UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo do efeito de cumarinas simples no metabolismo
oxidativo de neutrófilos de coelho: aspectos metodológicos,
avaliação da atividade e da sua relação com a toxicidade e com
propriedades físico-químicas dos compostos.**

Luciana Mariko Kabeya

Ribeirão Preto

2002

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo do efeito de cumarinas simples no metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho: aspectos metodológicos, avaliação da atividade e da sua relação com a toxicidade e com propriedades físico-químicas dos compostos.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientada: Luciana Mariko Kabeya

Orientadora: Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim

Ribeirão Preto

- 2002 -

Ficha Catalográfica

Kabeya, Luciana Mariko

Estudo do efeito de cumarinas simples no metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho: aspectos metodológicos, avaliação da atividade e da sua relação com a toxicidade e com propriedades físico-químicas dos compostos. Ribeirão Preto, 2002.

140p.; il.; 29,7cm

Bibliografia: p. 125 – 140.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Departamento de Física e Química.

Orientador: Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim.

1.Cumarinas. 2.Neutrófilos. 3.Quimioluminescência. 4.Espécies reativas de oxigênio. 5.Relação estrutura-atividade. 6.Características físico-químicas. 7.Toxicidade.

AUTOR: Luciana Mariko Kabeya

TÍTULO: Estudo do efeito de cumarinas simples no metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho: aspectos metodológicos, avaliação da atividade e da sua relação com a toxicidade e com propriedades físico-químicas dos compostos.

Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim
(Orientadora)

Trabalho apresentado e aprovado pela Comissão Julgadora em 21 / 06 / 2002.

Todas as vezes que nos deparamos com problemas em nossa vida, observamos o quanto somos frágeis. As alegrias se vão e só fica a verdade de que somos impotentes para lidar com adversidades que surgem no decorrer de nossa existência.

Deus nos deixa lições interessantes em sua criação para nos mostrar o contrário, que o homem foi criado forte e que essa força é sempre adquirida e absorvida dessas situações adversas.

Você conhece uma árvore chamada carvalho?

Pois é, essa árvore é usada pelos botânicos e geólogos como um medidor de catástrofes naturais do ambiente. Quando querem saber o índice de temporais e tempestades ocorridas numa determinada floresta, eles observam logo o carvalho, que naturalmente é a árvore que mais absorve as conseqüências de temporais. Quanto mais temporais e tempestades o carvalho enfrenta, mais forte ele fica. Suas raízes naturalmente se aprofundam mais na terra e seu caule se torna mais robusto, sendo impossível uma tempestade arrancá-lo do solo ou derrubá-lo.

Mas não pense que os cientistas precisam fazer essas análises todas para saber isso. Basta apenas eles olharem para o carvalho. Por absorver as conseqüências das tempestades, a robusta árvore assume uma aparência disforme, como se realmente tivesse feito muita força. Muitas vezes uma aparência triste. Cada tempestade para um carvalho é mais um desafio a ser vencido e não uma ameaça! Numa grande tempestade, muitas árvores são arrancadas, mas o carvalho permanece firme!

Assim somos nós. Devemos tirar proveito das situações contrárias à nossa vida e ficar mais fortes. Um pouco marcados. Muitas vezes com aparência abatida, mas fortes! Com raízes bem firmes e profundas na terra!

Podemos, com isso, compreender o que o nosso PAI maravilhoso quis nos ensinar, quando disse que podemos todas as coisas naquele que nos fortalece. E também a confiança do rei Davi quando cantou:

— “Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte eu não temerei mal algum, porque T’Ú estás comigo...”

Por isso quando olhar pela janela o lindo alvorecer, lembre-se de que não há temor com os infortúnios da dia, porque DEUS está consigo!

*"As palavras de Deus estão escritas no mundo que nos rodeia.
Basta prestar atenção ao que acontece em nossa vida para descobrir,
em qualquer momento, onde Ele esconde Suas palavras e Sua vontade."
(Paulo Coelho)*

Agradecimentos

A DEUS

Obrigada pelas dádivas e pelas oportunidades

de crescimento concedidas a cada dia.

Por seres o colo que me consola

nos momentos mais difíceis.

Por seres a luz que me guia

quando parece não haver saída.

