

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE – UNICENTRO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ROBSON SCHIMANDEIRO NOVAK

EFEITO BIOLÓGICO E COMPORTAMENTAL DA ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO
ASCÓRBICO, CETOPROFENO E SELÊNIO

PONTA GROSSA
2024

ROBSON SCHIMANDEIRO NOVAK

EFEITO BIOLÓGICO E COMPORTAMENTAL DA ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO
ASCÓRBICO, CETOPROFENO E SELÊNIO

Tese de doutorado apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da
Universidade Estadual de Ponta Grossa em
parceria com a Universidade Estadual do Centro-
Oeste.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Rebuglio
Velloso

PONTA GROSSA
2024

Novak, Robson Schimandei

N935 Efeito biológico e comportamental da associação de ácido ascórbico, cetoprofeno e selênio / Robson Schimandei Novak. Ponta Grossa, 2024.

81 f.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso.

1. Selênio. 2. Ácido ascórbico. 3. Antioxidantes. 4. Ação antimicrobiana. 5. Ação antifúngica. I. Velloso, José Carlos Rebuglio. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. III.T.

CDD: 615

ROBSON SCHIMANDEIRO NOVAK

**EFEITO BIOLÓGICO E COMPORTAMENTAL DA ASSOCIAÇÃO DE
ÁCIDO ASCÓRBICO, CETOPROFENO E SELÊNIO**

Tese apresentada para obtenção do grau de
Doutor no Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, nível Doutorado,
Associação Ampla entre a Universidade Estadual
de Ponta Grossa (UEPG) e a Universidade do
Centro-Oeste (UNICENTRO).

Ponta Grossa, 18 de abril de 2024.



Profa. Dra. JULIANA BONAMETTI OLIVATO – UEPG – Presidente

Documento assinado digitalmente

gov.br

JULIO CESAR MINE

Data: 08/08/2025 16:49:31-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. JULIO CESAR MINE – UEPG – Membro titular interno

Documento assinado digitalmente

gov.br

MARCELO MACHADO FERRO

Data: 08/08/2025 17:16:23-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. MARCELO MACHADO FERRO – UEPG – Membro titular interno

DEBORA RAFAELLI DE CARVALHO
AVILA04948679979

Assinado de forma digital por DEBORA RAFAELLI DE CARVALHO
AVILA04948679979
Data: 2025.08.08 09:04:01 -0300

**Profa. Dra. DEBORA RAFAELLI DE CARVALHO AVILA – Faculdade Inspirar –
Membro titular externo**

Documento assinado digitalmente

gov.br

NAJEH MAISSAR KHALIL

Data: 07/08/2025 14:51:22-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. NAJEH MAISSAR KHALIL – UNICENTRO – Membro titular externo

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF
Bloco M Sala 93 B – Campus Universitário – Fone (42) 2102-8937
Av. Carlos Cavalcanti, 4748 – CEP: 84030-900 – PONTA GROSSA – PR – BRASIL

Dedico esta dissertação aos meus pais, Admar (*in memoriam*) e Sheila, a minha irmã Larissa, a minha avó Leony e a voz na minha cabeça que nunca se cala e nunca vai me deixar parar.

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, sempre me auxiliando em todos os momentos difíceis da vida, Amém.

Aos meus pais, Admar (*in memoriam*) e Sheila, amo vocês, por todo amor e apoio incondicional 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! Obrigado Mãe por tudo, indescritivelmente. Te amo!!!

À minha namorada Sabrina, pelo incentivo e paciência (embora pouca hahaha) 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.

Aos meus familiares, em especial minha irmã Larissa, mesmo estando longe, sempre recebia suas energias positivas e a minha avó Leony por sempre me acolher tão bem.

A dona Carmem, por todo apoio e paciência.

Ao meu orientador e professor, Dr. José Carlos Rebuglio Velloso. Agradecer à você que me proporcionou essa oportunidade de realizar mais esse sonho e dedicou muitas horas do seu precioso tempo para atender minhas dúvidas, e muitas vezes minhas incertezas. Agradecer pelos momentos de troca de conhecimento e experiências de vida, pelo seu exemplo de professor e pessoa, onde a humildade e simplicidade ocupam um grande lugar!

Ao Professor Dr. Najeh Maissar Khalil, pela oportunidade, pela sua disponibilidade e pela sua essencial contribuição para a construção deste trabalho através de toda recepção e ajuda na realização dos experimentos realizados no Campus CEDETEG em Guarapuava.

Ao Professor Dr. Marcelo Machado Ferro, pela ajuda em todos os quesitos relacionados à realização dos experimentos em animais, assim como sua dedicação em me mostrar que havia um caminho para aquilo que para mim, à primeira vista era inexplicável. Obrigado por todo conhecimento e momentos que passamos juntos, te admiro demais como pessoa e profissionalmente

A toda a equipe do Laboratório de Neurociências que esteve envolvida nesta pesquisa, em especial ao técnico químico Marcelo Paulo, que nos auxiliou nas cirurgias de dissecação animais.

À Daniele pela sua total dedicação e esforço que me proporcionou quando estive em Guarapuava realizando os experimentos, obrigado por todo conhecimento, experiências e momentos que vivemos juntos. Te admiro demais, você merece tudo de melhor.

Às alunas de farmácia em iniciação científica Andrieli e Isabel que me ajudaram e auxiliaram com o manuseio e realização dos testes animais.

À Lourdes por toda dedicação e ajuda na interpretação e escrita dos resultados com a parte estatística. Obrigado por toda amizade e parceria.

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

Aos amigos que este doutorado me presenteou. Mariana, muito obrigada por todo companheirismo e sempre que eu ficava desesperado atras de um documento, estava prontamente ali para me ajudar. Sempre dizendo: “Vai dar certo, vamos nos ajudando!”. Obrigado pelos momentos de alegrias e também por aqueles momentos de falta de tudo, inclusive ou principalmente, sorte, que compartilhamos.

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 Farmacêuticas e todos os seus funcionários que contribuíram para a realização deste doutorado.

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

Muito obrigado!

RESUMO

SCHIMANDEIRO, R.N. **Efeito bioquímico e comportamental da associação de Ácido Ascórbico, Cetoprofeno e Selênio.** Orientador: Dr. José Carlos Rebuglio Velloso. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2024.

O selênio é um nutriente essencial para os seres humanos, ajuda no funcionamento de enzimas envolvidas na defesa antioxidante, no metabolismo do hormônio da tireoide e no controle redox de reações intracelulares. A vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, é uma vitamina solúvel em água essencial para o crescimento, desenvolvimento e manutenção do corpo humano. É um antioxidante poderoso que ajuda a proteger as células contra danos causados pelos radicais livres. Sabe-se que a suplementação de Selênio e Vitaminas C, preserva o sistema antioxidante durante o estresse induzido pelo treino sobrecarregado em atletas. O cetoprofeno, um anti-inflamatório não esteroide (AINE), age inibindo a enzima ciclooxigenase (COX), responsável pela produção de prostaglandinas, mediadoras da inflamação. Contudo, o uso de AINEs, como o cetoprofeno, pode gerar estresse oxidativo como efeito colateral. Este trabalho avaliou o efeito da suplementação de selênio e ácido ascórbico sobre os efeitos oxidativos do cetoprofeno, estresse oxidativo *in vitro* e *in vivo* e interferência em um possível estado depressivo *in vivo*. Para isso, foram utilizados experimentos de ação *scavenger* das amostras sobre o radical ABTS•⁺ e sobre radical DPPH•, além da ação sobre eritrócitos humanos, para analisar a atividade hemolítica. Para a fase *in vivo* foram utilizados 60 ratos *Wistar*, os quais foram submetidos a experimento recebendo medicação com cetoprofeno, juntamente com suplementação de selênio e ácido ascórbico. Após a administração das substâncias, foram coletadas amostras de sangue e tecidos para a verificação da expressão do radical DPPH•, bem como para avaliar a atividade hemolítica sobre os eritrócitos. Para análise estatística foi usado ANOVA de uma via com Posthoc de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis. Na fase *in vitro*, este estudo observou menor expressão do ABTS•⁺ quando utilizada a combinação Selênio + Cetoprofeno ($0,13 \pm 0,10$) $p < 0,001$. Para o DPPH• apresentaram maior capacidade antioxidante o Ácido Ascórbico ($0,04 \pm 0,01$); seguido pela combinação de Selênio + Ácido Ascórbico ($0,07 \pm 0,06$) $p < 0,001$. Em relação aos eritrócitos a associação de Selênio + Cetoprofeno + Ácido Ascórbico induziu menor atividade hemolítica no tempo de 1h ($0,27 \pm 0,05$) $p = 0,038$. Na fase *in vivo* para o DPPH• apresentou maior capacidade antioxidante o Selênio na sua forma pura ($0,08 \pm 0,01$; $p < 0,001$) e na proporção de 1:4 ($0,23 \pm 0,04$; $p < 0,001$). Na proporção de 1:32 observou-se a menor média para o grupo de selênio e para o grupo cetoprofeno + ácido ascórbico ($0,03 \pm 0,01$; $p < 0,001$). Em relação aos eritrócitos no tempo de 6 horas observa-se menor média de hemólise para os grupos de Selênio e Ácido Ascórbico + Selênio ($0,01 \pm 0,01$; $p = 0,036$). Foi possível concluir que a associação entre Ácido Ascórbico e Selênio, diminuem, de forma geral, os sistemas oxidantes, gerando um sistema antioxidante bastante efetivo.

Palavras chave: selênio; ácido ascórbico; antioxidantes; ação antimicrobiana; ação antifúngica.

ABSTRACT

SCHIMANDEIRO, R.N. **Biochemical and behavioral effects of the combination of ascorbic acid, ketoprofen, and selenium.** Advisor: Dr. José Carlos Rebuglio Velloso. Thesis (Doctorate in Pharmaceutical Sciences) - State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2024.

Selenium is an essential nutrient for humans, supporting the functioning of enzymes involved in antioxidant defense, thyroid hormone metabolism, and the redox control of intracellular reactions. Vitamin C, also known as ascorbic acid, is a water-soluble vitamin essential for the growth, development, and maintenance of the human body. It is a powerful antioxidant that helps protect cells against damage caused by free radicals. Selenium and vitamin C supplementation are known to preserve the antioxidant system during stress induced by intense training in athletes. Ketoprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), acts by inhibiting the enzyme cyclooxygenase (COX), responsible for the production of prostaglandins, which mediate inflammation. However, the use of NSAIDs, such as ketoprofen, can generate oxidative stress as a side effect. This study evaluated the effect of selenium and ascorbic acid supplementation on the oxidative effects of ketoprofen, oxidative stress *in vitro* and *in vivo*, and its impact on a possible depressive state *in vivo*. For this purpose, scavenger action experiments of the samples on the ABTS•⁺ radical and on the DPPH• radical were used, in addition to the action on human erythrocytes, to analyze the hemolytic activity. For the *in vivo* phase, 60 *Wistar* rats were used, which underwent an experiment receiving medication with ketoprofen, together with selenium and ascorbic acid supplementation. After administration of the substances, blood and tissue samples were collected to verify the expression of the DPPH• radical, as well as to evaluate the hemolytic activity on erythrocytes. For statistical analysis, one-way ANOVA with Tukey's Posthoc and the Kruskal-Wallis test were used. In the *in vitro* phase, this study observed a lower expression of ABTS•⁺ when the combination Selenium + Ketoprofen was used (0.13 ± 0.10) $p < 0.001$. For DPPH•, Ascorbic Acid (0.04 ± 0.01) presented the greatest antioxidant capacity, followed by the combination of Selenium + Ascorbic Acid (0.07 ± 0.06) $p < 0.001$. In relation to erythrocytes, the association of Selenium + Ketoprofen + Ascorbic Acid induced lower hemolytic activity in the time of 1h (0.27 ± 0.05) $p = 0.038$. In the *in vivo* phase for DPPH•, Selenium presented greater antioxidant capacity in its pure form (0.08 ± 0.01 ; $p < 0.001$) and in the proportion of 1:4 (0.23 ± 0.04 ; $p < 0.001$). In the proportion of 1:32, the lowest average was observed for the selenium group and for the ketoprofen + ascorbic acid group (0.03 ± 0.01 ; $p < 0.001$). In relation to erythrocytes at 6 hours, a lower average hemolysis was observed for the Selenium and Ascorbic Acid + Selenium groups (0.01 ± 0.01 ; $p = 0.036$). It was possible to conclude that the association between Ascorbic Acid and Selenium generally reduces the oxidizing systems, generating a very effective antioxidant system.

Keywords: selenium; ascorbic acid; antioxidants; antimicrobial action; antifungal action.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Delineamento experimental	31
Figura 2 - Sequência de testes comportamentais	34
Gráfico 1 - Percentual de inibição do radical ABTS•+ para associações de Sel (selênio), Ket (cetoprofeno) e A.A (ácido ascórbico) em diluições seriadas por 30 min de incubação em tampão fosfato salino (TFS) 10,0 mmol.L-1 , pH 7,4, à 37°C	37
Gráfico 2 - Percentual de inibição do radical DPPH•+ para associações de Sel (selênio), Ket (cetoprofeno) e A.A (ácido ascórbico) em diluições seriadas por 30 min de incubação em tampão fosfato salino (TFS) 10,0 mmol.L-1 , pH 7,4, à 37°C	40
Gráfico 3 - Atividade hemolítica do A.A em tampão sob modelo de hemólise por 1,3 e 6 horas à 37°C	42
Gráfico 4 - Atividade hemolítica do Sel+Ket+A.A em tampão sob modelo de hemólise por 1,3 e 6 horas à 37°C	42
Gráfico 5 - Atividade hemolítica do Ket em tampão sob modelo de hemólise por 1,3 e 6 horas à 37°C	43
Gráfico 6 - Atividade hemolítica do Sel em tampão sob modelo de hemólise por 1,3 e 6 horas à 37°C	43
Quadro 1 - Avaliação antimicrobiana frente as associações de Sel (selênio), Ket (cetoprofeno) e A.A (ácido ascórbico) em diluições seriadas por 24 horas à 37°C	46
Gráfico 7 - Tempo no braço aberto do labirinto em cruz elevado. Os valores são apresentados como média ± EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10)	48
Gráfico 8 - Número de entradas no braço fechado. Os valores são apresentados como média ± EPM em em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via	49
Gráfico 9 - Número total de linhas cruzadas no CA. Os valores são apresentados como média ± EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via	50
Gráfico 10 - Número de levantamentos no CA. Os valores são apresentados como média ± EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.....	50

- Gráfico 11 - Índice de reconhecimento de objetos. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via 51
- Gráfico 12 - Tempo de natação (A), imobilidade (B) e escalada (C). Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados de natação e imobilidade foram analisados pelo ANOVA de uma via. Os dados de escalada foram analisados usando o teste estatístico de Kruskal-Wallis..... 52
- Gráfico 13 - Ação scavenger das amostras de tecidos sobre radical DPPH• sem diluição. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via 54
- Gráfico 14 - Ação scavenger das amostras de tecidos sobre radical DPPH• na diluição 1/4. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via 55
- Gráfico 15 - Ação scavenger das amostras de tecidos sobre radical DPPH• na diluição 1/32. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via 56
- Gráfico 16 - Ação scavenger das amostras de sangue sobre radical DPPH• na diluição sem diluição. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via 58
- Gráfico 17 - Ação scavenger das amostras de sangue sobre radical DPPH• na diluição na diluição 1/4. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via 59
- Gráfico 18 - Ação scavenger das amostras de sangue sobre radical DPPH• na diluição na diluição 1/32. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via 61
- Gráfico 19 - Efeito citotóxico do Cetoprofeno (Ket) quando associado ao Selênio (Sel) e Ácido Ascórbico (AA). Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via 62

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Media $\pm$ DP da expressão do ABTS●+ quando usado Cetoprofeno (Ket), Selênio (Sel) e Ácido Ascórbico (AA). ANOVA de uma via e Posthoc de Tukey.....	38
Tabela 2 - Media $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Expressão do DPPH● quando usada as combinações de Selênio + Cetoprofeno, Selênio + Ácido Ascórbico, Selênio + Cetoprofeno + Ácido Ascórbico, Selênio, Cetoprofeno e Ácido Ascórbico	42
Tabela 3 - Media $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Efeito citotóxico do Cetoprofeno (Ket) quando associado ao Selênio (Sel) e Ácido Ascórbico (AA) sobre os eritrócitos tempo de reação de 1 Hora	44
Tabela 4 - Media $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Expressão do DPPH nos tecidos dos ratos Wistar quando não houve diluição das substâncias farmacológicas	55
Tabela 5 - Media $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Expressão do DPPH nos tecidos dos ratos Wistar, diluição 1:4 das substâncias farmacológicas.....	56
Tabela 6 - Media $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Expressão do DPPH nos tecidos dos ratos Wistar, diluição 1:32 das substâncias farmacológicas.....	57
Tabela 7 - Media $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Expressão do DPPH em sangue dos ratos Wistar, quando não houve diluição das substâncias farmacológicas	59
Tabela 8 - Media $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Expressão do DPPH em sangue dos ratos Wistar, diluição 1:4 das substâncias farmacológicas.....	60
Tabela 9 - Media $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Expressão do DPPH em sangue dos ratos Wistar, diluição 1:32 das substâncias farmacológicas.....	62
Tabela 10 - Media $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Efeito citotóxico do Cetoprofeno (Ket) quando associado ao Selênio (Sel) e Ácido Ascórbico (AA) sobre os eritrócitos em Ratos Wistar, tempo de reação de 1 Hora.....	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1.1 Selênio	14
1.1.1.1 Enzimas	17
1.1.1.1.1 <i>Glutathione Peroxidase (GPx)</i>	17
1.1.1.1.2 <i>Tioredoxina Redutase (TrxR)</i>	19
1.1.1.2 Absorção	19
1.1.1.3 Transporte e Repartição no Organismo	20
1.1.1.4 Metabolização	20
1.1.1.5 Excreção	21
1.1.2 Ácido Ascórbico	21
1.1.3 Cetoprofeno	22
1.1.3.1 Efeitos colaterais	23
1.1.4 Atividade Antimicrobiana dos Sistemas Oxidativos	24
1.1.5 Ação Antifúngica dos Sistemas Oxidativos	24
1.2 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	25
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 MATERIAL	27
3.2 MÉTODOS	27
3.2.1 Avaliação <i>In Vitro</i> em Sistemas Oxidativos	27
3.2.1.1 Ação <i>scavenger</i> das amostras sobre o radical ABTS• ⁺	27
3.2.1.2. Ação <i>scavenger</i> das amostras sobre radical DPPH•	28
3.2.2 Experimentação <i>Ex Vivo</i>	28
3.2.2.4 Ação sobre eritrócitos	28
3.2.2.4.1 <i>Preparação das Hemácias</i>	28
3.2.2.4.2 <i>Atividade citotóxica ex vivo sobre hemácias</i>	28
3.2.2.5 Ensaio de atividade antimicrobiana in vitro	29
3.2.2.6 Avaliação Antifúngica	29

3.2.3 Experimentação <i>In Vivo</i>	30
3.2.3.1 Animais	31
3.2.3.2 Testes comportamentais	32
3.2.3.3 Ação <i>scavenger</i> das amostras de tecidos sobre radical DPPH•.....	35
3.2.3.4 Ação <i>scavenger</i> das amostras de sangue sobre radical DPPH•.....	35
3.2.3.5 Ação sobre eritrócitos.....	35
3.2.4 Análise Estatística	36
4 RESULTADOS	37
4.1 AVALIAÇÃO IN VITRO EM SISTEMAS OXIDATIVOS	37
4.1.1 Ação <i>Scavenger</i> das Amostras Sobre o Radical ABTS•+	37
4.1.2 Ação <i>Scavenger</i> das Amostras Sobre Radical DPPH•	39
4.2 EXPERIMENTAÇÃO <i>EX VIVO</i>	42
4.2.1 Ação Sobre Eritrócitos	42
4.2.2 Antibacteriano	45
4.2.3 Antifúngico	46
4.3 EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VIVO</i>	48
4.3.1 Testes Comportamentais.....	48
4.3.1.1 Labirinto em cruz elevado	48
4.3.1.2 Campo aberto.....	49
4.3.1.3 Reconhecimento de objetos	51
4.3.1.4 Nado forçado	52
4.3.2 Testes Bioquímicos	53
4.3.2.1 Ação <i>scavenger</i> das amostras de tecidos sobre radical DPPH•	53
4.3.2.2 Ação <i>scavenger</i> das amostras de sangue sobre radical DPPH•	57
4.3.2.3 Ação sobre eritrócitos.....	62
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS	66
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	74
ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO UEPG	80

1 INTRODUÇÃO

O crescente desenvolvimento de novos fármacos é essencial para a melhoria contínua da qualidade de vida da sociedade, no entanto, muitas vezes, a introdução de medicamentos no mercado farmacêutico não é isenta de efeitos colaterais. O Cetoprofeno, um anti-inflamatório não esteroideal (AINE) amplamente utilizado, é conhecido por suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, no entanto, evidências crescentes sugerem que o uso prolongado desse fármaco pode estar associado a efeitos tóxicos em diversos órgãos e sistemas, especialmente relacionados ao estresse oxidativo e até mesmo uma relação com estados depressivos (Smith et al., 2020).

Estudos publicados no "Journal of Clinical Psychopharmacology" em 2017 sugeriram que o uso crônico de AINEs entre eles o Cetoprofeno poderia estar associado a um maior risco de desenvolvimento de sintomas depressivos em adultos mais velhos. Outros estudos também têm sugerido efeitos colaterais dos AINEs no sistema nervoso central e possíveis efeitos neuropsiquiátricos (Gisev et al., 2018).

Por outro lado, o estresse oxidativo especificamente resulta do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante do organismo, levando a danos celulares significativos. Nesse sentido e considerando o papel fundamental do estresse oxidativo na patogênese de diversas, a investigação dos efeitos do Cetoprofeno sobre o estresse oxidativo *in vitro* e *in vivo* torna-se crucial para compreender e mitigar os potenciais riscos associados ao medicamento (Smith et al., 2020).

Além disso, estratégias terapêuticas que visam minimizar os efeitos tóxicos do Cetoprofeno tem sido objeto de pesquisa. Entre essas estratégias, a suplementação de Selênio e Ácido Ascórbico tem se destacado devido às suas propriedades antioxidantes e capacidade de neutralizar radicais livres e proteger as células contra danos oxidativos. Estudos prévios sugerem que esses compostos podem desempenhar um papel significativo na redução do estresse oxidativo induzido por fármacos (Zhang et al., 2018 & Carr et al., 1999).

