

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

GERAÇÃO DE² OXIGÊNIO SINGLETE NA DEGRADAÇÃO
DE MALONALDEÍDO POR PEROXIDASE

SANDRA TEREZINHA DE FARIAS FURTADO

Orientador: Prof. Dr. NELSON DURÁN

TESE DE MESTRADO

1982

F984g

4435/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

*Ao Tarcísio, Cíntia e Lillian,
com carinho e afeto.*

Aos meus pais e irmãos pela
compreensão, carinho, incentivo,...

A G R A D E C I M E N T O S

- Ao Prof. Dr. Nelson Durán pela eficiência e dedicação na orientação deste trabalho.
- À Dra. Marcela Haun pelo prestimoso auxílio no trabalho com lisozima.
- À Dra. Sônia M. de Toledo pela ajuda na extração do DNA e E. coli.
- À Lídia A. Guillo e à Cristina Marcucci pela amizade e ajuda que me ofereceram.
- Ao grupo do Laboratório do Prof. Durán, minha gratidão.
- À Maria A. de Souza pelo incentivo no decorrer deste trabalho.
- À Carlos A. Caetano pelo apoio, incentivo e discussões referentes ao trabalho.
- À João P. Gões Filho pela amizade e correção da redação desta tese.
- À Lúcia H. Seron e Rogério Custódio pela colaboração.
- Ao Prof. Dr. Guiseppe Cilento por ter cedido seu laboratório em algumas das experiências.
- Ao Sidney pelo eficiente trabalho realizado nos desenhos.
- À Taka pelo excelente trabalho datilográfico.
- À todas as pessoas que contribuíram para a realização desta tese.
- Ao CNPq, FINEP, FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro.
- Ao Senhor, meu Deus, agradeço por tudo.

SUMÁRIO

ABSTRACT

OBJETIVOS DA TESE

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Estados excitados	2
1.1.1. Geração química de espécies excitadas	4
a) Transferência de elétrons	4
b) Decomposição de estruturas do tipo 1,2-dioxetano..	7
c) Reação de auto-oxidação via radicais peróxidos ...	8
1.1.2. Geração biológica de espécies excitadas	9
a) Bioluminescência	9
b) Processos bioenergizados	10
c) Papel da peroxidase em processos bioenergizados ..	12
1.2. Oxigênio Singlete	13
1.2.1. Geração de Oxigênio Singlete	16
a) Geração fotossensibilizada de $^1\text{O}_2$	17
1i) Reação do Tipo I	18
2i) Reação do Tipo II	19
b) Fontes químicas de geração de oxigênio singlete ..	20
1i) Reação de H_2O_2 em um hipoclorito (OCl^-)	20
2i) Reação de H_2O_2 e o radical $\text{O}_2^{\cdot -}$	20
3i) Geração de $^1\text{O}_2$ a partir de $\text{O}_2^{\cdot -}$ e $\text{OH}^{\cdot}$	21
4i) Decomposição de íon $\text{O}_2^{\cdot -}$	21
5i) Transferência de elétrons de $\text{O}_2^{\cdot -}$ para radicais cátions	21

6i) A dismutação de $O_2^{\cdot -}$	21
7i) Desproporcionamento de H_2O_2	21
8i) Decomposição de ozonetos	22
9i) Quebra de hidroperóxidos lipídicos	22
10i) Produção enzimática de 1O_2	22
c) Métodos físicos	23
i. Descargas gasosas	23
1.2.2. Identificação de Oxigênio Singlete	24
a) Análise de Produtos	24
i) Adição 1,4 a dienos e heterocíclicos, análogos a reação de Diels-Alder	24
2i. Reação-ene com olefinas	25
3i. Adição 1,2 à olefinas ricas em elétrons tais co- mo enaminas e éteres vinílicos	26
4i. Oxidação de sulfetos para sulfóxidos	27
5i. Oxidação de fenóis	27
6i. β -caroteno	28
b) Uso de água deuterada	28
c) Inibição por desativadores específicos	28
i. Carotenóides	28
2i. Aminas	28
3i. Tocoferóis	29
4i. Derivados de Aminoácidos e Peptídeos	29
5i. Derivados de Ácidos Nucleicos	31
6i) Lipídeos	32
1.2.3. Implicações médicas e biológicas	33
a) Porfiria	33
b) Tratamento de Icterícia do Recém-Nascido	33
c) Tratamento de <u>Herpes simplex</u>	34

d) Fotocarcinogênese	34
1.3. Malonaldeído e sua Toxicidade	35
1.4. Oxigênio Singlete e DNA	39
1.5. Oxigênio Singlete e Supressores Biológicos	41
1.6. Oxigênio Singlete e Lisozima	43

CAPÍTULO 2

2. PARTE EXPERIMENTAL	45
2.1. Material	45
2.2. Aparelhagem	47
2.3. Métodos	48
2.3.1. Síntese	48
a) Malonaldeído sódico (M.A.)	48
b) Malonaldeído ácido (M.A.H.)	49
c) β -Etoxi-acroleína (BEA)	49
2.3.2. Ácido desoxirribonucleico (DNA)	50
a) Extração de DNA de <u>Escherichia coli</u> (<u>E.coli</u>) C-600	50
b) Precipitação do ácido desoxirribonucleico (DNA) .	51
c) Soluções	51
i. Estoque	51
2i. Espectro na região U.V.	52
3i. Complexação com Tb^{+3}	52
2.3.3. Lisozima	52
2.3.4. Solução em geral	53
a) L-histidina	53

b) Peroxidase do rabanete ("horseradish peroxidase"-HRP	53
c) Tampão acetato	53
d) Bilirrubina	53
e) Hematoporfirina	53

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS	54
3.1. Estudos cinéticos para o sistema M.A./Mn ⁺² /HRP/O ₂	54
3.1.1. Otimização das condições experimentais para o sistema M.A./Mn ⁺² /HRP/O ₂	54
3.1.2. Consumo de Oxigênio	54
a) efeito da concentração de íons Mn ⁺²	54
b) Efeito de concentração da peroxidase	55
c) Efeito da concentração do tampão acetato	55
d) Efeito da concentração de M.A.	55
3.1.3. Emissão	63
a) Efeito da concentração de íons Mn ⁺²	63
b) Efeito da concentração da peroxidase	63
c) Efeito de concentração do tampão acetato	68
d) Efeito do pH	68
e) Efeito da concentração de M.A.	68
f) Efeito da concentração de M.A.H. (malonaldeído ácido)	68
3.1.4. Estudos para a proposição do mecanismo ...	68
a) Efeito do íon N ₃ ⁻ na atividade de HRP	73
b) Efeito de H ₂ O ₂ e catalase no consumo de O ₂ ...	73

c) Estudo cinético dos intermediários da peroxidase durante a reação	73
d) Efeito de H_2O_2 na emissão do sistema (com M.A.H.)	76
3.1.5. Comparação entre β -etóxi-acroleína (BEA) (80) e malonaldeído	76
3.2. Detecção de Oxigênio Singlete	76
3.2.1. Efeito da guanosina sobre a emissão	80
a) Análise Stern-Volmer para guanosina	80
b) Análise Duplo-recíproco para guanosina	80
3.2.2. Efeito da histidina sobre a emissão	84
a) Análise Stern-Volmer para histidina	84
b) Análise Duplo-Recíproco para histidina	84
3.2.3. Efeito de bilirrubina e 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato sobre a emissão	88
3.2.4. Efeito de β -(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina .	88
3.2.5. Efeito de 1,4-diazobiciclo(2.2.2)octano, metionina e triptofano	88
3.2.6. Efeito de (8- 3H)-guanosina	90
3.2.7. Efeito de deutério	90
3.2.8. Efeito da catalase, superóxido dismutase(SOD), benzoato e bicarbonato na emissão	91
3.3. Efeito de oxigênio singlete sobre ácido desoxirribonucleico e lisozima	91
3.3.1. Estudo do ácido desoxirribonucleico (DNA) sobre a emissão	91
a) Análise Stern-Volmer para ácido desoxirribonucleico	93

