

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

OXIDAÇÕES BIO- E FOTOSENSIBILIZADAS
POR OXIGÊNIO SINGLETE: CONSEQUÊNCIAS
EM SISTEMAS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

Nelson Eduardo Durán Caballero

Tese de Livre Docência

Campinas

1981

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

- ao Prof.Dr. Giuseppe Cilento pelas discussões estimulantes sobre estados excitados em sistemas biológicos, e por seu contínuo apoio e incentivo.
- à direção do Instituto de Química, durante a época em que este trabalho foi realizado, Drs. Giuseppe Cilento e Aécio Pereira Chagas, pelo apoio e pelas facilidades oferecidas.
- ao Prof. Dr. Joseph Miller pelo constante apoio e revisões de projetos e manuscritos.
- a todos os colegas de trabalho do Instituto de Química da UNICAMP e da USP, meus agradecimentos.
- aos meus estudantes, César, Yoshiko, Maricilda, Lúcia Helena, Lídia, Sandra, Regina, Cristina e Gastão, que direta ou indiretamente cooperaram com seu apoio e incentivo.
- à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), ao Projeto PNUD/UNESCO, pelos auxílios concedidos.

ÍNDICE

	página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUÇÃO	3
I.1. Oxigênio singlete em processos fotoquímicos.....	3
I.1.1. Mecanismos de fotooxidações	3
I.1.2. Propriedades de oxigênio singlete	5
I.1.3. Provas mecanísticas	11
I.1.4. Mecanismos de sensibilização por oxigênio sin- glete	14
A- Excitação sucessiva de tripletes	17
B- Sensibilização por moléculas duplas	18
C- Sensibilização por aniquilação triplete-triple te	18
D- Sensibilização por fluorescência retardada ...	18
E- Fluorescência induzida	18
I.1.5. Metodologia para estudos de supressão de oxigê nio singlete	18
A- Distinção de supressão de oxigênio singlete por outras maneiras de inibição	18
B- Técnicas de estado estacionário para determinar velocidades	21
C- Dependência de oxigênio	21
I.2. Oxigênio singlete em processos biológicos	23
I.2.1. Mieloperoxidase e leucócitos polimorfonuclea res	23
I.2.2. Xantina oxidase	27

	página
I.2.3. Oxidase lipídica microssomal	28
I.2.4. Prostaglandina oxigenase	32
I.2.5. Lipoxidase	35
I.2.6. Hemoproteínas	36
I.2.7. Sistemas biológicos complexos	38
I.3 Objetivos da Tese	41
II. PARTE EXPERIMENTAL	42
II.1. Reagentes	42
II.2. Atividades de enzimas	42
II.3. Aparelhos	45
II.4. Métodos	46
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
III.1. Prostaglandina sintetase	47
III.2. Hemoproteínas	53
III.2.1. Nitrosaminas	53
III.2.2. Ácido indol-3-acético	58
III.2.3. Malonaldeído	63
III.2.4. Ácido fólico	66
III.2.5. Ácido barbitúrico	71
III.3. Conclusões Gerais	74
IV. ESTUDOS DE EFEITOS DE OXIGÊNIO SINGLETE EM BIOMOLECULAS	77
IV.1. Proteínas	77
IV.1.1. Xantina oxidase	77
IV.1.2. Lisozima	77
IV.1.3. Ácido fólico oxidase	78
IV.2. Ácidos nucleicos	78
IV.2.1. Ácido desoxirribonucleico	78

IV.2.2. Ácido ribonucleico de transferência	79
V. REFERÊNCIAS	80

RESUMO

Emissão fotônica, espectro de emissão, distribuição de produtos, efeito de D_2O , efeito de DABCO, efeito de supressores e técnicas de cinética de estado estacionário parecem ser os experimentos mais razoáveis de serem incluídos no protocolo experimental para detectar a presença de oxigênio singlete em processos biológicos. Estes experimentos levaram à conclusão de que oxigênio singlete é formado na reação catalisada por peroxidase de malonaldeído, derivado importante em lipoperoxidação de ácidos graxos; ácido indol-3-acético, composto importante no crescimento de plantas e tumores; ácido fólico, cofator importante no crescimento celular; nitrosaminas, compostos altamente carcinogênicos e ácido barbitúrico, importante hipnótico; e também em prostaglandina sintetase atuando sobre ácido araquidônico. Todos estes sistemas podem agir sobre biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos, produzindo mudanças que poderiam explicar como, por exemplo, mutagênese espontânea.

ABSTRACT

Our experiments show that an effective procedure for verifying the presence of singlet oxygen in biological systems involves the use of the following techniques: photon emission , emission spectra, product distributuion, D₂O effect, DABCO effect, quencher effect and steady state techniques. Our experiments lead to the conclusion that singlet oxygen is present in the reaction of peroxidase with malonaldehyde, an important intermediate in lipoperoxidation of fatty acids; with indole-3-acetic acid, an important compound in plant growth; with folic acid, an important cofactor in cellular growth; with nitrosamines, extremely carcinogenic compounds, and with barbituric acid an important hypnotic. It is also present when prostaglandin synthetase acts on arachidonic acid. All of these systems can act on biomolecules, such as proteins and nucleic acids, producing changes that might explain, for instance, spontaneous mutagenesis.

I - INTRODUÇÃO

I.1 OXIGÊNIO SINGLETE EM PROCESSOS FOTOQUÍMICOS

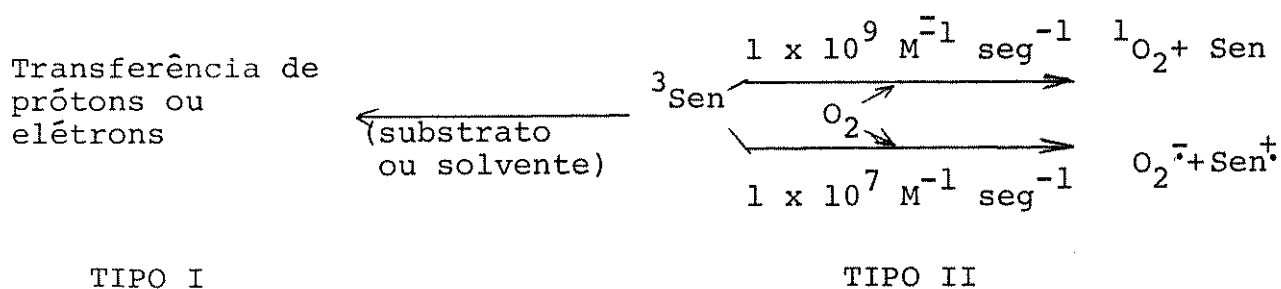
A absorção de luz em organismos vivos por fotossensibilizadores naturais, na presença de oxigênio, produz oxidação que leva a vários efeitos químicos e biológicos, os quais são, geralmente, prejudiciais. Fotossensibilizadores são moléculas que podem absorver luz para produzir uma reação química que, seguramente, não ocorreria na sua ausência; o fotossensibilizador pode, ou não, ser modificado quimicamente durante a sua ação. Nestas fotossensibilizações, tem-se demonstrado a existência de várias espécies de vida média curta muito reativas, sendo o oxigênio singlete molecular a espécie mais importante.

I.1.1 MECANISMOS DE FOTOOXIDAÇÕES

Os fotossensibilizadores (Sen) possuem dois tipos de estados eletrônicos excitados, os singletes (^1Sen), e os tripletes (^3Sen). O estado triplete é, normalmente, de vida média mais longa que o singlete, que é, contudo, o produto de absorção da luz. Existem raríssimos casos em que fotooxidações ocorrem por sensibilização de singletes (1). Os sensibilizadores mais efetivos são aqueles que têm estados tripletes de vida média longa e de alto rendimento quântico. Muitos corantes (azul de metileno, rosa bengala e eosina), pigmentos (clorofila, hematoporfirina, flavinas) e hidrocarbonetos aromáticos (rubreno, alguns antracenos) são sensibilizadores eficazes. A maioria destes compostos absorvem luz visível ou uv-próximo, assim estes comprimentos de onda

são normalmente eficientes para oxidações fotossensibilizadas.

Existem dois tipos de reações para sensibilizadores tripletes: No primeiro, o sensibilizador interage diretamente com outra molécula para produzir átomos de hidrogênio ou transferência de elétrons. O radical resultante reage logo com oxigênio ou outra molécula. Esta reação tem sido classificada como "Tipo I." por Schenck (2) e Gollnick (3). Na segunda classe de reações, chamadas "Tipo II", o sensibilizador triplete interage com oxigênio. A interação mais comum do Tipo II envolve transferência da excitação do sensibilizador ao oxigênio, produzindo estado eletrônico excitado singlete de oxigênio que pode reagir imediatamente com vários aceptores em solução (1). Esta reação é muito rápida, e pode explicar todas as supressões de espécies tripletes por oxigênio. Transferências de elétrons do sensibilizador para o oxigênio podem ocorrer menos eficientemente, levando à formação de íon superóxido radical ($O_2^{\cdot-}$) e uma forma oxidada do sensibilizador. Transferência de elétrons ocorre numa proporção de 1/100, por desativação colisional de oxigênio com a maioria dos sensibilizadores tripletes. Estas reações podem ser resumidas da seguinte maneira:



Oxigênio singlete foi detectado cineticamente, e acreditava-se que era um complexo corante- O_2 ; entretanto, as evidências levaram a uma aceitação geral, de que o intermediário era

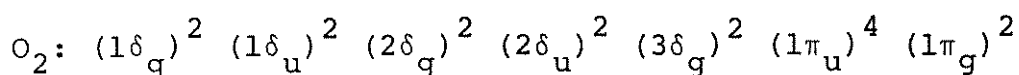
realmente oxigênio singlete molecular. Existem dois estados singletes de oxigênio diferentes. O mais alto, $^1\Sigma_g^+$, tem energia de 37 Kcal/mol e vida média em solução de aproximadamente 10^{-11} seg; o menos energético, $^1\Delta_g$ (22 Kcal/mol), é de vida média longa (10^{-6} seg), e acredita-se agora, que é a única espécie de oxigênio singlete que dá reações em solução, pois o elétron quando atinge o nível mais alto $^1\Sigma_g^+$, parece voltar ao nível $^1\Delta_g$, antes da espécie $^1\Sigma_g^+$ reagir. Assim, o termo oxigênio singlete estará subsequentemente referindo-se ao estado $^1\Delta_g$.

Durante vários anos, oxigênio singlete foi detectado por sua emissão em descarga de microondas (4) e na reação de cloro ou hipocloreto com peróxido de hidrogênio (5). Também foi encontrado que oxigênio singlete, gerado por qualquer destes métodos, reagia em solução da mesma maneira que nas reações fotossensibilizadas, com mesmos produtos, velocidade e cinética de reações (1).

Foi mencionado anteriormente, que alguns corantes podem transferir um elétron ao oxigênio, dando não só oxigênio singlete, mas também moléculas oxidadas do corante e íon superóxido. Por exemplo, eosina reduz uma pequena quantidade de oxigênio a íon O_2^- , formando oxigênio singlete com o restante. As mesmas complicações foram encontradas no caso de rosa bengala (6) e azul de metileno (7).

I.1.2 PROPRIEDADES DE OXIGÊNIO SINGLETE

A configuração eletrônica da molécula de oxigênio no estado fundamental é conhecida como:



Este estado expressa-se espectroscopicamente como ${}^3\Sigma_g^-$ (ou ${}^3\Sigma_g^+$) no qual o orbital mais alto ocupado é um par de orbitais não ligantes duplamente degenerados tendo dois elétrons com spins paralelos. Os parâmetros estruturais mais importantes do estado fundamental da molécula de oxigênio, $X^3\Sigma_g^-$, são os seguintes:

distância de equilíbrio internuclear	: 1,2074 Å
frequência vibracional fundamental	: 1580 cm ⁻¹
energia de dissociação	: 28,183 KJ mol ⁻¹
potencial de ionização	: 12,075 eV.
afinidade eletrônica	: 0,43 eV
dimensão molecular	: 3,18 Å (eixo curto) 4,18 Å (eixo longo)
momento dipolar	: 0
momento quadrupolar	: -0,39 x 10 ⁻²⁶ esu cm ²

Os estados eletronicamente excitados conhecidos da molécula de oxigênio são $a^1\Delta_g$, $b^1\Sigma_g^+$, $c^1\Sigma_u^-$, $c^3\Delta_u$, $A^3\Sigma_u^+$, $B^3\Sigma_u^-$ em ordem crescente de energia utilizando as expressões espectroscópicas. Os parâmetros espectroscópicos e estruturais para a molécula excitada de oxigênio tem sido resumidas por Herzberg (8). As curvas de potencial para cada estado eletrônico e sua configuração eletrônica são mostrados na Fig. 1 (9-11).

Os oxigênios singletes envolvidos nas reações fotosensibilizadas com luz ultravioleta ou visível estão no estado ${}^1\Delta_g$ e/ou ${}^1\Sigma_g^+$. As distâncias de equilíbrio interatômicas r_e , 1,2155 Å para ${}^1\Delta_g$ e 1,2268 Å para ${}^1\Sigma_g^+$ são praticamente as mes -

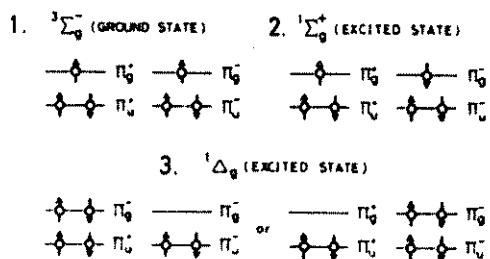
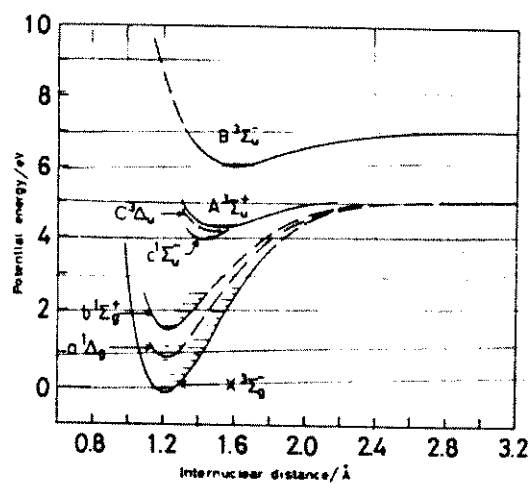
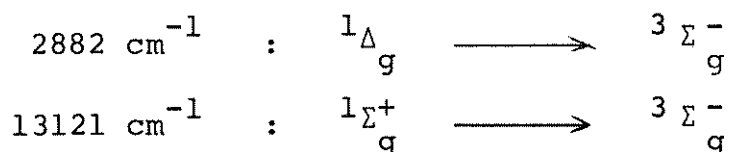


FIG. 1 CURVA DE POTENCIAL DO ESTADO FUNDAMENTAL E DOS ESTADOS EXCITADOS DO OXIGÊNIO E SEUS DIAGRAMAS ESQUEMÁTICOS DAS CONFIGURAÇÕES ELETRÔNICAS.

mas que para a molécula no estado fundamental. Outros estados eletrônicos mais altos têm potenciais menores e maiores r_e que o estado fundamental, p.e. 1,517 Å para $^1\Sigma_u$, 1,534 Å para $^3\Sigma_g^+$ e 1,614 Å para $^3\Sigma_u^-$.

Na fase gasosa a transição O-O do oxigênio molecular é observada a:



Os coeficientes de absorção integrados para essas transições dão uma vida média radiativa de 45 min por $^1\Delta_g$ (12,13) e 7 - 12 seg para $^1\Sigma_g^+$ (14,15). Entretanto, as vidas médias observadas são normalmente mais curtas devido a supressão por colisão com oxigênio molecular no estado fundamental.

Para detectar oxigênio singlete na fase gasosa, os seguintes métodos são principalmente usados:

a) Espectroscopia de emissão e absorção utilizando as bandas características de $^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g^+$;

b) Análise de fotoionização, os potenciais de ionização para os estados $^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g^+$ são de 1.0 eV e 1.6 eV;

c) Métodos de ressonância de spin eletrônico usando o paramagnetismo de $^1\Delta_g$ ($\Delta M = 1$, $J = 2$);

d) Métodos químicos.

A sensibilidade e limitações destes métodos têm sido discutidas por Kearns (16), Wayne (17) e Foote (18,19).

Entretanto, em meio condensado, a detecção de oxigênio singlete está restrita quase inteiramente a métodos químicos ou cinéticos, devido à rápida supressão pelo solvente. O requeri-

mento para usar os métodos químicos é que o acceptor reaja rapidamente e especificamente com oxigênio singlete sem ter complicações de reações secundárias. Estes tópicos tem sido muito bem analisados por Foote (20). Dois tipos de reações fundamentais para propósitos práticos são:

a) as reações com olefinas tais como tetrametiletileno que produz hidroperóxidos alílicos.

b) cicloadições 1,4 de oxigênio a dienos conjugados, tais como 2,5-dimetilfurano, e 1,3-difenilisobenzofurano para produzir endoperóxidos.

Acreditava-se que a vida média de oxigênio singlete era independente do solvente. Isto foi baseado nos resultados de que a razão (β) da velocidade de decaimento de oxigênio singlete e a sua velocidade de reação com aceptores como 2-metil-2-penteno (21), citronelol (22), etc. não era fortemente dependente do solvente.

Pelo contrário, um forte efeito de solvente foi observado nas primeiras pesquisas (23,24) e, mais tarde, um valor de β anômalo foi obtido para vários substratos em dissulfeto de carbono quando comparado com os em benzeno e metanol (25). Esse valor, mais baixo que os outros, foi atribuído ao fato de que a vida média de oxigênio singlete nesse solvente era mais longa. Em seguida, medidas usando técnicas de laser mostraram que o oxigênio singlete muda com os solventes (26,27).

A observação direta do decaimento de oxigênio singlete em fase condensada é difícil devido ao fato de não só ter rápida supressão pelo solvente, mas também ao de não ter boas bandas de absorção para sua detecção espectroscópica. Entretanto, o decaimento é investigado por análise de velocidade de mudança química

ca do acceptor com oxigênio singlete. Quando um acceptor (A) é adicionado ao sistema, o rendimento quântico de desaparecimento de A (ϕ_{-A}) para a reação com oxigênio singlete é expresso na Eq. 1, onde os processos de desativação do sensibilizador tripleto por seu estado fundamental é omitido por simplicidade. Do gráfico de $1/\phi_{-A}$ vs $1/(A)$, ϕ_{1O_2} e β são obtidos. Se a velocidade de consumo de A ou

$$\phi_{-A} = \phi_{1O_2} \frac{k_A (A)}{k'_d + k_A (A)} = \phi_{1O_2} \frac{(A)}{\beta + (A)} \quad (\text{Eq.1})$$

a de produção de AO_2 forem usadas em vez de ϕ_{-A} , só β é obtido por um gráfico duplo recíproco similar. β que é igual a $(\tau \Delta k_A)^{-1}$ é usado como índice de reatividade do acceptor. Entretanto, $\tau \Delta$ ou k_A não podem ser medidos a menos que sejam determinados independentemente por outras experiências.

A constante de velocidade k'_d na Eq. 1 pode ser estimada de um experimento de supressão. Quando é adicionado um supressor eficiente ocorre a reação da Eq. 2.



e a Eq. 1 é substituída pela Eq. 3.

$$\frac{1}{\phi_{-A}} = \frac{1}{\phi_{1O_2}} \left(1 + \left[\frac{k_q (Q)}{k_A} + \frac{k'_d}{k_A} \right] \right) \frac{1}{(A)} \quad (\text{Eq.3})$$

Logo, o gráfico $1/\phi_{-A}$ vs $1/(A)$ a certas concentrações de Q dá linhas retas. Da relação linear entre a inclinação da linha e concentração de Q, k'_d pode ser obtido supondo que k_q seja igual

a k_{diff} para um supressor efetivo. Na prática, k_q é estimado como $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ para β -caroteno em benzeno e $3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ para polimeteno perilidium em acetonitrila (27,28). Estes valores estão perto da constante controlada por difusão. Tem sido atualmente confirmado que β -caroteno é um dos bons supressores para estes propósitos. A fotooxidação de 2-metil-2-penteno (0.1 M) é 95% inibida por 10^{-4} M de β -caroteno (28-30). Um mecanismo razoável para esta supressão pode ser uma eficiente transferência de energia do oxigênio singlete para β -caroteno, que sofre isomerização cis-trans, já que o nível triplete deste último é mais baixo que o de $^1\Delta_g \text{O}_2$.

I.1.3 PROVAS MECANÍSTICAS

Existem vários métodos, atualmente, para distinguir o mecanismo Tipo I e Tipo II. Os métodos cinéticos simples podem levar a interpretações erradas já que o Tipo I bem como o Tipo II podem dar gráficos de Stern-Volmer (um gráfico Stern-Volmer (31) é uma cinética de gráfico recíproco em forma similar ao gráfico de Michaelis-Menten |Lineweaver-Burke| e indica que só um intermediário reativo está presente e pode decair unimolecularmente ou reagir com outra espécie). Logo, comparações de velocidades quantitativas de vários sistemas podem permitir comparações úteis.

