

## CARACTERIZAÇÃO FOTOQUÍMICA DA VIOLACEÍNA

**Renata Mantoan<sup>1</sup>, Juliana M. Neuweiler<sup>2</sup>, Divinomar Severino<sup>3</sup>, Fernanda M. Prado<sup>4</sup>, Paolo Di Mascio<sup>5</sup>, Maurício S. Baptista<sup>6</sup>, Claudio S. Shida<sup>7</sup>, Nelson Durán<sup>8</sup> e Iseli L. Nantes<sup>9</sup>**

Estudante do curso de Medicina; [renatamantoan@uol.com.br](mailto:renatamantoan@uol.com.br)<sup>1</sup>

Estudante do Curso de Medicina; [jumafrinha@hotmail.com](mailto:jumafrinha@hotmail.com)<sup>2</sup>

Pós Doutorado no Instituto de química (IQ) da Universidade de São Paulo (USP); [divinomar@gmail.com](mailto:divinomar@gmail.com)<sup>3</sup>

Doutorada no IQ USP; [fmprado@iq.usp.br](mailto:fmprado@iq.usp.br)<sup>4</sup>,

Professor da USP; [paolodimascio@pq.cnpq.br](mailto:paolodimascio@pq.cnpq.br)<sup>5</sup>

Professor da USP; [baptista@iq.usp.br](mailto:baptista@iq.usp.br)<sup>6</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; [shida@umc.br](mailto:shida@umc.br)<sup>7</sup>

Professor da Universidade Estadual de Campinas, no Instituto de Química; [duan@pq.cnpq.br](mailto:duan@pq.cnpq.br)<sup>8</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; [ilnantes@umc.br](mailto:ilnantes@umc.br)<sup>9</sup>

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas, Biofísica, Radiologia e Fotobiologia

**Palavras-chaves:** Violaceína; Oxigênio Singlete; Lipossomos; Micelas; Terapia Fotodinâmica

### INTRODUÇÃO

A violaceína é um pigmento produzido pela bactéria gram-negativa *Chromobacterium violaceum* que exibe uma multiplicidade de efeitos biológicos inclusive potencial antitumoral, decorrente da capacidade de indução de apoptose. Em células da linhagem leucêmica HL60, a violaceína promove a ativação de receptores TNF, contribuindo para a morte celular programada. A atividade pró-apoptótica da violaceína também foi observada quando o corante foi associado a  $\beta$ -ciclodextrina. O potencial terapêutico da violaceína não se limita à ação antitumoral, pois apresenta também atividade de antibiótico, ação antichagásica, propriedades antiparasitárias contra *Leishmania amazonensis*, antiulcerogênicas e ainda uma fraca atividade antiviral. Porém, um potencial terapêutico da violaceína permanece para ser explorado: uso do corante em terapia fotodinâmica (PDT, do inglês: photodynamic therapy). A PDT se fundamenta na geração, com alto rendimento, de espécies pró-oxidantes (oxigênio singlete e radicais livres) por meio da transferência de energia do estado excitado triplete de um corante submetido à irradiação. Como a eficiência dessa terapia está condicionada ao acesso da luz aos tecidos é imprescindível que o corante apresente banda de absorção de luz acima de 500 nm, pois os maiores comprimentos de onda de luz são os que melhor penetram nos tecidos. Em relação a isso, a violaceína tem a capacidade de absorção de luz acima de 500 nm.

### OBJETIVOS

Nesse trabalho, temos por objetivo caracterizar as propriedades fotoquímicas da violaceína no estado monomérico e agregado bem como associada a membranas para estabelecer seu potencial para ser usado como corante sensibilizador em PDT.

