxidante endógena (FLORA, 2009).

A catalase é uma proteína tetramérica composta por quatro subunidades idênticas, um grupamento heme (ferro III protoporfirina IX) e uma molécula de NADPH que parece ser importante na prevenção da forma inativa da CAT pelo H_2O_2 . É um antioxidante endógeno, expresso por um gene localizado no cromossomo 11 (banda p13) e possui inúmeros polimorfismos. A expressão do gene CAT pode ser regulada em diferentes níveis: transcrição, pós-transcrição e pós-tradução. Alguns compostos, como: fenóis, benzeno e derivados, álcoois, arilaminas, podem ser substratos e/ou inibidores da função oxidase desta enzima, e ainda, pesquisas apontam que alguns flavonóides (miricetina, quercetina, rutina) são inibidores da catalase, provocando a conversão do composto I em composto II (forma inativa da enzima) (GLORIEUX et al., 2015; KODYDKOVÁ et al., 2014; KRYCH; GEBICKI; GEBICKA, 2014).

A Figura 36 demonstra os resultados da atividade da catalase em eritrócitos dos animais distribuídos nos diferentes grupos de tratamento. A atividade da CAT é representada da seguinte maneira: 1(uma) unidade (U) de enzima é expressa pelo consumo de $1\mu\text{Mol}$ de H_2O_2 por minuto.

Figura 36 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a atividade da catalase

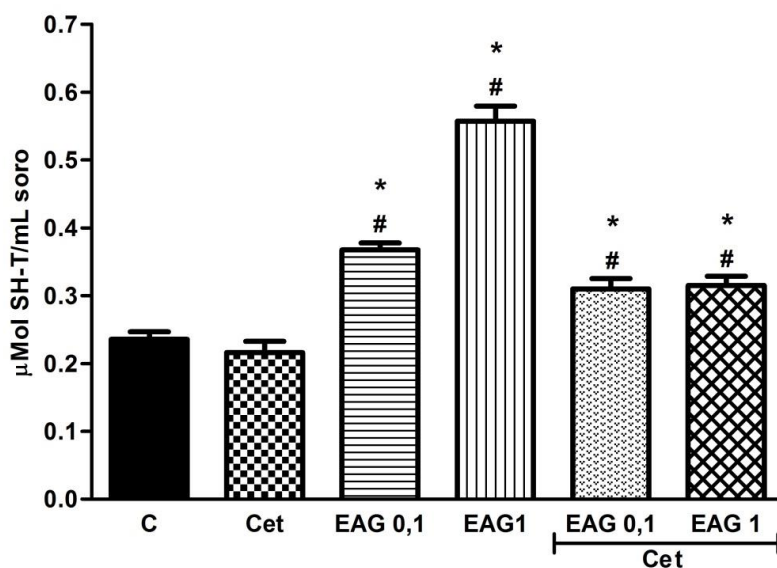


Nota: Atividade da enzima catalase em ratos Wistar que receberam C (salina); Cet (cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 0,1 (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia); EAG 1 (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia); EAG 0,1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia), durante 7 dias por via oral. * Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle. # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo cetoprofeno.

O cetoprofeno provocou diminuição significativa na atividade da CAT, demonstrando o comprometimento desta defesa antioxidante quando este fármaco é utilizado, e considerando que este fármaco possui em sua estrutura anéis do tipo benzeno, aponta-se a possibilidade de inibição desta enzima pelo cetoprofeno. Porém, o tratamento combinado de cetoprofeno e extrato aquoso de guaraná demonstrou resultados promissores no reestabelecimento desta defesa antioxidante, uma vez que seus valores foram elevados até os níveis do grupo controle. Importante salientar que estes resultados foram independentes da dose do extrato utilizado, sugerindo que na menor concentração do extrato associado ao cetoprofeno a atividade da CAT é normalizada. A utilização isolada do extrato aquoso de guaraná não demonstrou potencial influência sobre a atividade desta enzima, demonstrando que o antioxidante endógeno (CAT) pode manter seus níveis na presença de um antioxidante exógeno. Isso se dá porque a reação catalisada pela CAT predomina quando a concentração de H_2O_2 é superior a $10^{-4}M$, e na presença de antioxidantes que podem reagir com o H_2O_2 e reduzir a disponibilidade do substrato, a atividade da enzima não se altera (KODYDKOVÁ et al., 2014).

Para a complementação destes resultados avaliou-se o efeito de cada tratamento nos níveis de SH-T, que é a soma SH-NP e grupamentos sulfidrílicos proteicos (SH-P) (SEDLAK; LINDSAY, 1968), conforme demonstra a Figura 37.

Figura 37 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre os níveis de SH-T



Nota: Determinação dos grupamentos SH-T em ratas Wistar que receberam C (salina); Cet (cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 0,1 (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia); EAG 1 (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia); EAG 0,1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia), durante 7 dias por via oral. * Indica diferença estatística ($p<0,0001$) em relação ao grupo controle. # Indica diferença estatística ($p<0,0001$) em relação ao grupo cetoprofeno.

O cetoprofeno não provocou alterações significativas sobre este parâmetro antioxidante, porém o extrato aquoso de guaraná isolado ou associado ao cetoprofeno aumentou significativamente os valores de SH-T, demonstrando contribuição na melhoria da capacidade antioxidante *in vivo*. Este resultado confirma a efetividade antioxidante deste extrato que já havia sido observada *in vitro*. Estes resultados estão de acordo com Day e Lal (2012), que demonstraram o aumento de defesas antioxidantes endógenas provocado por substâncias como a vitamina C e E antioxidantes já estabelecidos.

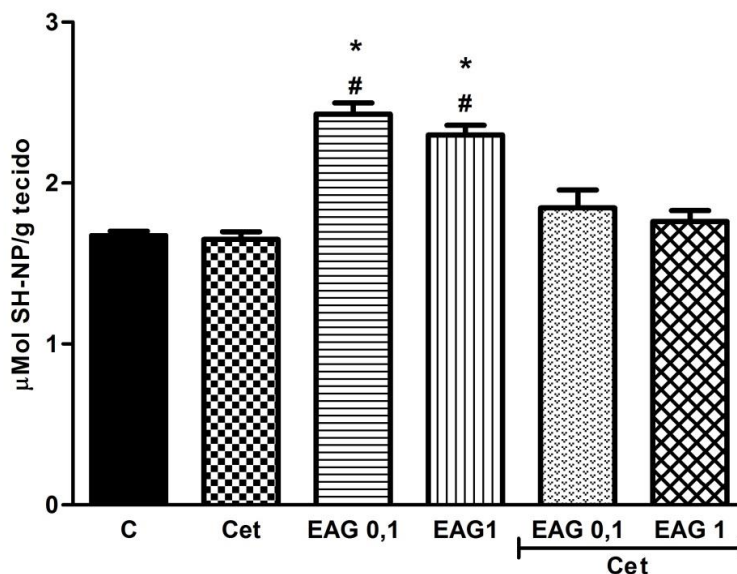
Os grupamentos SH-T estão presentes em diversos compartimentos do organismo e desempenham papel importante na manutenção do potencial redox de células, tecidos e plasma. Embora ocorra aumento nos níveis de SH-T com a utilização de compostos antioxidantes exógenos, o mecanismo responsável por esse efeito ainda é investigado (SIES, 1999). Uma hipótese está baseada no fato de que continuamente grupamentos SH-T são oxidados em reações fisiológicas e o antioxidante exógeno. Como possui alta capacidade de doar hidrogênio, poderia ocorrer a redução dos grupamentos SH-T novamente, elevando assim os níveis deste antioxidante endógeno.

