

**EFEITO DA COMPLEXAÇÃO DE METAIS AOS ANTIINFLAMATÓRIOS NA AÇÃO
CONTRA AGENTES OXIDATIVOS E RADICAIS LIVRES: AÇÃO DO
CETOPROFENO**

Francine Alessandra Manente¹, Lucas Rosolen de Almeida Mello¹, Omar Arafat Kdudsi Khalil², Cláudio Teodoro de Carvalho³, Gilbert Bannach⁴, José Carlos Rebuglio Velloso^{1,*}, ¹UEPG, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Ponta Grossa - PR, Brasil ²IFG, Instituto Federal de Goiás, Campus de Formosa, Formosa - GO, Brasil ³UFGD, Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologias, Dourados-MS, Brasil ⁴UNESP, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências de Bauru, Bauru -SP, Brasil *Autor para correspondência: Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, Ponta Grossa - PR, Brasil, CEP: 84030-900; telefone: +55-42-32203113; E-mail: josevellosa@yahoo.com.br (J.C.R.Velloso)

RESUMO

Os radicais livres são espécies altamente reativas geradas nos organismos vivos com a finalidade de proteção. Porém, em algumas circunstâncias, estes são responsáveis pela ocorrência ou o agravamento de danos teciduais. Muitos anti-inflamatórios apresentam ação direta sobre radicais livres

e espécies reativas não radicalares, o que contribui para suas ações contra a inflamação. O cetoprofeno é um antiinflamatório não esteroideal que gera radicais livres ao sofrer fotoirradiação e tem com isso um efeito hemolítico importante. A complexação de metais a diferentes fármacos tem sido utilizada como estratégia para melhorar a ação farmacológica de diferentes moléculas e reduzir seus efeitos colaterais. Neste trabalho são apresentados resultados do estudo de ação do cetoprofeno e seus complexos de cério e cobre sobre radicais livres e sobre eritrócitos. Observou-se que o cério intensifica as propriedades *scavenger* do cetoprofeno sobre radicais livres enquanto o cobre intensifica as ações sobre oxidantes não radicalares. O cobre ainda reduziu o efeito hemolítico apresentado pelo cetoprofeno e mantido pelo seu derivado de cério.

palavras-chave: cetoprofeno, hemólise, dano oxidativo, radicais livres

INTRODUÇÃO

Atualmente, existe uma demanda global por novos medicamentos devido a diferentes fatores, tais como a inexistência ou ineficácia de fármacos para a cura de algumas enfermidades (raiva, câncer e infecções) ou existência de reações adversas que impedem ou atrapalham a farmacoterapêutica (ex. antiinflamatórios não esteroideais – AINES) [1].

Dentre as estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos, a modificação molecular é uma das mais promissoras, oferecendo uma gama de possibilidades para a construção de novas moléculas. Tal estratégia pode incluir a hibridação molecular ou ainda, a formação de complexos [1, 2, 3]. Alguns complexos de cobre (Cu), que possuem propriedades antitumorais, são de grande interesse no processo inflamatório dada a função deste metal como co-fator em processos que envolvem os tecidos conectivos/articulares, o sistema imunológico, e seu efeito na síntese de prostaglandinas [4]. Neste sentido, alguns autores obtiveram melhores ações ou

reações adversas mais brandas ao complexar AINES e outros fármacos com metais. Saha et al. (2001) verificaram que a complexação do cobre a derivados do cetoprofeno, favorecia a ação antitumoral daquelas moléculas contra tumores responsivos a hormônios [5]. Desta forma, o estudo de complexos metálicos com potencialidade biológica é alvo de grande interesse no desenvolvimento de fármacos. Os AINEs são os medicamentos mais prescritos para dor, febre e inflamação. O cetoprofeno (CP; 3-*benzoyl-a-methylbenzeneacetic acid*) é um analgésico antiinflamatório não esteróide derivado do ácido propiônico, relacionado com o diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno e o ácido tiaprofênico. Este AINE inibe a atividade da enzima ciclooxigenase levando a uma diminuição da síntese de precursores das prostaglandinas e dos tromboxanos, a partir do ácido araquidônico [6, 7]. Entre as reações adversas que podem ocorrer pelo uso do CP cita-se a fototoxicidade, com a geração de radicais livres por ação dos raios ultravioleta. Neste processo, o cetoprofeno é decomposto gerando ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (OH^{\cdot}) e oxigênio singlete [8]. Desta forma, o CP promove danos nas membranas dos eritrócitos, leva à lise destas células [9] e, a partir das interações com a hemoglobina gera o radical nitrona [10].

Sabe-se que outros fatores, além da síntese de prostaglandinas, contribuem para a fisiopatologia dos processos inflamatórios, como é o caso da superprodução de espécies reativas de nitrogênio (RNS) e de espécies reativas de oxigênio (EROS) tais como o radical superóxido, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil, dentre

outros. Desta forma, o metabolismo celular produz espécies reativas que podem causar danos celulares, tecidual, protéico, lipídico e no próprio DNA, favorecendo o estresse oxidativo [11].

