

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO  
Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

**RODINEI VIEIRA VELOSO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
FARMACOCINÉTICA DE DERIVADOS DE TRIAZOL E GLUCAL  
E SUA APLICAÇÃO NA ANEMIA FALCIFORME**

Bragança Paulista  
2020

**RODINEI VIEIRA VELOSO – R.A. 001201810972**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
FARMACOCINÉTICA DE DERIVADOS DE TRIAZOL E GLUCAL  
E SUA APLICAÇÃO NA ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Área de Concentração:** Farmacologia

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Mozer Sciani

Bragança Paulista  
2020

QV 325  
V555a

Veloso, Rodinei Vieira.

Avaliação da atividade antioxidante e farmacocinética de derivados de Triazol e Glucal e sua aplicação na anemia falciforme / Rodinei Vieira Veloso. -- Bragança Paulista, 2020.

59 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciência da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Juliana Mozer Sciani.

1. Radicais livres. 2. Antioxidantes. 3. Triazóis.  
4. Glucais. 5. Anemia falciforme. I. Sciani, Juliana Mozer.  
II. Título.

**VELOSO, Rodinei Vieira.** “Avaliação da Atividade Antioxidante e Farmacocinética de Derivados de Triazol e Glucal e Sua Aplicação na Anemia Falciforme” Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 28 de julho de 2020 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Juliana Mozer Sciani - Orientadora e Presidente  
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Giovanna Barbarini Longato  
Universidade São Francisco

Prof. Dr. José Aires Pereira  
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Raquel de Cássia dos Santos  
Universidade São Francisco

## RESUMO

Os radicais livres são moléculas altamente instáveis, formadas *in vivo* por meio de reações catalíticas das enzimas, das quais ocorre a transferência de elétrons. Estas moléculas alteram proteínas extracelulares e intracelulares, as quais podem ocasionar danos celulares. Visando a redução na formação de radicais livres, as pesquisas se ampliam na direção da utilização dos antioxidantes. Uma delas é o possível uso de moléculas antioxidantes para o tratamento da anemia falciforme, doença de origem genética que acomete grande parte da população, e que não tem tratamento. O objetivo da presente pesquisa é avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de compostos derivados de triazol e glucal, estudar a sua farmacocinética e verificá-los na redução do estresse oxidativo de hemácias, visando uma possível aplicação na anemia falciforme. Vinte e oito compostos inéditos foram obtidos pela síntese de derivados de C-glycosyl-bis-1,2,3-triazol e 3,4,6-tri-O-acetyl-d-glucal, e foram submetidos aos testes antioxidantes de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) e PFRAP (Ferric Reducing Anti-Oxidant Power). Os compostos antioxidantes com melhor atividade nos dois ensaios foram testados em hemácias de voluntários saudáveis, e as células foram avaliadas quanto à diminuição da hemólise, causada pela liberação de espécies reativas de oxigênio – o tratamento foi realizado antes ou após o estresse oxidativo. Além disso, as moléculas ativas foram analisadas *in silico* para avaliação das características farmacocinéticas e sua potencialidade de se tornar um fármaco. Após os testes de DPPH e PFRAP foram selecionados 2 compostos com atividade importante, que foram conduzidos à uma avaliação em hemácias. Um dos compostos reduziu 61% da hemólise induzida por peróxido de hidrogênio, enquanto o outro teve 28% de redução. No efeito prevenção (adição dos compostos antes da indução de estresse oxidativo), somente uma delas foi eficaz (composto AS-66-1), com 40% de redução na hemólise. As análises farmacocinéticas mostraram que ambas as moléculas têm potencial para serem fármacos, principalmente o AS-66-1, que apresentou parâmetros que se enquadram em todos os critérios de permeabilidade de membranas plasmáticas e toxicidade, representando um bom candidato a fármaco para o tratamento da anemia falciforme.

**Palavras chave:** Radicais Livres. Antioxidantes. Triazois. Glucalis. Anemia falciforme

## ABSTRACT

Free radicals are highly unstable molecules, formed *in vivo* through catalytic reactions of enzymes, from which electron transfer occurs. These molecules alter extracellular and intracellular proteins, which can cause cellular damage. Aiming the reduction of the free radical's formation, research is expanding towards the use of antioxidants. One is the possible use of antioxidant molecules for the treatment of sickle cell disease, a disease of genetic origin that affects a large part of the population, and which has no treatment. The objective of this research is to evaluate the antioxidant activity *in vitro* of compounds derived from triazole and glucal, to study their pharmacokinetics and to verify them in the reduction of the oxidative stress of red blood cells, aiming at a possible application in sickle cell disease. Twenty-eight unprecedented compounds were obtained by the synthesis of derivatives of C-glycosyl-bis-1,2,3-triazole and 3,4,6-tri-O-acetyl-d-glucal, and were subjected to DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and PFRAP (Ferric Reducing Anti-Oxidant Power) antioxidant tests. The antioxidant compounds with the best activity in both assays were tested in red blood cells of healthy volunteers, and the cells were evaluated for decreased hemolysis, caused by the release of reactive oxygen species - the treatment was carried out before or after oxidative stress. In addition, the active molecules were analyzed *in silico* to evaluate the pharmacokinetic characteristics and their potential to become a drug. After the DPPH and PFRAP tests, 2 compounds with important activity were selected, which were conducted for an evaluation in red blood cells. One of the compounds reduced 61% of the hemolysis induced by hydrogen peroxide, while the other one had a 28% reduction. In the prevention effect (addition of compounds before oxidative stress induction), only one of them was effective (compound AS-66-1), with a 40% reduction in hemolysis. Pharmacokinetic analyzes showed that both molecules have the potential to be drugs, mainly AS-66-1, which presented parameters that fit all criteria of plasma membrane permeability and toxicity, representing a good drug candidate for the sickle cell disease treatment.

**Key-words:** Free radicals. Antioxidants. Triazoles. Glucals. Sickle cell disease

## Lista de Símbolos e Abreviações

°C – graus Celsius  
5-HMF - 5-Hydroxymethylfurfural  
ANOVA - análise de variância  
CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética  
CYP - enzimas do complexo de citocromo P450  
Da - Daltons  
DNA - ácido desoxirribonucleico  
DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil  
DTT - ditioneitol  
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético  
EROs – espécies reativas de oxigênio  
FDA – *food and drug administration*  
Fe - ferro  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
HbA - hemoglobina A  
HBA - aceptores de ligação de hidrogênio  
HbAS - gene A dominante da hemoglobina na anemia falciforme  
HBD - doadores de ligação de hidrogênio  
HbF – hemoglobina fetal  
HbS - hemoglobina S  
HbSS - gene S recessivo da hemoglobina na anemia falciforme  
HTS - *high throughput screening*  
LogP - coeficiente de partição n-octanol/água  
mL - mililitro  
mM – milimolar  
μM – micro molar  
NAD – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina  
NADH – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido  
NADPH  
nm - nanômetros  
PBS – tampão fosfato-salina  
PFRAP - *potassium ferricyanide reducing power*  
pH - potencial Hidrogeniônico  
ROS – espécies reativas de oxigênio  
RPM – rotações por minuto  
SAR – relação estrutura-atividade  
SOD – superóxido dismutase  
TPSA - área de superfície polar topológica  
UNIFAG - Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia

## Lista de Figuras

<b>FIGURA 1.</b> Classificação de antioxidantes, baseado em via enzimática e não-enzimática. ....	12
<b>FIGURA 2.</b> Formação de radicais livres e ação de enzimas antioxidantes para sua eliminação. 13	
<b>FIGURA 3.</b> Molécula de hemoglobina e o grupo heme. ....	18
<b>FIGURA 4.</b> Comparação entre (a) hemácias normais, uniformes e em forma de taça e (b) hemácias com formas variadas vistas na anemia falciforme, que variam desde os normais até os pontudos ou em forma de foice. ....	20
<b>FIGURA 5.</b> Estrutura química inicial das moléculas utilizadas no estudo. ....	25
<b>FIGURA 6.</b> Porcentagem de atividade antioxidante de 28 moléculas sintéticas pelo método do DPPH .....	31
<b>FIGURA 7.</b> Porcentagem de atividade antioxidante de moléculas em 3 diferentes concentrações pelo método do DPPH. ....	33
<b>FIGURA 8.</b> Atividade antioxidante de 5 moléculas pelo método do PFRAP.....	34
<b>FIGURA 9.</b> Atividade antioxidante de moléculas em 3 diferentes concentrações pelo método do PFRAP.....	36
<b>FIGURA 10.</b> Capacidade hemolítica de 2 moléculas em hemácias de pacientes sadios .....	37
<b>FIGURA 11.</b> Capacidade de redução da hemólise induzida por peróxido de hidrogênio com as amostras AS-66-1 e AS-64-6, em uma avaliação de tratamento. ....	38
<b>FIGURA 12.</b> Capacidade de prevenção da hemólise induzida por peróxido de hidrogênio com as amostras AS-66-1 e AS-64-6, em uma avaliação prevenção. ....	39

## Lista de Gráficos e Tabelas

<b>TABELA 1.</b> Parâmetros considerados para avaliação físico-química dos ligantes e valores máximos aceitáveis .....	29
<b>TABELA 2.</b> Avaliação farmacocinética in <i>silico</i> .....	40

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
1.1. Antioxidantes .....	11
1.2. Compostos triazóis e glucosídeos.....	16
1.3. Anemia falciforme.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS .....	24
3.1. Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivos Específicos .....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
4.1. Obtenção dos Compostos .....	25
4.2. Ensaio antioxidante .....	25
4.2.1. DPPH .....	25
4.2.2. PFRAP .....	26
4.3. Teste em células - hemácias.....	27
4.3.1. Atividade hemolítica em hemácias de pacientes saudáveis .....	27
4.3.2. Atividade dos compostos em hemácias induzidas ao estresse oxidativo.....	28
4.4. Estudo <i>in silico</i> para Avaliação Farmacocinética .....	29
4.5. Análise estatística .....	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1. Ensaio antioxidante .....	31
5.2. Atividade hemolítica .....	36
5.3. Atividade antioxidante em hemácias.....	37
5.4. Avaliação <i>in silico</i> das moléculas antioxidantes ativas.....	39
6. DISCUSSÃO .....	41
7. CONCLUSÃO .....	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
ANEXOS.....	57

## 1. INTRODUÇÃO

Os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas orgânicas, inorgânicas ou átomos que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita mais externa. Devido a esta característica, são moléculas independentes, altamente instáveis, com pequena meia-vida e quimicamente muito reativas (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

O desemparelhamento dos elétrons nas moléculas faz com que ela apresente alta instabilidade energética e cinética, e com isso há necessidade de doar ou retirar o elétron de outra molécula (HIRATA; SATO; SANTOS, 2004). Dentre alguns exemplos de radicais livres que interferem com as funções fisiológicas normais, pode-se citar o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), nitrogênio (RNS), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e radical semiquinona ( $\text{Q}^\cdot$ ) (RICE-EVANS; GOPINATHAN, 2010).

A formação de EROs *in vivo* pode ocorrer no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana plasmática das células, durante reações catalíticas de enzimas no processo de transferência de elétrons da fosforilação oxidativa, que acontece no metabolismo celular. Além disso, a produção desses radicais pode ser estimulada por fatores externos, como exposição a raios-X, ozônio, cigarro e poluentes do ar (LOBO et al., 2010).

São moléculas importantes para a manutenção da homeostasia e da função celular, quando presentes em concentrações fisiológicas. Um exemplo é a participação na ativação do sistema imunológico, no qual os macrófagos utilizam peróxido de hidrogênio para atacar microrganismos. Os radicais livres, da mesma forma, apresentam papel importante na desintoxicação de drogas e na produção de óxido nítrico pelo endotélio íntegro, substância que exerce uma importante função vasodilatadora (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

No entanto, o aumento na sua concentração pode ocasionar danos às células em consequência às alterações em proteínas extracelulares e modificações intracelulares, sendo o alvo

celular diretamente relacionado ao local de formação do radical (HIRATA; SATO; SANTOS, 2004).

As principais fontes radioativas são os radicais superóxido, e o radical mais reativo é o hidroxila ( $\text{OH}^-$ ), que possui maior potencial de causar danos na célula e no DNA (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), apesar de não ser um radical livre, devido à ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, pois participa da reação que produz o radical hidroxila. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas e reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao  $\text{Fe}^{5+}$  (SALVADOR; HENRIQUE, 2004).

Assim, o papel lesivo das radicais livres tem sido relacionado à diversas doenças, como cardiopatias, aterosclerose, câncer, Parkinson, Alzheimer e doenças pulmonares (LIU et al., 2017; DHALLA et al., 2000).

Em situações fisiológicas, o organismo apresenta defesas contra a produção de EROs, por meio da ação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, visando diminuir a lesão que estas substâncias podem ocasionar (NYSKA, 2002). O desequilíbrio entre as moléculas oxidantes e antioxidantes é um processo nomeado estresse oxidativo (RAHAL et al., 2014).

### **1.1. Antioxidantes**

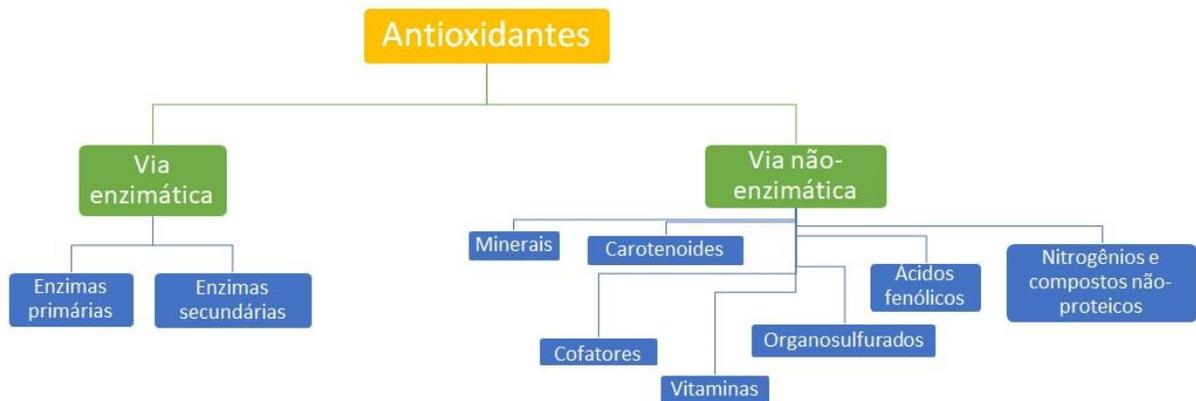
Os antioxidantes são definidos como substâncias que, presentes em baixas concentrações quando comparado a do substrato oxidável, são capazes de diminuir significativamente ou prevenir os efeitos deletérios causados pelos radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995).