Em conjunto estes resultados demonstram que de forma sistêmica o cetoprofeno possui significativa atividade na depleção de defesas antioxidantes endógenas e que a associação com o extrato aquoso de guaraná é uma alternativa promissora para o reestabelecimento das mesmas. Ainda, parece haver seletividade quanto à especificidade do parâmetro antioxidante alterado, o que suporta a necessidade de investigações sobre os demais índices que compõe a defesa antioxidante endógena.

Após a análise sistêmica dos parâmetros antioxidantes avaliou-se o efeito de cada tratamento na defesa antioxidante do rim e do fígado, órgãos que também foram alvo das avaliações bioquímicas. No fígado os níveis de SH-NP não foram alterados pelo tratamento com cetoprofeno, estes resultados estão de acordo com Micheli et al. (1992), que demonstram que o tratamento com cetoprofeno não provoca depleção dos níveis hepáticos de GSH.

A associação entre o cetoprofeno e o extrato aquoso de guaraná também não provocou nenhuma diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 38).

Figura 38 - Determinação dos níveis de SH-NP no fígado

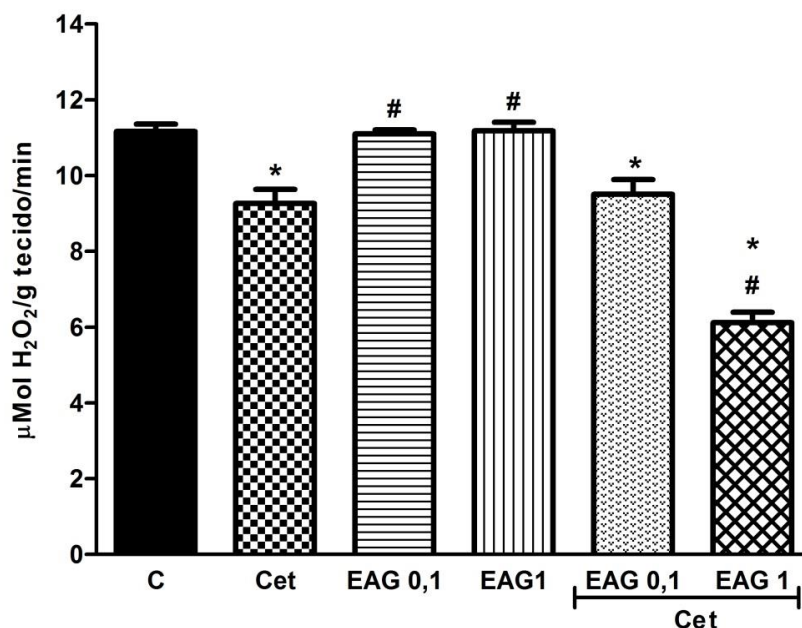


Nota: Determinação dos grupamentos SH-NP em ratos Wistar que receberam C (salina); Cet (cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 0,1 (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia); EAG 1 (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia); EAG 0,1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia), durante 7 dias por via oral. * Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle. # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo cetoprofeno.

Apenas nos grupos que receberam extrato aquoso de guaraná observou-se o aumento dos níveis de SH-NP, o que pode estar relacionado com a capacidade redutora do extrato diante de grupamentos SH-NP oxidados, regenerando este antioxidante endógeno. Estes resultados também foram encontrados por Benvegnú et al. (2010), em que a administração do extrato aquoso de nós pecan, composto por alta concentração de ácido gálico, um potente antioxidante, provocou aumento significativo nos níveis de GSH em animais tratados com este extrato durante 30 dias. JACQUES-SILVA et al. (2001), também demonstraram que o tratamento de animais com vitamina C provocou aumento significativo nos níveis de SH-NP.

Quando se observa os resultados da atividade da CAT no fígado, percebe-se que alterações significativas foram provocadas pelos diferentes tratamentos, conforme demonstra a Figura 39.

Figura 39 - Determinação da atividade da CAT no fígado



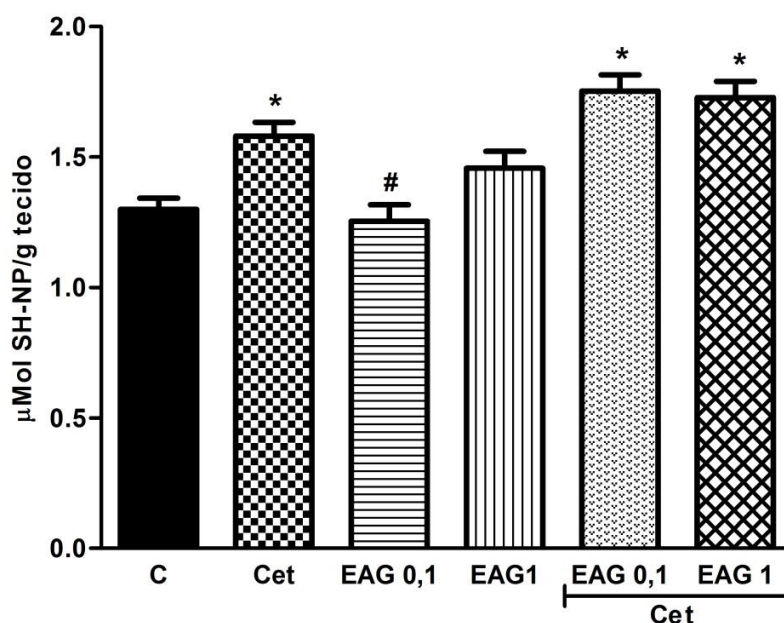
Nota: Determinação da atividade da CAT em ratas Wistar que receberam C (salina); Cet (cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 0,1 (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia); EAG 1 (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia); EAG 0,1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia), durante 7 dias por via oral. * Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle. # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo cetoprofeno.