Nas últimas décadas, inúmeras pesquisas foram realizadas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiológicos e patológicos [12]. Tem sido relatado que alguns antiinflamatórios não esteroidais são capazes de agir como *scavengers* de radicais livres e espécies oxidantes não radicalares [13, 14]. Esses antiinflamatórios também podem inibir a explosão respiratória de neutrófilos desencadeada por vários agentes ativadores [6].

Considerando-se que: i) o processo inflamatório envolve a formação de radicais livres que causam danos tissulares, ii) alguns AINEs apresentam ação contra radicais livres e EROs e iii) o cetoprofeno pode gerar radicais livres e danificar membranas celulares, torna-se interessante analisar a ação do CP em modelos experimentais antioxidantes e como a complexação de metais interfere nessas propriedades.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cetoprofeno e derivados

O cetoprofeno foi comprado da Sigma Chemical Co. Com grau de pureza >98%. Os complexos de cobre e cério (figura 1) foram obtidos conforme descrito a seguir.

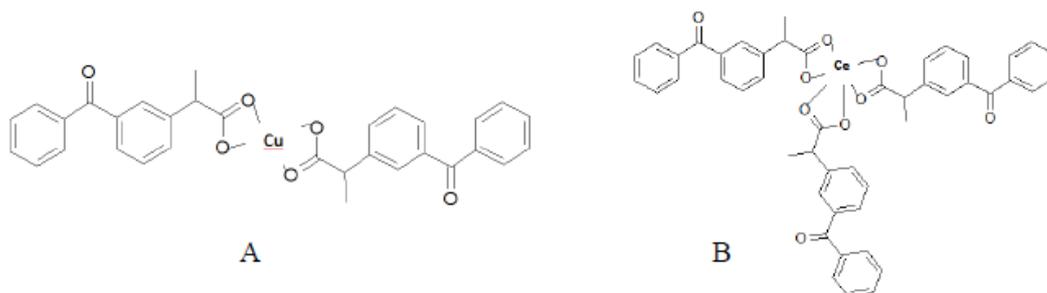


Figura 1. Estrutura molecular dos complexos de cobre (A) e cério (B) com o cetoprofeno

Para a obtenção do cetoprofenato de cobre [Cu(II)], inicialmente, sintetizou-se o carbonato de Cu (II), fazendo-se reagir solução aquosa de cloreto de cobre com solução aquosa de hidrogeno carbonato de sódio em excesso. Os precipitados obtidos foram lavados com água destilada até a eliminação dos íons cloretos. O cetoprofenato de Cu(II) foi preparado fazendo-se reagir o respectivo carbonato com ácido cetoprofeno, ambos em suspensão. O sistema foi mantido em ebulição até a eliminação total do CO₂ e a solução tornar-se límpida. A seguir filtrou-se o sistema utilizando papel de filtro Watman nº 42 e a solução evaporada em banho Maria até próximo a secura. Os compostos assim obtidos depois de seco foram transferidos para um dessecador contendo cloreto de cálcio anidro.

O cetoprofenato de cério [Ce(III)] foi preparado pela adição estequiométrica, lenta e sob agitação, de soluções de cetoprofenato de sódio (ligante) na solução de cloreto de cério. O precipitado obtido foi filtrado com papel de filtro Whatman no 42, lavado com água destilada até a eliminação dos íons cloretos, recolhido em frasco de vidro e mantido em dessecador contendo cloreto de cálcio.

Ação scavenger sobre o radical ABTS

Este ensaio foi padronizado por Pellegrini et al. (1999), sendo originalmente realizado em etanol absoluto [15]. Nos ensaios avaliou-se a atividade sequestradora de radicais pelas amostras, em tampão fosfato de sódio 10mM (pH 7,0) por meio do decréscimo da absorbância em 734 nm, de acordo com Velloso et al. (2007) [16].

Ação scavenger sobre o radical DPPH

A avaliação da ação sequestradora de radicais livres do extrato foi avaliada através do decréscimo da absorbância em 531nm da solução de DPPH (60 μ M) em etanol, segundo Soares et al. (1997) [17].

Ação scavenger sobre o peróxido de hidrogênio

O estudo da ação sequestradora de H₂O₂ pelas amostras foi realizado através da oxidação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) em ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico (DTNB), na presença de peróxido 100 μ M, com variação da absorbância em 412nm [18].

Ação scavenger sobre o ácido hipocloroso

As reações foram feitas de acordo com Costa et al. (2004), com algumas modificações [19, 20]. A concentração da solução de HOCl é determinada espectrofotometricamente em 295nm. As reações foram realizadas em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4. Procedeu-se incubação de 10 minutos da amostra com HOCl (30 μ M) e mais 5 minutos após adição de TMB (2,8 mM). A leitura das absorbâncias é feita em 652nm.