Estudos prévios têm demonstrado a capacidade do selênio em modular a resposta antioxidante e proteger as células contra danos oxidativos, já que o selênio é responsável pela manutenção e bom funcionamento de uma enzima chamada de glutathione peroxidase, enzima antioxidante, que possui atividade próxima à da vitamina E. Da mesma forma, o ácido ascórbico, conhecido por sua ação antioxidante, desempenha um papel crucial na modulação da síntese e liberação de neurotransmissores no cérebro.

As funções do ácido ascórbico no cérebro incluem atuar como um cofator para dopamina beta-hidroxilase, enzima responsável pela conversão de dopamina à noradrenalina, envolvida na modulação da neurotransmissão dopaminérgica e glutamatérgica, e regulação da liberação de catecolaminas e acetilcolina das vesículas sinápticas. A vitamina C também possui propriedades antioxidantes no cérebro, incluindo a limitação dos danos causados por lesão de isquemia-reperfusão e proteção contra a excitotoxicidade do glutamato (Harrison, 2009; Moretti, 2017).

Ambos os antioxidantes têm mostrado potencial em reduzir os efeitos adversos associados ao estresse oxidativo induzido por diversos agentes, incluindo fármacos (Russel, 2015 & El Kossi et al., 2000). No entanto, é crucial expandir o conhecimento existente, investigando não apenas os efeitos desses antioxidantes *in vitro*, mas também em modelos animais *in vivo*. Além disso, a possível influência da suplementação de Selênio e Ácido Ascórbico no estado depressivo *in vivo*, que pode ser correlacionado com o estresse oxidativo (Maes et al., 2014).

Esta pesquisa busca, portanto, avaliar o efeito da suplementação de Selênio e Ácido Ascórbico sobre os efeitos tóxicos do Cetoprofeno, especialmente no que diz respeito ao estresse oxidativo, tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*. Adicionalmente, investigaremos a potencial interferência desses antioxidantes no estado depressivo *in vivo*.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Selênio

O selênio é um micronutriente essencial para o corpo humano e desempenha papéis importantes na função enzimática, principalmente como componente essencial de algumas selenoproteínas. As selenoproteínas são um grupo de proteínas que contêm o aminoácido selenocisteína, que é derivado do selênio (Rayman, 2000). O selênio está envolvido em várias funções biológicas, incluindo a proteção contra o estresse oxidativo, a regulação do sistema imunológico e a função da tireoide (Hatfield & Gladyshev, 2009). Esse mineral é encontrado em alimentos como castanhas-do-pará, frutos do mar, carnes e cereais, sendo absorvido pelo organismo principalmente na forma de selenoproteínas, que atuam como antioxidantes (Berggren et al., 2018). Embora o selênio seja necessário em pequenas quantidades, tanto sua deficiência quanto o seu excesso podem acarretar sérios riscos à saúde, como distúrbios na

função imunológica e alterações no metabolismo da tireoide (Esteves et al., 2020). Assim, o consumo adequado de selênio é vital para o equilíbrio do organismo e para a prevenção de diversas doenças.

A concentração de selênio nos alimentos é proporcional à sua concentração nos solos. Solos muito ricos em selênio conduzem a uma concentração no grão de bico de 1 mg/gr e na carne de 0,2 mg/gr, sendo o selênio orgânico mais efetivo que o inorgânico.

Acúmulo de selênio em algumas espécies de plantas (como *Astragalus*) pode envenenar o gado. Por outro lado, o envenenamento de humanos por selênio foi observado nos EUA em 13 pessoas que consumiram um suplemento alimentar contendo 180 vezes mais selênio do que constava no rótulo.

A deficiência de selênio causa uma variedade de doenças similares às aquelas induzidas pela deficiência de vitamina E. Isso demonstra a importância do Se na defesa antioxidante. Entre as doenças causadas pela falta de Selênio no organismo encontram-se: uma doença degenerativa do coração chamada de Doença de Keshan. Essa doença causa aumento do tamanho do coração, alterações no ritmo cardíaco e eventual parada cardíaca em casos severos. Ela pode ser prevenida pela administração de pequenas doses de Selenito de sódio (Na_2SeO_3).

A deficiência de selênio também implica na Doença de Kashin-Beck, uma deficiência nas articulações observada em crianças de 5 a 13 anos. A administração de selenito de sódio e vitamina E durante os primeiros estágios da doença tem efeitos benéficos. Pouco selênio no sangue pode predispor o indivíduo a doenças cardiovasculares, câncer e complicações na gravidez.

A deficiência de selênio pode estar relacionada ao tipo de alimentação humana. O abuso de alimentos refinados, ou submetidos a processos de conservação e armazenamento muitas vezes provenientes de processos de cultivo acelerada, o consumo de alimentos exóticos que pouco têm a ver com as necessidades biológicas do consumidor para uma determinada região, e o processamento alimentar.

A ingestão reduzida de proteínas de fonte natural em crianças e adolescentes está associada também a seleniêmias baixas. O fator tem a ver com circunstâncias fisiológicas ou fisiopatológicas do indivíduo, ou com certos tipos de comportamento. Pessoas com dietas muito reduzidas de proteínas (por exemplo, fenilcetonúria), bem como pessoas com problemas de má absorção (por exemplo, *kwashiorkor*), insuficientes renais submetidos a hemodiálise iterativa, situações de alimentação parentérica prolongada, o trabalho excessivo, stress, e ritmo de vida desfasado do biológico conduzem também a carência de selênio.

Outro fator também tem a ver com a poluição. A poluição atmosférica, das águas, dos alimentos, o uso do tabaco, álcool, açúcar, café, gorduras sobreaquecidas e certos medicamentos, que exigem importantes quantidades de vitaminas e oligoelementos para neutralizar os seus efeitos nocivos, através da sua ação antioxidante e protetora celular que possui o selênio.

Estados de carência absoluta foram observados em áreas rurais da China, afetando crianças e mulheres jovens que morriam com uma cardiomiopatia congestiva (doença de Keshan) (Prohaska, 1987). Esta situação não se verificava nas áreas endêmicas onde se suplementavam os alimentos com 19 e 13 mg de selênio /dia respectivamente para homem e mulher (Grande Enciclopédia Portuguesa e Brasileira).

Doentes submetidos à nutrição parentérica total prolongada, foram relacionados com seleniemia baixa: perda de peso, distrofias musculares, perturbações cardíacas e artrite reumatoide. Uma carência de selênio pode conduzir a uma ou mais das seguintes condições (consoante à espécie, a idade e o grau de carência): atrasos de crescimento, distrofia muscular, degenerescência do miocárdio, lesões neurológicas, necrose hepática, fibrose pancreática, diátese exsudativa, deposição de pigmento ceróide no tecido adiposo e morte, cardiomiopatia, dores musculares, artrites, cancro, doenças de pele, anemia hemolítica, catarata, hipertensão, esterilidade, celulite, envelhecimento prematuro (Staehle, 1989).

Animais com carência de selênio apresentavam palidez acentuada, bem como degeneração dos músculos esqueléticos com envolvimento ocasional do coração e necrose hepática. Eram alterações semelhantes às dos animais com carência de vitamina E, e podia ser melhorada com um suplemento alimentar de aminoácidos com enxofre (metionina e cisteína). (Harrison, 1983) (Peterson; Lindemann; Duqueti'e; Holtzman, 1992).

Muitas situações resultantes de carência de selênio respondem favoravelmente à vitamina E, com exceção da fibrose pancreática. A natureza destes fenômenos foi parcialmente explicada com a descoberta de uma enzima contendo selênio: a glutathiona peroxidase, cuja atividade antioxidante a aproxima da vitamina E (Harrison, 1983).

Nos seres humanos, um déficit hereditário desta enzima exprime-se clinicamente por anemia hemolítica, necrose hepática, catarata, perturbações da agregação plaquetária e tendência para infecções crônicas (Chalvignac; Clavel; Thuillier, 1983).

Num estudo realizado pelo Departamento Médico dos Laboratórios des Granions, em Mônaco, concluiu-se que a população saudável estudada apresentava uma carência alimentar em selênio. O estudo consistiu em determinar a atividade da glutathiona peroxidase plaquetária (também seleno-enzima) em indivíduos voluntários saudáveis, tendo-se concluído que um

aporte de 960 mg/dia, durante 15 dias, de selênio na forma coloidal, era necessário para otimizar a atividade desta enzima (Laboratoire des Granions, 1992).

1.1.1.1 Enzimas

Há 25 anos Pinsent relatou que o selênio é essencial para a expressão de uma enzima específica na atividade em *E. coli*. Antes disso, nutricionistas e fisiologistas estavam cientes somente dos efeitos tóxicos do elemento. Duas enzimas importantes que contêm selênio são a glutathiona peroxidase e a tioredoxina redutase.

1.1.1.1.1 Glutathiona Peroxidase (GPx)

A glutathiona é sintetizada no citoplasma por todas as células animais, principalmente pelo fígado. Três aminoácidos são utilizados: glutamato, cisteína e glicina. A enzima glutamato-cisteína ligase (ou γ -glutamylcisteína sintetase, γ GCS) age na primeira etapa, e a enzima glutathiona sintetase age na segunda etapa, ligando glicina ao dipeptídeo, tudo com gasto de ATP. As células podem produzir a cisteína necessária a partir de metionina ou sequestrá-la do fluído intersticial. A glutathiona está presente em muitos alimentos, porém pouca quantidade é absorvida pelo intestino e a maior parte disso é hidrolisada em aminoácidos.

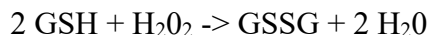
A glutathiona peroxidase é uma enzima antioxidante que protege as células contra danos oxidativos. O selênio atua como parte integrante do sítio ativo da GPx, onde desempenha um papel crucial na redução de peróxidos lipídicos e de outros compostos oxidativos. A enzima desempenha um papel vital na manutenção do equilíbrio redox celular.

A glutathiona peroxidase foi isolada na forma cristalina (Gunzler, W. A. 1974). (Flohé e cols, 1973) e caracterizada em vários estudos mecanísticos e cinética antes que fosse reconhecida como uma selenoproteína (Flohé e cols 1972) (Schneider e cols, 1967). Com base nos estudos, foi deduzido que, em mamíferos, esta enzima é a principal responsável pela proteção das membranas dos glóbulos vermelhos e outros tecidos que devem funcionar em um ambiente altamente aeróbio, de danos devido a peróxidos orgânicos (Mills; Randall, 1958) (O'Brien; Little, 1969).

Em uma revisão, Flohé apontou o importante papel da glutathiona peroxidase em uma série de mecanismos de defesa celular essenciais para a sobrevivência dos animais e também várias funções regulatórias possíveis da enzima (Flohé, 1976). A glutathiona peroxidase é capaz

de reduzir o H_2O_2 e uma grande variedade de peróxidos orgânicos (R-OOH), mas glutathiona reduzida (GSH) é o único redutor de importância fisiológica.

Essa redução ocorre conforme as seguintes reações:



A GSH, além de ser um cofator para as GPx, está envolvida em muitos processos metabólicos, como na manutenção da comunicação entre as células através de junções *gap*, no metabolismo do ascorbato, e geralmente prevenindo a oxidação de grupos $-\text{SH}$ e a ligação cruzada entre eles. Como está presente em grandes concentrações dentro da célula, ela e a GSSG são as principais contribuidoras do “estado redox” intracelular. Mas claro, há outros “pares redox” na célula, como NAD^+/NADH , ascorbato/dehidroascorbato e $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$.

A glutathiona também pode agir como antioxidante, reagindo *in vitro* com radicais centrados em carbono e O_2 , mas não com $\text{O}_2^{\bullet-}$ (pelo menos, não tão rápido). *In vivo*, é possível que ocorra essas reações, já que as concentrações intracelulares de GSH são altas, e ao reagir com espécies reativas, há formação de radicais tiol ($\text{GS}^{\bullet}$) e, por conseguinte, $\text{O}_2^{\bullet-}$. A reação de GSH com ONOO^- pode gerar nitrosotiol (GSNO), que pode ser decomposto e gerar $\text{NO}^{\bullet}$. Ela também pode ser quelante de íons cobre e diminuir sua capacidade de gerar $\text{OH}^{\bullet}$ a partir de H_2O_2 . 10 a 20% de toda a glutathiona intracelular está na mitocôndria.

In vivo, após a interação de um grupo selenol em a proteína com um peróxido, a forma oxidada resultante da enzima provavelmente sofrerá redução imediatamente pelo excesso de GSH normalmente presente na célula. Este processo de redução da oxidação cíclica deve ser distinguido da oxidação descontrolada da proteína pelo ar *in vitro*, especialmente desde o último processo frequentemente envolve adicionalmente a exposição à luz.

São conhecidas hoje pelo menos quatro tipos de GPx. O tipo mais comum é a GPx citoplasmática, também chamada de “clássica” ou cGPx ou GPx1. O plasma de mamíferos contém baixos níveis de outro tipo, a PGPx ou GPx3, que é uma glicoproteína. Ela também é encontrada em outros fluídos extracelulares, como leite, líquido seminal, humor aquoso do olho e no líquido que reveste o pulmão e é originada principalmente nos rins.

A GPx2 é encontrada nas células epiteliais do trato gastrointestinal e também pode ser chamada de GI-GPx. Ela deve servir para metabolizar peróxidos de lipídeos ingeridos ou gerados pela peroxidação lipídica no próprio intestino. O fígado humano contém GPx2, assim como GPx1 e GPx4. Essa última é uma glutathiona peroxidase de hidroperóxido fosfolipídico, ou PHGPx.

Ela tem o incrível papel de reduzir não só H_2O_2 e peróxidos orgânicos sintéticos, mas também ácidos graxos e hidroperóxidos de colesterol esterificados. Assim, ela pode agir sobre resíduos de ácidos graxos peroxidados dentro de membranas e lipoproteínas, reduzindo-os a álcool. Ela é menos específica para GSH que as outras e pode reduzir também hidroperóxido de timina, um produto do ataque de radicais livres ao DNA.

Sua atividade em geral é baixa nos tecidos, com exceção do testículo, onde ela parece desempenhar um papel fundamental na maturação dos espermatozoides, catalisando a oxidação de grupos tiol de proteínas da cabeça do mesmo.

As GPx1, 2 e 3 possuem quatro subunidades proteicas, cada uma contendo um átomo de selênio no sítio ativo. A GPx4 é um monômero, com massa molecular relativa de 19 kDa, e possui apenas um selênio. Ele está presente no sítio ativo das GPx na forma de selenocisteína, uma cisteína cujo átomo de enxofre (R-SH) foi substituído por selênio (R-SeH). Por isso, traços de selênio na dieta são essenciais para os animais, para o bom funcionamento das GPx, por exemplo.

1.1.1.1.2 Tio redoxina Redutase (TrxR)

A tio redoxina redutase é outra selenoproteína que desempenha um papel na regulação do estresse oxidativo. Ela está envolvida na redução de proteínas tiol-dissulfeto e pode afetar processos celulares como a proliferação celular e a resposta imune (Kryukov et. al., 2003).

Por outro lado, o selênio participa também em processos metabólicos essenciais e nutrição. É obtido principalmente por meio da dieta, no entanto, a ingestão inadequada ou excessiva pode levar a problemas de saúde. Estudos sugerem que a deficiência de selênio pode estar associada a doenças cardiovasculares, câncer, e distúrbios da tireoide (Rayman, 2012).

1.1.1.2 Absorção

O selênio é absorvido como selenometionina. A sua absorção faz-se ao nível do intestino, mas as suas modalidades são mal conhecidas. A forma como se encontra o selênio condiciona o grau de absorção. Esta é facilitada pela associação a aminoácidos e vitaminas do grupo B12.

Num estudo recente com administração de selenometionina marcada, constatou-se que a absorção se dá ao longo do trato gastrintestinal, segue para o grupo fígado-pâncreas, volta à

circulação entero-hepática e finalmente é distribuída aos tecidos. O selênio pode também ser absorvido pela pele ou pelos pulmões, em circunstâncias patológicas.

1.1.1.3 Transporte e repartição no organismo

O selênio é transportado no plasma ligado a proteínas α e α_2 globulina, e talvez a lipoproteínas. Estudos realizados com selênio radioativo mostraram que, a nível plasmático, o selênio se fixa aos grupos tióis das proteínas, sendo transportadas pelas α_2 e J3 globulinas. A selenêmia plasmática situa-se entre 50 e 200 ng/ml, segundo os países.

As taxas eritrocitárias de selênio são sensivelmente o dobro. As variações da selenêmia são rápidas em relação às variações no eritrócito, e dependem do aporte alimentar e da idade, sendo o máximo aos 35 anos, diminuindo depois gradualmente. Na hipófise, o selênio biologicamente ativo decresce na idade avançada, mais acentuadamente que em outros órgãos.

O selênio distribui-se a todos os tecidos do organismo: rins, baço, pâncreas, pulmões, músculos estriados, cabelos, fígado, cérebro e pituitária. A sua concentração faz-se principalmente no tecido muscular, fígado, rim e, particularmente, no miocárdio. Os ossos e dentes contêm indícios de selênio.

O selênio pode substituir o enxofre nos aminoácidos sulfurados e a selenite pode ligar-se a aminoácidos sulfurados. O selênio é também incorporado em selenonucleosídeos, podendo estar envolvido na tradução genética. O corpo de um indivíduo médio (± 70 kg) contém aproximadamente 15 mg de selênio. Este valor é variável conforme a área geográfica.

1.1.1.4 Metabolização

Ao nível hepático, os derivados do selênio são transformados em selênio metálico, depois em dimetilselênio $(CH)_2Se$, trimetilselênio $(CH_3)_3Se$ e selenometionina. Com selênio marcado, verificou-se que a sua permanência no corpo é cerca de cinco vezes maior que o tempo de *turnover* mais prolongado nos tecidos periféricos. Isto reflete uma reutilização substancial do selênio no organismo. A vitamina C (ácido ascórbico) parece ter uma importante ação na manutenção da homeostasia do selênio.

1.1.1.5 Excreção

Há um controle tanto na absorção como na excreção do selênio. A glutathione peroxidase é uma seleno-enzima adaptativa que aumenta com o *stress* oxidativo. A excreção do selênio se faz pelas fezes e urina. A excreção urinária sob a forma de trimetilselênio é quantitativamente a mais importante. A via pulmonar sob a forma de dimetilselênio é importante somente em caso de intoxicação, gerando uma halitose característica.

1.1.2 Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico, conhecido popularmente como vitamina C, é um nutriente essencial para o organismo humano, com importantes funções fisiológicas que incluem a síntese de colágeno, o fortalecimento do sistema imunológico e a ação antioxidante (Jacob & Sotoudeh, 2002). Como um potente antioxidante, o ácido ascórbico protege as células contra danos causados por radicais livres, desempenhando um papel crucial na prevenção de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer (Carr & Maggini, 2017). Encontrado principalmente em frutas cítricas, como laranja e limão, bem como em vegetais como pimentões e brócolis, o ácido ascórbico é solúvel em água e não pode ser produzido pelo corpo, o que torna seu consumo regular essencial para a saúde (Maggini et al., 2012). A deficiência de vitamina C pode levar a condições graves, como o escorbuto, que é caracterizado por fraqueza, sangramentos e problemas nas articulações (Haas et al., 2013).

A deficiência de vitamina C pode resultar em escorbuto, que se manifesta primeiramente com fadiga, crescimento ósseo prejudicado e, hemorragias, consequência da falha de conectividade do tecido para se formar, incluindo hemorragias perifoliculares, petéquias, equimoses e sangramento gengival (Russel, 2015).

A vitamina C tem um papel significativo na modulação da síntese e liberação de neurotransmissores no cérebro. As funções de vitamina C no cérebro incluem atuar como um cofator para dopamina beta-hidroxilase na conversão de dopamina à noradrenalina, envolvida na modulação da neurotransmissão dopaminérgica e glutamatérgica, como na regulação da liberação de catecolaminas e acetilcolina das vesículas sinápticas.

A vitamina C também possui propriedades antioxidantes no cérebro, incluindo a limitação dos danos causados por lesão da isquemia-reperfusão e proteção contra a excitotoxicidade do glutamato (Harrison, 2009; Moretti, 2017). Um estudo investigou o ponto em qual a deficiência de vitamina C se manifesta clinicamente. Em cinco voluntários saudáveis

de uma prisão, sinais notáveis de escorbuto clínico apareceram assim que os níveis de ascorbato no sangue total diminuíram a $17 \mu\text{mol} / \text{L}$.

Um estudo de Coorte, com sete jovens voluntários saudáveis do sexo masculino com níveis de vitamina C baixos, entre 5 e $10 \mu\text{mol}/\text{L}$. Uma suplementação de Vitamina C com uma dose diária de 30 mg, elevou o ácido ascórbico plasmático médio de $6,9 \pm 0,5$ a $11,7 \pm 0,9 \mu\text{mol} / \text{L}$. Depois que a estabilidade foi obtida, elevou-se a dose em uma dose diária de vitamina C para 60 mg, o que resultou em um intervalo de $14,9 \pm 1,0$ a $58,8 \pm 3,1 \mu\text{mol} / \text{L}$. Com relação aos sintomas clínicos da deficiência de vitamina C, seis dos sete indivíduos relataram fadiga e / ou irritabilidade.

Em três indivíduos, esses sintomas foram resolvidos em uma semana com a suplementação diária de 30 mg, e nos outros três indivíduos, os sintomas desapareceram dentro de uma semana com a dose diária de 60 mg (Levine, 1996).

A maioria dos intervalos de referência, no entanto, utiliza um corte mais alto para classificar a deficiência de vitamina C. Os laboratórios de análises clínicas no Brasil, consideram o intervalo de referência para vitamina C sérica normal entre como 23 a $85 \mu\text{mol} / \text{L}$ (0,4 a 1,5 mg/dL), enquanto a de deficiência de vitamina C é considerada quando o nível está $\leq 11 \mu\text{mol} / \text{L}$ (0,19 mg/dL).