As defesas efetuadas pelos antioxidantes podem ocorrer de várias formas. Os compostos podem ser inibidores das reações de oxidação, principalmente dos radicais lipídicos (oxidantes preventivos); podem interromper a propagação de reações de auto oxidação (antioxidantes

quebradores de cadeia); podem agir como diminuidores de oxigênio singlete; podem ter ação sinérgica com outros antioxidantes; serem agentes redutores que convertem peróxidos em compostos estáveis; quelantes de metal que convertem os metais pró-oxidantes em produtos estáveis; inibidores de enzimas pró-oxidativas (lipoxigensases) (LÜ et al., 2010; KURUTAS, 2015).

Os antioxidantes podem ser classificados de diversas formas. Uma das classificações é baseada na função, sendo divididos em primários e secundários. Os primários são os antioxidantes “*quebradores de cadeia*”, principalmente os compostos fenólicos, que reagem com radicais lipídicos convertendo-os em produtos mais estáveis. Os antioxidantes secundários são compostos que desempenham a função de captura dos radicais livres, inibindo as reações em cadeia (NIMSE; PAL, 2015).

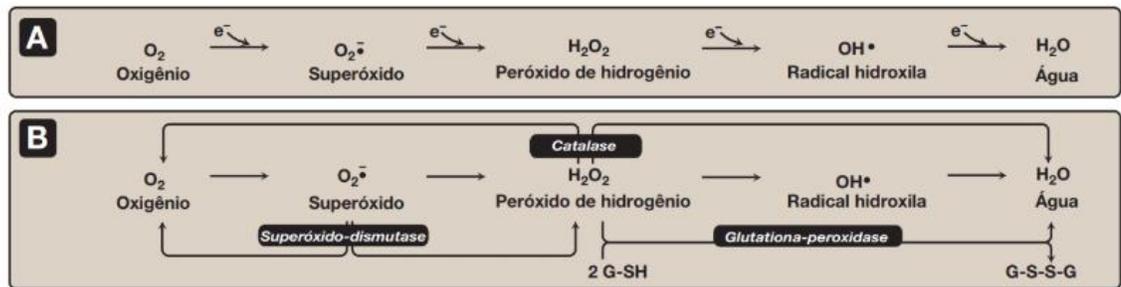
Outra classificação é baseada em vias enzimática ou não enzimática, conforme mostrado na figura 1.



**FIGURA 1. Classificação de antioxidantes, baseado em via enzimática e não-enzimática.** Fonte: Figura adaptada de CAROCHO; FERREIRA (2013, pág.18).

As enzimas primárias são aquelas que diretamente previnem ou neutralizam a ação de radicais livres. As três enzimas que participam desse sistema são glutaciona-peroxidase, catalase e superóxido dismutase, e as respectivas atividades antioxidantes estão mostradas na figura 2. As enzimas secundárias incluem a glutaciona-redutase e a glicose-6-fosfato desidrogenase, que participam do metabolismo celular e não neutralizam diretamente os radicais livres, mas tem uma função importante de auxiliar outros antioxidantes endógenos (CAROCHO; FERREIRA, 2013, RATNAM et al., 2006).

No caso de células com pouca capacidade de executar respiração aeróbia, como as hemácias, há formação de NADPH, essencial para a manutenção da glutaciona reduzida, que por sua vez elimina os radicais livres e peróxidos formados na célula. Além disso, esta enzima mantém os estados reduzidos de grupos sulfidríla em proteínas, como a hemoglobina, impedindo que esta seja oxidada e conseqüentemente desnaturada (JONES, 2006; WU et al., 2004).



**FIGURA 2. Formação de radicais livres e ação de enzimas antioxidantes para sua eliminação.** G-SH = glutaciona reduzida; G-S-S-H = glutaciona oxidada. Fonte: FERRIER, 2019, pág. 556.

Em relação aos antioxidantes não enzimáticos, a célula produz algumas dessas substâncias, contudo, eles são basicamente de origem exógena, obtidas pela alimentação ou sintéticos. Nesse grupo encontram-se minerais, cofatores, carotenoides, organosulfurados, vitaminas, ácidos fenólicos e nitrogênios/compostos não-proteicos. Exemplos são o ácido ascórbico, ácido lipóico,

tocoferóis, polifenóis e beta-carotenos (CAROCHO; FERREIRA, 2013, BOUAYED; BOHN, 2010).

Os antioxidantes não enzimáticos podem atuar de forma direta ou indireta, ou seja, agem após a formação dos radicais livres, ou, como os de ação indireta que incluem principalmente os agentes quelantes, que previnem a formação dos radicais (UTTARA et al., 2009).

Vale destacar que as vitaminas C, E e A, bem como os flavonoides, carotenoides e coenzima Q, são os importantes na intercepção dos radicais livres (OLIVEIRA et al., 2009).

Os polifenóis são a maior classe de antioxidantes obtidos da alimentação e compreendem os ácidos fenólicos, flavonoides e amidas polifenólicas. As ações benéficas destes compostos estão associadas a capacidade de sequestrar os radicais livres e modular vias de sinalização intracelulares (TSAO, 2010, DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Os ácidos fenólicos apresentam importância no processo de inibição da peroxidação lipídica e a lipo-oxigenase *in vitro*. A sua atividade antioxidante se dá em decorrência principalmente das suas propriedades redutoras e de estrutura química, o que lhe permite um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos fenólicos formados posteriormente são altamente estáveis, devido a ressonância do anel aromático, presente nestes compostos (SOUZA, et al., 2007).

No que refere aos polifenóis do tipo flavonoide, o grupo compreende as isoflavonas, neoflavonoides, chalconas, flavonóis, proantocianidinas e antocianina, a depender do carbono no anel C, em que o anel B está acoplado e o grau de insaturação e oxidação do anel C (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel que atua em fase aquosa, inibindo a formação de radicais livres. Contudo apresenta dificuldades de agir nos compartimentos lipofílicos para inibir a peroxidação dos lipídeos. Portanto, para se obter ação, a vitamina C é ingerida em altas quantidades e também é adicionada nos alimentos para inibir a formação de metabólitos nitrosos carcinogênicos (BIANCHI, ANTUNES, 1999).

A vitamina C pode ser encontrada sob duas formas, a saber, a forma reduzida, denominada de ácido ascórbico, e a forma oxidada, conhecida como ácido desidroascórbico. Essas formas estão presentes nos tecidos orgânicos e fisiologicamente ativas, contudo, se sofrerem uma nova oxidação do ácido desidroascórbico para o ácido dicetogulônico produz a formação de um produto inativo e irreversível da vitamina C (ARANHA, et al., 2000).

A ação antioxidante da vitamina C ocorre devido a sua capacidade de ligar-se aos dois lados da reação de óxido-redução, e desta forma, consegue acrescentar ou retirar átomos de hidrogênio de uma molécula. Cada vitamina C tem a capacidade de retirar dois átomos de hidrogênio, em um processo de oxidação, formando o ácido desidroascórbico, por sua vez, quando este passa o processo de redução, ganha dois átomos de hidrogênio, formando novamente o ácido ascórbico (DUCONGE et al., 2008).

O ácido ascórbico é molécula com solubilidade aquosa de 0,3 g/mL, com pKa de 4,17. Esta molécula sofre absorção no jejuno e no íleo, sendo necessário a presença de sódio. A capacidade de absorção é de 1200 mg/24h, sendo que a suplementação alta deste composto diminui a taxa de absorção para 49,5% para uma dose oral igual a 1,5 g, a 16,1% para dose igual a 12 g. O seu transporte no plasma ocorre na forma de ânion livre, sendo transferido para difusão simples para o interior dos leucócitos e dos eritrócitos. A sua distribuição ocorre de forma ampla para todos tecidos, contudo alguns conseguem apresentar altas taxas de ácido ascórbico, a saber glândula supra-renal, a hipófise e a retina. Já os tecidos fígado, pulmões, pâncreas e leucócitos têm teores médios, e rins, músculos e eritrócitos têm pequenos teores de ácido ascórbico (DUCONGE et al., 2008).

A eliminação do excesso do ácido ascórbico ocorre nos rins, os principais metabólitos, além do ácido ascórbico inalterado, são o ácido desidroascórbico, o ácido oxálico e o ácido 2,3-dicetogulônico (ARANHA et al., 2000).

A vitamina E pode ser encontrada em óleos vegetais, estando em alta concentração no germe do trigo, é uma vitamina lipossolúvel, sendo a mesma absorvida no intestino e transportada no plasma na forma de lipoproteínas. Esta vitamina é capaz de prevenir eficazmente peroxidação

lipídica da membrana plasmática. Contudo existem diversas formas naturais isoméricas da Vitamina E, sendo a  $\alpha$  – tocoferol, a forma mais usada e potente (REBOUL et al., 2007).

A associação da vitaminas C e E é frequentemente descrito na literatura, como ação sinérgica na inibição da peroxidação dos lipídeos da membrana e na proteção de DNA. O uso da vitamina E está associado a minimizar danos causados pelos radicais livres, associado a doenças específicas, incluindo câncer, artrite, catarata e o envelhecimento (BIANCHI, ANTUNES, 1999).

A vitamina A é importante no processo de crescimento e na diferenciação celular, sendo o  $\beta$ -caroteno o carotenóide encontrado na natureza com maior poder de formação de vitamina A, a qual apresenta um caráter lipossolúvel, e possui a capacidade de inibir a oxidação de compostos pelos peróxidos (FERREIRA, 2010a).

## 1.2.Compostos triazóis e glucais

Triazóis são uma classe de compostos heterocíclicos que desempenham uma série de atividades farmacológicas. Possuem um sistema de anel di-insaturado de cinco membros, contendo três átomos de nitrogênio em um núcleo heterocíclico. Ocorre em duas formas isoméricas possíveis, a 1,2,3 triazóis e 1,2,4 triazóis (KASHYAP; SILAKARI, 2018).

Compostos contendo triazóis têm sido muito utilizados na clínica. Antifúngicos, como fluconazol, isavuconazol, itraconazol, entre outros, possuem esse grupo funcional em sua estrutura, sendo os mais importantes o 1,2,3-Triazol e 1,2,4-Triazol (LASS-FLÖRL, 2011). Esses compostos têm um amplo espectro de ação, incluindo as micoses provocadas por diversas espécies, por isso são utilizados amplamente nos tratamentos clínicos (MOREIRA, 2010)

Atualmente, esse *scaffold* tem se mostrado bioativo e tem sido utilizado para o estudo de antimicrobianos, antivirais, antitumorais e doenças neurodegenerativas (KUMAR; KAVITHA, 2013).

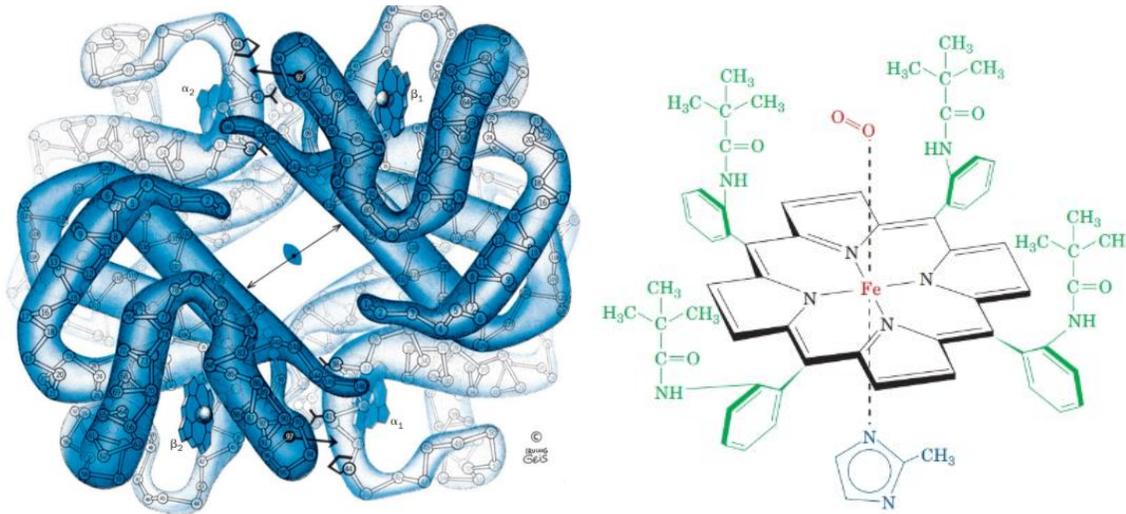
Além disso possui propriedades farmacocinéticas favoráveis por se ligarem facilmente com alvos terapêuticos. Por exemplo, em um 1,2,3-Triazol 1,4-disubstituído, a ligação C-H como doador de hidrogênio e o par N-3 como um aceptor de hidrogênio (BONANDI et al., 2017).

O uso desses compostos está sendo atualmente avaliado para atividade antioxidantes. Desta forma, há alguns trabalhos que relatam análogos com tal atividade, bem como os mecanismos ainda não são bem compreendidos (ALVES et al., 2018).

A junção de glucosídeos com triazóis tem oferecido compostos com alta estabilidade, natureza polar (compatível com fluidos biológicos), e facilidade de ligação com hidrogênio pelo anel triazólico e biocompatibilidade pela presença do centro esterogênico do carboidrato (FERREIRA et al., 2010b).

### **1.3. Anemia falciforme**

A anemia falciforme é uma doença de causa genética que acomete as células vermelhas do sangue, os eritrócitos. É caracterizada por uma mutação do aminoácido ácido glutâmico pelo aminoácido valina na cadeia  $\beta$  da hemoglobina A (HbA), cuja estrutura está mostrada na figura 3, constituindo assim a hemoglobina S (HbS). A presença de um gene S recessivo (HbSS) ou dominante (HbAS) caracteriza a doença como doença falciforme ou traço falciforme, respectivamente (AZAR; WONG, 2017).



**FIGURA 3. Molécula de hemoglobina e o grupo heme.** À esquerda a hemoglobina com 4 cadeias, duas  $\alpha$  e duas  $\beta$ , cada uma contendo o grupo heme. À direita, detalhe do grupo heme com molécula de porfirina e íon ferro. Fonte: VOET; VOET, 2013, págs. 328 e 334.

Por conta da mutação, a HbS se difere da HbA pela perda de das cargas elétricas por subunidade da proteína. Com isso, apresenta estabilidade e solubilidade distintas, com tendência à formação de agregados. Devido à essa alteração, a estrutura da hemácia sofre modificações, se tornando deformada e enrijecida, o que contribui para a vasocclusão, fenômeno responsável por consequentes alterações moleculares na própria hemácia e em outros órgãos.

