

---

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DE MEDICAMENTOS  
UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE ARTRITE REUMATOIDE**

Bianca Parra Pinto<sup>1</sup>  
Ana Julia Moreira<sup>1</sup>  
Laura Gabrielly Aparecida Gomes<sup>1</sup>  
Camila Keiko Izonaga Enoshita<sup>1</sup>  
Christyano Jubran Cury<sup>1</sup>  
Beatriz Martins Nunes<sup>2</sup>  
Carolina Saori Ishii Mauro<sup>3</sup>  
Ana Flavia Leal Specian Wollmersheiser<sup>3</sup>  
Andressa Keiko Matsumoto<sup>4</sup>

**RESUMO**

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune que afeta as articulações diartrodiais. Acredita-se que as interações entre vários fatores levam a uma imunomodulação inadequada e resultam em um processo inflamatório resultando em danos às estruturas sinoviais. Independentemente do gatilho exato, as espécies reativas de oxigênio (EROS) foram implicadas em desempenhar um papel importante neste processo. A AR é uma das condições que induzem o estresse oxidativo (EO), apresentando aumento de cinco vezes na produção de EROS em comparação com indivíduos saudáveis, sugerindo que o EO é uma marca patogênica na AR. Diante do contexto apresentado, o trabalho avaliou a atividade antioxidante in vitro de fármacos comumente utilizados no tratamento da AR, para controle dos sintomas e outros utilizados para modulação do curso da doença, como: Sulfassalazina 500mg, Hidroxicloroquina 400mg e Leflunomida 20mg. O estudo analisou a capacidade desses medicamentos em remover radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS+) e identificar qual deles obteve um maior desempenho no papel antioxidante, contribuindo para a escolha terapêutica entre esses medicamentos. Segundo os dados obtidos todos os medicamentos apresentaram atividade antioxidante, sendo a Hidroxicloroquina o medicamento de melhor eficácia apresentando um IC50 de 35,921 mg/mL, já a Sulfassalazina apresentou IC50 foi de 0,783 mg/mL e a Leflunomida um IC50 foi de 35,921 mg/mL. Embora alguns estudos já tenham apontado para essa direção, a literatura carecia de um estudo comparativo entre os medicamentos para AR, bem como de uma discussão sobre as hipóteses que poderiam explicar os mecanismos antioxidantes desses medicamentos.

**Palavras-chave:** antioxidantes; artrite reumatoide; estresse oxidativo.

---

<sup>1</sup> Graduando do curso de Farmácia da Universidade Positivo, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup> Graduando do curso de Farmácia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil.

<sup>3</sup> Docente do curso de Farmácia da Universidade Positivo, Paraná, Brasil.

<sup>4</sup> Docente do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil. E-mail: akeiko@uel.br.

## ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that affects diarthrodial joints. It is believed that interactions between various factors lead to improper immunomodulation, resulting in an inflammatory process that damages synovial structures. Regardless of the exact trigger, reactive oxygen species (ROS) have been implicated in playing a key role in this process. RA is one of the conditions that induce oxidative stress (OS), showing a fivefold increase in ROS production compared to healthy individuals, suggesting that OS is a pathogenic hallmark in RA. In this context, the present study evaluated the *in vitro* antioxidant activity of drugs commonly used in the treatment of RA to control symptoms and others used to modulate the course of the disease, including: Sulfasalazine 500mg, Hydroxychloroquine 400mg, and Leflunomide 20mg. The study analyzed the ability of these drugs to scavenge the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical and determined which exhibited the best antioxidant performance, contributing to therapeutic choices among these drugs. According to the data obtained, all the drugs demonstrated antioxidant activity, with Hydroxychloroquine being the most effective, presenting an IC<sub>50</sub> of 35.921mg/ml. Sulfasalazine showed an IC<sub>50</sub> of 0,783mg/ml, and Leflunomide an IC<sub>50</sub> of 35.921mg/ml. Although some studies had previously pointed in this direction, the literature lacked a comparative study among these RA drugs as well as a discussion on hypotheses that could explain the antioxidant mechanisms of these medications.

**Keywords:** antioxidants; rheumatoid arthritis; oxidative stress.

## 1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune e inflamatória crônica que afeta principalmente as articulações e está associada a diversos sintomas, como dor intensa, rigidez e edema, possuindo potencial de dano articular irreversível. Doenças autoimunes ocorrem quando o sistema imunológico do corpo, ao invés de proteger contra invasores externos ataca erroneamente tecidos saudáveis, no caso as membranas sinoviais das articulações, e como resultado há sinais de inflamação, dor e danos ao tecido, comprometendo diretamente a mobilidade e qualidade de vida dos pacientes (Abbas *et al.*, 2014). De acordo com o estudo de Abbas *et al.* (2014) realizado no Brasil, a prevalência da AR é de 0,46% e com maior predomínio em mulheres e em adultos na faixa dos 30 aos 50 anos, embora possa surgir em qualquer idade.

Estudos têm encontrado relação do processo inflamatório da AR com a identificação de citocinas inflamatórias que direcionam a inflamação sinovial crônica, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6), que

desempenham papéis centrais na perpetuação da inflamação sinovial e na destruição tecidual (Sánchez-Ramón *et al.*, 2011). Se uma determinada condição induz um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, onde os oxidantes são favorecidos, uma interrupção da sinalização redox é produzida e um controle e/ou dano molecular ocorre. Este estado celular denominado estresse oxidativo (EO) pode resultar de um excesso de oxidantes, deficiência de antioxidantes ou ambas as condições. Esse processo inflamatório exagerado na AR contribui para o aumento do EO no organismo, gerando um ambiente favorável a destruição articular, afetando ainda tecidos circundantes (Barbosa *et al.*, 2010).

