

## Avaliação do efeito inibitório de 4-metil cumarinas na produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos humanos

Carolina N. Fuzissaki (PG), Luciana M. Kabeya (PQ), Ana Elisa C.S. Azzolini (TC), Roberta B. Vermelho (IC), Sílvia H. Taleb-Contini (PQ), João Luis C. Lopes (PQ), Yara M. Lucisano-Valim (PQ)\*.

\* yaluva@usp.br

Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FCFRP-USP). Avenida do Café s/n, CEP 14040-903, Ribeirão Preto – SP, Brasil.

Palavras chave: *cumarina, neutrófilo, quimioluminescência, antioxidante, espécies reativas de oxigênio.*

### Introdução

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelos neutrófilos durante o processo inflamatório, mediada principalmente pela ativação do complexo NADPH oxidase e pela mieloperoxidase, é de vital importância para a defesa do organismo<sup>1</sup>. Entretanto, a liberação exacerbada dessas espécies pode levar a consequências deletérias, associadas a diferentes patologias de caráter inflamatório e auto-imune, como aterosclerose, artrite reumatóide, câncer e outras<sup>2</sup>. Assim, cada vez mais tem-se feito necessária a busca por substâncias que inibam a geração dessas EROs.

Neste trabalho, foram sintetizados três derivados de cumarinas hidroxilados [4-metil-6,7-diidroxycumarina (1), 4-metil-7,8-diidroxycumarina (2) e 4-metil-5,7-diidroxycumarina (3)] e três acetoxilados [4-metil-6,7-diacetoxycumarina (4), 4-metil-7,8-diacetoxycumarina (5) e 4-metil-5,7-diacetoxycumarina (6)]. Foram avaliados o efeito modulatório dessas substâncias sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos e os seus efeitos citotóxicos. Além disso, a relação estrutura-atividade foi analisada.

### Resultados e Discussão

As cumarinas 1, 2 e 3 foram sintetizadas através da condensação de Pechmann, enquanto que as cumarinas 4, 5 e 6 foram obtidas por acetilação das suas análogas hidroxiladas<sup>3</sup>. Todas as substâncias foram purificadas por recristalização em etanol/água em diferentes porções e a elucidação estrutural dos compostos foi feita por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H). A faixa de pureza das amostras foi de 95 - 100%, conforme analisada por cromatografia líquida de alta eficiência.

O efeito modulatório das cumarinas no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por zimosan opsonizado (Ziops) ou acetato de miristoilforbol (PMA) foi avaliado por quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e dependente de lucigenina (QLluc). Esta última detecta a geração de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, enquanto que a QLlum detecta a somatória das EROs produzidas

pelos neutrófilos estimulados.

Observou-se que as cumarinas com grupos *o*-diidroxil foram as mais efetivas inibidoras da QLlum e da QLluc, seguida pelas demais. Foi possível determinar os valores de CI<sub>50</sub> para as cumarinas que, a 100 μmol/L, inibiram mais de 50% da QLlum e da QLluc (1, 2, 3, 4 e 5) produzidas pelos neutrófilos estimulados por Ziops ou PMA. Considerando-se que cumarinas mais ativas apresentaram valores menores de CI<sub>50</sub>, observou-se que quando o estímulo utilizado foi o Ziops, a ordem de atividade das cumarinas foi 2>1>5>3>4 (QLlum) e 2>1>4>5>3 (QLluc) e quando utilizou-se o PMA como estímulo a atividade decresceu na seguinte ordem: 2>1>4>5>3 (QLlum) e 2>1>4>3 (QLluc).

Todos os efeitos farmacológicos das cumarinas descritos neste trabalho foram dependentes de concentração. Além disso, as cumarinas ensaiadas não foram tóxicas sobre neutrófilos humanos, avaliado através dos ensaios de exclusão ao corante Azul de Tripán e da determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase liberada.

### Conclusões

O número e a posição dos grupos hidroxil e acetoxil presentes nas cumarinas analisadas foram importantes para o efeito modulatório sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos, sendo que as substâncias com grupamento *o*-diidroxil apresentaram maior atividade inibitória. Além disso, o efeito farmacológico dessas substâncias não foi decorrente da toxicidade sobre os neutrófilos, nas condições empregadas.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq, à FAPESP e ao Instituto do Milênio Inovação e Desenvolvimento em Fármacos e Medicamentos (INOFAR) pelo suporte financeiro.

1. Babior, B. M.; Lamberth, J. D.; Nauseef, W. *Arch Biochem Biophys.* **2002**, *2*, 342-344.

2. Kris-Etherton, P. M.; Lefevre, M.; Beecher, G. R.; Gross, M. D.; Keen, C. L. e Etherton, T. D. *Annu Rev Nutr.* **2004**, *24*, 511-538.

3. Vogel, I. A. *A textbook of practical organic chemistry.* **1967**, 854-855.