b) Análise Duplo-Recíproco para ácido desoxirribonucleico	93
3.3.2. Espectro na região U.V. de ácido desoxirribonucleico (DNA) de <u>E.coli</u>	93
a) Iluminação na presença de hematoporfirina	93
b) Tratamento de <u>E.coli</u> no sistema	96
i. DNA sem sofrer desnaturação	96
2i. DNA tratado no sistema e depois desnaturado ...	96
3i. DNA desnaturado e depois tratado	96
3.3.3. Aumento de fluorescência de Tb^{+3} por DNA de <u>E.coli</u>	96

CAPÍTULO 4

4. DISCUSSÃO	103
4.1. Estudos Cinéticos	103
4.2. Detecção de Oxigênio	109
4.3. Ácido Desoxirribonucleico e Oxigênio Singlete	117
4.4. Oxigênio Singlete e Proteínas	121
4.5. Conclusões Gerais	121

CAPÍTULO 5

5. APÊNDICES	123
5.1. Apêndice 1 (Turro, 1967)	123
5.1.1. Cálculo de τ (tempo de meia vida da espécie excitada	123

5.1.2. Cálculo de β (concentração do supressor que inibe metade da concentração da espécie emissiva).....	125
5.2. Apêndice 2 (Lehninger, 1970)	128
5.2.1. Equação de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk	128
5.2.2. Equação de Lineweaver-Burk	131
5.3. Apêndice 3 (Robinson e Cooper, 1970)	132
5.3.1. Cálculo da velocidade de consumo de oxigênio	132
BIBLIOGRAFIA	133

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Pág.</u>
Figura 1.1 - Interação de heme com apoenzima na peroxidase	11
Figura 1.2 - Ciclo da peroxidase do rabanete	11
Figura 1.3 - Níveis de energia do orbital molecular do 1O_2	15
Figura 1.4 - Métodos para a geração de O_2	17
Figura 1.5 - 2'-desoxirribonucleosídeo-5'-monofosfato e as bases purinas e pirimidinas comuns ao DNA ...	40
Figura 3.1 - Efeito da concentração de Mn^{++} no sistema: Mn^{++} (nas concentrações indicadas MA (10,5mM)/HRP (3,8 μ M)/ O_2 em tampão acetato 0,2M, pH 4,8 a 38,0°C	56
Figura 3.2. - Duplo-recíproco para o efeito da concentração de Mn^{++} no sistema: Mn^{++} (nas concentrações indicadas)/MA (10,5 mM)/HRP (3,8 μ M)/ O_2 em tampão acetato 0,2 M. pH 4,8 a 38,0°C	57
Figura 3.3 - Efeito da concentração da enzima no sistema : Mn^{++} (3,1 mM)/MA (10,5 mM)/HRP (nas concentrações indicadas)/ O_2 em tampão acetato 0,2 M pH 4,8 a 38,0°C	58
Figura 3.4 - Duplo-recíproco para o efeito da concentração da enzima no sistema: Mn^{++} (3,1 mM)/MA (10,5 mM)/HRP (nas concentrações indicadas)/ O_2 em tampão acetato 0,2 M pH 4,8 a 38,0°C	59
Figura 3.5 - Efeito da concentração do tampão no sistema : Mn^{++} (3,1 mM)/M.A. 10,5 mM)/HRP (3,8 μ M)/ O_2 em acetato pH 4,8 a 38,0°C	60
Figura 3.6. - Duplo-recíproco para o efeito da força iônica no sistema: Mn^{++} (3,1 mM)/MA (10,5 mM)/HRP (3,8 μ M)/ O_2 em tampão acetato pH 4,8 a 38,0°C	61

- Figura 3.7 - Efeito da concentração do M.A. na velocidade de consumo de oxigênio pelo sistema Mn^{++} (5,5 mM) / MA / HRP (2,3 μ M) / O_2 em tampão acetato 0,2 M pH 4,8 a 38,0°C concentração de M.A.: (—) 1,8 mM; (---) 2,7 mM; (-·-) 5,5 mM; (-x-) 7,3 mM; (···○···) 9,1 mM; (···□···) 10,5 mM; (-●-) 15,0 mM; (-Δ-) 18,0 mM 62
- Figura 3.8 - Efeito da concentração de M.A. no sistema Mn^{++} (5,5 mM) / MA (nas concentrações indicadas) / HRP 2,3 μ M) / O_2 em tampão acetato 0,2 M pH 4,8 a 38,0°C 64
- Figura 3.9 - Duplo-recíproco para o efeito da concentração da enzima no sistema: Mn^{++} (5,5 mM) / MA (nas concentrações indicadas) / HRP (2,3 μ M) / O_2 em tampão acetato 0,2 M, pH 4,8 a 38,0°C 65
- Fugura 3.10 - Efeito da concentração do Mn^{++} no sistema: Mn^{++} (nas concentrações indicadas) / MA (0,7 mM) / HRP (7,0 μ M) em tampão acetato 0,2 M, pH 4,8 a 38,0°C 66
- Figura 3.11 - Efeito da concentração da peroxidase no sistema: Mn^{++} (2,0 mM) / MA (0,7 mM) / HRP (nas concentrações indicadas) / O_2 em tampão acetato 0,2 M, pH 4,8 a 38,0°C 67
- Figura 3.12 - Efeito da concentração do tampão no sistema: Mn^{++} (2,0 mM) / M.A. (0,7 mM) / HRP (7,0 μ M) / O_2 em tampão acetato pH 4,8 a 38,0°C 69
- Figura 3.13 - Efeito do pH no sistema: Mn^{++} (2,0 mM) / MA (0,7 M) / HRP (7,0 μ M) / O_2 em tampão acetato 0,2 M a 38,0°C 70
- Figura 3.14 - Efeito da concentração do M.A. do sistema Mn^{++} (2,0 mM) MA (nas concentrações indicadas) / HRP (7,0 μ M) / O_2 em tampão acetato pH 4,8 a 38,0°C 71