Sabe-se que os neutrófilos geram grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) e são as células mais abundantes no líquido sinovial de pacientes com AR, onde geram níveis mais elevados de ERO total e radicais hidroxila, cujos níveis se correlacionam com o escore de atividade da doença, que é o fator clínico mais comum usado para determinar a gravidade dos sintomas da AR. Os neutrófilos também são a principal fonte de moléculas pró-oxidativas, como a mieloperoxidase (MPO), cujos níveis se correlacionam com os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-18 na AR. O tratamento padrão para AR leva a uma diminuição nos níveis de MPO e dessas citocinas, apoiando a observação de que a inflamação e o EO ocorrem juntos durante a AR (Toukap *et al.*, 2014).

Além disso, o EO está associado com a progressão da doença, como os neutrófilos geram uma grande quantidade de EROs, a sua ativação é importante para o início do EO, que é definido como uma mudança no equilíbrio redox em direção às reações oxidativas. Como resultado, as EROs interagem com proteínas, ácidos nucleicos e principalmente lipídios, causando modificações oxidativas em sua estrutura. Uma das consequências metabólicas significativas é a peroxidação dos fosfolipídios da membrana com aumento da produção de aldeídos reativos (Jaganjac *et al.*, 2016), levando a sérios distúrbios metabólicos resultando em celular. As EROs também levam à ativação de fatores de transcrição que modulam a biossíntese de proteínas antioxidantes e fatores pró-inflamatórios, resultando em uma piora do quadro inflamatório e auxílio na progressão das doenças imunológicas (Toukap *et al.*, 2014).

EROs são radicais derivados de oxigênio e incluem o radical superóxido ( $O_2^-$ ), radical peroxil ( $ROO\cdot$ ), radical peridroxil ( $HO_2\cdot$ ) e radical hidroxil ( $\cdot OH$ ), e espécies não radicais livres, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) que são facilmente convertidos em radicais livres. Óxido nítrico ( $NO\cdot$ ), dióxido de nitrogênio ( $NO_2\cdot$ ) e peroxinitrito ( $OONO^-$ ) representam as espécies reativas de nitrogênio (RNS) mais

importantes. Essas espécies químicas contêm um ou mais elétrons desemparelhados na camada orbital mais externa e são chamadas de radicais livres. Eles são instáveis, altamente reativos e de vida curta. Os radicais livres podem abstrair elétrons de outros compostos para atingir a estabilidade; assim a molécula atacada perde seu elétron e se torna um radical livre, iniciando uma cascata de reação em cadeia (Quiñonez-Flores *et al.*, 2016).

Em condições fisiológicas, as ROS são necessárias para manter o estado redox da célula e desempenham um papel na sinalização celular, diferenciação, proliferação, crescimento, apoptose, regulação citoesquelética e fagocitose. No entanto, se as concentrações de ROS forem aumentadas além das condições fisiológicas, elas podem danificar componentes celulares, como os lipídios nas membranas celulares, e também proteínas e ácidos nucleicos (Barbosa *et al.*, 2010; Klisic *et al.*, 2024).

A resposta antioxidante enzimática é realizada pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e enzimas relacionadas à glutathione (GSH) (glutathione peroxidase [GPx], glutathione reductase [GR] e tioredoxina reductase). Além disso, a resposta antioxidante não enzimática inclui a ação de vitaminas (A, C e E),  $\beta$ -caroteno, minerais antioxidantes (cobre, ferritina, zinco, manganês e selênio) e L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilglicina (GSH), que é a defesa antioxidante não enzimática mais importante (Quiñonez-Flores *et al.*, 2016).

Estudos têm mostrado que EROs podem ativar a cascata de inflamação por meio da indução de fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B), que regula a expressão de citocinas inflamatórias e amplifica ainda mais a resposta inflamatória na AR. Além disso, o EO perpetua o quadro inflamatório ao estimular a produção de citocinas pró inflamatórias, com TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (Heinz *et al.*, 2006). Nesse sentido, os antioxidantes têm se mostrado eficientes, onde desempenham um papel na interrupção desse ciclo, podendo diminuir o EO e conseqüentemente a resposta inflamatória de doenças (Allegra; Tesoriere, 2022).

Os tratamentos de doenças autoimunes ainda são discutíveis e são atualizados com frequência, porém no caso da AR alguns medicamentos são utilizados para o controle dos sintomas e outros utilizados para modulação do curso da doença. Os principais medicamentos estão na base do CONITEC (Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS) disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Abbas *et al.*, 2014).

Os medicamento utilizados para tratamento e que serão analisados nesta pesquisa, são: hidroxicloroquina, utilizada para diminuir a inflamação e dor pois atua principalmente nos

macrófagos e nas células dendríticas, inibindo a apresentação de antígenos; sulfassalazina, imunorreguladora ao reduzir a produção de linfócitos T e anticorpos, além de inibir mediadores inflamatórios e regular a expressão de genes inflamatórios, e por último, a leflunomida utilizada para retardar a doença ao inibir as pirimidinas presentes nas células imunes reduzindo a proliferação de linfócitos (Heinz *et al.*, 2006).