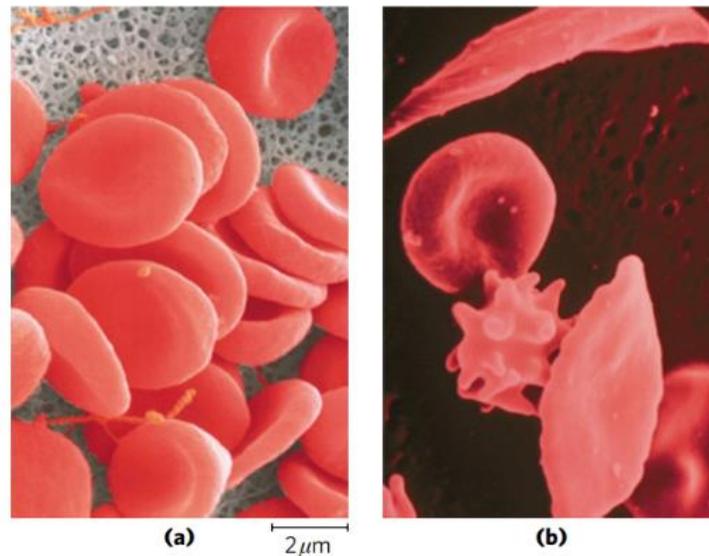
A hemoglobina S diminui o tempo de meia vida das hemácias, reduz a sua capacidade de transportar oxigênio, causa inflamação e comprometimento do metabolismo do ferro (WRIGHT; REID; STENNETT, 2014).

A membrana das hemácias contém grande quantidade de grupos -SH, que são convertidos em componentes dissulfeto (R-SSG) pelos agentes oxidantes. Esse fenômeno leva à desnaturação das proteínas da membrana e oxidação dos seus componentes lipídicos (lipoperoxidação), que pode, por sua vez, induzir o estresse oxidativo intracelular. Além disso, a formação de R-SSG causa oxidação proteica, como ocorre com a hemoglobina, que se agrega na célula. Todo esse processo pode levar a célula ao rompimento (hemólise) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Por conta disso, o paciente diagnosticado com anemia falciforme apresenta um aumento do estresse oxidativo e mediadores inflamatórios em comparação com seus homólogos saudáveis, de forma que a utilização de antioxidantes tem sido investigada para o tratamento nessa doença, visando um controle da extensão da lesão tecidual (WRIGHT; REID; STENNETT, 2014).

A figura 4 mostra a comparação de uma hemácia de um humano saudável, e uma hemácia de um paciente portador de anemia falciforme, em que é possível observar a célula no formato de meia lua ou foice, característica da doença.

A anemia falciforme é a doença hereditária mais comum no mundo e no Brasil, que causa alta mortalidade, principalmente no continente africano. Segundo o Ministério da Saúde, não há dados consistentes sobre a mortalidade e a letalidade por doenças falciformes no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015), em 2007 foi estimado que cerca de 3.500 crianças, por ano, nascem com doença falciforme e 200.000 com o traço falciforme entre os recém-nascidos vivos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). As maiores taxas de óbitos estão na região Centro-Oeste – o estado de Goiás registrou 0,48 mortes por 100.000 habitantes), além da Bahia, que também tem essa taxa de óbitos. As maiores taxas de mortalidade estão relacionadas com o genótipo homozigótico HbSS (POMPEO et al., 2020).



**FIGURA 4. Comparação entre (a) hemácias normais, uniformes e em forma de taça e (b) hemácias com formas variadas vistos na anemia falciforme, que variam desde os normais até os pontudos ou em forma de foice.** Fonte: NELSON; COX, 2019, pág 172.

Os sintomas da doença são variados: os pacientes podem não apresentar quase nenhum sintoma, ou ter crises graves da doença, com sintomas de dores ósseas, na barriga, infecções, podendo levar à morte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Hoje, o procedimento terapêutico recomendado para essa doença inclui a transfusão de sangue, a terapia antibiótica e vacinação contra o pneumococo e todas as complicações. Quanto à terapia farmacológica para a anemia falciforme, são considerados a administração de moléculas indutoras de hemoglobina fetal (HbF), agentes antianêmicos, moléculas que diminuem adesão, moduladores de isquemia-reperfusão, agentes que fazem balanço entre Hb livre e grupo heme, anti-inflamatórios, antitrombóticos e antiplaquetários (TELEN et al., 2019).

Com relação à antioxidantes, os medicamentos aprovados pelo FDA para o tratamento da anemia falciforme incluem principalmente a hidroxiureia e a L-glutamina (REES, 2011; GIBSON et al., 2015; KASSA et al., 2019).

A hidroxiureia começou a ser testada na anemia falciforme desde 1984 e hoje é a principal terapia específica medicamentosa para a anemia falciforme (PLATT et al., 1984; AGRAWAL et al., 2014). No entanto, não há um consenso sobre o seu mecanismo de ação, mas acredita-se que o fármaco cause uma diminuição no grau de polimerização da hemoglobina e consequente alívios dos sintomas associados à doença, além de aumentar os níveis de HbF. Ainda se cogita a possibilidade de um mecanismo de proteção pela S-nitrosilação de  $\beta$ Cys93 (EATON AND BUNN, 2017).

A L-glutamina aumenta a atividade de síntese de NAD, reduzindo a produção de espécies reativas, uma vez que o potencial redox é definido como uma taxa de NADH para a soma de NADH mais NAD<sup>+</sup>. Essa mudança no potencial redox diminui a sensibilidade da hemácia ao estresse oxidativo (NIIHARA et al., 1997).

## 2. JUSTIFICATIVA

Diante do exposto, os antioxidantes exercem um importante papel nos sistemas biológicos e, portanto, é de interesse das indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia, devido à propriedade de conservação de muitos produtos do mercado, além da prevenção e tratamento de muitas patologias, como câncer, doenças degenerativas, cardiovasculares, artrite, arteriosclerose e o processo normal de envelhecimento (BETTENCOURT, 2017).

No campo da anemia falciforme, os antioxidantes têm sido extensivamente estudados para melhor compreensão do papel do estresse oxidativo na doença e como essas moléculas podem trazer benefícios aos pacientes. Nesse sentido, a busca por novos antioxidantes é fundamental.

As pesquisas avançam não somente para a descoberta de novos antioxidantes, como também na melhora do perfil farmacocinético dos que já existem, visando aprimorar as questões que se referem à absorção, distribuição, metabolização e excreção dos compostos, uma vez que os antioxidantes mais conhecidos (vitaminas) não tem um perfil adequado de absorção e distribuição, principalmente em hemácias, o foco desse trabalho. Por conta disso, esse trabalho leva em conta não somente a prospecção de novas moléculas antioxidantes, mas também a seleção daquelas mais atrativas do ponto de vista físico-químico, por meio de avaliações farmacocinéticas. Assim, a seleção foi feita pela atividade antioxidante e pelas propriedades medicamentosas.

Nesse sentido, foram utilizadas moléculas derivadas de triazóis e gluciais, uma vez que esses protótipos têm sido associados à atividade antioxidante. Além disso, são estruturas estáveis, com rota de síntese já estabelecida, rápida e de baixo custo, fatores igualmente importantes quando se trata do desenvolvimento de fármacos.

A aplicação, portanto, de tais moléculas antioxidantes na anemia falciforme se dá por se tratar de uma doença sem cura, com poucas opções terapêuticas, que acomete grande parte da população mundial. Assim, tendo em vista o potencial terapêutico de tais moléculas, nesse trabalho

foi feita uma triagem de compostos derivados de triazóis e glucal, por sua atividade antioxidante monitorada por estratégias de ensaios químicos e celulares, a fim de comprovar a participação de uma atividade antioxidante da remoção de radicais livres de hemácias. Na triagem ainda foi considerada a farmacocinética dos compostos, visando a seleção de um medicamento candidato.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo é avaliar a atividade antioxidante de moléculas derivadas de 1,2,3-triazol e glucal e investigar sua aplicação na anemia falciforme além de avaliar sua propriedade farmacocinética.

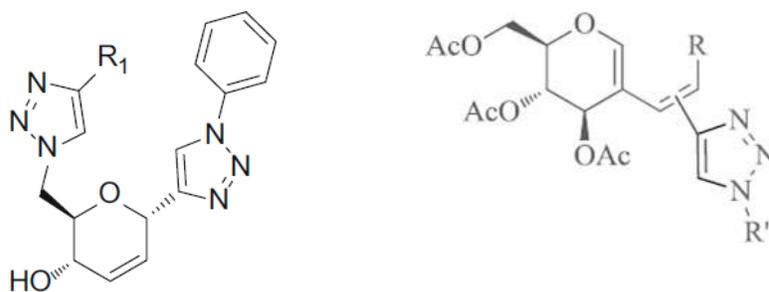
#### 3.2. Objetivos Específicos

- Obter compostos sintéticos análogos de 1,2,3-triazol e glucal;
- Analisar a atividade antioxidante dos compostos pela técnica de captura do radical livre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) e pelo método PFRAP (Ferric Reducing Anti-Oxidant Power);
- Investigar a atividade hemolítica das moléculas;
- Avaliar a capacidade das moléculas de diminuir atividade hemolítica induzida por estresse oxidativo;
- Observar a farmacocinética dos compostos *in silico*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção dos Compostos

Vinte e oito compostos foram obtidos pela síntese de derivados de C-glycosyl-bis-1,2,3-triazol a partir de 3,4,6-tri-O-acetyl-d-glucal, conforme descrito por Shamin et al., (2015 e 2017). A síntese foi realizada no Laboratório de Síntese de Moléculas Bioativas, no Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, sob a coordenação do Dr. Hélio Alexandre Stefani. As moléculas utilizadas como ponto de partida estão apresentadas na Figura 5.



**FIGURA 5. Estrutura química inicial das moléculas utilizadas no estudo.** No grupo R foram adicionados diversos grupos funcionais para a síntese dos 28 compostos.

### 4.2. Ensaio antioxidantes

#### 4.2.1. DPPH

O teste de DPPH foi conduzido em microplacas de 96 poços, conforme descrito por Rajesh e Natvar (2011). Para isso, 10  $\mu$ L de amostra (0,5 mM) foi incubado com 10  $\mu$ L de DPPH (0,1 mM

concentração final, diluído em metanol) e acrescidos 180 µL de metanol. A reação foi incubada por 30 minutos, no escuro, à temperatura ambiente, e após esse período realizou-se uma medida de absorvância em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 515 nm. Os ensaios foram feitos em triplicata e para o cálculo foi considerada a média dos valores obtidos.

Como controle, foram adicionados 10 µL de metanol em vez da amostra e para o controle do ensaio utilizou ácido ascórbico (1 mM) no lugar das amostras. O valor de absorvância obtido com o ácido ascórbico (controle do ensaio) não foi utilizado para o cálculo.

Para o cálculo de atividade antioxidante, em porcentagem, utilizou a fórmula:

$$100 - ((A_{\text{amostra}} \times 100) / A_{\text{controle}})$$

Para amostras que demonstraram atividade importante foi feita uma curva concentração-resposta com 0,5, 1 e 2 mM dos principais compostos, com o ensaio feito da mesma forma como descrito acima.

#### **4.2.2. PFRAP**

O teste de PFRAP foi conduzido em microtubos e posteriormente em microplacas de 96 poços (VIJAYALAKSHMI; RUCKMANI, 2016). A amostra (0,5 mM, 10 µL) foi incubada com 250 µL de tampão fosfato (PBS, 50 mM, pH 7,3) e 250 µL de ferrocianeto de potássio 1%. A mistura foi agitada em vórtex e incubada a 50°C por 20 min. Após isso adicionou 250 µL de ácido tricloroacético 10% e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos, em temperatura ambiente. Uma alíquota de 250 µL de sobrenadante foi adicionada a 250 µL de água destilada e 50 µL de cloreto férrico 0,1%. Essa reação teve a absorvância medida de em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 700 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e para o cálculo foi considerada a média dos valores obtidos.

Como controle, adicionou-se 10 µL de PBS em vez da amostra e para o controle do ensaio utilizou ácido ascórbico (1 mM) no lugar das amostras, não mostrado nos resultados.

Para amostras que demonstraram atividade importante foi feita uma curva concentração-resposta com 0,5, 1 e 2 mM dos principais compostos, com o ensaio feito da mesma forma como descrito acima.

### **4.3. Teste em células - hemácias**

#### **4.3.1. Atividade hemolítica em hemácias de pacientes saudáveis**

Para a determinação de atividade hemolítica dos compostos foi utilizado sangue de voluntários saudáveis, obtidos por doação da UNIFAG, considerado material de descarte, após o processo de triagem de voluntários referente à primeira coleta, ou seja, de voluntários que não passaram por qualquer procedimento na Unidade e estão cientes e concordaram com este procedimento. O procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco (CAAE 25441719.0.0000.5514).

Um volume de 1 mL sangue de cada voluntário (em um total de 20 voluntários) foi aleatoriamente agrupado para formação de um *pool* geral de sangue, para ser utilizado nesse trabalho, para normalizar diferenças individuais, uma vez que não foi feita distinção de sexo ou idade para a composição do *pool*.

O sangue total, coletado em tubos contendo EDTA, foi centrifugado a 1000 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. O plasma foi retirado e as hemácias foram lavadas com tampão fosfato-salina (PBS, 50 mM, pH 7,3). Para cada 3 mL de sangue total foram adicionados 9 mL do mesmo tampão para a obtenção de uma suspensão de hemácias a 4%.

Para o ensaio de hemólise, foram misturados 20 µL da suspensão de hemácias, 50 µL de solução PBS e 0,5 µL de amostra. A mistura foi incubada a 37°C por 60 minutos e após isso foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. Uma alíquota do sobrenadante

foi transferida para uma placa de 96 poços e a absorbância (A) foi medida em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 414 nm.

Como controle negativo utilizou tampão PBS ao invés de amostra, e como controle positivo utilizou-se triton-X 100 0,1%.

Para o cálculo de atividade hemolítica, utilizou a seguinte fórmula:

$$(A_{\text{amostra}} - A_{\text{tampão}}) / (A_{\text{triton}} - A_{\text{tampão}}) \times 100$$

#### **4.3.2. Atividade dos compostos em hemácias induzidas ao estresse oxidativo**

Os compostos foram testados em hemácias induzidas por estresse oxidativo para avaliar as situações de prevenção e tratamento das moléculas no estresse oxidativo, ou seja, avaliar se as moléculas são capazes de impedir a formação dos radicais livres ou remover esses radicais já formados. A avaliação dos efeitos de estresse oxidativo foi feita pelo teste de hemólise.