O intervalo de referência utilizado pela SA Pathology (Austrália do Sul) é de 26 a $85 \mu\text{mol} / \text{L}$ (0,46 a 1,5 mg/dL), e o Royal College of Pathologists of Australia (RCPA manul. 2015) considera que o intervalo de referência geralmente é entre 30 a $80 \mu\text{mol} / \text{L}$ (0,5 a 1,4 mg/dL). Com isso, podemos considerar que o intervalo de referência real no mundo está entre 23 a $85 \mu\text{mol} / \text{L}$ (0,4 a 1,5 mg/dL), basicamente o utilizado no Brasil.

Existe uma relação sigmoide entre a ingestão de vitamina C oral e níveis plasmáticos de vitamina C. Relativamente pequenas mudanças na ingestão de vitamina C são capazes de gerar grandes alterações nos níveis plasmáticos de vitamina C. Em um estudo, a ingestão oral de 30 mg de vitamina C por dia resultou em um aumento médio dos níveis plasmáticos de menos de $20 \mu\text{mol} / \text{L}$, mas o aumento da ingestão de 60 mg resultou em níveis plasmáticos médios de $74 \mu\text{mol} / \text{L}$ (Newton, 1983).

1.1.3 Cetoprofeno

O cetoprofeno (ácido 2- (3-benzoil-fenil) propiônico), é um anti-inflamatório derivado do ácido arilpropiônico (Levain et al., 2004). Foi originalmente sintetizado em 1967 na França e lançado como droga oral na década de 1970 (Kantor, 1986). É praticamente solúvel em

acetona, etanol e metanol e pouco solúvel em água, desta forma 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. (Levoín et al., 2004).

Os AINES estão entre os medicamentos mais vendidos no mundo. Sua comercialização atinge aproximadamente 73 milhões de prescrições anuais em todo o mundo (Hahn, 2006). Em 2010, no Brasil, foram gastos aproximadamente R\$: 1,5 bilhões na compra deste tipo de medicamento (Silva et al., 2013).

O Cetoprofeno é amplamente utilizado na 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) (Levoín et al., 2004). Entretanto, após o seu uso alguns efeitos adversos ainda são observados, seja na mucosa gastrointestinal, nos rins ou até mesmo no fígado (Lee; Rodriguez; Dionne, 2005; Radi; Khan, 2006).

O mecanismo pelo qual os efeitos adversos acontecem ainda não está completamente elucidado. Enquanto observam-se 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, visto que a utilização do Cetoprofeno está relacionada com o aumento de espécies reativas de oxigênio 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).

1.1.3.1 Efeitos colaterais

Os AINEs agem principalmente inibindo as enzimas ciclooxigenase (COX), reduzindo assim a produção de prostaglandinas, que são mediadores químicos envolvidos no processo inflamatório, dor e febre. Embora esses medicamentos geralmente atuem periféricamente, eles podem ter efeitos indiretos no sistema nervoso central.

Alguns efeitos colaterais comuns dos AINEs, como o Cetoprofeno, incluem irritação gastrointestinal, úlceras, problemas renais, tontura, vertigem, sonolência, cefaleia, visão turba e aumento da pressão arterial (RAINSFORD, 1999). Em casos raros, eles podem estar associados a distúrbios psiquiátricos, como insônia, nervosismo, irritabilidade e, embora mais raramente, depressão (Graham et al., 2013).

Seus efeitos colaterais sobre o sistema nervoso central (SNC) podem variar, e é importante destacar que nem todos os pacientes apresentarão esses efeitos. Além disso, a interação com outros medicamentos e condições de saúde preexistentes também pode influenciar os efeitos colaterais (Katzung & Trevor, 2018; Prescrire, 2016).

1.1.4 Atividade Antimicrobiana dos Sistemas Oxidativos

A atividade antimicrobiana *in vitro* dos sistemas oxidativos refere-se à capacidade de certas substâncias oxidativas ou processos oxidativos em inibir o crescimento ou matar microrganismos, como bactérias, vírus, ou fungos, em condições de laboratório. Esta atividade muitas vezes envolve a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou outras moléculas oxigenadas que são tóxicas para os microrganismos (Winterbourn, 2008).

Os sistemas oxidativos podem agir de diversas maneiras, incluindo danificar componentes celulares essenciais, desencadear estresse oxidativo e interferir nos processos metabólicos vitais dos microrganismos. Entre as substâncias ou processos oxidativos que exibem atividade antimicrobiana *in vitro*, estão incluídos compostos como peróxido de hidrogênio, ozônio, radicais livres de oxigênio, entre outros (Halliwell et al., 2015).

1.1.5 Ação Antifúngica dos Sistemas Oxidativos

Quanto à ação antifúngica dos sistemas oxidativos, estes podem afetar os fungos de maneiras semelhantes às descritas anteriormente para outros microrganismos. Os ROS, por exemplo, podem danificar as membranas celulares, proteínas e material genético dos fungos, resultando na inibição do seu crescimento ou na sua eliminação (Halliwell et al., 2015; Fisher, 2011).

Existem evidências de que o estresse oxidativo pode afetar certos fungos como a *Candida albicans*, por exemplo, influenciando seu crescimento, sobrevivência e virulência. Alguns estudos sugerem que o estresse oxidativo pode ter efeitos antifúngicos, inibindo o crescimento de *Candida albicans*. Outros estudos indicam que a *Candida albicans* pode ativar mecanismos de defesa antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo, permitindo sua adaptação e persistência (Frohner et al., 2009; da Silva Dantas et al., 2015).

1.2 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

Por meio da pesquisa poderemos compreender os efeitos adversos do Cetoprofeno, explorar o potencial protetor do Selênio e Ácido Ascórbico, além de contribuir para o entendimento do estresse oxidativo em diferentes contextos. Por outro lado, poderá ser investigada a relação entre o uso de Cetoprofeno e o estado depressivo, fornecendo informações relevantes para a área da saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação de Selênio e Ácido Ascórbico sobre os efeitos tóxicos do Cetoprofeno, estresse oxidativo *in vitro* e *in vivo* e a interferência no estado depressivo *in vivo*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* a ação de sistemas oxidativos;
- Avaliar *in vivo* a ação de sistemas oxidativos
- Avaliar o ensaio da atividade antimicrobiana *in vitro* dos sistemas oxidativos;
- Avaliar a ação antifúngica dos sistemas oxidativos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

- Ácido ascórbico (Vitamina C)
- Cetoprofeno
- DPPH• (2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl; Sigma-Aldrich)
- Peroxido de hidrogênio (H₂O₂)
- Radical ABTS•+ (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6'-sulfonic acid)) - Sigma-Aldrich®)
- Tampão fosfato de sódio
- TMB (3',5,5'-Tetramethyl-benzidine) - Sigma-Aldrich
- Selênio quelado

Todos os materiais necessários foram obtidos com recursos particulares próprios, sendo que alguns já estão disponíveis no laboratório de pesquisa do Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Avaliação *In Vitro* em Sistemas Oxidativos

As amostras foram testadas isoladamente e em associação entre si nas diferentes combinações (Ket+Sel; Ket+AA; Ket+Sel+AA; Sel+AA) em diferentes concentrações. Onde Ket refere-se ao cetoprofeno, Sel refere-se ao Selênio e AA refere-se ao Ácido ascórbico (Vitamina C). As amostras definidas por puro, se referem a concentração de Selênio 1200 mcg/mL, Ácido Ascórbico 125 mcg/mL e Cetoprofeno 30 mcg/mL.

3.2.1.1 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®) foi verificada conforme metodologia

descrita por PELLEGRINI et al. (1999), com modificações. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato de sódio 10mM (pH 7,0) por meio do decréscimo da absorbância em 734 nm, de acordo com VELLOSA et al. (2007). O resultado foi expresso em porcentagem de inibição de acordo com a equação 1.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

(Equação 1)

Onde:

A_c é a absorbância do controle, registrada à $\lambda=734$ nm.

A_s é a absorbância da amostra, registrada à $\lambda=734$ nm.

3.2.1.2 Ação scavenger das amostras sobre radical DPPH•

A ação das amostras sobre radicais livres foi avaliada por meio do decréscimo da absorbância em 531nm da solução de DPPH• (2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl; Sigma-Aldrich) na concentração de 60 μ M em etanol absoluto, segundo Soares et al. (1997).

3.2.2 Experimentação *Ex Vivo*

3.2.2.4 Ação sobre eritrócitos

3.2.2.4.1 Preparação das Hemácias

Para a obtenção das hemácias foram coletados 10 mL de sangue de indivíduos voluntários, com idade acima de 18 anos. A coleta foi efetuada na Farmácia Escola, Campus CEDETEG – Guarapuava, por punção venosa periférica. Após a coleta, o sangue obtido foi colocado em tubo de vidro heparinizado, homogeneizado e então centrifugado (5 minutos, 4°C, 1200xG).

Foram retirados o plasma e a camada de leucócitos por aspiração. Em seguida, a suspensão de hemácias foi lavada com tampão fosfato de sódio salino (0,85% de NaCl) 10,0 mmol.L⁻¹, pH 7,4 por três vezes, acertando-se o volume globular para 3% (Cruz Silva et al.,

2000). O presente ensaio possui parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa CEP – UNICENTRO, número 3.231.864 conforme anexo I.

3.2.2.4.2 Atividade citotóxica *ex vivo* sobre hemácias

As amostras de Sel, Ket, AA e sua associação (Sel.Ket.AA) e controles negativo (tampão e hemácias) e 100% hemólise (20,0 µg.mL⁻¹ água), foram mantidas na incubadora (*shaker*) às condições de 37 °C, 150 rpm com a solução de hemácias (3%) contendo 1,08 g.L⁻¹ de glicose, 0,3 g.L⁻¹ de penicilina e 0,5 g.L⁻¹ de estreptomicina (Cruz Silva et al., 2001).

Nos tempos de 1; 3; e 6 h, as amostras foram centrifugadas (5 minutos, 4°C, 1200 xG) e o conteúdo de hemoglobina liberado, devido à ação citotóxica das preparações, foi determinado pela leitura do sobrenadante, através do registro da absorbância $\lambda = 540$ nm. A análise foi efetuada em triplicata e os dados foram exibidos em percentual de hemólise, o qual foi calculado de acordo com a Equação 2:

$$\% \text{ Hemólise} = (\text{Absa} / \text{Abscp}) \times 100$$

(Equação 2)

onde:

Absa – absorbância da amostra;

Abscp – absorbância do controle positivo, o qual apresentou 100 % de hemólise.

3.2.2.5 Ensaio de atividade antimicrobiana *in vitro*

O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizado com as bactérias *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, pelo método de microdiluição em placas de 96 poços, conforme as orientações gerais do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018), com modificações. Os inócuos foram realizados por diluição em salina estéril 0,85% de NaCl ajustada a concentração de microorganismo em torno de 0,08 e 0,10 realizando a leitura da absorbância em comprimento de onda para bactérias 625nm e semeadas por método de esgotamento em placas de Petri. Para *S. epidermidis* foi utilizado o meio de cultura Mueller Hinton + 4% glicose, e para *E. coli* o meio Mueller Hinton.

As placas foram incubadas por um tempo definido de 24 h a 35°C ± 2°C contendo as amostras a serem avaliadas (Ket+Sel; Ket+AA; Ket+Sel+AA; Sel+AA; Ket; Sel e AA). Como

controle positivo de crescimento foi utilizado somente o meio de cultura com as suspensões bacterianas. Como controle negativo, foi utilizado meio de cultura sem bactérias contendo apenas salina. A leitura foi realizada por contagem das unidades formadoras de colônias (UFC's).

3.2.2.6 Avaliação Antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada conforme o protocolo estabelecido pelo documento M27-A2 do CLSI (2008). As cepas utilizadas foram *C. albicans* 0546 VITROIDSTM. Inicialmente as leveduras foram submetidas ao repique em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), a 36 ± 2 °C por 24 horas antes do ensaio. Terminado a fase inicial de preparação do inóculo foi preparado sendo suspenso em solução salina estéril 0,85% de NaCl, padronizadas de acordo com a escala de 0,5 McFarland. A densidade celular foi analisada em comprimento de onda de 530 nm por espectrofotômetro, onde obteve-se uma absorbância dentre 0,07 a 0,10.

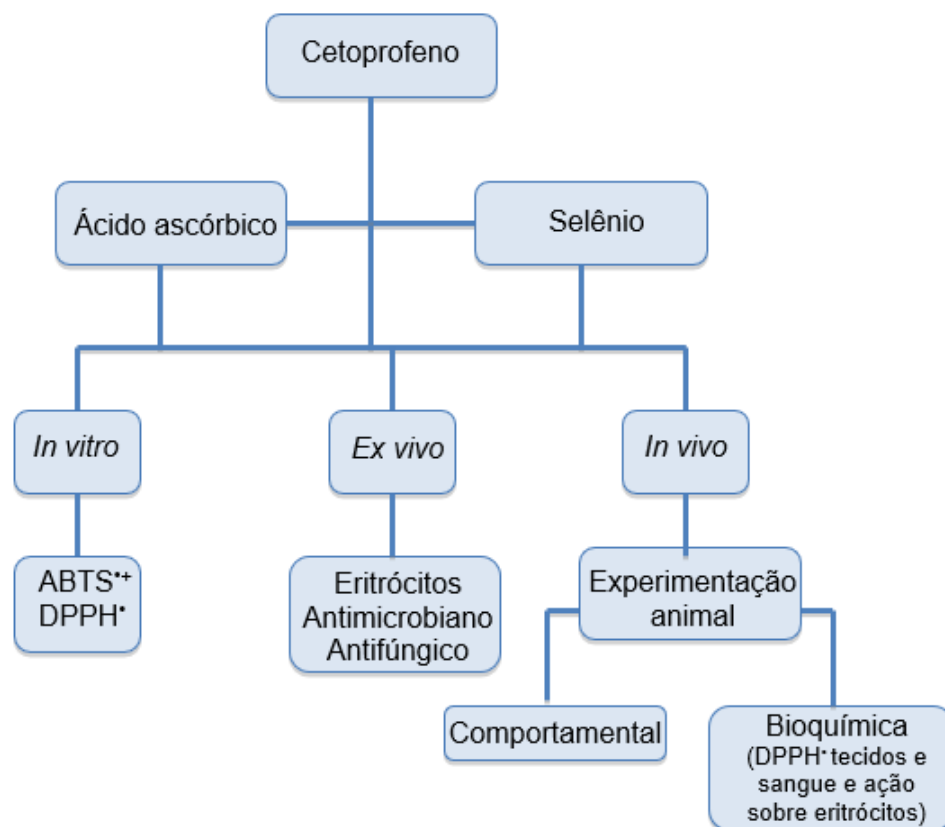
Foram testadas Ket+Sel; Ket+AA; Ket+Sel+AA; Sel+AA; Ket; Sel e AA todas essas amostras puras e em diluições seriadas de: 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32. As amostras foram diluídas previamente em tampão fosfato de potássio 10,0 mmol.L⁻¹, pH 7,4 até atingirem a concentração desejada.

Para o experimento também foram utilizados, controles: controle positivo de crescimento (meio RPMI-1640 e o inóculo) e controle negativo de crescimento (meio RPMI-1640). Todas as análises foram realizadas em triplicata. As amostras foram adicionadas a microplacas estéreis de em conjunto com o inóculo e o meio de cultura RPMI-1640 e incubadas à 36 ± 2 °C por 24 horas. Alíquotas foram repassadas das microplacas para as placas de cultivo e novamente incubadas (36 ± 2 °C por 24 horas). A contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de cada placa de cultura foi realizada, sendo que para cada concentração o experimento foi realizado em triplicata.

3.2.3 Experimentação *in vivo*

Tratamento dos animais e divisão dos grupos.

Figura 1- Delineamento experimental



Fonte: o autor.

3.2.3.1 Animais

Foram utilizados 60 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), obtidas do Núcleo Avançado de Estudos da Vida (NAEVI) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os animais foram mantidos no NAEVI-UEPG em caixas para roedores, com cama de maravalha, em condições de temperatura controlada de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, com luminosidade em ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentados com ração comercial e água à vontade.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEPG (processo CEUA: 23.000033744-1 – ANEXO B)

Cálculo amostral - Foi realizado um cálculo amostral com base nos resultados obtidos nas recentes dissertações de mestrado do programa de Ciências Biomédicas, assim como trabalhos publicados por outros grupos envolvendo comportamentos tipo depressivo e tipo ansioso de ratos (SANTIAGO et al., 2014). O nível de significância adotado (alfa) foi 0,05. Os cálculos foram realizados com base no desvio padrão médio de 20%, estabelecendo um poder de teste de 90%, adotando um d Cohen de 1,5 como significativo. Os cálculos foram realizados

utilizando o programa GPower 3.1 Germany (FAUL et al., 2007). Este cálculo resultou em 10 animais por grupo, totalizando 60 animais. Os animais, obtidos aos 60 dias de vida, foram separados em seis grupos, nomeados de acordo com a suplementação aplicada.

Amostras testadas: Cetoprofeno (Ket), ácido ascórbico (AA) e selênio (Sel).

Esta etapa (experimentação animal) foi realizada dividindo os animais em grupos:

- Grupo 1 (G1): animais tratados por via oral (v.o.) durante 7 dias somente com o veículo (salina 0,9%);
- Grupo 2 (G2): animais tratados via oral (v.o.) com Sel 50 µg/Kg/dia;
- Grupo 3 (G3): animais tratados via oral (v.o.) com Ket 5 mg/Kg/dia e via oral (v.o.) com AA 1 mg/Kg/dia durante 7 dias;
- Grupo 4 (G4): animais tratados via oral (v.o.) com Ket 5 mg/Kg/dia e via oral (v.o.) com Sel 50 µg/Kg/dia durante 7 dias;
- Grupo 5 (G5): animais tratados via oral (v.o.) com A.A. 1 mg/kg/dia e via oral (v.o.) com Sel 50 µg/Kg/dia durante 7 dias;
- Grupo 6 (G6): animais tratados via oral (v.o.) com AA 1 mg/Kg/dia, via oral (v.o.) com Sel 50 µg/Kg/dia e via oral (v.o.) com Ket 5 mg/Kg/dia durante 7 dias.

Doses das amostras:

Foram administrados Cetoprofeno (5 mg/kg/dia), conforme TOMIC et al. (2008), ácido ascórbico (1 mg/kg/dia), conforme Levine, 1996 e Selênio quelado (50 µg/mg/kg/dia) em cada grupo que necessitar de cada substância.

3.2.3.2 Testes comportamentais

Aos 67 dias de vida, os ratos foram submetidos a teste comportamentais para avaliar o comportamento do tipo ansioso, tipo depressivo, atividade locomotora e a memória de reconhecimento.

Os testes foram realizados em dias diferentes, ordenando também os testes mais estressantes para os animais por último, totalizando 7 dias consecutivos na seguinte ordem: Labirinto em cruz elevado, campo aberto, dois dias de habituação no campo aberto, reconhecimento de objetos, treino de nado forçado e teste de nado forçado.

O transporte dos animais do biotério até a sala de experimentos causa alterações fisiológicas devido ao estresse do transporte e pode ter reflexos nos dados da pesquisa

(O’Bernier; Baldwin, 2006), por esse motivo, os testes foram realizados na sala de experimentos do próprio biotério e os animais foram habituados à sala de experimento por 1 h antes de iniciar o respectivo teste comportamental (Dietze et al., 2016) que ocorreram com intervalo de 24 horas, sendo realizados entre 13h e 16h.

Os testes foram registrados por meio de filmagem com *Webcam* HD Logitech modelo C270 e os testes sempre realizados pelos mesmos experimentadores.

1. Teste de Labirinto em Cruz Elevado: O labirinto em cruz elevado (LCE) é um aparelho usado predominantemente para estudar os comportamentos relacionados à ansiedade e os efeitos dos moduladores de ansiedade, sendo esse modelo baseado no “conflito de aproximação-esquiva” induzido pela presença de partes seguras do aparelho que são fechadas e protegidas, e abertas, aversivas e desprotegidas (Casarrubea et al., 2013). O LCE consiste em dois braços abertos cruzados com dois braços fechados, todos elevados a 50cm do chão. O rato foi posicionado no centro do LCE voltado para o braço aberto e pode explorar livremente o aparelho durante um período de 5 minutos. O teste foi filmado para análise e os fatores observados e registrados foram: tempo de permanência nos braços abertos, fechados, plataforma central e entradas no braço fechado. Antes de cada início de testes, ele foi higienizado com álcool 5% (Pinto et al., 2012).

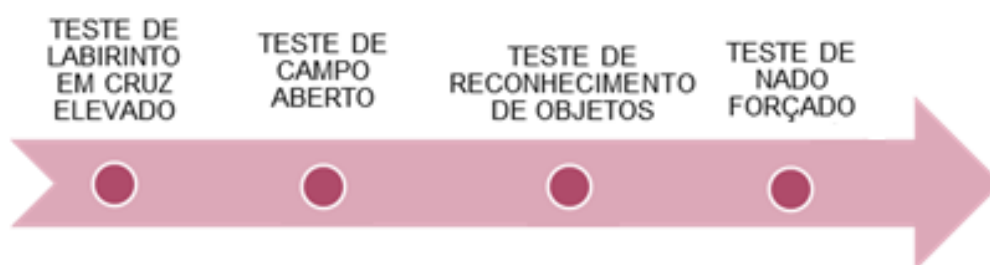
2. Teste de Campo Aberto (CA): Consiste em uma arena iluminada com bordas de 40 cm de altura, dividida em 25 quadrados (20 x 20 cm), onde o rato foi colocado no centro para explorar livremente a caixa por cinco minutos. O CA avalia a atividade motora dos animais através da quantificação da locomoção espontânea (Estrela et al., 2015) e também o comportamento semelhante ao da ansiedade por meio de do percentual de locomoção nos quadrantes centrais e periféricos (Prut; Belzung, 2003). O teste foi filmado e foram registrados e analisados os números de linhas cruzadas e número de levantamentos para exploração vertical. A arena foi limpa antes de cada teste com álcool 5%.

3. Teste de Reconhecimento de Objetos: Tem como objetivo avaliar a memória de reconhecimento. O aparato utilizado para esse teste é o mesmo do teste de CA. O teste foi realizado durante quatro dias consecutivos, sendo três dias para habituação do animal ao aparato de teste e um dia para a realização do teste, procedimento adaptado de Ennaceur e Delacour (1988). O animal foi colocado no centro do aparato e permanece nele por cinco minutos sem a presença de nenhum objeto. No 4º dia, o teste é realizado em dois momentos, com intervalo de 30 minutos entre cada exposição. No primeiro momento são colocados dois objetos idênticos no aparato, garrafas de plástico azul de 1 litro, cada qual estando em um dos lados da caixa a uma distância aproximada de 10 cm das paredes. O animal foi colocado no centro do aparato,

tendo ele cinco minutos para investigar estes objetos. O comportamento de investigação foi considerado quando o animal se aproximar ao menos dois centímetros a sua narina do objeto. Após 30 minutos do primeiro período de investigação o animal foi recolocado no aparato, porém, um dos objetos utilizados no primeiro período de investigação foi substituído por um novo objeto, garrafa de vidro marrom de modelo diferente da garrafa anterior, tendo o animal novamente cinco minutos para investigá-los.