Pelos inúmeros amigos que tens

colocado em meu caminho.

E, sobretudo, por seres o amor de todos

os que me apoiaram para chegar até aqui.

*Aos meus pais, Natio e Akiko,
e aos meus irmãos, Rogério e Adriana*

*Por todo amor dedicado à família,
que se torna mais forte a cada dia
e me fortalece para enfrentar as dificuldades.
Pelo apoio e incentivo constantes
para a realização dos meus sonhos.
Pela orientação espiritual e pelos ensinamentos,
que têm sido essenciais para guiar-me
ao longo de minha caminhada.
Por tudo o que vocês representam em minha vida
e que não é possível expressar em palavras.
Muito Obrigada.*

À Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim

*Obrigada pela amizade, pelo carinho
pela paciência com que tem me orientado
ao longo desses anos.
Seu exemplo de caráter, de conduta,
de transparência e de simplicidade,
assim como a sabedoria transmitida
por seus ensinamentos,
dignos de um verdadeiro Mestre,
têm sido essenciais para o
meu crescimento profissional e pessoal.*

*" O Mestre que caminha à sombra do templo,
rodeado de discípulos, não dá de sua sabedoria,
mas sim de sua fé e de sua ternura.
Se ele for verdadeiramente sábio,
não vos convidará a entrar na mansão de seu saber,
mas vos conduzirá antes
ao luminar de vossa própria mente. "*
(Autor desconhecido)

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido para a realização
deste trabalho (processo nº 00/06233-7).*

Aos amigos

"Amigos são pessoas comuns até os encontrarmos.

Tornam-se importantes pelos momentos divididos,

pelo tempo compartilhado, pelos sorrisos,

pelos dias comuns e especiais, pelas alegrias vividas a cada dia,

e pelas lágrimas compreendidas e até amenizadas...

E amigos são tão preciosos, tão necessários!

Preenchem os espaços, enfeitam, ensinam.

São inimigos da solidão, com seu barulho, seus passos e abraços.

Exercitam-nos na prática do amor, compartilhando, querendo bem,

ampliando as nossas dimensões, da superfície à profundidade.

Tornam-nos seres mais felizes pelo simples fato de existirem

e serem nossos amigos."

À eterna amiga Andréia Cristina Kazue Kuramoto, pela amizade, pelo companheirismo, compreensão, sinceridade, pelos ensinamentos transmitidos a cada dia, e pela alegria de viver, que contagia a todos e torna mais belos os dias daqueles que a cercam.

À amiga Renata Takeara, pela preciosa amizade, pela demonstração de humildade e de harmonia, e pelos inúmeros momentos compartilhados.

À amiga Juliana Alves Uzuelli, pela amizade, pela solidariedade e pela compreensão demonstrados nos mais diversos momentos.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica, do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, onde foi desenvolvido este trabalho:

Que fazem deste laboratório não somente um local de pesquisa, mas uma escola da vida, onde a presença de Deus pode ser sentida em cada gesto, em cada palavra, e mesmo num simples olhar.

Todas elas contribuíram, de alguma forma para a realização deste trabalho, não só através do trabalho inerente às funções de cada um, mas, principalmente, com suas palavras, com seu carinho, com seu constante apoio e cooperação, e com seus ensinamentos transmitidos a cada dia, que fazem com que o Laboratório de Bioquímica seja cada vez mais um local harmonioso, aconchegante e acolhedor.

São essas as pessoas que "fazem a diferença ":

Profs. Drs. Ana Isabel de Assis Pandochi, Carem Gledes Vargas Recchia, Carlos Curti e Augusto César Cropanese Sapdaro e o Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, do laboratório de Bioquímica Clínica da FCFRP-USP.

Os funcionários Alcides Silva Pereira, Ana Cristina Morseli Pollizelo, Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini, Ieda Maria Razaboni Prado, Maria Regina de Pila Raphaloski, Nadir Mazzucato.

10

Os pós-graduandos Acácio Antônio Pigoso, Alexandre Kanashiro, Ana Paula Garcia Landi, Cássio de Barros Pontes, Celene Maria de Oliveira Simões Alves, Celma Gonçalves Duarte, Cláudia da Silva Bitencourt, Cleni Mara Marzochi Machado, Daniel Junqueira Dorta, Denise Pimenta da Silva Leitão, Elisa Maria de Sousa Russo Carbolante, Fábio Ermínio Mingatto, Frederico Marianetti Soriani, Miriam Ribeiro Moreira, Tiago Rodrigues, Valéria Gomes Tudella.