Comparações de produtos e/ou cinéticas de sistemas químicos geradores de oxigênio singlete e os dos sistemas fotossensibilizados podem ser úteis, se se acredita que o oxigênio singlete é o intermediário envolvido no último. Na realidade tais estudos foram primeiramente usados para demonstrar a participação de oxigênio singlete em fotooxidações (32,33). Tanto os pro-

duto, como a cinética devem ser independentes do corante sensibilizador se o oxigênio singlete é o intermediário. Infelizmente, muito dos substratos biológicos de interesse são facilmente oxidados, logo reações diretas com os reagentes para gerar oxigênio singlete podem dar problemas; por exemplo, NaOCl , H_2O_2 , a trifenilfosfita ozonídeo são oxidantes fortes. Trifenil fosfita ozonídeo reage diretamente com olefinas (34). Geração de oxigênio singlete por microonda tem sido usada, mas o ozono e átomos de oxigênio da fonte devem ser cuidadosamente eliminados, além disso, é difícil obterem-se bons rendimentos de oxigênio singlete em solução desta maneira (35-37). Entretanto, estas técnicas têm sido utilizadas, por exemplo com fenol (38,39), tocoferol (40) e bases de ácidos nucleicos (41), para indicar que estas reações ocorrem com oxigênio singlete. A reação com oxigênio singlete, de qualquer maneira não é por si só uma prova de oxigênio singlete como intermediário em fotooxigenação. Um problema adicional é que os produtos de reação com oxigênio singlete e autooxidação podem ser idênticos, como no caso do fenol. Estudos de produtos devem ser acompanhados de análise cinética em todos os casos.

Uma das técnicas mais importantes na demonstração da participação de oxigênio singlete é a inibição competitiva com aceptores específicos conhecidos que não são bons substratos para reações de Tipo I (32,33). Olefinas tais como tetrametiletileno e supressores como β -caroteno ou 1,4-diazabicyclo(2.2.2)octano (DABCO) podem ser utilizados para estas experiências (18). Sendo feitas na forma adequada tais cinéticas de competição são provas fortes da participação de oxigênio singlete. O substrato deve ser escolhido cuidadosamente. Deve ser reativo o suficiente para sequestrar uma grande fração de oxigênio singlete nas concentrações utilizadas, e deveria ter uma química simples e conhecida. Infe -

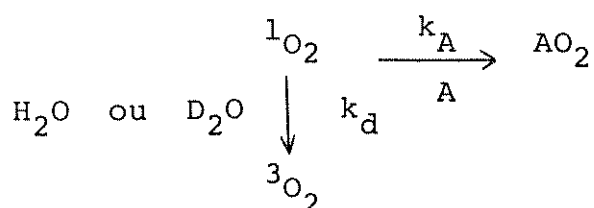
lizmente poucos substratos são conhecidos com estas características e que sejam solúveis em água. Dimetilfurano e DABCO são dois utilizados e 9,10-difenilantraceno -2,3-dicarboxilato é outro (42,44).

Outra técnica efetiva para determinar se a reação é Tipo I ou Tipo II é determinar se o substrato e oxigênio competem ou não. Em reações nas quais o mecanismo Tipo I é mais lento que o Tipo II, não tem dependência de pressão de oxigênio mesmo em baixas concentrações, por que todo o sensibilizador triplete é sequestrado numa concentração de oxigênio de $10^{-6}M$ (36,45).

A reação de Tipo I tem muita dependência de pressão de oxigênio; este inclusive pode chegar a inibir a reação embora não seja o único comportamento possível. Um outro que tem sido observado é que a velocidade de reação passa por um máximo com aumento da pressão de oxigênio, e logo cai para um valor limite mais baixo (46). Este comportamento provavelmente indica uma troca de mecanismos indo do Tipo I ao Tipo II a pressões altas. Estudos devem ser feitos com pressão de oxigênio suficiente para estabelecer os limites de comportamento. Um exemplo da reação que muda de Tipo I para Tipo II com a concentração de substrato é o decréscimo da fotooxidação de aliltiouréia (47). Idealmente, os produtos poderiam ser determinados sob ambas séries de condições.

Kearns tem desenvolvido uma técnica para demonstrar a participação de oxigênio singlete em fotooxidação baseado no fato de que a vida média de oxigênio singlete em D_2O é mais longa que em água; assim, a velocidade de reação pode ser maior em D_2O que em H_2O (48). Entretanto, antes de usar este método com confiança deve-se verificar que não há mudanças na eficiência da reação Tipo I em D_2O comparada à água. Deve-se saber também, que esta técnica

ca só dará resultados positivos se a reação de oxigênio singlete está na faixa de primeira ordem, isto é, onde $k_A(A) \ll k_d$; se o reverso for verdadeiro, não haverá mudanças na eficiência na reação de oxigênio singlete em D_2O e em H_2O (49)



$$\phi_{AO_2} = K \left(\frac{k_A(A)}{k_A(A) + k_d} \right)$$

$$k_d^{H_2O} > k_d^{D_2O}$$

I.1.4 MECANISMOS DE SENSIBILIZAÇÃO POR OXIGÊNIO SINGLETE

O diagrama de níveis de energia experimental para as transições envolvendo os três estados eletrônicos mais baixos do oxigênio molecular (Fig. 2) estão, agora, muito bem estabelecidos por pesquisas experimentais e teóricas. As transições de moléculas isoladas de oxigênio (Fig. 1) ${}^1\Delta_g \leftarrow {}^3\Sigma_g^-$ e ${}^1\Sigma_g^+ \leftarrow {}^3\Sigma_g^-$ permitem uma estimação de vida média, por medidas de absorção integrada, de 45 min para o estado ${}^1\Delta_g$ e 7.1 seg para o estado ${}^1\Sigma_g^+$ a pressão zero. Fig. 2 indica colisão intermolecular de pares de oxigênio, por exemplo, $({}^1\Delta_g) ({}^3\Sigma_g^-)$. A vida média em solução para a molécula de oxigênio singlete é drasticamente reduzida, com uma estimativa de 10^{-3} seg para ${}^1\Delta_g$ e 10^{-9} seg para ${}^1\Sigma_g^+$ em água (50).

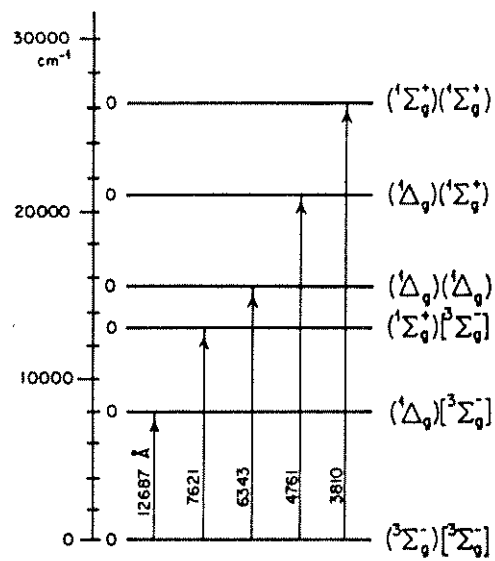


FIG. 2 ESTADOS DAS MOLÉCULAS DE OXIGÊNIO
E SUAS TRANSIÇÕES SIMULTÂNEAS MO-
LECULARES DE ESTADOS PAREADOS

A vida média do estado $^1\Delta_g$ de oxigênio tem sido medida (27,51) e está na faixa de $10^{-6} - 10^{-3}$ seg, com um grande efeito de solvente (49).

A diretriz do comportamento espectroscópico e fotoquímico é estabelecida pela compreensão de transições simultâneas que são possíveis para colisões de pares de moléculas de oxigênio. A idéia originou-se com Ellis e Kneser (52), que tentaram explicar a cor azul e o espectro de absorção de oxigênio líquido com bases na absorção de pares de moléculas. Estes estavam influenciados com a idéia de Lewis no conceito de dímeros de oxigênio $(O_2)_2$ para explicar o comportamento paramagnético do oxigênio líquido diluído em nitrogênio líquido. Todas as pesquisas subsequentes têm indicado definitivamente que a molécula de oxigênio não existe como dímero a temperaturas normais e que as perturbações intermoleculares, necessárias para explicar o aumento das colisões de transições de moléculas simples e as transições simultâneas são menores que kT . O termo "dimol" que é comumente aplicado a moléculas simples de oxigênio em pares é assim melhor utilizado só em termos operacionais (53). Moléculas de oxigênio em sua forma dimérica só são encontradas em oxigênio sólido e a temperaturas muito baixas.

Observações de quimiluminescência na reação de hipoclorito/peróxido foram tratadas como transições simultâneas em pares de moléculas por uma série de investigadores (54-57), mas foi Ogryzlo e seus colaboradores (58,59) que descreveram o espectro de quimiluminescência desta reação e sua relação com o espectro de oxigênio gerado pela descarga elétrica. Subsequentemente, Khan e Kasha (57) deram uma correlação completa de absorção e emissão correspondentes aos estados das transições simultâneas que foi mostrado na Fig. 2 para pares moleculares.

As transições simultâneas podem ser definidas como a transição de um par de espécies atômicas moleculares para um estado excitado composto (uma absorção cooperativa de um -fóton- das moléculas). A energia do novo estado obtida por uma superposição de duas energias de estados excitados não ressonante das espécies correspondentes. Este processo de conversão simultânea pode ter lugar com a emissão de um fóton. O fenômeno de transições simultâneas é muito observado em espectroscopia infravermelha e especialmente em espectroscopia eletrônica de transições proibidas. Este último torna as transições simultâneas fáceis de serem observadas por efeitos aumentados. No caso de oxigênio singlete é possível perceber um estado de par de moléculas ($^1\Delta_g$ $^1\Delta_g$) como dando uma única multiplicidade do singlete, S, onde o par no estado fundamental ($^3\Sigma_g^-$ $^3\Sigma_g^-$) pode dar a multiplicidade de S + T + Q, permitindo que ocorra a multiplicidade de singlete $\longrightarrow$ singlete.

Não é necessário que exista um complexo para que haja transições simultâneas de um par de espécies absorvendo ou emitindo, mas as duas moléculas devem estar em contato para intercâmbio de elétrons.

Na fase condensada, como por exemplo em oxigênio líquido, existem suficientes colisões de pares para que se possa obter uma pequena absorção. Na fase gasosa, precisa-se de um passo ótico de 10cm e pressão de 100atm. para poder observar a absorção de uma transição simultânea. A emissão de pares de oxigênio singlete é possível ser detectada a 1 atm inclusive. Os mecanismos possíveis de sensibilização segundo Kasha e Brabham (53) são:

A. Excitação sucessiva de tripletes (60,61): Foi aplicado pa

ra rubreno e violantrona e os critérios energéticos são $\Delta E_{S_1} < 2(\Delta E_{1\Delta_g})$ e $\Delta E_{T_1} < \Delta E_{1\Delta_g}$.

B. Sensibilização por moléculas duplas (62): Pode ser aplicado a rubreno e violantrona. Os critérios energéticos são

$$\Delta S_1 < 2(\Delta E_{1\Delta_g}).$$

C. Sensibilização por aniquilação Triplete-triplete (53): não se conhece casos na literatura que possam ser explicados por este mecanismo. Os critérios energéticos são $\Delta E_{T_1} < 2(\Delta E_{1\Delta_g})$, $\Delta E_{S_1} \gg 2(\Delta E_{1\Delta_g})$.

D. Sensibilização por fluorescência retardada (53): Acredita-se que os corantes xantênicos possam ser explicados por este mecanismo. Os critérios energéticos são $\Delta E_{T_1} < 2(\Delta E_{1\Delta_g})$, $(\Delta E_{S_1} - \Delta E_{T_1}) \approx kT$.

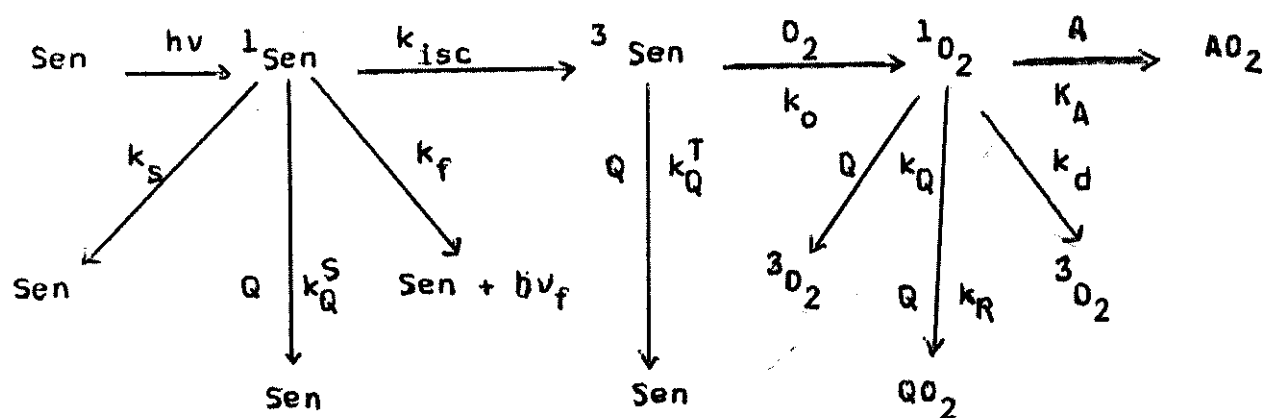
E. Fluorescência induzida (63): Foi aplicado para sensibilização de oxigênio singlete por azul de metileno. Os critérios energéticos são $\Delta E_{T_1} < \Delta E_{1\Sigma_g^+}$.

I.1.5 METODOLOGIA PARA ESTUDOS DE SUPRESSÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE

A. Distinção de supressão de oxigênio singlete por outras maneiras de inibição

A cinética de fotooxidação tem sido estudada ultimamente com grandes detalhes. O seguinte esquema geral explica a fotooxidação de um substrato (A) que reaja exclusivamente com oxigênio singlete (constante de velocidade K_A) na presença de um supressor (Q). O supressor pode inibir a reação de A por supressão do sensibilizador no estado singlete (Sens) ou triplete ($^3\text{Sens}$)

(constante de velocidade k_Q^S ou k_Q^T , respectivamente) ou por supressão ou reação com oxigênio singleto (k_Q ou k_R). O mecanismo trivial, que é uma competição do supressor pela luz por absorção, pode ser facilmente eliminado pelas escolhas de um sensibilizador e do comprimento de onda de excitação. No Esquema I, os termos conhecidos são, o decaimento fluorescente (k_f), decaimento não radiativo (k_s) e cruzamento intersistemas (k_{isc}), todos do estado singleto do sensibilizador e também transferência de energia de $^3\text{Sens}$ a O_2 (k_o)_m e decaimento de $^1\text{O}_2$ (k_d) (1,3,30,64).



ESQUEMA I

A equação cinética do estado estacionário para a eficiência quântica de formação de produto AO_2 (ϕ_{AO_2}) é dada por (Eq. 4)

$$\phi_{AO_2} = \left(\frac{k_{isc}}{k_s + k_f + k_{isc} + k_Q^s [Q]} \right) \left(\frac{k_o [O_2]}{k_o [O_2] + k_Q^T [Q]} \right) \left(\frac{k_A [A]}{k_A [A] + (k_R + k_Q) [Q] + k_d} \right) \quad (\text{Eq. 4})$$

Nesta expressão, os termos A, B, e C refletem a partição do sensibilizador singlete e triplete e de oxigênio singlete relacionado com o produto AO_2 . Aparentemente, esta expressão é complexa, mas cada termo pode ser estudado separadamente.

Supressão de sensibilizador singlete (termo A) normalmente é eliminado devido a sua vida média curta e, ainda, para atuar como supressor necessita altas concentrações do sensibilizador. Estes processos têm sido recentemente estudados por Davidson e Trethewey (65,66) os quais postularam que os estados singletes da rosa bengala e do azul de metileno podem ser suprimidos por aminas e β -carotenos se forem utilizadas concentrações suficientemente altas. Por exemplo, o estado singlete da rosa bengala é 50% suprimido a concentrações de 0.2M de DABCO ou 0.02M de β -carotenos. Entretanto, estas concentrações são muitas vezes maiores que as concentrações necessárias para suprimir 50% do oxigênio singlete. Logo, supressão de corantes singletes é muito ineficiente para ser considerada para a maioria dos supressores (19).

Sob condições normais o termo A da equação anterior é igual à eficiência quântica de cruzamento intersistemas (ϕ_{isc}) do sensibilizador. Se não tem supressão de tripletes o termo B vale 1, logo a equação agora é Eq. 5.

$$\phi_{AO_2}^{-1} = \phi_{isc}^{-1} \left\{ 1 + \frac{k_d + (k_R + k_Q) [Q]}{k_A} [A]^{-1} \right\} \quad (\text{Eq. 5})$$

Esta equação é a frequentemente utilizada, porque para os supressores suprimirem os estados tripletes dos sensibilizadores, eles devem estar em altas concentrações já que necessitam competir com oxigênio, cujo k_o é da ordem de $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (48).

B. Técnicas de estado estacionário para determinar velocidades:

Coeficientes Lineares

Gráficos de $[AO]^{-1}$ (quantidade de produto formado em um dado tempo) vs $[A]^{-1}$, em condições onde $[A]$ não muda apreciavelmente, obtém-se linhas retas. Quando não existe supressão do triplete, tais gráficos a vários $[Q]$ têm coeficientes lineares idênticos constantes. Logo, constância nos coeficientes lineares, em gráficos de $[AO_2]^{-1}$ a diferentes $[Q]$ é diagnóstico para supressão de oxigênio singlete (sempre que A só reaja com oxigênio singlete, implica que A e Q competem por um intermediário comum). A variação do coeficiente linear nestes gráficos é diagnóstico de supressão de estados excitados dos sensibilizadores e implica que A e Q não competem por um intermediário comum.

C. Dependência de Oxigênio

Como temos mostrado anteriormente, a supressão do sensibilizador triplete é competitiva com sua reação com oxigênio, logo tem uma dependência da pressão de oxigênio e é maior a baixas pressões de oxigênio. Oxigênio singlete não mostra esta dependência, já que a supressão de sensibilizadores tripletes pelo oxigênio é completa excepto a concentrações extremamente baixas.

Através desta introdução pode-se concluir que existe uma metodologia bastante planejada. Contudo, para estudos feitos em sistemas biológicos temos uma série de desvantagens e limitações (p. ex. solubilidade, altas concentrações dos supressores inibem os sistemas biológicos, etc.) que no caso da fotoquímica orgânica tem sido amplamente solucionados. Logo, farei uma apresentação dos métodos biológicos de gerar e detectar oxigênio singlete e mostrar grandes dificuldades que devem ser ultrapassadas bem como a necessidade de se desenvolver uma nova metodologia para estes sistemas.

I.2- OXIGÊNIO SINGLETE EM PROCESSOS BIOLÓGICOS

Foi constatada, em reações químicas e fotossensibilizadas, a geração de uma espécie eletronicamente excitada de oxigênio (1O_2), de meia vida longa, o estado $^1\Delta_g$, e a esta espécie atribuiu-se a responsabilidade pela ação fotodinâmica, como foi asinalada anteriormente. Esta descoberta tem atraído a atenção dos bioquímicos e, esta espécie de meia vida longa vem sendo considerada o agente causador de muitos efeitos oxidativos na natureza. A finalidade desta parte é revisar as evidências disponíveis que apoiam o envolvimento do $^1\Delta_g O_2$ em sistemas biológicos.

Excelentes revisões com respeito ao assunto foram publicadas por Foote (18,19) e Krinsky (67).

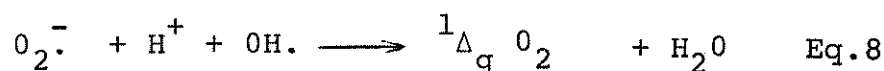
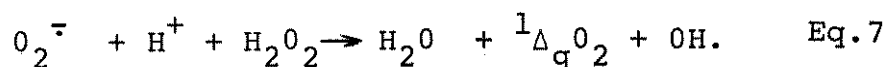
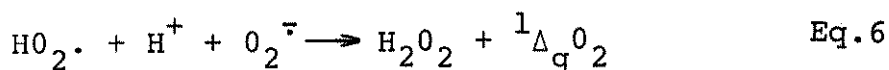
Um aspecto importante a se considerar, é quais métodos permitem a identificação do $^1\Delta_g O_2$ em sistemas biológicos; as revisões feitas por Krinsky (67) e Foote (19) fornecem excelentes críticas quanto aos métodos químicos existentes.

Na presente revisão, serão considerados somente alguns métodos especiais de aplicação a sistemas biológicos, em particular, sistemas enzimáticos, nos quais há possibilidade de geração de $^1\Delta_g O_2$.

I.2.1.- MIELOPEROXIDASE E LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES

Os processos pelos quais os microorganismos invasores são reconhecidos e ingeridos pelas células fagocíticas, foi descrito em diversas revisões recentes (68,69).