Ação scavenger sobre o ânion superóxido

Este ensaio foi realizado de acordo com Kakkar (1984) [21]. O ânion superóxido reage com o NBT para formar o cromóforo (formazana) cuja intensidade de cor, medida em 560 nm, é diretamente proporcional à concentração do radical.

Dano provocado pelo radical AAPH em eritrócitos

Os testes foram realizados conforme protocolo de pesquisa 08766/10 aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da UEPG (parecer 68/2010). As hemácias utilizadas foram colhidas de voluntários sadios por meio de punção venosa do sangue periférico e separadas por centrifugação e sucessivas lavagens em tampão fosfato de sódio 10mM, pH7,4 contendo NaCl 150mM, com o qual ajustou-se a concentração da suspensão e realizaram-se os ensaios. A ação dos compostos sobre os eritrócitos na ausência de radicais livres e sobre a hemólise promovida pelo radical AAPH 25mM, foi avaliada pela liberação de hemoglobina pelas células (suspensão

de eritrócitos 5%) após 2 horas e meia de incubação através das leituras das absorvâncias em 414 nm [22, 23].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ação scavenger sobre radicais livres, H_2O_2 e $HOCl$

Nenhum dos compostos apresentou uma atividade pronunciada sobre o radical $ABTS^{\bullet+}$. O cetoprofeno (fig.2A) apresentou inibição máxima de 10,9% (60 μ g/mL). O cetoprofenato de cério (fig.2B) apresentou maior ação, promovendo inibição máxima de 21% (60 μ g/mL), enquanto o cetoprofenato de cobre (fig.2C) alcançou 14,3% (60 μ g/mL).

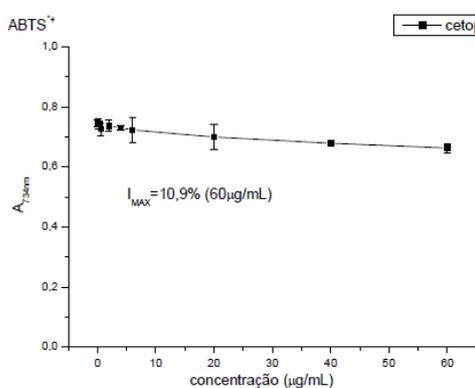


Fig. 2A

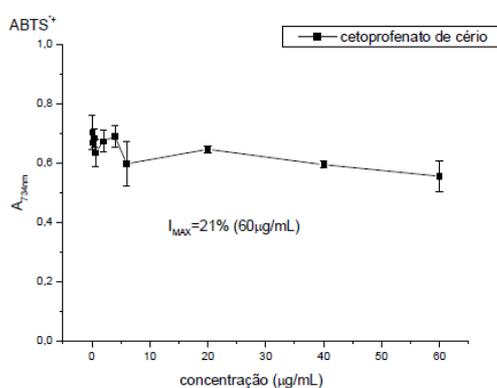


Fig.2B

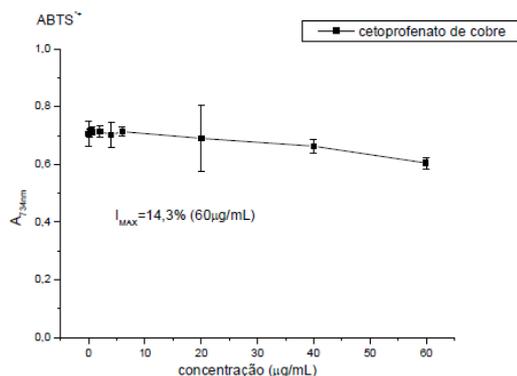


Fig. 2C

Figura 2. Ação scavenger sobre o radical $ABTS^{\bullet+}$

No modelo de estudo sobre o radical DPPH, o cetoprofeno (fig. 3A) apresentou inibição máxima de 16,3% (20 µg/mL) enquanto o cetoprofenato de cério (fig. 3B) alcançou 25,3% (20 µg/mL) e o cetoprofenato de cobre (fig.3C) não apresentou ação.

