

AÇÃO ANTIOXIDANTE DA VIOLACEÍNA CONTRA ESPÉCIES ELETRONICAMENTE EXCITADAS E RADICALARES

Camila Maria Prado Alonso ¹; Juliana Mafra Machado Nunweiler ²; Iseli L. Nantes ³

Estudante do Curso de Medicina; e-mail: camila_mpa@yahoo.com.br¹

Mestranda em Biotecnologia; e-mail: jumafrinha@hotmail.com²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: ilnantes@gmail.com³

Área do Conhecimento: Bioquímica

Palavras-chaves: violaceína; radicais livres; oxigênio singlete

INTRODUÇÃO

A violaceína é um pigmento produzido pela bactéria gram-negativa *Chromobacterium violaceum*, que exibe uma multiplicidade de efeitos biológicos tais como potencial antitumoral decorrente da capacidade de indução de apoptose (MELO e col.). Em células da linhagem leucêmica HL60, a violaceína promove a ativação de receptores TNF, contribuindo para a morte celular programada (FERREIRA e col.). O potencial terapêutico da violaceína não se limita à ação antitumoral, pois também possui efeito como antibiótico, ação antichagásica, propriedades antiparasitárias contra *Leishmania amazonensis*, propriedades antiulcerogênicas (DURAN e col.) e ainda uma fraca atividade antiviral. Adicionalmente, dados na literatura relatam que a violaceína possui ação antioxidante em células (KOZEN e col.).

Dessa forma, o presente trabalho investigou a ação antioxidante desse corante contra as espécies excitadas eletronicamente e as radicalares. Compostos que possuem propriedades fotoquímicas, como drogas fotossensibilizadoras, são capazes de gerar estados excitados ou espécies radicalares quando irradiados. Várias biomoléculas tais como lipídeos e proteínas, podem ser alvos dos efeito pró-oxidantes dessas espécies excitadas após irradiação. Além disso, as drogas fotossensibilizadoras podem interagir com oxigênio molecular produzindo oxigênio singlete, um estado excitado do oxigênio molecular, espécie tóxica que provoca danos oxidativos em membranas lipídicas. Os danos oxidativos em lipídeos podem resultar em peroxidação lipídica, dando início a uma seqüência de reações que geram diferentes subprodutos derivados de lipídeos.

OBJETIVOS

Neste projeto, temos por objetivo caracterizar a ação antioxidante da violaceína contra espécies excitadas e radicalares. Para tanto, sistemas modelo de lipossomos biológicos e membranas mitocondriais foram submetidos à irradiação na presença de substâncias fotossensibilizadoras como o azul de metileno, ou incubados na presença de substâncias pró-oxidantes como o citocromo *c* e os efeitos foram identificados.

METODOLOGIA

As condições experimentais foram: preparo de estoques de violaceína em etanol na concentração 2,1 mM. As medidas de absorvância foram feitas no espectrofotômetro Shimadzu modelo Multispec-1501, utilizando cubeta de quartzo de caminho óptico 1 cm. As análises de infravermelho foram feitas através do espectrofotômetro infravermelho Perkin Elmer, modelo Spectrum 100 utilizando a técnica de ATR com placa de SeZn.

Dosagem dos produtos de oxidação de lipídeos de membranas: as medidas de peróxido de lipídeo foram feitas pelo método colorimétrico FOX e avaliadas também através da formação de TBARs (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), que incluem todos os aldeídos derivados de lipídeos após a peroxidação lipídica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para estudar a ação antioxidante, a violaceína foi adicionada aos lipossomos fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina/cardioplipina (PCPECL) e submetido à ação pró-oxidante do citocromo *c*. Segundo o trabalho de Rodrigues e colaboradores citocromo *c* adicionado em lipossomos biológicos tem efeito pró-oxidante, capaz de gerar espécies excitadas eletronicamente e radicalares. O corante na concentração de 4 μM diminuiu significativamente a produção de TBARs (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) em relação ao controle positivo (citocromo *c*) em lipossomos PCPECL, além de diminuição de 60% no conteúdo de peróxido de lipídeo na mesma condição. Para verificar a ação da violaceína contra espécies eletronicamente excitadas, utilizou-se o corante azul de metileno, o qual possui ação pró-oxidante quando submetido à irradiação. Da mesma forma que o resultado anterior, a violaceína promoveu proteção.