O esquema geral, aceito para a ação microbicida, é o seguinte :



A reação da Eq. 6 corresponde à geração de H_2O_2 e ${}^1\Delta_g\text{O}_2$ como produtos do desproporcionamento de $\text{O}_2^{\cdot-}$ catalisado por ácido (70). A reação da Eq. 7 corresponde ao mecanismo de Haber-Weiss que envolve o reagente e o produto da reação anterior, podendo portanto, produzir $\text{OH}\cdot$ e ${}^1\Delta_g\text{O}_2$ (71). Embora a velocidade desta reação em sistemas químicos bem definidos seja lenta, ela pode ser alterada pela presença de catalisadores metálicos e pela acidez do fagolisosoma (68). Diversos pesquisadores apresentaram evidências contrárias a este mecanismo (72). A reação da Eq. 8, um aniquilamento radicalar entre $\text{O}_2^{\cdot-}$ e $\text{OH}\cdot$ (73), é também objeto de consideração uma vez que ocorre a uma velocidade controlada por difusão (74). Recentemente, Foote e Col. (75) mostraram através de distribuição de produtos e estudos de supressão que, 0,2% de ${}^1\Delta_g\text{O}_2$ era formado na dismutação de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Outro processo interessante registrado por Smith e Kulig (76) é a formação de ${}^1\Delta_g\text{O}_2$ a partir do desproporcionamento de H_2O_2 catalisado por base.

Schultz e Kaminker (77) mostraram que 5% do peso seco de leucócitos polimorfonucleares é constituído por mieloperoxidase, uma das principais enzimas localizadas nos grânulos primários. Esta enzima tem ação microbicida em presença de H_2O_2 e um cofator haleto (78), associada à quimiluminescência dependente do pH e do haleto (79).

Os produtos da oxidação mediada por mieloperoxidase, embora compatíveis com o mecanismo de reação de $^1\Delta_g O_2$, não se constituem por si sô, evidências inequívocas para tal mecanismo (18).

Com o intuito de aumentar a sensibilidade do ensaio quimiluminescente, Allen e Loose (80) adicionaram luminol a leucócitos polimorfonucleares humanos e de coelhos. Sabe-se que o luminol reage com um grande número de agentes oxidantes formando um ânion aminoftalato eletronicamente excitado o qual, por sua vez emite um fóton sob relaxação para o estado fundamental.

Para identificar as espécies responsáveis pela oxidação do luminol introduziram benzoato, um supressor efetivo de $OH^\cdot$ (81) ou superóxido dismutase (SOD), que catalisa o desproporcionamento de $O_2^{\cdot -}$ para O_2 e H_2O_2 . No caso de leucócitos polimorfonucleares de coelho, tanto SOD quanto benzoato diminuíram a quimiluminescência, enquanto que em leucócitos polimorfonucleares humanos, benzoato foi efetivo e SOD diminuiu apenas levemente a quimiluminescência.

Allen e Loose (80) concluíram que leucócitos polimorfonucleares humanos geram $OH^\cdot$, mas que a geração de $O_2^{\cdot -}$ não é necessária para a oxidação do luminol a um estado eletronicamente excitado. Este fato tem sido extremamente útil para numerosos pesquisadores interessados na detecção de metabolismo errôneos (82).

Krinsky (83) expôs leucócitos polimorfonucleares humanos à uma cepa selvagem de S. Lutes (um carotenóide amarelo contendo cepa selvagem, resistente aos efeitos danosos de luz, corantes e O_2) e à cepa mutante deficiente em carotenóides (destruída rapidamente sob condições fotossensibilizantes) e mediu a sobrevivência deste organismo a tempos variados após misturar a bacté -

ria com as células.

A S.Lutea selvagem não foi destruída significativamente durante o tratamento, enquanto que a cepa mutante incolor foi rapidamente destruída sob estas circunstâncias em presença de soro. Destes dados, inferiu-se que os pigmentos carotenóides na cepa selvagem de S.Lutea atuam como agentes protetores contra a destruição provocada pela ação bactericida de leucócitos polimorfonucleares humanos. Embora estes dados não constituam prova absoluta de envolvimento de $^1\Delta_g 0_2$ na atividade microbicida de leucócitos polimorfonucleares (β -carotenos também aniquilam radicais), eles sugerem que $^1\Delta_g 0_2$ possa ser um dos agentes microbicidas ativos nessas células. Uma medida quantitativa feita recentemente por Foote (20) indica que 1,6% do oxigênio consumido aparece na forma de oxigênio singlete.

Klebanoff (84) estudou também o efeito de 1,4-diazobiciclo (2.2.2) octano (DABCO), porém evidências mais definitivas do envolvimento de $^1\Delta_g 0_2$ aparecerem em uma publicação feita por Rosen e Klebanoff (85). Estes pesquisadores usaram uma combinação de análise de produtos, supressores de oxigênio singlete e o efeito do óxido de deutério para estudar o sistema mieloperoxidase/ H_2O_2 haleto. Na análise de produtos, estudaram o efeito dos sistemas enzimáticos em 2,5-difenilfurano, que forma cis-dibenzoiletileno em presença de $^1\Delta_g 0_2$. Embora esta reação seja formalmente considerada como específica (86), existem atualmente, diversos registros indicativos da presença de diversos radicais que podem, igualmente, produzir cis-dibenzoiletileno. Rosen e Klebanoff (85) mostraram que este produto é inibido em presença de vários supressores conhecidos de oxigênio singlete por exemplo, β -caroteno (21), bilirubina (87), DABCO (88) e histidina (89). Demonstraram, finalmente

que a formação de cis-dibenzoiletileno aumentava de acordo com o conhecido efeito de D_2O na meia-vida de $^1\Delta_g O_2$ (90).

I.2.2-XANTINA-OXIDASE

Há quase 20 anos atrás, observou-se que a xantina-oxidase, quando incubada com um de seus substratos, por ex., xantina, causava o aparecimento de uma quimiluminescência (91). Naquele tempo, $^1\Delta_g O_2$ foi proposto como espécie emissiva, mais recentemente (92) sugeriram que a quimiluminescência observada neste sistema podia ser devida realmente à recombinação de radicais carbonato.

Arneson (73) propôs que H_2O_2 era importante nesta reação, gerando presumivelmente, $^1\Delta_g O_2$ via interação com $O_2^{\cdot -}$ em uma reação Haber-Weiss. Pederson e Aust (93) empregaram os dados de de composição do 1,3-difenilisobenzofurano para o α -dibenzoilbenzeno para argumentar em favor de $^1\Delta_g O_2$. Mas esta reação não envolve $^1\Delta_g O_2$ (94), necessariamente.

Kellog e Fridovich (95) usando xantina-oxidase e medindo a peroxidação do ácido linoleico, concluíram que tanto SOD como catalase, inibem a peroxidação lipídica. O álcool terc-butilico e ma nitol, foram inefetivos na reação total, enquanto que DABCO inibiu a peroxidação lipídica. Propuseram então, baseados nestas observações, que uma reação Heber-Weiss não só origina $OH^{\cdot}$ como também $^1\Delta_g O_2$, sendo que a última espécie é quem inicia a peroxidação do ácido linoleico. Um estudo do produto em presença de 2,5-dimetilfurano garantiu a hipótese de que $^1\Delta_g O_2$ era gerado a partir dos produtos de xantina-oxidase. Aparentemente, $^1\Delta_g O_2$ não participa na iniciação, mas sim na propagação da peroxidação (96). Fong e col. (97) apresentaram evidências de que $OH^{\cdot}$ pode ser produzido pela

oxidação de complexos de Fe^{+2} catalisada por H_2O_2 ou, através da reação de Haber-Weiss quando H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot -}$ estiverem presentes. Propuseram então $\text{OH}^{\cdot}$, como espécie responsável pela iniciação da peroxidação lipídica. Pryor (98) sugere que os radicais primordiais no sistema xantina-oxidase-ácidos graxos poliinsaturados-são radicais alcóxi. Entretanto, o isolamento de hidroperóxidos não conjugados, no caso do linoleato, indicam que, algum R.OOH possa derivar da reação com $^1\Delta_g \text{O}_2$.

Hogdson e Fridovich (99) descreveram a dependência da emissão de luz do sistema xantina-oxidase na presença de ânions carbonato e sugeriram reações desta última espécie com radicais $\text{OH}^{\cdot}$ dando o radical carbonato $\text{CO}_3^{\cdot -}$. Este radical na dimerização poderia então, originar a emissão de luz observada. Este estudo foi aplicado para o caso de hemólise de eritrócitos humanos, onde um efeito pronunciado de carbonato foi também observado (100).

Baseados nas experiências de aniquilamento preliminares, Khan (101) concluiu que o sistema xantina-oxidase era gerador, de $^1\Delta_g \text{O}_2$. Atualmente, a maioria dos autores parece favorecer o ponto de vista de que $^1\Delta_g \text{O}_2$ aparece numa posição secundária, via uma reação de transferência de elétrons envolvendo $\text{O}_2^{\cdot -}$, ou através da reação de Haber-Weiss.

I.2.3 - OXIDASE LIPÍDICA MICROSSOMAL

Em 1971, Howes e Steele (102) observaram que a adição de NADPH e oxigênio a microsomas hepáticos de rato produzia quimiluminescência. Sugeriram então, que a reação que gerava quimiluminescência precedia a quebra do peróxido lipídico a malonaldeído pois, não puderam encontrar uma correlação entre malonaldeído, produto de quebra do pe

róxido lipídico, e quimiluminescência. Sugeriram, posteriormente, que $^1\Delta_g O_2$ era gerado na oxidação de NADPH por microsossomas hepáticos. Contudo, experimentos recentes feitos por Wright e col (103) indicam que a quimiluminescência iniciada em microsossomas hepáticos por escorbato ou NADPH, é diretamente proporcional à peroxidação lipídica. Medidas feitas por Howes e Steele (102) parecem ter sido obtidas antes de se atingir uma resposta máxima de quimiluminescência e, o excesso de tecido empregados em seus estudos, podem ter resultado em supressão da resposta quimiluminescente. Assim, as aparentes discrepâncias entre os resultados (102,103) podem ser atribuídas às diferenças técnicas na aproximação experimental. Recentemente, tem sido mostrado a existência de 1-hidroxipe - roxido na interação de microsossomo e NADPH (104).

Existe uma série de evidências contrárias à participa - ção de $^1\Delta_g O_2$ nestes sistemas. Sternson e Wiley (105) não observa ram mudanças na cinética de reação de hidroxilação usando um núme ro de inibidores de $^1\Delta_g O_2$, incluindo β -caroteno, DABCO (embora a concentração fosse muito baixa para supressão efetiva), etilsulfeto e glutatona. Usando (1,2- 3H) colesterol incubado em uma fração subscelular de fígado de rato, em presença de um sistema gerador, de NADPH e analisando o produto de oxidação do colesterol, conclu íram que a oxidação de esteróis observada anteriormente (106) era similar à oxidação via-radical livre e não envolvia $^1\Delta_g O_2$ (76,107).

Baseados em estudos com supressores de $^1\Delta_g O_2$, Pederson e Aust (108) questionaram o envolvimento de $^1\Delta_g O_2$ em reações de peroxidação lipídica dependente do NADPH. Esses pesquisadores obser varam que os aniquiladores de $OH^\bullet$, catalase e SOD, ocasionaram ape nas uma inibição marginal, concluindo portanto, que a reação não envol via O_2^- , $^1\Delta_g O_2$, $OH^\bullet$ nem H_2O_2 , mas provavelmente radicais alcóxi

formados pela decomposição de hidroperóxidos lipídicos. Recentemente, (109) demonstraram que a peroxidação lipídica dependente de NADPH ocorre em dois passos sequenciais. O 1º passo é a iniciação catalisada pelo íon ADP-perferril. O 2º passo, isto é, a propagação, é dependente do hidroperóxido lipídico formado durante a iniciação e resulta em rápida formação de intermediários reativos e produtos da peroxidação lipídica. A propagação contribui com mais de 90% dos produtos formados durante a peroxidação lipídica e é, em essência, radicalar. A possível formação de baixos níveis de radicais hidroperóxi indica a presença de $^1\Delta_g O_2$ durante a propagação.

Wang e Kimura (110) observaram que tanto a degradação do citocromo P-450 quanto a peroxidação lipídica, ocorreram simultaneamente e não foram inibidas pela adição de catalase, SOD, DABCO ou etanol, concordando com os resultados de Pederson e Aust (108). Obtiveram também peroxidação lipídica e destruição do citocromo P-450, simultaneamente, por adição de cumenohidroperóxido à mistura de incubação, contudo, o oxigênio deve estar presente. Isto sugere que o hidroperóxido gerado em presença de Fe^{2+} pode iniciar tanto a peroxidação lipídica quanto a destruição do citocromo P-450 (111), e está provavelmente associado com a ação de $^1\Delta_g O_2$ (102). O mesmo efeito também observado recentemente por Boveris e col. (113) Auclair Lacomte (114) a adição de hidroperóxido orgânico, aumenta a quimiluminescência microsomal.

A emissão fotônica microsomal foi também aumentada por suplementação com íon Fe^{+2} e ADP (113), de acordo com os resultados prévios de Howes e Steele (102) e Nakano e Noguchi (115).

Baseado na observação de Howard e Ingold (116) e no fato de que a quimiluminescência era proporcional ao quadrado da concen-

tração de peróxido lipídico, concluiu-se que $^1\Delta_g 0_2$ poderia se originar através de uma auto-reação de radicais peróxi lipídicos isto é, via mecanismo de Russell (117).

Baseados na formação do o-dibenzoiletileno a partir de 2,5-difenilfurano, (86,118), conclui-se que os microsossomos de fígado geram $^1\Delta_g 0_2$ em presença de NADPH em um processo dependente de Fe^{3+} . Desde que é sabido que este furano pode reagir com oxigênio no estado fundamental mesmo no escuro para produzir o suposto produto $^1\Delta_g 0_2$, este teste não fornece fortes evidências para a existência desta espécie. A necessidade de Fe^{3+} e a observação de $OH^\cdot$ e $^1\Delta_g 0_2$ em um sistema gerador de $0_2^\cdot$, poderia ser explicado pela interação direta de Fe^{3+} com $0_2^\cdot$ para produzir $^1\Delta_g 0_2$ (67). Estudos em peroxidação lipídica microsossomal de fígado por citocromo P-450 indicam também, que a formação de $^1\Delta_g 0_2$ acompanha a peroxidação (112).

O citocromo P-450 oxigenase microsossomal de fígado, tem um papel importante na oxidação de hidrocarbonetos policíclicos (119). Em presença do NADPH, este sistema enzimático converte 9,10 dimetil-1,2-benzantraceno a 1,4-endoperóxido, um fotoproduto conhecido, originário presumivelmente, da interação de $^1\Delta_g 0_2$ com benzantraceno (120). Estes resultados indicam que, o citocromo P-450 oxigenase atua como uma dioxigenase ao invés de uma monooxigenase e adiciona oxigênio de uma forma equivalente à adição de $^1\Delta_g 0_2$. A mesma conclusão foi tirada anteriormente por Baldwin e col. (121).

Sligar e col. (122) observaram quimiluminescência durante a auto-oxidação do citocromo P-450 (Fe^{2+}) por uma enzima de Ps. Putida. Concluíram então, baseados nos resultados com aniquiladores de radicais livres, supressores de $^1\Delta_g 0_2$ e SOD, que a quimiluminescência observada era diretamente relacionada com a formação

de $^1\Delta_g 0_2$.

A quimiluminescência foi também utilizada por Goda e col. (123) como indicativo da formação de $^1\Delta_g 0_2$ no sistema adrenodoxina-adrenoxina redutase bovina, dependente de NADPH. Seliger e col. (124,125) também observaram quimiluminescência proveniente da hidroxilação do carcinogênico benzo(a) pireno por hidrolase de hidrocarboneto arílico microsossomal, quimiluminescência esta, atribuída a compostos carbonílicos eletronicamente excitados, produzidos a partir da interação de duplas ligações ativadas com $^1\Delta_g 0_2$.

I-2.4- PROSTAGLANDINA OXIGENASE

Samuelsson (126) foi o primeiro a estabelecer a possibilidade de geração de endoperóxidos via reação de $^1\Delta_g 0_2$ com ácido araquidônico. Pangamala e col. (127) iniciaram a investigação, do possível papel desempenhado por $^1\Delta_g 0_2$ na biossíntese de prostaglandina, estudando os efeitos de vários supressores de $^1\Delta_g 0_2$ neste processo. Sem dúvida alguma, 1,3-difenilisobenzofurano e tetrafenilciclopentadieno inibem efetivamente este processo, embora o efeito de D_2O não tenha sido observado. Subsequentemente, (118) descobriram que a biossíntese de prostaglandina PGE foi inibida por catalase, 3-amino-1,2,4-triazol, NaN_3 e clorpromazina, um aniquilador de $OH^\bullet$. DABCO não inibiu este processo. Logo, encontraram um efeito diferencial em concentrações altas ou baixas de aniquiladores de $OH^\bullet$ (129), provavelmente, devido ao fato de que a função de $OH^\bullet$ é gerar $O_2^{\bullet -}$, que pode por sua vez, ser utilizado na reação de Haber-Weiss gerando $^1\Delta_g 0_2$ como proposto inicialmente por Kellog e Fridovich (95).

Marneff e col. (130,131) estudaram o possível envolvi-

mento de $^1\Delta_g 0_2$ na biossíntese de prostaglandina na fração microssomal da glândula vesicular da ovelha. Eles observaram uma quimiluminescência associada à reação responsável pela biossíntese de prostaglandina. A quimiluminescência foi inibida por indometacina aspirina, dimercaptopropanol, todos inibidores de prostaglandina sintetase, bem como por SOD e β -carotenos.

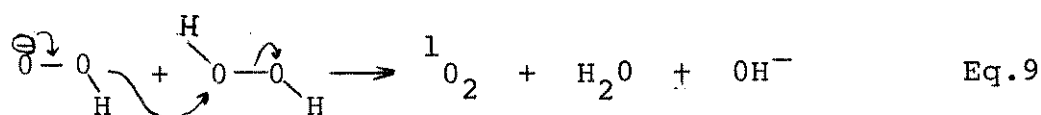
1,3-difenilisobenzofurano, luminol, benzo(a) pireno e colesterol foram oxidados na conversão de ácido araquidônico a prostaglandina. Nenhum destes aniquiladores porém, é seletivo para $^1\Delta_g 0_2$ (com excessão de colesterol, cuja eficiência é muito baixa para detecção de produtos sob estas condições) portanto, nem a oxidação nem a quimiluminescência podem ser consideradas únicas para $^1\Delta_g 0_2$. Deixando de lado este fato, concluíram que não dispõem de evidências definidas em relação à função da reação de $^1\Delta_g 0_2$ na cooxigenação de vários substratos pelo sistema prostaglandina sintetase.

Rahimtula e O' Brien (112) estudaram tanto a oxidação de aceptores de $^1\Delta_g 0_2$ tais como bilirrubina, 2,5-difenilfurano e 1,3-difenilisobenzofurano, quando o efeito de D_2O sobre a extensão da atividade da prostaglandina sintetase. Observaram que a bilirrubina, um substrato efetivo para $^1\Delta_g 0_2$, foi rapidamente oxidada por este sistema enzimático e que esta oxidação não foi afetada pela adição de endometacina ou supressores de radicais; D_2O inibiu a ação da prostaglandina sintetase. Concluíram então, que a prostaglandina sintetase consiste de duas atividades, uma peroxidase que está envolvida na geração de $^1\Delta_g 0_2$ seguida pelo ataque subsequente desta espécie em substrato ácidos graxos insaturados, forma, posteriormente, um radical peróxi que pode sofrer uma reação de ciclização produzindo o intermediário endoperóxido cíclico na sín

tese da prostaglandina, como descrito por Samuelsson e col. (132)

Recentemente, Yoshimoto e col. (133) observaram uma rápida emissão de luz quando prostaglandina endoperóxido sintetase purificada de glândula vesicular bovina foi incubada com ácido araquidônico em presença de hematina e triptofano. O espectro de luminescência foi distintamente observado para $^1\Delta_g 0_2$ e similar ao de uma reação fotoquímica de triptofano (134).

O efeito de H_2O_2 sobre a velocidade da reação enzimática catalisada por prostaglandina endoperóxido sintetase de tecidos reprodutivos de loko (abalone, molusco) foi investigado por Morse e col. (135). Eles acreditavam que este efeito pudesse ser diretamente responsável pela indução de ovulação em moluscos partindo do ponto que, H_2O_2 e outros produtos derivados desta reação podem induzir ovulação. A indução de ovulação por H_2O_2 depende da concentração de H_2O_2 adicionada e da alcalinidade do ambiente marinho. A necessidade de um meio aparentemente alcalino, reflete o processo de decomposição de H_2O_2 catalisado por base (hidróxido) para produzir uma forma de oxigênio radicalar livre ou ativado eletronicamente (136), que pode então, participar como um substrato estimulador e preferencial na síntese enzimática de prostaglandina endoperóxido. Smith e Kulig (76) observaram que a formação de $^1\Delta_g 0_2$ via desproporcionamento de H_2O_2 catalisada por base, provavelmente, ocorre via um processo simultâneo de 2 elétrons



Talvez estes resultados estejam de acordo com a sugestão da participação de $^1\Delta_g 0_2$ na formação de prostaglandina endoperóxido (112).