- Figura 3.15 - Variação da concentração M.A.H. no sistema Mn^{++} (3,1 mM)/M.A.H./HRP (3,4 mM)/ O_2 em tampão acetato 0,2 M pH 4,8 a 38,0°C (—) 10,5 mM, (—o—) 5,0 mM, (—●—) 12,5 mM, (—Δ—) 1,3 mM, (—▲—) 0,7 mM. 72
- Figura 3.16 - Efeito de H_2O_2 e catalase sobre o sistema Mn^{++} (3,1 mM)/M.A. (4,3 mM)/HRP (3,8 μM)/ O_2 tampão acetato 0,2 M pH 4,8 a 38,0°C; (—) reação controle; (---) catalase 125 unidades (—o—) H_2O_2 $9,6 \times 10^{-5} M$ 74
- Figura 3.17 - Variação da absorbância em função do tempo, do sistema Mn^{++} /M.A./HRP em tampão acetato 0,2 M pH 4,8 a 20,0°C; (—●—) 420 nm corresponde a HRP-II, (—Δ—) 411 nm corresponde ao ponto isobéstico entre HRP e HRP II, (—o—) 400 nm corresponde a HRP nativa 75
- Figura 3.18 - Efeito de H_2O_2 sobre a emissão do sistema : Mn^{++} (3,1 mM)/M.A.H. (0,8 mM)/HRP (3,4 μM)/ O_2 em tampão acetato 0,3 M pH 4,8 a 38,0°C. As concentrações de H_2O_2 foram: (—o—) 0,0 mM; (—■—) 80,0 μM; (—●—) 3,0 μM; (—□—) 1,0 μM com Mn^{++} adicionado após 9,2 min de incubação 79
- Figura 3.19 - Supressão de emissão do sistema: Mn^{++} (3,1 mM)/MA (10,5 mM)/HRP (3,8 μM)/ O_2 em tampão acetato (0,2M) a pH 4,8 a 38,0°C por guanossina: (—) 0,0 mM; (—▲—) 1,2 mM; (—●—) 1,8 mM; (—o—) 2,5 mM; (—x—) 3,0 mM; (—□—) 5,3 mM; (—Δ—) 5,8 mM 81
- Figura 3.20 - Stern-Volmer para efeito da concentração da guanossina na emissão da luz do sistema Mn^{++} (3,1 mM)/MA (10,5 mM)/HRP (2,3 μM)/ O_2 em tampão acetato (0,2 M) a pH 4,8 e 38,0°C 82

- Figura 3.21 - Duplo-recíproco para efeito da guanosina na emissão de luz do sistema Mn^{++} (3,1 mM)/MA (10,5 mM)/HRP (2,3 μ M)/ O_2 em tampão acetato (0,2 M) pH 4,8 e 38,0°C 83
- Figura 3.22 - Supressão de emissão em função do tempo do sistema: Mn^{++} (3,1 M)/MA (10,5 mM)/HRP (3,9 μ M)/ O_2 em tampão acetato (0,2 M) a pH 4,8 a 38,0°C por histidina: (—) 0,0 mM; (—o—) 0,6 mM; (—□—) 1,2 mM; (—x—) 1,9 mM; (—Δ—) 2,5 mM; (—●—) 3,1 mM; (—■—) 3,8 mM. 85
- Figura 3.23 - Stern-Volmer para efeito da concentração da histidina na emissão de luz do sistema Mn^{++} (3,1 mM)/MA (10,5 mM)/HRP (2,3 μ M)/ O_2 em tampão (0,2 M) a pH 4,8 e 38,0°C 86
- Figura 3.24 - Duplo-recíproco para efeito da histidina na emissão de luz do sistema Mn^{++} (3,1 mM)/MA (10,5 mM)/HRP (2,3 μ M)/ O_2 em tampão acetato (0,2 M) pH 4,8 a 38,0°C 87
- Figura 3.25 - Efeito da bilirrubina e DBAS no sistema Mn^{++} (3,1 mM) M.A. (10,5 mM)/HRP (2,3 μ M)/ O_2 em tampão acetato (0,2 M) pH 4,8 a 38,0°C 89
- Figura 3.26 - Supressão de emissão em função do tempo, sistema: Mn^{++} (3,1 mM)/MA (10,5 mM)/HRP (2,3 μ M)/ O_2 em tampão acetato (0,2 M) a pH 4,8 a 25,0°C por DNA: (—) 0,0 mM; (—●—) $0,2 \times 10^{-4}$ M; (—o—) $0,7 \times 10^{-4}$ M; (—x—) $1,4 \times 10^{-4}$ M; (—Δ—) $2,0 \times 10^{-4}$ M; (—▲—) $2,7 \times 10^{-4}$ M a concentração do DNA é dado por nucleotídeo cintilador. 92
- Figura 3.27 - Stern-Volmer para efeito da concentração do DNA na emissão de luz no sistema Mn^{++} (3,1 mM)/M.A. (10,5 mM)/HRP (2,3 μ M)/ O_2 em tampão acetato (0,2 M) a pH 4,8 e 25,0°C. A concentração do DNA é dada por nucleotídeo 94

Figura 3.28 - Duplo-recíproco para o efeito de DNA na emissão de luz do sistema Mn^{++} (3,1 mM)/MA (10,5 mM)/HRP (2,3 μ M)/ O_2 em tampão acetato (0,2 M) pH 4,8 e 25,0°C. A concentração do DNA é dado por nucleotídeo	95
Figura 3.29 - A-Espectro na região U.V. de DNA de <u>E.coli</u> (—) nativa, (---) tratada no sistema, (-·-·-) DNA-MA. (-·-) desnaturado e exposto à luz por 16,3 h (-o-) irradiado na presença de hematoporfirina por 16,3 h.	97
Figura 3.30 - Espectro na região U.V. de DNA de <u>E.coli</u> (—) desnaturado e exposta à luz por 16,3h; (-□-) irradiado na presença de hematoporfirina por 16,3 h; (-·-) nativo (depois desnaturado); (-■-) tratado no sistema e depois desnaturado; (-·-·-) DNA-MA (sem desnaturação)	98
Figura 3.31 - Espectro na região U.V. de DNA de <u>E.coli</u> (-·-) desnaturado e exposto à luz por 16,3 h; (-o-) irradiado na presença de hematoporfirina por 16,3 h; (—) desnaturado; (---) desnaturado e depois tratado no Sistema; (-·-·-) DNA-MA (sem desnaturação)	99
Figura 3.32 - Aumento de fluorescência de Tb^{+3} por DNA de <u>E.coli</u> (λ_{ex} 290 nm) Tb^{+3} (10,0 μ M)/DNA (11,0) μ g/ml; (—) Tb^{+3} ; (-·-·-) DNA nativo; (---) DNA tratado no sistema	101
Figura 4.1 - Stern-Volmer para o efeito da concentração de bilirrubina na emissão de luz do sistema Mn^{++} (3,1 mM)/M.A. (10,5 mM)/HRP (2,3 μ M) O_2 em tampão (0,2 M) a pH 4,8 e 38,0°C	112
Figura 5.1 - Análise Stern-Volmer para inibidores de espécie excitada	125

Figura 5.2	-	Análise Duplo-Recíproco para inibidores de espécie excitada	127
Figura 5.3	-	Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de uma reação catalizada por enzima	131
Figura 5.4	-	Um gráfico Duplo-Recíproco	132

ÍNDICE DOS ESQUEMAS

	<u>Pág.</u>
Esquema 1.1 - Estados fundamental, singlete e triplete	2
Esquema 1.2 - Produção e desativação de estados excitados ..	5
Esquema 1.3 - Aniquilamento cátio-ânion	7
Esquema 1.4 - Velocidades de formação e desativação dos dois estados excitados mais baixos de sensibilizado res	18
Esquema 1.5 - Química do tipo I: interação direta do sensi- bilizador com outras moléculas	19
Esquema 1.6 - Reação do sensibilizador com oxigênio	20
Esquema 1.7 - Oxigênio singlete a partir de hidrocarbonetos carcinogê- nicos sem luz	35
Esquema 4.1 - Carcinogênese e mutagênese do M.A.	121

S U M Á R I O

A oxidação aeróbica de Malonaldeído catalizada por peroxidase produz oxigênio singlete, cuja formação pode ser explicado pelo mecanismo de Russell.