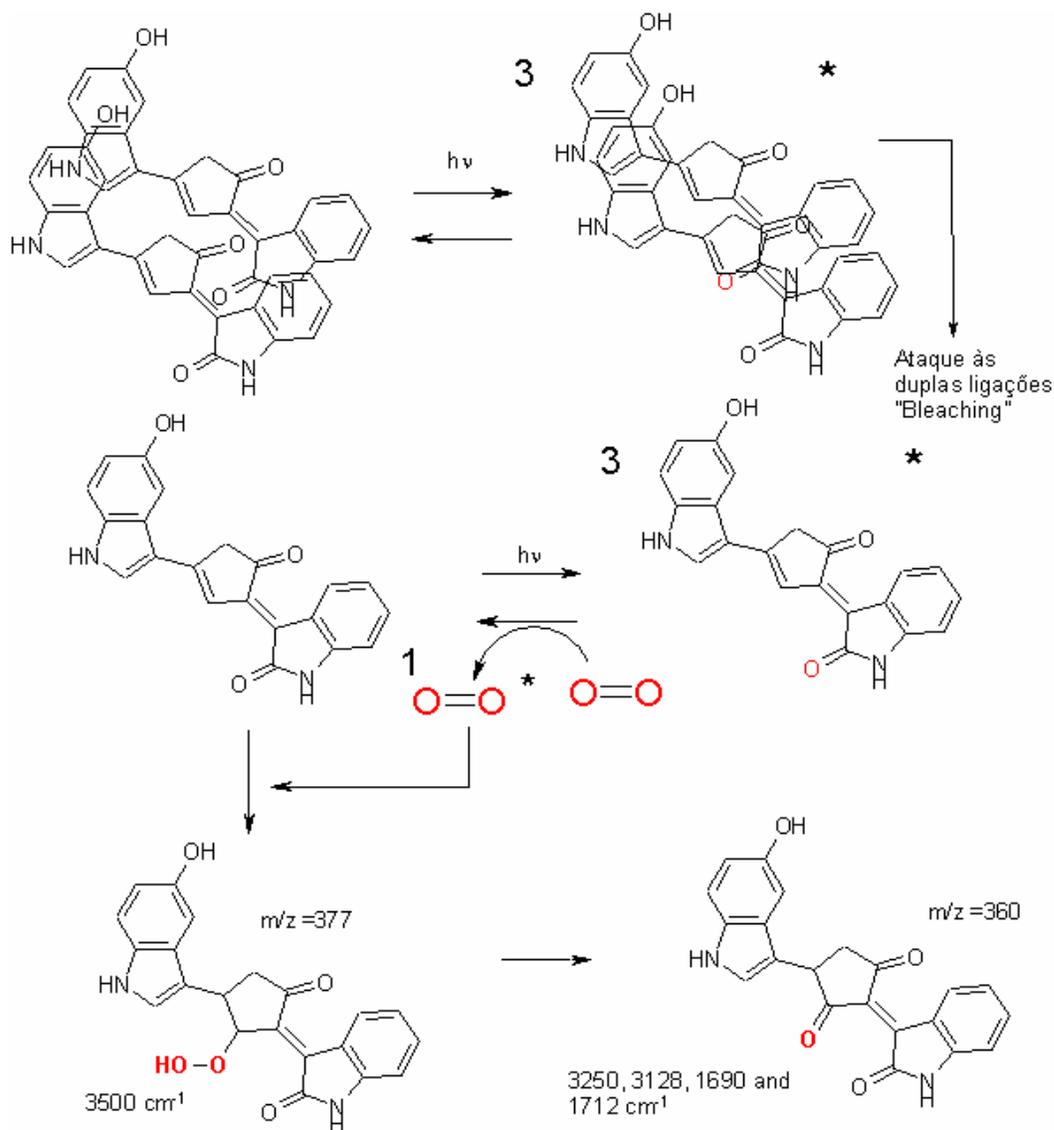
Para acessar o mecanismo de atividade antioxidante da violaceína, o corante foi irradiado em água deuterada (D_2O) na presença e na ausência de oxigênio. Utilizou-se água deuterada, para que eventuais modificações químicas da violaceína causadas por oxigênio singlete com conseqüentes alterações espectrais fossem maximizadas e assim, bem diferenciadas daquelas obtidas em atmosfera inerte, onde somente seria possível reação da violaceína triplete com seus pares no estado fundamental.