Os estagiários Cintia B. Salomão, Elaine Akemi Kuvauti, Fernanda F. F. Speretta, Fernando A. E. del Campo, Flávia G. Tinti, Isabela F. Morete, Gabriela Manfrin, Karen R. N. Hiraki, Kátia C. de Marco, Lívia M. C. Simões, Maira N. Zampier, Maria Fernanda G. B. dos Santos, Marília R. Mendes, Ricardo D. C. de Oliveira, Rodrigo A. Cazzaniga, Tatiana S. Marasca.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação da FCFRP-USP

Alexandre P. Rogério, Eduardo Ricci Junior, Fabiano H. Mateus, Jocivânia Oliveira, Lillian S. C. Bernardes, Luis L. P. da Silva, Samara Leite e Wanessa S. Garcia, pela agradável convivência, pelos momentos de riso, de alegria e de reflexão compartilhados.

A aqueles que colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho:

Prof. Dr. João Luis Callegari Lopes, do Departamento de Física e Química da FCFRP – USP, pelo fornecimento das cumarinas, pela preciosa amizade e pela atenção dispensada.

Profa. Dra. Antônia Tavares do Amaral, os pós-graduandos Alberto Malvezzi e Hamilton Ishiki, e o técnico Ênio Robson Braz, do Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela colaboração nos estudos de relação estrutura-atividade e pela agradável convivência.

Prof. Dr. Antônio Cardozo dos Santos, pela agradável convivência e por estar sempre aberto a esclarecimentos dos mais diversos tipos.

Profa. Dra. Ivone de Carvalho, do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP, e Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira, da Universidade Federal de Uberlândia, pela valiosa contribuição na elaboração deste trabalho.

Profa. Dra. Mônica Talarico Pupo, do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP e Profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott, do Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP – USP, pelas frutíferas discussões acerca deste trabalho e pela atenção dispensada.

Profa. Dra. Ana Maria de Oliveira, Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pela amizade, pelo carinho e orientação quanto às análises estatísticas.

Prof. Dr. Sérgio Emanuel Galembeck e à Profa. Dra. Laura Tiemi Okano, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, pelos diversos esclarecimentos prestados e pela atenção dispensada.

Aos Funcionários da seção de pós-graduação da FCFRP-USP, Cleber José Lupachini, Denise Bernardi Botelho, Rosana F. L. S. Florêncio e Ana Lúcia Turatti, pela paciência e pela imprescindível assistência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Funcionários do Biotério da FCFRP-USP pelo cuidado no tratamento dos animais.

Aos Funcionários da Biblioteca Central do Campus de Ribeirão Preto, pela simpatia, pela atenção e pela prontidão em ajudar.

*A todos aqueles que, embora não citados,
contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.*

*"Todas as grandezas do mundo
não valem uma amizade."
(Voltaire)*

Sumário

Sumário

Lista de siglas e abreviaturas	I
Lista de símbolos, unidades e grandezas	V
Lista de tabelas.....	Vi
Lista de figuras	Vii
Resumo	X
Summary	Xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Neutrófilos.....	2
1.1.1. Aspectos morfológicos	2
1.1.2. Atuação no processo inflamatório.....	3
1.1.3. Fagocitose.....	5
1.1.4. Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	7
1.1.5. Envolvimento de neutrófilos em doenças	14
1.2. Quimioluminescência.....	17
1.3. Cumarinas	22
1.4. Aspectos importantes a serem considerados na investigação da atividade biológica de novos compostos.....	28
1.4.1. Propriedades físico-químicas.....	28
1.4.2. Toxicidade.....	30
2. OBJETIVOS.....	32

