

Modulação da atividade catalítica da *horseradish peroxidase* por flavonóides e 3-fenilcumarinas: relação estrutura-atividade e docking

Luciana M. Kabeya ¹ (PQ)*, Anderson A. de Marchi ² (IC), Alexandre Kanashiro ¹ (PQ), Norberto P. Lopes ¹ (PQ), Carlos H.T.P. da Silva ² (PQ), Monica T. Pupo ² (PQ), Yara M. Lucisano-Valim ¹ (PQ) **
* lmkabeya@ig.com.br; ** yaluva@usp.br

¹Departamento de Física e Química; ²Departamento de Ciências Farmacêuticas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
Av. Café s/nº, Ribeirão Preto - SP, Brasil, CEP 14040-903.

Palavras Chave: *cumarina, flavonóide, horseradish peroxidase, docking, catecol, antioxidante.*

Introdução

As peroxidases têm importante papel em processos fisiológicos de vegetais, como a produção de hormônios, de metabólitos secundários para a defesa contra microrganismo e insetos, e biossíntese de parede celular.¹ Em mamíferos, essas enzimas participam de processos de sinalização intracelular e biossíntese de eicosanóides pró-inflamatórios, além de mediar a morte de microrganismos fagocitados por leucócitos. Apesar da importância fisiológica das peroxidases e de seus produtos, a sua contribuição para a lesão tecidual observada em doenças inflamatórias crônicas, como aterosclerose, asma e artrite reumatóide, tem sido extensamente relatada.² Nesse contexto, a modulação da atividade dessas enzimas tem despertado interesse terapêutico recentemente.

A atividade antiinflamatória de flavonóides e cumarinas, amplamente relatada na literatura, tem sido atribuída à presença de grupos substituintes hidroxílicos.³ Entretanto, os requisitos estruturais específicos para tal atividade e para a modulação da atividade de peroxidases ainda permanecem controversos. Neste trabalho, foram realizadas: (1) síntese de vinte derivados 3-fenilcumarínicos; (2) avaliação da atividade inibitória das 3-fenilcumarinas e flavonóides sobre a atividade catalítica da *horseradish peroxidase* (HRP), por meio da reação HRP-H₂O₂-luminol; (3) análise qualitativa da relação estrutura-atividade; (4) estudo da interação proteína-ligante por meio de *docking* flexível.⁴

Resultados e Discussão

Os derivados 3-fenilcumarínicos foram sintetizados pela reação de Perkin-Oglialoro, purificadas por recristalização e identificadas pelo ponto de fusão e por métodos espectroscópicos.

A partir da comparação dos valores de IC₅₀ obtidos, verificou-se que os flavonóides avaliados

inibiram a atividade catalítica da HRP na seguinte ordem: miricetina = quercetina > kaempferol > galangina, sendo observado efeito dependente do número de hidroxilas no anel B. Dentre as vinte 3-fenilcumarinas avaliadas: (1) cinco inibiram a atividade enzimática, sendo que as três contendo grupo catecol foram tão efetivas quanto a quercetina, e as outras duas tiveram atividade inibitória menor que a deste flavonóide; (2) as demais substâncias não tiveram efeito inibitório significativo, nas condições avaliadas.

Com o intuito de propor um modo de ligação das 3-fenilcumarinas com a HRP, foi utilizado o método de *docking* flexível (programa GOLD 3.0), empregando a estrutura da HRP resolvida a 1.57 Å (código no *Protein Data Bank*: 1H5G) como receptor.⁵ Os resultados sugerem que as substâncias avaliadas se ligariam à HRP de modo que os grupos substituintes orto-diidroxi específicos ocupariam as posições originalmente ocupadas pelos átomos de oxigênio dos ligantes nos complexos cristalográficos, próximos ao grupo heme. Esses resultados reforçam a importância dos grupos substituintes hidroxil nas posições *meta* e *para* do anel benzênico, tanto do esqueleto cumarínico quanto do anel 3-fenílico.

Conclusões

As 3-fenilcumarinas e flavonóides contendo grupo catecol foram as substâncias mais efetivas em inibir a atividade catalítica da HRP. Um de seus mecanismos de ação provavelmente é mediado pela interação desse grupo com o sítio catalítico da enzima.

Agradecimentos

CNPq, FAPESP e CAPES pelo suporte financeiro e pelas bolsas concedidas.

¹ Veitch, N.C. *Phytochemistry*, **2004**, 65, 249.

² Obinger, C. *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, 445, 197.

- ³ Middleton Junior, E.; Kandaswami, C.; Theoharides, T. C. *Pharmacol. Rev.* **2000**, 52, 673.
- ⁴ Kabeya, L.M.; de Marchi, A.A.; Kanashiro, A.; Lopes, N.P.; da Silva, C.H.T.P.; Pupo, M.T.; Lucisano-Valim, Y.M. *Bioorg Med Chem.* **2007**, 15, 1516.
- ⁵ Berglund, G. I.; Carlsson, G. H.; Smith, A. T.; Szoke, H.; Henriksen, A.; Hadju, J. *Nature* **2002**, 417, 463.