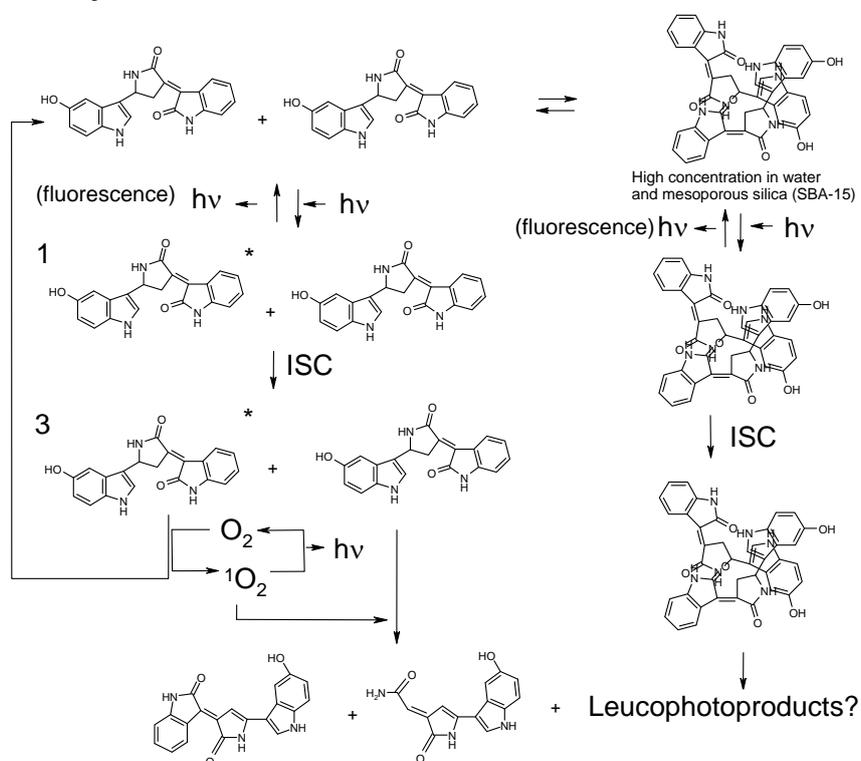
## METODOLOGIA

As condições experimentais foram: preparo de estoques da violaceína na concentração de 1,5 mM, em dimetil sulfoxido (DMSO), mantidos em temperatura ambiente. As medidas de absorvância foram feitas em um espectrofotômetro Shimadzu modelo Photodiode Array MultiSpec-1501 e os espectros de absorvância foram obtidos a partir de amostras de violaceína dos estoques feitos em DMSO (sempre utilizando até 2%), utilizando cubetas de quartzo de caminho óptico 1,0 cm e 0,1 cm. A irradiação foi feita sob refrigeração, para evitar efeitos térmicos, com uma lâmpada de halogênio de 500 Watts de potência. A distância entre a lâmpada e a cubeta contendo a amostra foi de 25 cm. As amostras foram irradiadas por 15 e 30 minutos e a leitura feita logo após a irradiação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A PDT depende da fotogeração de espécies pró-oxidantes nas células, isto é, de oxigênio singlete e radicais. Contudo, no caso do corante azul de metileno, já utilizado em PDT, suas propriedades fotoquímicas isto é, a predominância de geração de oxigênio singlete (mecanismo tipo II) ou radicais livres (mecanismo tipo I) é modulada pelo estado de agregação do corante. Em razão disso, iniciamos nossa investigação caracterizando a capacidade de agregação da violaceína em diferentes meios e como isso afeta seu comportamento fotoquímico. Em meio aquoso, verificamos que violaceína permanece monomérica em solução até a concentração de 0,4  $\mu\text{M}$ , pois a partir dessa concentração há desvio de linearidade no gráfico de intensidade de absorvância em 565 nm em função da concentração de violaceína analisada na faixa de concentração de 0,05 a 3,2  $\mu\text{M}$ . A propósito, um modelo preliminar do estado agregado foi obtido por meio da ferramenta de *docking* molecular. A presença de um dipolo na molécula de violaceína sugere que a agregação pode ocorrer pelo alinhamento dos dipolos elétricos (veja abaixo) de cada uma delas. Em meio aquoso verificamos que, de forma semelhante ao observado para o azul de metileno, a agregação do corante parece favorecer o mecanismo tipo I, visto que, a irradiação do corante nessa condição leva ao *bleaching* do mesmo, observado tanto nos espectros de absorvância quanto nos de fluorescência. Contudo, não se descarta a possibilidade de que o *bleaching* ou parte dele decorra da reação do oxigênio singlete com a violaceína, fato que permanece para ser elucidado por meio da caracterização dos fotoprodutos formados. Uma tentativa de obtenção dos espectros de massa dos fotoprodutos nessa condição, não revelou presença de fotoprodutos oxidados, mas apenas produtos de fragmentação. Contudo, a não detecção dos produtos oxidados pode ser devido à dificuldade de ionização dos mesmos e será necessária uma nova análise por meio de espectrometria infra-vermelho. Ao contrário, na condição monomérica, não foi observado *bleaching* do corante após irradiação. Foi feita uma tentativa de conseguir agregados de violaceína em micelas de detergentes, que são modelos de membranas, por meio da variação da razão corante/micela. Contudo, a baixa solubilidade da violaceína impediu que fosse atingida a razão corante/micela 2/1, porém interessantes resultados foram obtidos comparando o comportamento fotoquímico da violaceína em micelas e lipossomos aniônicos e catiônicos. Nas concentrações estudadas, a violaceína permaneceu monomérica quando associada a micelas e lipossomos aniônicos e catiônicos, respectivamente de Dodecil sulfato de sódio (SDS) e Dicetil fosfato (DCP) e Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB) e Brometo de dioctadecilmetil amônio (DODAB). O estado monomérico em todos esses meios foi atestado pela linearidade da intensidade de absorvância da violaceína em função da concentração estudada. Contudo, embora em estado monomérico, a violaceína apresentou significativo *bleaching* durante a irradiação nas