4. Teste do Nado Forçado: Avalia o comportamento tipo depressivo dos ratos. Neste teste o rato foi colocado em um cilindro com 50 cm de altura e 20 cm de diâmetro, aproximadamente 2/3 do cilindro é completado com água (22 ± 2 °C). O teste é realizado em dois momentos, o primeiro foi o treino e o segundo o teste propriamente dito, separados por um intervalo de 24 horas. Durante o treino, o rato foi colocado para nadar por 15 minutos. No teste o animal permanece no cilindro por cinco minutos. Os animais foram filmados durante o teste, e os parâmetros observados foram: tempo e comportamento de imobilidade; tempo de escalada e tempo de natação. Ao fim de cada teste, os animais foram retirados e secos com toalhas (Estrela et al., 2015). A água foi trocada entre todos os testes, sempre iniciando com água limpa.

Figura 2 - Sequência de testes comportamentais.



Fonte: o autor.

Ao final dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400mg/Kg), via intraperitoneal, e então decapitados para coleta de sangue para análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Então, foram retirados os rins, fígado e cérebro para análises bioquímicas de parâmetros oxidativos (DPPH• e ação sobre eritrócitos).

Nas amostras de sangue total, rins, fígado e cérebro, foram avaliados os efeitos bioquímicos (marcadores de estresse oxidativo e metabolismo) dos diferentes tratamentos realizados nos animais *Rattus Norvergicus albinus* Wistar com aproximadamente 74 dias de idade. A manipulação dos animais seguiu as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência

em Animais de Laboratório e este protocolo foi submetido para aprovação do Comitê de ética em Pesquisa no uso de animais.

3.2.3.3 Ação *scavenger* das amostras de tecidos sobre radical DPPH•

A ação das amostras de homogenato de tecidos (fígado, rins e cérebro) sobre radicais livres foi avaliada por meio do decréscimo da absorbância em 531nm da solução de DPPH• (2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl; Sigma-Aldrich) na concentração de 60 µM em etanol absoluto, segundo Soares et al. (1997).

3.2.3.4 Ação *scavenger* das amostras de sangue sobre radical DPPH•

A ação das amostras de soro do sangue dos animais sobre radicais livres foi avaliada por meio do decréscimo da absorbância em 531nm da solução de DPPH• (2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl; Sigma-Aldrich) na concentração de 60 µM em etanol absoluto, segundo SOARES et al. (1997).

3.2.3.5 Ação sobre eritrócitos

As amostras de Sel, Ket, AA e sua associação (Sel.Ket.AA) e controles negativo (tampão e hemácias) e 100% hemólise (20,0 µg.mL⁻¹ água), foram mantidas na incubadora (*shaker*) às condições de 37 °C, 150 rpm com a solução de hemácias (3%) contendo 1,08 g.L⁻¹ de glicose, 0,3 g.L⁻¹ de penicilina e 0,5 g.L⁻¹ de estreptomicina (Cruz Silva et al., 2001).

Nos tempos de 1; 3; e 6 h, as amostras foram centrifugadas (5 minutos, 4°C, 1200 xG) e o conteúdo de hemoglobina liberado, devido à ação citotóxica das preparações, foi determinado pela leitura do sobrenadante, através do registro da absorbância $\lambda = 540$ nm. A análise foi efetuada em triplicata e os dados foram exibidos em percentual de hemólise, o qual foi calculado de acordo com a Equação 3:

$$\% \text{ Hemólise} = (\text{Absa} / \text{Abscp}) \times 100$$

(Equação 3)

onde:

Absa: absorbância da amostra;

Abscp: absorbância do controle positivo, o qual apresentou 100% de hemólise.

3.2.4 Análise Estatística

A normalidade e homogeneidade dos dados foram previamente verificadas pelo teste de Shapiro-Wilk e Teste de Levene respectivamente. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como Média $\pm$ DP. Foi realizada a análise de variância de uma via (ANOVA) com Posthoc de Tukey além do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis quando necessário, considerando-se significância estatística quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

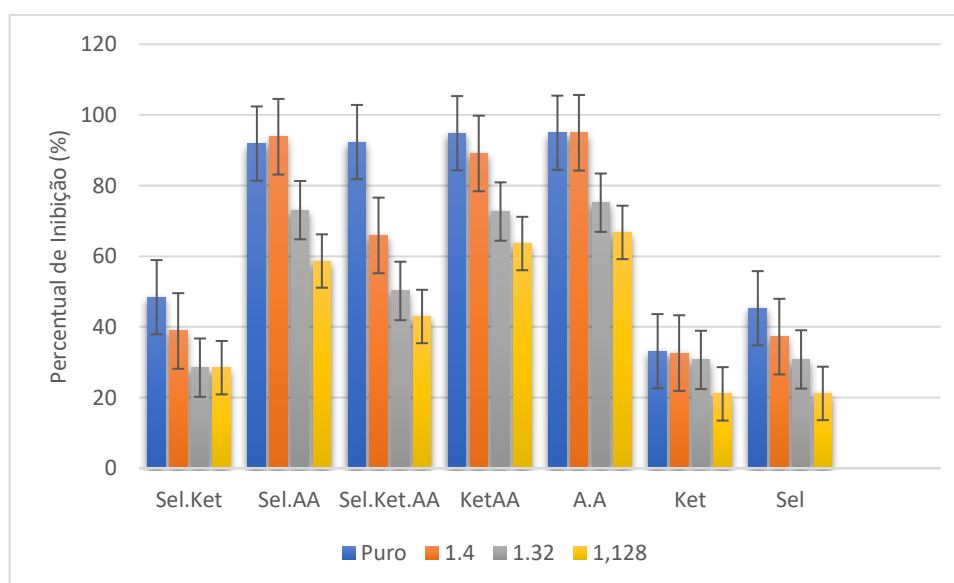
4.1 AVALIAÇÃO IN VITRO EM SISTEMAS OXIDATIVOS

4.1.1 Ação *Scavenger* das Amostras Sobre o Radical ABTS•+

A atividade antioxidante foi avaliada por medida colorimétrica da redução do ABTS•+. Inicialmente, uma mistura aquosa de ABTS ($7,0 \text{ mmol.L}^{-1}$) e persulfato de potássio ($2,45 \text{ mmol.L}^{-1}$) foi incubada em temperatura ambiente e sob o abrigo da luz por 12 horas, para a geração do ABTS•+. O ABTS•+ foi diluído em tampão fosfato de potássio $10,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 7,4 e registrada absorbância de 0,77 em comprimento de onda de 734 nm. A redução do ABTS•+ foi monitorada espectrofotometricamente após 30 minutos de incubação à 37°C e a absorbância expressa em 734 nm foi registrada (Ak, Gülçin, 2008).

A atividade antioxidante sobre o ABTS•+ das amostras foi investigada e comparada com um padrão interno (ácido gálico). No Gráfico 1, estão representados os percentuais de inibição do ABTS•+ para os dados avaliados.

Gráfico 1 - Percentual de inibição do radical ABTS•+ para associações de Sel (selênio), Ket (cetoprofeno) e A.A (ácido ascórbico) em diluições seriadas por 30 min de incubação em tampão fosfato salino (TFS) $10,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 7,4, à 37°C .



Fonte: o autor.

Observa-se que a presença do AA potencializa a atividade antioxidante do selênio quando comparamos a sua mistura (Sel.AA) com seu composto isolado (S). Isso é verificado

também para o cetoprofeno (Ket) quando em mistura Ket.AA e Sel.Ket.AA. Quando observamos a mistura dos 3 compostos essa ação antioxidante demonstra-se reduzida conforme aumento de diluição da amostra analisada.

Quando realizado o teste ANOVA de uma via observa-se diferencia significativa entre os grupos, temos menores medias de expressão do ABTS●+ ($0,13 \pm 0,10$) quando utilizada a combinação de Cetoprofeno + Ácido Ascórbico (Ket.AA) $p < 0,001$ (Tabela 1). Quando realizado o Posthoc de Tukey observa-se que em média a expressão do ABTS●+ do grupo SelKet é diferente do grupo Sel.AA e Ket.AA.

Tabela 1 - Média $\pm$ DP da expressão do ABTS●+ quando usado Cetoprofeno (Ket), Selênio (Sel) e Ácido Ascórbico (AA). ANOVA de uma via e Posthoc de Tukey.

Grupo	n	Média $\pm$ DP	P
SelKet	8	$0,52 \pm 0,05$	* $<0,001$
SelAA	8	$0,16 \pm 0,11$	
SelKetAA	8	$0,33 \pm 0,14$	
KetAA	8	$0,13 \pm 0,10$	

*Significância estatística quando $p < 0,05$. Grupos: SelKet (Selênio + Cetoprofeno), SelAA (Selênio + Ácido Ascórbico), SelKetAA (Selênio + Cetoprofeno + Ácido Ascórbico), KetAA (Cetoprofeno + Ácido Ascórbico).

Fonte: o autor.

Apesar do ácido ascórbico apresentar aplicabilidades biológicas multifuncionais, uma das principais e a mais descrita é a atividade antioxidante, devido ao seu grande número de substituintes hidroxilados e isso também pode ser observado quando analisamos o composto com o padrão interno (Ak e Gülçin 2008). O ácido ascórbico, por exemplo, atua na fase aquosa como um excelente antioxidante sobre os radicais livres, mas não é capaz de agir nos compartimentos lipofílicos para inibir a peroxidação dos lipídeos.

Contudo, a recomendação de suplementação dessa vitamina deve ser avaliada especificamente para cada caso, pois existem muitos componentes orgânicos e inorgânicos nas células que podem modular a atividade da vitamina C, afetando sua ação antioxidante (Lupulescu, 2003).

No que diz respeito ao Selênio níveis reduzidos de selênio, um elemento traço essencial para os seres humanos e animais, nas células e tecidos tem como consequência concentrações menores da enzima antioxidante glutathione peroxidase, resultando em maior

suscetibilidade das células e do organismo aos danos oxidativos induzidos pelos radicais livres (Scieszka et al., 1997). Há na literatura evidências de que a deficiência de selênio é um fator importante de predisposição no desenvolvimento de tumores.

Os estudos epidemiológicos mostram a relação inversa entre os níveis de selênio no plasma e a incidência de câncer (Fiala et al., 1998). Dados epidemiológicos também mostraram que o selênio pode interagir com as vitaminas na prevenção do desenvolvimento de tumores e na terapia da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Delmas-Beauvieux et al., 1996). Entretanto, outros resultados mostraram que a suplementação com esse mineral “antioxidante” pode aumentar os processos de carcinogênese, recomendando cautela na administração de selênio para os seres humanos (Birt, 1986).

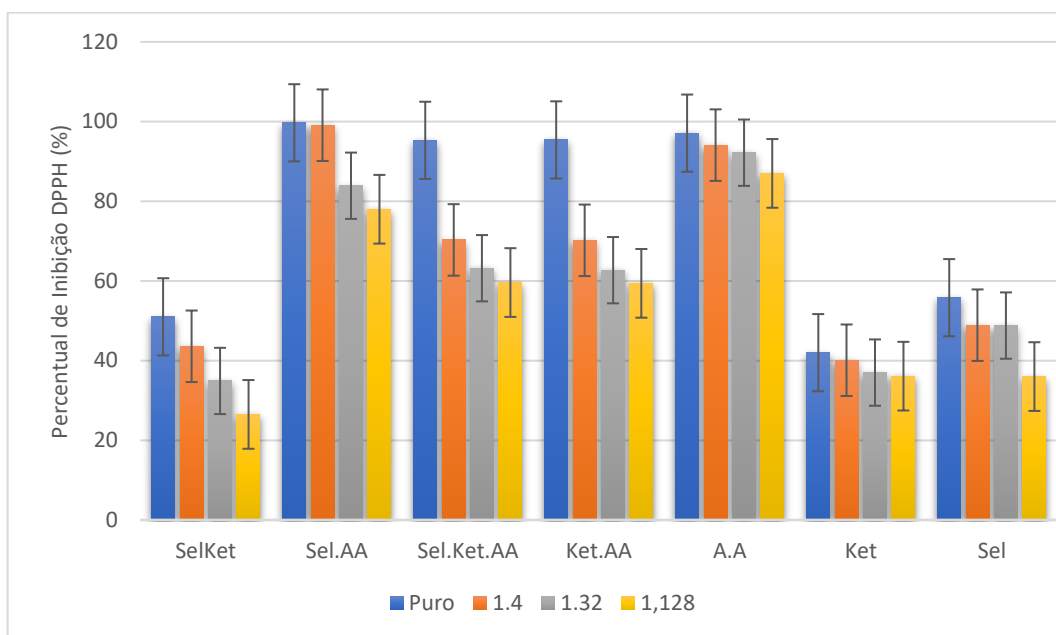
A respeito do cetoprofeno sabemos que esse medicamento pertence ao grupo de anti-inflamatórios não-estereoidais (AINES) (Levoir et al., 2004). Há controvérsias quanto à ação pró ou antioxidante destes fármacos. Alguns AINES afetam uma variedade de sistemas enzimáticos incluindo a glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione redutase (GR), xantina oxidase (XO), superóxido dismutase (SOD) e a mieloperoxidase (MPO). Isto pode resultar no aumento das concentrações de EROs dentro da célula assumindo um papel importante na patogênese dos danos (Villegas et al., 2000).

Portanto a associação desses componentes tende a ser benéfica, porém devem-se analisar os entroncamentos dessa associação devido aos efeitos colaterais que podem vir a gerar no organismo.

4.1.2 Ação *Scavenger* das Amostras Sobre Radical DPPH•

A avaliação da ação antioxidante também foi realizada por redução do radical DPPH•. As amostras foram submetidas a incubação por 30 minutos a 37°C e a redução do radical foi avaliado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 531nm.

Gráfico 2 - Percentual de inibição do radical DPPH•+ para associações de Sel (selênio), Ket (cetoprofeno) e A.A (ácido ascórbico) em diluições seriadas por 30 min de incubação em tampão fosfato salino (TFS) 10,0 mmol.L⁻¹, pH 7,4, à 37°C.



Fonte: o autor.

A partir dos resultados podemos avaliar similaridades dentre os dois métodos de avaliação para potencial antioxidante, padrões como alta taxa antioxidante do composto AA, e abaixo do percentual de inibição do radical DPPH pelos compostos K e S se repetem. Bem como o grupo Sel.Ket.AA dando novamente uma perspectiva que quando associados os compostos aumentam seu potencial antioxidante. Dessa forma, podemos observar a ação antioxidante dos compostos analisados é notável tanto para radicais artificiais como DPPH• e ABTS•+.

Quando realizado o teste Kruskal-Wallis observa-se diferencia significativa entre os grupos, pois a menor média de absorbância para expressão de DPPH• foi para Ácido Ascórbico ($0,04 \pm 0,01$); seguido pela combinação de Selênio + Ácido Ascórbico ($0,07 \pm 0,06$) $p < 0,001$ (Tabela 2) denotando que a menor absorbância maior a capacidade antioxidante dos compostos estudados. Houve diferença estatística significativa entre os grupos em relação ao grupo S.K.

Tabela 2. Média $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Expressão do DPPH• quando usada as combinações de Selênio + Cetoprofeno, Selênio + Ácido Ascórbico, Selênio + Cetoprofeno + Ácido Ascórbico, Selênio, Cetoprofeno e Ácido Ascórbico

Grupo	n	Média $\pm$ DP	Kruskal-Wallis	P
SelKet	8	0,11 $\pm$ 0,09	36,27	*<0,001
SelAA	8	0,07 $\pm$ 0,06		
SelKetAA	8	0,22 $\pm$ 0,11		
Sel	8	0,41 $\pm$ 0,05		
Ket	8	0,47 $\pm$ 0,02		
AA	8	0,04 $\pm$ 0,01		

*Significância estatística quando $p < 0,05$. Grupos: SelKet (Selênio + Cetoprofeno), SelAA (Selênio + Ácido Ascórbico), SelKetAA (Selênio + Cetoprofeno + Ácido Ascórbico), Sel (Selênio), Ket (Cetoprofeno) e AA (Ácido Ascórbico).

Fonte: o autor.

Owuor et al. (2006) conduziram um estudo para investigar o efeito antioxidante do selênio em células humanas e em sistemas modelo, utilizando o teste do radical DPPH•. Os resultados mostraram que o selênio, em concentrações adequadas, apresentou uma redução significativa do radical DPPH•, sugerindo uma ação antioxidante potente. A pesquisa indicou que o selênio pode ser utilizado como um agente antioxidante natural eficaz em doses controladas.

Kong et al. (2005) investigaram a capacidade antioxidante de ácido ascórbico usando o método DPPH•. Eles observaram que o ácido ascórbico demonstrou uma capacidade antioxidante significativa, com valores de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% da atividade do radical DPPH•) que indicam uma alta eficiência na neutralização dos radicais livres, corroborando com os resultados obtidos neste estudo, os quais demonstram maior atividade dos grupos contendo ácido ascórbico frente aos grupos que não continham.

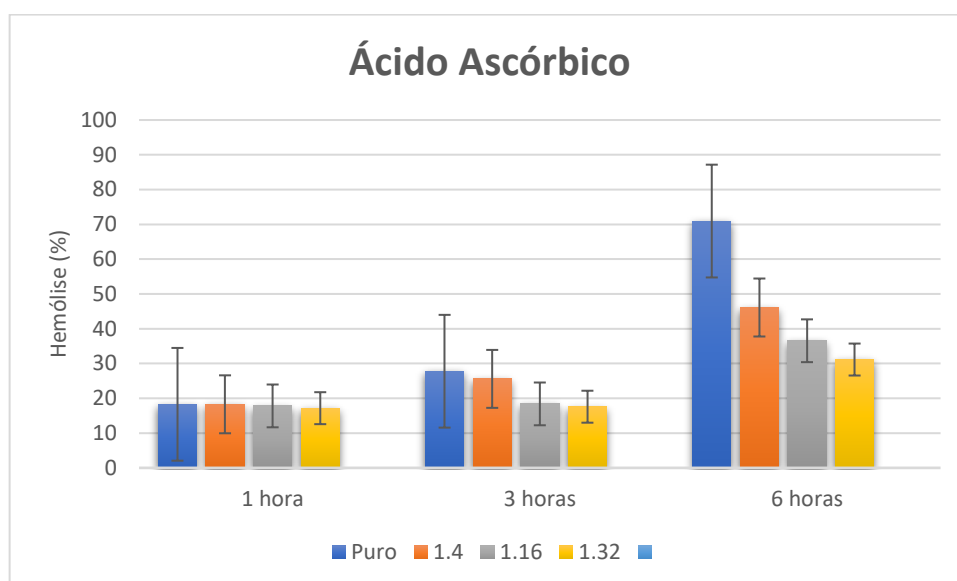
Santos et al. (2015) conduziram uma investigação sobre a atividade antioxidante de diversos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), incluindo o cetoprofeno, utilizando o ensaio de DPPH•. Os resultados mostraram que o cetoprofeno demonstrou atividade antioxidante significativa, reduzindo de forma dose-dependente o radical DPPH•. Esse efeito foi comparado com outros AINEs e com antioxidantes naturais, como a vitamina C, e o cetoprofeno se destacou por apresentar uma redução considerável do DPPH•.

4.2 EXPERIMENTAÇÃO *EX VIVO*

4.2.1 Ação Sobre Eritrócitos

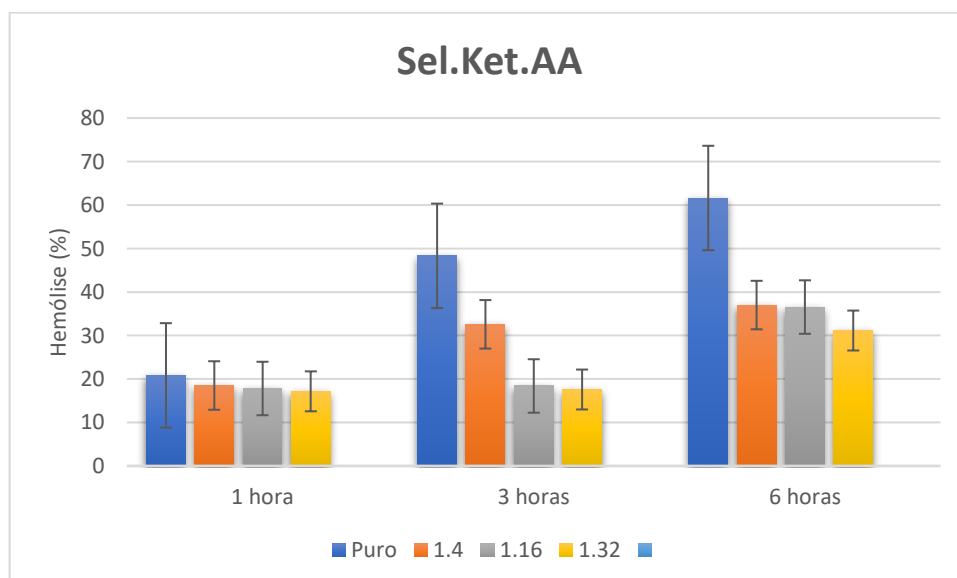
Esse estudo avaliou a citotoxicidade do Sel, AA, Ket, e suas combinações SelKet, SelAA, KetAA e SelKetAA sobre os eritrócitos e o resultado está representado nos gráficos 3,4,5 3 6.

Gráfico 3 - Atividade hemolítica do A.A em tampão sob modelo de hemólise por 1,3 e 6 horas à 37°C.