3. MATERIAL E METODOS	34
3.1. Compostos estudados	35
3.1.1. Cumarinas.....	35
3.1.2. Compostos com atividade antioxidante conhecida	37
3.2. Principais reagentes.....	38
3.3. Equipamentos	38
3.4. Animais	38
3.5. Isolamento de neutrófilos	39
3.6. Obtenção de soro	40
3.7. Preparo e opsonização do Zimosan	40
3.8. Ensaios de quimioluminescência (QL).....	41
3.8.1. Padronização das condições dos ensaios de QL	41
3.8.1.1. Padronização da concentração de Zlops	41
3.8.1.2. Padronização da diluição do soro para opsonização do Zimosan	45
3.8.2. Avaliação da atividade das cumarinas simples e dos padrões de antioxidantes sobre a QLlum e a QLluc	47
3.8.2.1. Condições experimentais dos ensaios.....	47
3.8.2.2. Expressão dos resultados e análise estatística	48
3.8.3. Avaliação da influência da concentração de DMSO nas medidas de QLlum e de QLluc	51
3.9. Ensaios de toxicidade.....	54
3.9.1. Padronização das condições experimentais do ensaio para determinação da atividade da LDH.....	55
3.9.1.1. Determinação da absorbância em 340 nm	55
3.9.1.2. Padronização da concentração de células	56

3.9.1.3. Padronização do volume de amostra (sobrenadante de 1×10^6 neutrófilos de coelho, lisados com 0,2% de Triton X-100)	58
3.9.1.4. Avaliação da relação da concentração de LDH na amostra com a atividade medida pelo Kit.....	60
3.9.2. Avaliação da toxicidade das cumarinas e dos padrões de atividade antioxidante	61
3.9.3. Análise estatística	63
3.10. Estudos de relação entre propriedades físico-químicas das cumarinas simples e sua atividade biológica de inibição da QLLuc .	64
3.10.1. Determinação dos valores de coeficiente de partição por cálculo ($\text{Log } P_{\text{calc}}$)	64
3.10.2. Determinação experimental do coeficiente de partição aparente ($\text{Log } P_{\text{app}}$)	65
3.10.2.1. Pré-saturação mútua	66
3.10.2.2. Obtenção do comprimento de onda de absorção máxima e determinação da absortividade molar das cumarinas	66
3.10.2.3. Procedimento experimental do método "Shake-flask"	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
Parte I. Avaliação da atividade dos padrões de antioxidantes sobre a QLLum e a QLLuc e da toxicidade dos compostos sobre os neutrófilos de coelho	73
4.1. α -Tocoferol	74
4.2. BHT	79
4.3. Quercetina	84

Parte II. Avaliação da atividade das cumarinas simples sobre a QLLum e a QLLuc, da toxicidade e dos parâmetros físico-químicos desses compostos	90
4.4. Avaliação da atividade das cumarinas simples sobre a QLLuc.....	91
4.5. Avaliação da atividade das cumarinas simples sobre a QLLum	97
4.6. Avaliação da toxicidade das cumarinas simples sobre os neutrófilos de coelho	100
4.7. Avaliação da relação entre propriedades físico-químicas das cumarinas simples e sua atividade biológica de inibição da QLLuc	102
4.8. Discussão dos resultados da parte II	105
5. CONCLUSÕES.....	115
5.1. Aspectos metodológicos.....	117
5.1.1. Padronização dos ensaios de QL.....	117
5.1.2. Padronização dos ensaios para avaliação da toxicidade das cumarinas e dos padrões de antioxidantes sobre os neutrófilos de coelho	118
5.2. Seleção do padrão de antioxidante	119
5.3. Avaliação da atividade das cumarinas sobre a QLLum e a QLLuc e estudo da relação dessa atividade com a toxicidade e com propriedades físico-químicas dos compostos	120
6. APÊNDICE	122
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

*"Ninguém que passa em nossa vida, passa em vão.
Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco da gente."
(A. S. Exupéry)*

Lista de Siglas e Abreviaturas

Lista de Siglas e Abreviaturas

AC	área integrada do controle
AS	área integrada da substância estudada
Ai	absorbância inicial
Af	absorbância final
AMPc	adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
BHT	butil-hidroxitolueno
C3b, C3bi, C5a	fragmentos de ativação do sistema complemento
CR1, CR3	receptores de complemento tipo 1 e 3
C _{aq}	concentração do composto na fase aquosa
C _{org}	concentração do composto na fase orgânica
CFD	"complement fixation diluent" (diluyente para fixação de
CFDgel	CFD contendo 0,1 % de gelatina
Cl ₂₀	concentração que inibe 20% da quimioluminescência
Cl ₅₀	concentração que inibe 50% da quimioluminescência
Cl _x	concentração que inibe uma porcentagem x de uma determinada resposta biológica
DGC	doença granulomatosa crônica
DL ₅₀	concentração letal para 50% de uma determinada população
DMSO	dimetilsulfóxido
DP	desvio padrão
ϵ	coeficiente de absorvidade molar
EROs	espécies reativas de oxigênio