Foram feitos estudos cinéticos por consumo de O_2 e emissão de luz, encontrando-se as melhores condições para alta emissão de luz. O sistema obedece uma cinética típica de Michaelis-Menten. Foi observada uma diminuição da enzima nativa (HRP) concomitantemente ao aparecimento de HRP-I e HRP-II.

Foram calculados os valores de β (para guanosina, histidina, bilirrubina e DNA) e valores de τ para oxigênio singlete.

A ação de oxigênio singlete gerado no sistema enzimático causa modificações no DNA, observadas por absorção na região U.V.; possivelmente a base guanina seja atingida, verificação feita pelos estudos da fluorescência do cátion lantanídeo Tb^{+3} . Também foi observada a formação do complexo M.A.-DNA e a ação do oxigênio singlete sobre a lisozima; neste último caso foi observada a destruição de triptofano e metionina.

A B S T R A C T

The aerobic oxidation of malonaldehyde catalyzed by peroxidase produces singlet oxygen, and the formation can be explained by Russell's mechanism.

Kinetic studies by consumption of oxygen and emission of light were carried out. The system follows the typical Michaelis-Menten kinetic. A decreasing of the native enzyme (HRP) was observed concomitantly with the appearance of HRP-I and HRP-II.

The β -values (of guanosine, histidine, bilirubin and DNA) and the τ -values of singlet oxygen were calculated.

. The action of singlet oxygen generated by the enzymatic system causes modification on DNA, as observed by absorption in the UV region. It is possible that the guanosine base is attained, confirmed by studies of the fluorescence of lanthanide Tb^{+3} cation. The production of M.A.-DNA complex and the action of singlet oxygen on lysozyme was also observed; in the latter destruction of tryptophan and methionine was observed.

Objetivos da tese

Sabendo-se que o malonaldeído atua em envelhecimento celular (Munkres, 1976), carcinogênese (Kubinski e col., 1973) e danos por radiação (Packer e col., 1967), foi de interesse pesquisar a espécie ativa nestas transformações. Uma vez que a oxidação do malonaldeído catalisada por peroxidase gera estados eletronicamente excitados (Vidigal-Martinelli, 1979), intenta-se estudar as melhores condições para se obter uma boa cinética de consumo de O_2 e uma alta emissão de luz, como também detectar a espécie excitada e sua possível atuação sobre ácidos nucleicos (DNA) e em proteínas (lisozima), para propor um possível mecanismo da ação biológica.

LISTA DAS ABREVIações USADAS

<u>Abreviação</u>	<u>Nome</u>
BEA	β -etoxi-acroleína
DABCO	1,4-diazobiciclo(2.2.2)octano
DBAS	9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido tetra acético etileno diamina
HRP	peroxidase do rabanete
M.A.	malonaldeído sódico
M.A.H.	malonaldeído ácido
TEP	1,1,3,3-tetra etoxipropano

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A Fotoquímica desenvolve-se ao longo de duas linhas distintas: a Química Orgânica (usando luz para efetuar transformações químicas desejadas dando ênfase às sínteses, com pouca base teórica) e a Fisicoquímica (interessando-se em cinética de reações rápidas - normalmente em fase de vapor - estudando a produção e reação de radicais livres e outras espécies geradas fotoquimicamente. (Leermakers, 1969).

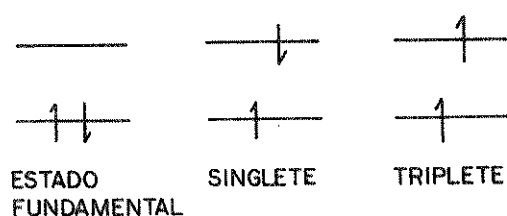
Na segunda metade da década de 1950, o campo da Físicoquímica começou a mudar. Tanto os cineticistas físicos quanto os químicos orgânicos começaram a relacionar seus interesses no campo relativamente novo da espectroscopia molecular eletrônica, principalmente quando os químicos orgânicos começaram a usar uma linguagem qualitativa e modelos simplificados na descrição de estados excitados. A importância da Fotoquímica, usada tanto como uma ferramenta sintética quanto mecanística, é enorme. A Fotoquímica, juntamente com a espectroscopia, visualizam largamente os problemas e respostas das pesquisas, relacionando as áreas de Química e Física. (Leermakers, 1969).

O princípio básico da Fotoquímica parte de que somente luz absorvida pode produzir uma mudança química. (Lamola e Turro, 1977).

A Fotobiologia está relacionada predominantemente com radiação de comprimentos de onda de 200 a 800 nm, comprimentos estes que causam mudanças químicas quando absorvidas por biomoléculas (Lamola e Turro, 1977).

1.1. Estados excitados

Os elétrons ocupam regiões do espaço onde a possibilidade de encontrá-los girando em torno do núcleo é maior - estas regiões são chamadas orbitais. Elétrons em orbitais diferentes possuem energias diferentes e cada orbital pode conter no máximo dois elétrons com spins opostos (princípio de exclusão de Pauli) (Lamola e Turro, 1977). Quando todos os orbitais contêm dois elétrons, há igual nº de elétrons de spin oposto ($+\frac{1}{2}$, $-\frac{1}{2}$) ou spin eletrônico total zero. O estado de multiplicidade é dado por $2S+1$, onde S é o spin eletrônico total. Um estado singlete é um estado de multiplicidade igual a 1 ($S=0$) e um estado triplete é um estado de multiplicidade igual a 3 ($S=1$) (Johns e Rauth, 1965). Os estados excitados singlete e triplete e o estado fundamental são três espécies distintas e têm, portanto, propriedades químicas e físicas diferentes (Cilento e col., 1979). Mecanismos de reação fotoquímica são com frequência altamente específicos, com produtos de reação estritamente diferentes daqueles obtidos quando o mesmo sistema reage termicamente (Salem, 1976).



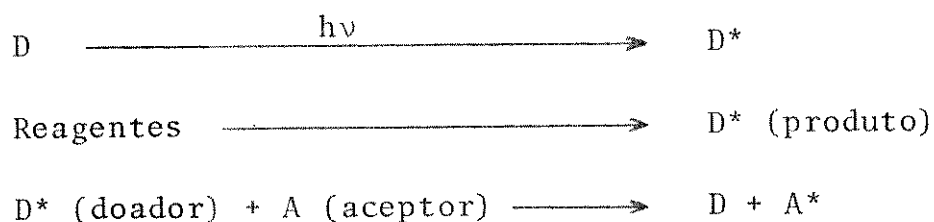
Esquema 1.1: Estados fundamental, singlete e triplete.

Um estado triplete tem menor energia que o estado singlete correspondente devido à natureza repulsiva da interação spin-spin entre elétrons de mesmo spin (Regra de Hund: estados de maior multiplicidade tem menor energia). A diferença de energia

entre estado singlete e triplete varia de acordo com o grau de interação entre os orbitais envolvidos. A interação entre os orbitais que ocupam regiões de espaço diferentes (por exemplo, n , π de compostos carbonílicos) é menor, e o espaço energético singlete-triplete também é menor. A interação entre os orbitais que ocupam regiões de espaço semelhantes (por exemplo, π , π^* de alcenos) é muito maior e portanto a diferença energética singlete-singlete também é muito maior (Cilento e col., 1979).