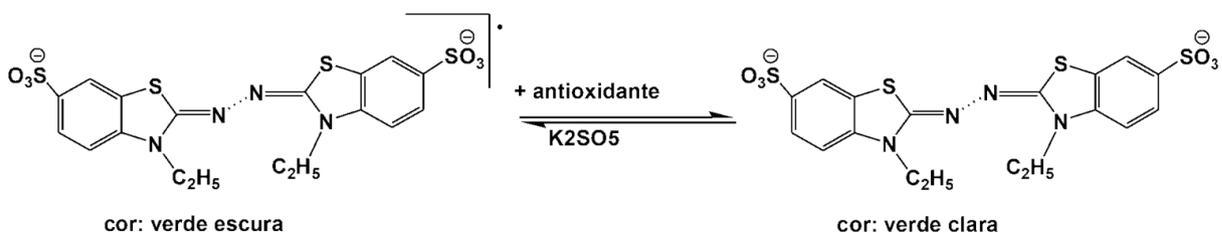
Além de seus efeitos anti-inflamatórios, evidências emergentes sugerem que esses medicamentos podem apresentar propriedades antioxidantes, potencializando seus efeitos terapêuticos ao atenuar o EO e proteger os tecidos articulares de danos adicionais (Klasic *et al.*, 2024).

Existe uma variedade de radicais livres e cada um pode atuar de maneiras diferentes nos organismos vivos e in vitro. Devido a isso, a criação de um método único capaz de mensurar a capacidade antioxidante ou quantificar antioxidantes específicos de maneira precisa, exata e simples é muito difícil. Sendo assim existem vários métodos, dentre eles os colorimétricos, como o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), ferric reducing antioxidante power (FRAP) e 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS<sup>•+</sup>) (Benzie; Strain 1996; Re, *et al.*, 1999; Molyneux, 2004; Lazzari *et al.*, 2021).

5

O ensaio ABTS<sup>•+</sup> é baseado na propriedade dos antioxidantes em sequestrar o ânion radical de longa vida ABTS<sup>•+</sup>. Neste ensaio o ABTS<sup>•+</sup> é oxidado pelo radical peróxido ou outros oxidantes para seu radical cátion, ABTS<sup>•+</sup>, que é intensamente colorido, e a capacidade antioxidante é medida pela propriedade que o composto em teste possui em decrescer a cor, deixando-a mais clara, reagindo diretamente com o radical ABTS<sup>•+</sup> (Figura 1). De acordo com o poder antioxidante da amostra, observa-se uma diminuição do valor das leituras (Sánchez-González *et al.*, 2005).

**Figura 1** - Estabilização do radical ABTS<sup>•+</sup> por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



Fonte: Borges *et al.* (2011).

Portanto este estudo visa avaliar a eficácia antioxidante do tratamento farmacológico convencional da AR, buscando melhorar o entendimento da ação desses medicamentos sobre o EO em doenças crônicas, na busca de contribuir na minimização da progressão da doença, promovendo uma melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes (Macdonald-Wicks *et al.*, 2006).

O trabalho buscou verificar a capacidade antioxidante *in vitro* dos medicamentos mais utilizados pelos pacientes com AR, sendo eles a Leflunomida 20mg, Sulfassalazina 500mg e Hidroxicloroquina 400mg, todos disponibilizados no SUS. O objetivo da pesquisa foi descrever a fisiopatologia da AR e sua relação com o EO elevado; verificar capacidade antioxidante *in vitro* dos medicamentos usados no tratamento da AR através da capacidade removedora do radical ABTS+ e identificar qual deles obteve um maior desempenho no papel antioxidante, contribuindo para a escolha terapêutica entre esses medicamentos.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 REAGENTES**

Os fármacos utilizados foram: Sulfassalazina 500mg (azulfim do laboratório APSEN), Hidroxicloroquina 400mg (genérico do laboratório SEM) e Leflunomida 20mg (manipulado na farmácia magistral Biofórmula de Rolândia). Os fármacos foram macerados e dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO: Synth, Brasil). O reagente utilizado para os ensaios foi: 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina 6-ácido sulfônico) (ABTS), da Sigma-Aldrich, EUA. Todos os outros reagentes eram do mais alto grau disponível comercialmente.

### **2.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Para as metodologias de ABTS, após macerados, os fármacos foram diluídos com o menor volume possível do diluente. Para encontrar o valor de IC50 (concentração inibitória média), é necessário que exista várias concentrações, que são aumentadas gradualmente para obter os valores da % de inibição. Cada medicamento, dependendo da sua característica e do seu comportamento mediante a técnica selecionada, vai utilizar concentrações mais espaçadas ou mais próximas. Ou seja, cada medicamento se comporta de uma forma nas metodologias de

capacidade antioxidante. Dependendo do medicamento, concentração e potencial antioxidante, por mais que se concentre o fármaco, ele não apresentará atividade na metodologia. Portanto, é necessário ter discernimento e conhecimento para realizar essas metodologias.