I. 2.5. LIPOXIDASE

A oxidação do linoleato catalisada por lipoxidase mostrou-se uma fonte enzimática de baixo nível de quimiluminescência (137,138). Agindo sobre ácidos graxos insaturados, a lipoxidase, produz somente hidroperóxidos conjugados em contraste com o ataque de $^1\Delta_g 0_2$ que forma hidroperóxidos conjugados e não conjugados no sistema polieno (139). Baseado na oxidação de tetrafenilciclopentadienona e seu endoperóxido, Chan (140,141) propôs que um intermediário é gerado durante a oxidação de etil linoleato catalisada por lipoxidase, representando um forte análogo de $^1\Delta_g 0_2$. Finazzi Agro e col, (142) chegaram à mesma conclusão baseados na oxidação de 1,3-difenilisobenzofurano.

Estes resultados foram refutados por Baldwin e col. (143) os quais observaram que o produto obtido por Chan (141) era uma cetolactona conhecida e não o endoperóxido.

Teng e Smith (144,145) não puderam detectar o derivado de colesterol 5-hidroperóxido, produto de $^1\Delta_g 0_2$, quando lipoxidase de soja agiu sobre linoleato de etila. Nilsson e Kearns (146) não observaram mudanças na velocidade de oxidação do ácido linoleico catalisada por lipoxidase quando D_2O , ao invés de H_2O , foi usada como solvente. Assim, parece estar excluída a participação de $^1\Delta_g 0_2$ no ciclo catalítico normal da lipoxidase. Esta descoberta concorda com a observação de que o tetrafenilciclopentadienona, que foi usado para identificação de $^1\Delta_g 0_2$ (140), é rapidamente oxidado por passos de oxigênio não-singlete gerando os mesmos produtos que Baldwin e col. (143). Faria-Oliveira e col. (147), observaram que a velocidade de branqueamento do citocromo C pelo sistema lipoxidase é aumentada em cerca de 4-5 vezes quando se passa de tampão á-

gua para tampão óxido de deutério. É improvável que o aumento de velocidade em D_2O seja devido a desnaturação do citocromo C, pois D_2O normalmente tem um efeito estabilizador (148). Por outro lado, tal efeito estabilizador exercido sobre a lipoxidase, deveria protegê-la da auto-inativação (149).

Esta interpretação foi dividida em dois fatos: 1º, o efeito principal de D_2O foi sobre a velocidade inicial e 2º, curvas similares foram obtidas em H_2O e D_2O quando a formação de hidropéroxido conjugado foi seguida em função do tempo. Interpretando esses resultados, pode-se dizer que o efeito de D_2O é sem dúvida, devido à formação de $^1\Delta_g O_2$. Contudo, sendo este efeito menor do que 10, parece necessário supor-se que $^1\Delta_g O_2$ reage com citocromo C no primeiro instante de sua formação.

Recentemente, Boveris e col. (150) observaram que a oxidação de ácido linoleico por lipoxidase produz uma cinética complexa de quimiluminescência envolvendo radical livre como produto da atividade catalítica da enzima dependente de Fe^{3+} . O efeito inibidor de di-terc-butilquimol e salicilhidroxamato sustentam esta interpretação. A espécie emissora de luz azul (450 nm), responsável por cerca de 46% da emissão fotônica da reação de lipoxidase, pode ser formada através de uma auto-reação produzindo compostos carbonílicos excitados através de um mecanismo de Russell (117). $^1\Delta_g O_2$ pode também ser gerado por este mecanismo. Curiosamente, a emissão máxima deste sistema foi observada por diversos pesquisadores ao redor de 555nm (151) 520nm(152), 420nm(138) e 450^{nm}(150).

A forte emissão da carbonila aparece provavelmente, da interação de $^1\Delta_g O_2$ com duplas ligações, formando 1,2-dioxetano com subsequente clivagem e formação de produtos carbonila excitada (153).

I.2.6- HEMOPROTEÍNAS

Vladimirov e col.(154) descobriram que uma quimiluminescência era observada quando peroxidase de rabanete agia sobre H_2O_2 em presença de tirosina e durante a decomposição de H_2O_2 por catalase. Stauff e Wolf(91), observaram quimiluminescência durante a ação da peroxidase, mas não com catalase. Uma razão para esta diferença nos resultados pode ser a velocidade excepcionalmente alta de decomposição de H_2O_2 induzida por catalase, sendo possível observar a quimiluminescência somente quando o processo for suficientemente prolongado (isto é, com pequenas concentrações de catalase e concentrações muito altas de H_2O_2) e iniciado em concomitância com a mistura. Embora tenha sido sugerido que parte do oxigênio produzido na ação da catalase sobre H_2O_2 seja $^1\Delta_g O_2$ (155), Porter e Ingraham (156), observaram que $^1\Delta_g O_2$ representa menos que 0,5% do oxigênio total produzido usando a oxigenação de 2,5-difenilfurano por catalase e H_2O_2 em presença de D_2O . Concluíram portanto, que somente oxigênio no estado triplete é liberado durante o desproporcionamento de H_2O_2 por catalase. O grupo de Foote (1) tem tentado também detectar $^1\Delta_g O_2$ da reação H_2O_2 -catalase com aniquiladores-químicos, porém nenhum produto de $^1\Delta_g O_2$ foi detectado (menos que 0,01%).

A adição de H_2O_2 ou peroxidase produz uma quimiluminescência muito fraca (91). A emissão é aumentada na presença de eosina, mas a espécie excitada não foi determinada.

Piatte e col. (157) observaram que o sistema lactoperoxidase/ H_2O_2 / Br^- processa efetivamente a oxidação de 1,3-difenilisobenzofurano e 2,5-difenilfurano. A quimiluminescência foi suprimida por 2,5-difenilfurano e metionina e estimulada em um tampão deuterado. DABCO, metionina, triptofano e histidina, supressores de $^1\Delta_g O_2$, se mostraram inibidores eficientes da reação, enquanto

que os aniquiladores de radicais foram inofensivos. Concluíram, então, que a oxidação dos derivados de furano e a quimiluminescência eram devidas à oxidação de Br^- pela lactoperoxidase, gerando OBr^- que poderia subseqüentemente reagir com H_2O_2 gerando $^1\Delta_g\text{O}_2$. Rosen e Klekanoft (85) têm oferecido evidência mais definitiva para o envolvimento de $^1\Delta_g\text{O}_2$ no sistema mieloperoxidase / H_2O_2 / Br^- . Este sistema foi descrito acima em relação a leucócitos polimorfo nucleares.

O malonaldeído, formado durante a peroxidação lipídica e posteriormente metabolizado, (158), tem múltiplo interesse bioquímico (159). Desde que, tanto Mn^{+2} quanto peroxidase de rabanete estejam presentes, o malonaldeído consome oxigênio em uma reação que emite luz; nem a mioglobina nem a hemoglobina poderiam, ser substituídas pela peroxidase de rabanete. O principal pico de emissão está logo acima de 700nm, sendo que, ocasionalmente, observa-se um pico menor a 630 nm (160). Concluindo a formação de oxigênio singlete observada no sistema malonaldeído-peroxidase fornece o primeiro exemplo da observação de uma emissão substancial de $^1\Delta_g\text{O}_2$ a partir de um sistema enzimático.

I.2.7. SISTEMAS BIOLÓGICOS COMPLEXOS

Uma emissão ultra-fraca de sistemas biológicos foi primeiramente descoberta por Gurvich em meados de 1934 e publicado anos depois (161), usando um detetor biológico. Mais tarde, Becher (162) descobriu a luminescência de fibroblastos e Konev e col. (163) e Troitskii e col. (164) observaram emissão ultravioleta em cultura de levedura. Arnold e col. (165), Arthur e Strehler (166), Strehler e Arnold (168) e Cilento (169,170) devem também ser considerados,

pioneiros na investigação de luminescência fraca de sistemas biológicos (137). Em 1954 um grupo de pesquisadores italianos desenvolveram um aparelho sensível que poderia medir a luminescência de brotos de trigo, milho, lentilha e feijão na região visível do espectro (450-650 nm) causada por reações bioquímicas no escuro (171, 172). Vladimirov e Litvin (173) desenvolveram outro aparelho muito sensível que permitiu a detecção de pós-luminescência de proteínas secas e de luminescência de levedura induzida por luz que está bem associada ao metabolismo celular (154).

Uma observação particularmente interessante de Tarusov e col. (174,175) é que a luminescência dos tecidos e lipídios é na região de 460-500nm. Já que extratos lipídicos de tecidos apresentam quimiluminescência durante a oxidação com oxigênio, é natural supor que a oxidação espontânea (não enzimática) de lipídios é responsável pela luminescência dos tecidos (137). Extensão a tecidos cancerosos mostraram que a quimiluminescência depende dos estados fisiológicos do animal (176).

A quimiluminescência de homogenatos de fígado de ratos sob condições fisiológicas tem sido descoberta simultaneamente e independentemente por Stauff e Schmidkrunz (177,178). Posteriormente sistemas foram estudados com mais detalhes por Vladimirov e L'vova (179). Adição de Fe^{++} a mitocôndria foi acompanhada por um aumento da emissão (137, 180).

Num experimento muito interessante de Polinova e col. (181) e de Tarusov e col. (175) foi medida a quimiluminescência de fígado de rato in vivo colocando o animal com a cavidade abdominal exposta na frente da janela de um fotomultiplicador. Recentemente, um estudo sistemático e detalhado destes sistemas foi feito por Boveris e col (183, 182) e por Cadena e col. (183-185). Estes

autores mostraram a importância da quimiluminescência de órgãos como método de ensaio útil de detecção de metabolismo oxidativos continuos.

Em outros estudos Stauff e Reske (186) e Stauff e Ostrowstki (187) observaram emissão de uma suspensão de células de levedura e de mitocôndrias isoladas.

Mecanismos complexos foram propostos para a produção, de moléculas excitadas, incluindo geração de carbonilos excitados por rompimentos de dioxetanos e geração de $^1\Delta_g O_2$ por recombinação de radicais peróxidos via o mecanismo de Russell (188). Além da indicação de que a emissão vem de oxigênio singlete não existem evidências para a presença desta espécie nestes sistemas.

A primeira pesquisa de quimiluminescência em plantas foi relatada por Colli e col. (171,172). Esta emissão é região de 460-600nm. Os mesmos resultados foram obtidos por Vartapetian e col. (189). Outros estudos envolvem a emissão de brotos de feijão (173) e brotos de outras plantas (190-195).

A conclusão mais importante destes investigadores é que a quimiluminescência está diretamente relacionada com atividade vital de plantas. Também existem estudos de quimiluminescência em raízes e tecidos de ervilha, feijão e milho. Acredita-se que estes casos o sistema H_2O_2 -peroxidase é o responsável pela emissão (196,197).

Em geral, nestes sistemas complexos, estudos sistemáticos com supressores, cálculos de meia vida e estudos cinéticos são necessários para determinar a natureza exata das espécies excitadas.

I.3- OBJETIVOS DA TESE

Visto que a metodologia está muito desenvolvida em sistemas fotoquímicos de geração de oxigênio singlete, mas em sistemas biológicos está, ainda, sem diretrizes estabelecidas, o objetivo principal desta tese é sistematizar a detecção de oxigênio singlete em vários sistemas enzimáticos. A contribuição desta tese é principalmente, em prostaglandina sintetase atuando sobre ácido araquidônico; peroxidase atuando sobre malonaldeído, ácido indol-3-acético, nitrosaminas, ácido barbitúrico e ácido fólico; e a ácido fólico oxidase atuando sobre ácido fólico.

Através destes sistemas chega-se a uma metodologia a ser seguida para determinar a existência de oxigênio singlete em sistemas biológicos.

Como segundo ponto de interesse, pretendesse mostrar os efeitos desta espécie em sistemas químicos/biológicos mais complexos e maneira de prever efeitos biológicos como por exemplo, mutagênese e carcinogênese.

II - PARTE EXPERIMENTAL

II.1. REAGENTES

Ácido araquidônico (99%), glutathione, superóxido dismutase, catalase, L-triptofano, β -caroteno, peroxidase de rabanete (tipo VI), L-histidina, benzoato, hidroxitolueno butilado, guanosina, bilirrubina, hemina, e ácido pterin-6-carboxílico foram obtidos da SIGMA Chem. Co. 1,4-Diazobícl(2.2.2)octano (DABCO), 1,3-difenilisobenzofurano, o-dibenzoilbenzeno, D_2O (99,8%) e 1,1,3,3-tetraetoxipropano foram obtidos da Aldrich. Chem. Co.. Eosina, manitol, ácido indol-3-acético, H_2O_2 (30%), riboflavina, rodamina B, rosa bengala, eritrosina B, fluoresceína e ácido fólico foram da Merck Co.. 2,5-Difenilfurano foi da Eastman. Ácido barbitúrico foi da Hopkins and William, Ltd.. Antraceno-2-sulfonato, 9,10-difenilantraceno-2-sulfonato e 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato foram preparados por métodos publicados (198-200). Malonaldeído (sal sódico) foi preparado por hidrólise de 1,1,3,3-tetraetoxipropano usando o método publicado (201). Pterin-6-aldeído e 6-hidroximetilpterin foram preparados pelo método já publicado (202). Os experimentos com D_2O foram feitos segundo métodos descritos anteriormente (203).

II.2. ATIVIDADE DE ENZIMAS

A prostaglandina sintetase foi preparada da seguinte maneira: a medula renal foi separada da parede externa por dissecação com tesoura (204) após poucos minutos da morte do coelho. Todas as manipulações posteriores foram feitas a 0-5°C, segundo os

procedimentos publicados (205). A medula congelada (18gr) foi homogenizada num equipamento de Waring por 3 min com 60ml de tampão fosfato 50mM a pH 7.0. O homogenato foi centrifugado a 105.000 x g por 60mn. O precipitado foi suspenso em 20ml do mesmo tampão e o centrífugado a 105.000 x g por 60min. O precipitado (fração microsomal) foi ressuspenso em tampão fosfato 5 mM a pH 7,0, contendo 5mM glutathione, etilenglicol (20% v/v) e Tween-20 (1% peso/v). O volume final foi ajustado a 10ml. A mistura foi dispersa com um homogenizador Potter-Elvehjem e mantido em gelo por 30min seguido por centrifugação a 105.000 x g por 60min. A solução sobrenadante é designada como enzima solubilizada já que apresenta atividade seguida pela formação de PGE_2 . Uma coluna de DEAE-celulose (2 x 8 cm) foi equilibrada com tampão fosfato 5 mM pH 7.0 contendo 10mM glutathione, etilenglicol (20% v/v) e Tween-20 (0.1% peso/v). A enzima solubilizada foi aplicada na coluna e foi eluída com o mesmo tampão (200ml). A enzima eluída refere-se como Fração-I (banda sobre a 450nm). A concentração de fosfato foi aumentada a 200mM e a coluna foi eluída novamente com este tampão (100ml). O eluído foi designado como Fração -II (não tem banda a 405 nm). A concentração da proteína foi determinada pelo método de Lowry e col. (206).

A determinação da atividade foi feita da seguinte maneira: uma mistura de 2 ml da Fração-I (0,68 mg de proteína com 5mM de glutathione) e 2 ml da Fração-II (0.17 mg da proteína com 5mM de glutathione) em um volume total de 10ml de tampão tris-HCL 0.1 M pH 8.0, foi incubada com ácido araquidônico (500 nmol) na presença de L-triptofano (50 mol), hemoglobina (2 nmol) e glutathione (10uM) a 37°C por 30min. Uma mistura de éter etílico (30 ml) metanol (4 ml) e ácido cítrico (1 ml, 0.2 M) foi adicionado à mistura de reação para interrompê-la. A fase orgânica foi tirada e o solvente evaporado

sob pressão reduzida. O resíduo foi analisado por cromatografia de camada delgada em sílica gel (Eastman Kodak 13181) eluindo com éter-metanol-ácido acético (90:1:2) e revelando com vapor de iodo (207). Quatro manchas com R_f 0,96, 0,84, 0,78 e 0,34 (maior) foram detectadas. Comparados com amostras autênticas os R_f 's corresponderam a ácido araquidônico (46% conversão a produtos), ácido 12-hidroxi-5,8-10 heptadecatrienônico (HHT), PGA_2 e PGE_2 , respectivamente.

A mesma reação na presença de somente Fração-I deu os seguintes R_f 's 0,97, 0,84, 0,54 (maior), 0,30 e 0,19 correspondendo a ácido araquidônico, HHT, PGD_2 , PGE_2 e $PGF_2\alpha$ - A Fração-II, foi inativa sob as mesmas condições de incubação empregada para Fração I.

A enzima de ácido fólico oxidase extraída de eritrócito foi preparada da seguinte maneira: Retira-se o soro do sangue por centrifugação a 500 x g por 10 min a 0°C, até se obter 22ml de eritrócitos. Lava-se os mesmos com solução isotônica de NaCl a pH 7.4 para garantir a tamponação do meio e centrifuga-se. O precipitado é então colocado em 20 volumes de água para produzir a hemólise das células. Após 30 min adiciona-se HCl concentrado (27 ml) gota a gota no hemolisado, ainda sob agitação. Centrifuga-se em 500 x g e o precipitado formado é lavado com HCl 2 N. Centrifuga-se, novamente a 500 x g e a seguir suspende-se o precipitado obtido em 50 ml de água destilada e leva-se o pH para 5,5 por adição de NaOH 1,0 N. Finalmente, para garantir pH 7.0, a mistura adiciona-se tampão fosfato 0,5 M pH 7.0. O precipitado formado é removido por centrifugação a 500 x g e o sobrenadante contendo o material ativo é dialisado em água destilada por 18 horas a 0-4°C com agitação. Logo, recolhe-se o dialisado e mede-se o volume. Pa-

ra cada 100 ml adiciona-se lentamente 32.5 gr. de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ com agitação. A seguir centrifuga-se por 20 min a 11.000 x g a 0°C . O sobrenadante obtido é levado a 70% em $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ adicionando 9,3gr. para cada 100 ml de dialisado, vagarosamente e agitação. Centrifuga-se novamente a 11.000 x g a 0°C por 20 min e dissolve-se cuidadosamente. O precipitado formado é ressuspendido em 50 ml de água destilada. Dialisa-se por 20 hrs. em água destilada a 4°C .

A atividade da enzima foi medida pela aminodiazotação na degradação de ácido fólico utilizando o método de Bratton - Marshall (208), com nitrito de sódio (0,1% peso/v) e ácido tricloro acético a 30% (peso/v), sulfonato de amônio a 0,5% (peso/v) e, ainda hidrocloreto de N-naftiletilenodiamina (0,1% peso/v), dando uma cor roxa, cuja medida é feita a 540 nm. A concentração da proteína foi calculada por $1,45 E_{280} - 0,74 E_{260}$ (mgr.e proteína/ml) segundo o método de Aravindakshan e Braganca (209) e Braganca e col. (210).

II. 3. APARELHOS

Espectros de absorção foram feitos em um espectrofotômetro Zeiss DMR 21, ou Cary 219. Espectros de dicroísmo circular foram medidos em um espectropolarímetro Cary 60 equipamentos com um sonda de CD modelo 60002. Os consumos de oxigênio foram medidos em um Oxígrafo da Yellow Springs Instr. Modelo 53. As emissões foram medidas dependendo das intensidades da emissão em um fotoc contador Hamamatsu TV C-767 com um fotomultiplicador 1P28 ou um fotomultiplicador Hamamatsu HTV-R-562; contador de cintilação líquida da Beckman modelos LS 100c, LS 250 ou LS 7000 (211, 212) ou em Fluorímetro Perkin-Elmer MPF 4 com um fotomultiplicador 446F ou MPF 44B com um fotomultiplicador R928. O "cocktail" de cintilação de

Hastings-Weber (213) foi utilizado como padrão para as emissões.

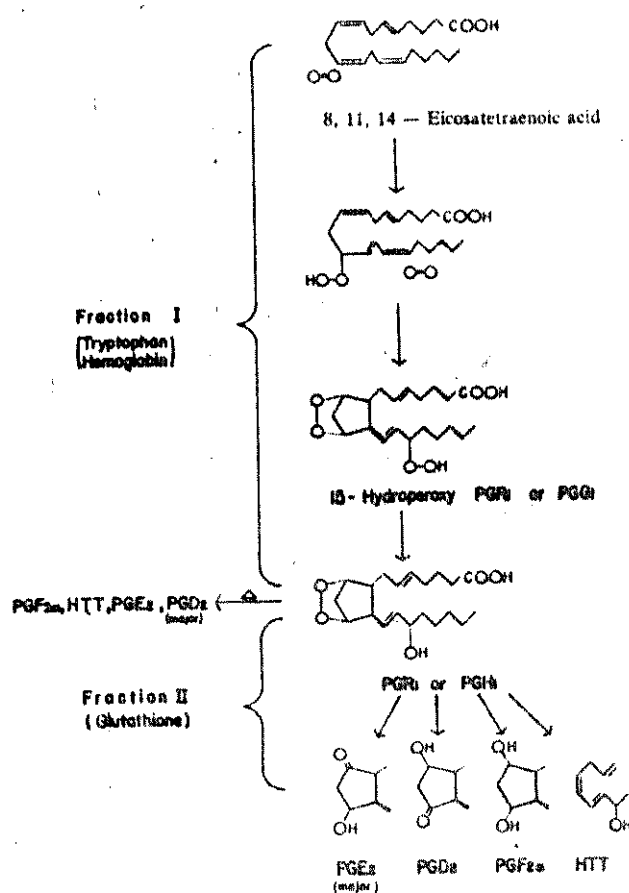
II.4. Métodos

Os métodos para o estudo de aceptores emissivos e su
pressores são descritos nos trabalhos de Cilento (214,215) e Cileno
to e col. (216).