As moléculas orgânicas absorvem luz no intervalo de comprimento de onda acima de 200 nm porque os estados eletrônicos para estas moléculas possuem cerca de 140 kcal/mol em energia acima do estado fundamental. Estes estados eletrônicos são gerados pela promoção de um elétron de um orbital n ou π para um orbital π^* . A energia de excitação entre o orbital de energia mais alta n ou π e o orbital de energia mais baixa π^* em sistemas conjugados diminui com a extensão da conjugação (Lamola e Turro, 1977).

Estados excitados de moléculas podem ser formados pela absorção de luz visível ou U.V., como resultado de uma reação química, ou por transferência de energia de uma molécula excitada para outra no estado fundamental (White e col., 1974).



Os estados excitados inicialmente produzidos por absorção de um fóton são quase sempre estados singlete, porque a grande maioria das moléculas no estado fundamental estão num estado singlete e as regras de seleção favorecem a conservação de spin no processo de absorção de energia. As bandas de absorção singlete-triplete geralmente são fraquíssimas, comparadas com as bandas

singlete-singlete (Cilento e col., 1979).

Estados singlete em meio líquido, têm, com raras exceções, vida média muito curta (10^{-5} - 10^{-7} seg) enquanto que os tripletes duram mais tempo (10^{-3} - alguns seg) (Calvert e Pitts, 1966). Ambos são desativados por um dos seguintes processos competitivos (Cilento e col., 1979). (Esquema 1.2)

A bioluminescência, ou emissão de luz por seres vivos, resulta de uma reação catalizada por enzima. É uma reação oxidativa em que parte da energia é canalizada para produção de um estado eletronicamente excitado de um intermediário (ou produto da reação) que emite um fóton e volta ao estado fundamental (Cilento e col., 1979).

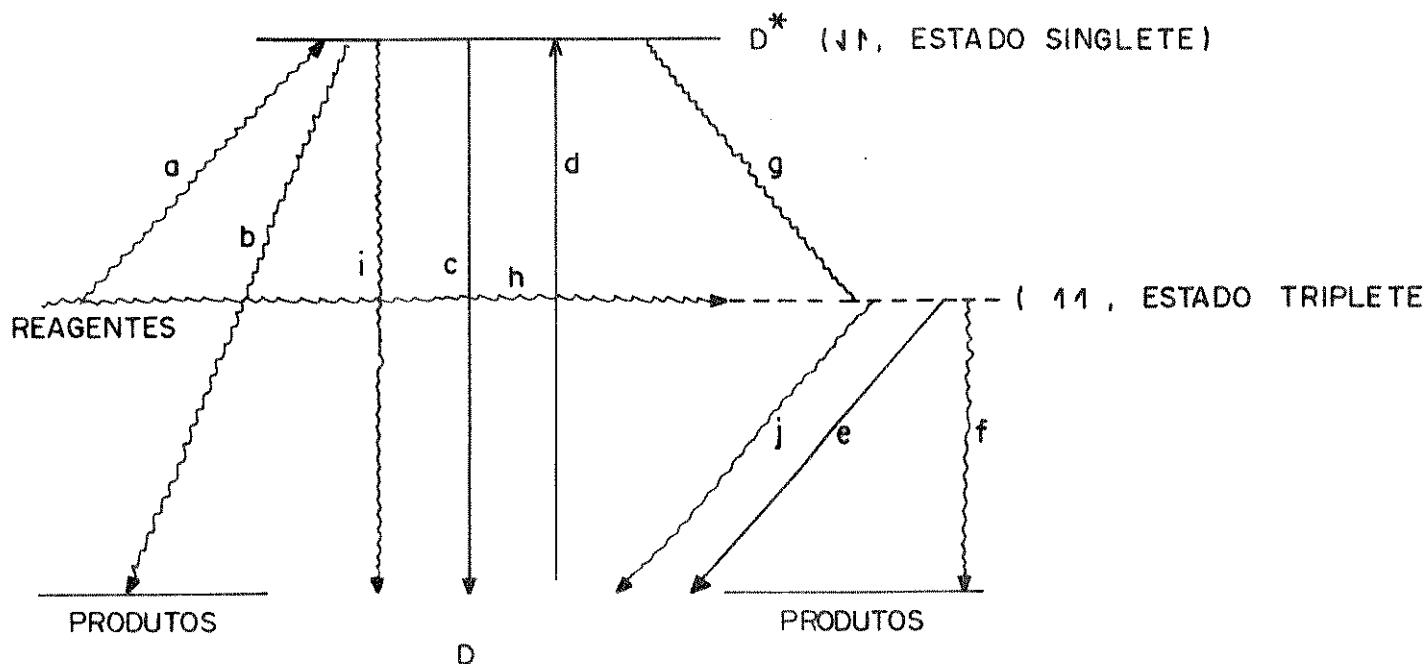
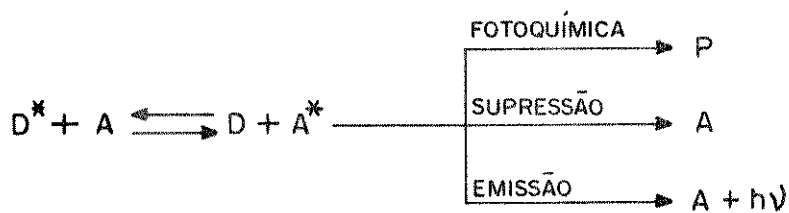
A bioluminescência é de especial interesse em Bioenergética no que diz respeito à transformação biológica de energia química em luz sem envolver energia térmica. A cor desta "luz fria" emitida por diferentes organismos vai do azul (460 nm) de certos crustáceos, passando pelo verde-azulado (490 nm) de algumas bactérias, pelo verde (530 nm) de cogumelos, pelo amarelo-esverdeado a laranja (540 a 580 nm) de vagalumes, até o vermelho (600 nm) da forma larval do inseto Diplocardia longa (Hastings, 1975).

1.1.1. Geração química de espécies excitadas

Há dois processos gerais que são responsáveis pela produção de espécies excitadas em quimiluminescência e bioluminescência: transferência de elétrons e clivagem de peróxidos cíclicos e lineares (Cilento e col., 1979).

a) Transferência de elétrons

As moléculas excitadas forma-se pelos seguintes processos (Hércules, 1969):



ESQUEMA 1.2
PRODUÇÃO E DESATIVAÇÃO DE ESTADOS
EXCITADOS

A. Produção de estados excitados

a, h - excitação química

d - absorção de fóton (fotoexcitação)

g - cruzamento intersistema

B. Desativação

c - fluorescência

e - fosforescência

b, f - fotoquímica sem luz (isomerização, dimerização, rearranjo, reação com solvente, etc.) (McCapra, 1970).

i, j - desativação térmica

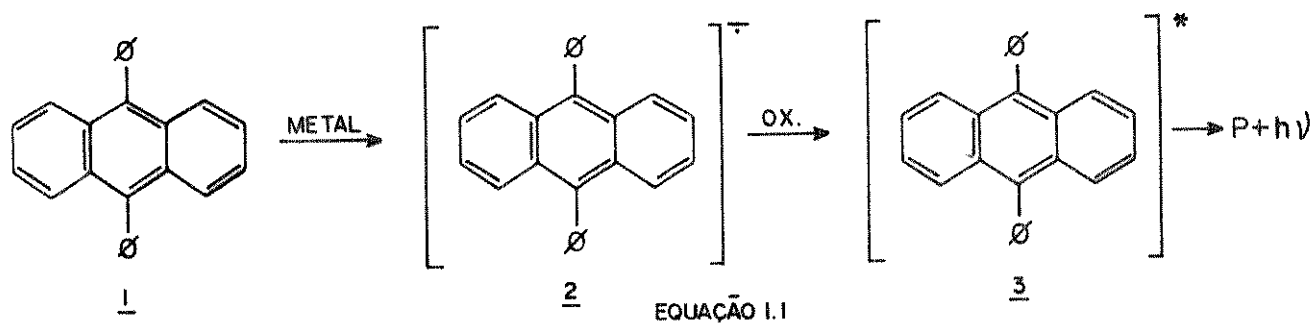
g - cruzamento intersistema

i - Remoção de um elétron (oxidação) de um radical
ânion (Equação 1.1);