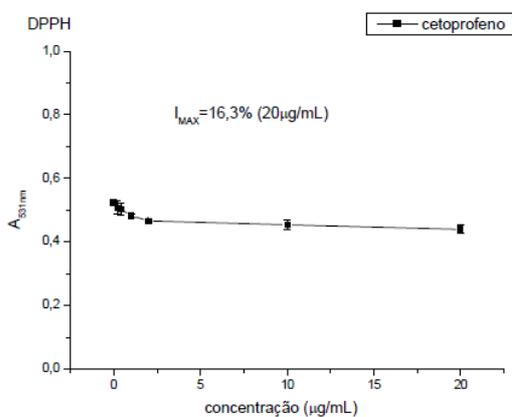


Fig. 3A

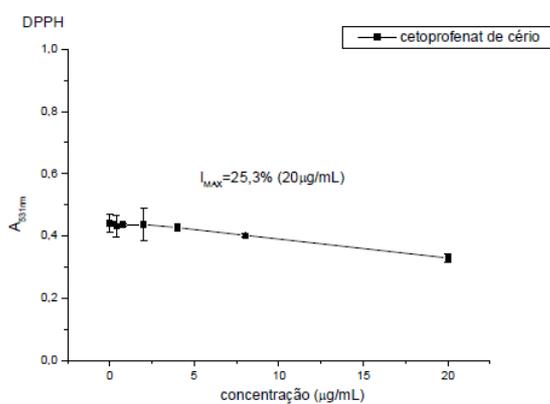


Fig. 3B

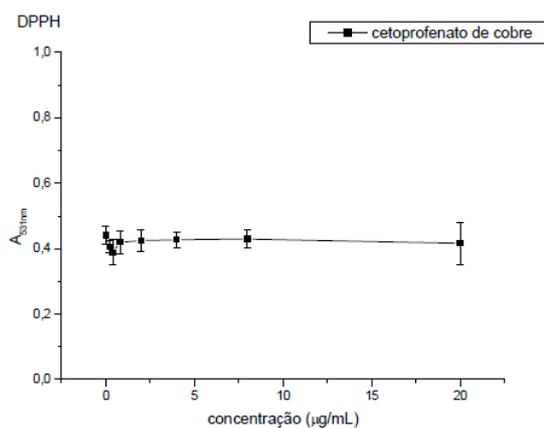


Fig. 3C

Figura 3. Ação scavenger sobre o radical DPPH

Como demonstrado na figura 4, as amostras não apresentaram ação estatisticamente significativas sobre o peróxido de hidrogênio 100 μ M.

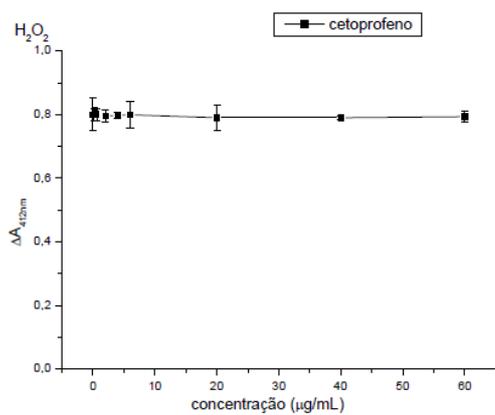


Fig. 4A

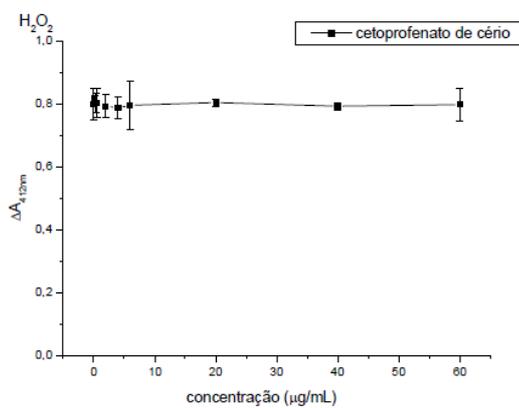


Fig. 4B

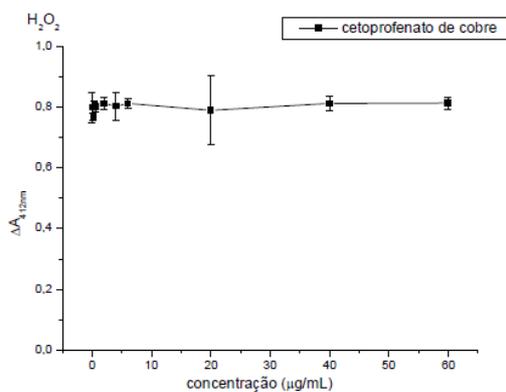


Fig. 4C

Figura 4 – Ação scavenger sobre o radical Peróxido de Hidrogênio

Nos testes com o ácido hipocloroso, o cetoprofeno (fig. 5A) foi o composto que apresentou maior ação promovendo inibição máxima de 31,2% (20 µg/mL) enquanto o cetoprofenato de cério (fig. 5B) e de cobre (fig. 5C) apresentaram, respectivamente, inibições máximas de 3,5% (20 µg/mL) e 28,2% (20 µg/mL).