O tratamento com cetoprofeno provocou a diminuição da enzima CAT resultado que também foi obtido quando se associou este fármaco com o extrato aquoso do guaraná. Estes resultados indicam que a associação entre o cetoprofeno e o extrato aquoso de guaraná não é benéfica para o reestabelecimento desta defesa antioxidante no fígado, uma vez que na maior dose do extrato observa-se uma diminuição ainda maior da atividade da CAT.

O fígado é o órgão responsável pela biotransformação de muitos xenobióticos, como é o cetoprofeno, que sofre hidroxilação seguida de conjugação ao glicuronil, assim como os diferentes compostos do extrato aquoso do guaraná, por exemplo, a cafeína (RENÇBER; KARAVANA; ÖZYAZICI, 2009; SINCLAIR; GEIGER, 2000). A interação entre este fármaco e o extrato aquoso de guaraná e seus respectivos metabólicos ainda permanece desconhecida e estas reações podem comprometer as defesas antioxidantes, visto a possibilidade de formação de compostos ainda mais reativos durante o processo de biotransformação que poderiam depletar estas defesas do fígado ou ainda, provocar a inibição da enzima estudada.

No rim o cetoprofeno não provocou efeitos deletérios nos níveis de SH-NP, conforme se observa na Figura 40.

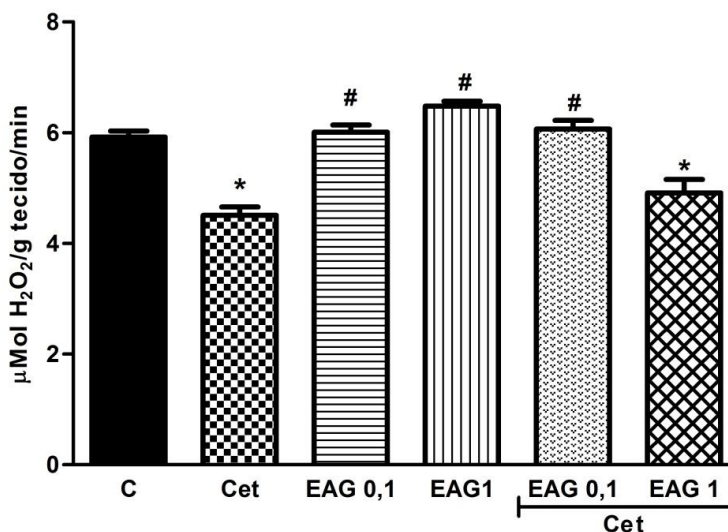
Figura 40 - Determinação dos níveis de SH-NP no rim



Nota: Determinação dos grupamentos SH-NP em ratas Wistar que receberam C (salina); Cet (cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 0,1 (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia); EAG 1 (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia); EAG 0,1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia), durante 7 dias por via oral. * Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle. # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo cetoprofeno.

Em nenhum dos tratamentos foi observada a diminuição dos níveis de SH-NP em relação ao grupo controle e a associação entre o cetoprofeno e o extrato aquoso de guaraná parece ser benéfica quando se trata da manutenção dos níveis desta defesa antioxidante provocada pelo cetoprofeno e na melhoria deste parâmetro quando comparada aos níveis do grupo controle. Na pesquisa conduzida por Benvegnú et al. (2010), a associação do extrato aquoso de nós pecan à ciclofosdamida também demonstrou resultados satisfatórios quando se trata do aumento dos níveis de GSH.

A atividade da CAT nos rins foi alterada de maneira significativa e diferente entre os tratamentos utilizados. Estes resultados podem ser observados na Figura 41.

Figura 41 - Determinação da atividade da CAT no rim

Nota: Determinação da atividade da CAT em ratos Wistar que receberam C (salina); Cet (cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 0,1 (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia); EAG 1 (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia); EAG 0,1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 0,1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia); EAG 1+ Cet (extrato aquoso de guaraná 1mg/g/dia+ cetoprofeno 20mg/kg/dia), durante 7 dias por via oral. * Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle. # Indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo cetoprofeno.

Sobre este parâmetro antioxidante o cetoprofeno provocou significativa diminuição quando comparado com a atividade da CAT do grupo controle. Entretanto, a menor dose do extrato aquoso de guaraná quando associado ao cetoprofeno impediu o dano, pois se observa que a atividade da CAT foi mantida igual àquela do grupo controle. Em contrapartida este resultado não foi observado quando se utilizou a maior dose do extrato na associação o que indica um efeito dependente da dose e pode estar relacionado com a atividade inibitória dessas substâncias sobre a enzima, quando associadas nestas concentrações e sob estas condições. Este resultado está de acordo com Benvegnú et al. (2010), onde o extrato aquoso de nós pecan não foi capaz de prevenir os danos causados pela ciclofosfamida, um fármaco nefrotóxico, sobre a atividade da CAT.

Os resultados sugerem uma possível ação seletiva do cetoprofeno, associado ou não a um antioxidante natural, sobre os parâmetros antioxidantes avaliados. E, possivelmente esteja relacionado com as alterações nas funções renais observadas anteriormente.

Em conjunto os dados relacionados com o perfil antioxidante dos animais tratados, demonstram que o extrato aquoso de guaraná possui ação favorável ao reestabelecimento das defesas antioxidantes endógenas, enquanto que o cetoprofeno provoca a diminuição destas, principalmente na defesa enzimática avaliada neste estudo. Apesar disso é importante a

avaliação de diferentes indicadores da defesa antioxidante enzimática ou não para a elucidação do mecanismo de ação que está envolvido com os resultados aqui apresentados.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a importância de avaliações que envolvam diferentes sistemas oxidativos (com ou sem radical), visto a variação do comportamento do cetoprofeno e do extrato aquoso de guaraná em cada modelo utilizado. Pode se observar que o cetoprofeno apresenta alguma ação antioxidante sobre o radical $ABTS^{•+}$ e sobre o $HOCl$, pouca ação sobre o DPPH e na inibição da HRP, entretanto apresentou significativa atividade sobre o $O_2^{•-}$. Já o extrato aquoso de guaraná demonstrou eficiente atividade sobre todos os modelos oxidativos estudados, o que possivelmente está relacionado com a sua composição: grande quantidade e variedade de moléculas antioxidantes, como catequinas, teobromina, taninos, apontados neste estudo.

O cetoprofeno não provocou a exacerbação das espécies reativas, e observou-se que quando este foi associado ao extrato aquoso de guaraná a ação antioxidante do cetoprofeno sobre a maioria das espécies testadas foi melhorada. Tendo em vista a ampla participação das espécies reativas estudadas em processos patológicos, como a inflamação, esta associação pode ser uma alternativa na diminuição dos possíveis efeitos adversos provocados pelo cetoprofeno, visto que há possibilidade de se alcançar um produto efetivo farmacologicamente, com redução de possíveis efeitos colaterais associados à produção de radicais livres e outros oxidantes, caso seja constatada a manutenção e/ou potencialização da atividade antioxidante do extrato na presença do cetoprofeno e que a atividade anti-inflamatória do fármaco seja mantida na associação.