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1. PROSTAGLANDINA SINTETASE

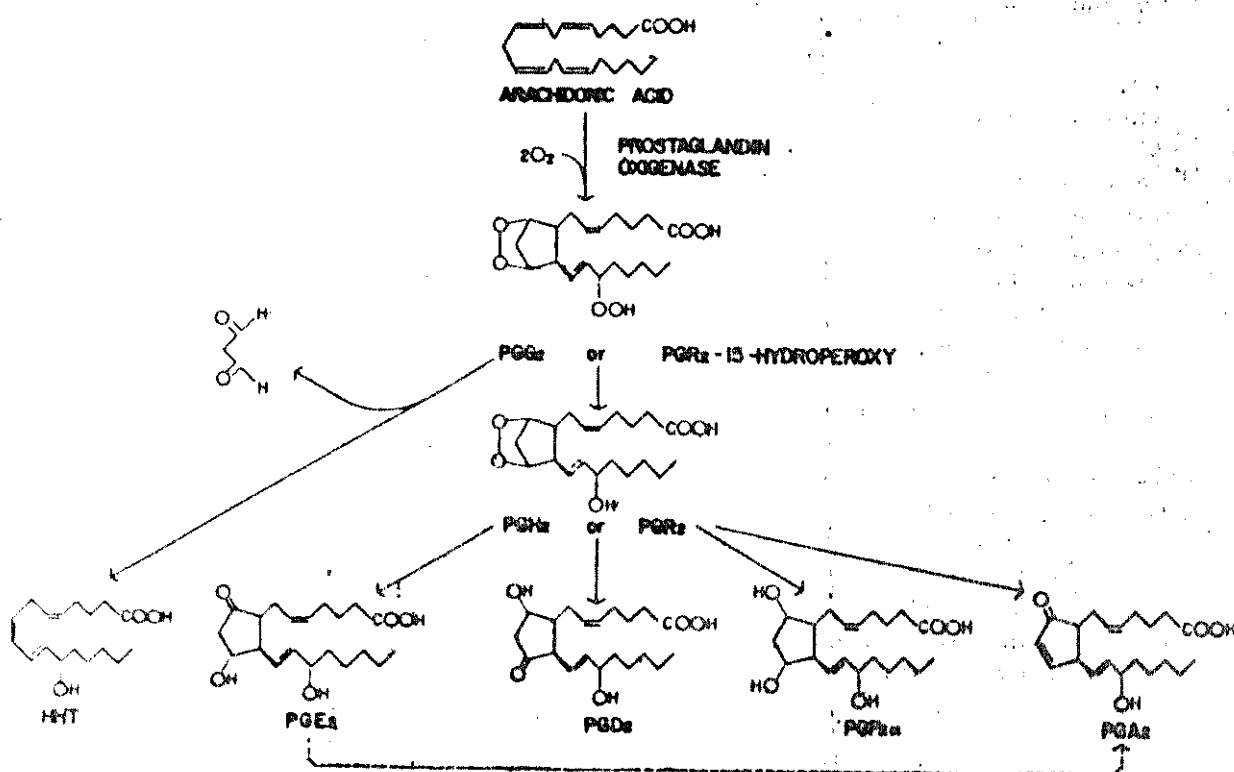
Recentemente têm-se demonstrado a formação de PGE_2 , PGF_2 e ácido 12-hydroperoxy-5,8,10 heptadecatrienônico de tecidos de medula renal (217-219). PGE_2 and PGF_2 tem sido isolados destes tecidos (220-223), junto com PGA_2 , mas considerou-se que todos eles eram produzidos não-enzimaticamente a partir de PGE_2 , durante os procedimentos de extração. Recentemente, (224) foi relatado que epinefrina estimulava a síntese de endoperóxidos de ácido araquidônico, entretanto a glutathione facilitava a formação de PGs do endoperóxidos PGG_2 . (ESQUEMA II)



ESQUEMA II

A prostaglandina sintetase de vesícula biliar (microsomas) tem sido solubilizada na Fração I que sintetiza PGH_2 e a Fração II que isomeriza PGH_2 em PGE_2 . Muito recentemente, a Fração I foi purificada (225). Também tem sido relatado o possível envolvimento de peroxidase (226) na síntese de prostaglandina. Recentemente, têm-se purificado a ciclooxigenase (227).

Nossos resultados, descritos na Parte Experimental, mostram que a Fração I das proteínas extraídas de rim de coelho na ausência da Fração II estão de acordo com o acúmulo de endoperoxido e, subsequentemente, decomposição, principalmente em $\text{PGF}_2\alpha$, PGE_2 e PGD_2 (ESQUEMA III).



ESQUEMA III

Estes resultados experimentais indicam que o mecanismo proposto por Miyamoto e col. (205) para fração microsomal crua de vesícula está também operante no caso da medula renal.

A biossíntese de prostaglandina envolve uma série de reações que, provavelmente, são catalizadas por várias enzimas atuando sequencialmente. Quimiluminescência na biosíntese de prostaglandinas aparece como em muitas outras reações enzimáticas. Provavelmente, vem de espécies eletronicamente excitadas como grupos carbonílicos, íons superóxidos, radicais hidroxilas e oxigênio singlete (228). Logo, é interessante analisar se o oxigênio singlete participa na biosíntese de prostaglandinas como sugerido por Marnett e col (130).

Tabela 1 mostra os requisitos dos cofatores para a reação da Fração I com ácido araquidônico. Na quimiluminescência a hemoglobina foi eliminada devido a esta hemoproteína induzir luminescência com ácido araquidônico.

Adição de ácido araquidônico como sal de amônio a uma suspensão da Fração I nas condições descritas na Tabela 1 (experiência 4) resulta em quimiluminescência (Fig. 3) que não foi afetada por catalase e manitol e é levemente afetada por superóxido dismutase (provavelmente supressão por proteína). Com L-triptofano, L-histidina, β -caroteno e borbulhando nitrogênio há uma supressão da luminescência de 90%, 70%, 60% e 40% respectivamente. Aumento da emissão com DABCO foi observado (Tabela 2). Quando eosina (10 μ M) foi adicionada à mistura de reação após 3 min. apareceu uma nova emissão (Fig. 3)

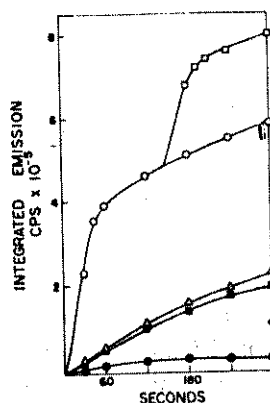


FIG. 3 QUIMILUMINESCÊNCIA DE PROSTAGLANDINA SINTETASE: (-●-●), Reação 2, Tabela 1; (-■-) Fração II (0,6 ml, 73,2 µg de proteína/0.1 ml), triptofano (5 mM), glutathione (10 µM) e ácido araquidônico (0.25 mM); (-Δ-) Fração II (0,6 ml), glutathione (10 µM); (-o-o) Reação 4, Tabela 1; (-□-) adição de eosina depois de 3 min. (10 µM) na reação 4.

TABELA 1

REQUERIMENTOS DE COFACTORES PARA A REAÇÃO DE PROSTAGLANDINA
ENDOPEROXIDO SINTETASE ^a

Exp.	Cofactor	Decomposição do substrato (%)
1	nenhum	8
2	Triptofano 5 mM glutathione 10 mM	35
3	Triptofano 5 mM hemoglobina 0.2 uM glutathione 10 uM	46
4	Glutathione 10 uM	10
5	Glutathione 10 uM hemoglobina 0.2 uM	14

a) Ácido araquidônico (0.25 mM), glutathione (10 uM), 0.6 ml de Fração I (49,2 µg/0.1 ml) num total de 5 ml de tampão Tris-HCl 0.1 mM pH 8.0 . Tempo de reação 30 min.

Nas reações bioquímicas a espécie mais comum no estado eletrônico excitado é o oxigênio singlete $^1\Delta_g \text{O}_2$ como foi descrito na INTRODUÇÃO.

O fato da biossíntese de prostaglandina ser inibida por supressores de oxigênio singlete, tais como 1,3-difenilisobenzofurano (130), tetrafenilciclopentadienona (128), bilirrubina e difenilbenzofurano (112) e da emissão de luz observada durante a incubação de ácido araquidônico com a fração vesicular de ovelha ser atribuída a enzima responsável pela síntese de prostaglandina, são indicativas de que a geração de estados excitados é um passo importante na reação.

TABELA 2

INIBIÇÃO DA QUIMILUMINESCÊNCIA DA PROSTAGLANDINA ENDOPERÓXIDO SINTETASE POR VÁRIOS AGENTES ^a		
Compostos	Intensidade ^b Relativa	Supressão de
Nenhum	100	-
SOD 100 unidades	60	$O_2^{\cdot -}$
SOD desnaturado	70	-
Triptofano 5 mM	10	1O_2
Histidina 5 mM	30	1O_2
β -Caroteno 0.2 mM	40	1O_2
Nitrogênio (traços de O_2)	60	-
Manitol 5 mM	95	$OH^{\cdot}$
Catalase 0,15 mg	90	H_2O_2
DABCO 10 mM	200	1O_2

a) Nas mesmas condições da Tabela 1.

b) Intensidade integrada a 4 min.

Nossos resultados de supressão da emissão da Fração I são indicativos do envolvimento de oxigênio singlete na prostaglandina endoperóxido sintetase e não na fração de isomerase. Logo, este estudo mostra que o método bioenergizado (geração de estados eletronicamente excitados por sistemas enzimáticos) é um método adequado para o estudo de mecanismos em sistemas complexos como o de prostaglandina sintetase.

III.2. HEMOPROTEINA (PEROXIDASE)

III.2.1. NITROSAMINAS.

A degradação de nitrosaminas por homogenatos de fígado ou rins (229), extratos de plantas (230) e por peroxidase (213) tem sido publicados. Acredita-se que o primeiro passo in vivo destas oxidações é catalisada pelo citocromo P-450 que tem uma função de oxidase mista.

Os efeitos destes compostos têm sido investigados por longo tempo os quais têm-se mostrado carcinogênicos, mutagênicos e podem induzir tumores em animais prenhos. Acredita-se, com base nos resultados, que estes efeitos são possíveis através de alquilação das bases de ácidos nucleicos (232). Entretanto, não existe razão química para se acreditar que a alquilação da guanina no N-7 ou O⁶-poderia ter efeitos mutagênicos. Logo, qualquer relação, entre as reações primárias e a última resposta oncogênica aparece muito duvidosa (233).

Previamente, nós tínhamos encontrado que as nitrosaminas eram degradadas por peroxidase produzindo quimiluminescência (231). Logo, era interessante determinar a natureza desta emissão e estudar as possíveis implicações dessas espécies eletronicamente excitadas na carcinogênese de nitrosaminas.

Foi observada, também quimiluminescência na decomposição de diisopropil-N-nitrosamina catalizada por HRP a pH 7.4 (Tabela 3). Existem evidências sugerindo que oxigênio singlete seja responsável por esta quimiluminescência e a inibição da emissão por histidina, metionina, difenilfurano, 1,3-difenilisobenzofurano, que são excelentes supressores de oxigênio singlete, foi observada.

TABELA 3

FORMAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE DURANTE A DECOMPOSIÇÃO DE DIISOPROPIL-N-NITROSAMINA CATALISADA POR PEROXIDASE.^a

	Consumo de Oxigênio (nmol/min)	Emissão integrada a 5 min x 10 ⁻⁴ (contagem)	%Relativo de 1,3-di- feniliso- benzofurano (após 15min.)
Controle	750	239	100
Histidina 1.0mM	520	24	83
Histidina 2.0 mM	360	16	63
Metionina 0.1 mM	620	77	81
Metionina 0.25 mM	540	60	71
3,5-Diterbutil-4 hidroxiben- zila álcool 1.0 mM	216	98	33
" " 2.0 mM	0	0	0
Hidroxitolueno butilado 2.0mM	0	0	0
Benzoato 2.0 mM	700	235	95
Difenilisobenzofurano 0.1mM	1200	156	-
Difenilfurano	936	150	-
Difenilfurano 1.0 mM	-	96	-
Catalase 580 unidades	840	210	90
Catalase denaturado 580un.	-	200	-
SOD 100 unidades	700	200	93
SOD denaturada 100 un.	-	215	-
Controle	720	2,3 ^b	100
DABCO 1,0 mM	730	3,2 ^b	90
DABCO 10,0 mM	725	5,0 ^b	83

a) Para consumo de oxigênio o meio de reação tinha 40 mM de diisopropil-N-nitrosamina, 3 μ M de HRP (tipo VI) em tampão fosfato 0.1 M pH 7.4; para quimiluminescência foram adicionados 80 μ M de eosina. A oxidação de 38 μ M de 1,3-difenilisobenzofurano foi seguida a 250°C por absorção a 420 nm.

b) sem adição de eosina.

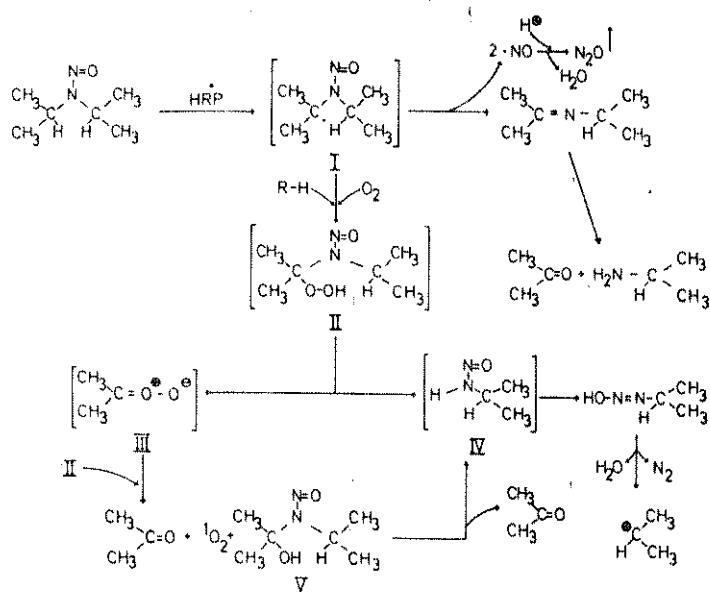
Também pode ser visto que o consumo de oxigênio por histidina e metionina não afetam marcadamente a formação do intermediário. Os anti-oxidantes como hidroxitolueno butilado e 3,5 álcool diterbutil-4-hidroxibenzílico suprimem completamente o consumo de oxigênio e, obviamente, a emissão por mecanismo diferentes. Nenhum efeito foi observado com benzoato, catalase e SOD que são aniquiladores de radicais, peróxido de hidrogênio ion superóxido.

Outras evidências importantes que sugerem que o oxigênio singlete seja responsável pela quimiluminescência é notável o aumento da emissão na presença da DABCO, que aumenta a emissão do oxigênio singlete dimol em meio aquoso (234). Os únicos produtos detectados na cooxidação de 1,3-difenilisobenzofurano e difenilfurano foram dibenzoilbenzeno e dibenzoiletileno como produtos da reação com oxigênio singlete. Estudo do efeito da concentração do tampão mostrou que a 1.0 M de tampão fosfato era atingido o máximo da emissão. A emissão é linear com respeito a concentração da nitrosamina na faixa de 10-150 mM. A Tabela 4 mostra a influência dos diferentes aumentadores da emissão na catálise da reação. Encontrou-se que a intensidade da luminescência era fortemente dependente da energia de excitação dos estados excitados singlete, que são muito similares em todos os compostos estudados. A elevada concentração do corante requerido para atingir a máxima luminescência (0,1 mM) parece apoiar o mecanismo de Khan e Kasha (57,101) no qual o complexo bimolecular de duas moléculas de oxigênio singlete são requeridas para ter suficiente energia para excitar os substratos orgânicos. Os passos pelos quais a energia surge são incertos e, uma excitação por dois passos sucessivos, como por mecanismos termomoleculares, tem sido proposto (57,101).

Com base numa dupla recíproca para eosina e num valor de k_q para β -carotenos ($3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$), a vida da espécie excitada foi $1.0 \times 10^{-6} \text{ seg}$. A vida média para $^1\Delta_g^0\text{O}_2$ em água tem um valor de $2 \times 10^{-6} \text{ seg}$. (29). Apesar da emissão ser fraca na ausência de aceptores emissivos, o espectro de emissão foi observado na região entre 560-600 nm.

Com base na distribuição de produtos, Esquema IV é sugerido. O α -hidroperoxi-N-nitrosamina II pode decompor-se num zwitterion III e este último, por colisão com II pelo mecanismo de Benson (235), pode dar acetona, oxigênio singlete e a hidroxí-N-nitrosamina V.

Estes resultados mostram que a produção de oxigênio singlete ^{pode} vir de uma reação concomitante que poderia ter um papel importante na carcinogênese de nitrosaminas. O fato de acetato de retinilo, um composto similar a β -carotenos, inibir carcinogênese mamário induzida por nitroureia (235) e suprimir carcinoma de bexiga induzido por dibutilnitrosamina, devido à ingestão diária de indol (236) que por sinal, é um excelente inibidor de oxigênio singlete, poderia apoiar a hipótese de que oxigênio singlete tem um papel mais importante que a alquilação.



ESQUEMA IV

TABELA 4

INFLUÊNCIA DE VÁRIOS ACEPTORES EMISSIVOS SOBRE A EMISSÃO INTEGRADA DURANTE A DECOMPOSIÇÃO DE DIISOPROPIL-N-NITROSAMINA CATALISADA POR PEROXIDASE ^a.

Aceptor emissivo	Emissão integrada a 30 seg contagens x 10 ⁻⁴	Banda de Excitação (nm)	Fluorescência ^b (nm)	Energia ^c	
				Singlete	Triplete
				(Kcal/mol)	(Kcal/mol)
Controle	3,0	-	-	-	-
antraceno-2-sulfonato	3,6	380	425	68	42.5
9,10-dibromo-antraceno-2-sulfonato	4,0	403	435	66	40.2
9,10-difenil-antraceno-2-sulfonato	3,5	403	440	65	40.6
Riboflavina	3.0	440	540	53	47.0
Fluoresceína	42,0	500	550	52	45.2
Eosina	173.0	513	565	51	43.2
Rodamina B	170.0	550	590	49	43.0
Rosa Bengala	427,0	560	618	46	39.5

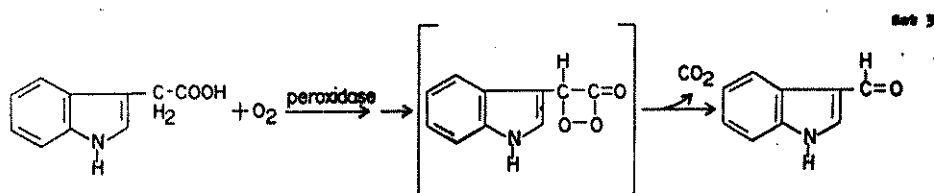
ã) O meio de reação contém 8.0 mM diisopropil-N-nitrosamina, 2µM de HRP (tipo VI) em tampão fosfato 1.0M pH 7.4 e 40 µM do acceptor emissivo a 40°C.

b) todos os espectros de fluorescência foram tirados nas condições de reação.

c) referência 237.

III, 2.2. ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO

A geração bioquímica e a funcionalidade de espécies eletronicamente excitadas tem sido amplamente estudadas em nosso grupo (238) e em colaboração com o Prof. Cilento na USP (214,215). Um sistema bastante estudado e de importância no crescimento de plantas é o ácido indol-3-acético (211,239). A reação ocorre, pelo menos formalmente, através de uma dioxetanona (Eq.10) gerando o indol-3-aldeído eletronicamente excitado, possivelmente em seu estado triplete:



Eq. 10

Como se sabe, as espécies tripletes são suprimidas por oxigênio e oxigênio singlete pode ser formado nesses processos (240); assim, tornou-se importante analisar a formação de oxigênio singlete nesses processos enzimáticos. Como primeira aproximação, foram ensaiados os típicos supressores de oxigênio singlete, bem como os aumentadores desta emissão. Por exemplo, em concentrações de histidina que não influenciava o consumo de oxigênio, calculou-se através de um gráfico de Stern-Volmer um valor de k_{sv} de $276M^{-1}$. Se se supõe que o valor de k_q é de $10^8 M^{-1} \text{ seg}^{-1}$ (que é o valor observado para histidina em fotoquímica) a τ^0 , a vida média, poderia ser $2.8 \times 10^{-6} \text{ seg}$, esse valor sugere que a espécie excitada seja realmente oxigênio singlete já que o τ^0 em água é $2.0 \times 10^{-6} \text{ seg}$. O valor recíproco da inclinação do gráfico de Stern-Volmer

fornece o valor de β , que é a concentração de supressor necessária para aniquilar 50% do oxigênio singlete. O valor de β obtido da maneira descrita para o sistema em discussão deu o mesmo da literatura (3×10^{-3} M); resultados similares com guanosina foram obtidos.