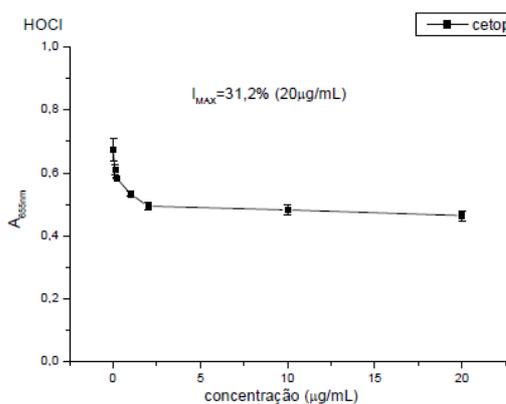


Fig. 5A

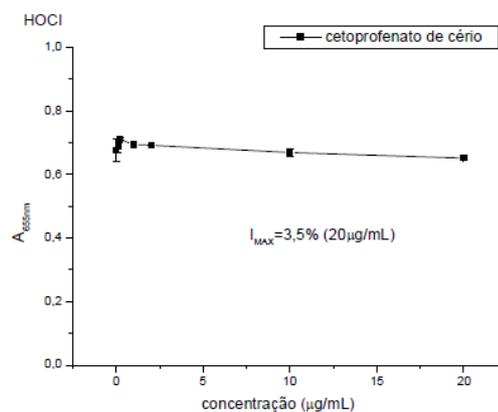


Fig. 5B

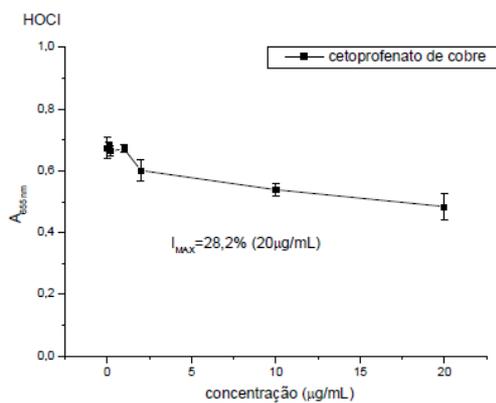


Fig. 5C

Figura 5. Ação scavenger sobre o ácido hipocloroso

Contra o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o cetoprofeno não promoveu inibição nas concentrações avaliadas, enquanto seus derivados de cério e de cobre alcançaram inibições máximas de 31,1% e 17,7%, respectivamente (Fig.6).