### 2.3 CAPACIDADE DE SEQUESTRAR RADICAIS LIVRES

A capacidade de sequestrar radical livre ABTS<sup>+</sup> (2,2', azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) será realizada de acordo com a metodologia descrita por Sanches-Gonzales *et al.* (2005). Antes da análise, foi preparada a solução ABTS 7mM com persulfato de potássio 2,45mM, no escuro com antecedência de 16 horas. Esta solução foi diluída com tampão fosfato de sódio (pH 7,4) até apresentar absorvância  $0,7 \pm 0,02$  a 730nm, seguindo para adição de 10 $\mu$ l da amostra e 4mL da solução diluída de ABTS.

Neste ensaio o ABTS é oxidado pelo radical peroxil ou outros oxidantes para seu radical cátion, ABTS<sup>+</sup>, que é intensamente colorido, e a capacidade antioxidante é medida pela habilidade que o composto em teste possui em decrescer a cor reagindo diretamente com o radical ABTS<sup>+</sup>. Esta atividade foi calculada pela porcentagem de inibição da atividade do radical ABTS<sup>+</sup> utilizando a Equação I. Como descrito na metodologia a reação foi realizada ao abrigo da luz e com período de incubação de 6 minutos. Após a incubação foi feita a leitura das amostras em espectrofotômetro Evolution™ 201, ThermoFisher Scientific, no comprimento de onda de 730nm. A supressão do radical colorido no meio reacional foi monitorizada diminuindo a absorvância utilizando tampão fosfato 0,1M como branco.

Equação I: % de atividade =  $[1 - (\text{absorvância da amostra} / \text{absorvância do controle})] \times 100$ .

### 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

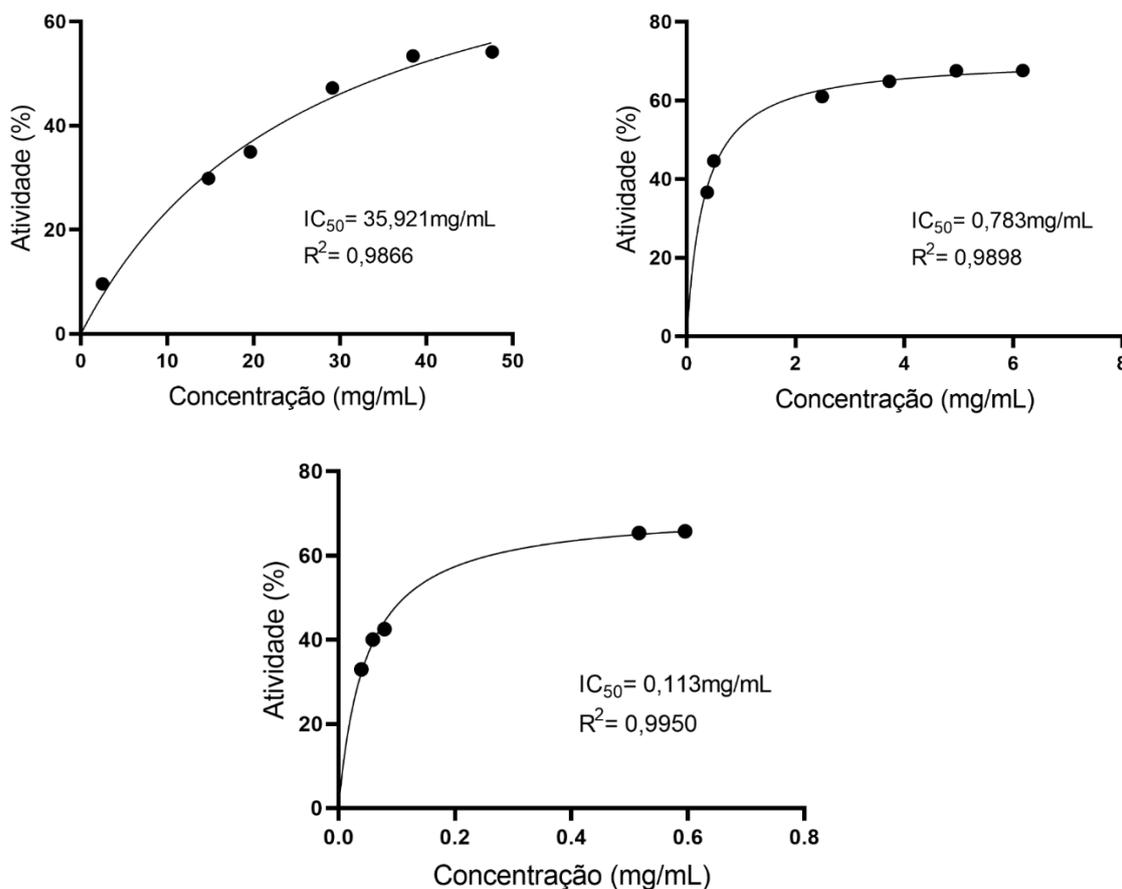
A concentração *in vitro* Sulfassalazina, Hidroxicloroquina e Leflunomida que causou 50% da eliminação de ABTS foi considerada a concentração inibitória média (IC50). A IC50 foi determinada pelo software GraphPadPrism®, versão 10, usando curva hiperbólica (hipérbole de ligação de um sítio). Os resultados da atividade antioxidante são apresentados como médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos se  $P < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio ABTS+, todos os medicamentos testados sequestraram o radical ABTS+ carregado positivamente de uma maneira dependente da concentração. O ensaio com leflunomida (Figura 2A) resultou em uma linearidade de  $R^2$  0,9866 entre 49,87 a 952,38 mg/mL. A atividade máxima foi constatada como sendo 54,17% na concentração de 952,38 mg/mL e IC50 foi de 35,921 mg/mL.