O espectro de emissão do sistema de oxigênio singlete dimol é muito complexo (241), O espectro do sistema ácido indol-3-acético/HRP/O₂ também é complexo, mas contém, além, de outros picos, um proeminente a 630 nm e uma indicação de outro a 675 nm, que são esperados para oxigênio singlete. A ausência de efeitos com catalase, benzoato, carbonatos e SOD, indica que a emissão não vem de H₂O₂, OH[•], e O₂^{•-}, sendo que oxigênio singlete é a espécie importante na emissão deste sistema. Além disso, um efeito marcado na emissão é encontrado na presença de DABCO e de água deuterada. Uma outra possibilidade de formação de oxigênio singlete seria a decomposição do hidroperóxido formado na fase estacionária (Eq. 10) pelo mecanismo de Russell (117). Este hidroperóxido pode ser detectado quando se faz a correlação de consumo de oxigênio com formação de produtos e emissão. Os dois últimos se correlacionam bem, mas o consumo de oxigênio se mostrou muito mais rápido. (FIG. 4)

Cadet e Teoule (242) relataram que a guanosina reage especificamente com oxigênio singlete. Na realidade, usando o (5,8-¹⁴C) deoxiguanosina no sistema, foi detectado N(2-deoxi-D-eritro-pentossil)uréia (Rf 0.18). A formação deste composto pode ser racionalizada por uma cicloadição de oxigênio singlete nas ligações 7,8 e 4,5 e, subsequente decomposição do endoperóxido formado. Foi detectado também, N¹ (2-deoxi-β-eritropentofuranosil)N²-formil-uréia Rf 0.31) .

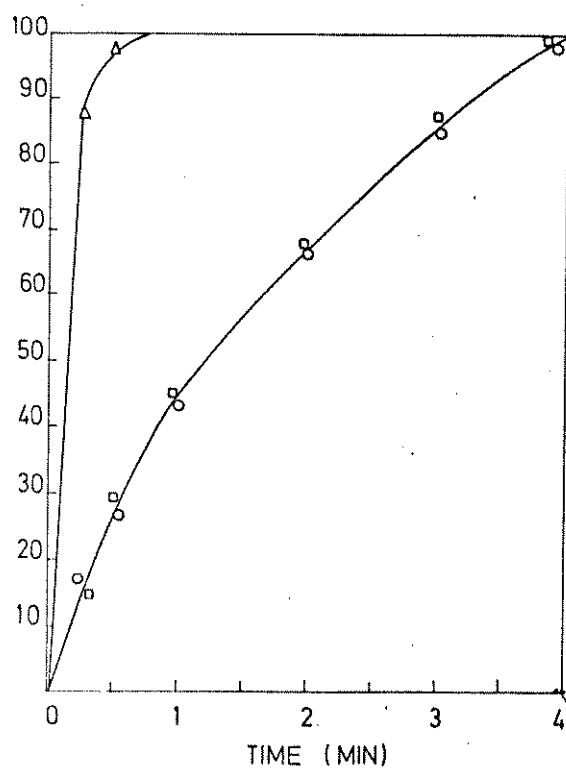


FIG. 4 CORRELAÇÃO ENTRE OS VÁRIOS PARÂMETROS.

(-Δ-) consumo de oxigênio; (-□-) emissão total e (-o-) formação de indol-3-aldeído, no sistema ácido indol-3-acético (0,20 mM)/HRP (2.0 μM)/EDTA (30 μM)/O₂, em tampão acetato 50 mM pH 3.8 contendo 39 mM etanol.

Zweig e Henderson (248) deram um tratamento cinético muito útil para o estudo de supressão aplicando técnicas de estado estacionário para determinação das velocidades de reação de oxigênio singlete. Essencialmente, a quantidade de produto AO_2 (endoperóxido) está dada pela Eq. 11:

$$\frac{1}{(AO_2)} = \frac{1}{(^1O_2)} + \left[\frac{(k_q + k_R) (Q) + k_d}{k_A} \right] \frac{1}{(A)} \frac{1}{(^1O_2)}$$

(Eq. 11)

onde $(^1O_2)$ é a quantidade total de oxigênio singlete gerado, (A) é a concentração do acceptor e (Q) a concentração de supressor, e k_q , k_R e k_A são as constantes de velocidade para supressão, reação com Q e com A , respectivamente. Quando o método bioenergizado é aplicado (243,244) (AO_2) é representado por $I_o - I_{A,Q}$, onde I_o é emissão fotônica na ausência de A e Q . Logo, se (Q) é constante, e se a quantidade de A que é convertida em AO_2 é mantido menor que 10 %, então, o gráfico $1/(I_o - I_{A,Q})$ vs. $1/(A)$ dá uma linha reta. Em outras palavras, uma família de curvas para diferentes concentrações de supressor (Q) permite a distinção entre uma supressão física verdadeira e outras alterações. A constância no coeficiente linear do gráfico $1/(I_o - I_{A,Q})$ vs $1/(A)$ a diferentes (Q) é diagnóstico para supressão de oxigênio singlete e , implica que A e Q competem por um intermediário comum. A supressão da oxidação da histidina por guanossina no sistema do ácido indol-3-acético é mostrado na Fig. 5 , e mostra constância no coeficiente linear.

Logo, neste caso, a cinética de emissão, o espectro de emissão, a distribuição de produtos, o efeito de D_2O e DABCO sobre a emissão, os efeitos de supressores e a aplicação da técnica de estados estacionários mostra, que para se ter certeza da presença de oxigênio singlete em sistemas enzimáticos esta metodologia deve ser aplicada.

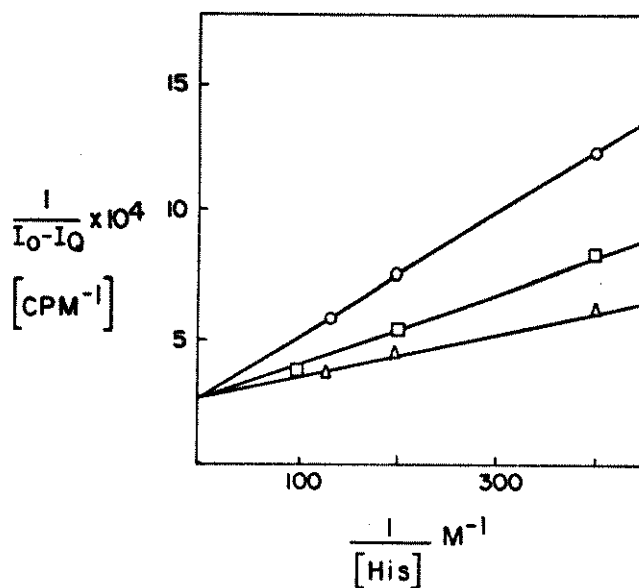


FIG. 5 - SUPRESSÃO DA OXIDAÇÃO BIOENERGIZADA DO SISTEMA ÁCIDO-
INDOL - 3 - ACÉTICO

(0.1 mM)/HRP (0.25 μ M)/EDTA (30 μ M)/O₂/ tampão acetato 0.05M
pH 3.8.

Na presença de guanosina: 0,0 M (- O -), 1.25 mM (- □ -)
e 2.5 nM (- Δ -).

III.2.3. MALONALDEÍDO

Anteriormente, nós tínhamos encontrado que malonaldeído era metabolizado por peroxidase gerando oxigênio singlete. Isto estava só fundamentado em dados espectrais (160).

Agora, foi estudada sistematicamente sua identificação através de efeitos de supressores, aceptores emissivos e outras técnicas.

Neste sistema como nos anteriores não existe correlação de consumo de oxigênio com a emissão fotônica (FIG. 6), indicando um acúmulo de intermediário, possivelmente o hidroperóxido. A Tabela 5 mostra o efeito dos diferentes agentes sobre a emissão.

Pode-se concluir desta Tabela que não existe nenhum outro tipo de espécies que poderia estar prejudicando a emissão de oxigênio singlete. O aumento da emissão com eosina (10 μ M) foi observado, mas inexplicavelmente não teve o aumento esperado na presença de DABCO. O estudo cinético mostra uma interação de DABCO com o sistema, fato não acontecido nos outros sistemas biológicos. Este efeito está sendo estudado com mais detalhes. A emissão aumenta aproximadamente 4 vezes na presença de tampão deuterado.

Os valores de τ^0 (vida média da espécie) obtidos dos experimentos de supressão com guanosina e histidina foram de $1,42 \times 10^{-6}$ seg e $5,0 \times 10^{-6}$ seg respectivamente (τ^0 oxigênio singlete em água 2×10^{-6} seg), ao passo que os valores β nestes casos foram de $7,4 \times 10^{-3}$ M e $1,2 \times 10^{-3}$ M, respectivamente. Bilirrubina mostrou-se muito eficiente na supressão de oxigênio singlete (valor de β de $1,7 \times 10^{-5}$ M).

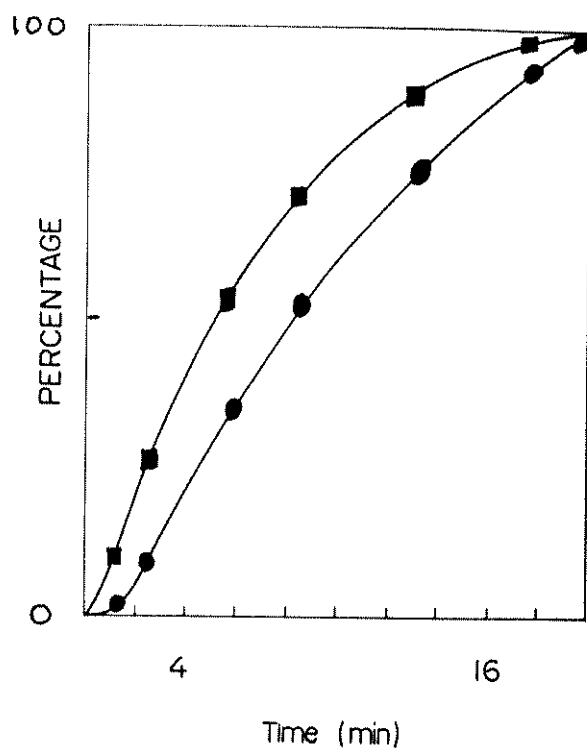


FIG. 6 - CORRELAÇÃO DOS VÁRIOS PARÂMETROS

(-■-) consumo de oxigênio, (-●-) emissão total do sistema malonaldeído (0.67 mM) / Mn^{++} (1.6 mM) / HRP (6.7 μM) / O_2 em tampão acetato 0.2M, pH 4.8.

TABELA 5

FORMAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE DURANTE DECOMPOSIÇÃO DE MALONALDEÍDO CATALISADA POR PEROXIDASE ^a

Composto	Intensidade Máxima contagens x 10 ⁻⁵ cpm	Deteção
Controle	15.0	---
Metionina 0.29 mM	12.5	¹ O ₂
Triptofano 0.1 mM	12.0	"
Triptofano 1.6 mM	9.7	"
Guanosina 1.23 mM	12.1	"
Guanosina 5.8 mM	8.2	"
Histidina 1.9 mM	2.1	"
Bilirrubina 2.5 µM	5.2	"
DNA 138 µM	13.0	"
Benzoato 0.1 mM	13.5	OH.
Bicarbonato 12.3 mM	14.7	OH.
SOD 203 unidades	11.5	O ₂ ⁻ .
SOD denaturada 203 unidades	9.7	-
Catalase 150 unidades	12.5	H ₂ O ₂
Catalase denaturada 150 un.	9.7	-

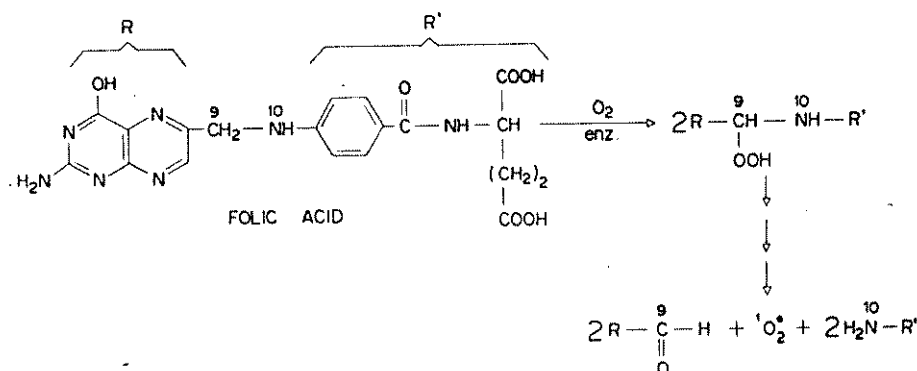
a) Sistema Mn⁺⁺ (3.13 mM)/malonaldeído (10.5 mM)/HRP (3.8 µM)/O₂ em tampão acetato 0.2 M e pH 4.8 e 38° C.

A distribuição de produtos também foi realizada com (5,8- ^{14}C) deoxiguanosina como no caso do sistema de ácido indol-3-acético. Os mesmos produtos foram detectados, o N(2-deoxi-D-eritropentosil)urêia (Rf 0.18), um composto desconhecido (Rf 0.23) e N^1 (2-deoxi- β -eritropentofuranosil) N^2 -formilurêia (Rf.0.31). Colesterol (20 μM) suprimiu 5% da emissão total do sistema e ergosterol suprimiu totalmente a emissão a uma concentração de 1.0 μM . Nestes dois últimos casos não foi estudada a distribuição dos produtos.

O estudo cinético por técnicas de estado estacionário, da mesma maneira que no caso de ácido indol-3-acético, mostrou constância no coeficiente linear quando este foi realizado com histidina e guanosina.

III.2.4. ÁCIDO FÓLICO

Ácido fólico é metabolizado a acetamido-benzoil glutamato. Isto sugere que o catabolismo de folatos possa acontecer in vivo na ligação $\text{C}^9\text{-N}^{10}$. Realmente, tem sido demonstrado o metabolismo de ácido fólico em extratos crus de animais (245), em E.coli (246) e em eritrócitos (247). Recentemente, tem-se achado que ácido fólico é metabolizado em células cancerosas a 6-hidroxi metilpterina através da produção de pterin-6-aldeído (248). Logo, era interessante estudar o metabolismo na presença de oxidase, como por exemplo peroxidase, já que na análise de produtos poder-se-ia pensar na possibilidade de produzir oxigênio singlete. (Eq.12).



Eq. 12

Após estudos de consumo de oxigênio, encontrou-se que era necessária a adição de íons Mn^{++} e glutathione como cofatores. Mas, só a interação destes cofatores na presença de peroxidase produzia peróxido de hidrogênio (244), assim, foi necessário utilizar catalase em todos os ensaios.

A cinética de emissão acompanha a decomposição de ácido fólico catalisada por peroxidase a pH 5.5 (Tabela 6). A inibição por bilirrubina, um conhecido supressor de oxigênio singlete (249), é evidência de que o oxigênio singlete é a espécie que emite. Entretanto, a adição de guanosina e histidina não afetaram a emissão. Isto se deve, provavelmente, ao fato de não serem tão eficientes como bilirrubina para competir com glutathione ou glutathione oxidada (250,251) produzida no meio da reação (244).

Outras evidências importantes (Tabela 6), que sugerem que oxigênio singlete é a espécie responsável pela emissão, são a estimulação da emissão por DABCO em meio aquoso (88) e o fato do espectro da reação não sensibilizada mostrar um máximo ao redor de 560 nm.

A 23°C a emissão total (Tabela 6) é aumentada de 4-5 vezes quando se utiliza D_2O . Nenhum efeito foi observado ao utilizar benzoato e SOD. Possivelmente, a emissão vem de um intermediário

rio semelhante ao proposto em nitrosamina e em malonaldeído, já que não existe correlação entre o consumo de oxigênio e a formação de produto e a emissão (FIG. 7). Um mecanismo similar foi proposto na oxidação catalisada por HRP de aminas terciárias com H_2O_2 (250).

Somente os corantes xantênicos aumentam a emissão deste sistema. Os valores de τ^0 determinados por gráficos Stern-Volmer para histidina e guanosina não são significativos devido a pouca supressão observada, mas na presença de bilirrubina obteve-se um valor de vida média similar ao de oxigênio singlete obtido anteriormente, mas com constantes de supressão da ordem de $10^{10} M^{-1} \text{seg}^{-1}$, valores que são similares aos de β -carotenos. O valor de β para bilirrubina foi muito baixo, $1.3 \times 10^{-5} M$.

Assim, todos os fatos indicam que este sistema gera o xigênio singlete, mas que devido a sua complexidade alguns dos su pressores ou aceptores emissivos não se comportam de forma regular como nos outros sistemas estudados. Assim, se torna uma vez mais necessário ter-se muito cuidado nas conclusões com respeito à existência ou não de oxigênio singlete, em sistemas biológicos.

TABELA 6

EFEITOS DE VÁRIOS ACEPTORES EMISSIVOS E SUPRESSORES NA EMISSÃO INTEGRADA DURANTE A DEGRADAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO POR PEROXIDASE ^a

Composto	Emissão ^b Integra da a 6 min contagens x 10 ⁻³	Supressor	Emissão Integra da a 6 min contagens x 10 ⁻³
Controle/H ₂ O	130	Controle/H ₂ O	130
Antraceno-2-sulfonato	135	Guanosina 7.8 mM	130
9,10 Dibromo-antraceno-2-sulfonato	136	Histidina 5.8 mM	143
9,10-Difenil-antraceno-2-sulfonato	130	Triptofano 0.1 mM	80
Fluoresceína	300	Triptofano 0.8 mM ^c	234
Eosina	250	Bilirrubina 0.02 mM	26
Rosa bengala	250	Bilirrubina 0.02 mM ^c	390
Eritrosina B	300	Benzoato 0.8 mM	130
DABCO 10 mM	400	SOD 150 unidades	104
Controle/D ₂ O	700	SOD denaturada	104

a) Ácido fólico (1.16 mM)/glutathiona (0.39 mM)/Mn⁺⁺ (78 µM)/catalase (150 unidades)/HRP (2.3 µM), a 23°C.

b) Concentração do aceptor emissivo foi 5 µM.

c) a 35°C.

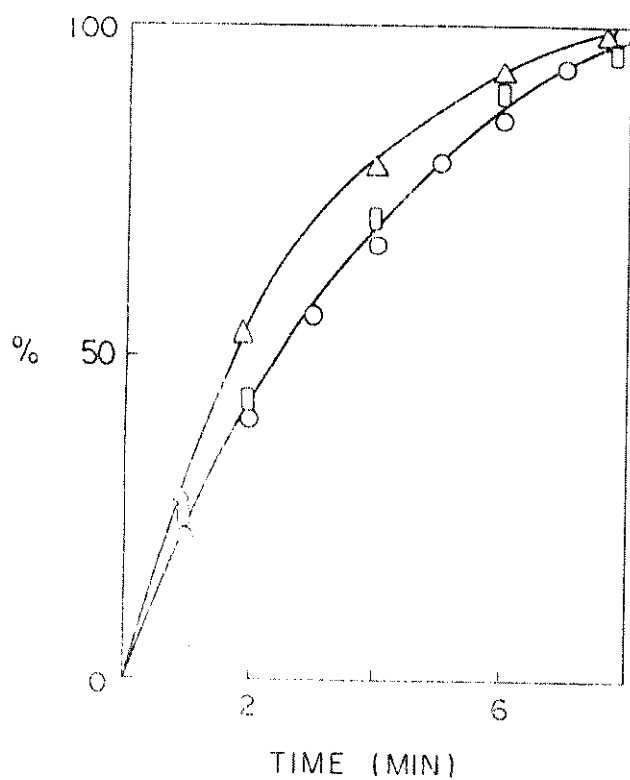
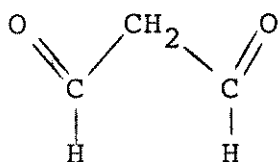


FIG. 7 - CORRELAÇÃO DOS VÁRIOS PARÂMETROS

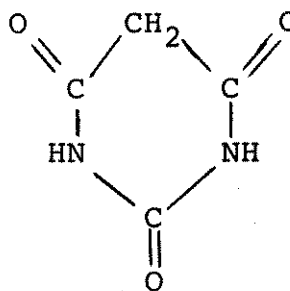
(-Δ-) consumo de oxigênio, (-□-) degradação do ácido fólico, e (-O-) emissão total do sistema ácido fólico (1.16 mM)/glutathione (0.39 mM)/Mn⁺⁺ (78 μM)/catalase (150 unidades)/HRP (2.3 μM)/O₂ em tampão fosfato 0.5M pH 5.5.

III.2.5. ÁCIDO BARBITÚRICO

Os derivados dialdeídicos são intermediários importantes em sistemas biológicos. Anteriormente, temos mostrado que malonaldeído (I) é formado durante a lipoperoxidação e, logo, metabolizado. Esta oxidação é catalisada in vitro por peroxidase formando uma espécie eletronicamente excitada que se mostrou ser o oxigênio singlete, e esta, poderia produzir os efeitos deletérios do malonaldeído. A semelhança estrutural de ácido barbitúrico (II) com malonaldeído fez pensar que sua ação e toxicidade poderia estar relacionada com a produção de espécies eletronicamente excitadas.