Fc	fragmento cristalizável da molécula do anticorpo
Fc γ	receptores para porção Fc de IgG
Fc γ RIIA, Fc γ RIIIB	isoformas de receptores de Fc γ
fMLP	<i>n</i> -formil-metionil-leucil-fenilalanina
gp91 ^{phox} , p22 ^{phox} , 40 ^{phox} , p47 ^{phox} , p67 ^{phox} , Rac2, Rap1A	componentes do complexo da NADPH oxidase (gp = glicoproteína; p = proteína; phox = "phagocyte oxidase" = oxidase de fagócito)
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
GTP	guanosina trifosfato
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico
K _i	constante de inibição
% I	porcentagem de inibição da quimioluminescência
IgG	imunoglobulina da classe G
IL-1, IL-1b, IL-6, IL-8	interleucinas tipo 1, 1b, 6 e 8
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
λ_{max}	comprimento de onda de máxima absorbância
LDH	lactato desidrogenase
LDL	lipoproteína de baixa densidade
Log	logaritmo em base 10
LTB ₄	leucotrieno tipo B ₄
μ	força iônica
M.M.	massa molecular
MPO	mieloperoxidase
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NOS	óxido nítrico sintase
P _{app}	P = coeficiente de partição aparente
P _{calc}	P = coeficiente de partição calculado
pCl ₂₀	antilogaritmo do valor de Cl ₂₀
pKa	antilogaritmo do coeficiente de dissociação
PKC	proteína quinase C
PMA	acetato de miristoilforbol
p/v	peso/volume
QL	quimioluminescência
QLluc	quimioluminescência dependente de lucigenina
QLlum	quimioluminescência dependente de luminol
QSAR	relação estrutura-atividade quantitativa
R ²	coeficiente de correlação linear
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de prótons
S/D	sem diluir
SOD	superóxido dismutase
TNF- α	fator de necrose tumoral tipo α
UV	ultravioleta
V _{aq}	volume de fase aquosa
V _{org}	volume de fase orgânica
v/v	volume/volume
ZI	zimosan A
ZIops	zimosan opsonizado

Espécies reativas e íons inorgânicos

Ca^{2+}	íon cálcio
Cl^-	íon cloreto
Fe^{2+}	íon ferroso
Fe^{3+}	íon férrico
H^+	íon hidrogênio
H_2O	água
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
$\text{HO}\cdot$	radical hidroxil
HOCl	ácido hipocloroso
NH_4^+	íon amônio
NO	óxido nítrico
O_2	oxigênio molecular
$\text{O}_2^{\cdot-}$	ânion superóxido
$^1\text{O}_2$	oxigênio singlete
OH^-	íon hidróxido
ONOO^-	peroxinitrito
ONOOH	ácido peroxinitroso
R-CHO	aldeído
R-NCl_2	di-cloramina
R-NH_2	amina
R-NHCl	cloramina

*"O verdadeiro sábio não é aquele que classifica
os seres humanos em bons ou ruins, mas sim,
aquele que consegue encontrar qualidades
que os tornam todos iguais."
(Lao-Tsé)*

Lista de Símbolos, Unidades e Grandezas

Lista de Símbolos, Unidades e Grandezas

$\text{\AA}^3$	ângstron elevado ao cubo
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
cpm	"counted photons per minute" (quantidade de fótons produzidos por minuto)
x g	aceleração da gravidade
g/mol	grama por mol
Kg	quilograma
μL	microlitro (10^{-6} litros)
μm	micrometro (10^{-6} metros)
$\mu\text{mol/L}$	micromols por litro (10^{-6} mols por litro)
mg/mL	miligrama por mililitro
mL	mililitro (10^{-3} litros)
mol/L	mols por litro
nm	nanometro
U/mL	unidade internacional por mililitro

