



AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE FÁRMACOS NO TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE: INVESTIGAÇÃO IN VITRO

BIANCA PARRA PINTO; ANA JULIA MOREIRA; LAURA GABRIELLY APARECIDA GOMES; CAMILA KEIKO IZONAGA ENOSHITA; ANDRESSA KEIKOMATSUMOTO

RESUMO

O presente estudo teve como finalidade analisar a capacidade de neutralização de radicais livres de fármacos amplamente empregados no tratamento da artrite reumatoide, considerando a influência do estresse oxidativo na patogênese da doença. Foram avaliadas, por meio do ensaio ABTS+, as atividades antioxidantes da hidroxicloroquina, sulfassalazina, e leflunomida, utilizando fármacos dissolvidos em dimetilsulfóxido e submetidos a condições experimentais controladas para a determinação dos valores de IC50. Através dos resultados adquiridos no final do experimento foi possível notar que os fármacos eliminaram o radical ABTS+, confirmando sua atividade inibitória, mas com eficácia distinta entre eles. A hidroxicloroquina se destacou como a mais eficaz na neutralização dos radicais livres, com um IC50 de apenas 0,113 mg/mL. Isso significa que doses relativamente baixas já são capazes de atingir 50% da atividade inibitória. A sulfassalazina também mostrou uma atividade oxidante importante, apresentando um IC50 de 0,783 mg/mL. Já a leflunomida teve um desempenho inferior, com um IC50 de 35,921 mg/mL, provavelmente por não possuir grupos funcionais que facilitam uma interação mais eficiente com as espécies reativas de oxigênio. Esses resultados sugerem que a forte ação antioxidante da hidroxicloroquina pode potencializar suas propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias, tornando-se uma estratégia terapêutica bastante promissora para quem está exposto a altos níveis de estresse oxidativo. Porém, como os experimentos foram feitos in vitro, torna-se importantíssima a realização de investigações in vivo para validar essas evidências e aprofundar a compreensão das implicações clínicas associadas. Em suma, a conjugação dessas propriedades pode viabilizar o desenvolvimento de tratamentos terapêuticos mais individualizados e cada vez mais eficazes a fim de manejar a artrite reumatoide.

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

1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune e inflamatória crônica que afeta de forma devastadora as articulações, provocando sintomas como dor intensa, rigidez e edema, o que pode levar a danos irreversíveis das estruturas sinoviais. Diversos estudos apontam que o processo inflamatório associado à AR está intimamente relacionado ao desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (EROS) e mecanismos antioxidantes, resultando em estresse oxidativo que contribui para a patogênese e progressão da doença (Abbas et al., 2014; Barbosa et al., 2010).

Nesse contexto, mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 e IL-6 desempenham papéis centrais na perpetuação do estado inflamatório, enquanto a deficiência dos sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos quanto não enzimáticos, dificulta a neutralização dos radicais livres formados. Essa interação entre inflamação e estresse oxidativo tem sido associada à deterioração dos tecidos articulares, enfatizando a necessidade de abordagens terapêuticas que

considerem também o potencial antioxidante dos medicamentos empregados no tratamento da AR (Sánchez-Ramón et al., 2011; Toukap et al., 2014).

Apesar do uso consolidado de fármacos como hidroxicloroquina, sulfassalazina e leflunomida para alívio dos sintomas e modulação do curso da AR, a literatura revela uma carência de estudos comparativos que explorem a ação antioxidante destes medicamentos. Compreender os mecanismos que possibilitam a neutralização dos radicais livres pode fornecer subsídios importantes para aprimorar as estratégias terapêuticas e reduzir os danos oxidativos envolvidos na doença.