I



II

Após estudos preliminares, foi encontrado que na presença de 1.2 mM de Mn⁺⁺ e 6.5 μM de HRP, o ácido barbitúrico consome oxigênio numa reação que emite fótons. O espectro de emissão do sistema ácido barbitúrico/HRP/Mn⁺⁺/O₂ é complexo, mas contém picos a 630 e 670 nm, que correspondem aos de oxigênio singlete. Comparando-se o consumo de oxigênio, a formação de produto e a emissão, os únicos que correlacionam são os dois últimos (Fig. 8).

Além das evidências espectrais a espécie emissora têm sido identificada como oxigênio singlete com base nos seguintes dados:

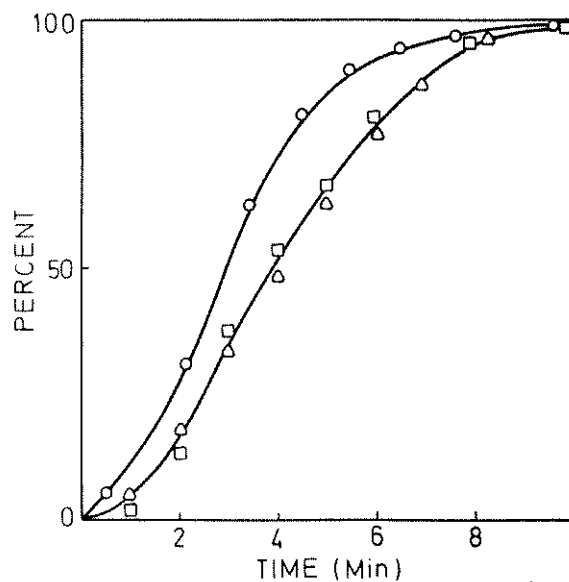


FIG. 8 CORRELAÇÃO DOS VÁRIOS PARÂMETROS. (-o-) consumo de oxigênio, (-□-) degradação de ácido barbitúrico e (-Δ-) emissão total do sistema ácido barbitúrico (1.95 mM)/HRP (6.52 μ M)/Mn⁺⁺ (2.45 mM)/O₂ a 25°C em tampão acetato 0,2N pH 4,8.

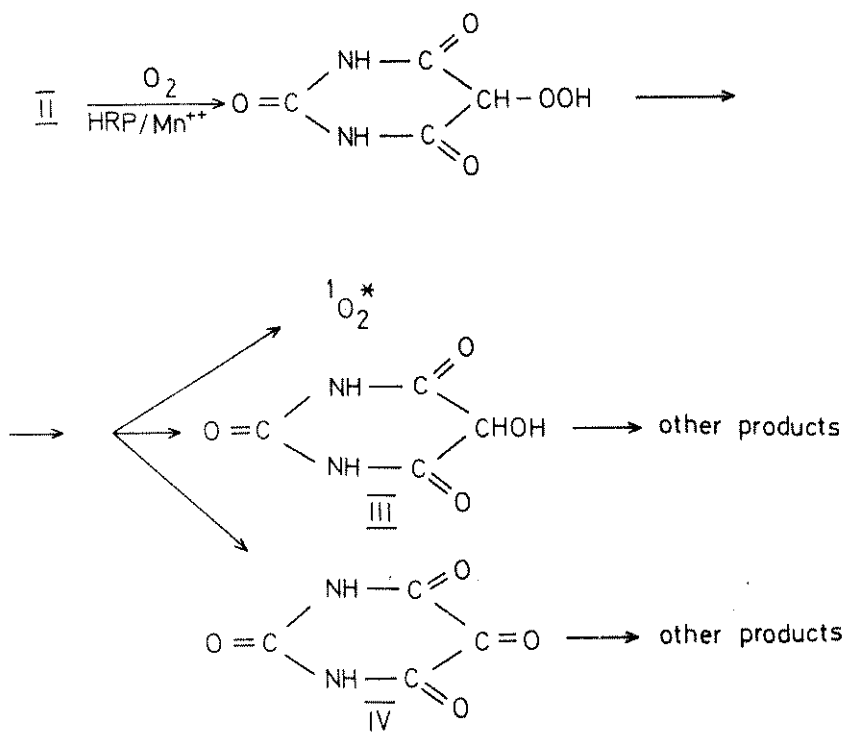
- a) Histidina (10 mM) suprime em 50% a emissão total,
- b) o sistema é afetado por guanosina e bilirrubina, da mesma maneira.

Um grande aumento da emissão foi observado na presença de DABCO e eosina. O duplo recíproco do aumento com eosina forneceu um valor de $K_{ET} \tau^0$ de $7.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Se utilizamos o valor de K_{ET} para sensibilização de oxigênio singlete por eosina em nitrosaminas ($3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$) a vida média τ^0 dá um valor de $2.7 \times 10^{-6} \text{ seg}$ que corresponde ao da vida média de oxigênio singlete em água.

D_2O aumenta em 4 vezes a emissão do sistema, 9,10-Dibromoantraceno-2-sulfonato um excelente aceptor emissivo de carbonilos tripletes não mostrou nenhum efeito na emissão. SOD (150 unidades) e bicarbonato (10 mM) também não afetaram a emissão. Isto significa que $\text{O}_2^{\cdot -}$ e $\text{OH}^{\cdot}$ não participam da emissão desse sistema.

Assim, tudo indica que a espécie emissora neste sistema é oxigênio singlete e que possivelmente vem do acúmulo de um intermediário hidropéroxido (ESQUEMA V).

Concluindo, a formação de oxigênio singlete neste caso é outro exemplo de um processo bioenergizado que poderia explicar efeitos tóxicos causados por barbituratos.



ESQUEMA V

III.3. CONCLUSÕES GERAIS

Temos estudado vários sistemas bioenergizados com o objetivo de poder conhecer exatamente os limites dos métodos fotoquímicos comumente empregados. Com este intuito foram estudados os sistemas enzimáticos para metabolizar ácido araquidônico, nitrosamina, malonaldeído, ácido fólico e ácido barbitúrico. Para isto, cada sistema foi analisado sob vários pontos de vista:

- a) Correlação entre consumo de oxigênio, formação de produto e emissão.

Todos os sistemas enzimáticos mostraram correlação somente entre formação de produto e emissão. A velocidade maior de consumo de oxigênio indicou um acúmulo de um intermediário, possivelmente um hidroperóxido.

b) Emissão fotônica: supressores e aumentadores da emissão

Primeiramente, foram eliminadas as possíveis espécies indutoras, por recombinações de radicais de oxigênio singlete, pelos métodos clássicos (SOD, catalase, benzoato, bicarbonato, etc).

Logo, encontrou-se que os três supressores mais eficientes foram histidina, guanosina e bilirrubina. Os aumentadores mais eficientes foram DABCO e eosina. Em todos os casos houve um efeito de 4-5 vezes

maior na presença de D_2O . O cálculo de $k_q \tau^0$ ou $k_{ET} \tau^0$, para estudos de supressão ou aumento da emissão respectivamente, permite a determinação de dois parâmetros importantes, a vida média e o valor β .

c) Distribuição de produtos

A guanosina mostrou-se muito específica em estudos fotodinâmicos e de facilidade de análise, quando marcado isotopicamente. Este composto mostrou-se muito adequado em sistemas biológicos por sua solubilidade em água e boa eficiência na detecção de oxigênio singlete.

d) Espectro de emissão

Embora o espectro de emissão de oxigênio singlete (bimol) seja complexo, utilizando fotocontadores adequados é possível diferenciar perfeitamente as bandas características de oxigênio singlete.

e) Estudos cinéticos

Utiliza-se a Eq. 13 onde a formação do endoperóxido AO_2 é representado por $I_0 - I_{A,Q}$, onde I_0 é a emissão do sistema na ausência de A e Q.

$$\frac{1}{I_0 - I_{A,Q}} = \left(1 + \left[\frac{(k_q + k_R)(Q) + k_d}{k_A} \right] \frac{1}{(A)} \right) \frac{1}{(I_{O_2})} \quad (\text{Eq. 13})$$

Se (Q) é constante e se a quantidade de A convertida em AO_2 se mantém abaixo de 10%, $1/(I_0 - I_{A,Q})$ vs $1/(A)$ dá linhas retas. Constância no coef. linear a diferentes concentrações de Q permite reconhecer a presença de oxigênio singlete, uma vez que se usam supressores específicos para esta espécie ou se tenha eliminado, previamente, as outras espécies ativas de oxigênio. Este método foi aplicado para ácido indol-3-acético e malonaldeído mostrando-se seu emprego muito relevante em sistemas biológicos.

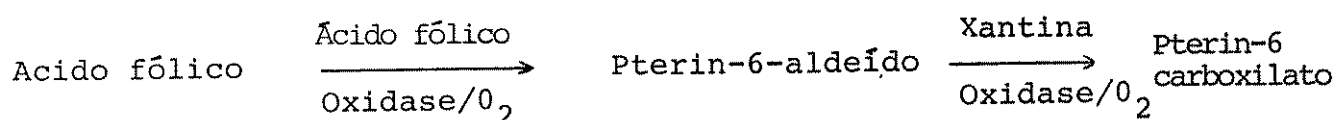
Os resultados dos sistemas bioquímicos investigados indicam que quando um conjunto de dados experimentais é usado (emissão, espectro de emissão, inibição por supressores específicos, análise de produtos, efeito de deutério, efeito de DABCO, transferência de energia para corantes xantênicos e técnicas cinéticas de estado estacionário), paralelamente à eliminação de outras espécies ativas de oxigênio por aniquiladores correspondentes, é possível concluir que o oxigênio singlete está presente com a mesma segurança que têm sido mostrado em experimentos fotoquímicos.

IV- ESTUDO DE EFEITOS DE OXIGÊNIO SINGLETE EM BIOMOLÉCULAS

IV-1. PROTEINAS

IV.1.1. XANTINA OXIDASE

Utilizando o método de fluorescência para medir atividade de xantina oxidase (245) foi mostrado que a inativação tanto fotodinâmica (azul de metileno/luz/ O_2) como a bioenergizada (utilizando o sistema Malonaldeído/HRP/ Mn^{++}/O_2) deram resultados semelhantes. As diferenças entre as duas maneiras de gerar oxigênio singlete surgem da inespecificidade do processo fotodinâmico, já que foram detectadas espécies como H_2O_2 , $OH^\cdot$, e $O_2^\cdot$ além de oxigênio singlete. Entretanto, no sistema de malonaldeído foi detectado somente oxigênio singlete. Este efeito de inativação, aparentemente, tem importância em casos de câncer, já que esta enzima se apresenta com muito baixa atividade nestas condições. Esta enzima está relacionada ao metabolismo de ácido fólico. Paralelamente, temos achado que no metabolismo de ácido fólico (vide Resultados e Discussão) é gerado oxigênio singlete, e que a enzima encarregada deste processo apresenta atividade aumentada em casos de câncer. (Eq.14).



Eq. 14

IV.1.2. LISOZIMA

A atividade desta enzima hidrolítica foi medida por tec-

nicas usuais (246). Esta enzima foi completamente inativada tanto pelo processo fotodinâmico (Riboflavina/luz/ O_2) como pelo processo bionergizado (utilizando o sistema malonaldeído/HRP/ Mn^{++}/O_2). Foram analisados os aminoácidos componentes da enzima e foi encontrado que no processo fotodinâmico tanto triptofano como histidina foram destruídos, ao passo que no caso bioenergizado só triptofano foi atingido. Isto mostra maior especificidade de ataque do oxigênio singlete gerado enzimaticamente.

IV.1.3. ÁCIDO FÓLICO OXIDASE.

Esta enzima foi purificada parcialmente por nós (247) a partir de eritrócitos e sua atividade foi medida pelo método bioenergizado (243). Na sua ação sobre ácido fólico, gera oxigênio singlete. Em casos normais esta enzima tem atividade baixas, mas em câncer se apresenta com atividades muito aumentadas. Esta propriedade tem sido utilizada para desenvolver no nosso laboratório, um método novo de marcação proteica para detecção precoce de câncer.

IV.2. ÁCIDOS NUCLEICOS.

IV.2.1. ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO.

O DNA submetido a processos fotodinâmicos (hematoporfirina/luz/ O_2) apresenta uma série de mudanças espectrais na região de UV, variações conformacionais, estudadas por dicroísmo circular e fluorescência (utilizando sondas).

Estas mesmas modificações foram observadas no tratamento com o processo bioenergizado (malonaldeído/HRP/ Mn^{++}/O_2). As mudanças

no DNA estão relacionadas com destruição da guanossina. Isto pode levar a despurinificação que por sua vez levaria a mutações espontâneas que acontecem em alguns sistemas celulares.

IV.2.2. ÁCIDO RIBONUCLEICO DE TRANSFERÊNCIA.

O tRNA submetido ao processo fotodinâmico (acridina orange/luz/ O_2) perde sua capacidade de aminoacilação. Estudos feitos com processos bionergizados (sistema Malonaldeído/HRP/ Mn^{++} / O_2) deram resultados semelhantes. As mesmas modificações espectrais estudadas com sonda de fluorescência e espectros de absorção foram encontradas. Possivelmente, aqui também, as mudanças devam-se à destruição da guanossina.

V. REFERÊNCIAS

1. C.S. Foote, em "Free Radicals in Biology", Ed. W.A. Pryor, Vol. 2, pp. 85, Academic Press, New York, 1976.
2. G.O. Schenck e E. Koch, Z. Elektrochem, 64, 170 (1960).
3. K. Gollnick, Adv. Photochem., 6, 1 (1968).
4. C.W. Bader e E.A. Ogryzlo, Disc. Faraday Soc., 37, 46 (1964).
5. A.U. Khan e M. Kasha, J. Chem. Phys., 39, 2105 (1963).
6. V.S. Srinivasan, D. Podolski, N.J. Westrick e D.C. Neckers ,
J. Amer. Chem. Soc., 100, 6513 (1978).
7. L.S. Jahuke e A.W. Ternkel, Photochem. Photobiol., 28, 517,
(1978).
8. G. Herzberg, em "Spectra of Diatomic Molecules", Van Nostram,
New York, 1950.
9. F.R. Gilmore, J. Quant. Spectr. Radiative Transfer., 5, 369,
(1965).
10. V. Degen, Can. J. Phys., 46, 783 (1968).
11. R. Siska, Aerosol Sci., 2, 229 (1971).
12. R.M. Badger, A.C. Wright e R.F. Whitlock, J. Chem. Phys., 43,
4345 (1965).
13. R.W. Nicholls, Can. J. Chem., 47, 1847 (1969).
14. W.H.J. Childs e R. Meeks, Z. Physik, 68, 344 (1931).
15. L. Wallace e D.M. Hunter, J. Geophys. Res., 73, 4813 (1968).
16. D.R. Kearns, Photochem. Photobiol., 10, 193 (1969).
17. R.P. Wayne, Advan. Photochem. 7, 311 (1969).
18. C.S. Foote, em "Singlet Oxygen, Reaction with Organic Compounds
and Polymers" Ed.B. Ramby e J.F. Rabek, pp.135, John Wiley
and Sons, New York, 1978.
19. C.S. Foote, em "Singlet Oxygen", Ed. H.H. Wasserman e R.W.

Murray, pp. 139, Academic Press Inc., New York, 1979.

20. C.S. Foote, em "Biochemical and Clinical Aspect of Oxygen" ,
Ed. W.S. Caughey, pp. 603, Academic Press Inc., New York,
1979.
21. C.S. Foote e R.W. Denny, J. Amer. Chem. Soc., 93, 5168 (1971).
22. G.O. Schenck e K. Gollnick, em "Forschungsbericht des Landes
Nordrhein-Westfalen", Nr. 1256, West Deutscher, Köln and
Opladen, 1963.
23. E.J. Bowen, Advan. Photochem., 1, 23 (1963).
24. R. Livingston e K.E. Owens, J. Amer. Chem. Soc., 78, 3301
(1956).
25. C.S. Foote, E.H. Peterson e K.W. Lee, J. Amer. Chem. Soc., 94,
1032 (1972).
26. P.B. Merkel e D.R. Kearns, Chem. Phys. Lett., 12, 120 (1971).
27. P.B. Merkel e D.R. Kearns, J. Amer. Chem. Soc., 94, 7244
(1972).
28. C.S. Foote e R.W. Denny, J. Amer. Chem. Soc., 90, 6233 (1968).
29. P.B. Merkel e D.R. Kearns, J. Amer. Chem. Soc., 94 1029 (1972).
30. C.S. Foote, R.W. Denny, L. Weaver, Y. Chang e J. Peter, Ann.
N. Y. Acad. Sci., 171, 139 (1970).
31. J. Calvert e J.N. Pitts, Jr. "Photochemistry" p. 532ff, Wiley,
New York, 1966.
32. C.S. Foote, Acc. Chem. Rev., 1, 104 (1968).
33. R. Higgins, C.S. Foote e H. Cheng, Advan. Chem. Ser., 77 (III),
102 (1968).
34. P.D. Bartlett, G.D. Mendenhall e A.P. Schaap, Ann. N. Y. Acad.
Sci., 171 79 (1970).
35. L.W. Bader e E.A. Ogryzlo, Discuss. Faraday Soc., 37, 46 (1964).
36. E.J. Corey e W.C. Taylor, J. Amer. Chem. Soc., 86, 3881 (1964).

37. J.T. Herron e R.E. Huie, Ann. N. Y. Acad. Sci., 171, 229
(1970).
38. I. Saito, S. Kato e T. Matsuura, Tetrahedron Lett., 239(1970).
39. T. Matsuura, N. Yoshimura, A. Nishinaga e I. Saito,
Tetrahedron, 28, 4933 (1972).
40. G.W. Grams, Tetrahedron Lett., 4823 (1971).
41. F.R. Hallett, B.P. Hallet e W. Snipes, Biophys. J., 10, 305
(1970).
42. K. Goda, T. Kimura, A.L. Thayer, K. Kees e A.P. Schaap,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 58, 660 (1974).
43. D.J.T. Porter e L.L. Ingraham, Biochim. Biophys. Acta., 334,
97 (1974).
44. J.M. Audry, J. Rigoudy e N.K. Cuong, Photochem. Photobiol. 33,
155 (1981).
45. K. Gollnick e G.O. Schenck, em "1,4-Cycloaddition Reactions",
Ed. J. Hamer, pp.255, Academic Press, New York, 1967.
46. J.S. Bellin e C.A. Yankus, Arch. Biochem. Biophys., 123, 18
(1968).
47. H.E.A. Kramer e A. Maute, Photochem. Photobiol., 17, 413
(1973).
48. R. Nilsson, P.B.Merkel e D.R. Kearns, Photochem. Photobiol.,
16, 117 (1972).
49. P.R. Ogilby e C.S. Foote, J. Amer. Chem. Soc., 103, 1219(1981).
50. S.J. Arnold, M. Kubo e E.A. Ogrizlo, Adv. Chem. Ser., 77, 133
(1968).
51. C.A. Long e D.R. Kearns, J. Amer. Chem. Soc., 97, 2018(1975).
52. J.W. Ellis e H.O. Kneser, Z. Phys., 86, 583 (1933).
53. M. Kasha e D.E. Brabham, em "Singlet Oxygen", Eds. H.H.Wasserman
and R.W.Murray, Academic Press, New York, pp.1, 1979.

54. P. Groh e K.A. Kirrmann, C.R. Hedb, Seances Acad. Sci., 215, 275 (1942).
55. J. Stauff e H. Schmidkunz, Z. Phys. Chem., 25, 295 (1962).
56. S.J. Arnold, E.A. Ogryzlo e H. Witzke, J. Chem. Phys., 40, 1769 (1964).
57. A.U. Khan e M. Kasha, J. Amer. Chem. Soc., 92, 3293 (1970).
58. R.J. Browne e E.A. Ogryzlo, Proc. Chem. Soc. London, p. 117 (1964).
59. E.A. Ogryzlo, em "Singlet Oxygen", Eds. H.H. Wassermann and R.W. Murray, Academic Press, New York, pp. 35, 1979.
60. E.A. Ogryzlo e E.A. Pearson, J. Phys. Chem., 72, 2913 (1968).
61. T. Wilson, J. Amer. Chem. Soc., 91, 2387 (1969).
62. A.U. Khan e M. Kasha, J. Amer. Chem. Soc., 88, 1574 (1966).
63. D.E. Brabham e M. Kasha, Chem Phys, Lett., 29, 159 (1974).
64. C.S. Foote, Y.C. Chang e R.W. Denny, J. Amer. Chem. Soc., 92, 5216 (1970).
65. R.S. Davidson e K.R. Trethewey, J. Amer. Chem. Soc., 98, 4008 (1976).
66. R.S. Davidson e K.R. Trethewey, J. Chem. Soc. Perkin Trans., II, 169, 173 (1977).
67. N.I. Krinsky, em "Singlet Oxygen", Ed. H.H. Wassermann e R.W. Murray, pp. 597, Academic Press, New York, 1979.
68. R.C. Allen, em "Frontiers in Biology", Eds. J.J. Dingle, P.J. Jacques e F.H. Shaw, pp. 197, North Holland, Amsterdam, 1979.
69. J. Schadelin, R. Schadelin e G.C. Mandell, CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 13, 1 (1981).
70. A.U. Khan, Photochem. Photobiol., 28, 615 (1978).
71. K. Kakimura, E. Cadenas, A. Boveris e B. Chance, FEBS Lett.,

- 102, 38 (1979).
72. B. Halliwell, FEBS Lett., 72, 8 (1976).
 73. R.M. Arneson, Arch. Biochem. Biophys, 136, 352 (1970).
 74. K. Schested, O.L. Ramussen e H. Fricke, J. Phys.Chem., 72, 626 (1968).
 75. C.S. Foote, F.C. Shook e R.A. Abakerli, J. Amer. Chem. Soc., 102, 2503 (1980).
 76. L.L. Smith e M.J. Kulig, J. Amer. Chem. Soc., 98, 1027(1976).
 77. J. Schultz e K. Kaminker, Arch. Biochem. Biophys, 96, 465 (1962).
 78. S.J. Klebanoff, J. Bacteriol., 95, 2131 (1968).
 79. B.R. Andersen, A.M. Bræzel e T.F. Lint, Infect. Immun., 17, 62 (1977).
 80. R.C. Allen e L.D. Loose, Biochem. Biophys. Res. Commun, 69, 245 (1976).
 81. C. Beauchamp e I. Fridovich, J. Biol. Chem., 245, 4641 (1970).
 82. N. Durán, em "Chemical and Biological Generation of Excited States", Eds.W. Adam e G. Cilento, Academic Press, New York 1981/1982, no prelo.
 83. N.I. Krinsky, Science, 186, 363 (1974).
 84. S.J. Klebanoff, Semin. Hematol., 12, 117 (1975).
 85. H. Rosen e S.J. Klebanoff, J. Biol. Chem., 252, 4803 (1977).
 86. M.M. King, E.F. Lai e P.B. McCay, J. Biol. Chem., 250, 6496 (1975).
 87. C.S. Foote e T.Y. Ching, J. Amer. Chem. Soc., 97, 6209 (1975).
 88. C.F. Deneke e N.I. Krinsky, Photochem. Photobiol., 25, 299 (1977).
 89. E.K. Hodgson e I. Fridovich, Biochemistry, 13, 3811 (1974).
 90. P.B. Merkel, R. Nilsson e D.R. Kearns, J. Amer. Chem. Soc., 94,

1030 (1972).