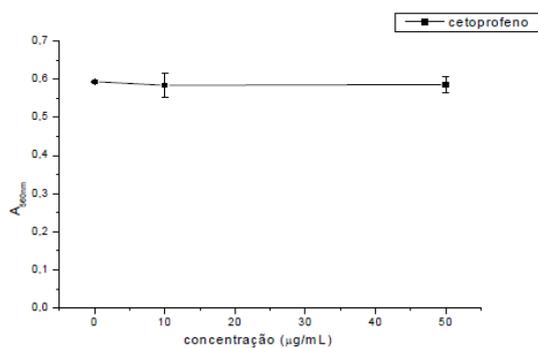


Fig. 6A

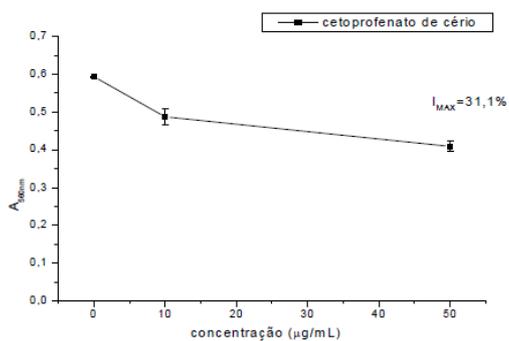


Fig. 6B

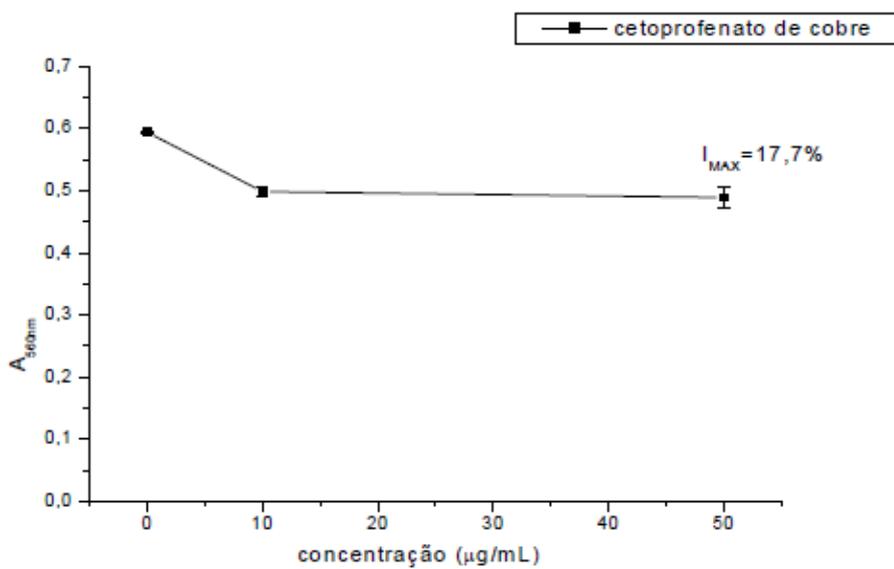


Fig. 6C

Figura 6. Ação scavenger sobre o ânion superóxido

Como se pode observar nos resultados apresentados, a complexação de metais à estrutura do cetoprofeno alterou suas propriedades de ação frente às diferentes espécies reativas estudadas, sejam estas radicalares ou não. A complexação do cério ao cetoprofeno parece intensificar sua ação sobre radicais livres com maior eficiência do que o cobre, enquanto o cobre aumentou a ação do cetoprofeno sobre o HOCl, uma espécie reativa não radicalar.

Dano provocado pelo radical AAPH em eritrócitos

Nos ensaios de hemólise na ausência de radicais livres, o cetoprofeno (Fig.7A) e cetoprofenato de cério (Fig.7B) apresentaram efeito hemolítico, ao contrário do cetoprofenato de cobre (Fig.7C). Desta forma, confirmou-se a ação hemolítica do cetoprofeno, conforme relatos em literatura científica [9, 10], observando-se também, que a complexação do cobre impede este efeito do cetoprofeno.

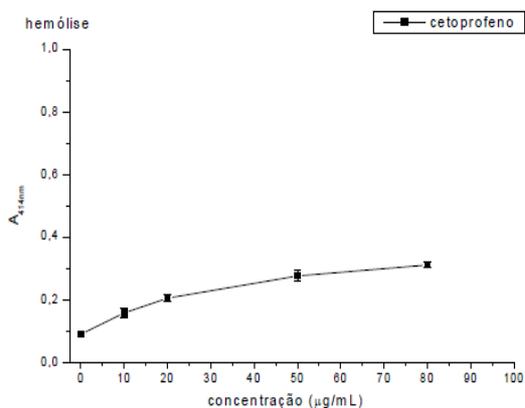


Fig. 7A

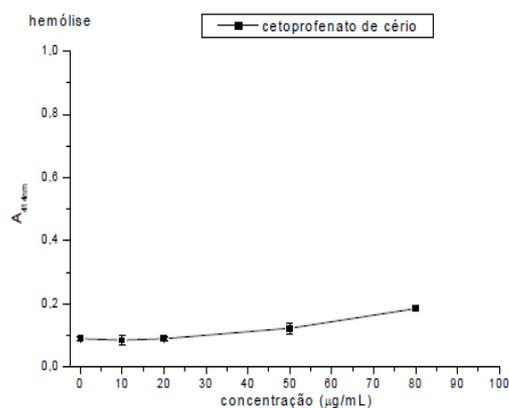


Fig. 7B

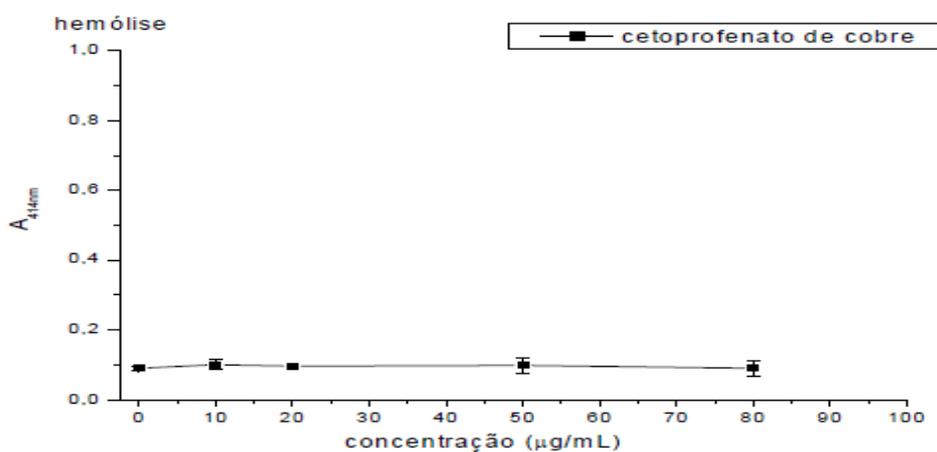


Fig. 7C

Figura 7. Ação hemolítica das amostras.

Na presença do radical AAPH, o cetoprofeno (Fig.8A) e o cetoprofenato de cério (Fig.8B), tiveram ação hemolítica intensificada enquanto o cetoprofenato de cobre (Fig. 8C) não apresentou efeito sobre a ação do radical livre, o que também demonstra que a complexação do cobre ao cetoprofeno é um fator de proteção contra a ação hemolítica do antiinflamatório.