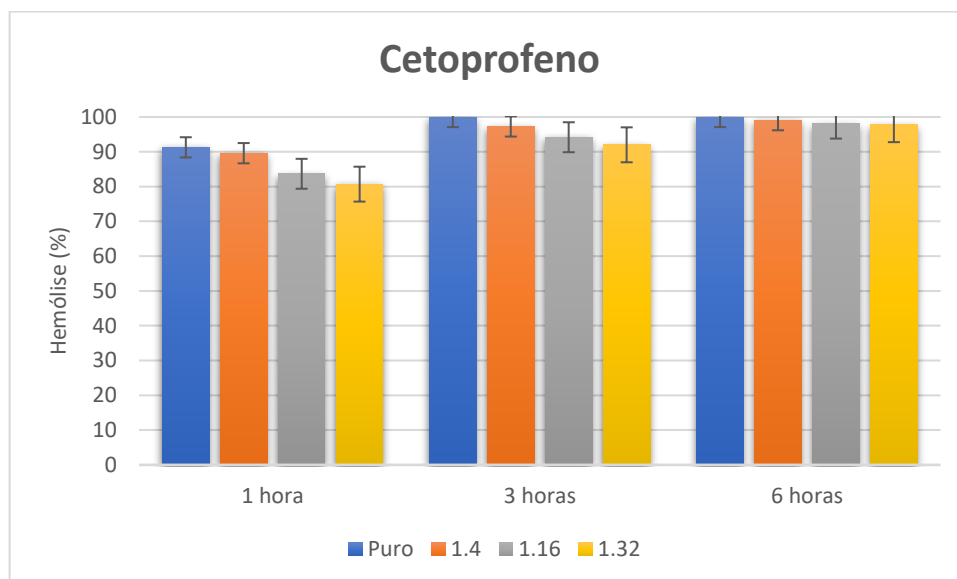
Fonte: o autor.

Gráfico 4 - Atividade hemolítica do Sel+Ket+A.A em tampão sob modelo de hemólise por 1,3 e 6 horas à 37°C.



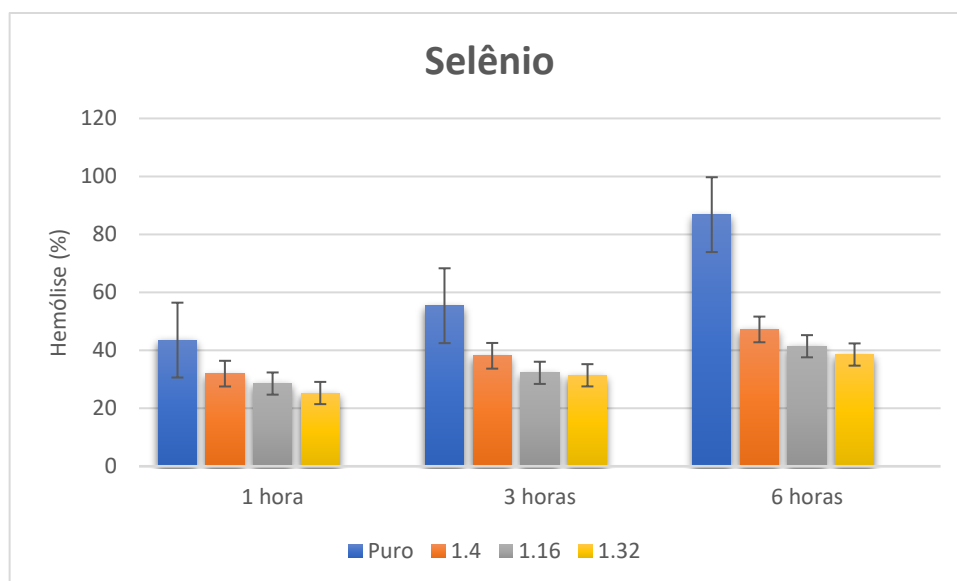
Fonte: o autor.

Gráfico 5- Atividade hemolítica do Ket em tampão sob modelo de hemólise por 1,3 e 6 horas à 37°C



Fonte: o autor.

Gráfico 6- Atividade hemolítica do Sel em tampão sob modelo de hemólise por 1,3 e 6 horas à 37°C



Fonte: o autor.

Cabe ressaltar que para a confiabilidade do ensaio, foi utilizado o controle 100% hemólise, composto por água destilada eritrócitos, sendo que esse exibiu em todos os tempos maior atividade hemolítica. Além disso, tampão/hemácias foi utilizado como controle positivo (Abs $0,07 \pm 0,02$), a ser comparado com as médias das Abs das demais amostras.

No tempo de 6h dentre as amostras, a associação de SelKetAA induziram menor atividade hemolítica. Dessa forma, sugere-se que a associação dos compostos estudados

estando em sua forma livre exibiram maior hemocompatibilidade com modelo estudado. Além disso, comparando os resultados obtidos para AA, em 1,3 e 6 horas, o Ket isolado foram responsáveis por maior dano aos eritrócitos em relação aos demais compostos (Gráfico 5).

Observa-se também que o AA provocaram menor atividade hemolítica quando comparada à S, mantendo constância de Abs ao longo do tempo. Experimentos de Spallholz (1993) demonstraram que o selênio possui a propriedade de causar danos em membranas eritrocitárias *in vitro*. Além disso, as reações entre selênio e glutathione foram capazes de produzir H_2O_2 (Yan & Spallholz, 1991).

Estudos usando hepatócitos isolados de ratos tratados com selenito mostram o possível envolvimento de espécies reativas de oxigênio como causa da ação citotóxica do selênio, sendo demonstrado que nestas células ocorreu um aumento na taxa de consumo de oxigênio (Kitahara et al., 1993).

Quando realizado o teste de Kruskal-Wallis observa-se diferença significativa entre os grupos no tempo de 1h dentre as amostras, a associação de SelKetAA induziu menor atividade hemolítica quando comparada com SelKet e SelAA ($X^2=8,40$; $P=0,038$) (tabela 3). Para os tempos de três horas ($X^2=6,23$; $P=0,101$) e seis horas ($X^2=4,49$; $P=0,213$) não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 3 - Média $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Efeito citotóxico do Cetoprofeno (Ket) quando associado ao Selênio (Sel) e Ácido Ascórbico (AA) sobre os eritrócitos tempo de reação de 1 Hora

Grupos comparados	n	Média $\pm$ DP	Kruskal-Wallis	P
SelKet	6	0,27 $\pm$ 0,02	8,40	*0,038
SelAA	6	0,29 $\pm$ 0,02		
KetAA	6	0,29 $\pm$ 0,00		
SelKetAA	6	0,27 $\pm$ 0,05		

*Significância estatística quando $p < 0,05$. Grupos: SelKet (Selênio + Cetoprofeno), SelKetAA (Selênio + Cetoprofeno + Ácido Ascórbico), KetAA (Cetoprofeno + Ácido Ascórbico), SelAA (Selênio + Ácido Ascórbico).

Fonte: o autor

Um estudo realizado por Santos et al. (2011) investigou a toxicidade do selênio em concentrações variadas, usando hemácias humanas em cultura. Os pesquisadores observaram que, enquanto concentrações baixas de selênio (na faixa de 1 a 5 μM) não causaram danos

significativos às células vermelhas, doses mais altas (acima de 10 μM) levaram a uma liberação crescente de hemoglobina, indicando a ocorrência de hemólise. Esse estudo destacou a importância de uma dose balanceada de selênio para evitar a toxicidade hemolítica, assim como obtivemos em nossos experimentos deste trabalho.

Em outro estudo isolado realizado por Souza et al. (2010), os pesquisadores investigaram o efeito do ácido ascórbico sobre hemácias humanas em cultura. Através de um experimento *in vitro*, foi observada uma redução significativa da integridade das hemácias quando expostas a concentrações muito altas de ácido ascórbico, especialmente na presença de agentes redutores como o ferro. A hemólise foi dose-dependente, com maiores taxas de ruptura das células em concentrações acima de 500 μM de ácido ascórbico. O estudo sugeriu que, em doses excessivas, o ácido ascórbico pode causar estresse oxidativo nas hemácias, levando à sua destruição.

Ainda em outro estudo realizado por Garcia et al. (2012) investigou a atividade hemolítica de diversos AINEs, incluindo o cetoprofeno, utilizando uma cultura de hemácias humanas. O estudo encontrou que, quando o cetoprofeno foi administrado em concentrações elevadas, houve uma liberação significativa de hemoglobina, sugerindo que o cetoprofeno tem uma capacidade de induzir hemólise em concentrações mais altas. Embora os efeitos tenham sido observados principalmente em modelos *in vitro*, os resultados sugerem que o cetoprofeno pode ter um potencial hemolítico, especialmente em indivíduos com condições predisponentes, como deficiências enzimáticas (por exemplo, deficiência de G6PD).

4.2.2 Antibacteriano

O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizado com as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, pelo método de micro diluição em placas de 96 poços, conforme já descrito anteriormente (CLSI, 2018). Observou-se crescimento negativo para todas as amostras testadas (Ket+Sel; Ket+AA; Ket+Sel+AA; Sel+AA; Ket; Sel e AA) frente a *S. Aureus* em todas as diluições testadas (1:2; 1:4 e 1:8). Isso pode ser devido à alta concentração dos compostos testados frente à sensibilidade da cepa frente aos compostos. Porém tal resultado não foi observado para a espécie *E. coli*, cujo resultado consta no Quadro 1.

Quadro 1 - Avaliação antimicrobiana frente as associações de Sel (selênio), Ket (cetoprofeno) e A.A (ácido ascórbico) em diluições seriadas por 24 horas à 37°C.

		Média (UFC)	Desvio Padrão
Controle Positivo		1471,7	±21,1
Controle Negativo		0	0
Ket+Sel	Puro	112,7	±7,6
	1:2	382,3	±6,9
	1:4	646,7	±9,8
Ket+A.A	Puro	135,7	±10,9
	1:2	512,7	±9,6
	1:4	1012,3	±18,4
Ket+Sel+A.A	Puro	416,0	±7,3
	1:2	598,0	±4,0
	1:4	917	±4,7
Sel+A.A	Puro	421,0	±15,3
	1:2	546,7	±32,9
	1:4	846,0	±28,0
Ket	Puro	0	0
Sel	Puro	0	0
AA	Puro	421,0	±15,3

Fonte: o autor

Comparando o efeito antimicrobiano entre os compostos nota-se que o Ket e o Sel em separado apresentaram taxa de crescimento de 0 (UFC) porém quando em associação nas três diluições testadas apresentaram taxa de crescimento. Sendo assim a associação desses compostos tende a diminuir sua eficácia. E essa discrepância é maior ainda quando há a associação junto com A.A onde Ket+Sel+A.A na maior concentração, apresenta taxa de $135 \pm 10,9$.

Portanto a inibição do crescimento das UFC utilizando os compostos sem associação foi maior que a verificada em ambas as associações (Ket+Sel; Ket+A.A; Sel+A.A e Ket+Sel+A.A), possivelmente, devido ao fato de que o Sel e Ket apresentarem efeitos antimicrobianos (Kezemi et. al., 2020; Kojouri et. al., 2020).

4.2.3 Antifúngico

Foram realizados ensaios *in vitro* para avaliar a atividade antifúngica dos compostos livres frente o crescimento de colônias de *C. albicans* 10231 VitroidsTM. Observou-se que todos os compostos em todas as diluições exibiram atividade antifúngica frente a espécies

citadas. O efeito inibitório dos compostos frente ao crescimento das cepas testadas não foi dose dependente visto que até na maior diluição dos compostos (1:128) houve inibição fúngica.

Como esse patógeno é de grande importância clínica, sendo agente etiológico predominante em infecções fúngicas invasivas, nas quais segundo estudos, o crescimento expressivo de suas hifas pode estar relacionado à patogenicidade (Höfs; Mogavero; Hube, 2016; Shrivash et al., 2018). Portanto esses resultados são promissores no que tange a eficácia desses compostos frente ao microrganismo estudado. Sabe-se que, o fungo *C. albicans* é um constituinte comensal da flora humana, podendo ser encontrado em superfícies mucocutâneas: pele, cavidade oral, do trato gastrointestinal e vaginal (Chen et al., 2016).

Corroborando esses dados, Sudbery, Gow e Berman (2004); Noble, Gianetti e Witchley (2016) relataram que o genoma de *C. albicans* tem revelado alterações alélicas responsáveis por codificarem fatores proteicos ligados à virulência e, dessa forma, esse organismo tem demonstrado resistência para a maioria das drogas usadas, por isso, novos alvos terapêuticos antifúngicos são de grande interesse para a comunidade científica.

Com relação ao efeito antifúngico dos compostos avaliados o ácido ascórbico, não apresenta muitos dados referente a sua ação antifúngica, porém SUN e colaboradores demonstraram que a suplementação de AA melhora efetivamente a eficácia de antifúngicos contra cepas de *C. albicans*, é relatado também o A.A que não apenas induz alta produção de ROS e estresse oxidativo, mas também interfere no metabolismo glicolítico ao inibir a atividade da enzima glicolítica GAPDH (Francesco et al, 2017).

O sulfeto de selênio é um ativo com ação antifúngica e bactericida. Utilizado em sua forma de sulfeto de selênio para no tratamento das seborreias do couro cabeludo. O sulfeto de selênio tem um efeito antimitótico, antibacteriano e antifúngica leve. Da mesma forma, complexos organometálicos à base de selênio metálico estão sendo aplicados como agentes farmacológicos e atividades antimicrobianas (W. Ahmad, et al, 2020).

Do mesmo modo, Raza e colaboradores (2023) demonstraram a eficácia do selênio como agente antifúngico. No que diz respeito ao cetoprofeno, não há indícios de sua ação antifúngica, portanto, a inibição pode se dever a alta dose aplicada nas placas contendo ágar, sendo o cetoprofeno puro tem característica ácida, interferindo no pH do meio (Kantor, 1986).

4.3 EXPERIMENTAÇÃO *IN VIVO*

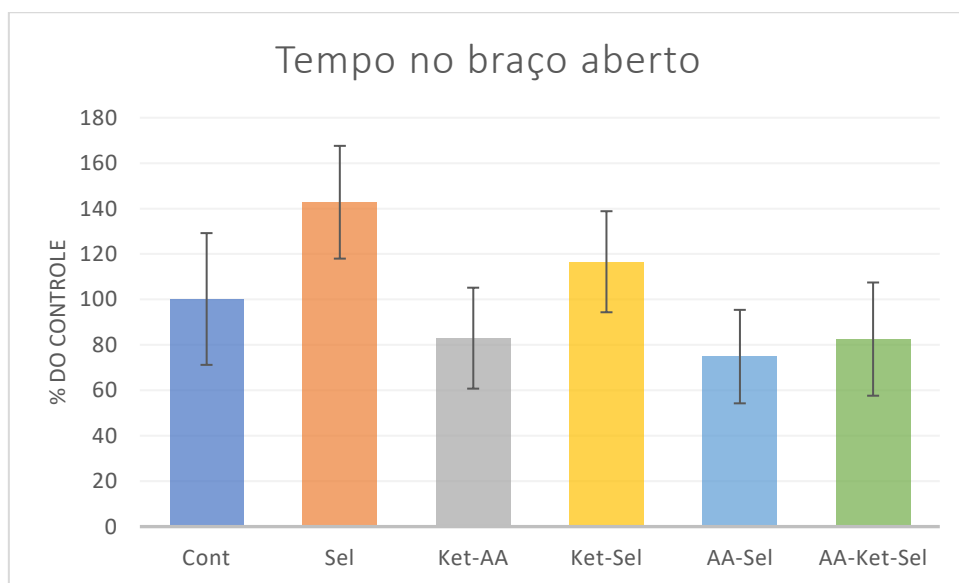
4.3.1 Testes Comportamentais

4.3.1.1 Labirinto em cruz elevado

O software utilizado identificou outliers, esses foram removidos e, por esse motivo, o grupo Cont (Controle) possui 10 animais.

Os dados do tempo no braço aberto do LCE não apresentaram distribuição normal e foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Esse mostrou haver diferença entre os grupos ($p=0,0780$). Na sequência, o pós-teste de Dunn apontou diferença significativa entre os grupos Ket-AA e AA-Sel ($p=0,0364$ (Gráfico 7)).

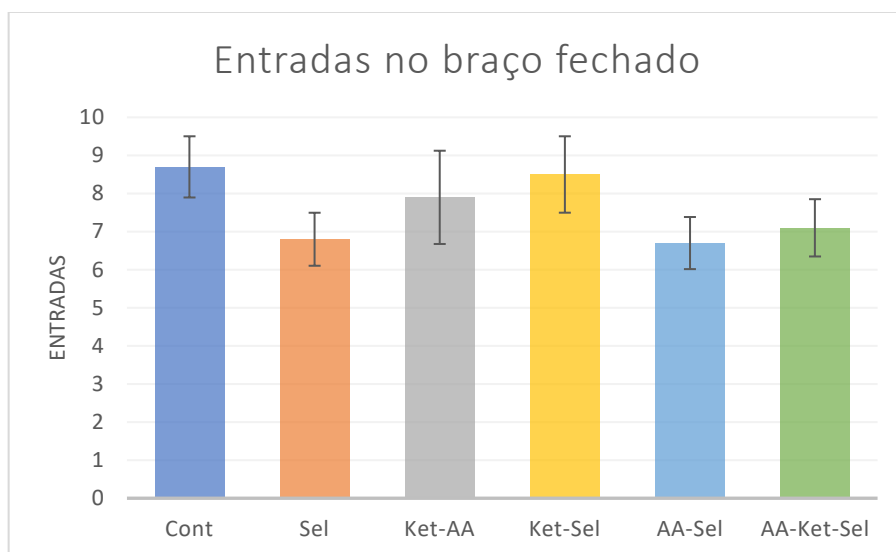
Gráfico 7 – Tempo no braço aberto do labirinto em cruz elevado. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) ($n = 10$), Sel ($n = 10$), Ket-AA ($n = 10$), Ket-Sel ($n = 10$), AA-Sel ($n = 10$) e AA-Ket-Sel ($n = 10$).



Fonte: o autor.

O número de entradas nos braços fechados podem ser uma medida para avaliar a atividade motora espontânea dos animais. Dessa forma, foi realizada a ANOVA de uma via para avaliar essa diferença. O teste estatístico não mostrou diferença entre os grupos ($F(3,42) = 0,7402$, $p=0,5342$) (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Número de entradas no braço fechado. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.



Fonte: o autor.

De acordo com o gráfico 8, observou-se que não houve diferença nos tempos de permanência nos braços abertos ou fechados, nem no número de entradas no braço fechado.

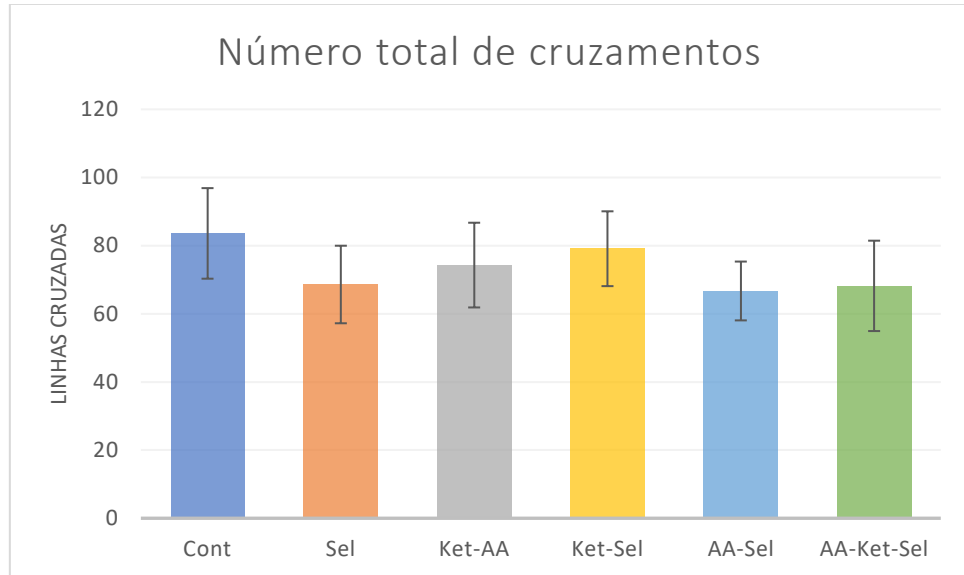
Os dados do tempo de permanência indicam que os tratamentos não tiveram efeito ansiogênico nem ansiolítico.

O número de entradas semelhante confirma os dados do campo aberto (ambulação e rearing) que indicam que não houve alteração motora.

4.3.1.2 Campo aberto

O gráfico 9 mostra o número total de cruzamentos realizados pelos animais no teste de campo aberto, que visa avaliar a atividade locomotora. O teste ANOVA de uma via apontou não haver diferença entre os grupos ($F(5,54) = 0,34$; $p = 0,89$), sendo esse o resultado esperado, pois mostra que os animais não possuem atividade motora comprometida.

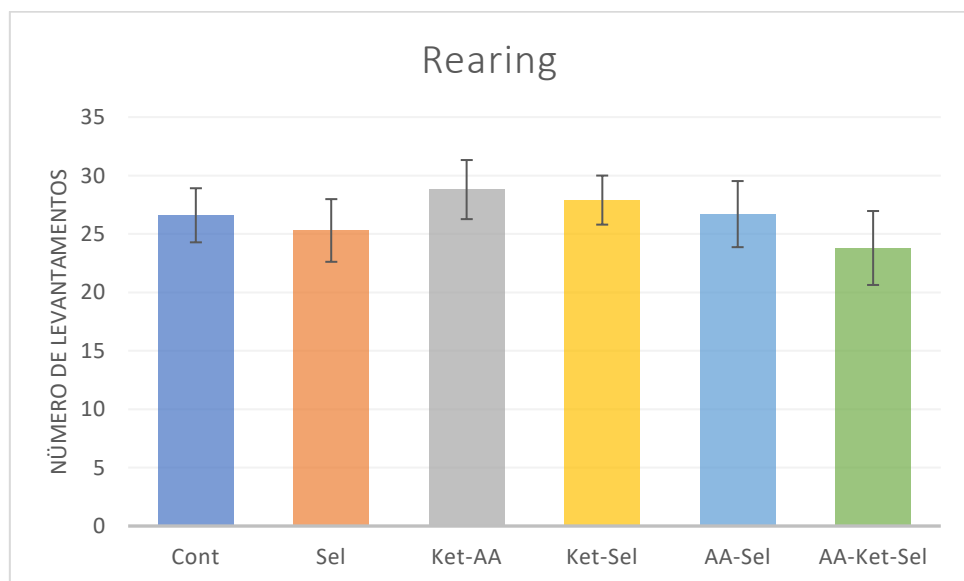
Gráfico 9 – Número total de linhas cruzadas no CA. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.