Além disso, sugere-se que as substâncias testadas podem apresentar potencial toxicidade sobre a membrana de eritrócitos, o que é dependente do tempo, da concentração da substância analisada e da presença ou ausência de um radical no meio reacional. A associação entre o cetoprofeno e o extrato aquoso de guaraná exerce relativa proteção, que é dependente do tempo e da concentração de cetoprofeno utilizada, contra os danos hemolíticos provocados por radicais.

Desta forma, a associação entre o extrato aquoso de guaraná e o cetoprofeno demonstrou ser eficaz sobre diferentes ERO e com baixo potencial tóxico nos sistemas *in vitro* e *ex vivo*; apesar disso, as avaliações *in vivo* forneceram informações importantes acerca da variabilidade de cada sistema que compõe o organismo.

Nos ensaios *in vivo* o cetoprofeno não provocou alterações na função hepática, porém alterou significativamente a homeostasia da série vermelha do sangue e marcadores das funções renais. O extrato aquoso de guaraná foi capaz de reverter ou impedir apenas os

danos renais. Em relação ao perfil antioxidante dos animais, o tratamento com cetoprofeno apresentou potencial ação de depleção dos sistemas de defesa que foram reestabelecidos pelo tratamento com o extrato aquoso de guaraná. É importante salientar que esta ação foi dependente do sistema antioxidante analisado.

Este conjunto de informações sugere que a associação entre o cetoprofeno e o extrato aquoso de guaraná pode ser promissora sobre condições oxidativas presentes na inflamação e durante o processo de resolução desta, além de impedir possíveis efeitos indesejados que estejam direta ou indiretamente relacionados ao estresse oxidativo. Vale ressaltar a importância da realização de estudos que envolvam a farmacodinâmica e farmacocinética das substâncias utilizadas nesta pesquisa para que a segurança e eficácia, tanto do fármaco como do produto natural, sejam garantidas. Além disso, a avaliação de diferentes doses e intervalo de administração das mesmas, formas de administração, tempo de tratamento e utilização de modelos *in vivo* de inflamação são variações importantes para futuras avaliações, permitindo desta forma a obtenção de resultados que possam agregar informações e até contribuir no esclarecimento de dúvidas pertinentes a este trabalho.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p. 121-126, 1984.

AFSANA, K. et al. Reducing effect of ingesting tannic acid on the absorption of iron, but not of zinc, copper and manganese by rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 3, p. 584-592, 2004.

ALVES, A. B.; BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 237-243, 2002.

ANDREWS, K. W. et al. The caffeine contents of dietary supplements commonly purchased in the US: analysis of 53 products with caffeine-containing ingredients. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 1, p. 231-239, 2007.

APIWATTANAKUL, N. et al. Transport properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by organic anion transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. **Molecular Pharmacology**, v.55, n. 5, p.847-854, 1999.

ARUOMA, O. I. et al. Functional benefits of citrus fruits in the management of diabetes. **Preventive Medicine**, v.54, p. S12-S16, 2012.

ASENSIO, C. et al. Irreversible inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase by the coenzyme A conjugate of ketoprofen: A key to oxidative stress induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs? **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 405-416, 2007.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, v.109, p. 33-44, 2000.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**, v.16, n.1, p.42-47, 2004.

BANERJEE, A. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin. Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, p. 134-139, 2008.

BARBOSA, C. M. et al. Evaluations hematological and biochemical by the use of sodium diclofenac, meloxicam and firocoxib in rats. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 2, p. 118-126, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASILE, A. et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 31, p. 32-36, 2005.

BATLOUNI, M. Anti-Inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cérebro-Vasculares e Renais. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 556-563, 2010.

BELLINARDO, F.; MARTELLI, A.; VALLE, M.G.. HPLC determination of caffeine and theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (guaraná) and *Cola* spp. samples. **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 180, n. 5, p. 398-401, 1985.

BECKER, E. L. Chemotactic factors of inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 4, n. 5, p. 223-225, 1983.

BENVEGNÚ, D. M. et al. Protective effects of a by-product of the pecan nut industry (*carya illinoensis*) on the toxicity induced by cyclophosphamide in rats *carya Illinoensis* protects against cyclophosphamide-induced toxicity. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology**, v. 29, n. 3, p. 185-197, 2010.

BERTOLAMI, M. C. Mecanismos de hepatotoxicidade. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.85, p. 25-27, 2005.

BHATT, S.; LOKHANDWALA, M. F.; BANDAY, A. A. Vascular oxidative stress upregulates angiotensin II type I receptors via Mechanisms involving nuclear factor kappa B. **Clinical and Experimental Hypertension**, v.36, n.6, p. 367-373, 2014.

BITTENCOURT, L. S. et al. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 119-125, 2013.

BOLIGNANO, D. et al. Caffeine and the kidney: what evidence right now? **Journal of Renal Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 225-234, 2007.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola - LSPA.In: Estatística, I.B.d.G.e.(Ed.), p.82, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmResultado.asp#>. Acesso em 06 de julho de 2015.

BRESTEL, E. P. Co-oxidation of luminol and hydrogen peroxide. Implications for neutrophil chemiluminescence. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 126, p. 482-488, 1985.

BRUNE, M.; HALLBERG, L.; SKANBERG, A. Determination of iron-binding phenolic groups in foods. **Journal of Food Science**. v. 56, n.1, p.128-132, 1991.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287-299, 2011.

BUTTGEREIT, F.; BURMESTER, G. R.; SIMON, L. S. Gastrointestinal toxic side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2-specific inhibitors. **The American Journal of Medicine**, v. 110, p. 13S-19S, 2001.

BYDLOWSKI, S. P.; D'AMICO, E. A.; CHAMONE, D. A. An aqueous extract of guaraná (Paullinia cupana) decreases platelet thromboxane synthesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 4, p. 421-424, 1991.

CABRÉ, F. et al. Analgesic, antiinflammatory and antipyretic effects of S(+)-ketoprofen in vivo. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 38, p.3S-10S, 1998.

CAMPOS, A. R. et al. Acute effects of guarana (Paullinia cupana Mart.) on mouse behaviour in forced swimming and open field tests. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 5, p. 441-443, 2005.

CAPEILLÈRE-BLANDIN, C. Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a twoelectron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. **Biochemical Journal**, v. 336, p. 395-404, 1998.

CARNEVALE, R.; et al. LDL oxidation by platelets propagates platelet activation via an oxidative stress-mediated mechanism. **Atherosclerosis**, v. 237, n. 1, p. 108-116, 2014.

CARVALHO, W. A.; LEMONICA L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 48, n. 2, p. 137-158, 1998.