Para avaliar o efeito prevenção, hemácias de pacientes saudáveis (20 µL da suspensão de hemácias, conforme descrito no item 4.3.1), foram colocadas em 50 µL de PBS e os compostos 64-6 e 66-1 foram adicionados por 60 minutos a 37°C. Após isso, foi acrescentado 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à solução. Após 10 minutos, a mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. Uma alíquota do sobrenadante foi transferida para uma placa de 96 poços e a absorbância (A) foi medida em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 414 nm.

Para a avaliação do efeito tratamento das moléculas, 20 µL da suspensão de hemácias (obtidas conforme descrito no item 4.3.1), foram colocadas em 50 µL de PBS e foi incubado 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10 minutos a 37°C. Após esse período, as moléculas 64-6 e 66-1 foram adicionadas, e após 60 minutos a mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. Uma alíquota do sobrenadante foi transferida para uma placa de 96 poços e a absorbância (A) foi medida em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 414 nm.

Os ensaios foram feitos em triplicata e a média  $\pm$  desvio padrão são apresentados nos resultados.

#### 4.4. Estudo *in silico* para Avaliação Farmacocinética

Compostos foram avaliados quanto às suas propriedades físico-químicas, por meio das ferramentas admetSAR LMMD, SwissADME e Molinspiration (todas de uso livre). Com essas ferramentas foi possível prever parâmetros farmacocinéticos de absorção gastrointestinal, penetração na barreira hematoencefálica, inibição de enzimas metabólicas hepáticas e toxicidade.

Ainda foram avaliados os parâmetros físico-químicos, seguindo as regras de Lipinski, (LIPINSKI et al., 2001) para verificar se as moléculas candidatas são passíveis de serem medicamentos.

Os parâmetros avaliados e valores aceitáveis para o estudo estão mostrados na tabela 1.

**TABELA 1.** Parâmetros considerados para avaliação físico-química dos ligantes e valores máximos aceitáveis

Parâmetro	Valores aceitáveis*
massa molecular	< 500 Da
aceptores de ligação de hidrogênio (HBA)	<10
doadores de ligação de hidrogênio (HBD)	<5
LogP	2 a 5
TPSA	40 a 100 Å <sup>2</sup>

\* conforme parâmetros estabelecidos por LIPINSKI et al. (2001)

Foram selecionadas somente moléculas que tenham alta absorção gastrointestinal e pouca ou nenhuma permeabilidade à barreira hematoencefálica, inibição de no máximo 2 enzimas hepáticas, baixa toxicidade e nenhuma violação das regras de *Lipinski*.

#### **4.5. Análise estatística**

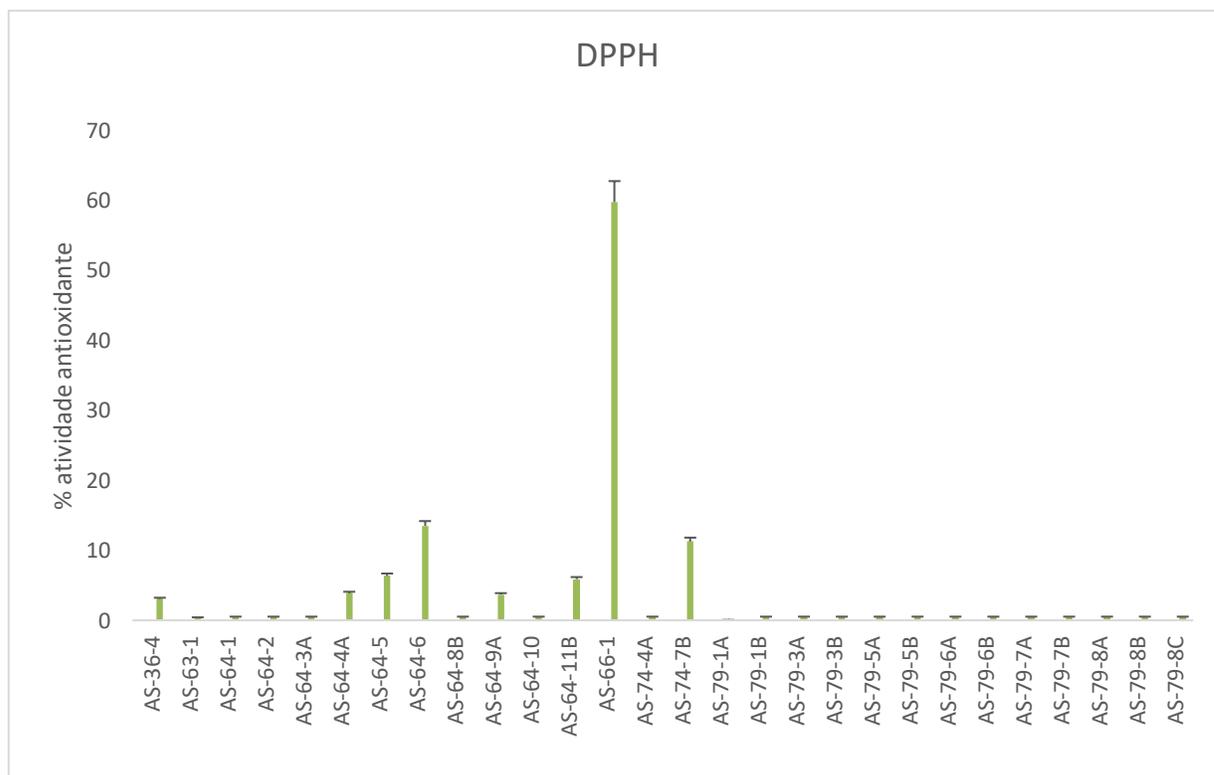
Análise estatística foi aplicada nos experimentos com células (hemácias). No teste de hemólise, foi comparado o grupo controle, sem tratamento, com os grupos tratados com as novas moléculas. Nos ensaios de indução de estresse oxidativo em hemácias, foi comparado o grupo induzido à hemólise (controle positivo) com os grupos tratados.

Para isso, foi utilizado o teste ANOVA, com pós teste de Tukey. Foram considerados estatisticamente significantes valores de  $p < 0,05$ , marcados com asterisco nos gráficos, apresentados na seção Resultados.

## 5. RESULTADOS

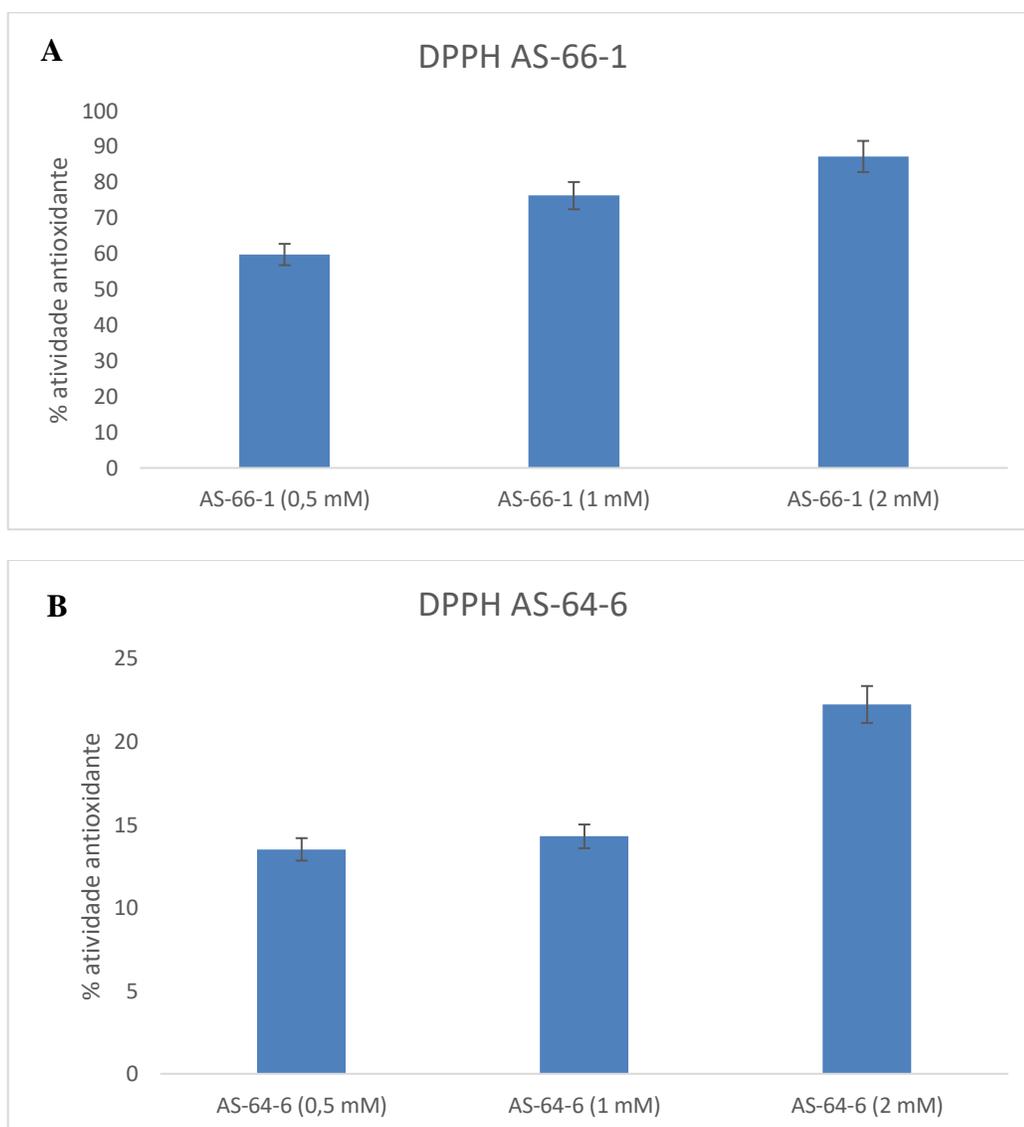
### 5.1. Ensaio antioxidantes

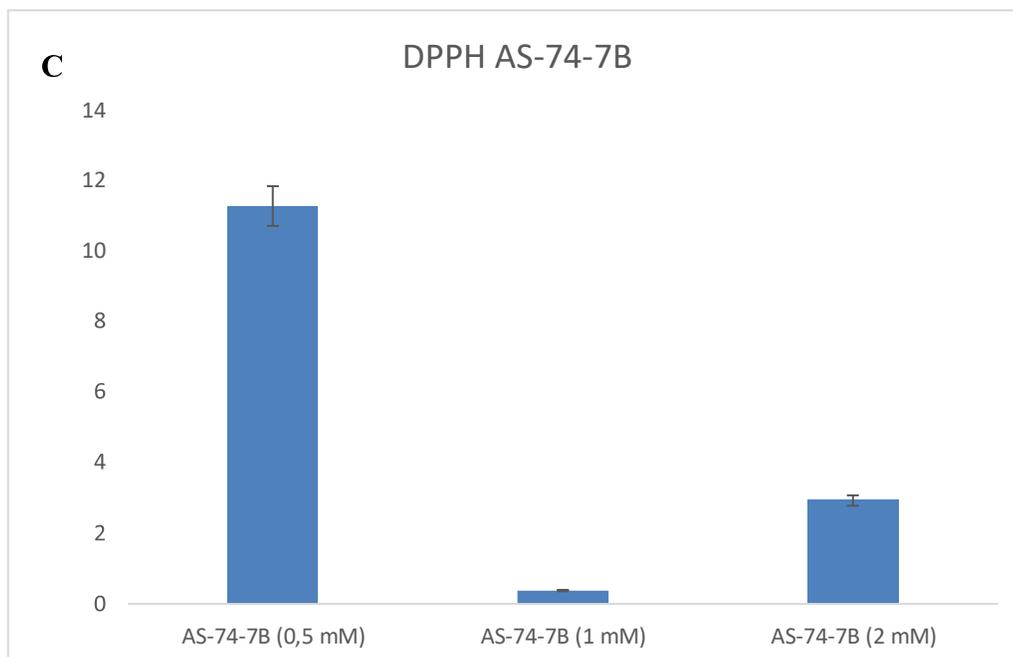
As 28 moléculas obtidas foram inicialmente testadas no ensaio de DPPH para avaliação da atividade antioxidante. O resultado da porcentagem de atividade antioxidante, em comparação com o controle, sem adição de amostra, está mostrado na figura 6. Por esse ensaio, foi possível identificar atividade em 8 amostras, a saber, AS-36-4, AS – 64-4A, AS-64-5, AS-64-6, AS-64-9A, AS-64-11B, AS-66-1 e AS74-7B.



**FIGURA 6.** Porcentagem de atividade antioxidante de 28 moléculas sintéticas pelo método do DPPH

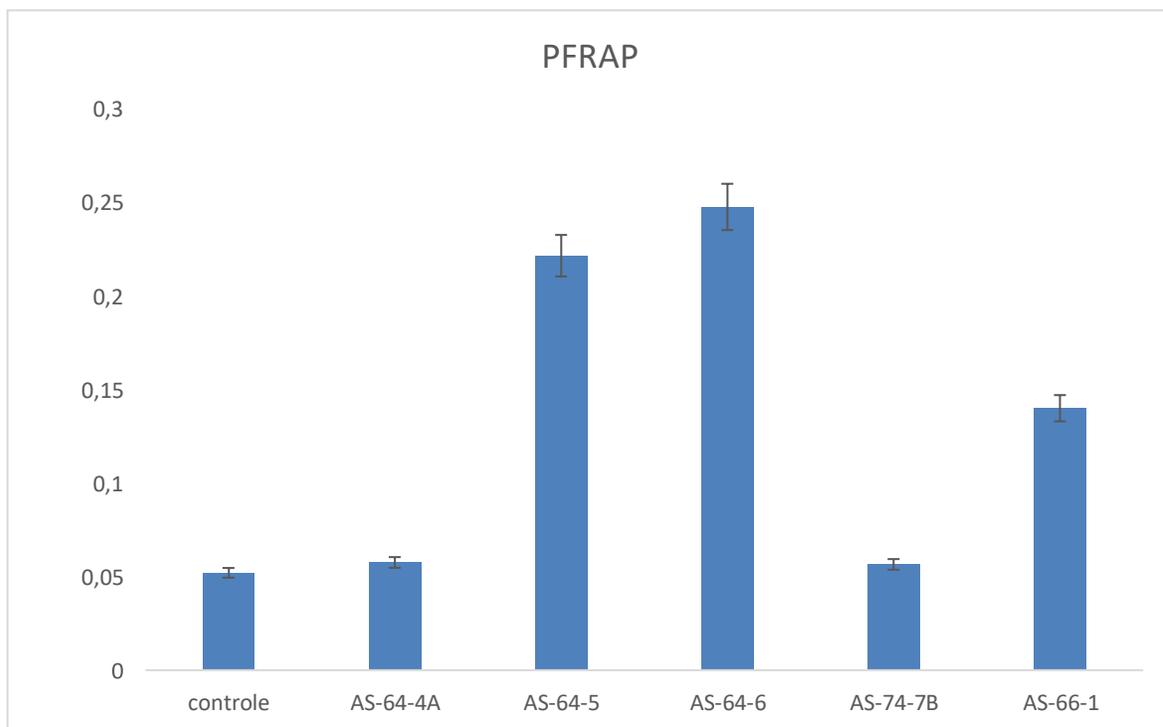
Para confirmar a atividade antioxidante, 3 moléculas que apresentaram atividade mais pronunciada (AS-66-1, AS-64-6 e AS-74-7B) foram testadas em duas outras concentrações maiores, conforme mostra a figura 3. Foi possível verificar que as amostras AS-66-1 e AS-64-6 apresentaram um efeito dependente da concentração (figuras 7A e 7B, respectivamente), enquanto a molécula AS-74-7B diminuiu a sua atividade antioxidante conforme o aumento da concentração (figura 7C).





