

ESTUDO COMPARATIVO DA REATIVIDADE DA HEMINA E SEUS DERIVADOS CONJUGADA COM DEXTRAN: MODELOS DE COMPLEXOS GERADORES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.

Rafaela Regina Leite¹; Tatiana Prieto²; Ivarne Luis dos Santos Tersariol³

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: flavio.rafa@hotmail.com¹

Departamento de Biofísica de São Carlos, SP; e-mail: tati_prieto@yahoo.com.br²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: ivarne@umc.br³

Área do conhecimento: Radicais livres e Espécies reativas de oxigênio (EROS)

Palavras chaves: Hemina, Dextrana, Peroxidase, Catalase, K562.

INTRODUÇÃO

Hemina pertence a uma classe de compostos orgânicos denominados de porfirinas. As porfirinas possuem como base estrutural um macrociclo tetrapirrólico, que contém um metal no centro ativo (MILAGRON, 1997). A atividade catalítica da hemina engloba reações similares àquelas mediadas por peroxidases e por catalases (MUGNOL *et al*, 2008). As propriedades redox das porfirinas têm sido amplamente utilizadas em Medicina e nanotecnologia (ANDRADE, S.M; 2002). Dextrana é um polissacarídeo, solúvel em água e facilmente funcionalizada através de seus reativos grupos hidroxilas (NAESSENS *et al*, 2006), por ser atóxico, biocompatível, biodegradável, e ter boa solubilidade tem tornado esta molécula alvo de desenvolvimento de sistemas de entrega de drogas (KIM, S. H *et al*, 1999). A compreensão do papel executado pelas porfirinas em processos fisiológicos e patológicos, assim como sua aplicação em Medicina e nanotecnologia necessitam do conhecimento das estratégias catalíticas utilizadas por estes compostos na clivagem de peróxidos (MUGNOL *et al*, 2008).

OBJETIVO

O objetivo é sintetizar e verificar se o acoplamento dextrana-hemina interfere nas atividades catalíticas da hemina nativa (peroxidase e catalase), além de avaliar a resposta celular ao efeito deletério de peróxido de hidrogênio na presença do complexo dextrana-hemina.

METODOLOGIA

Síntese do complexo dextrana-hemina: A hemina contém dois grupamentos carboxilas que podem ser ativados por carbodiimida (EDAC) (TAKAHASHI, K. 1986). A ativação dos grupos carboxílicos da hemina foi feita em meio aquoso (pH 5,0) na presença de um excesso molar (3 x) de EDAC, o pH da solução foi ajustado com HCl diluído, a reação foi mantida sob agitação a 37 °C por 1 hora e 30 minutos. A seguir foi adicionado a essa mistura a dextrana aminada 19%, em quantidade sub-estequiométrica a concentração de hemina e a reação foi mantida sob agitação, pH 5,0 a 37 °C por 3 horas. A separação do complexo dos demais reagentes da mistura de acoplamento foi realizada por diálise excessiva contra água deionizada, seguida por centrifugação.

Atividade de peroxidase: A reatividade do catalisador dextrana-hemina foi acompanhada em tempo real por espectrofotometria de absorção eletrônica em 200 a 800nm, seguindo a ordem de reação tampão fosfato de sódio 10 mM pH 13,0 complexo

dextrana-hemina (2,0 μM) e HOOH (0,25mM a 2,4mM) que foi adicionado aos 10 segundos de reação em cubeta com caminho óptico de 1 cm, com registro de 300 segundos.

Cultura de célula e viabilidade com azul de Trypan: A linhagem de células leucêmicas humanas K562, é derivada de um paciente de leucemia mielóide crônica. Para os experimentos, as células K562 (3×10^5 cél/mL) foram incubadas com as seguintes variáveis: HOOH 0,2 mM, dextrana-hemina 2 μM , dextrana-hemina na presença de HOOH nas concentrações de 2 μM e 20 μM , todos comparados ao controle (células sem nenhum tratamento), e mantidas a 37°C em atmosfera com 5% CO₂. Após o período de incubação o total de células viáveis e inviáveis foram contadas em câmara de Neubauer.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eficácia da reação de acoplamento da hemina a molécula de dextrana-aminada, foi comprovada por técnica de espectroscopia de absorção eletrônica UV-vis. Para auxiliar o acoplamento a molécula dextrana foi aminada previamente para que a reação ocorresse entre os grupamentos amina da dextrana e carboxilatos da hemina. O que parece ter de fato ocorrido, pelas diferenças espectrais na região correspondente à própria molécula de dextrana, já que não há grandes alterações espectrais na região das bandas Soret e transferência de carga, como demonstra a figura 1.

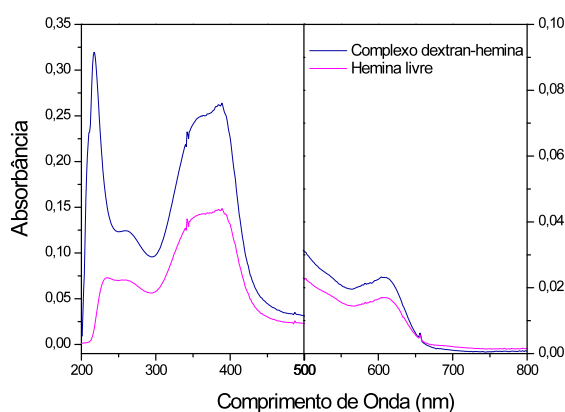


Figura 1: Espectros de absorção eletrônica de hemina nativa e complexo dextrana-hemina. As condições experimentais foram: complexo dextrana-hemina 3,4 μM , hemina livre 3 μM , dissolvidos em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 13,0, a cubeta com caminho óptico de 1cm.