Fonte: o autor.

O gráfico 10 mostra o número de vezes que os animais realizaram a exploração vertical (*rearing*), no campo aberto. O teste ANOVA de uma via não apresentou diferenças entre os grupos $F(5,54)=0,47$; $p=0,80$.

Gráfico 10 – Número de levantamentos no CA. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.



Fonte: o autor.

Não houve diferença no número de linhas cruzadas durante a exploração (ambulação), no número de levantamentos para exploração vertical (*rearing*), nem nos tempos de permanência na área central da arena.

Os dados de ambulação e *rearing* indicam que os tratamentos não provocaram alteração motora. O tempo de permanência semelhante no centro indica que os tratamentos não foram ansiogênicos nem ansiolíticos.

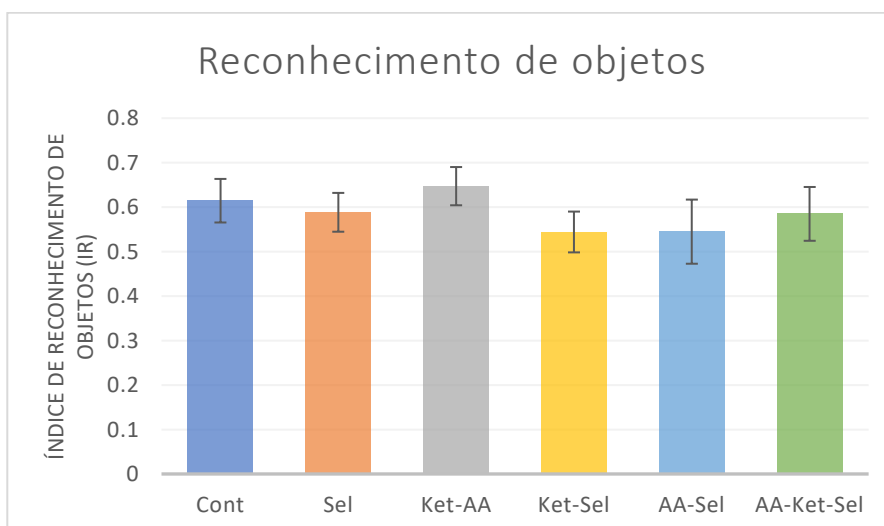
Com a análise dos dois primeiros testes comportamentais em conjunto, LCE e CA, podemos concluir que a ausência de diferença nos parâmetros de ambulação no campo aberto e no número de entradas no braço fechado do labirinto em cruz elevado indicam que os tratamentos não provocaram alteração motora.

Por outro lado, os tratamentos também não foram nem ansiolíticos ou ansiogênicos, uma vez que não houve diferenças nos tempos de permanência nos braços aberto e fechado do labirinto nem no tempo de permanência na área central do campo aberto.

4.3.1.3 Reconhecimento de objetos

O gráfico 11 mostra os resultados do índice de reconhecimento de objetos, que visa avaliar a memória de curto prazo dos animais, a sua tendência espontânea de explorar um objeto novo em relação a um já conhecido. Foi realizada a ANOVA de uma via que não identificou diferenças significativas entre os grupos ($F(5,55) = 0,56$; $p = 0,73$).

Gráfico 11 – Índice de reconhecimento de objetos. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.



Fonte: o autor.

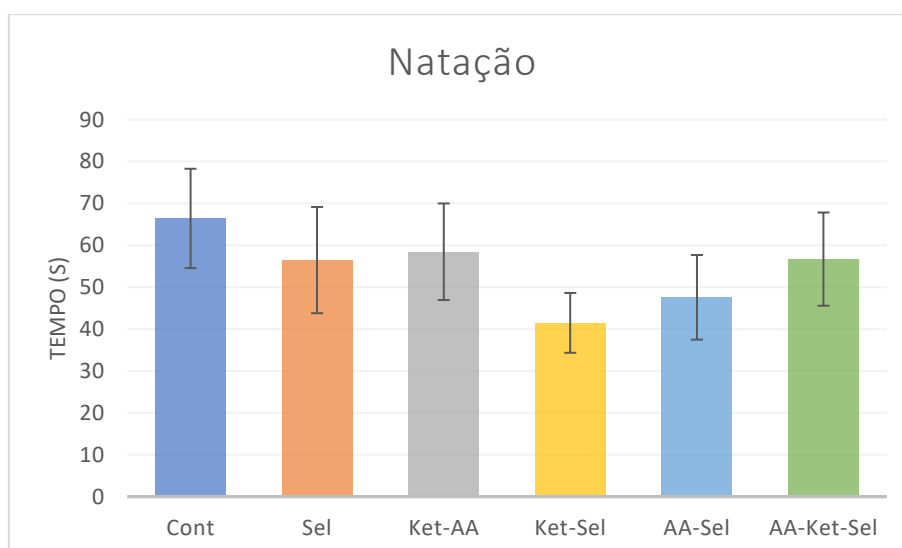
Não houve diferença significativa entre os índices de reconhecimento dos diferentes grupos, isso indica que a memória de curto prazo dos animais não foi alterada pelos tratamentos.

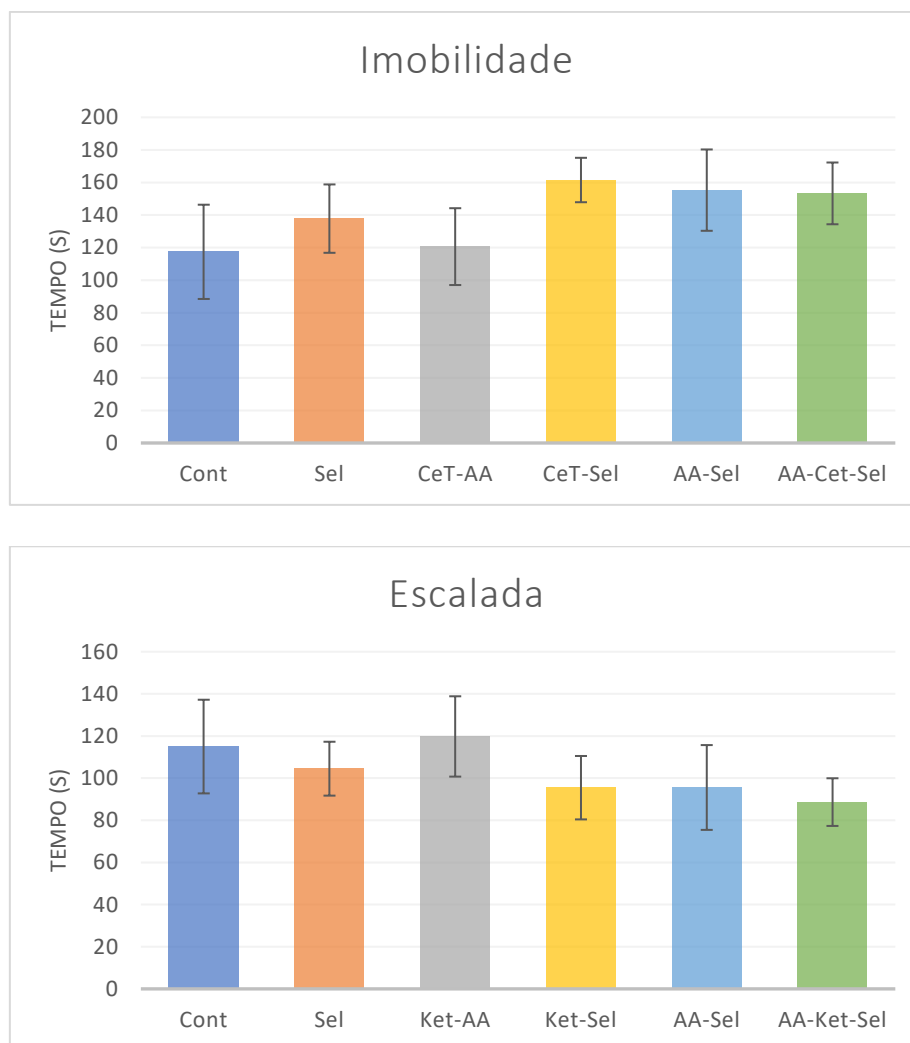
4.3.1.4 Nado forçado

No teste de nado forçado foram avaliados o tempo de natação (Gráfico 12-A), imobilidade (Gráfico 12-B) e escalada (Gráfico 12-C). Para os tempos de natação e imobilidade foi realizado a ANOVA de uma via. O teste não apontou diferenças significativas nos tempos de natação ($F(5,54) = 0,65$; $p = 0,68$) e no tempo de imobilidade ($F(5,54) = 0,70$; $P = 0,62$) entre os grupos.

Para o tempo de escalada foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, que também não mostrou diferenças entre os grupos ($p = 0,0397$). Tanto a suplementação com selênio, quanto as combinações não foram capazes de promover comportamento tipo depressivo ou antidepressivo nos animais.

Gráfico 12 – Tempo de natação (A), imobilidade (B) e escalada (C). Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) ($n = 10$), Sel ($n = 10$), Ket-AA ($n = 10$), Ket-Sel ($n = 10$), AA-Sel ($n = 10$) e AA-Ket-Sel ($n = 10$). Os dados de natação e imobilidade foram analisados pelo ANOVA de uma via. Os dados de escalada foram analisados usando o teste estatístico de Kruskal-Wallis.





Fonte: o autor.

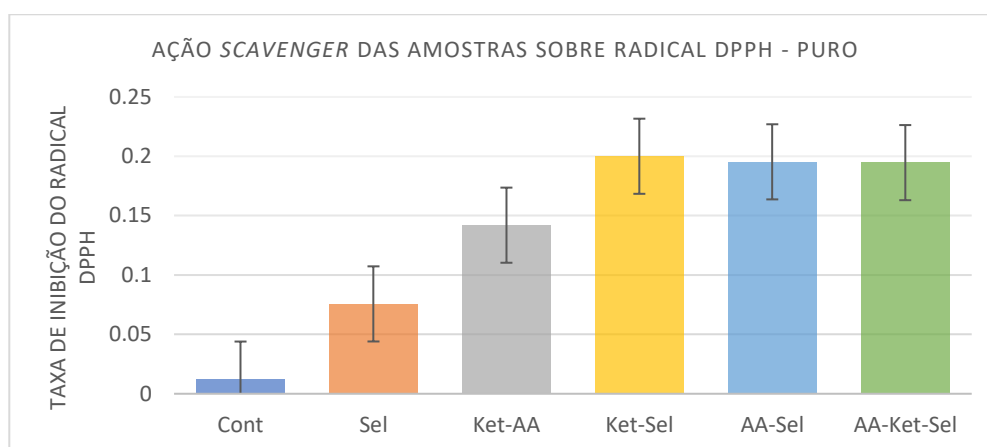
4.3.2 Testes Bioquímicos

4.3.2.1 Ação *scavenger* das amostras de tecidos sobre radical DPPH•

A avaliação da ação antioxidante também foi realizada por redução do radical DPPH•. As amostras foram submetidas a incubação por 30 minutos a 37°C e a redução do radical foi avaliado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 531nm.

Quando realizado o teste de Kruskal-Wallis observa-se efeito do grupo farmacológico sobre a expressão do DPPH nas amostras teciduais estudadas. A menor média observada para expressão do DPPH foi quando usado o selênio ($0,08 \pm 0,01$; $p = <0,001$) na sua forma pura, ou seja, lembrando que quando menores medias de absorbância maior foi o poder antioxidante (Gráfico 13).

Gráfico 13 – Ação scavenger das amostras de tecidos sobre radical DPPH• sem diluição. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.



Fonte: o autor.

A partir dos resultados podemos observar uma alta taxa de inibição do radical DPPH quando temos as combinações de Ket-AA, Ket-Sel, AA-Sel e AA-Ket-Sel. Sendo que as combinações de AA-Sel e AA-Ket-Sel possuem quase o mesmo potencial de inibição do radical DPPH. Destacando que o selênio quando sozinho, apresenta um potencial antioxidante de aproximadamente a metade das combinações e a combinação com melhor poder antioxidante é Ket-Sel para este experimento sem diluições.

Tabela 4 - Média $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Expressão do DPPH nos tecidos dos ratos Wistar quando não houve diluição das substâncias farmacológicas

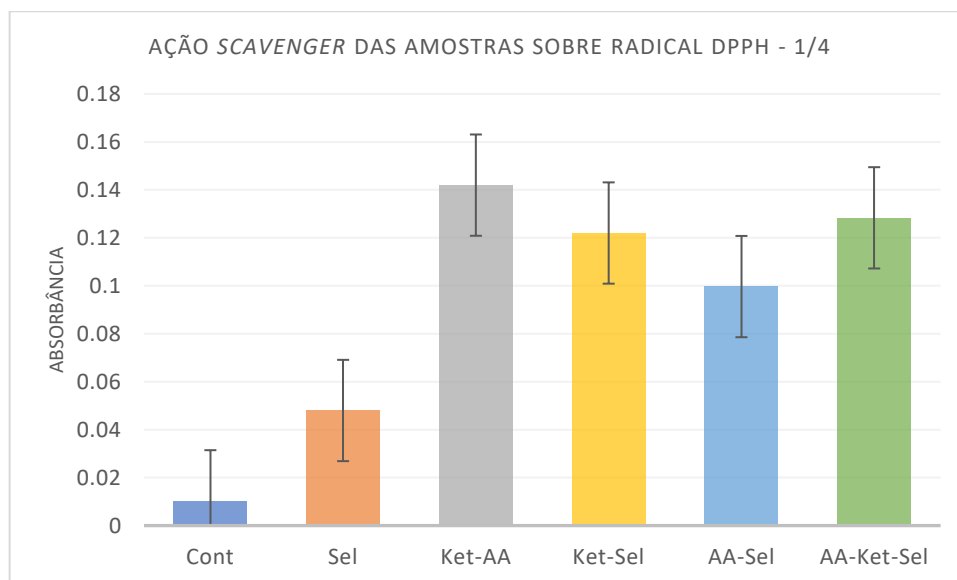
Grupos comparados	n	Média $\pm$ DP	Kruskal-Wallis	p
Salina	10	0,01 $\pm$ 0,00	51,50	* $<0,001$
Sel	10	0,08 $\pm$ 0,01		
Ket+ AA	10	0,15 $\pm$ 0,03		
Ket + Sel	10	0,21 $\pm$ 0,01		
AA + Sel	10	0,20 $\pm$ 0,02		
AA + Sel + Ket	10	0,19 $\pm$ 0,01		

*Significância estatística quando $p < 0,05$. Grupos: Salina, S (Selênio), Ket + AA (Cetoprofeno + Ácido Ascórbico), Ket + Sel (Cetoprofeno + Selênio), AA + Sel (Ácido Ascórbico + Selênio), AA + Sel + Ket (Ácido Ascórbico + Selênio + Cetoprofeno).

Fonte: o autor.

Quando analisada a expressão do DPPH nos tecidos estudados utilizando as substâncias farmacológicas a uma diluição de 1:4 observa-se a menor média para o selênio ($0,05 \pm 0,01$; $p < 0,001$) também (Tabela 5).

Gráfico 14 – Ação scavenger das amostras de tecidos sobre radical DPPH• na diluição 1/4. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.



Fonte: o autor.

A partir dos resultados da ação *scavenger* das amostras de tecidos sobre radical DPPH• na diluição 1/4, podemos observar um alta taxa de inibição do radical DPPH quando temos as combinações de Ket-AA, Ket-Sel, AA-Sel e AA-Ket-Sel. Nesta diluição as combinações AA-Sel e AA-Ket-Sel demonstram uma maior diferença entre si, quando comparado ao resultado sem diluição.

Também se observa um pequeno aumento no potencial de inibição da combinação AA-Ket-Sel em relação ao resultado sem diluição. Novamente destacamos que o selênio quando sozinho, apresenta um potencial antioxidante de aproximadamente a metade das combinações e a combinação com melhor poder antioxidante na diluição de 1/4 continuam é Ket-Sel para este experimento.

Tabela 5 - Média $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Expressão do DPPH nos tecidos dos ratos Wistar, diluição 1:4 das substâncias farmacológicas

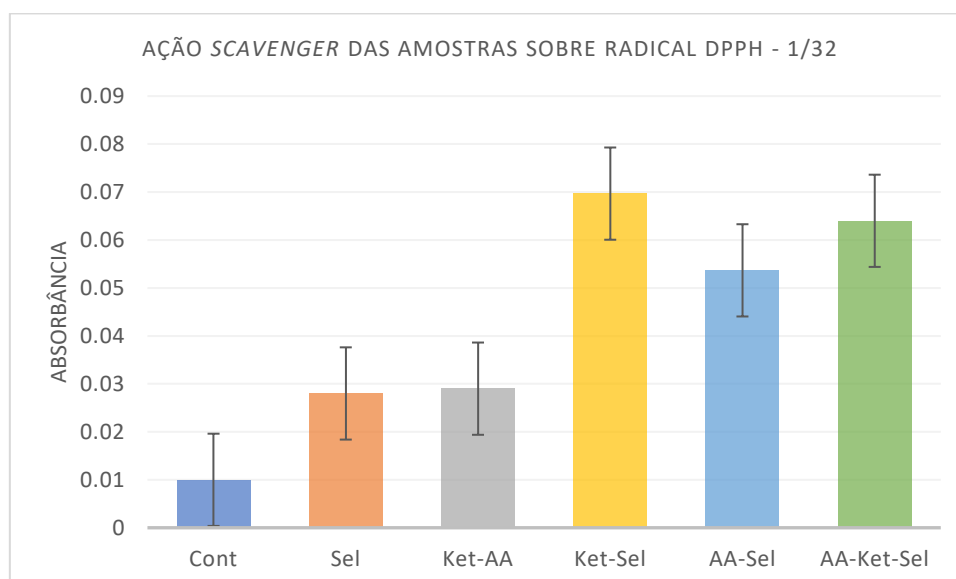
Grupos comparados	n	Média $\pm$ DP	Kruskal-Wallis	p
Salina	10	0,01 $\pm$ 0,00	51,65	*<0,001
Sel	10	0,05 $\pm$ 0,01		
Ket+ AA	10	0,07 $\pm$ 0,02		
Ket + Sel	10	0,12 $\pm$ 0,02		
AA + Sel	10	0,10 $\pm$ 0,02		
AA + Sel + Ket	10	0,13 $\pm$ 0,02		

*Significância estatística quando $p < 0,05$. Grupos: Salina, S (Selênio), Ket + AA (Cetoprofeno + Ácido Ascórbico), Ket + Sel (Cetoprofeno + Selênio), AA + Sel (Ácido Ascórbico + Selênio), AA + Sel + Ket (Ácido Ascórbico + Selênio + Cetoprofeno).

Fonte: o autor.

Quando analisada a expressão do DPPH nos tecidos estudados utilizando as substâncias farmacológicas a uma diluição de 1:32 observa-se a menor média para o grupo de selênio como também para o grupo Cetoprofeno + Ácido Ascórbico ($0,03 \pm 0,01$; $p < 0,001$) (Tabela 6). Quando realizada a comparação dentre os grupos observa-se que salina é diferente do grupo Ácido Ascórbico + Selênio e do grupo Ácido Ascórbico + Selênio + Cetoprofeno.

Gráfico 15 – Ação scavenger das amostras de tecidos sobre radical DPPH• na diluição 1/32. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.



Fonte: o autor.

A partir dos resultados da ação *scavenger* das amostras de tecidos sobre radical DPPH• na diluição 1/32, podemos observar um alta taxa de inibição do radical DPPH quando temos as combinações de Ket-Sel, AA-Sel e AA-Ket-Sel. Nesta diluição a combinação Ket-AA e Sel possuem um potencial antioxidante semelhante, o que não é observado nas outras diluições. Isso pode ser explicado pelo fato da dose mínima necessária para se ter um alto grau de inibição do DPPH não ter sido atingida quando temos esta diluição, porém, a atividade antioxidante ainda existe. Novamente destacamos que o selênio quando sozinho, apresenta um potencial antioxidante de aproximadamente a metade das combinações, juntamente com a combinação Ket-AA e a combinação com melhor poder antioxidante na diluição de 1/4 continuou sendo a Ket-Sel para este experimento.

Tabela 6 - Média $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Expressão do DPPH nos tecidos dos ratos Wistar, diluição 1:32 das substâncias farmacológicas

Grupos comparados	n	Média $\pm$ DP	Kruskal-Wallis	p
Salina	10	0,01 $\pm$ 0,00	50,11	* $<0,001$
Sel	10	0,03 $\pm$ 0,01		
Ket + AA	10	0,03 $\pm$ 0,01		
Ket + Sel	10	0,07 $\pm$ 0,02		
AA + Sel	10	0,05 $\pm$ 0,01		
AA + Sel + Ket	10	0,06 $\pm$ 0,01		

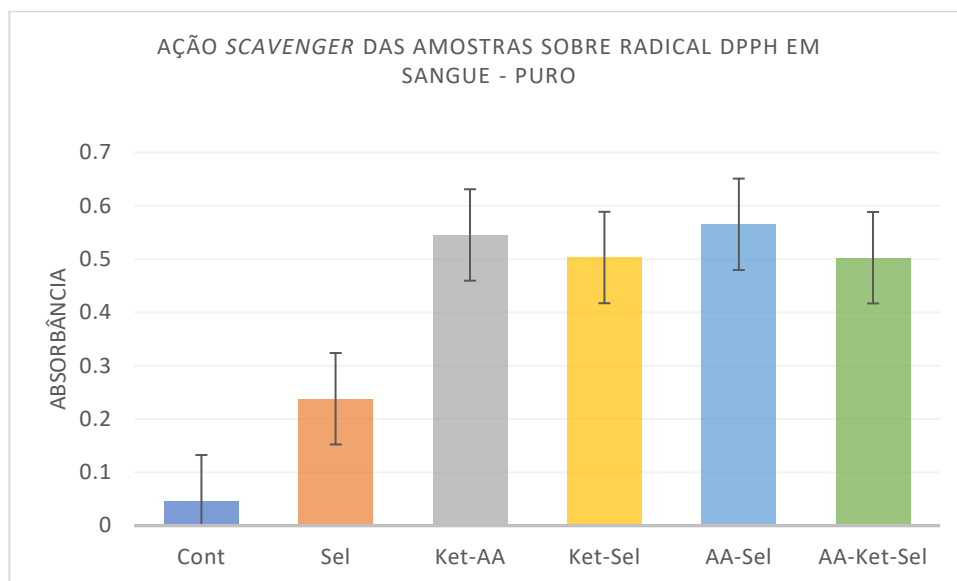
*Significância estatística quando $p < 0,05$. Grupos: Salina, S (Selênio), Ket + AA (Cetoprofeno + Ácido Ascórbico), Ket + Sel (Cetoprofeno + Selênio), AA + Sel (Ácido Ascórbico + Selênio), AA + Sel + Ket (Ácido Ascórbico + Selênio + Cetoprofeno).