**FIGURA 7. Porcentagem de atividade antioxidante de moléculas em 3 diferentes concentrações pelo método do DPPH. A = AS-66-1; B = AS-64-6; C = AS-74-7B.**

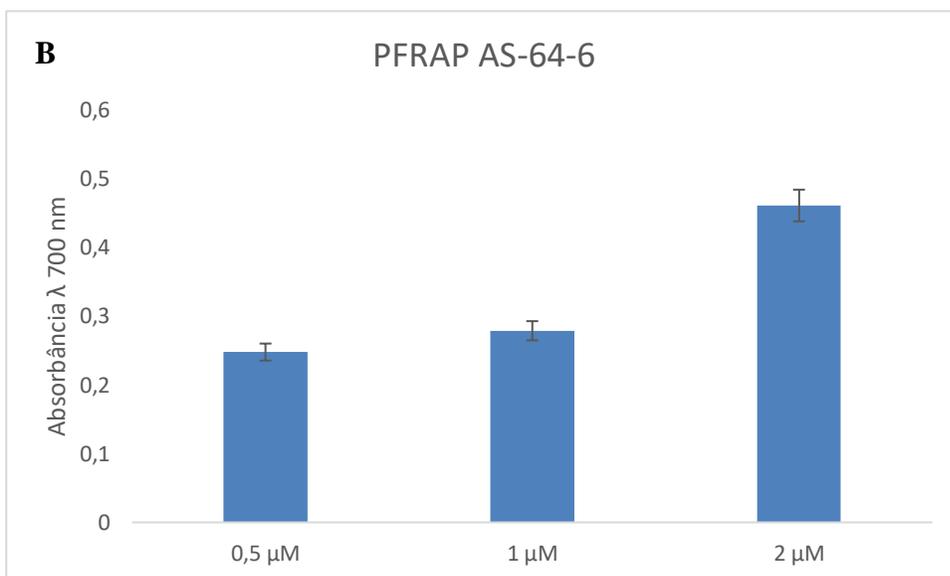
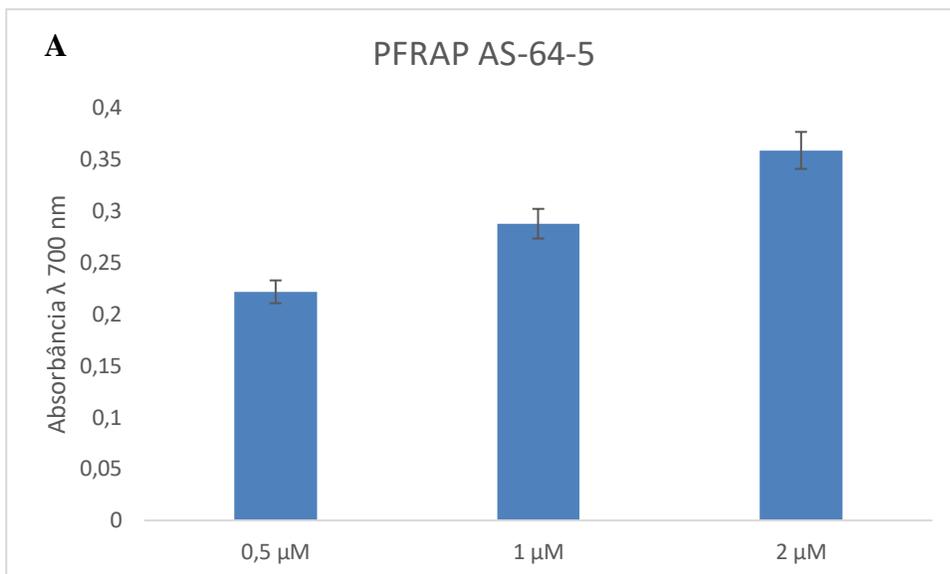
Para melhor validação do resultado foi feito um segundo teste de antioxidação das amostras, utilizando o ensaio de PFRAP. Foram utilizadas as 5 amostras que mais apresentaram atividade no teste anterior (DPPH), incluindo aquelas em que a curva concentração-resposta foi avaliada - AS-64-4A, AS-64-5, AS-64-6, AS-74-7B e AS-66-1. Como mostrado na figura 8, somente três amostras apresentaram atividade antioxidante relevante: AS-64-5, AS-64-6 e AS-66-1.

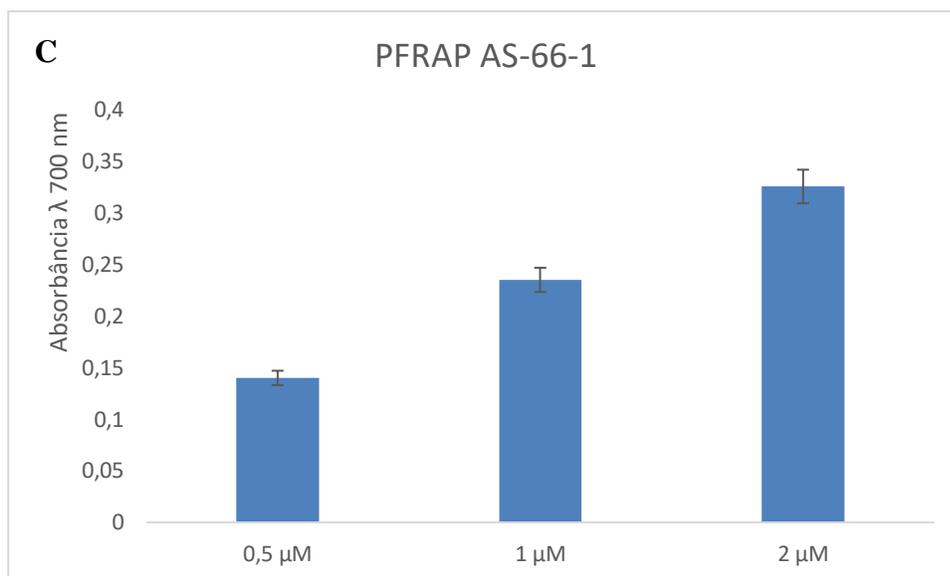


**FIGURA 8. Atividade antioxidante de 5 moléculas pelo método do PFRAP**

As três amostras (AS64-5, AS64-6, AS66-1) que confirmaram a atividade antioxidante pelo método de PFRAP foram testadas, no mesmo ensaio, em uma curva concentração-resposta, conforme mostrado na figura 9. As três moléculas causaram atividade antioxidante dependente de concentração.

Assim, duas moléculas – AS64-6 e AS-66-1 – foram selecionadas para continuidade do estudo, por demonstrarem atividade nos dois ensaios, em resposta dependente da concentração.

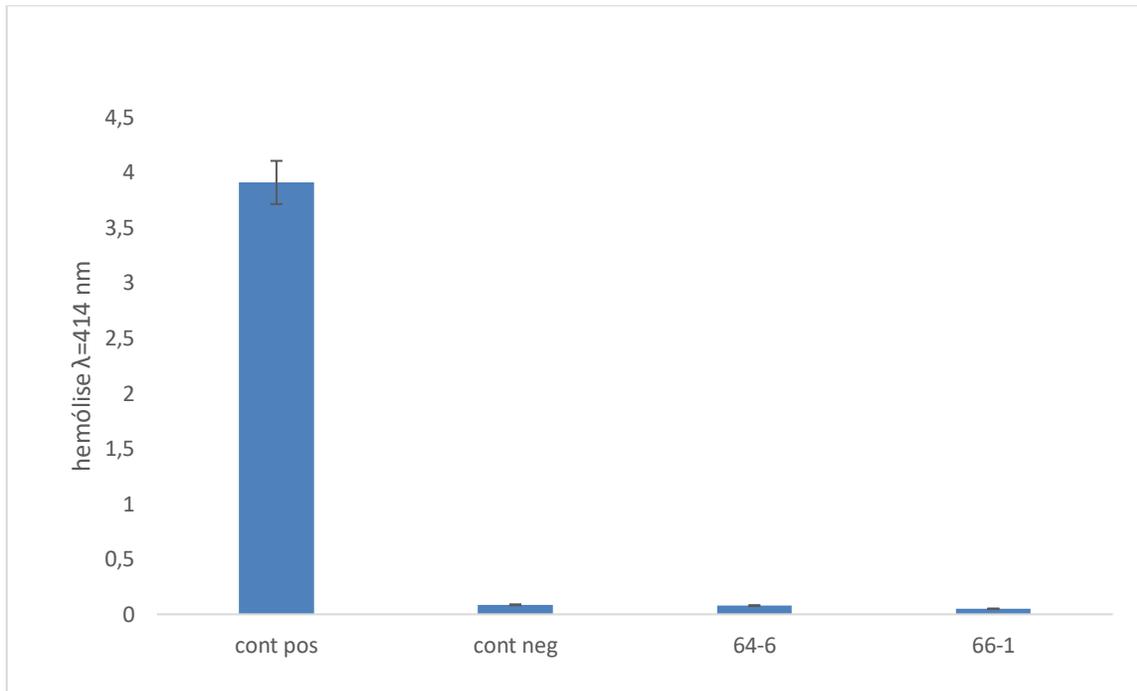




**FIGURA 9. Atividade antioxidante de moléculas em 3 diferentes concentrações pelo método do PFRAP. A = AS-64-5; B = AS-64-6; C = AS-66-1.**

## 5.2. Atividade hemolítica

Os compostos 64-6 e 66-1 foram selecionados por terem apresentado atividade antioxidante, dependente de concentração, nos dois ensaios DPPH e PFRAP. Eles foram então testados quanto à capacidade de causar hemólise em hemácias de doadores saudáveis. Foi verificado que ambas as moléculas não são capazes de causar lise nesse tipo de célula, conforme mostrado na figura 10. Sendo assim, esses compostos poderão ser avaliados em hemácias quanto ao estresse oxidativo.



**FIGURA 10. Capacidade hemolítica de 2 moléculas em hemácias de pacientes sadios**

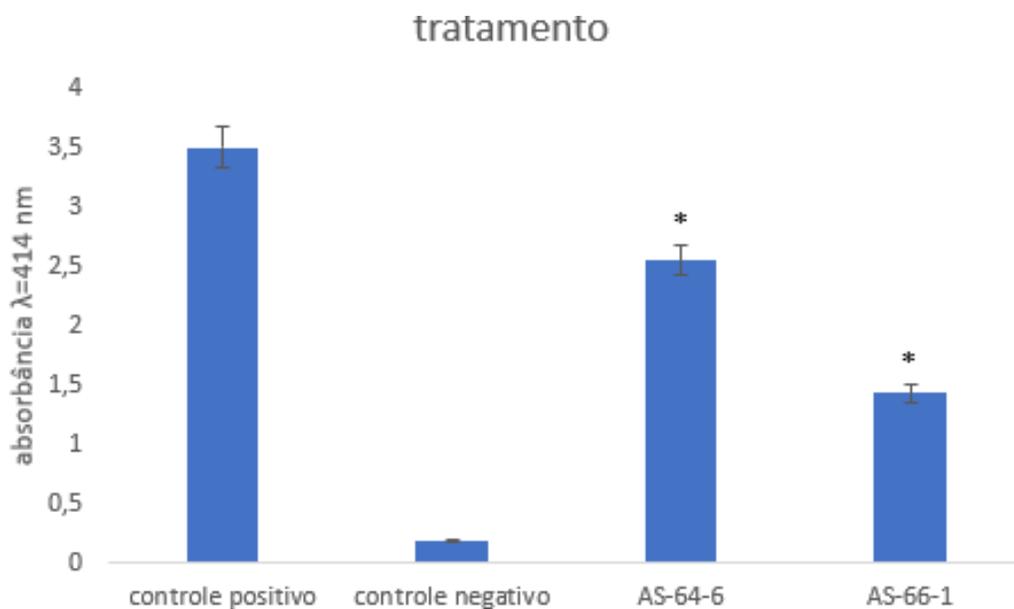
### 5.3. Atividade antioxidante em hemácias

Para verificar se os dois compostos selecionados teriam atividade antioxidante em células, foi induzido estresse oxidativo em hemácias pela adição de peróxido de hidrogênio. As moléculas foram avaliadas em duas situações. Uma delas foi a incubação das novas moléculas com as hemácias antes da indução do estresse oxidativo, para avaliar um efeito de prevenção, ou seja, se os compostos poderiam impedir a formação dos radicais livres. A outra condição foi a incubação das amostras após a indução do estresse oxidativo, para avaliar um efeito tratamento, isto é, se os compostos poderiam reverter as ações causadas pelos radicais livres já formados.

Como mostrado na figura 6, o controle positivo representa uma alta taxa de hemólise, após a incubação de 1% peróxido de hidrogênio nas hemácias, por 60 minutos. No controle negativo,

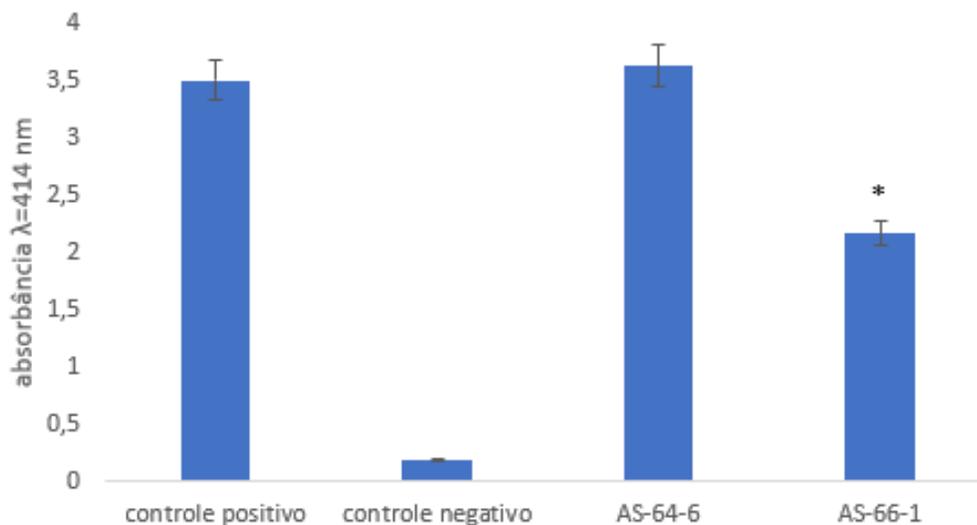
somente com a adição de amostras no período de 60 minutos, não foi observada hemólise importante.