*"Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina."
(Cora Coralina)*

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

3.1	Valores de absorbância em 340 nm dos compostos submetidos ao ensaio de toxicidade.....	56
3.2	Valores dos comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{max}) e de absortividade molar (ϵ), obtidos para as cumarinas simples estudadas. ...	67
3.3	Volumes dos componentes empregados para determinação do coeficiente de partição aparente das cumarinas simples, através do método "Shake-flask".	69
4.1	Avaliação da toxicidade do BHT sobre neutrófilos de coelho.	82
4.2	Avaliação da toxicidade da quercetina sobre neutrófilos de coelho, na concentração final de 50 μ mol/L.	89
4.3	Inibição da QLLuc pelas cumarinas simples 1 a 8 , representada pelos valores de CI_{20} , CI_{50} e porcentagem de inibição na concentração final de 200 μ mol/L.	96
4.4	Avaliação do efeito tóxico das cumarinas simples 1 a 8 sobre neutrófilos de coelho, na concentração final de 200 μ mol/L.	101
4.5	Comparação da atividade biológica das cumarinas simples de inibição da QLLuc, expressa como pCI_{20} , com parâmetros físico-químicos desses compostos ($\log P_{calc}$, $\log P_{app}$ e volume molecular).	103

"Você quer ser feliz por um instante? Vingue-se.

Você quer ser feliz para sempre? Perdoe."

(Tertuliano)

Lista de Figuras

Lista de Figuras

1.1	Neutrófilos com morfologia característica, apresentando núcleo multilobulado e grânulos citoplasmáticos.....	3
1.2	Representação esquemática dos componentes do complexo da NADPH oxidase de fagócitos profissionais..	10
1.3	Representação simplificada das etapas do processo de fagocitose de um agente invasor por neutrófilos estimulados.....	15
1.4	Representação simplificada do mecanismo proposto para descrever a origem e a regulação da quimioluminescência (QL) nativa em neutrófilos estimulados com Zimosan opsonizado (Zlops) e das reações químicas envolvidas na QL amplificada por luminol (QLlum) e na QL amplificada por lucigenina (QLluc).	21
1.5	Estrutura química básica dos compostos da classe das cumarinas.....	23
1.6	Estrutura química de anticoagulantes orais cumarínicos empregados terapeuticamente..	24
1.7	Modelo bilinear usado para descrever as correlações entre a atividade biológica (log A) e a lipofilicidade (log P) de uma série de fármacos congêneres	27
3.1	Estruturas químicas das cumarinas simples estudadas	36
3.2	Estruturas químicas dos padrões de antioxidantes estudados	37
3.3	Representação gráfica dos perfis de QLluc, obtido após estimulação de neutrófilos de coelho com diferentes concentrações de Zlops.	43
3.4	Respostas de QLluc e de QLLum de neutrófilos de coelho estimulados com diferentes concentrações de Zlops	44

3.5	Produção de QLuc (A) e de QLum (B) por neutrófilos de coelho estimulados com zimosan opsonizado com soro diluído em diferentes proporções.	46
3.6	Produção de QLuc por neutrófilos de coelho estimulados com Zlops, na presença da cumarina 3 em diferentes concentrações.	49
3.7	Gráfico representativo da porcentagem de inibição da QLuc em função do logaritmo da concentração final de quercetina, em mol/L.....	51
3.8	Avaliação da influência da concentração DMSO sobre a QLuc e a QLum medidas, após estimulação de neutrófilos de coelho com Zlops.....	53
3.9	Determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada em função da concentração neutrófilos de coelho, lisados com 0,2% de Triton X-100.	58
3.10	Determinação da atividade de LDH empregando-se diferentes volumes de amostra (sobrenadante de preparações de 1×10^6 neutrófilos de coelho, lisados com 0,2% de Triton X-100, por 15 minutos a 37°C).	59
3.11	Avaliação da relação entre a concentração de LDH na amostra e a atividade medida pelo kit LDH Liquiform.....	61
4.1	Avaliação da atividade do α -tocoferol, dissolvido em DMSO, sobre a QLuc (gráficos A, C, E) e a QLum (gráficos B, D, F) produzidas em decorrência da estimulação de neutrófilos de coelho por Zlops.....	76
4.2	Avaliação da atividade do β -tocoferol, dissolvido em etanol (gráfico A) e em acetona (gráfico B), sobre a QLuc produzida após a estimulação de neutrófilos de coelho com Zlops.	78

