

Avaliação do efeito pró-oxidante da umbeliferona e da 4-metilumbeliferona por meio de ensaios de quimioluminescência dependente de luminol

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 Maria 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: cumarinas, neutrófilos, quimioluminescência, peroxidases, radicais livres.

Introdução

A estreita relação entre inflamação, estresse oxidativo e neutrófilos tem levado a uma intensa procura por substâncias com propriedades antioxidantes como potenciais moduladores da resposta inflamatória mediada por essas células¹. Dentre elas, destacam-se as cumarinas hidroxiladas, as quais tem-se mostrado capazes de atuar em diferentes eventos envolvidos no desenvolvimento da resposta inflamatória, como a produção de espécies oxidantes, produção de TNF- α e a atividade das enzimas lipoxigenase, ciclooxigenase e elastase². Por outro lado, estudos recentes têm demonstrado que alguns antioxidantes fenólicos clássicos, como a quercetina e o butil-hidroxitolueno, podem também exercer atividade pró-oxidante, dependendo das condições de reação³.

Neste trabalho, foi avaliado o efeito modulatório da umbeliferona e da 4-metilumbeliferona na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por neutrófilos humanos estimulados por zimosan opsonizado (Ziops) ou acetato de miristoilforbol (PMA), através de quimioluminescência dependente de luminol (QLlum). Além disso, foram avaliados a toxicidade dessas substâncias sobre os neutrófilos, e seu efeito anti- ou pró-oxidante, através da medida de QLlum produzida pelos sistemas enzimáticos *horseradish* peroxidase (HRP)-H₂O₂-luminol e mieloperoxidase (MPO)-H₂O₂-luminol.

Resultados e Discussão

A umbeliferona (**1**) foi obtida de fonte comercial (Sigma) e a 4-metilumbeliferona (**2**) foi sintetizada através da condensação de Pechmann⁴. As substâncias foram purificadas por recristalização em etanol/água em diferentes proporções. A elucidação estrutural foi feita por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H). A pureza foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo obtidos índices de 97-100%.

Verificou-se que as duas cumarinas avaliadas aumentaram a QLlum produzida pelos neutrófilos humanos estimulados, de modo dependente da concentração. Observou-se que o efeito pró-oxidante das amostras foi maior para as células

foram estimuladas por PMA (estímulo solúvel), quando comparado ao Ziops (estímulo particulado). Além disso, as substâncias estudadas não foram tóxicas para os neutrófilos humanos, conforme avaliado pelos ensaios de exclusão ao corante Azul de Tripán e de determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase liberada.

Empregando-se sistemas de reação enzimáticos (HRP-H₂O₂-luminol e MPO-H₂O₂-luminol), observou-se que as cumarinas **1** e **2** tiveram efeito pró-oxidante, ou seja, levaram ao aumento da oxidação do luminol e ao conseqüente aumento da QLlum medida. Isto sugere que peroxidases intracelulares podem estar envolvidas na produção de oxidantes derivados das cumarinas pelos neutrófilos estimulados.

Conclusões

A umbeliferona e a 4-metilumbeliferona tiveram efeito pró-oxidante, levando ao aumento da QLlum produzida tanto pelos modelos experimentais celulares (neutrófilo-PMA-luminol e neutrófilo-Ziops-luminol) quanto pelos modelos enzimáticos (HRP-H₂O₂-luminol e MPO-H₂O₂-luminol). Tal efeito parece ser mediado pela ação de peroxidases sobre as cumarinas, gerando produtos capazes de oxidar o luminol.

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. *Am. J. Med.* **2000**, 109, 33-44.
2. Kontogiorgis, C.A.; Hadjipavlou-Litina, D.J. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 6400-6408.
3. Miura, T.; Muraoka, S.; Fujimoto, Y. *Food Chem. Toxicol.* **2003**, 41, 759-765.
4. Vogel, I.A. *A textbook of practical organic chemistry*. 3.ed., **1967**.