Foi verificado que o composto AS-66-1 foi eficaz em reduzir 61% da hemólise causada pelo peróxido de hidrogênio, na concentração e tempos testados (figura 11), no efeito tratamento. A molécula AS-64-6 causou 28,6% de redução da hemólise. Nos dois casos, a redução de hemólise, em relação ao controle positivo, foi estatisticamente significativa.



**FIGURA 11.** Capacidade de redução da hemólise induzida por peróxido de hidrogênio com as amostras AS-66-1 e AS-64-6, em uma avaliação de tratamento. \*  $p < 0,05$

O composto AS-66-1, quando incubado antes da adição de peróxido de hidrogênio, causou redução de 40%, comparado ao controle positivo (indução de hemólise pelo peróxido de hidrogênio), conforme mostrado na figura 12. O composto AS-64-6 não causou nenhuma redução de hemólise no efeito prevenção.



**FIGURA 12.** Capacidade de prevenção da hemólise induzida por peróxido de hidrogênio com as amostras AS-66-1 e AS-64-6, em uma avaliação prevenção. \*  $p < 0,05$

#### 5.4. Avaliação *in silico* das moléculas antioxidantes ativas

As moléculas que apresentaram atividade antioxidante nos dois ensaios e causaram atividade de diminuição de hemólise (AS-64-6 e AS-66-1), foram analisadas quanto às suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas.

Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 2, bem como os valores considerados nesse trabalho, como potencial capacidade de fármaco.

Foi possível observar que para o composto AS66-1, todos os parâmetros estavam dentro daqueles previamente estabelecidos (conforme critérios de Lipinski mencionados na tabela 1), sendo considerada a melhor molécula nesse estudo, considerando a sua capacidade antioxidante, seu efeito de redução de estresse oxidativo nas hemácias e características farmacocinéticas favoráveis para um futuro medicamento.

**TABELA 2.** Avaliação farmacocinética *in silico*

<b>Parâmetro</b>	<b>Critério*</b>	<b>Valor AS-64-6</b>	<b>Valor AS-66-1</b>
Massa molecular	< 500 Da	550.53 g/mol	391.42 g/mol
Aceptores de ligação de hidrogênio (HBA)	<10	11	6
Doadores de ligação de hidrogênio (HBD)	<5	2	3
LogP	2 a 5	3.75	2.98
TPSA	40 a 100 Å <sup>2</sup>	128,32Å <sup>2</sup>	100,63Å <sup>2</sup>
Absorção gastrointestinal	Sim	Sim	Sim
Penetração na barreira hematoencefálica	Não	Não	Não
Inibição de enzimas metabólicas hepáticas	Até 2	2 Enzimas	Não

\* conforme parâmetros estabelecidos por LIPINSKI et al. (2001)

## 6. DISCUSSÃO

Antioxidantes são utilizados no tratamento de muitas desordens, principalmente neoplasias, doenças neurodegenerativas e anemia falciforme (AL BALUSHI et al., 2019).

Existem diversos ensaios para avaliação da capacidade antioxidante de compostos, *in vitro*. Como uma primeira avaliação, neste trabalho optou-se por utilizar os testes de DPPH e PFRAP.

O DPPH é um ensaio clássico e muito utilizado para a avaliação de atividade antioxidante por sequestro de elétrons, por ser fácil (envolve apenas uma reação) e rápido. Para o *screening* de atividade de várias moléculas, como foi feito neste trabalho, é o teste ideal para uma primeira abordagem (FOTI, 2015).

No entanto, é recomendado que para que um composto seja determinado antioxidante, mais de um ensaio seja realizado, e por isso foi feito PFRAP somente com amostras que apresentaram maior atividade pelo DPPH.

O método do PFRAP avalia a redução de ferro  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  na presença de antioxidantes, que reagem com o ferrocianeto de potássio produzindo um composto que irá reagir com o cloreto férrico, detectável pela espectrofotometria. Dessa forma, um outro mecanismo de antioxidação é avaliado (MOHARRAM & YOUSSEF, 2014).

Dessa forma, de 28 compostos que iniciaram o estudo, foi possível selecionar 2 (AS-64-6 e AS-66-1) pelo ensaio de DPPH e também pelo ensaio de PFRAP, ainda levando em consideração a dependência de concentração.

Muitos compostos com conhecida atividade antioxidante, principalmente os de origem natural, como os polifenóis, flavonoides e vitaminas, têm sido testados com sucesso por esses métodos, permitindo assim a descoberta de novos antioxidantes (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Novos antioxidantes são cada vez mais procurados, uma vez que os mais conhecidos têm propriedades farmacocinéticas que desfavorecem a penetração de membranas biológicas ou distribuição em compartimentos biológicos, o que prejudica a chegada e permanência da molécula

na região alvo. A vitamina C, por exemplo, tem dificuldade em permear hemácias, sendo inviável a sua utilização para o tratamento da anemia falciforme.

Na anemia falciforme, as hemácias dos pacientes contêm hemoglobina anormal (HbSS na forma homozigótica e HbSC na forma heterozigótica) após uma substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina, o que leva à polimerização de tetrâmeros e conseqüentemente deformação da membrana das hemácias (POMPEO et al., 2020). Essa alteração de formato da hemácia leva a célula a ficar em um estado mais rígido, o que causa obstrução do fluxo sanguíneo, principalmente na microvasculatura (REES et al., 2010). Além disso, há um quadro de hemólise intravascular, com eliminação de óxido nítrico, além da alteração na permeabilidade da membrana de glóbulos vermelhos (GLADWIN et al., 2004).

Assim, pacientes apresentam efeitos clínicos divididos em dois grupos: anemia hemolítica crônica e episódios agudos de isquemia vaso-oclusiva. As complicações incluem dor, síndrome torácica aguda, acidente vascular cerebral, nefropatia, osteonecrose, úlceras de perna e vida útil reduzida (KASSA et al., 2019; AL BALUSHI et al., 2019).

Já foi relatado que o ciclo de produção de HbS resulta em produção de espécies reativas de oxigênio (principalmente  $O_2$  e  $H_2O_2$ ) dentro das hemácias SS. A atividade de enzimas antioxidantes (SOD e catalase) aumentam em resposta a esse estresse. Ainda há aumento da expressão de NADPH oxidase derivada de ROS e a retenção de mitocôndrias ativas em hemácias maduras SS, onde o metabolismo oxidativo pode ser uma fonte para a produção das espécies reativas de oxigênio (AL BALUSHI et al., 2019).

O estresse oxidativo é direcionado para a porção ferril do heme (que é altamente oxidável) e seus radicais proteicos associados. Assim, aminoácidos de locais conhecidos como “*hotspots* oxidativos” (por exemplo  $\beta$ Cys93) são irreversivelmente oxidados e contribuem para o colapso, desestruturação e degradação das subunidades  $\beta$  da hemoglobina e conseqüente liberação do grupo heme. A oxidação da região  $\beta$ Cys93 é crucial pois está envolvida com a transição R para T (JIA et al., 2007).

Essa série de oxidações e condições de hipóxia leva a hemoglobina a uma condição de desoxigenação (desoxiHbS), em que se torna instável estruturalmente e é polimerizada, além de perder o grupo heme. Esse fenômeno leva à alteração da conformação da hemácia, deixando-a rígida, instável e levando a oclusão e trombose em vasos sanguíneos de baixo calibre, além de hemólise da célula (JANA et al., 2018; NAKAGAWA et al., 2014).

Assim, a terapia com antioxidantes pode ser uma alternativa aos pacientes portadores de anemia falciforme (KASSA et al., 2015).

Resultados apontam ações benéficas de antioxidantes na manutenção do formato correto da hemácia e redução da adesão vascular. Os mecanismos por trás disso incluem a proteção contra a peroxidação lipídica de hemácias e o aumento dos níveis de glutathione reduzida, com redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (DUCONGE et al., 2008).

Os três antioxidantes mais estudados com aplicação na anemia falciforme são o ditiotreitól (DTT), N- acetilcisteína, e quercetina. Além dos benefícios nos alívios dos sintomas, eles parecem ter efeitos benéficos sobre a permeabilidade da membrana de glóbulos vermelhos.

A quercetina, um flavonoide de origem natural, é capaz de sequestrar radicais livres através da ortoestruturas de di-hidroxi (MORIDANI et al., 2003), também tem demonstrado proteção contra o dano oxidativo nas células falciformes in vitro (HENNEBERG et al., 2013; QUEIROZ E LIMA, 2013).

Um antioxidante potencial adicional é representado pela L-glutamina. Este reagente provavelmente age através de níveis crescentes de dinucleotídeos nicotinamida adenina reduzido e também possivelmente de glutathione reduzida. Ele tem recebido alguma atenção para o tratamento de pacientes com SCA (NIIHARA et al., 2005, 2014)

O aumento da afinidade de oxigênio à HbS é uma proposta terapêutica para a anemia falciforme, a fim de agregar hemoglobina ao oxigênio e diminuir os níveis de desoxiHbS. Nesse sentido, moléculas têm sido descritas como estabilizadores do estado R da hemoglobina, aquele que tem maior afinidade pelo oxigênio, como por exemplo aldeídos, isotiocianatos, derivados de salicilatos, fosfato acetil metil, dissulfetos e maleimidás (NAKAGAWA et al., 2014).

A 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) é um aldeído aromático de origem natural, que está em estudos de fase clínica. Esse composto se liga à hemoglobina, produzindo um deslocamento à esquerda da curva de equilíbrio de oxigênio, reduzindo, portanto, a anemia em modelos animais (ABDULMALIK et al., 2005).

Compostos derivados de triazóis, conhecidos antifúngicos, têm sido associados à atividade antioxidante, por apresentar em sua estrutura que grupos funcionais que favorecem a atividade de sequestro de elétrons: -OH, -SH, -COOH, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, C=O, -NR<sub>2</sub>, -S-, -O- (GULCIN, 2006).

Alguns derivados de triazóis antioxidante têm sido descritos: 4-amino-5-aryl-3H-1,2,4-triazol-3-íonias com grupos metoxibenzila e metoxifenila (HANIF et al., 2012), 4,5-Dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-one (GÜRISOY-KOL et al., 2016), derivados de 1,2,4-triazóis (KOCHIKYAN et al., 2011; CETIN; GEÇIBESLER, 2015) e derivados de 4-[3,4-di-(4-nitrobenzoxy)-benzylidenamino]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-one (GÜRISOY-KOL; AYAZOĞLU, 2016).

O composto TD-3 derivado de triazol (4,4'-di(1,2,3-triazolyl) disulfide) está em estudo pré-clínico de desenvolvimento. Ele tem se mostrado altamente solúvel em água e inibidor da formação de pontes salinas que estabilizam o estado R e desestabilizam o estado T da hemoglobina, favorecendo a ligação com oxigênio (NAKAGAWA et al., 2018).

Um derivado de TD-3, o TD-1, foi desenvolvido por Kassa e colaboradores (2019), o di (5-(2,3-di-hidro-1,4-benzodioxin-2-il) -4H-1,2,4-triazol-3-il) dissulfeto. Esse composto apresenta função antioxidante relacionada à atividade antianemia, com mecanismo de proteção da porção βCys93 (KASSA et al., 2017).

No nosso trabalho, as moléculas com maior atividade (AS-64-6 e AS 66-1) não possuem esses grupamentos em comum nos triazóis que caracterizam a atividade sequestrante de elétrons e parece não haver uma relação estrutura-reatividade (SAR) com a substituição de grupos funcionais. Assim, a junção com o glucal parece ser essencial para a atividade e constituição de uma nova entidade moléculas, cuja presença de NH<sub>2</sub> e -O- associados podem ser responsáveis pela atividade, além de terem propriedades de solubilidade favoráveis para o ensaio.

Carboidratos têm sido utilizados em vários compostos químicos sintéticos, pois facilita o reconhecimento intracelular e ativa várias cascatas de sinalização para proliferação ou apoptose. Além disso, em associação a outros grupos adicionam propriedades interessantes como aumento da hidrofiliabilidade, diminuição da toxicidade e melhora da biodisponibilidade (SHAMIN et al., 2017).

Os 28 compostos estudados eram análogos, ou seja, todos tinham estruturas químicas semelhantes, com pequenas modificações para avaliação da melhora da atividade antioxidante. Esse racional de química medicinal tem sido aplicado à busca de moléculas com maior atividade e menos efeitos não desejados, pelo estudo de relação estrutura-reatividade (SAR), como foi feito nesse trabalho (LOUNNAS et al., 2013).

Um trabalho de SAR foi aplicado ao resveratrol, uma fitoalexina de origem natural associado a uma série de atividades biológicas, muitas delas por suas propriedades antioxidantes. No entanto, essa molécula demonstrou alta citotoxicidade. Theodorou e colaboradores (2016) estudaram nove derivados de resveratrol, na tentativa de identificar novas moléculas capazes de induzir a forma HbF com suas propriedades antioxidantes e diminuir a toxicidade em células. Eles demonstraram que 3 análogos tiveram propriedades indutoras de hemoglobina, com baixa toxicidade.

Após a seleção de duas moléculas (AS-64-6 e AS 66-1), estas foram testadas em um modelo biológico de estresse oxidativo em hemácias, a fim de se mimetizar uma condição de anemia falciforme. Esse modelo de indução de estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio já foi descrito por muitos autores, assim como a avaliação da atividade por hemólise, um método simples e de baixo custo (NEIL et al., 1986; AL BALUSHI et al., 2019).

Com esse método foi possível observar que as moléculas, em especial a AS-66-1, diminuí significativamente a hemólise causada por peróxido de hidrogênio, além de prevenir a hemólise, quando incubada antes da indução do estresse oxidativo. Isso indica que as propriedades antioxidativas do AS-66-1 estão tendo efeitos positivos no dano celular causado pela formação de espécies reativas de oxigênio. Assim, é esperado que a molécula esteja efetuando o sequestro de

elétrons livres, estabilizando a estrutura da hemácia. Além disso, a preservação da oxidação dos íons Fe pela molécula, atividade observada pelo método do PFRAP, pode contribuir para a manutenção da hemoglobina e conseqüentemente redução da hemólise.