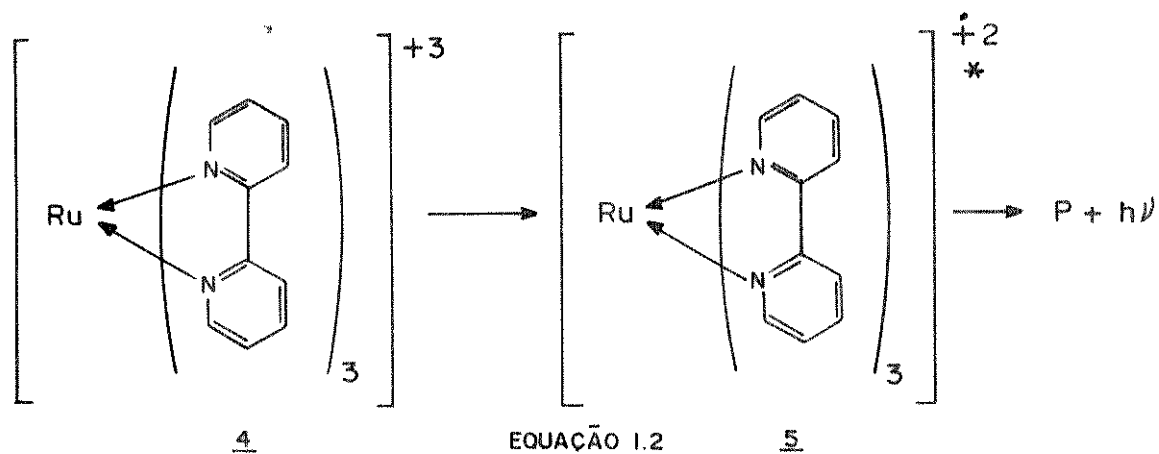
2i - Redução de radical cátion (Equação 1.2);

3i - Aniquilamento cátion-ânion (Esquema 1.3).

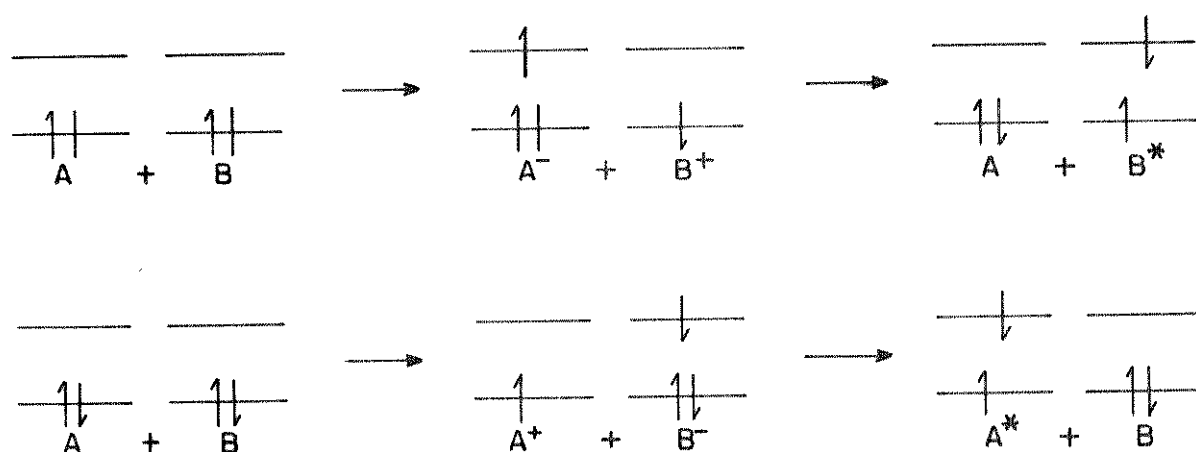
OXIDAÇÃO DE UM ÂNION RADICAL



REDUÇÃO DE UM CÁTION RADICAL



ANIQUILAMENTO CÁTION-ÂNION



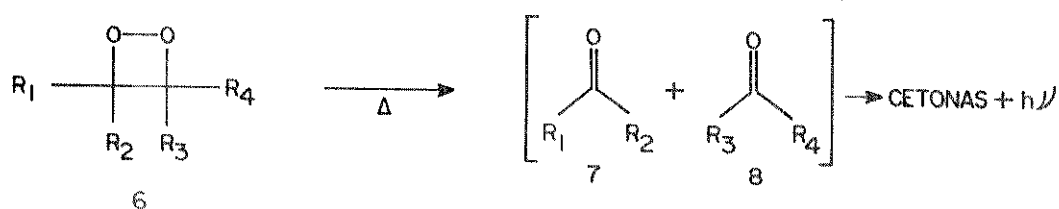
A* e B* = singlete ou triplete

ESQUEMA 1.3 ANIQUILAMENTO CÁTION-ÂNION

b) Decomposição de estruturas do tipo 1,2-dioxetano

Os anéis dioxetânicos foram propostos como intermediários em numerosas reações quimiluminescentes, envolvendo indóis, derivados de acridina, peroxioxalatos, aminoetilenos, etc, (Mc Capra, 1970), tendo como base os tipos de produtos formados.

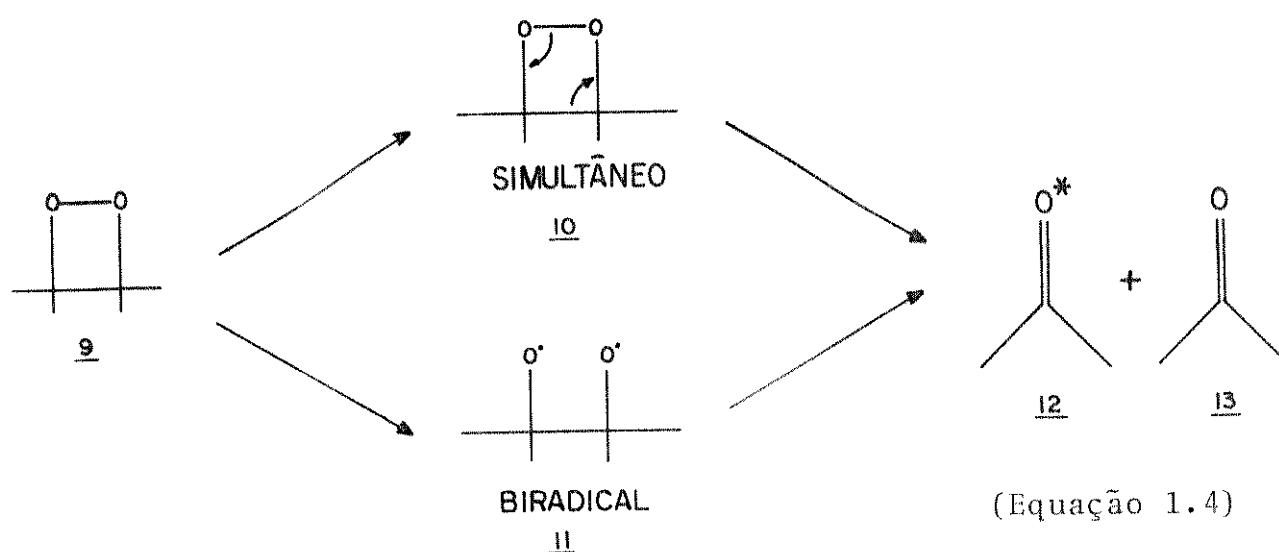
Kopecky e Munford (1969) observaram que a termólise de dioxetano gera produtos carbonílicos no estado excitado (Equação 1.3).