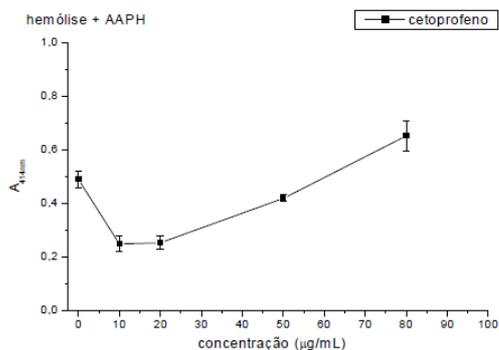


Fig.8A

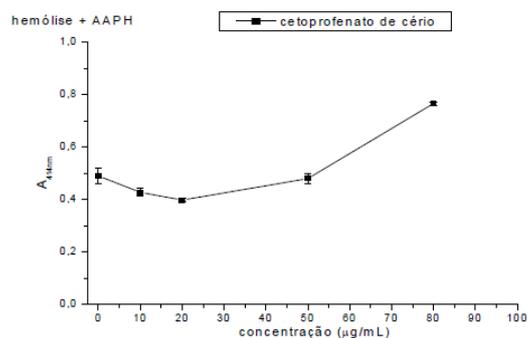


Fig. 8B

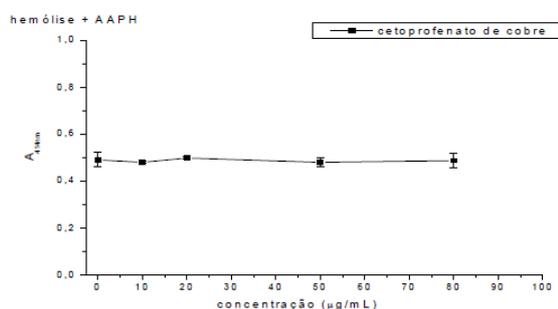


Fig. 8C

Figura 8. Ação sobre a hemólise provocada pelo AAPH.

O efeito da complexação do cobre sobre cetoprofeno poderia ser explicado por alterações em diferentes vias, tais como: i) alteração na via de formação de radicais livres por fotirradiação; ii) alteração do grau de ionização de grupamentos da estrutura química da molécula, ou ainda, iii) alteração no potencial de interação do antiinflamatório com diferentes moléculas de membrana dos eritrócitos.

CONCLUSÃO

O cetoprofeno pode apresentar diferentes propriedades de ação quando complexo a

diferentes metais. Dentre as ações afetadas está a ação scavenger de radicais livres e espécies reativas não radicalares. A complexação do cetoprofeno ao cobre parece favorecer a captura de oxidantes não radicalares, enquanto a complexação ao cério intensifica a ação sobre radicais livres.

Pode-se perceber ainda que, o cetoprofeno, quando complexado ao cobre, não causa hemólise nem intensifica aquela promovida por radicais livres, sugestionando que o cetoprofenato de cobre pode ter uma atividade antiinflamatória semelhante ou superior ao cetoprofeno, mas com a vantagem de apresentar menor efeito colateral.

AGRADECIMENTOS

Francine A. Manente e Lucas R. A. Mello agradecem ao CNPq e à Fundação Araucária – PR, respectivamente, pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

- [1] Lockhart, M.; Babar, Z.U.D.; Garg, S. Evaluation of policies to support drug development in New Zealand, *Health Policy* 96 (2010) 108–117.
- [2] Zawidlak-Wegrzynska, B.; Kawalec, M.; Bosek, I.; Luczyk-Juzwa, M.; Adamus, G.; Rusin, A.; Filipczak, P.; Glowala-Kosinska, M.; Wolanska, K.; Krawczyk, Z.; Kurcok, P. Synthesis and antiproliferative properties of ibuprofen–oligo(3-hydroxybutyrate) Conjugates. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45 (2010) 1833–1842

- [3] Kalgutkar, A.S.; Crews, B.C. Rowlinson, S.W.; Marnett, A.B.; Kozak, K.R. Remmel, R.P., Marnett, L.J. Biochemically based design of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: Facile conversion of nonsteroidal antiinflammatory drugs to potent and highly selective COX-2 inhibitors, PNAS, (2000), vol97, p.925–930
- [4] Guo, Z.; Sadler, P.J. Metals in Medicine, Angewandte Chemie International Edition, 38, 1512 – 1531, 1999.
- [5] Saha, D.K.; Padhye, S.; Padhye, S. Targeting estrogen receptor sites in human breast cancer cell line T47D with copper conjugates of nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives: antiproliferative activity of ketoprofen derivative and its copper complex. Metal Based Drugs, Vol. 8, Nr. 2, 2001
- [6] Costa, D.; Moutinho, L.; Lima, J.L.F.C.; Fernandes, E. Antioxidant Activity and Inhibition of Human Neutrophil Oxidative Burst Mediated by Arylpropionic Acid Non-steroidal Antiinflammatory Drugs. Biol. Pharm. Bull. 29 (8) (2006) 1659 – 1670.
- [7] Kantor, T.G. Ketoprofen: a review of its pharmacologic and clinical properties. Pharmacotherapy May-Jun;6(3) (1986) 93-103.
- [8] Nakajima, A.; Tahara, M.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H. Determination of free radicals generated from light exposed ketoprofen. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 174 (2005) 89–97.
- [9] Kimura, M.; Takai, M.; Ishihara, K. Biocompatibility and drug release behavior of

spontaneously formed phospholipid polymer hydrogels. *J.Biomed Mater Res A*. Jan;80(1) (2007) 45-54.