CASCÃO, R.; ROSARIO, H. S.; FONSECA, J. E. Neutrophils: warriors and commanders in immune mediated inflammatory diseases. **Acta Reumatologica Portuguesa**, v. 34, n.2B, p. 313-326, 2009.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v.30, n. 2, p.441-449, 2007.

CHENG, Y. T. et al. Catechin protects against ketoprofen-induced oxidative damage of the gastric mucosa by up-regulating Nrf2 in vitro and in vivo. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 2, p. 475-483, 2013.

COSTA, M. et al. Hypochlorous acid inhibition by acetoacetate: implications on neutrophil

functions. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p.1183-1187, 2004.

COSTA, D. et al. Antioxidant activity and inhibition of human neutrophil oxidative burst mediated by arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 8, p. 1659-1670, 2006.

DAY, R.; LAL, S. S. Supplementation Effects of Vitamin C and Vitamin E vitaminon Oxidative Stress in Post Menopausal Diabetic Women. **The Journal of Applied Research**, v. 12, n. 2, p. 108-111, 2012.

DEVARAJ, S. et al. C-reactive protein stimulates superoxide anion release and tissue factor activity *in vivo*. **Atherosclerosis**, v. 203, n. 1, p. 67-74, 2009.

DOMÍGUEZ-LUIS, M. et al. Superoxide anion mediates the L-selectin down-regulation induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs in human neutrophils. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 2, p. 246-256, 2013.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, n. 2, p. 125-131, 1995.

DURACKOVA, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiological Research**, v.59, n. 4, p. 459-469, 2010.

ELLMAN, G. L. 'Tissue sulphydryl groups'. **Archives of Biochemistry adn Biophysics**, v. 589, p. 70-77, 1959.

ESPINOLA, E. B. et al. Pharmacological activity of Guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55 (1997) p. 223–229, 1997.

FANTINI, M. et al. *In vitro* and *in vivo* antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 5, p. 9236-9282, 2015.

FEDERICO, A. et al. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 11, p. 2381-2386, 2007.

FERNANDES, E. et al. The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 9, p. 1008-1017, 2003.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, T. R. et al. Analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios não esteroides em prescrições pediátricas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 12, p. 3695-3704, 2013.

FLORA, S. J. S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 4, p. 191-206, 2009.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 73, p. 424-427, 1927.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, v. 66, n. 8, p. 663-673, 2000.

FUKUMASU, H. et al. Chemopreventive effects of Paullinia cupana Mart var. sorbilis, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 233, p. 158-16, 2006.

GAWEL, M.; LIBROWSKI, T.; LIPKOWSKA, A. Influence of zinc hydroaspartate on the anti-inflammatory and gastric activity of ketoprofen in rats. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 1, p. 214-219, 2013.

GLORIEUX, C. et al. Regulation of catalase expression. In healthy and cancerous cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v.87, p. 84-97, 2015.

GOETZ, M. E.; LUCH, A. Reactive species: A cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. **Cancer Letters**, v. 266, n. 1, p. 73-83, 2008.

GOLDSTEIN, J. L. et al. Haemoglobin decreases in NSAID users over time: an analysis of two large outcome trials. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, n. 7, p. 808-816, 2011.

HAHN, S. R. **Avaliação farmacoepidemiológica de anti-inflamatório não-esteróides (AINE) em hospital geral do interior do RS**. Dissertação, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p.1-85, 1990.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **The American Journal of Medicine**, v.30, n. 3C, p. 14S-22S, 1991.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L.H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Letters**, v. 486, n. 1, p. 10-13, 2000.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

HU, Q. H. et al. Quercetin regulates organic ion transporter and uromodulin expression and improves renal function in hyperuricemic mice. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 5, p. 593-606, 2012.

INSTITUTO AMAZÔNIA. Disponível em: <www.institutoamazonia.org.br>. Acesso em: 10 de janeiro de 2016.

JACQUES-SILVA, M. C. et al. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacology and Toxicology**, v. 88, n.3, p.119-125, 2001.

JAMALI, F.; BROCKS, D. R. Clinical pharmacokinetics of ketoprofen and its enantiomers. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 19, n. 3, p. 197-217, 1990.

JIALAL, I.; KAUR, H.; DEVARAJ, S. Human C-reactive protein accentuates macrophage activity in biobreeding diabetic rats. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 27, n. 1, p. 23-28, 2013.

JIMOH, F. O.; SOFIDIYA, M. O.; AFOLAYAN, A. J. Antioxidant properties of the methanol extracts from the leaves of *Paullinia pinnata*. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, n. 4, p. 707-711, 2007.

JIPPO, T. et al. Inhibitory effects of guarana seed extract on passive cutaneous anaphylaxis and mast cell degranulation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, p. 2110-2112, 2009.

JOHNSON, S. T. Drug-induced immune hemolytic anemia. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 40, p. 205-207, 2009.

KANTOR, T. G. Ketoprofen: a review of its pharmacologic and clinical properties. **Pharmacotherapy**, v. 6, p. 93-103, 1986.

KAY-MUGFORD, P.; BENN, S. H.; LAMARRE, J. In vitro effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 7, p. 802-810, 2000.

KEHRER, J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, n. 1, p. 43-50, 2000.

KHALIL, N. M. **Interação nicotina-peroxidases (Mieloperoxidase e *Horseradish*): implicações no Burst oxidativo de leucócitos polimorfonucleares**. 2002, 99f. Dissertação

de Mestrado em Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

KHAMDANG, S. et al. Interactions of human organic anion transporters and human organic cation transporters with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 2, p. 534-539, 2002.

KHOSHNEGAH, J.; KAMRANI, A.; MOHRI, M. A comparative study of the long-term effects of piroxicam and ketoprofen on the gastric mucosa, kidney, liver, and hematopoietic system of dogs. **Comparative Clinical Pathology**, v. 20, n. 1, p. 65-68, 2011.

KLADNA, A. et al. Scavenging of Reactive Oxygen Species by Some Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Fenofibrate. **Biopolymers**, v. 82, n. 2, p. 99-105, 2006.

KODYDKOVÁ, J. et al. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. **Folia Biologica**, v. 60, p. 153-167, 2014.

KONCIC, M. Z. et al. Antioxidant activity of NSAID hydroxamic acids. **Acta Pharmaceutica**, v. 59, n. 2, p. 235-242, 2009.

KREWER, C. C. et al. Habitual intake of guaraná and metabolic morbidities: an epidemiological study of an elderly Amazonian population. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 9, p. 1367-1374, 2011.

KRYCH, J.; GEBICKI, J. L.; GEBICKA, L. Flavonoid-induced conversion of catalase to its inactive form - Compound II. **Free Radical Research**, v. 48, n. 11, p. 1334-1341, 2014.