O ensaio com sulfassalazina mostrou uma linearidade  $R^2$  0,9898 entre 0,374 a 6,178 mg/mL. A atividade máxima foi constatada como sendo 67,61% na concentração de 6,178 mg/mL e IC50 foi de 0,783 mg/mL (Figura 2B). Já a hidroxicloroquina demonstrou uma linearidade de  $R^2$  0,9950 entre 0,039 a 0,595 mg/mL. A atividade máxima foi constatada como sendo 65,73% na concentração de 0,595 mg/mL e IC50 foi de 0,113 mg/mL (Figura 2C).

**Figura 2** - Atividade de eliminação de radicais livres de Leflunomida (A), Sulfassalazina (B) e Hidroxicloroquina (C) no ensaio ABTS+.



Fonte: Autor próprio.

Os dados são médias  $\pm$  erro padrão médio (SEM) de valores triplicados e são apresentados como porcentagem de inibição em relação ao controle.

A leflunomida (figura 3) atua inibindo a proliferação de linfócitos T. A droga inibe a enzima diidroorato desidrogenase (DHODP), impedindo a síntese de pirimidinas dos linfócitos. Essas pirimidinas são essenciais no processo de expansão clonal dos linfócitos, desta maneira, quando há um declínio na produção de pirimidinas, conseqüentemente há um declínio na proliferação dos linfócitos T (Heinz *et al.*, 2006).

Muitos radicais livres produzidos pelo EO levarão à oxidação de várias substâncias no corpo. O nível de malondialdeído (MDA) aumenta nos corpos dos pacientes com artrite reumatoide devido ao excesso de espécies reativas de oxigênio, e o sistema superóxido dismutase (SOD) é interrompido, o que enfraquece o antioxidante das defesas do corpo, bem como exacerba a perda óssea.

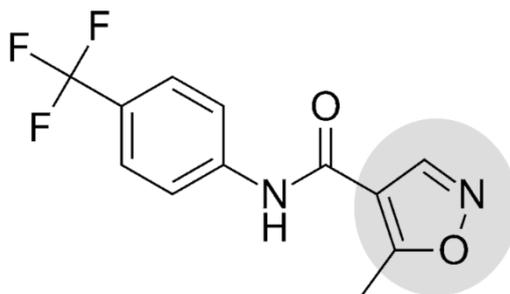
Além disso, o EO e o metabolismo energético do tecido sinovial em indivíduos com AR estão intimamente relacionados. Estudos que investigam a ligação entre estresse oxidativo, antioxidação da SOD e monitoramento em pacientes com AR podem, conseqüentemente, revelar o processo patogênico da artrite reumatoide e levar à descoberta de novos medicamentos anti-artrite reumatoide (Weber Fell, *et al.*, 2022).

A presença de um grupo isoxazol na sua estrutura, que corresponde à um anel heterocíclico composto por nitrogênio (N) e oxigênio (O), elementos altamente eletronegativos, o que influencia sua capacidade de interagir eletronicamente com outras moléculas. A eletronegatividade desses átomos cria uma distribuição de carga polarizada dentro do anel, com o oxigênio puxando densidade eletrônica devido à sua alta eletronegatividade. Essa polarização pode tornar o isoxazol menos propenso a doar elétrons diretamente, pois a presença de oxigênio e nitrogênio promove mais uma natureza eletronegativa ao anel, ao invés de eletropositiva (Jayaroopa, 2013).

Em muitos casos, compostos com o grupo isoxazol não são doadores de elétrons no sentido clássico, mas eles podem estabilizar estados eletrônicos ou interagir com radicais livres em sistemas antioxidantes. Por exemplo, sua presença em compostos antioxidantes tende a estabilizar espécies reativas através de ressonância e redistribuição eletrônica, em vez de doar elétrons diretamente como fariam compostos com grupos fenólicos. Essa redistribuição de carga permite que o isoxazol ajude na neutralização de radicais livres sem precisar "doar" elétrons de forma convencional (Jayaroopa, 2013).

Assim, a atividade antioxidante dos compostos de isoxazol se deve mais à estabilização dos radicais livres através de ressonância e redistribuição da densidade eletrônica do que à doação direta de elétrons. Derivados do isoxazol são muito utilizados no mercado como inibidores da COX-2 (ciclooxigenase-2) e anti-inflamatório (Jayarooma, 2013).

**Figura 3** - Estrutura química do leflunomida.

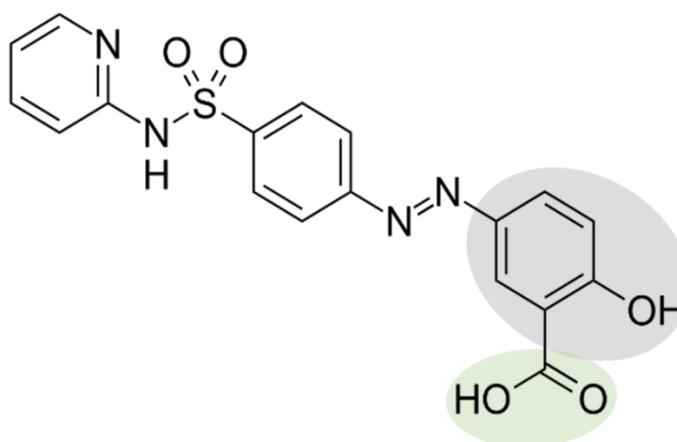


Fonte: Autor próprio.