Este estudo visa avaliar, por meio de ensaios *in vitro*, a capacidade antioxidante dos medicamentos mais utilizados no tratamento da artrite reumatoide – especificamente a hidroxicloroquina, a sulfassalazina e a leflunomida – com o intuito de identificar qual destes se mostra mais eficaz na eliminação de radicais livres, contribuindo assim para a melhoria do manejo clínico e da qualidade de vida dos pacientes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* de medicamentos utilizados no tratamento da artrite reumatoide, utilizando o ensaio ABTS+ como metodologia principal. Os procedimentos foram realizados em laboratório, seguindo rigorosos padrões de controle e análise.

Reagentes e Preparação das Amostras Os medicamentos analisados foram Sulfassalazina 500 mg (Azulfim, laboratório APSEN), Hidroxicloroquina 400 mg (genérico, laboratório SEM) e Leflunomida 20 mg (manipulado na farmácia magistral Biofórmula de Rolândia). Os fármacos foram macerados e dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, Brasil) para obtenção das soluções. O reagente utilizado para o ensaio foi o 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), adquirido da Sigma-Aldrich, EUA. Todos os reagentes utilizados eram de grau comercial mais elevado disponível.

Metodologia de Atividade Antioxidante Para a análise da atividade antioxidante, os medicamentos foram diluídos em concentrações crescentes, permitindo a obtenção de valores de inibição percentual. A solução de ABTS foi preparada a partir de uma concentração inicial de 7 mM, oxidada com persulfato de potássio 2,45 mM e mantida no escuro por 16 horas. Posteriormente, a solução foi diluída em tampão fosfato de sódio (pH 7,4) até atingir uma absorbância de $0,7 \pm 0,02$ a 730 nm. Para cada amostra, foram adicionados 10 µL da solução do medicamento e 4 mL da solução diluída de ABTS. A reação foi realizada ao abrigo da luz, com período de incubação de 6 minutos, e as leituras foram feitas em espectrofotômetro Evolution™ 201 (ThermoFisher Scientific) no comprimento de onda de 730 nm. A capacidade antioxidante foi calculada pela porcentagem de inibição do radical ABTS+, utilizando a fórmula:

$$\text{Atividade (\%)} = [1 - \text{Absorbância da amostra} / \text{Absorbância do controle}] \times 100$$

Análise Estatística A concentração inibitória média (IC50), definida como a concentração necessária para eliminar 50% do radical ABTS+, foi determinada utilizando o software GraphPad Prism®, versão 10, por meio de curvas hiperbólicas de ligação a um sítio. Os resultados foram apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média (SEM) e considerados estatisticamente significativos para $P < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios realizados demonstraram que todos os medicamentos analisados – leflunomida, sulfassalazina e hidroxicloroquina – foram capazes de eliminar o radical ABTS+, confirmando sua atividade antioxidante. No entanto, a eficácia dessa ação variou entre os

fármacos, sendo a hidroxiclороquina a que apresentou maior potência antioxidante, conforme os valores de IC₅₀ obtidos.

A hidroxiclороquina demonstrou um IC₅₀ de 0,113 mg/mL, sendo a substância mais eficiente na neutralização do radical ABTS⁺, indicando que menores concentrações do medicamento são suficientes para atingir metade da inibição dos radicais livres. Esse achado corrobora estudos como o de Ahmed & Althanoon (2022), que destacam a ação antioxidante do fármaco e sua capacidade de reduzir a peroxidação lipídica em pacientes com artrite reumatoide.

A sulfassalazina obteve um IC₅₀ de 0,783 mg/mL, sendo a segunda melhor no teste, mostrando também uma significativa atividade antioxidante. Sua eficácia pode estar relacionada à presença de grupos fenólicos e carboxílicos na estrutura química, que permitem a estabilização de radicais livres, conforme descrito por Stoll et al. (2017).

Por outro lado, a leflunomida apresentou um IC₅₀ de 35,921 mg/mL, sendo a menos eficiente na eliminação de radicais livres. Sua estrutura química, que carece de grupos funcionais capazes de interagir diretamente com espécies reativas de oxigênio, pode explicar esse desempenho inferior, conforme apontado por Jayaroopa (2013) em relação a compostos do tipo isoxazol.