Há diferença espectral quando a violaceína é submetida à irradiação na presença de oxigênio e na ausência do mesmo em D_2O . Esse resultado sugere que a violaceína excitada na presença ou na ausência de oxigênio é convertida em fotoprodutos. Assim, partiu-se para caracterização dos fotoprodutos formados por meio de análises das respectivas amostras por espectrometria infravermelha.

O composto irradiado na presença do oxigênio apresenta um modo normal de vibração de grupos N-H em 3250 cm^{-1} e uma banda de absorção mais fraca em 3128 cm^{-1} . Este comportamento é típico de modos vibracionais das estruturas cíclicas das lactamas. A primeira banda é relativa a um forte estiramento N-H, enquanto a segunda é devida a uma combinação de estiramento C=O com uma deformação angular N-H. Observa-se que em 1690 cm^{-1} há um modo normal de vibração atribuível a um estiramento C=O de uma cetona cíclica conjugada e observa-se também um modo vibracional de estiramento C=O em 1712 cm^{-1} característico de uma lactama cíclica de anel de cinco membros. Tudo isto leva a proposição da formação do fotoproduto de oxidação 2.

A amostra irradiada na presença do oxigênio possui uma banda larga de absorção na região de 3500 cm^{-1} , típica de estiramentos O-H de hidroperóxidos, o que explicaria a proposição de formação do fotoproduto de oxidação 1.

Já o corante irradiado em atmosfera inerte apresenta mudanças no padrão espectral na região de 3000-3200 cm^{-1} , indicativo de alterações de vibrações de estiramento C-H de grupos olefinicos. O fato de observar concomitantemente uma variação de padrão espectral na região de 1600-1700 cm^{-1} referente à modos vibracionais C=C, sugere uma perda de conjugação da molécula estudada. O esquema abaixo resume os eventos que sucedem à irradiação da violaceína:



CONCLUSÃO

A violaceína é um corante que é convertido ao estado triplete quando irradiada com luz visível. Em atmosfera normal, seu estado excitado triplete decai ao estado fundamental por meio da transferência de energia ao oxigênio do meio e gera oxigênio singlete. Porém, a violaceína não causa danos a biomoléculas porque é eficiente seqüestradora de oxigênio singlete e radicais livres, conforme ficou comprovado nos experimentos feitos com citocromo *c*, azul de metileno e com a irradiação da violaceína em água deuterada em atmosferas inerte e normal. Portanto, na presença de oxigênio, a violaceína é fonte e ao mesmo tempo alvo da espécie excitada, o que leva a formação de derivados oxidados. Quando o corante é irradiado sem oxigênio ocorre reação do estado triplete da violaceína com perda de duplas conjugadas. A eficiente atividade antioxidante da violaceína pode ser responsável por efeitos protetores em células e membranas modelo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DURAN, N.; JUSTO, G.Z.; MELO, P.S.; DE AZEVEDO, M.B.; BRITO, A.R.; ALMEIDA, A.B.; HAUN, M. Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with beta-cyclodextrin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 81 (4), 387-396, 2003.

FERREIRA, C.V.; BOS, C.L.; VERSTEEG, H.H.; JUSTO, G.Z.; DURAN, N. PEPPELENBOSCH, M.P. molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood*, 104(5), 1459-1464, 2004.

KONZEN, D.M.M.; CORDOVA, C.A.S.; VIEIRA, T.O.; ANTÔNIO, R.V.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Antioxidant properties of violacein : Possible relation on its biological function. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14 8307-8313, 2006.

MELO, P.S.; MARIA, S.S; VIDAL, B.C.; HAUN, M.; DURAN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 36 (8), 539-543, 2000.

RODRIGUES, T.; FRANÇA, L.P.; KAWAI, C.; FARIA, P.A.; MUGNOL, K.C.U.; BRAGA, F.M.; TERSARIOL, I.L.S.; SMAILI, S.S.; NANTES, I.L. Protective Role of Mitochondrial Unsaturated Lipids on the Preservation of the Apoptotic Ability of Cytochrome c Exposed to Singlet Oxygen. *The Journal of Biological Chemistry*. VOL. 282, NO. 35, pp. 25577-25587, 2007

AGRADECIMENTOS: ,FAPESP, FAEP-UMC, CNPq