KUKULL, W. A. An apple a day to prevent Parkinson disease: Reduction of risk by flavonoids. **Neurology**, v.78, n. 15, p.1112-1113, 2012.

LAPENNA, D.; CUCCUROLLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: An update picture. **General Pharmacology**, v.27, n. 7, p. 1145-1147, 1996.

LASTRA, C. A. DE LA. et al. Gastric toxicity of racemic ketoprofen and its enantiomers in rat: oxygen radical generation and COX-expression. **Inflammation Research**, v. 51, n. 2, p. 51-57, 2002.

LEE, B. S. et al. Ketoprofen: experimental overview of dermal toxicity. **Archives of Toxicology**, v. 81, p. 723-748, 2007.

LEE, Y.; RODRIGUEZ, C.; DIONNE, R. A. The role of COX-2 in acute pain and the use of selective COX-2 inhibitors for acute pain relief. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 14, p. 1737-1755, 2005.

LEVOIN, N. et al. Elucidation of the mechanism of inhibition of cyclooxygenases by acyl-coenzyme A and acylglucuronic conjugates of ketoprofen. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 10, p. 1957-1969, 2004.

LIN, W.W.; KARIN M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1175-1183, 2007.

LIPKOWITZ, M. S. Regulation of uric acid excretion by the kidney. **Current Rheumatology Reports**, v. 14, n. 2, p. 179-188, 2012.

LOVALLO, W.R. et al. Blood pressure response to caffeine shows incomplete tolerance after short-term regular consumption. **Hypertension**, v. 43, n. 4, p. 760-765, 2004.

LOZANO, R. P. et al. Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. **Adicciones**, v. 19, n. 3, p. 225-238, 2007.

MANENTE, F.A. et al. Efeito da complexação de metais aos anti-inflamatórios na ação contra agentes oxidativos e radicais livres: ação do cetoprofeno. **Eclética Química**, v. 36, n. 2, p. 107-127, 2011.

MARKIEWICZ, M.; PASENKIEWICZ-GIERULA, M. Comparative model studies of gastric toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Langmuir**, v. 27, n.11, p. 6950-6951, 2011.

MARLICZ, W. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, proton pump inhibitors, and gastrointestinal injury: contrasting interactions in the stomach and small intestine. **Mayo Clinical Proceedings**, v. 89, n. 12, p. 1699-1709, 2014.

MATTEI, R. et al. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 2, p. 111-116, 1998.

MEDEIROS, N. C.; DITTRICH, R. L. Número de policromatófilos na diferenciação das anemias não regenerativas de regenerativas em cães. **Semina**, v. 35, n. 5, p. 2501-2506, 2014.

MENDES, R. T. et al. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 5, p. 767-782, 2012.

MEOTI, F.C. **Análise dos mecanismos de ação antinociceptiva e antiinflamatória do flavonóide miricitrina: estudos *in vivo* e *in vitro***. 2006, 137f. Tese (Doutorado em Bioquímica toxicológica), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

MICHELI, L. et al. Modulation of glutathione levels by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Pharmacological Research**, v.25, p. 45-46, 1992.

MORRISON, M. et al. Determination of Lignin and Tannin contents of cowpea seeds coats. **Annals of Botany**, v.76, n. 3, p. 287-290, 1995.

MOTA, K. S. L. et al. Flavonoids with Gastroprotective Activity. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 979-1012, 2009.

MOTA, P. M. et al. Estudo sobre a utilização de anti-inflamatórios não esteroidais prescritos em receitas para idosos da região Noroeste Paulista. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 157-163, 2010.

MURRAY, M. D.; BRATER, D.C. Renal toxicity of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 32, p. 435-465, 1993.

NG, T. B; LIU, F; ZHAO, L. Antioxidative and free radical scavenging activities of pineal índoles. **Journal of Neural Transmission**, v. 107, n. 11, p. 1243-1251, 2000.

NIKI, E. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 100-108, 1990.

NISCHİYAMA, M. F. et al. Chá verde brasileiro (Camellia sinensis var assamica): efeito do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n. 1, p. 191-96, 2010.

O`BRIEN, P. J. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 129, n. 1-2, p. 113-139, 2000.

OHLSON, P. I.; PAUL, K. G. The molar absorptivity of horseradish peroxidase. **Acta chemica Scandinavica. Series B: Organic chemistry and biochemistry**, v. 31, p. 373-375, 1976.

OSSWALD, H.; SCHNERMANN, J. Methylxanthines and the Kidney. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 200, p. 391-412, 2011.

PANASENKO, O. M.; GORUDKO, I. V.; SOKOLOV, A. V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 13, p. 1466-1489, 2013.

PELLEGRINI, N. et al. Screening of dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts for Antioxidant Activities Applying 2,2'-Azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid Radical Cation Decolorization Assay. **Methods in Enzymology**, v.299, p. 379-389, 1999.

PELLETIER, M. et al. Activation of human neutrophils in vitro and dieldrin-induced neutrophilic inflammation in vivo. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 70, n. 3, p. 367-373,

2001.

PORTELLA, R. L. et al. Guaraná (Paullinia cupana Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. **Lipids in Health and Disease**, v.12, n 12, p. 1-9, 2013.

QUIDEAU, S. et al. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 3, p. 586-621, 2011.

QUINN, M. T.; GAUSS, K. A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 4, p. 760-781, 2004.

RADI, Z. A.; KHAN, N. K. Effects of cyclooxygenase inhibition on the gastrointestinal tract. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 58, n. 2-3, p. 163-173, 2006.

RENÇBER, S.; KARAVANA, S. Y.; ÖZYAZICI, M. Bioavailability File: Ketoprofen. **Pharmaceutical Sciences**, v. 34, p. 203-216, 2009.

RIEG T. et al. Requirement of intact adenosine A1 receptors for the diuretic and natriuretic action of the methylxanthines theophylline and caffeine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 313, n. 1, p. 403-409, 2005.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochemical Pharmacology**, v.37, n. 5, p. 837-841, 1988.

ROBERTS, L. J.; MORROW, J. D. In: GOODMAN&GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2005. cap. 27. p. 519-549.

ROCH-RAMEL, F.; GUISAN, B. Renal transport of urate in humans. **News in Physiological Sciences**, v. 14, p. 80-84, 1999.

SATO, Y. et al. Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: Hemolysis by water-soluble radical initiator. **Biochemistry**, v. 34, n. 28, p. 8940-8949, 1995.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

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

SCHETTER, A.J.; HEEGAARD, N. H.; HARRIS, C. C. Inflammation and cancer:

interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 37–49, 2010.

SCHIMPL, F. C. et al. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 14-31, 2013.

SCOTTI, L. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, 2007.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SERRA, D. et al. Resveratrol modulates cytokine-induced Jak/STAT activation more efficiently than 5-aminosalicylic acid: An in vitro approach. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1-11, 2014.