EQUAÇÃO 1.3

Os estados excitados formados na clivagem de dioxetanos catalizadas por traços de metais, aminas, sílica gel, são essencialmente tripletes, acompanhados de presença de singlete, mas em escala bem menor ($\phi^3/\phi^1 \sim 10^2-10^4$) (Wilson, 1976; Bartlett, 1976).

O mecanismo para decomposição de dioxetanos deve ser compatível com a produção eficiente de produtos excitados predominando tripletes sobre singletes e com a estabilidade dos dioxetanos ser pouco influenciada pela natureza dos substituintes. Dois mecanismos foram propostos (Equação 1.4) (Cilento e col., 1979).

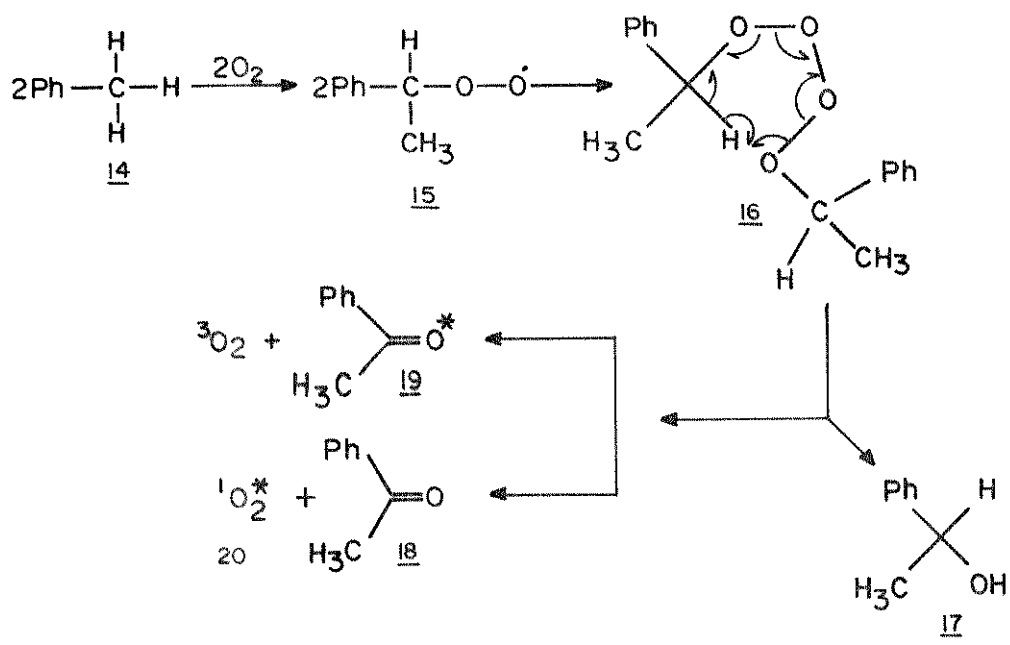


O mecanismo simultâneo (10), onde as ligações O-O e C-C são quebradas e ligações C=O formadas simultaneamente, foi proposto por McCapra (1970) baseado na correlação de simetria de orbitais (Woodward e Hoffmann, 1969). No mecanismo em duas etapas (11), a ligação O-O se rompe gerando um di-radical (vida muito curta) e subsequente quebra da ligação C-C dando os produtos. A energia disponível é suficiente para excitar apenas uma das moléculas-produto (12) nos dois casos (Cilento e col., 1979).

c) Reação de auto-oxidação via radicais peróxidos

Vários casos de reação de auto-oxidação acompanhada de quimiluminescência fraca são mencionadas na literatura; entre elas

a autoxidação de hidrocarbonetos e polímeros (Vasilev, 1962 e 1967). Os trabalhos de Howard e Ingold (1968) tem confirmado a produção de compostos carbonílicos excitados (19) e oxigênio singlete na decomposição de um intermediário tetróxido (16) pelo mecanismo de Russell (1957).

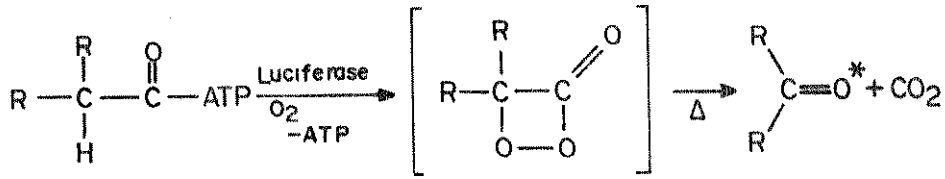


(Equação 1.5)

1.1.2. Geração biológica de Espécies Excitadas

a) Bioluminescência

A bioluminescência é um fenômeno amplamente conhecido de geração de espécies eletronicamente excitadas no estado single te (Hastings e Wilson, 1976). Nestes processos são propostos in-termediários 1,2-dioxetanonas (22) (Equação 1.6).



(Equação 1.6)

Estes mecanismos tem sido amplamente estudados (Shimomura e Johnson, 1979).

b) Processos bioenergizados

Processos enzimáticos também podem gerar espécies carbonílicas eletronicamente excitadas no estado triplete (Cilento, 1980 a). Estes mecanismos tem sido amplamente estudados em termos cinéticos (Cilento, 1980 b) em termos fotoquímicos (Durán e col., 1981). Mas alguns dos sistemas podem gerar, além de carbonilos excitados, também oxigênio singlete (como por exemplo, oxidação catalizada de indol-3-acético - De Mello e col., 1980).

Em todos estes sistemas a enzima peroxidase tem um papel importante.

HRP é uma enzima de cor marrom com um peso molecular de 40.000; é uma proteína globular com um diâmetro de 50 Å. Hemin (ferriprotoporfirínico IX) é o grupo prostético da peroxidase (Ugarova e Lebedeva, 1979).

Keilin e Mann (1937) descobriram a espécie agora conhecida como composto II (HRP-II), formada como resultado de HRP com H_2O_2 . O composto I, descoberto após o composto II, é formado antes de HRP-II, logo após a adição de H_2O_2 a HRP (Theorell, 1941). O espectro de HRP-I e HRP-II na região Soret (400 nm) foram medidos e a cinética de algumas reações de HRP foram investigadas (Dunford e Stillman, 1976) (Fig. 1.1; Fig. 1.2).