A figura 4 corresponde a molécula da sulfassalazina, que possui tanto a presença de grupos fenólicos, ou seja, anel benzênico ligados a hidroxilas (OH), quanto ácidos carboxílicos, compostos orgânicos que possuem o grupo funcional carboxila (-COOH), ambos apresentam a capacidade de doar elétrons e neutralizar radicais livres. Além disso, é possível associá-la com a regulação da expressão de genes associados à defesa antioxidante (STOLL et al., 2017).

10

**Figura 4** - Estrutura química da Sulfassalazina.



Fonte: Autor próprio.

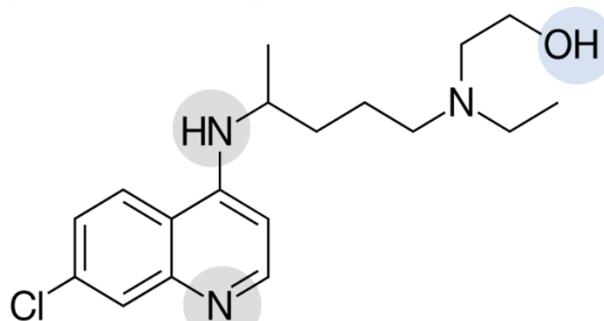
A sulfassalazina ainda apresenta um mecanismo de ação desconhecido, porém, com estudos feitos em modelos *in vitro* de animais, pode se relacionar o seu efeito com as propriedades imunossupressoras e com sua afinidade com os tecidos conjuntivos. A degradação do fármaco em mesalazina inibe a síntese da interleucina 1, principal proteína pró-inflamatória, contribuindo para a diminuição da inflamação. A sulfapiridina, também liberada com a degradação do fármaco, tem ação imunomoduladora ao inibir a produção de prostaglandinas, que são responsáveis por mediar proteínas pró-inflamatórias e levar a formação da COX-2 que é responsável por causar os sintomas da inflamação (Heinz *et al.*, 2006).

A hidroxicloroquina (figura 5) é uma versão hidroxilada da cloroquina, um derivado da quinina, que foi usada clinicamente pela primeira vez por suas propriedades antimaláricas. Na década de 1950, surgiram evidências do benefício terapêutico da hidroxicloroquina no lúpus eritematoso sistêmico (LES) e na artrite reumatoide. A hidroxicloroquina agora é considerada um tratamento bem tolerado e eficaz para essas condições. Embora amplamente prescrita, ainda não temos uma imagem completa de como esse medicamento funciona nas células imunológicas humanas (Schrezenmeier; Dorner, 2020).

Heinz *et al.* (2006) correlacionou a ação da hidroxicloroquina com o acúmulo intralisossomal, estabilizando as membranas lisossomais e inibindo as enzimas lisossômicas, além de bloquear a ação fagocitária de polimorfonucleares. Por outro lado, várias linhas de evidência sugerem que a eficácia da hidroxicloroquina em condições autoimunes pode ser mediada por efeitos na imunidade inata e adaptativa. Em células imunes inatas, acredita-se há muito tempo que a hidroxicloroquina se acumula em compartimentos ácidos (ou seja, endossomos e lisossomos ou endo-lisossomos), onde inibe o processamento e a ativação de receptores toll-like (TLRs) sensíveis a ácidos nucleicos ao aumentar o pH (Park *et al.*, 2008; Schrezenmeier; Dorner, 2020).

11

**Figura 5** - Estrutura química da Hidroxicloroquina.



Fonte: Autor próprio.

Analisando a estrutura química do fármaco, representado pela figura 4, a presença do grupo hidroxila (-OH) e aminas podem contribuir para a sua capacidade de neutralizar radicais livres. Grupos -OH podem doar hidrogênios para espécies reativas, neutralizando-as, enquanto grupos aminas podem estabilizar radicais através de interações ressonantes, ajudando a proteger células de danos oxidativos em algum grau. Essa atividade antioxidante, embora moderada, pode auxiliar na redução de inflamações e estresse oxidativo, especialmente em doenças autoimunes e inflamatórias (Cramer *et al.*, 2019).

Ademais, a hidroxicloroquina também tem propriedades quelantes, prevenindo a formação de radicais livres catalisados por metais e a medicação tem sido relatado por inibir a formação de EROs, reduzindo o EO (Jia *et al.*, 2020).

Segundo o estudo clínico de Ahmed e Althanoon (2022), no qual foi analisado 80 pacientes com artrite reumatoide sob intervenção com hidroxicloroquina e 80 pacientes utilizando placebo, a hidroxicloroquina demonstrou ter propriedades antioxidantes e retardar o curso da doença. Todos os indivíduos tiveram seu índice de peroxidação lipídica, malondialdeído e atividade antioxidante total, superóxido dismutase e níveis de glutathione examinados. Os pacientes com artrite tratados com hidroxicloroquina apresentaram níveis significativamente mais altos de atividade antioxidante total e níveis mais baixos de peroxidação lipídica do que pacientes que não foram tratados com hidroxicloroquina.