91. J. Stauff e H. Wolf, Z. Naturforsch B, 19, 87 (1964).
92. J. Stauff, U. Sander e W. Jaeschke, em "Chemiluminescence and Bioluminescence", Eds. M.J. Cormier, D.H. Hercules e J.Lee, pp. 131, Plenum, New York, 1973.
93. T.C. Pederson e S.D. Aust, Biochem. Biophys. Res. Commun, 52, 1071 (1973).
94. R.F. Boyer, C.G. Lindstrom, B. Darby e M. Hylarides, Tetrahedron Lett., 4111 (1975).
95. E.W. Kellong e I. Fridovich, J. Biol. Chem., 250, 8812 (1975).
96. B.A. Svingen, F.O. O'Neal e S.D. Aust, Photochem. Photobiol., 28, 803 (1978).
97. R.L. Fong, P.B. McCay, J.L. Poyer, H.P. Misra e B.B. Keele, Chem. Biol. Interact., 15, 77 (1976).
98. W.A. Pryor, Photochem. Photobiol., 28, 787 (1978).
99. E.K. Hodgson e I. Fridovich, Arch. Biochem. Biophys., 172, 202 (1976).
100. A.M. Michelson e P. Durosay, Photochem. Photobiol., 25, 55 (1977).
101. A.U. Khan, J. Phys. Chem., 80, 2219 (1976).
102. R.M. Howes e R.H. Steele, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 2, 619 (1971).
103. J.R. Wright, R.C. Rumbaugh, H.D. Colby e P.R. Miles, Arch. Biochem. Biophys., 192, 344, (1979).
104. S.C. Guttaus, W.H. Baricos e R.H. Steele, Biochim. Biophys. Acta, 586, 112 (1979).
105. C.A. Sternson e R.A. Wiley, Chem. Biol. Interact., 5, 317 (1972).
106. G.O. Schenok, Angew. Chem., 69, 579 (1957).

107. L.L. Smith e J.I. Teng, J. Amer. Chem. Soc., 96, 2640 (1974).
108. T.C. Pederson e S.D. Aust, Biochem. Biophys. Acta, 385, 232 (1975).
109. B.A. Svingen, J.A. Buege, F.O. O'Neal e S.D. Aust, J. Biol. Chem., 254, 5892 (1979).
110. H.P. Wang e T. Kimura, Biochim. Biophys. Acta., 423, 374, (1976).
111. P.T. O'Brien e A.D. Rahimtula, J. Agr. Food Chem., 23, 154, (1975).
112. A.D. Rahimtula e P.J. O'Brien, Biochem. Biophys. Res. Commun., 70, 893 (1976).
113. A. Boveris, B. Chance, M. Filipkoski, Y. Nakase e K.G. Paul, em "Frontiers of Biological Energetics", Eds. A.Scarpa, P.L. Dutton e J.J. Leigh, Jr., vol.2, pp. 975, Academic Press, New York, 1978.
114. C. Auclair e M.C. Lecomte, Biochem. Biophys. Res. Commun., 85, 946 (1978).
115. M. Nakano e T. Noguchi, em "Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen", Eds. O. Hayaishi e J. Asada, pp.29, University Park Press, Baltimore, 1977.
116. J.A. Howard e K.U. Ingold, J. Amer. Chem. Soc., 90, 1056 (1968).
117. G.A. Russell, J. Amer. Chem. Soc., 79, 3871 (1957).
118. P.B. McCay, K.L. Fong, M. King, E. Lai, C. Weddle, L. Poyer e K.R. Hornbrook, em "Lipids", Eds. R. Paoletti, G. Porcellati e G. Jacini, vol. 1, pp.157, Raven, New York, 1976.
119. C. Chen e M.H. Tu, Biochem. J., 160, 805 (1976).
120. E. Boyland e P. Sims, Biochem. J., 95, 780 (1968).
121. J.E. Baldwin, H.H. Basson, J. Krauss, Jr. Chem. Commun., 984 (1968).

122. S.G. Sligar, J.D. Lipscomb, P.G. Debrunner e I.C. Gunsalus,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 61, 290 (1974).
123. K. Goda, J.W. Chu, T. Kimura e A.P. Schaap, Biochem. Biophys. Res. Commun., 52, 1300 (1973).
124. J.P. Hamman e H.H. Seliger, Biochem. Biophys. Res. Commun., 70, 675 (1976).
125. H.H. Seliger e J.P. Hamman, J. Phys. Chem., 80, 2296 (1976).
126. B. Samuelsson, J. Amer. Chem. Soc., 87, 3011 (1965).
127. R.V. Pangamala, N.R. Brownlee, H. Sprecher e D.G. Cornwell,
Prostaglandins, 7, 21 (1974).
128. R.V. Pangamala, N.R. Brownlee, H. Sprecher, J.C. Greer e D.G. Cornwell, Prostaglandins, 8, 3 (1974).
129. R.V. Pangamala, H.M. Sharma, R.E. Heikkilla, J.C. Geer e D.G. Cornwell, Prostaglandins, 11, 599 (1976).
130. L.S. Marnett, P. Wlodawer e B. Samuelsson, Biochem. Biophys. Res. Commun., 60, 1228 (1974).
131. L.S. Marnett, P. Wlodawer e B. Samuelsson, J. Biol. Chem., 250, 8510 (1975).
132. B. Samuelsson, E. Granstrom, K. Green e M. Hamberg, Ann. N.Y. Acad. Sci., 180, 138 (1971).
133. T. Yoshimoto, S. Yamamoto, K. Sugioaka, M. Nakano, C. Takyu, A. Yamaguishi e H. Inaba, J. Biol. Chem., 255, 10199 (1980).
134. Yu. A. Vladimirov, D.I. Roshchupkin e E.E. Fesenko, Photochem. Photobiol., 11, 227 (1970).
135. D.E. Morse, H. Duncan, N. Hooker e A. Morse, Science, 196, 298 (1977).
136. D.E. Morse, H. Duncan, N. Hooker e A. Morse, Proc. Um. Symp. Progr. Carib. Res. (CICAR-II) Caracas, Venezuela 1977.
137. Yu.A. Vladimirov, em "Ultraewak Luminescence Accompanying

- Biochemical Reactions", USSR Acad. Sci. Inst. Biol. Phys.
Moscow Translation NASA TT F-456, Virginia, USA, 1966.
138. M. Nakano e K. Sugioka, Arch. Biochem. Biophys., 181, 371 (1977).
 139. M. Hamberg e B. Samuelsson, J. Biol. Chem., 242, 5329 (1967).
 140. H.W.-S. Chan, Chem. Commun., 1550 (1970).
 141. H.W.-S. Chan, J. Amer. Chem. Soc., 83, 2357 (1971).
 142. A. Finazzi Agro, P. De Sole, G. Rotilio e B. Mandovi, Ital. J. Biochem, 22, 217 (1973).
 143. J.E. Baldwin, J.C. Swallow e H.W.-S. Chan, Chem. Commun., 1407 (1971).
 144. J.I. Teng e L.L. Smith, J. Amer. Chem. Soc., 95, 4060 (1979).
 145. J.I. Teng e L.L. Smith, Biorganic Chem., 5, 99 (1976).
 146. R. Nilsson e D.R. Kearns, J. Phys. Chem., 78, 1681 (1974).
 147. O.M.M. Faria Oliveira, D.L. Sanioto e G. Cilento, Biochem. Biophys. Res. Commun., 58, 391 (1974).
 148. G.D. Smith e H.K. Schachman, Biochemistry, 12, 3789 (1973).
 149. W.L. Smith e W.E.M. Lands, J. Biol. Chem., 247, 1038 (1972).
 150. A. Boveris, E. Cadenas e B. Chance, Photobiochem. Photobiophys., 1, 175 (1980).
 151. Ye.A. Neifakh, Biofizika, 16, 560 (1971).
 152. S.N. Orlov, V.S. Danilov, Yu.A. Makov e V.G. Rebtov, Biophysics (Moscow) 20, 231 (1975).
 153. D.J. Bogan, J.C. Durant, R.S. Sheison e F.W. Williams, Photochem. Photobiol., 30, 3 (1979).
 154. Yu.A. Vladimirov, F.F. Litvin e M.-C. T'an, Biofizika, 7, 675 (1962).
 155. U. Gallo e L. Santamaria (Eds) em "Research Progress in Organic Biological and Medicinal Chemistry", vol.3, Elsevier,

New York, 1972.

156. D.J.T. Porter e L.L. Ingraham, Biochem. Biophys. Acta, 334, 97 (1974).
157. J.F. Piatt, A.S. Chema e P.J. O'Brien, FEBS Lett., 74, 232 (1977).
158. Z. Placer, A. Veselkova e R. Rath, Experientia, 21, 19 (1965).
159. F.N. Summerfield e A.L. Tappel, Biochem. Biophys. Res. Commun., 82, 547 (1978).
160. C. Vidigal-Martinelli, K. Zinner, B. Kashar, N. Durán e G. Cilento, FEBS Lett., 108, 266 (1979).
161. A.A. Gurvich, Biofizika, 10, 619 (1965).
162. O. Becher, Biol. Zbl., 76, 141 (1957).
163. S.V. Konev, N.A. Trotskii e M.A. Katibnikov, V Intern. Biochemical Congress, Moscow, Izd-vo AN SSSR 2, 35 (1961).
164. N.A. Troitskii, S.V. Konev e M.A. Katibnikov, Biofizika, 6, 238 (1961).
165. J.S. Arnold, R.J. Brown e E.A. Ogryzlo, em "Symposium on Chemiluminescence", Durham, North Carolina, March p.35, 1965.
166. W.E. Arthur e B.C. Strehler, Arch. Biochem. Biophys., 70, 507 (1957).
167. B.C. Strehler, Arch. Biochem. Biophys., 34, 239 (1951).
168. B.C. Strehler e W. Arnold, J. Gen. Physiol., 34, 809 (1951).
169. G. Cilento, em "Symposium on Chemiluminescence", Durham, North Carolina, March p. 415, 1965.
170. G. Cilento, Photochem. Photobiol., 4, 1243 (1965).
171. L. Colli, U. Facchini, G. Guidotti, R.D. Conati, M. Orsenigo e O. Sommariva, Experientia, 11, 479 (1955).

172. L. Colli e U. Facchini, Nuovo Cimento, 12, 150 (1954).
173. Yu.A. Vladimirov e F.F. Litvin, Biofizika, 10, 614 (1965).
174. B.N. Tarusov, F.I. Polivoda e A.I. Zhuravlev, Biofizika, 6, 490 (1961).
175. B.N. Tarusov, A.N. Polivoda, A.I. Zhuravlev e Ye.N. Sekamova, Tsitologiya, 4, 696 (1962).
176. A.I. Zhuravlev, B.N. Tarusov e T.D. Easakova, Acta Unio. Intern. Contra Cancrum, 20, 1395 (1964).
177. J. Stauff e H. Schmidkunz, Z. Physik. Chem., 35, 295 (1962).
178. J. Stauff e H. Schmidkunz, Z. Physik. Chem., 33, 273 (1962).
179. Yu.A. Vladimirov e S.F. L'vova, em "Biophysics of the Cells", pp. 74, Izd-vo, Nauka, Moscow, 1965.
180. R.D. Lippman, Exp. Gerontol., 15, 339 (1980).
181. A.I. Polivoda e Ye.N. Sekamova, Radiobiologiya, 2, 801 (1962).
182. A. Boveris, E. Cadenas, R. Reiter, M. Filipkowski, Y. Nakase e B. Chance, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 347 (1980).
183. E. Cadenas, A. Boveris e B. Chance, Biochem. J., 186, 659 (1980).
184. E. Cadenas, A. Boveris e B. Chance, Biochem. J., 187, 131 (1980).
185. E. Cadenas, I. D-Arad, A.B. Fisher e B. Chance, Biochem. J., 192, 303 (1980).
186. J. Stauff e G. Reske, Naturwissenschaften, 51, 39 (1964).
187. J. Stauff e J. Ostrowski, Z. Naturforsch. B., 22, 734 (1967).
188. A. Boveris, E. Cadenas e B. Chance, Fed. Proc., 40, 195 (1981).
189. B.B. Vartapetian, L.P. Agapuva, A.A. Averianov e V.A. Vaselowskii, Nature (London), 249, 269 (1974).
190. A.Sh. Agaverdiger e B.N. Tarusov, Biofizika, 10, 351 (1965).

191. V.A. Veselowsky, Ye.N. Sekamiva e B.N. Tarusov, Biofizika, 8,
125 (1963).
192. R.A. Gasanov e T.G. Mamedov, Nauchn. Dokl. Vysshei. Shkoly.
Biol. Nauki, 3, 88 (1963).
193. R.A. Gasanov, T.G. Mamedov e B.N. Tarusov, Dokl. Biol. Sci.
Sect., 153, 1480 (1963).
194. R.A. Gasanov, T.G. Mamedov e B.N. Tarusov, Dokl. Biol. Sci.
Sect., 150, 645 (1963).
195. R.A. Gasanov, T.G. Mamedov e B.N. Tarusov, em "Bioluminescence"
Trudy MOIP, Moscow Izd-vo Nauka, 21, 64 (1965).
196. F.B. Abeles, Plant Physiol., 62, 696 (1978).
197. M.L. Salim e S.M. Bridges, Plant. Physiol., 67, 43 (1981).
198. N. Durán, O.M.M. Faria Oliveira, M. Haun e G. Cilento, J. Chem.
Soc. Chem Commun., 442 (1977).
199. O.M.M. Faria Oliveira, M. Haun, N. Durán, P.J. O'Brien, C.R.
O'Brien, E.J.H. Bechara e G. Cilento, J. Biol. Chem., 253,
4707 (1978).
200. E.J.H. Bechara, O.M.M. Faria Oliveira, N. Durán, R.C. De
Baptista e G. Cilento, Photochem. Photobiol., 30, 101 (1979).
201. E.J.H. Grabonski e R.L. Autrey, Tetrahedron, 25, 4315 (1969).
202. H.H.W. Thijssen, Anal. Biochem., 54, 609 (1973).
203. P.A. Srere, G.W. Kosicki e R. Lumry, Biochem. Biophys. Acta.,
50, 184 (1961).
204. J.B. Lee, B.G. Cavino, B.H. Takmen e E.R. Smith, Circulation
Res., 27, 57 (1965).
205. T. Miyamoto, S. Yamamoto e O. Hayaishi, Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, 71, 3645 (1974).
206. O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough e A.L. Farr, J. Biol. Chem., 193,
265 (1951).

207. D.H. Nughteren e E. Hazeldorf, Biochim. Biophys. Acta., 326, 448 (1973).
208. A.C. Bratton e E.K. Marshall, J. Biol. Chem., 128, 537 (1939).
209. I. Aravindakshan e B.M. Braganca, Biochim. Biophys. Acta, 27, 345 (1958).
210. B.M. Braganca, I. Aravindakshan e D.S. Ghanecker, Biochim. Biophys. Acta., 25, 623 (1957).
211. C.C.C. Vidigal, A. Faljoni-Alario, N. Durán, K. Zinner, Y. Shimizu e G. Cilento, Photochem. Photobiol., 30, 195 (1979).
212. M. Haun, N. Durán, O. Augusto e G. Cilento, Arch. Biochem. Biophys., 200, 245 (1980).
213. J.W. Hastings e G. Weber, J. Opt. Soc. Am., 53, 1410 (1963).
214. G. Cilento, Photochem. Photobiol. Rev., 5, 199 (1980).
215. G. Cilento, Acc. Chem. Res., 13, 225 (1980).
216. G. Cilento, N. Durán, K. Zinner, C.C.C. Vidigal, O.M.M. Faria Oliveira, M. Haun, A. Faljoni, O. Augusto, R.C. De Baptista e E.J.H. Bechara, Photochem. Photobiol., 28, 445 (1978).
217. M. Hamberg, FEBS Lett., 5, 127 (1969).
218. K. Crowshaw, Nature, 231, 240 (1971).
219. J.C. Frolich, B.J. Sweetman, K. Carr e J.A. Oates, Life Sci., 17, 1105 (1975).
220. E.G. Daniels, J.W. Hennen, B.E. Leach e E.E. Muihead, Nature, 215, 1298 (1967).
221. J.B. Lee, K. Crowshaw, B.H. Takman, K.A. Atreep e J.Z. Goughoutae, Biochem. J., 105, 1251 (1967).
222. H.H. Tai, Fed. Proc., 34, 672 (1975).
223. R.V. Pangamala, Fed. Proc., 34, 655 (1975).
224. H.H. Tai, C.L. Tai e C.S. Hollander, Biochem. J., 154, 257 (1976).

225. T. Miyamoto, N. Ogino e O. Hayaishi, J. Biol. Chem., 251, 2629 (1976).
226. P.O. O'Brien e A. Rahimtula, Biochem. Biophys. Res. Commun., 70, 832 (1976).
227. M. Hemler, W.E.M. Lands e W.L. Smith, J. Biol. Chem., 251, 5575 (1976).
228. N. Durán, em Abst. VII Int. Congress Biophysics, Mexico, 1981.
229. F.W. Krueger e B. Bertram, Z. Krebsforsch. Klin. Onkol., 80, 189 (1973).
230. J. Sander, M. Ladenstein, J. Labar e F. Schwiensberg, IARC Sci. Publication, "9 (N-nitroso Compd. Environ. Proc. Work. Conference", 205 (1975).
231. N. Durán e A. Faljoni, Rev. Latinoamer. Quím., 9, 193 (1978).
232. B. Singer, Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 15, 219 (1975).
233. A.E. Pegg, Advan. Cancer Res., 25, 195 (1977).
234. F.J. Hawco, C.R. O'Brien e P.J. O'Brien, Biochem. Biophys. Res. Commun., 76, 354 (1977).
235. D.F. Bowman, T. Gillan e K.U. Ingold, J. Amer. Chem. Soc., 93, 6555 (1971).
236. M. Mutsumoto, R. Oyasu, M.L. Happ e T. Kitajima, J. Natl. Cancer Inst., 58, 1825 (1977).
237. P.S. Engel e B.M. Monroe, Advan. Photochem., 8, 245 (1971).
238. N. Durán, M. Haun e J.E. Brunet, Rev. Latinoamer. Quím., 12, 1 (1981).
239. N. Durán, K. Zinner, R.C. De Baptista, C.C.C. Vidigal e G. Cilento, Photochem. Photobiol., 24, 383 (1976).
240. K.C. Wu e A.M. Trozzolo, J. Photochem., 10, 407 (1979).
241. B.R. Andersen, T.F. Lint e A.M. Brendzel, Biochem. Biophys. Acta., 542, 527 (1978).

242. J. Cadet e R. Teoule, Photochem. Photobiol., 28, 661 (1978).
243. S.M. De Toledo, M. Haun, E.J.H. Bechara e N. Durán, Anal. Biochem., 105, 36 (1980).
244. L.H. Innocentini, S.M. De Toledo e N. Durán, An. Acad. Brasil. Cienc., 52, 691 (1980).
245. A. McHale, H. Grimes e M.P. Coughlan, Int. J. Biochem., 10, 317 (1979).
246. E. Silva, Radiat. Envirom. Biophys., 16, 71 (1979).
247. N. Durán, Y. Makita e L.H. Innocentini, Biochem. Biophys. Res. Commun., 88, 642 (1979).
248. A. Zweig e W.A. Henderson, J. Polym. Sci, Polym. Chem. Ed., 13, 717 (1975).