Fonte: o autor.

4.3.2.2 Ação *scavenger* das amostras de sangue sobre radical DPPH•

Quando analisada a expressão do DPPH em sangue dos Ratos *Wistar* quando considerando as substâncias farmacológicas na sua forma pura observa-se por meio do teste de Kruskal-Wallis que a menor média foi para o grupo Selênio ($0,23 \pm 0,03$; $P = <0,001$) então o selênio mostrou ter maior capacidade antioxidante em relação aos outros grupos (Tabela 7).

Gráfico 16 – Ação scavenger das amostras de sangue sobre radical DPPH• na diluição sem diluição. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.



Fonte: o autor.

A partir dos resultados podemos observar um alta taxa de inibição do radical DPPH quando temos as combinações de Ket-AA, Ket-Sel, AA-Sel e AA-Ket-Sel. Sendo que as combinações de Ket-Sel e AA-Ket-Sel possuem quase o mesmo potencial de inibição do radical DPPH. Destacando que o selênio quando sozinho, apresenta um potencial antioxidante de aproximadamente a metade das combinações assim como as amostras de tecidos analisadas, e a combinação com melhor poder antioxidante é AA-Sel para este experimento sem diluições.

Podemos concluir que os resultados nas amostras de sangue são bastante parecidos com os resultados das análises feitas em amostras de tecidos. Porém, as combinações que melhor apresentou potencial antioxidante frente ao radical DDPH no sangue sem diluição foi a AA-Sel, já nos tecidos sem diluição foi a Ket-Sel. Isso pode ser explicado devido ao grande acúmulo de cetoprofeno que ocorre tanto no cérebro, quanto nos rins e fígado. Ao contrário da quantidade de ácido ascórbico que tende a ter um potencial absorvivo e uma meia vida maior que o cetoprofeno quando estamos tratando das amostras de sangue.

Tabela 7 - Média $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Expressão do DPPH em sangue dos ratos Wistar, quando não houve diluição das substâncias farmacológicas

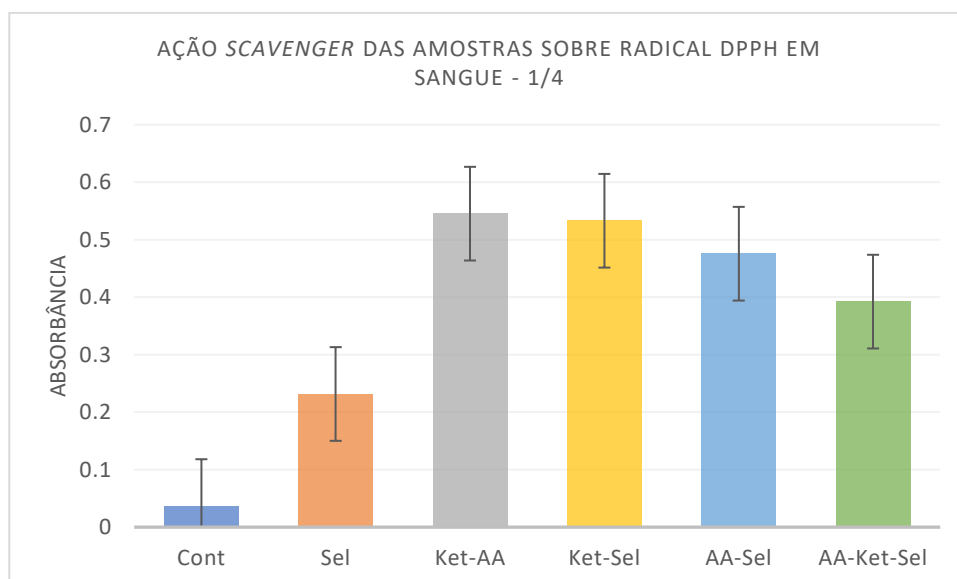
Grupos comparados	n	Média $\pm$ DP	Kruskal-Wallis	p
Salina	10	0,05 $\pm$ 0,00	51,14	* $<0,001$
Sel	10	0,23 $\pm$ 0,03		
Ket+ AA	10	0,55 $\pm$ 0,04		
Ket + Sel	10	0,50 $\pm$ 0,01		
AA + Sel	10	0,56 $\pm$ 0,04		
AA + Sel + Ket	10	0,50 $\pm$ 0,02		

*Significância estatística quando $p < 0,05$. Grupos: Salina, S (Selênio), Ket + AA (Cetoprofeno + Ácido Ascórbico), Ket + Sel (Cetoprofeno + Selênio), AA + Sel (Ácido Ascórbico + Selênio), AA + Sel + Ket (Ácido Ascórbico + Selênio + Cetoprofeno).

Fonte: o autor.

Quando analisada a expressão do DPPH em sangue dos Ratos Wistar diluindo as substâncias farmacológicas a uma proporção de 1:4 observa-se que a menor média foi para o grupo Selênio (0,23 $\pm$ 0,04; $p < 0,001$), seguido pelo grupo Ácido Ascórbico + Selênio + Cetoprofeno (0,40 $\pm$ 0,04; $p < 0,001$) (Tabela 8).

Gráfico 17 – Ação scavenger das amostras de sangue sobre radical DPPH• na diluição 1/4. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.



Fonte: o autor.

A partir dos resultados da ação *scavenger* das amostras de sangue sobre radical DPPH• na diluição 1/4, podemos observar um alta taxa de inibição do radical DPPH quando temos as combinações de Ket-AA, Ket-Sel, AA-Sel e AA-Ket-Sel. Nesta diluição as combinações Ket-AA e Ket-Sel demonstram um aumento no potencial antioxidante, quando comparado ao resultado sem diluição. Novamente destacamos que o selênio quando sozinho, apresenta um potencial antioxidante de aproximadamente a metade das combinações e a combinação com melhor poder antioxidante na diluição de 1/4 passou a ser a Ket-AA para este experimento. Isso pode ser explicado pelo longo tempo de meia vida que o ácido ascórbico possui em relação ao cetoprofeno. Fazendo com que a combinação contendo ácido ascórbico, apresentasse maior potencial antioxidante.

Tabela 8 - Média $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Expressão do DPPH em sangue dos ratos Wistar, diluição 1:4 das substâncias farmacológicas

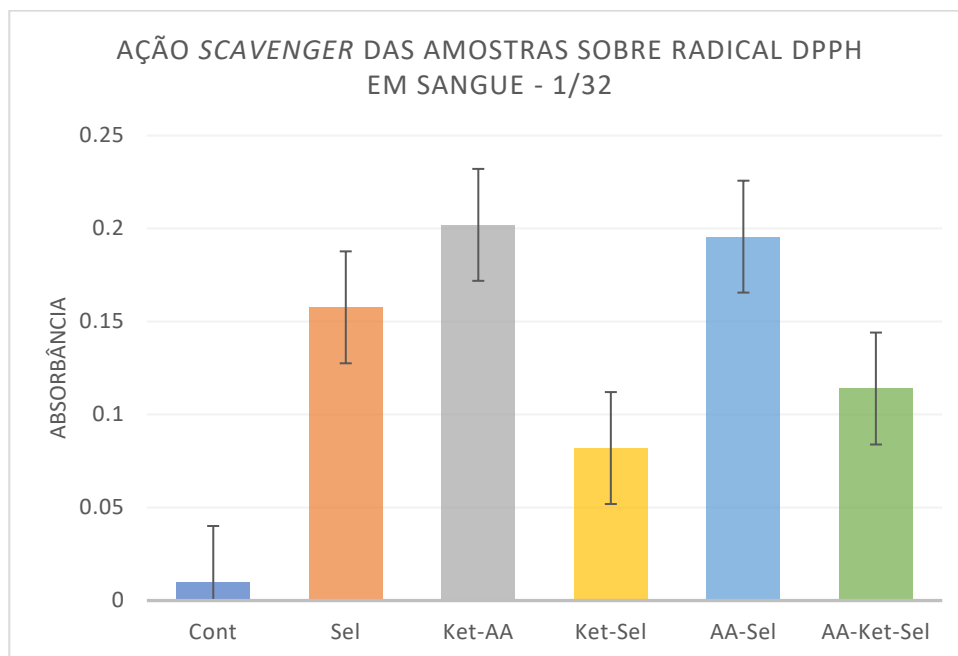
Grupos comparados	n	Média $\pm$ DP	Kruskal-Wallis	p
Salina	10	0,04 $\pm$ 0,00	50,89	* $<0,001$
Sel	10	0,23 $\pm$ 0,04		
Ket + AA	10	0,50 $\pm$ 0,05		
Ket + Sel	10	0,53 $\pm$ 0,06		
AA + Sel	10	0,48 $\pm$ 0,05		
AA + Sel + Ket	10	0,40 $\pm$ 0,04		

*Significância estatística quando $p < 0,05$. Grupos: Salina, Sel (Selênio), Ket + AA (Cetoprofeno + Ácido Ascórbico), Ket + Sel (Cetoprofeno + Selênio), AA + Sel (Ácido Ascórbico + Selênio), AA + Sel + Ket (Ácido Ascórbico + Selênio + Cetoprofeno).

Fonte: o autor.

Quando analisada a expressão do DPPH em sangue dos Ratos *Wistar* diluindo as substâncias farmacológicas a uma proporção de 1:32 uma vez realizado o teste de Kruskal-Wallis observa-se que a menor média foi para o grupo Cetoprofeno + Selênio ($0,08 \pm 0,02$; $p = < 0,001$) em relação aos outros grupos (Tabela 9).

Gráfico 18 – Ação scavenger das amostras de sangue sobre radical DPPH• na diluição na diluição 1/32. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM em Cont (Controle) (n = 10), Sel (n = 10), Ket-AA (n = 10), Ket-Sel (n = 10), AA-Sel (n = 10) e AA-Ket-Sel (n = 10). Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.



Fonte: o autor.

A partir dos resultados da ação *scavenger* das amostras de sangue sobre radical DPPH• na diluição 1/32, podemos observar um alta taxa de inibição do radical DPPH quando temos as combinações de Ket-AA e AA-Sel. Nesta diluição a combinação Ket-AA e AA-Sel possuem um potencial antioxidante semelhante, o que não é observado nas outras diluições. Nesta diluição, o selênio quando sozinho, apresenta um potencial antioxidante maior do que as combinações Ket-Sel e AA-Ket-Sel. Isso pode ser explicado pelo fato de o cetoprofeno ser absorvido pelo trato gastrointestinal, e uma quantidade já ser depositada em alguns órgãos, fazendo com que a concentração sanguínea do cetoprofeno diminua e consequentemente, o potencial oxidativo das combinações que contenham cetoprofeno também diminuam. A combinação com melhor poder antioxidante na diluição de 1/32 é a Ket-AA para este experimento.

Tabela 9 - Média $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Expressão do DPPH em sangue dos ratos Wistar, diluição 1:32 das substâncias farmacológicas.

Grupos comparados	n	Média $\pm$ DP	Kruskal-Wallis	p
Salina	10	0,01 $\pm$ 0,00	52,82	*<0,001
Sel	10	0,16 $\pm$ 0,03		
Ket + AA	10	0,20 $\pm$ 0,02		
Ket + Sel	10	0,08 $\pm$ 0,02		
AA + Sel	10	0,19 $\pm$ 0,03		
AA + Sel + Ket	10	0,09 $\pm$ 0,01		

*Significância estatística quando $p < 0,05$. Grupos: Salina, Sel (Selênio), Ket + AA (Cetoprofeno + Ácido Ascórbico), Ket + Sel (Cetoprofeno + Selênio), AA + Sel (Ácido Ascórbico + Selênio), AA + Sel + Ket (Ácido Ascórbico + Selênio + Cetoprofeno).

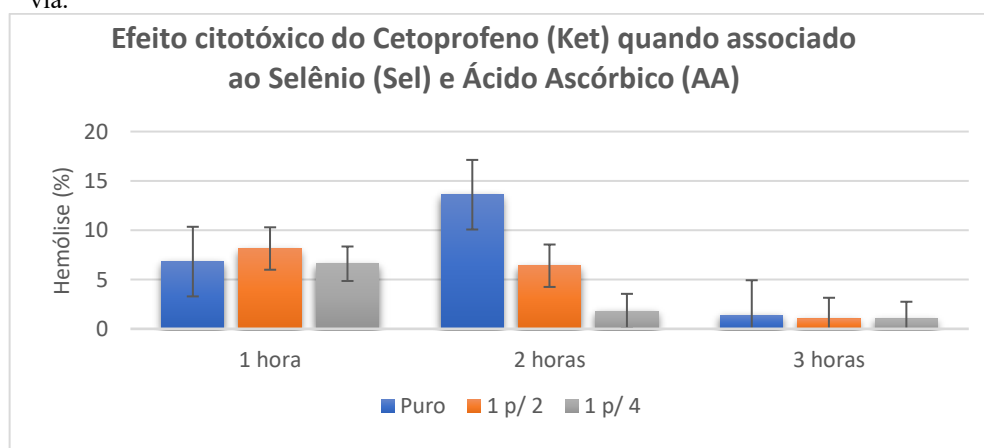
Fonte: o autor

4.3.2.3. Ação sobre eritrócitos

Quando analisada o efeito citotóxico das substâncias farmacológicas sobre os eritrócitos em Ratos Wistar não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos no tempo de 1 hora ($X^2=8,53$; $P=0,129$) e no tempo de três horas ($X^2=6,51$; $P=0,260$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Porém para o tempo de 6 horas observa-se que a menor média de citotoxicidade foi para os grupos de Selênio e ácido ascórbico + Selênio ($0,01 \pm 0,01$; $p=0,036$) diferente do grupo Cetoprofeno + Selênio que mostrou a maior média de citotoxicidade ($0,05 \pm 0,03$; $p=0,036$) estatisticamente significativo (Tabela 10).

Gráfico 19 – Efeito citotóxico do Cetoprofeno (Ket) quando associado ao Selênio (Sel) e Ácido Ascórbico (AA). Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. Os dados foram analisados pelo ANOVA de uma via.



Fonte: o autor.

Cabe ressaltar que para a confiabilidade do ensaio, foi utilizado o controle 100% hemólise, composto por água destilada e eritrócitos, sendo que esse exibiu em todos os tempos maior atividade hemolítica. Além disso, tampão/hemácias foi utilizado como controle positivo (Abs $0,08 \pm 0,02$), a ser comparado com as médias das Abs das demais amostras.

No tempo de 6h dentre as amostras, a associação de SelKetAA induziram menor atividade hemolítica em todas as diluições. Dessa forma, sugere-se que a associação dos compostos estudados estando em sua forma livre exibiram maior hemocompatibilidade com modelo estudado.

A concentração que mais nos mostrou porcentagem de hemólise foi a concentração pura em 2 horas de reação. Em 2 horas para a diluição 1/2 temos a porcentagem de hemólise caindo pela metade da concentração pura e na diluição 1/4 temos a porcentagem de hemólise caindo um pouco mais que a metade da diluição 1/2. Esse resultado também se repete no tempo de 6 horas de reação em todas as diluições.

Já no tempo de reação de 1 hora, a concentração 1/2 apresento potencial de hemólise um pouco elevado em relação ao esperado e aos outros resultados de outros tempos. Isso pode ser explicado pelo curto tempo de reação após a adição dos compostos nas amostras e também pela possível dificuldade de as hemácias absorverem os compostos nessa diluição.

Tabela 10 - Média $\pm$ DP Teste de Kruskal-Wallis: Efeito citotóxico do Cetoprofeno (Ket) quando associado ao Selênio (Sel) e Ácido Ascórbico (AA) sobre os eritrócitos em Ratos Wistar, tempo de reação de 1 Hora

Grupos comparados	n	Média $\pm$ DP	Kruskal-Wallis	p
Salina	3	$0,01 \pm 0,00$	11,91	*0,036
Sel	3	$0,01 \pm 0,01$		
Ket + AA	3	$0,01 \pm 0,00$		
Ket + Sel	3	$0,05 \pm 0,03$		
AA + Sel	3	$0,01 \pm 0,01$		
AA + Sel + Ket	3	$0,01 \pm 0,00$		

*Significância estatística quando $p < 0,05$. Grupos: Salina, Sel (Selênio), Ket + AA (Cetoprofeno + Ácido Ascórbico), Ket + Sel (Cetoprofeno + Selênio), AA + Sel (Ácido Ascórbico + Selênio), AA + Sel + Ket (Ácido Ascórbico + Selênio + Cetoprofeno).

Fonte: o autor.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados obtidos nos ensaios de ação *scavenger* das amostras sobre o radical ABTS•⁺, tem-se que a associação entre os componentes tende a ser benéfica para prevenir a oxidação dos sistemas. O mesmo se observou nos resultados obtidos para ação *scavenger* das amostras sobre radical DPPH•. Corroborando os resultados e provando a ação antioxidante dos sistemas. Nos testes *ex vivo*, tomando como base a ação sobre eritrócitos, concluiu-se que a associação dos componentes também foi benéfica para impedir a hemólise nos 3 tempos determinados. Outro ponto importante é que o ácido ascórbico em isolado provocou menor atividade hemolítica quando comparada ao selênio isolado. No teste antibacteriano, utilizando os microrganismos *Staphylococcus aureus*, observou-se crescimento negativo para todas as amostras testadas, tanto em isolado, quanto em associações. Comparando o efeito antimicrobiano entre os compostos nota-se que o Ket e o Sel em separado apresentaram taxa de crescimento de 0 (UFC) porém quando em associação nas três diluições testadas apresentaram taxa de crescimento. Sendo assim a associação desses compostos tende a diminuir sua eficácia. E essa discrepância é maior ainda quando há a associação junto com A.A onde Ket+Sel+A.A na maior concentração, apresenta taxa de $135 \pm 10,9$. Portanto a inibição do crescimento das UFC utilizando os compostos sem associação foi maior que a verificada em ambas as associações (Ket+Sel; Ket+A.A; Sel+A.A e Ket+Sel+A.A), possivelmente, devido ao fato de que o Sel e Ket apresentarem efeitos antimicrobianos.

No teste antifúngico, observou-se que todos os compostos em todas as diluições exibiram atividade antifúngica frente a espécies testadas. Sendo assim, podemos concluir que a associação entre selênio e ácido ascórbico apresenta um aumento na atividade antioxidante dos sistemas propostos.

Nos testes comportamentais, observou-se que no teste de labirinto em cruz elevado não houve diferença nos tempos de permanência nos braços abertos ou fechados, nem no número de entradas no braço fechado. O número de entradas semelhante confirma os dados do campo aberto (ambulação e *rearing*) que indicam que não houve alteração motora. No teste de campo aberto não houve diferença no número de linhas cruzadas durante a exploração (ambulação), no número de levantamentos para exploração vertical (*rearing*), nem nos tempos de permanência na área central da arena. Os dados de ambulação e *rearing* indicam que os tratamentos não provocaram alteração motora. No teste de reconhecimento de objetos não houve diferença significativa entre os índices de reconhecimento dos diferentes grupos. Isso indica que a memória de curto prazo dos animais não foi alterada pelos tratamentos. E no teste

de nado forçado, não houve diferença nos tempos de imobilidade, natação ou escalada. Isso indica que os tratamentos não tiveram efeito depressor nem antidepressivo.

Nos testes bioquímicos *in vivo* pudemos concluir que a combinação que possui maior potencial antioxidante nos tecidos é Ket-Sel, seguido de AA-Ket-Sel, AA-Sel e Ket-Sel. Lembrando que o selênio isolado apresentou metade do potencial antioxidante para este experimento. Já com relação aos experimentos antioxidante com sangue, a combinação com melhor potencial antioxidante foi a de AA-Sel, seguido de Ket-AA, Ket-Sel e AA-Ket-Sel. O selênio isolado apresentou metade do potencial antioxidante também para este experimento.

E por último, a ação da combinação Sel-Ket-AA sobre os eritrócitos, apresentou melhor potencial de hemólise no tempo de 1h de reação com a diluição de 1/4. O que explica a capacidade antioxidante/protetiva da combinação.

A relação entre cetoprofeno, selênio e ácido ascórbico (vitamina C) envolve aspectos importantes no que diz respeito à sua interação no organismo, especialmente em contextos de propriedades antioxidantes e suas funções biológicas.

Tanto o selênio quanto o ácido ascórbico possuem propriedades antioxidantes que podem proteger o organismo contra danos oxidativos. O cetoprofeno, por sua vez, ao ser administrado em tratamentos para dor e inflamação, pode provocar estresse oxidativo. Nesse contexto, o selênio e o ácido ascórbico atuam como moduladores, ajudando a reduzir esse estresse e a prevenir danos às células.

O ácido ascórbico e o selênio podem atuar sinergicamente na proteção contra o estresse oxidativo, complementando as ações antioxidantes de cetoprofeno, o que poderia potencialmente diminuir efeitos adversos dessa medicação.

O uso de cetoprofeno pode ser acompanhado de suplementos de vitamina C e selênio em alguns casos, visando reduzir os danos do estresse oxidativo, além de potencializar a ação terapêutica ao diminuir inflamações e promover a recuperação celular. (Lin, G. J. et al, 2013; Re, R. et al, 1999; Canter, P. H., 2007).

Este trabalho contribui para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais seguras. Subsidia a prática clínica ao considerar os benefícios da suplementação de Selênio e Ácido Ascórbico. Amplia o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no estresse oxidativo e seus impactos. Fornece insights sobre possíveis relações entre o uso de anti-inflamatórios, estresse oxidativo e condições depressivas.

REFERÊNCIAS

AK, TUBA; GÜLÇİN, İLHAMİ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions*, v. 174, n. 1, p. 27–37, 2008.

BERGGREN, M.; SÖRENSEN, M.; NORRMAN, K. Selenium in the human diet and its role in health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 62, p. 24–34, 2018.

CANTER, P. H.; WIDER, B.; ERNST, E. The antioxidant vitamins A, C, E and selenium in the treatment of arthritis: a systematic review of randomized clinical trials. *Rheumatology* (Oxford), v. 46, n. 8, p. 1223–1233, 2007.