Estudos anteriores sugerem que os medicamentos utilizados no tratamento da artrite reumatoide apresentam não apenas propriedades anti-inflamatórias, mas também potenciais efeitos antioxidantes (Barbosa et al., 2010; Allegra & Tesoriere, 2022). A hidroxiclороquina, por exemplo, além de sua ação imunomoduladora, tem sido associada à redução do estresse oxidativo, o que pode impactar positivamente a evolução da doença.

Já a sulfassalazina, além de sua conhecida atividade imunossupressora, pode modular a expressão de genes relacionados à defesa antioxidante (Quiñonez-Flores et al., 2016). No entanto, a literatura ainda carece de estudos aprofundados que correlacionem diretamente seus mecanismos antioxidantes ao tratamento da AR.

A leflunomida, por sua vez, é reconhecida principalmente pelo seu papel na inibição da proliferação de linfócitos T e não pela eliminação direta de radicais livres. Como demonstrado no estudo de Weber Fell et al. (2022), sua ação se dá mais pela modulação do sistema imunológico do que pelo combate ao estresse oxidativo.

Os dados obtidos reforçam a importância de considerar a atividade antioxidante dos medicamentos ao selecionar terapias para artrite reumatoide. A hidroxiclороquina se destaca como uma opção viável para pacientes que apresentam níveis elevados de estresse oxidativo, podendo complementar sua ação anti-inflamatória com a eliminação de radicais livres.

No entanto, uma limitação do estudo está no fato de que os ensaios foram realizados *in vitro*, sem considerar a influência dos metabólitos gerados no organismo. No caso da sulfassalazina, por exemplo, a fração 5-aminossalicílico (5-ASA) é liberada somente após metabolismo intestinal, o que pode alterar sua capacidade antioxidante em sistemas biológicos.

Assim, futuras pesquisas *in vivo* são necessárias para validar os achados e explorar se os efeitos antioxidantes observados *in vitro* realmente contribuem para o manejo clínico da artrite reumatoide.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou a atividade antioxidante dos principais medicamentos utilizados no tratamento da artrite reumatoide, demonstrando que todos apresentam capacidade de eliminar radicais livres, com destaque para a hidroxiclороquina. Esses achados reforçam a importância da ação antioxidante na escolha terapêutica e sugerem possíveis implicações para o manejo clínico da doença.

Apesar dos resultados obtidos, a pesquisa possui limitações, pois os ensaios foram

conduzidos in vitro, sem considerar os efeitos metabólicos que ocorrem no organismo. Assim, estudos complementares in vivo são essenciais para validar esses dados e aprofundar a compreensão dos mecanismos antioxidantes envolvidos.

Futuras investigações devem explorar o impacto da capacidade antioxidante desses medicamentos no ambiente biológico, avaliando sua influência sobre biomarcadores do estresse oxidativo e da resposta inflamatória. Além disso, pesquisas clínicas podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais personalizadas, considerando o perfil antioxidante dos pacientes com artrite reumatoide.

O conhecimento gerado por este estudo pode servir de base para aprimoramento das abordagens farmacológicas, promovendo tratamentos mais eficazes e possibilitando uma melhor qualidade de vida para indivíduos acometidos pela doença.

REFERÊNCIAS

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

ALLEGRA, M.; TESORIERE, L. Phytochemical as modulators of oxidative stress-dependent, inflammatory conditions. *Antioxidants*, out. 2022.

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.

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, out. 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. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, v. 3, p. 294-304, 2013.

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

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

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

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

STOLL, M. D. et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of sulfasalazine and its metabolite in K/BxN serum transfer arthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 2014.

TOUKAP, A. N. et al. Myeloperoxidase and its products in synovial fluid of patients with treated or untreated rheumatoid arthritis. *Free Radical Research*, v. 48, n. 4, p. 461-465, 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.