A reatividade do complexo dextrana-hemina com H₂O₂ foi acompanhada através do *bleaching* da banda Soret do complexo dextrana-hemina, analisamos a relação velocidade de *bleaching* versus concentração de H₂O₂ (figura 2). A reação obedece uma cinética de primeira ordem, ou seja, a velocidade de reação é proporcional a concentração de H₂O₂.

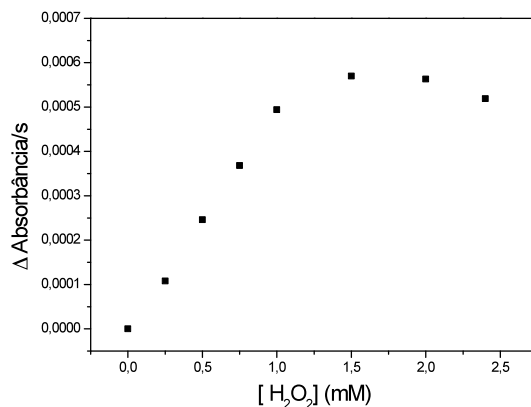


Figura 2: Velocidade de *bleaching* (Δ Abs/s) x $[H_2O_2]$. As condições experimentais foram: complexo dextrana-hemina 2 μ M, H_2O_2 (0,25 – 2,4 mM) adicionados aos 10 segundos de reação, tampão fosfato de sódio 10 mM pH 13, a cubeta com caminho óptico de 1cm.

Uma vez elucidado que a reação de acoplamento não interferiu na estrutura e atividade da hemina complexada, permanecendo a hemina com atividades catalíticas tipo peroxidase e catalase-like, avaliamos a resposta celular, de células leucêmicas ao efeito deletério do peróxido de hidrogênio na presença do complexo dextrana-hemina. O teste de viabilidade celular ilustrado na figura 3 demonstra que apenas o complexo dextrana-hemina quando incubado com células K562, não apresenta ação pró-oxidante. Quando a incubação das células ocorre na presença do complexo dextrana-hemina e HOOH, há um aumento da morte celular, em comparação as células incubadas apenas com HOOH. Os testes demonstram ainda que a variação da concentração do complexo influencia na resposta celular.

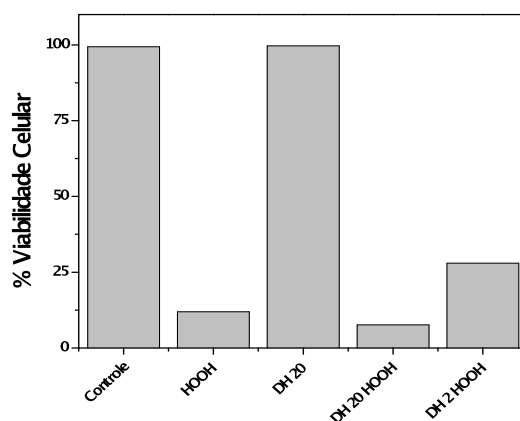


Figura 3: Teste de viabilidade celular por azul Tripan. As condições experimentais foram: dextrana-hemina 2 μ M e 20 μ M, H_2O_2 0,2 mM, período de 12 horas. A porcentagem de viabilidade das células induzida pelo complexo dextrana-hemina foi expressa em relação ao controle na ausência de H_2O_2 , sendo considerados 100% de viabilidade.

CONCLUSÃO

A ligação covalente do complexo dextrana-hemina, não causou mudanças significativas, no ferro hemínico, por não haver mudanças espectrais na região de absorbância da banda Soret, como demonstrado pela técnica de espectroscopia. O complexo

demonstrou ter atividades catalíticas (peroxidase e catalase) e foi capaz de exacerbar a capacidade de HOOH em induzir a morte celular de células leucêmicas K562.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, S.M.; COSTA, S.M.B. Spectroscopic Studies on the Interaction of a Water Soluble Porphyrin and Two Drug Carrier Proteins. **Biophysical Journal**, Lisboa, Portugal. v.82, p.1607–1619, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1301959/pdf/11867473.pdf>>. Acesso em: 08 de novembro, 2010.

KIM, S. H.; WON, C. Y.; CHU, C. C., *Carbohydrate Polymers*, v. 40, p.183-190, 1999.

MILGRON, L. R.; **The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds**, 1st ed., Oxford University Press: Oxford, 1997.

MUGNOL, K.C.R., PRIETO, T., *et al. Inorganic Biochemistry: Research Progress. . New York: Nova Science Publishers. ed ; 2008, v. 1, 44p.*

NAESSENS, M.; CERDOBBELL, A.; SOETAERT, W.; VANDAMME, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p.845–860, 2005.

TAKAHASHI, K., MATSUSHIMA, A., SAITO, Y, & INADA, Y. **Journal Biochem Biophys Research Commun.** v.138,p. 283-288, 1986.