CARR, A. C.; FREI, B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 69, n. 6, p. 1086–1107, 1999.

CASARRUBEA, M.; ROY, V.; SORBERA, F.; MAGNUSSON, M.S.; SANTANGELO, A.; ARABO, A.; CRESCIMANNO, G. Temporal structure of the rat's behavior in elevated plus maze test. *Behavioural Brain Research*, v. 237, p. 290–297, 2013.

CHALVIGNAC, B.; CLAVEL, J. P.; THUILLIER, A. Le sélénium: un oligo-élément essentiel d'actualité. *Les Actualités Pharmaceutiques*, n. 200, p. 20–25, 1983.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. *Método de referência para teste de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras*: Norma Aprovada. 2. ed. Norma M27-A2. Pennsylvania, 51 p., 2008.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

CRUZ SILVA, M. M.; MADEIRA, V. M.; ALMEIDA, L. M.; CUSTODIO, J. B. A. Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1464, n. 1, p. 49–61, 2000.

DA SILVA DANTAS A, DAY A, IKEH M, KOS I, ACHAN B, Quinn J. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules*, v. 5, n. 1, p. 142–165, 2015.

DE FRANCESCO EM, BONUCCELLI G, MAGGIOLINI M, SOTGIA F, LISANTI MP. Vitamin C and doxycycline: a synthetic lethal combination therapy targeting metabolic flexibility in cancer stem cells (CSCs). *Oncotarget*, v. 8, p. 67269–67286, 2017.

DELMAS-BEAUVIEUX, M.C. PEUCHANT, E., COUCHOURON, A., CONSTANS, J., SERGEANT, C., SIMONOFF, M., PELLEGRIN, J.L., LENG, B., CONRY, C., CLERC, M. The enzymatic antioxidant system in blood and glutathione status in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients: effects of supplementation with selenium or β -carotene. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 64, n. 1, p. 101–107, 1996.

EL KOSSI, M. M.; ZAKHARY, M. M. Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke. *Stroke*, v. 31, n. 8, p. 1889–1892, 2000.

ENNACEUR, A., AND DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. *Behavioural Brain Research*, v. 31, p. 47–59, 1988.

ESTEVEZ, J. M., GOUVEIA, A., & FERNANDES, P. Selenium: a nutrient with multiple effects on human health. *Clinical Nutrition Research*, v. 9, n. 4, p. 254–262, 2020.

ESTRELA, D. C.; MENDES, B. O.; SILVA, W. A. M.; GUIMARAES, A. T. B.; LEMES, C.G.C.; CHAVES, C. F.; MALAFAIA, G. Dieta de cafeteria, por 8 semanas, não causa tolerância à insulina em ratos Wistar. In: SEMANA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 5., 2014, Urutaí. *Anais [...]*. Urutaí: IF Goiano, 2015.

FAUL, F. et al. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, v. 39, p. 175–191, 2007.

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.

FIALA, E.S., STARETZ, M.E., PANDYA, G.A., EL--BAOUMY, K., HAMILTON, S.R. Inhibition of DNA cytosine methyltransferase by chemopreventive selenium compounds, determined by an improved assay for DNA cytosine methyltransferase and DNA cytosine methylation. *Carcinogenesis*, v. 15, n. 4, p. 597–604, 1998.

FISHER, A. B. Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 15, n. 3, p. 831–844, 2011.

FROHNER IE, BOURGEOIS C, YATSYK K, MAJER O, KUCHLER K. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Molecular Microbiology*, v. 71, n. 1, p. 240–252, 2009.

GARCIA, J. R., SILVA, M. L., & ROCHA, J. F. Evaluation of hemolytic activity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: in vitro study. *Toxicology Letters*, v. 210, n. 2, p. 118–123, 2012.

GISEV, N. et al. Use of analgesic medications in older people with persistent pain: an Australian population-based survey. *Journal of the American Geriatrics Society*, v. 66, n. 6, p. 1201–1208, 2018.

GRAHAM GG, DAVIES MJ, DAY RO, Mohamudally A, Scott KF. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology*, v. 21, n. 3, p. 201–232, 2013.

GUNZLER, W. A. *Some critical remarks on the determination of glutathione peroxidase in blood*. Stuttgart: Thieme, p. 180–183, 1974.

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

HARRISON FE, MAY JM., Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 46, n. 6, p. 719–730, 2009.

HARRISON: *Principles of Internal Medicine*. 10. ed. [S.l.]: [s.n.], 1983. p. 428–430, 460, 472, 558, 1661.

HATFIELD, D. L., & GLADYSHEV, V. N. The outcome of Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT) reveals the need for better understanding of selenium biology. *Molecular Interventions*, v. 9, n. 1, p. 18–21, 2009.

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

KATZUNG BG, TREVOR AJ. *Basic & Clinical Pharmacology*. 14. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018.

KITAHARA, J.; SEKO, Y.; IMURA, N. Possible involvement of active oxygen species in selenite toxicity in isolated rat hepatocytes. *Archives of Toxicology*, v. 67, p. 497–501, 1993.

KONG, W., & WEI, C. Antioxidant properties of vitamin C: a review. *Journal of Food Science*, v. 70, n. 5, p. R184–R189, 2005.

KRYUKOV, G. V., CASTELLANO, S., NOVOSELOV, S. V., LOBANOV, A. V., ZEHTAB, O., GUIGO, R., ... & GLADYSHEV, V. N. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, v. 300, n. 5624, p. 1439–1443, 2003.

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, 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.

LEVINE M, CONRY-CANTILENA C, WANG Y, WELCH RW, WASHKO PW, DHARIWAL KR, et al. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 8, p. 3704–3709, 1996.

LEVOIN N, BLONDEAUA C, GUILLAUMEA C, GRANDCOLAS L, CHRETIENB F, JOUZEUA JY, BENOIT E, CHAPLEUR Y, NETTER P, LAPICQUEA F. 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 GJ, HUANG SH, CHEN SJ, WANG CH, CHANG DM, SYTWU HK. Modulation by melatonin of the pathogenesis of inflammatory autoimmune diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 6, p. 11742–11766, 2013.

LUPULESCU, A. The role of vitamins A, β -carotene, E and C in cancer cell biology. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, v. 63, n. 3, p. 3–14, 2003.

MAES M, et al. The oxidative & nitrosative stress (O&NS) pathways in the major psychiatric disorders. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, v. 13, n. 5, p. 567–584, 2014.

MILLS, G. C., RANDALL, H. P. J. Bioi. *Journal of Biological Chemistry*, v. 232, p. 589–598, 1958.

MORETTI M, FRAGA DB, RODRIGUES ALS., Ascorbic acid to manage psychiatric disorders. *CNS Drugs*, v. 31, n. 7, p. 571–583, 2017.

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

NEWTON HMV, MORGAN DB, SCHORAH CJ, HULLIN RP., Relation between intake and plasma concentration of vitamin C in elderly women. *British Medical Journal*, v. 287, n. 6403, p. 1429, 1983.

OWUOR, P. O., & LEE, M. Y. Selenium as an antioxidant and its role in the prevention of oxidative stress-induced diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 40, n. 9, p. 1640–1648, 2006.

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. 379–385, 1999.

PETERSON F.J., LINDEMANN N.J., DUQUETI'E PH, HOLTZMAN J.L.: Potentiation of acute acetaminophen lethality by selenium and vitamin E deficiency in mice. *Journal of Nutrition*, v. 122, p. 74–81, 1992.

PINTO.W.B.V. R; LAPCHIK.V.B. V; ARIZA.C. B; KO.G. M; PORCIONATTO.M. Teste de labirinto em cruz elevado: aplicações no estudo de doenças neuropsiquiátricas em modelos animais. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciências Aplicadas ao Laboratório (RESBCAL)*, v. 1, p. 102–120, 2012.

PRESCRIRE EDITORIAL STAFF. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: avoid using intramuscular ketoprofen. *Prescrire International*, v. 25, n. 173, p. 271–273, 2016.

PROHASKA J.R.: Functions of trace elements in brain metabolism. *Physiological Reviews*, [S.l.], 1987.

PRUT. L; BELZUNG.C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.

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.

RAINSFORD KD. Profile and mechanisms of gastrointestinal and other side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *American Journal of Medicine*, v. 107, suppl. 6A, p. 27S–33S, 1999.

RAYMAN MP. Selenium and human health. *The Lancet*, v. 379, n. 9822, p. 1256–1268, 2012.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. *The Lancet*, v. 356, n. 9225, p. 233–241, 2000.

RAZA, A., PARVEEN, S., MAJEED, M. I., NAWAZ, H., JAVED, M. R., IQBAL, M. A., RASHID, N., HAIDER, M. Z., ALI, M. Z., SABIR, A., MAHMOOD UI HASAN, H., & MAJEED, B. Surface-enhanced Raman spectral characterization of antifungal activity of selenium and zinc based organometallic compounds. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 285, 2023.

RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, PANNALA A, YANG M, RICE-EVANS C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

RUSSELL RM, SUTER PM., Vitamin and trace mineral deficiency and excess. In: KASPER, D. L. et al. (ed.). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 19. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2015.

SANTIAGO, R.M., BARBIERO, J., GRADOWSKI, R.W., BOCHEN, S., LIMA, M.M., DA CUNHA, C., ANDREATINI, R., VITAL, M.A. Induction of depressive-like behavior by intranigral 6-OHDA is directly correlated with deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin. *Behavioural Brain Research*, v. 259, p. 70–77, 2014.

SANTOS, J. A., LIMA, C. F., & RIBEIRO, A. S. Effects of selenium on human erythrocytes in vitro: a study of hemolytic activity. *Toxicology in Vitro*, v. 25, n. 2, p. 387–393, 2011.

SANTOS, M. G., & SILVA, R. A. Avaliação da atividade antioxidante de anti-inflamatórios não esteroides no ensaio do radical DPPH. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 58, n. 15, p. 7023–7028, 2015.

SCHNEIDER, F., FLOM, L. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, v. 348, p. 540–552, 1967.

SCIESZKA, M., DANCH, A., MACHALSKI, M., DROZDZ, M. Plasma selenium concentration in patients with stomach and colon cancer in the Upper Silesia. *Neoplasma*, v. 44, n. 6, p. 395–397, 1997.

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.

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

SMITH A, Johnson B. The role of oxidative stress in drug-induced tissue injury. *Pharmacological Reviews*, v. 72, n. 3, p. 803–829, 2020.

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

SOUZA, L. L., COSTA, M. F., & ALMEIDA, R. T. Effects of ascorbic acid on human erythrocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*, v. 24, n. 7, p. 2056–2060, 2010.

SUN, L., YE, X., DING, D., & KAI, L. Opposite effects of vitamin C and vitamin E on the antifungal activity of honokiol. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 4, p. 538–547, 2019.

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, 2007.

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, 2007.

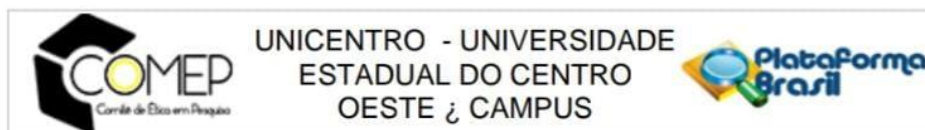
VILLEGAS I, Martin MJ, La Casa C, Motilva V, Alarcón de la Lastra C. Effects of meloxicam on oxygen radical generation in rat gastric mucosa. *Inflammation Research*, v. 49, n. 7, p. 361–366, 2000.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, v. 4, n. 5, p. 278–286, 2008.

YAN, L. & SPALLHOLZ, J. E. Free radicals generation by selenium compounds. *FASEB Journal*, v. 5, p. 581, 1991.

ZHANG X, et al. Selenium, selenoproteins, and aging: a review. *Nutrients*, v. 10, n. 12, p. 1804, 2018.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL BIOLÓGICO (NANOESTRUTURADOS OU ISOLADOS), SOBRE CÉLULAS NORMAIS E MICROORGANISMOS

Pesquisador: Najeh Maissar Khalil

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 08020818.3.0000.0106

Instituição Proponente: Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.231.864

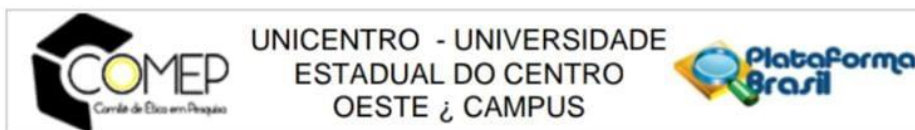
Apresentação do Projeto:

Trata-se da apreciação do projeto de Iniciação Científica intitulado AVALIAÇÃO DO EFEITO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL BIOLÓGICO (NANOESTRUTURADOS OU ISOLADOS), SOBRE CÉLULAS NORMAIS E MICROORGANISMOS, de interesse e responsabilidade do proponente Najeh Maissar Khalil.

A utilização de sistemas nanoestruturados, ou compostos isolados, no tratamento de doenças, baseia-se na sua habilidade de liberar doses concentradas de fármacos em locais específicos, pelo efeito de permeabilidade e retenção aumentadas e, conseqüentemente, reduzindo a exposição aos tecidos saudáveis e diminuindo a possibilidade de efeitos tóxicos. Com isso, o presente projeto tem por objetivo avaliar o potencial citotóxico de diferentes compostos, acoplados em sistemas nanoestruturados ou isolados, sobre células normais e sobre microrganismos.

Serão coletados 5 mL de sangue total de vinte indivíduos voluntários adultos saudáveis, em tubo de ensaio contendo anticoagulante. Todas as práticas de coleta sanguínea serão seguidas de acordo com a RDC nº 34 de 11 de Junho de 2014. O sangue será centrifugado por tempo e velocidade de rotação pré-determinado, a 4 °C, e então será retirado o plasma e a camada de leucócitos por aspiração. Em seguida, a suspensão de hemácias será lavada com solução de tampão fosfato 50 mM, 0,15 mM de NaCl pH 7,4 por três vezes. As hemácias serão ressuspensas em solução a ser

Endereço: Alameda Élio Antonio Dalla Vecchia, nº 838 - Campus CEDETEG - (ao lado dos laboratórios do curso de
Bairro: Vila Carli **CEP:** 85.040-167
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comepe@unicentro.br



Continuação do Parecer: 3.231.864

imediate e gratuita.

Benefícios:

Contribuir com uma nova proposta farmacêutica, que reduza os efeitos adversos e citotóxicos induzidos pelos fármacos utilizados no tratamento de doenças.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente pesquisa apresenta relevância científica com método adequado para atingir aos objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

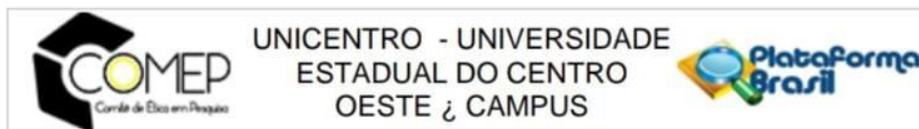
- 1) Check List inteiramente preenchido;
- 2) Folha de rosto com campos preenchidos e com carimbo identificador e assinada por Emerson Carraro - chefe do departamento de farmácia da unicentro;
- 3) Carta de anuência/autorização: Carimbada e assinada por Emerson Carraro - diretor da farmácia escola da Unicentro;
- 4) TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido). Anexado, com linguagem adequada e dentro do modelo disponibilizado pelo comep;
- 5) Projeto de pesquisa completo anexado pelo pesquisador;
- 6) Instrumento para coleta dos dados (questionário/roteiro/questões norteadora): Não se aplica.
- 7) Cronograma do projeto com vigência da pesquisa de 01/2019 a 30/11/2023. Início da coleta de dados: 15/05/2019.
- 8)- Orçamento: Apresentado na plataforma;

Recomendações:

(1)- Ressalta-se que segundo a Resolução 466/2012, item XI – DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL, parágrafo f), é de responsabilidade do pesquisador "manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa."

(2)- O TCLE, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, deve ser emitido em duas vias de igual teor. Todas as vias devem ser assinadas pelo pesquisador responsável e pelo participante. Uma via deverá ser entregue ao participante e a outra fará parte dos documentos do projeto, a serem mantidos sob a guarda do pesquisador.

Endereço: Alameda Élio Antonio Dalla Vecchia, nº 838 - Campus CEDETEG - (ao lado dos laboratórios do curso de
Bairro: Vila Carli **CEP:** 85.040-167
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep@unicentro.br



Continuação do Parecer: 3.231.864

definida, que dependerá da análise a ser executada. Diversas concentrações de sistemas nanoestruturados e/ou dos compostos serão incubados com a solução de hemácias em tempos diferentes, à 37 °C, com constante homogeneização. Após, a solução será centrifugada a 1200 G, a 4 °C, por 5 minutos. O conteúdo de hemoglobina será determinado no sobrenadante através da medida da absorbância em 540 nm (SILVA et al. 2001). Vale ressaltar que a abordagem aos participantes, a coleta e a análise das amostras serão realizadas no Farmácia Escola da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO).

Serão incluídos no estudo, indivíduos maiores de 18 anos, saudáveis e que aceitem voluntariamente participar da coleta de sangue.

Objetivo da Pesquisa:

Primário: Desenvolver sistemas nanoestruturados como carreadores de fármacos e analisar compostos isolados, com a finalidade de reduzir a citotoxicidade sobre hemácias e leucócitos, e avaliar capacidade antimicrobiana sob microrganismos. Os sistemas nanoestruturados a serem testados poderão ser obtidos utilizando diferentes polímeros e sistemas inorgânicos e/ou orgânicos, e os compostos a serem encapsulados nas nanopartículas ou testados isoladamente poderão pertencer a diferentes tipos de classes/grupos, por exemplo: produtos naturais, compostos orgânicos e/ou inorgânicos, compostos obtidos por síntese ou semi-síntese, produtos comercialmente disponíveis para uso na clínica médica, entre outros.

Secundário:

Analisar os sistemas/compostos sobre células normais (hemácias e leucócitos); Analisar os sistemas/compostos sobre espécies de microrganismos, fungos e/ou bactérias.

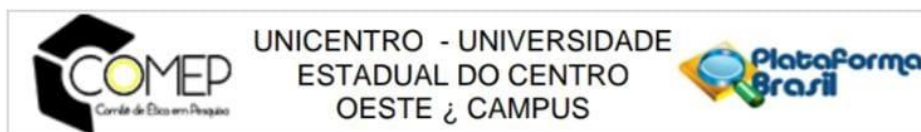
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador:

Riscos:

O procedimento utilizado será a coleta de sangue, sendo que esta poderá trazer desconforto devido a injúria ocasionada pela agulha. Serão preconizados as normas de biossegurança, utilizando agulhas e seringas descartáveis e antisepsia com álcool 70%. No caso da formação de hematoma ou abscesso cutâneo, o pesquisador tomará todas as providências para minimizar os efeitos da picada, como compressa gelada. Se você precisar de algum tratamento, por se sentir prejudicado por causa da pesquisa, ou sofrer algum dano decorrente da pesquisa, o pesquisador se responsabiliza pela assistência integral,

Endereço: Alameda Élio Antonio Dalla Vecchia, nº 838 - Campus CEDETEG - (ao lado dos laboratórios do curso de
Bairro: Vila Carli **CEP:** 85.040-167
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comepe@unicentro.br



Continuação do Parecer: 3.231.864

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A presente pesquisa está em conformidade com a Resolução 466/2012. Este CEP considera que todos os esclarecimentos necessários foram devidamente prestados, estando este projeto de pesquisa apto a ser realizado, devendo-se observar as informações presentes no item "Recomendações".

Considerações Finais a critério do CEP:

Em atendimento à Resolução CNS/MS- 466/2012, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório parcial assim que tenha transcorrido um ano da pesquisa e relatório final em até trinta dias após o término da pesquisa. Qualquer alteração no projeto deverá ser encaminhada para análise deste comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1263197.pdf	19/03/2019 16:26:20		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_atualizado.pdf	19/03/2019 16:25:50	Najeh Maissar Khalil	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta.pdf	14/02/2019 15:16:21	Najeh Maissar Khalil	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	14/02/2019 15:16:00	Najeh Maissar Khalil	Aceito
Outros	checklist.pdf	13/02/2019 15:06:52	Najeh Maissar Khalil	Aceito
Folha de Rosto	20181126145909846.pdf	26/11/2018 17:27:22	Najeh Maissar Khalil	Aceito

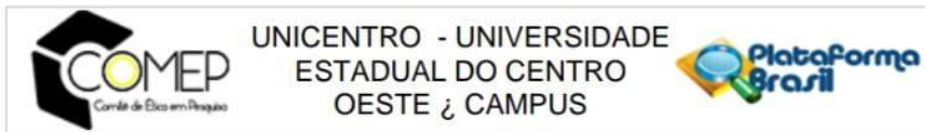
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Alameda Élio Antonio Dalla Vecchia, nº 838 - Campus CEDETEG - (ao lado dos laboratórios do curso de
Bairro: Vila Carli **CEP:** 85.040-167
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comepe@unicentro.br



Continuação do Parecer: 3.231.864

GUARAPUAVA, 29 de Março de 2019

Assinado por:
Maria Emilia Marcondes Barbosa
(Coordenador(a))

Endereço: Alameda Élio Antonio Dalla Vecchia, nº 838 - Campus CEDETEG - (ao lado dos laboratórios do curso de
Bairro: Vila Carli **CEP:** 85.040-167
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep@unicentro.br

ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO UEPG

31/05/2023, 16:24

SEI/UEPG - 1475041 - Carta



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

CARTA**CARTA DE APROVAÇÃO**

Protocolo UEPG – 23.000033744-1

Título – Efeitos bioquímicos e comportamentais da suplementação com selenio e ácido ascórbico na presença de cetoprofeno.

Interessado – Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro

e-mail: mferro@uepg.br

Data de Entrada – 24/05/2023

Vigência – 01/06/2023 a 31/05/2025

Resultado: Aprovado

Considerações

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), estabelecida pelo Conselho Nacional para fins de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizado o uso de 60 (sessenta) ratos wistar (machos).

Obs. Necessidade de envio de relatório final após 60 dias da conclusão do projeto.



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Ricardo Vicari, Membro da Comissão - PROPESP/CEUA**, em 31/05/2023, às 16:24, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **1475041** e o código CRC **E0AD9D6F**.

23.000033744-1

1475041v2