As propriedades farmacocinéticas foram utilizadas nesse estudo para avaliar e selecionar os melhores compostos. Os parâmetros físico-químicos baseados nas regras de Lipinski foram utilizados, que leva em conta cálculos computacionais para estimar a solubilidade e permeabilidade de novos compostos na fase de desenvolvimento, a fim de se determinar o potencial de uma molécula ser um medicamento (*drugable*). Essas regras predizem a absorção e permeabilidade com relação ao número de doadores e aceptores de hidrogênio, a massa molecular, TPSA e LogP. Os parâmetros determinados por Lipinski para todas essas categorias foram validados em centenas de compostos conhecidos, em conjunto com testes em HTS (*high throughput screening*) em células. Dessa forma, pôde-se estabelecer uma predição confiável de parâmetros farmacocinéticos (LIPINSKI et al., 2001).

Neste trabalho, a partir de 28 compostos, foi possível se chegar a 1 molécula com atividade antioxidante relevante, aplicável à anemia falciforme, com propriedades farmacocinéticas relevantes para um novo fármaco (AS-66-1).

O composto AS-66-1 possui massa molecular de 391.42 g/mol (abaixo de 500 Da), 6 aceptores de ligação de hidrogênio – HBA (<10), 3 doadores de ligação de hidrogênio – HBD (<5), coeficiente de partição n-octanol/água (LogP) de 2,98 (entre 2 e 5) e TPSA de 100,63 Å<sup>2</sup>.

Parâmetros de massa molecular abaixo de 500 Da indica que a molécula tem capacidade de atravessar livremente membranas plasmáticas, compostas por uma bicamada lipídica, além de poder se encaixar mais apropriadamente a um alvo molecular (MENICHETTI, et al., 2019).

Os valores de HBA e HBD refletem o potencial de interação com ligantes e ainda determina parâmetros de biodisponibilidade, por prever ligações N-H ou O-H nos meios intra e extracelulares e conseqüentemente a solubilidade em fases (HANSCH & SELASSIE, 2007). Os valores para AS-66-1, tanto de aceptores quanto doadores de hidrogênio, estão dentro dos parâmetros estabelecidos por Lipinski, sendo adequados para um possível medicamento.

Valores de HBA e HBD também auxiliam na predição de interação com enzimas de metabolismo hepático (enzimas do complexo de citocromo P450 CYP). Para a molécula AS-66-1 não há indicação de inibição de enzimas hepáticas, o que indica baixa hepatotoxicidade e baixa interação medicamentosa.

O coeficiente de partição n-octanol/água reflete a lipofilicidade da molécula LogP e indicam a capacidade de permeação em membranas celulares. Devido à sua natureza anfipática, o n-octanol é considerado um bom agente que mimetiza as características da membrana fosfolipídica. Assim, os cálculos são feitos levando em consideração a solubilidade da molécula no octanol e em água, em um pH neutro. O valor resultante é definido com a proporção de concentração molar entre a forma neutra de n-octanol e em água (DAINA et al., 2014).

O valor de LogP que encontramos para a AS-66-1 permite a boa permeabilidade em membranas, o que explica a boa atividade da molécula nas hemácias.

Para a predição de absorção gastrointestinal e barreira hematoencefálica, utilizamos a ferramenta baseada no método BOILED-Egg (Brain or intestinal estimated permeation), como modelo preditivo de lipofilicidade e polaridade de moléculas pequenas, utilizando os parâmetros de log P e TPSA (DAINA; ZOETE, 2016). Dessa forma, foi confirmada a boa permeabilidade celular, refletida na alta absorção gastrointestinal, o que indica que a molécula poderá ser administrada por via oral, a via preferencial para administração de fármacos.

Além disso, foi possível observar que o alto valor de TPSA (100,63 A2) para a AS-66-1 reflete alta polaridade e baixa permeabilidade à barreira hematoencefálica (apesar do valor de lipofilicidade – logP estar adequado), o que é um bom resultado nesse caso, uma vez que não é de interesse ter ações no sistema nervoso central. Com isso, conseguimos selecionar uma molécula protótipo com potencial para ser um medicamento para o tratamento ou prevenção da anemia falciforme.

## 7. CONCLUSÃO

Após a avaliação de 28 compostos sintéticos inéditos, derivados de triazol e glucal, foi possível obter um com atividade antioxidante em dois diferentes ensaios *in vitro*. Esse novo composto não causa hemólise, além de reduzir e prevenir o rompimento de hemácias causado pelo estresse oxidativo, característico da anemia falciforme.

Além disso, essa molécula apresenta importantes características físico-químicas, que por meio de avaliações farmacocinéticas nos permitiu concluir que são capazes de atravessar membranas biológicas, passível de ser administrada por via oral e com potencial permear hemácias, atingindo, portanto, o alvo terapêutico. Além disso, tem pouca capacidade de causar toxicidade, características importantes considerando o desenvolvimento da molécula como um novo medicamento.

Portanto, neste trabalho obtivemos um novo protótipo de medicamento para o tratamento da anemia falciforme, com uma alternativa medicamentosa para uma doença que não tem cura.

Apesar de outros experimentos serem necessários para um melhor esclarecimento do mecanismo de ação da molécula e efetividade *in vivo*, temos nesse momento uma molécula altamente promissora para anemia falciforme.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULMALIK, O.; SAFO, M. K.; CHEN, Q.; YANG, J.; BRUGNARA, C.; OHENE-FREMPONG, K., 5-Hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells. **Br. J. Haematol**, v. 128, p. 552–561, 2005.

AGRAWAL R. K.; PATEL R.K. Corresponding author Varsha shah, Lalit Nainiwal, and Bhadra Trivedi. Hydroxyurea in Sickle Cell Disease: Drug Review. **Indian J Hematol Blood Transfus.** Jun; v.30(2): p.91–96, 2014.

AL BALUSHI, H.; HANNEMANN, A.; REES, D.; BREWIN, J.; GIBSON, J.S. The effect of antioxidants on the properties of red blood cells from patients with sickle cell anemia. **Front Physiol.**, v. 10, p. 976, 2019.

ALVES, A.C.S; MUNHOZ, T.; SOARES, F.G.N.; ROCKENBACH, L.; GAUER, B; KAWANO, D.F.; POSER, G.L.V.; GARCIA, S.C.; LIMA, V.L.E. Synthesis and in vitro Evaluation of 1,2,3-triazole-4-chloromethylcoumarins with Antioxidant Activity. **Lett. Drug Design Discov.**, v. 15, n. 7, 2018.

ARANHA, F. Q; BARROS, Z.F.; MOURA, L.S.A; GONÇALVES, M. da C.R.; BARROS, J.C de; METRI, J.C.; SOUZA, M.S.de. O Papel Da Vitamina C Sobre As Alterações Orgânicas no Idoso. **Rev. Nutrição**, v. 13, n. 2, p. 89-97, 2000

AZAR, S.; WONG, T.E. Sickle Cell Disease - A Brief Update. **Med. Clin. N. Am.**, v. 101, p. 375–393, 2017.

BETTENCOURT, R. MEDEIROS, O. N. **Estudo da Aplicação na Área da Saúde do Gengibre, Sua Caracterização Química.** 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2017.

BIANCHI, M. de. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres E Os Principais Antioxidantes Da Dieta Free Radicals And The Main Dietary Antioxidants. **Rev. Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BONANDI, E.; CHRISTODOULOU, M.S.; FUMAGALLI, G.; PERDICCHIA, D.; RASTELLI, G.; PASSARELLA, D. The 1,2,3-triazole ring as a bioisostere in medicinal chemistry. **Drug disc. today**, v. 22, n. 10, 2017.

BOUAYED J.; BOHN T., Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state. **Oxid Med Cell Longev.** Jul-Aug; v.3(4), p. 228–237, 2010.

CAROCHO, M., & FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.15–25, 2013.

CETIN, A.; GEÇİBESLER, I. H. Evaluation as antioxidant agents of 1,2,4-triazole derivatives: effects of essential functional groups. **J. App. Pharm. Sci.**, v. 5, n. 6, p. 120-126, 2015.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. iLOGP: a simple, robust, and efficient description of n-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 54, n. 12, p. 3284–3301, 2014.

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. **Chem. Med. Chem.**, v. 11, n.11, p. 1117-1121, 2016.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos. **Visão Acadêmica**. v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004

DHALLA, NARANJAN S.; TEMSAH, RANA M.; NETTICADAN, THOMAS. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases, **Journal of Hypertension**. V. 18 – n. 6 - p 655-673, 2000

DUCONGE, J.; MIRANDA, M. J. R.; GONZALEZ, M.J.; JACKSON, J.A.; WARNOCK, W. RIORDAN, N.H. Pharmacokinetics of Vitamin C: insights into the oral and intravenous administration of ascorbate. **P. R. Health Sci. J.**, v. 27, n. 1, p. 7-19, 2008.

EATON, W. A.; BUNN, H. F. Treating sickle cell disease by targeting HbS polymerization. **Blood**, v. 129, p. 2719–2726, 2017.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S.. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo**. Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, R. M. de A.; FERNANDES, P. L. de O.; FONTES, L. DE O.; RODRIGUES, A. P. M. dos S.; SILVA, L. T. Antioxidantes e Sua Importância Na Alimentação. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável Grupo Verde de Agricultura Alternativa**, v.5, n.5, p. 26-30, 2010a.

FERREIRA, S.B.; SODERO, A.C.R.; CARDOSO, M.F.C.; LIMA, E.S.; KAISER, C.R.; SILVA, F.P.; FERREIRA, V.F. Synthesis, biological activity, and molecular modeling studies of 1H-1,2,3-Triazole derivatives of carbohydrates as  $\alpha$ -glucosidases inhibitors. **J. Med. Chem.**, v. 53, n. 6, p. 2364-2375, 2010b.

- FERRIER, D.R. **Bioquímica ilustrada**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019. 556 p.
- FOTI, M.C. Use and Abuse of the DPPH(•) Radical. **J. Agric. Food Chem.**, v. 14, n. 63, p. 8765-76, 2015.
- GIBSON, J. S.; AL BALUSHI, H. W. M.; HANNEMANN, A.; REES, D. Sickle cell disease and 5HMF: the search for effective treatments. **Drugs Fut.**, v. 40, p. 817–826, 2015.
- GLADWIN, M. T.; CRAWFORD, J. H.; PATEL, R. P. The biochemistry of nitric oxide, nitrite and hemoglobin: role in blood flow regulation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 15, p. 707–717, 2004.
- GÜLÇİN I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. **Life Sci.** v. 78, n. 8, p. 803-811, 2006.
- GÜRSOY-KOL, Ö; YÜKSEK, H.; MANAP, S.; TOKALI, F. Synthesis, Characterization, and antioxidant activities of novel 1-(morpholine-4-yl-methyl)-3-alkyl(aryl)-4-[4-(dimethylamino)-benzylidenamino]-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-ones. **J. Turkish Chem. Soc., Section A: Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 105-120, 2016.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radic. Biol. Med.** V.18, p.125–126, 1995.
- HANIF, M.; SALEEM, M.; HUSSEIN, M.T.; RAMA, N.H.; ZAIB, S.; ASLAM, M.A.M.; JONES, P.G.; IQBAL, J. Synthesis, urease inhibition, antioxidant and antibacterial studies of some 4-amino-5-aryl-3h-1,2,4-triazole-3-thiones and their 3,6-disubstituted 1,2,4-triazolo[3,4-b]1,3,4-thiadiazole derivatives. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n.5, p. 854-860, 2012.
- HANSCH, C.; SELASSIE, C. Computer-assisted drug design: quantitative structure–activity relationship – a historical perspective and the future. In: TAYLOR, J. B.; TRIGGLE, D. J. **Comprehensive Medicinal Chemistry II**, Nova York: Elsevier Science 2. ed. 2007. p. 43-63.
- HENNEBERG, R.; OTUKI, M. F.; FURMAN, A. E. F.; HERMANN, P.; DO NASCIMENTO, A. J.; LEONART, M. S. S. Protective effect of flavonoids against reactive oxygen species production in sickle cell anemia patients treated with hydroxyurea. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 35, p. 52–55, 2013.
- HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O.; SANTOS, A. de M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta. Farm. Bonaerense.**, v. 23, n. 3, p. 418-24, 2004.
- JANA, S., STRADER, M. B., MENG, F., HICKS, W., KASSA, T., TARANDOVSKIY, I. DE PAOLI, S.; SIMAK, J.; HEAVEN, M.R.; BELCHER, J.D.; VERCELLOTTI, G.M.; ALAYASH, A.I. Hemoglobin oxidation-dependent reactions promote interactions with band 3 and oxidative changes in sickle cell-derived microparticles. **JCI Insight**, v. 3, n. 21, 2018.

JIA, Y., BUEHLER, P. W., BOYKINS, R. A., VENABLE, R. M.; ALAYASH, A. I. Structural basis of peroxide-mediated changes in human hemoglobin: a novel oxidative pathway. **J. Biol. Chem.** n. 282, p. 4894–4907, 2007.

JONES D.P. **Redefining oxidative stress. Antioxid Redox Signal.**2006;8(9-10): p.1865-1879, 2010.

KASHYAP A.; SILAKARI O. Triazoles: Multidimensional 5-Membered Nucleus for Designing Multitargeting Agents. In: **Key Heterocycle Cores for Designing Multitargeting Molecules**. Ed. Om Silakari. p. 323-342, 2018.

KASSA, T.; JANA, S.; STRADER, M. B.; MENG, F.; JIA, Y.; WILSON, M. T.; ALAYASH, A.I. Sick cell hemoglobin in the ferryl state promotes betaCys-93 oxidation and mitochondrial dysfunction in epithelial lung cells (E10). **J. Biol. Chem.**, v. 290, p. 27939–27958, 2015.

KASSA, T.; STRADER, M.B.; NAKAGAWA, A.; ZAPOL, W. M.; ABDU, I. ALAYASH, A.L. Targeting  $\beta$ Cys93 in hemoglobin S with an antisickling agent possessing dual allosteric and antioxidant effects. **Metallomics**. v. 9, n. 9, p.1260–1270, 2017.

KASSA, T; WOOD, F.; STRADER, M.B.; ALAYASH, A.I. Antisickling Drugs Targeting  $\beta$ Cys93 Reduce Iron Oxidation and Oxidative Changes in Sick Cell Hemoglobin. **Front. Physiol.**, v.10, p.931, 2019.