[10] He, Y.; Ramirez, D.C.; Detweiler, C.D.; Mason, R.P.; Chignell, C.F. UVA-ketoprofen-induced Hemoglobin Radicals Detected by Immuno-spin Trapping, *Photochemistry and Photobiology* 77(6) (2003) 585–591

[11] Barreiros, A.L.B.S.; David, J.M.; David, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo, *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 1 (2006) 113-123.

[12] Velloso, J.C.R.; Barbosa, V.F.; Oliveira, O.M.M.F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. *Revista Eletrônica da Faculdade de Farmácia*, v. 4, (2007) 119-130.

[13] Shacter, E.; Lopez, R.L.; Patis S. Inhibition of the myeloperoxidase-H₂O₂-Cl system of neutrophils by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochemical Pharmacology*, v.41 (1991) 975-984.

[14] Kataoka, M.; Tonooka, K.; Ando, T.; Imai, K.; Aimoto, T. Hydroxyl radical scavenging activity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Free Radical Research*, v.27 (1997) 419-427.

[15] Pellegrini, N.; Re, R.; Yang, M.; Evans, C.R. 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 (1999) 379-389.

[16] Velloso, J.C.R.; Barbosa, V.F.; Khalil, N.M.; Santos, V.A F. F. M.; Furlan; M.; Brunetti, I.L.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43 (2007) 447-453.

[17] Soares, J. R.; Dinis, T. C.; Cunha, A. P.; Almeida, L. M. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Research*, v. 26 (1997) 469-478.

[18] Velloso, J.C.R.; Khalil, N.M; Fonseca, L.M.; Brunetti, I.L; Oliveira, O.M.M.F. Does cotinine act upon reactive oxygen species and peroxidases? *Eclética Química*, Volume 32 (2007) 65-70.

[19] Costa, M.; Ximenes, V. F.; Fonseca, L. M. Hypochlorous acid inhibition by acetoacetate: implications on neutrophil functions. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 27 (2004) 1183-1187.

[20] Velloso, J.C.R. ; Khalil, N.M.; Gutierrez, V.O. ; dos Santos, V.A.F.M. ; Furlan, M.; Brunetti, I.L.; Oliveira, O.M.M.F. *Salacia campestris* Root Bark Extract: Peroxidase Inhibition, Antioxidant and Antiradical Profile. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 45 (2009) 99-107.

[21] Kakkar, P.; Das, B.; Viswanathan, P. N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, v. 21 (1984) 130-132.

[22] Vissers, M.C.M., Carr, A.C., Chapman, A.L.P. Comparison of human red cell lysis by hypochlorous and hypobromous acids: insights into the mechanism of lysis. *The Biochemical Journal*, v330 (1998) 131-138.

[23] Yang, H.L., Chen, S.C., Chang, N.W., Chang, J.M., Lee, M.L., Tsai, P.C., Fu, H.H., Kao, W.W., Chiang, H.C., Wang, H.H., Hseu, Y.C. Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology* 44 (2006) 1513-1521.

EFFECT OF METAL COMPLEXATION TO ANTI-INFLAMMATORY OVER THE ACTION AGAINST OXIDATIVE AND FREE RADICALS: KETOPROFEN ACTION

ABSTRACT:

Free radicals are highly reactive species generated in living organisms for the purpose of protection. However, in some circumstances, they are responsible for the occurrence or aggravation of tissue damage. Many anti-inflammatory drugs have a direct effect on free radicals

and not radical reactive species, which contributes to its actions against inflammation. Ketoprofen is a nonsteroidal anti-inflammatory agent that generates free radicals by photo irradiation and has an important hemolytic effect with that. The complexation of metals to different drugs has been used as a strategy to improve the pharmacological action of different molecules and reduce their side effects. This paper presents the results of ketoprofen and their

metallic complexes action on erythrocytes and free radicals. It was observed that the cerium enhances the scavenger properties of ketoprofen on free radicals, while copper enhances its action over non-radical oxidants. Copper also reduced the hemolytic effect presented by ketoprofen meanwhile its cerium derivative maintained it

.

key words: *ketoprofen, hemolysis, oxidative damage, free radical*