Um estudo epidemiológico feito através de um questionário correlacionando a AR com dados demográficos, histórico médico, uso de terapia hormonal, histórico de fumo e outros fatores de estilo de vida têm demonstrado correlação inversa entre os níveis de exposição a antioxidantes. Esses estudos observaram a hipótese de que alimentação balanceada e suplementação de antioxidantes poderiam impedir o desenvolvimento ou agravamento da doença, pois tem sido relatado que pacientes com AR possuem níveis mais baixos de antioxidantes, incluindo vitamina C, vitamina E, betacaroteno, selênio e zinco quando comparados com pacientes controles (Bruna *et al.*, 2014)

Alguns estudos associam a condição antioxidante com a capacidade de doar elétrons ou moléculas de hidrogênio, transferindo essa molécula a outro composto químico e conseqüentemente reduzindo e eliminando os radicais livres existentes (Barbosa *et al.*, 2010; Sucupira *et al.*, 2012).

Os gráficos apresentados na figura 1, que representam os resultados obtidos no teste ABTS nos medicamentos, mostram uma relação dose-resposta entre a concentração do

medicamento e a atividade antioxidante, o que significa que quando a concentração do medicamento aumenta, a sua atividade antioxidante também aumenta e essa relação é diferente em cada medicamento.

O valor de  $R^2$  indica o coeficiente de determinação, e o fato de todos os valores estarem próximos a 1 nos revela que os dados se ajustam bem ao modelo da curva matemática hiperbólica, traduzindo em uma maior confiabilidade nos resultados obtidos experimentalmente.

Com nossos resultados, foi possível concluir que apesar dos três medicamentos apresentarem capacidade de sequestrar radicais livres, dentre os valores obtidos aquele que apresentou melhor atividade antioxidante foi a hidroxicloroquina (IC<sub>50</sub>: 0,113 mg/mL) se fazendo mais eficiente no teste ABTS, indicando que é necessária uma menor quantidade de dose medicamentosa para atingir a metade da inibição de radicais livres.

A estrutura da hidroxicloroquina confere capacidade de doação de elétrons, no caso, o grupo hidroxila e amina primária e secundária entram em ressonância por conta do anel aromático, liberando com maior facilidade o hidrogênio (ou elétron), sendo assim, capaz de neutralizar o radical ABTS. Além disso, o anel aromático confere uma maior capacidade de desativar radicais livres após essa doação de elétrons. O medicamento também apresenta uma alta estabilidade em solução aquosa, permitindo uma melhor interação com os radicais ABTS. Como visto que a AR tem relação com o EO, pode-se conferir ao medicamento, uma posição de relevância no tratamento da doença, podendo contribuir para a melhora de quadros inflamatórios e nos sintomas apresentados.

No caso da sulfassalazina, que apresentou o segundo melhor valor de IC<sub>50</sub> (0,783 mg/mL), a hidroxila e o ácido carboxílico liberam grupos abonador, porém em menor quantidade, dificultando a liberação do hidrogênio se tornando mais eletronegativo, configurando em maior dificuldade em doar elétrons. O grupo fenol também é capaz de doar elétrons e neutralizar os radicais livres, porém, para a liberação da fração ácido 5-aminossalicílico (5-ASA) o medicamento precisa ser metabolizado por enzimas bacterianas presentes no intestino, não ocorrendo no teste in vitro realizado, apresentando um potencial antioxidante incompleto por depender de metabólitos para exercer seu efeito.

A leflunomida se mostrou menos eficiente quando se trata de atividade antioxidante, pois de acordo com o teste, foi necessária uma maior quantidade de medicamento para atingir metade dos efeitos inibitórios. Em relação à eliminação de radicais livre, a leflunomida não

apresenta efeitos terapêuticos favoráveis. A leflunomida não apresenta grupos funcionais que possam interagir com EROS ou radicais livres, reduzindo a capacidade direta de neutralizar o radical ABTS. O medicamento mostra-se mais eficiente ao atuar na modulação do sistema imunológico do que no combate direto ao EO.

#### **4 CONCLUSÃO**

Dentre os medicamentos analisados no teste ABTS – leflunomida, hidroxicloroquina e sulfassalazina - todos os três obtiveram resultados satisfatórios quanto a atividade antioxidante, entretanto, aquele que obteve um melhor resultado foi a hidroxicloroquina, com um IC50 de 0,113mg/ml, se mostrando mais eficiente quanto a eliminação de radicais livres.

O presente trabalho, apesar de trazer resultados esperados e satisfatórios ainda apresenta certas limitações por se tratar de um experimento in vitro, como no caso da leflunomida que necessita de metabólitos liberados no organismo para ter uma melhor eficácia, e não pode refletir diretamente em efeitos apresentados in vivo. Diante de tais limitações, faz-se necessário uma busca adicional nos medicamentos citados, partindo de outros testes in vitro e in vivo para que se possa comparar tais resultados e validá-los.

Sabe-se que o EO está associado com a AR e sua progressão devido a ativação e presença de citocinas e radicais livres presentes no organismo, principalmente na articulação sinovial, portanto, o resultado obtido reforça o potencial da hidroxicloroquina ao atuar como antioxidante e que possa ajudar no curso da doença e na melhora dos sintomas.

Esse estudo sugere que a ação antioxidante pode ser um fator crucial na escolha do tratamento da AR, contribuindo para a ampliação do conhecimento e de novos estudos correlacionando os efeitos da ação antioxidante na melhora da doença. A investigação pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias mais personalizadas como foco nos danos causados pelo EO.