4.3	Avaliação da atividade do BHT sobre a QLLuc produzida por neutrófilos de coelho estimulados com Zlops.....	80
4.4	Avaliação da atividade da quercetina sobre a QLLuc (gráfico A) e a QLLum (gráfico B) produzidas por neutrófilos de coelho estimulados com Zlops.....	86
4.5	Comparação da atividade da quercetina sobre a QLLuc e a QLLum produzidas por neutrófilos de coelho estimulados com Zlops.	87
4.6	Avaliação da atividade das cumarinas simples (concentração final de 200 $\mu\text{mol/L}$) e da quercetina (concentração final de 50 $\mu\text{mol/L}$) sobre a QLLuc produzida por neutrófilos de coelho estimulados com Zlops.	94
4.7	Curvas de porcentagem de inibição da QLLuc em função da concentração final das cumarinas simples 1 a 8	95
4.8	Avaliação da atividade das cumarinas simples (concentração final de 200 $\mu\text{mol/L}$) e da quercetina (concentração final de 50 $\mu\text{mol/L}$) sobre a QLLum produzida por neutrófilos de coelho estimulados com Zlops	98
4.9	Avaliação da atividade das cumarinas simples 3 (gráfico A) e 4 (gráfico B), em diferentes concentrações, sobre a QLLum produzida por neutrófilos de coelho estimulados com Zlops.....	99
4.10	Avaliação da correlação da atividade inibitória das cumarinas simples sobre a QLLuc, expressa como pCl_{20} , com os valores de $\log P_{\text{app}}$ (gráfico A) e de volume molecular (gráfico B) desses compostos.....	104
4.11	Mecanismo de ação proposto para as cumarinas 3 e 4 sobre a QLLuc e a QLLum produzida por neutrófilos de coelho estimulados por Zlops	113

*"Os poderosos podem matar uma, duas ou até três rosas,
mas jamais poderão deter a primavera."
(Che Guevara)*

Resumo

Os neutrófilos desempenham um papel fundamental na defesa do organismo contra microrganismos invasores, através da fagocitose, da degranulação e da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo que esta última é decorrente da ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos. As EROs produzidas, tais como $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $HO\cdot$, $HOCl$, 1O_2 e NO , que são essenciais para matar os microrganismos fagocitados, podem também ser liberadas para o meio extracelular e causar lesões oxidativas aos tecidos do hospedeiro. Essas lesões têm sido implicadas na patogênese de doenças como aterosclerose, câncer, artrite reumatóide, pneumonia e enfisema pulmonar. Com o intuito de prevenir essas lesões oxidativas, tem-se investigado a atividade antioxidante de diversos compostos, especialmente os derivados de plantas.

Neste trabalho foram avaliadas as atividades de oito cumarinas simples (compostos **1** a **8**) sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho estimulados com Zimosan opsonizado, empregando-se os ensaios de quimioluminescência (QL) dependente de lucigenina (QLluc) e de QL dependente de luminol (QLlum). A QLluc reflete a produção apenas de $O_2^{\cdot-}$, enquanto que a QLlum é resultante da oxidação do luminol pelas diversas EROs produzidas pelos neutrófilos estimulados. Assim, a inibição da QLluc e da QLlum será decorrente da redução da concentração das EROs responsáveis pela oxidação da lucigenina e do luminol no meio de reação, respectivamente.

Foram avaliadas também a atividade dos antioxidantes α -tocoferol, butil-hidroxitolueno (BHT) e quercetina sobre a QLlum e a QLluc, e a toxicidade das cumarinas **1** a **8** e dos três antioxidantes citados sobre os neutrófilos de coelho. Determinou-se o coeficiente de partição e o volume molecular das cumarinas **1** a **8**.

Dentre os três antioxidantes, observou-se que a quercetina inibiu tanto a QLlum quanto a QLluc, e não foi tóxica para os neutrófilos, na concentração de $50 \mu\text{mol/L}$. O α -tocoferol não inibiu a QLlum nem a QLluc, enquanto o BHT foi tóxico para os neutrófilos de coelho.