SHENG, J. J. et al. Solubilization and Dissolution of Insoluble Weak Acid, Ketoprofen: Effect of pH Combined Surfactant. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n.3-4, p. 306-314, 2006.

SIES, H. Oxidative Stress: From Clinical Application. **The American Journal of Medicine**, v. 91, p. 31S-38S, 1991.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9/10, p. 916-921, 1999.

SILVA, A. A. **Avaliação clínica de Ratos novernicus após terapia anti-inflamatória com inibidor seletivo ou não para COX 2 por extrapolação alométrica**. 2004, 104f. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

SILVA, F. H. C. et al. Prevalência e fatores associados ao uso de antiinflamatórios não-esteroides por clientes de farmácias comerciais de São Luís-MA. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 65ª Ed. 2013. Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livro/65ra/resumos/resumos/8905.htm>>. Acesso em 12 de junho de 2015.

SILVA, J.L.; BARBOSA, P. S. S.; SOUSA, H. W. O. Avaliação da dosagem de uréia pré e pós hemodiálise em pacientes em terapia renal substitutiva. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 2, p. 43-47, 2008.

SINCLAIR, C. J. D.; GEIGER, J. D. Caffeine use in sports. A pharmacological review. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 40, n. 1, p. 71-79, 2000.

SIWAK, J. et al. Protection of flavonoids against hypochlorite-induced protein modifications. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1227-1241, 2013.

SMITH, N.; ATROCH, A. L. Guarana's journey from regional tonic to aphrodisiac and global energy drink. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 279-282, 2007.

SOARES, J. R. et al. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. **Free Radical Research**, v. 26, p.469-478, 1997.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.

SOMCHIT, M. N. et al. Mefenamic acid induced nephrotoxicity: an animal model. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v.4, n. 4, p. 401-404, 2014.

SPITELLER, G. Are lipid peroxidation processes induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with diseases? **Medical Hypotheses**, v. 60, n. 1, p. 69-83, 2003.

SREEVIDYA, N.; MEHROTRA, S. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 1124-1127, 2003.

SWAIN, S. D.; ROHN, T. T.; QUINN, M. T. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 4, n. 1, p. 69-83, 2002.

TABEL, S.M. et al. Effect of vitamins A, E, C and omega-3 fatty acids supplementation on the level of catalase and superoxide dismutase activities in streptozotocin-induced diabetic rats. **Bratislava Medical Journal**, v. 116, n. 2, p.115-118, 2015.

TACHECÍ, I. et al. Nsaid-induced enteropathy in rheumatoid arthritis patients with chronic occult gastrointestinal bleeding: a prospective capsule endoscopy study. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

TANAKA, T. Flavonoids for allergic diseases: present evidence and future perspective. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 6, p. 879-885, 2014.

TERLECKY, S. R.; TERLECKY, L. J.; GIORDANO, C.R. Peroxisomes, oxidative stress, and inflammation. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 3, n. 5, p. 93-97, 2012.

THERIAULT, A. et al. Tocotrienol: a review of its therapeutic potential. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 5, p. 309-319, 1999.

TOMIC, Z. et al. Diclofenac and ketoprofen liver toxicity in rat. **European Journal of Drug Metabolism Pharmacokinetics**, v. 33, n. 4, p. 253-260, 2008.

VALLON, V.; HLBAUER, B.; OSSWALD, H. Adenosine and Kidney Function. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 3, p. 901-940, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VELLOSA, J. C. R. **Estudo bioquímico do efeito de alguns flavonóides de *Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae) em processos oxidativos: sistema modelo “químicos”, “enzimáticos” e “celulares”**. 2008, 116f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, Araraquara, 2008.

VELLOSA, J. C. R. et al. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 119-130, 2007a.

VELLOSA, J.C.R. et al. Profile of Maytenus aquifolium action over free radicals and reactive oxygen species. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p.447-453, 2007b.

VELLOSA, J. C. R. et al. Preliminary in vitro and ex vivo evaluation of afzelin, kaempferitrin and pterogynocide action over free radicals and reactive oxygen species. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 6, p. 1169-1177, 2015.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VILLEGAS, I. et al. Effects of meloxicam on oxygen radical generation in rat gastric mucosa. **Inflammation Research**, v. 49, n. 7, p. 361-366, 2000.

WANG, C. P. et al. Morin improves urate excretion and kidney function through regulation of renal organic ion transporters in hyperuricemic mice. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 3, p. 411-427, 2010.

WECKERLE, C. S.; STUTZ, M. A.; BAUMANN, T. W. Purine alkaloids in Paullinia. **Phytochemistry**, v. 64, n. 3, p. 735-742, 2003.

YAMAGUTI-SASAKI, E. et al. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of Paullinia cupana. **Molecules**, v. 12, p.1950-1963, 2007.

YAMAMURA, S. et al. Simultaneous activation of granulocytes and extrathymic T cells in number and function by excessive administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Cellular Immunology**, v. 173, p.303-311, 1996.

YILMAZ, Y. Novel uses of catechins in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.17, n. 2, p. 64-71, 2006.

ZGLICZYNSKI, T. J. M. et al. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 235, p. 419-424, 1971.

ZHAO, Y. et al. Ketoprofen glucuronidation and bile excretion in carbon tetrachloride and alpha-naphthylisothiocyanate induced hepatic injury rats. **Toxicology**. v. 230, p.145-150, 2007.

ZUURBIER, K. W. et al. Human Hemi-myeloperoxidase. Initial chlorinating activity at neutral pH, compound II and III formation, and stability towards hypochlorous acid and high temperature. **European Journal of Biochemistry**, v. 205, n. 2, p. 737-742, 1992.

ANEXOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Ação do cetoprofeno e produtos naturais sobre eritrócitos e hemólise provocada por radicais livres

Pesquisador: JOSÉ CARLOS REBUGLIO VELLOSA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 32509814.8.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 698.795

Data da Relatoria: 26/06/2014

Apresentação do Projeto:

O presente projeto refere-se a uma possibilidade de contribuição com os estudos sobre a inflamação que está relacionada com diversas patologias que acometem grande parte da população mundial e, para seu tratamento são utilizados medicamentos anti-inflamatórios, como por exemplo o cetoprofeno. A ampla aplicabilidade clínica deste fármaco tornou difusa sua utilização e com isso o surgimento de alguns efeitos adversos tornaram-se mais pronunciados. Muitos estudos indicam a participação do estresse oxidativo no desenvolvimento destes efeitos colaterais. Portanto a utilização de substâncias antioxidantes poderia ser uma alternativa viável para a diminuição destes efeitos indesejáveis com a manutenção do efeito farmacológico requerida. Substâncias naturais como a hesperidina, rutina, curcumina, quercetina, vitamina C e guaraná são bons exemplos de antioxidantes exógenos. Portanto neste estudo visa-se avaliar os efeitos destes compostos

naturais e do cetoprofeno, de forma isolada e associada, sobre os eritrócitos e processo de destruição de hemácias por radicais livres.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar as ações de diferentes produtos naturais (hesperidina, rutina, quercetina, curcumina e

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 bl M sala 12

Bairro: CEP: 84.030-900

UF: PR **Município:** PONTA GROSSA

Telefone: (42-)3220-3108

Fax: (42-)3220-3102

E-mail: seccoop@uepg.br

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG**

Continuação do Parecer: 698.795

vitamina C), o extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) e do xenobiótico (cetoprofeno), associados ou não, sobre a hemólise causada por radicais livres.