interfaces aniônicas de SDS e DCP e nenhuma alteração espectral em DODAB e CTAB. Considerando que não havia diferença de agregação, essa diferença de comportamento pode ser atribuída à topologia do corante nas diferentes interfaces. A otimização da estrutura da violaceína por meio do programa Arguslab revela que a violaceína apresenta uma estrutura praticamente planar e seu dipolo elétrico aponta na direção contrária aos oxigênios de sua estrutura. Extrapolando para os meios micelares e de lipossomos, a orientação do dipolo poderia fazer com que, nas interfaces catiônicas a violaceína ficasse mais à superfície da micela CTAB e do lipossomo de DODAB. De forma contrária, as interfaces aniônicas das micelas de SDS e de DCP devem induzir o enterramento do corante no meio hidrofóbico. Como o oxigênio molecular se particiona preferencialmente no meio hidrofóbico, o enterramento do corante faria com que o mesmo agisse como fonte de oxigênio singlete e ao mesmo tempo como alvo de reação com o mesmo levando ao seu *bleaching*. A propósito, observamos que o aumento da concentração de violaceína em presença de SDS, na faixa de concentração em que o corante permanece monomérico, leva a uma significativa diminuição na emissão monomol de oxigênio singlete monitorado por meio de detector de germânio. Considerando a impossibilidade de obter agregados de violaceína em micelas, promovemos a agregação do corante por meio de sua incorporação na sílica mesoporosa SBA-15. Nesse meio, nenhuma emissão monomol de oxigênio singlete foi detectada o que pode ser atribuído a reação do triplete de violaceína com seus pares no estado fundamental e/ou reação da violaceína no estado fundamental com oxigênio singlete gerado nesse meio. Nessa condição, a determinação da principal causa da abolição da emissão de oxigênio singlete somente será possível pela análise dos fotoprodutos obtidos, visto que a reação com oxigênio singlete deve resultar em produtos oxidados do corante enquanto que a reação cruzada entre as moléculas de corante deve resultar em outros tipos de fotoprodutos. O esquema 1 abaixo resume os eventos que se sucedem à irradiação da violaceína.



## CONCLUSÕES

A violaceína é um corante de alta hidrofobicidade que forma agregados em meio aquoso, provavelmente pela interação entre dipolos elétricos das moléculas. A violaceína em estado triplete é capaz de sensibilizar oxigênio molecular às espécies singletes excitadas. A agregação em meio aquoso favorece o mecanismo tipo I levando ao *bleaching* do corante durante a irradiação. Violaceína é capaz de particionar em micelas, lipossomos e membranas mitocondriais. Devido à orientação de dipolo elétrico, a violaceína exibe diferentes topologias em micelas e lipossomos aniônicos e catiônicos. As interfaces aniônicas favorecem a inserção do corante no centro hidrofóbico das micelas e bicamadas lipídicas. Essa topologia favorece a reação da violaceína com o oxigênio singlete levando ao *bleaching* do corante. Violaceína também particiona em membranas mitocondriais e é capaz de promover fotodano nas mesmas durante a geração de oxigênio singlete. Os presentes achados apontam para o potencial uso da violaceína em PDT.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

MELO, P.S.; JUSTO, G.Z.; DE AZEVEDO, M.B.; DURAN, N.; HAUN, M. Violacein and its  $\beta$ - cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells. *Toxicology*, 186, 217-225, 2003.

[KAWAI C., PRADO F.M., NUNES G.L., DI MASCIO P., CARMONA-RIBEIRO A.M., NANTES I.L.](#) pH-Dependent interaction of cytochrome c with mitochondrial mimetic membranes: the role of an array of positively charged amino acids. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Oct 14;280(41):34709-17. Epub 2005 Jul 11.

THOMPSON, M.A., ArgusLabb software, version 4.0.1, Planaria Software LLC, Seattle, WA, <http://www.arguslab.com>