Para as cumarinas simples, observou-se que: (1) a cumarina **1** não apresentou atividade inibitória sobre a QLluc e sobre a QLlum; (2) as cumarinas **3**, **4**, **5** e **6** tiveram atividades inibitórias sobre a QLluc semelhantes à da quercetina, que foram maiores que as das cumarinas **2**, **7** e **8**; (3) as atividades inibitórias das cumarinas **2** a **8** sobre a QLluc não estão relacionadas à lipofilicidade e ao volume molecular desses compostos, nem à toxicidade dos mesmos sobre os neutrófilos de coelho; (4) as cumarinas **3** e **4** provocaram aumento da QLlum medida, enquanto as demais não tiveram atividade neste sistema.

	R ₁	R ₂
1:	H	H
2:	CH ₃ O -	CH ₃
3:	OH	H
4:	OH	CH ₃

	R ₁	R ₂
5:	CH ₃ CO ₂ -	H
6:	CH ₃ CO ₂ -	CH ₃
7:	-OCH ₂ CH=CH ₂	H
8:	-OCH ₂ CH=CH ₂	CH ₃

*"Em todos os seus sonhos mais belos o homem
nunca inventou coisa mais bela do que a natureza."*

(Alphonse de Lamartine)

Summary

Neutrophils play a crucial role in the defense of the organism against invading microorganisms, thorough phagocytosis, degranulation and generation of reactive oxygen species (EROS). The last one is a consequence of activation of neutrophils' oxidative metabolism. The produced EROs, such as $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $HOCl$, $HO\cdot$, 1O_2 and NO , which are essential for killing phagocytosed microorganisms, may also be released to the extracellular milieu and inflict oxidative damage to host tissues. This damage has been implicated in the pathogenesis of diseases, such as arteriosclerosis, cancer, rheumatoid arthritis, pneumonia and lung emphysema. The antioxidant activity of many compounds, especially those obtained from plants, has been investigated with the aim of avoid such oxidative damage.

In this work, we studied the activity of eight simple coumarins (compounds **1** to **8**) on the oxidative metabolism of rabbit neutrophils upon stimulation by opsonized zymosan, using luminol- (QLlum) and lucigenin (QLluc)-enhanced chemiluminescence (QL) assays. QLluc reflects generation of $O_2^{\cdot-}$ only, whereas QLLum is a result of luminol oxidation by the various EROs produced by the stimulated neutrophils. Inhibition of QLluc and of QLLum will be a consequence of the decrease of the concentration of that EROs which are involved in the oxidation of lucigenin and luminol, respectively, in the reaction medium.

We also evaluated the activity of the antioxidants α -tocopherol, butyl-hydroxytoluene (BHT) and quercetin on QLLum and QLluc, and the toxicity of coumarins **1** to **8** and the three antioxidants on rabbit neutrophils. Partition coefficient and molecular volume values of coumarins **1** to **8** were determined.

We observed that, among the three antioxidants, quercetin inhibited QLLum and QLluc, and was not toxic to the neutrophils at concentration of 50 $\mu\text{mol/L}$. BHT was toxic to the rabbit neutrophils whereas α -tocopherol did not inhibit QLLum nor QLluc.

For the simple coumarins we observed that: (1) coumarin **1** did not inhibit QLLum nor QLluc; (2) coumarins **3**, **4**, **5** and **6** had inhibitory effects, which were similar to the quercetin and higher than coumarins **2**, **7** and **8**; (3) the inhibitory activities of coumarins **2** to **8** on QLluc were not related to the lipophilicity and to the molecular volume of these compounds, nor to their toxicity upon the rabbit neutrophils; (4) coumarins **3** and **4** increased the QLLum, whereas the others had no effect on this system.

	R ₁	R ₂
1:	H	H
2:	CH ₃ O -	CH ₃
3:	OH	H
4:	OH	CH ₃

	R ₁	R ₂
5:	CH ₃ CO ₂ -	H
6:	CH ₃ CO ₂ -	CH ₃
7:	-OCH ₂ CH=CH ₂	H
8:	-OCH ₂ CH=CH ₂	CH ₃