#### **REFERÊNCIAS**

ABBAS, A.K. *et al.* **Imunologia Básica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

ALLEGRA, M.; TEOSIERE, L. Phytochemicals as modulators of oxidative stress-dependent, inflammatory conditions. **Antioxidants**, oct. 2022.

ANDRADE, E.R. *et al.* Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 2010.

BARBOSA, K.B.F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, n.4, ago. 2010.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”. **Analytical Biochemistry**, v.239, n.1, p. 70-76, 1996.

BORGES, L. L. *et al.* Uma Abordagem Sobre Métodos Analíticos Para Determinação Da Atividade Antioxidante Em Produtos Naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 1, p. 12, 2011.

CONITEC. **Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas: Artrite Reumatóide**. Disponível em: [www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2021/20210623\\_relatorio\\_pcdt\\_artrite\\_reumatoide.pdf](http://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2021/20210623_relatorio_pcdt_artrite_reumatoide.pdf). Acesso em: 30 jun. 2024.

CRAMER, J. *et al.* Hydroxyl groups in synthetic and natural-product-derived therapeutics: a perspective on a common functional group. **Journal of medicinal chemistry**, v.62, n.20, oct. 2019.

HASHEMI, G. *et al.* A pilot Study to Evaluate the Effects of Oral N-Acetyl Cysteine on inflammatory and Oxidative Stress Biomarkers in Rheumatoid Arthritis. **Curr Rheumatol Rev.**, v. 15, n. 3, p. 246-253, 2019.

HEINZ L., *et al.* **Pharmakologie Und Toxikologie**. 129 Tabellen. Stuttgart, Thieme, 2006.

JAGANJAC, M. *et al.* Pathophysiology of neutrophil-mediated extracellular redox reactions. **Front. Biosci**, v. 21, p. 839–855, 2016.

JAYAROOPA, K. A. K. A. Isoxazol: Molecules with potential medicinal properties. **Internacional journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences**, v. 3, p. 294–304, 2013.

JIA, L. *et al.* Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-Cov-2 infection in vitro. **Cell Discovery**, v. 6. 2020.

KLISIC, A. *et al.* Editorial: The role of oxidative stress in metabolic and inflammatory diseases. **Frontiers in Endocrinology**, v.8, n.15, fev. 2024.

MACDONALD-WICKS, L.K.; WOOD, L.G.; GARG, M.L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, n.13, oct. 2006.

MANGGE, H.J.; HERMANN, J.; SCHAUENSTEIN, K.: Diet and rheumatoid arthritis – a review. **Scand J Rheumatol**, v. 28, n. 4, p. 201-9, 1999.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical DPPH for estimating antioxidante activity. **Journal os Science na Technology**, v.26, n.2, 2004.

MOTA, L.M.H. *et al.* Consenso 2012 Da Sociedade Brasileira de Reumatologia Para O Tratamento Da Artrite Reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 2, p. 152–174, 2012.

NELL, V.P. *et al.* Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis**, v. 64, p. 1731-1736, 2005.

PARK B. *et al.* Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. **Nat. Immunol**, v. 9, p. 1407–1414, 2008.

QUINONEZ-FLORES, C. M. *et al.* Oxidative Stress RElevance In the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. **National Library of Medicine**, may, 2016.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying na improved ABTS radical cátion decolorization assay. **Free radical Biology and Medicine**, v.26, n.9-10, may, 1999.

ROSENBLUM, M.D.; REMEDIOS, K.A.; ABBAS, A.K. Mechanisms of human autoimmunity. **J. Clin. Investig.**, v. 125, p. 2228-2233, 2015.

SÁNCHEZ-RAMÓN, S. *et al.* Interleucinas En La Fisiopatología de La Artritis Reumatoide: Más Allá de Las Citocinas Proinflamatorias. **Reumatología Clínica**, v. 6, p. 20–24, 2011.

16

SCHREZENMEIER, E.; DORNER, T. Mechanisms of action of hydroxichloroquine and chloroquine: implications for rheumatology. **Nature Reviwes Rheumatology**, v.16, n.3, mar. 2020.

SILVA. B. N.S. *et al.* Intake of atioxidants in patience with rheumatoid arthritis. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.60, n.6, nov./dec. 2014.

SONG, Y.W.; KANG, E.H. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. **QJM**, v. 103, p. 139-146, 2010.

STOLL, M.D. *et al.* Anti-inflammatory and atioxidant effects os sulfasalazine and its metabolite in K/BxN sérum transfer arthrits. **Arthritis e Rhemautology**, 2014.

SUCUPIRA, N.R. *et al.* Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v.14, n.4, 2012.

TOUKAP, A.N. *et al.* Myeloperoxidase and its products in synovial fluid of patients with treated or untreated rheumatoid arthritis. **Free Radic Res**, v. 48, n. 4, p. 461-5, 2014.

VASCONCELOS, T.B. *et al.* Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **Journal of Health Sciences**, 2014.

WEBER FELL. *et al.* **Avaliação do perfil de estresse oxidativo em pacientes com artrite reumatoide em uso de DMARDS convencionais e biológicos: um estudo piloto.** *In:* SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DE UNIJUÍ, 30., 2022, Santa Catarina. **Anais [...].** Santa Catarina, 2022.