Definir se cada substância (natural ou xenobiótico) testada de forma isolada e também quando cada substância natural é associada ao xenobiótico apresenta ação hemolítica;

Definir se amostras (substâncias naturais e/ou xenobiótico) interferem na hemólise provocada por radicais livres (modelo AAPH)

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Bem definidos de acordo com a metodologia adotada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto proposto é bastante interessante pois o processo inflamatório está associado a diversas patologias e os indivíduos fazem uso de fármacos anti-inflamatórios em demasia, muitas vezes sem recomendação médica, isso ocorre com o cetoprofeno. Tais fármacos podem trazer aos indivíduos que os utiliza alguns problemas importantes e para que isso não ocorra, sabendo-se que antioxidantes poderiam evitar ou diminuir os efeitos indesejáveis relacionados ao uso de cetoprofeno, associá-lo ou não a um antioxidante poderia ajudar os indivíduos a terem melhor qualidade de vida. A metodologia proposta é relativamente simples e bastante corriqueira nos laboratórios de bioquímica, e, faz uso de hemácias coletadas de indivíduos hígidos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Toda documentação encaminhada é pertinente e está de acordo com as diretrizes.

Recomendações:

Não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sou favorável à aprovação deste projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 bl M sala 12

Bairro: CEP: 84.030-900

UF: PR Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42-)3220-3108 Fax: (42-)3220-3102 E-mail: seccoep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 698.795

PONTA GROSSA, 26 de Junho de 2014

Assinado por:
ULISSES COELHO
(Coordenador)

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 bl M sala 12
Bairro: CEP: 84.030-900
UF: PR **Município:** PONTA GROSSA
Telefone: (42-)3220-3108 **Fax:** (42-)3220-3102 **E-mail:** seccoep@uepg.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL****CARTA DE APROVAÇÃO****Processo CEUA – 039/2014**

Protocolo UEPG – 9086/2014

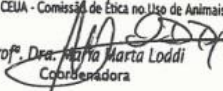
Título – Projeto de pesquisa perfil da ação do cetoprofeno e do Guaraná na toxicidade renal, hepática e sobre marcadores do metabolismo oxidativo**Data de Entrada** – 09/06/2014**Resultado:** Aprovado**Data/Prazo** – 09/06/2014 a 09/06/2016**Considerações**

Prezado Professor José Carlos Rebuglio Velloso e mestrande Caroline Belló:

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, do uso de 64 (sessenta e quatro) ratas. APROVADO.

Ponta Grossa, 6 de outubro de 2014.

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROESP - CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Prof.ª Dra. Maria Marta Loddi
CoordenadoraAv. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROESP
Fone: (042) 3220-3264



3905612739716199

AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010547/2013-4

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 161/2010, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA - UFSM

CNPJ: 955.917.640/0001-05

Representante Legal: IVANA BEATRICE MANICA DA CRUZ

Cargo/Função: Docente - Departamento de Morfologia - Centro de Ciências da Saúde - UFSM

CPF: 331.322.400-87 **RG:** 8017462709

Projeto: ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO DOS EFEITOS BIOATIVOS PRESENTES EM FRUTOS AMAZÔNICOS

Coordenador do Projeto: Ivana Beatrice Mânica Da Cruz

CPF: 331.322.400-87 **RG:** 8017462709 - ssp / RS

Finalidade do projeto: Este projeto irá realizar estudos in vitro e in vivo para avaliar a atividade biológica (antioxidante, antimicrobiana, anticolinesterásica, hipolipimiente, hipotensiva, antiobesogênica, hipoglicêmica, anticarcinogênica, no metabolismo e comportamentos circadianos) de frutos nativos da região amazônica.

Amostras a serem acessadas:

Espécie(s): frutos das seguintes famílias botânicas serão investigados: Arecaceae, Sapindaceae, Lecythidaceae, Myrtaceae, Clusiaceae, Solanaceae, Malvaceae e Fabaceae.

Tipo de material/quantidade de amostras: Serão coletados frutos, em um total máximo de 50 kg

Local de depósito de subamostra: NÃO INFORMADO

Equipe do projeto: IVANA BEATRICE MANICA DA CRUZ / CPF 331.322.400-87

EULER ESTEVES RIBEIRO / CPF 000.678.812-20

MARIA FERNANDA MANICA RIZZI CATTANI / CPF 983.518.260-49

MARIA IZABEL DE UGALDE MARQUES DA ROCHA / CPF 243.430.990-91

CRISTINA DA COSTA KREWER / CPF 805.802.890-87

MARTA MARIA MEDEIROS FRESCURA DUARTE / CPF 428.275.150-91

MICHEL MANSUR MACHADO / CPF 936.104.590-34

MICHELE RORATO SAGRILLO / CPF 926.721.830-15

OLMIRO CEZIMBRA DE SOUZA FILHO / CPF 322.916.710-49

ALENCAR KOLINSKI MACHADO / CPF 007.046.370-06

ARAE RIGAO DE OLIVEIRA / CPF 023.215.180-65

CINTIA CORTE REAL RODRIGUES / CPF 014.581.210-38

CLARICE PINHEIRO MOSTARDEIRO / CPF 457.318.370-15

ELIZA RIBAS DA SILVEIRA FLORES / CPF 023.464.970-45

FERNANDA BARBISAN / CPF 022.159.910-03

FRANCINE CARLA CADONA / CPF 005.561.340-36

GREICE FRANCIELE FEYH DOS SANTOS MONTAGNER / CPF 005.505.050-67

IVO EMILIO DA CRUZ JUNG / CPF 989.567.010-91

LUIZ FILIPE MACHADO GARCIA / CPF 003.418.820-70

RAUL MOREIRA OLIVEIRA / CPF 022.226.840-99

Validade da Autorização: 06/08/2013 a 06/08/2017

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio da Plataforma Carlos Chagas, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010547/2013-4. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRM). Para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, mormente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 18 de Julho de 2013

Paulo Sergio Lacerda Beirão
Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 3905612739716199 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.