KOCHIKYAN, T. V.; SAMVELYAN, M.A; ARUTYUNYAN, E. V.; ARUTYUNYAN, V.S.; AVETISYAN, A. A.; MALAKYAN, M.G; VARDEVANYAN, L.A.; BADZHINYAN, S.A. Synthesis and antioxidant activity of new 1,2,4-triazole derivatives. **Pharm. Chem. J.**, v. 44, n. 10, p. 525–527, 2011.

KUMAR S. S.; KAVITHA H. P.. Synthesis and Biological Applications of Triazole Derivatives – **A Review. Mini-Reviews in Organic Chemistry**. v.10, 2013.

KURUTAS, E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutr J** 15, 71 (2015).

LASS-FLÖRL C. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. **Drugs**, v.71(18): p.2405-241, 2011.

LIPINSKI, C.A.L.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **Adv Drug Deliv Rev.**, v.1, n. 46, p. 3-26, 2001.

- LIU, Z.; ZHOU, T.; ZIEGLER, A.C.; DIMITRION, P.; ZUO, L. **Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications**. V. 2017 p.11, 2017
- LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacogn.**, v.4, n. 8, p.118–126, 2010.
- LOUNNAS, V.; RITSCHER, R.; KELDER, J.; MCGUIRE, R.; BYWATER, R. P.; FOLOPPE, N. Current progress in Structure-Based Rational Drug Design marks a new mindset in drug discovery, **Comput. Struct. Biotechnol. J.**, v. 5, n. 6, p. 2011- 2020, 2013.
- LÜ, J., LIN, P.H., YAO, Q., CHEN, C., Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **J. Cell Mod. Med.** v.14, p.840–860, 2010.
- MENICHETTI, R.; KANEKAL, K. H.; BEREAU, T. Drug–Membrane Permeability across Chemical Space. **ACS Cent Sci.**, v.5, n.2, p. 290–298, 2019.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. Manual da anemia falciforme para a população. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. 24 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença falciforme - diretrizes básicas da linha de cuidado, 2015. [http://biblioteca.cofen.gov.br/wpcontent/uploads/2017/09/doenca\\_falciforme\\_diretrizes\\_basicas\\_1\\_inha\\_cuidado.pdf](http://biblioteca.cofen.gov.br/wpcontent/uploads/2017/09/doenca_falciforme_diretrizes_basicas_1_inha_cuidado.pdf) > Acesso em: 10 de junho de 2020.
- MOHARRAM, H. A.; YOUSSEF, M. M. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review, **Alexandria J. Food Sci.Tech.**, v. 11, n. 1, p. 31-42, 2014
- MOON, J.K.L.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, n. 5, p.1655-1666, 2009.
- MOREIRA, M.I.M.C.G. Azóis: Farmacologia e interações medicamentosas. Universidade Fernando Pessoa – Porto. 2010. Disponível em: <[http://www.bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3250/1/TG\\_11256.pdf](http://www.bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3250/1/TG_11256.pdf) . >Acesso em: junho de 2020.
- MORIDANI, M. Y.; POURAHMAD, J.; BUI, H.; SIRAKI, A.; O'BRIEN, P. J. Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 34, p. 243–253, 2003.
- NAKAGAWA, A.; FERRARI, M.; SCHLEIFER, G.; COOPER, M. K.; LIU, C.; YU, B.; BERRA, L.; KLINGS E.S.; SAFO, R.S.; CHEN, Q.; MUSAYEV, F.N.; SAFO, M.K.; ABDULMALIK, O.; BLOCH, D.B.; ZAPOL, W.M. A triazole disulfide compound increases the affinity of hemoglobina for oxygen and reduces the sickling of human sickle cells. **Mol. Pharm.** n.15, p. 1954–1963, 2018.

NAKAGAWA, A.; LUI, F.E.; WASSAF, D.; YEFIDOFF-FREEDMAN, R.; CASALENA, D.; PALMER, M.A; MEADOWS, J.; MOZZARELLI, A.; RONDA, L.; ABDULMALIK, O.; BLOCH, K.D.; SAFO, M.K.; ZAPOL, W.M. Identification of a Small Molecule that Increases Hemoglobin Oxygen Affinity and Reduces SS Erythrocyte Sickling. **ACS Chem Biol.**, v. 9, n. 10, p. 2318–2325, 2014.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Tradução de C. Dalmaz, C. Termignoni, M.L.S. Pereira. Porto Alegre: Artmed, 2019. 1226 p.

NIIHARA, Y.; KOH, H. A.; TRAN, L. A phase 3 study of L-glutamine therapy for sickle cell anemia and sickle  $\beta$ 0-thalassemia. **Blood**, v. 124, p. 86, 2014.

NIIHARA, Y.; MATSUI, N. M.; SHEN, Y. M.; AKIYAMA, D. A.; JOHNSON, C. S.; SUNGA, M. A.; MAGPAYO, J.; EMBURY, S.H.; KALRA, V.K.; CHO, S.H.; TANAKA, K.R. L-glutamine therapy reduces endothelial adhesion of sickle red blood cells to human umbilical vein endothelial cells. **BMC Blood Disord.**, v. 5, p. 1–7, 2005.

NIIHARA, Y.; ZEREZ, C. R.; AKIYAMA, D. S.; TANAKA, K. R. Increased red cell glutamine availability in sickle cell anemia: demonstration of increased active transport, affinity, and increased glutamate level in intact red cells. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 130, p. 83–90, 1997.

NIMSE B. S., PAL D. **Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms**. RSC Adv., v.5, p. 27986-28006, 2015.

NYSKA, K.R. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol. Pathol.**, v. 30, p.620-650, 2002.

OLIVEIRA, A. C. de O.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quím. Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

PANCHE, N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA. S. R. Flavonoids: an overview. **J. Nutr. Sci.**, v.5: e47, 2016.

PATEL, R.M.; PATEL, N. J. In vitro antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, Super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods. **Journal of Advanced Pharmacy Education & Research**, v.1: p.52-68, 2011

PLATT, O. S.; ORKIN, S. H.; DOVER, C. G.; BEARDSLEY, G. P.; MILLER, B. A.; NATHAN, D. G. Hydroxyurea enhances fetal haemoglobin in sickle cell anaemia. **J. Clin. Invest.**, v. 74, p. 652–656, 1984.

POMPEO, C.M.; CARDOSO, A. I. de Q.; SOUZA, M. da C.; FERRAZ, M. P.; FERREIRA JÚNIOR, M. A.; IVO, M. L. Fatores de risco para mortalidade em pacientes com doença falciforme: uma revisão integrativa. **Esc. Anna. Nery.**, v. 24, n. 2, p. 2019-194, 2020.

QUEIROZ, R. F.; LIMA, E. S. Oxidative stress in sickle cell disease. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 35, p. 3–17, 2013.

RAHAL A, KUMAR A, SINGH V, ET AL. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **Biomed Res Int.** 2014; p.761264, 2014.

RATNAM, D.V., ANKOLA, D.D., BHARDWAJ, V., SAHANA, D.K., KUMAR, N.M.V.R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **J. Control Release.** v.113, p.189–207, 2006.

REBOUL, E.; THAP, S.; PERROT, E.; AMIOT, M. J.; LAIRON, D.; BOREL, P. Effect of the main dietary antioxidants (carotenoids, c-tocopherol, polyphenols, and vitamin C) on a-tocopherol absorption. **European Journal of Clinical Nutrition.** v. 61, p.1167–1173, 2007

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 376, p. 2018–2031, 2010.

REES, D.C. The rationale for using hydroxycarbamide in the treatment of sickle cell disease. **Haematologica**, v. 96, p. 488–491, 2011.

RICE-EVANS, C. A.; GOPINATHAN, V. Oxygen toxicity, free radicals and antioxidants in human disease: Biochemical implications in atherosclerosis and the problems of premature neonates. **Essays Biochem.**, v.29, p. 39–63, 1995.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. (Orgs). **Radicais Livres e a resposta celular ao estresse oxidativo.** Canoas: Ulbra, 2004.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. de. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 10, n.4, p. 308-313, 2004.

SHAMIN, A.; SOUZA, F.B.; TROSSINI, G.H.G.; GATTI, F.M.; STEFANI, H.A. Synthesis of C-glycosyl-bis-1,2,3-triazole derivatives from 3,4,6-tri-O-acetyl-D-glucal. **Mol Divers.**, v. 19, n. 3, p. 423-434, 2015.

SHAMIN, A.; SOUZA, F.B.; VASCONCELOS, S.N.S.; STEFANI, H.A. Synthesis of a library of glucal-derived triazoles via copper-catalyzed azide–alkyne cyclization. **Tetrah. Let.**, v. 58, p. 884-888, 2017.

SOUZA, C. M.M.; SILVA, H. R.; VIEIRA Junior, G. M.; AYRES, M.C.; COSTA, L.S., ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S; ARAÚJO, P.B.M.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

TELEN, M. J.; MALIK, P.; VERCELLOTTI, G. M. Therapeutic strategies for sickle cell disease: towards a multi-agent approach. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 18, n. 2 p. 139–158, 2019.

THEODOROU, A; PHYLACTIDES, M.; FORTI, L.; CRAMAROSSA, M. R.; SPYROU, P.; GAMBARI, R.; THEIN, S. L.; KLEANTHOUS, M. The investigation of resveratrol. **Blood Cells, Mol. Dis.**, n. 58, p. 6–12, 2016.

TSAO R.. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**. Dec; v.2(12): p.1231–1246, 2010.

UTTARA, B.; SINGH, A.V.; ZAMBONI, P. MAHAJAN, R.T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Curr. Neuropharm.**, v.7, p. 65-74 65, 2009.

VIJAYALAKSHMI M.; RUCKMANI K. Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract. **Bangladesh J Pharmacol.** v.11: p.570-572, 2016.

VOET, D.; VOET, J. **Bioquímica**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 1512 p.

WRIGHT, D.; REID, M.; STENNETT, R. Antioxidant Intake in Sickle Cell Disease. **International J. Clin. Nutr.**, v. 2, n. 3, p. 53-59, 2014.

WU G.; YUN-ZHONG FANG Y. Z.; YANG S.; LUPTON J. R.; TURNER N. D. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. **J Nutr.** Mar; p.489-92, 2004.

## ANEXOS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da atividade hemolítica de compostos sintéticos e naturais em hemácias normais e induzidas a estresse oxidativo

**Pesquisador:** JULIANA MOZER SCIANI

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 25441719.0.0000.5514

**Instituição Proponente:** CASA DE NOSSA SENHORA DA PAZ ACAO SOCIAL FRANCISCANA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.719.637

#### Apresentação do Projeto:

Os radicais livres são moléculas altamente instáveis, formadas in vivo por meio de reações catalíticas das enzimas, no qual ocorre a transferência de elétrons. Estas moléculas podem ocasionar alterações em proteínas extracelulares e intracelulares, as quais podem ocasionar danos celulares. Visando a redução na formação de radicais livres, as pesquisas se ampliam na direção da utilização dos antioxidantes. Uma delas é o possível uso para o tratamento da anemia falciforme, doença de origem genética que acomete grande parte da população, e que não tem tratamento. O objetivo da presente pesquisa é avaliar a atividade antioxidante moléculas sintéticas e de origem natural, bem como verificar seu potencial antioxidante em hemácias induzidas a estresse oxidativo, simulando a anemia falciforme. As amostras serão submetidas aos testes antioxidantes de DPPH e PFRAP. Aquelas que demonstrarem atividade serão testadas in vitro em hemácias, PBMC (peripheral blood mononuclear cell) e plasma normais e com estresse oxidativo. As células serão avaliadas quanto à diminuição da liberação de espécies reativas de oxigênio, e as hemácias também serão avaliadas quanto à diminuição da hemólise após o tratamento.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo geral deste estudo é avaliar a atividade antioxidante de moléculas obtidas por rota

**Endereço:** Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 12.916-900  
**UF:** SP **Município:** BRAGANCA PAULISTA  
**Telefone:** (11)2454-8302 **E-mail:** comiteetica@usf.edu.br



Continuação do Parecer: 3.719.637

sintética, bem como provenientes de fontes naturais (venenos de animais), e a diminuição da liberação de espécies reativas de oxigênio de hemácias, células brancas e plasma normais e após estresse oxidativo, visando um possível tratamento da anemia falciforme.

Objetivo Secundário:

- Obter compostos sintéticos com base em triazóis, glucal e quinonas;
- Obter moléculas a partir de venenos e secreções animais (animais marinhos e anfíbios);
- Avaliar atividade antioxidante dos compostos e extratos;
- Testar os compostos selecionados por atividade antioxidante em células sanguíneas vermelhas, brancas e plasma normais e após estresse oxidativo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

De acordo com proponente,

Riscos:

Não há riscos envolvidos para os participantes, uma vez que nesse projeto não será feita qualquer manipulação ou utilização de quaisquer dados pessoais ou clínicos. O sangue que será utilizado é o de descarte da UNIFAG (que já passou pelos procedimentos e não será mais utilizado), que teve origem de um outro procedimento, o qual o participante esteve ciente e concordou com a retirada da amostra.

Benefícios:

Com a descoberta de uma nova molécula que inibe processos oxidativos do sangue, no futuro pode ser utilizada para o tratamento da anemia falciforme, uma que afeta uma grande parcela da população mundial, com origem genética que não possui tratamento, principalmente farmacológico. Os antioxidantes disponíveis hoje não são efetivos no tratamento dessa doença.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto apresentado com boa metodologia e aborda tema de importância a ser estudado.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termos apresentados adequadamente.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Óbices éticos ausentes.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

APÓS DISCUSSÃO EM REUNIÃO DO DIA 21/11/2019, O COLEGIADO DELIBEROU PELA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISAS. APÓS A CONCLUSÃO DO PROJETO É OBRIGATÓRIO O ENVIO DO

**Endereço:** Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 12.916-900  
**UF:** SP **Município:** BRAGANCA PAULISTA  
**Telefone:** (11)2454-8302 **E-mail:** comiteetica@usf.edu.br



Continuação do Parecer: 3.719.637

RELATÓRIO FINAL PARA ENCERRAMENTO DO PROJETO.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1466500.pdf	07/11/2019 14:24:32		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	brochura.pdf	07/11/2019 14:24:07	JULIANA MOZER SCIANI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	UNIFAG.pdf	07/11/2019 14:21:05	JULIANA MOZER SCIANI	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	07/11/2019 14:16:31	JULIANA MOZER SCIANI	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BRAGANCA PAULISTA, 22 de Novembro de 2019

---

Assinado por:  
CARLOS EDUARDO PULZ ARAUJO  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 12.916-900  
**UF:** SP **Município:** BRAGANCA PAULISTA  
**Telefone:** (11)2454-8302 **E-mail:** comiteetica@usf.edu.br