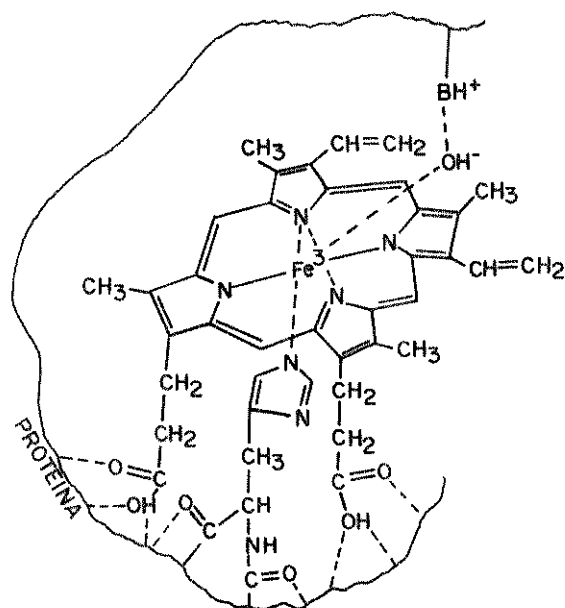


FIG. I.1. - INTERAÇÃO DE HEME COM APOENZINA NA PEROXIDASE
(UGAROVA E LEBEDEVA, 1978)

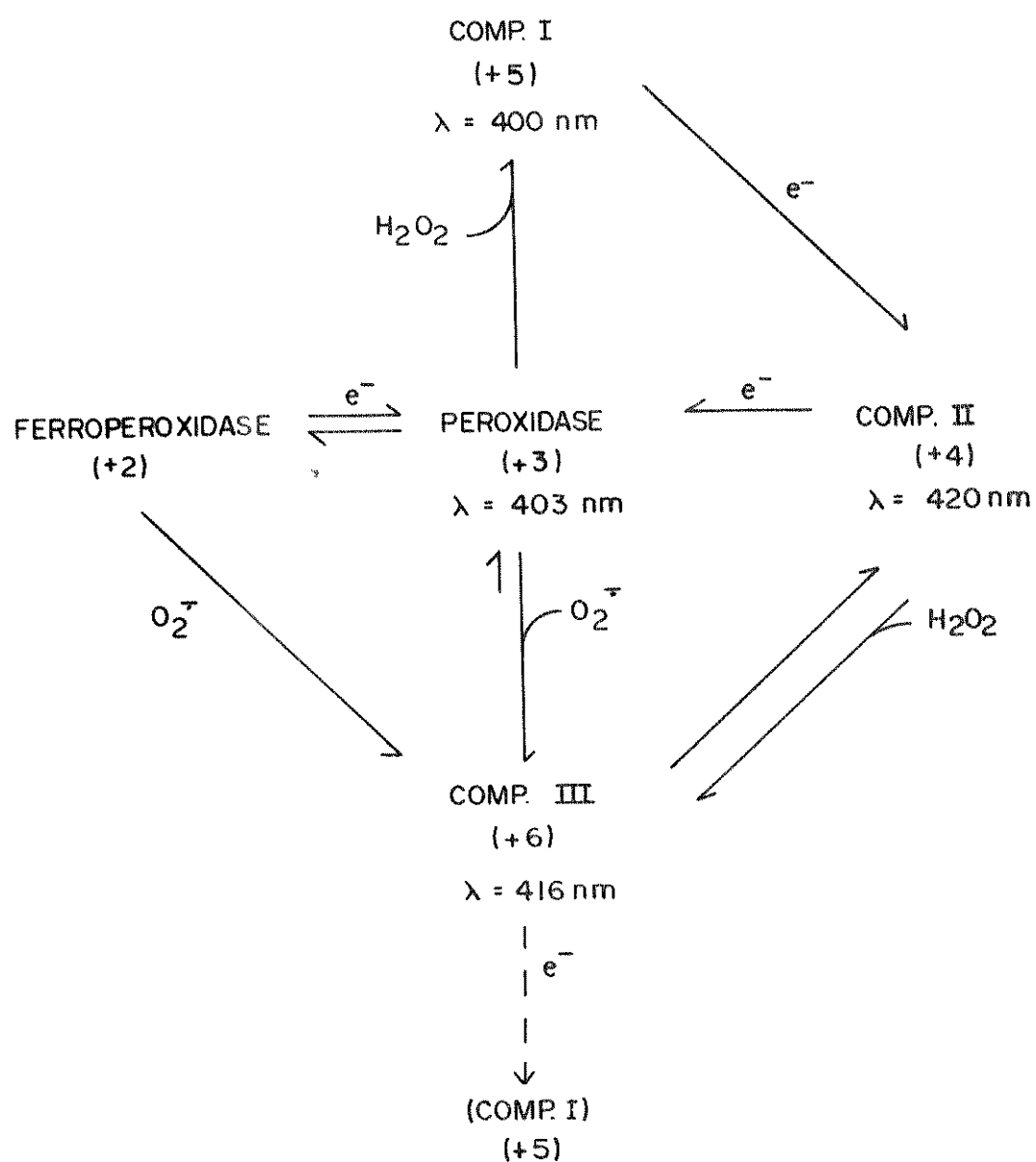
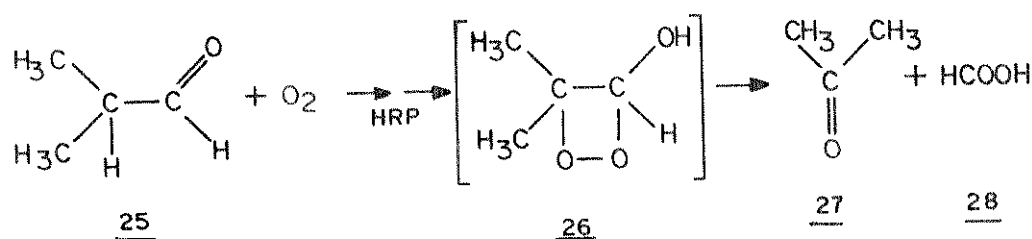


FIG. I.2 - CICLO DA PEROXIDASE DO RABANETE

As ferrihemoproteínas interagem preferencialmente com F^- , CN^- , e N_3^- que se ligam ao ferro (George e Lyster, 1958), no grupo prostético.

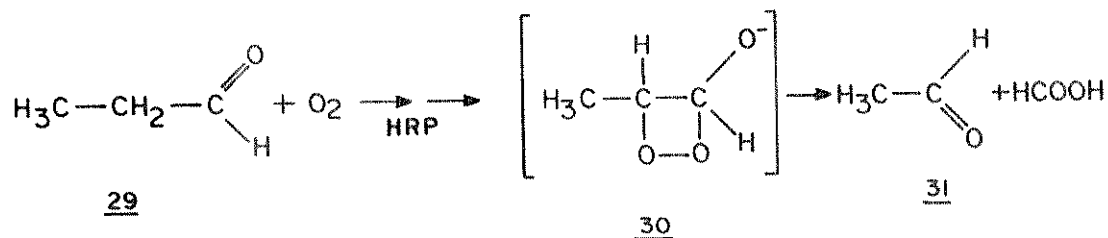
c) Papel da peroxidase em processos bioenergizados

Descobriu-se que HRP pode atuar com uma oxigenase interna sobre diversos substratos da estrutura geral $R'-\overset{\overset{R''}{|}}{\underset{\underset{H}{|}}{C}}-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}<\overset{\overset{X}{|}}{C}$ (Cilento, 1980 b). Há evidências claras de que em reações de oxidação catalizadas por HRP ocorre a formação de estados excitados (Cilento, 1980 a). A oxidação de 2-metilpropanal (25) catalizada por HRP produz acetona (27) no estado excitado triplete e ácido fórmico (28) (Equação 1.7) (Durán e col., 1977; Faria Oliveira e col., 1978; Bechara e col., 1979).



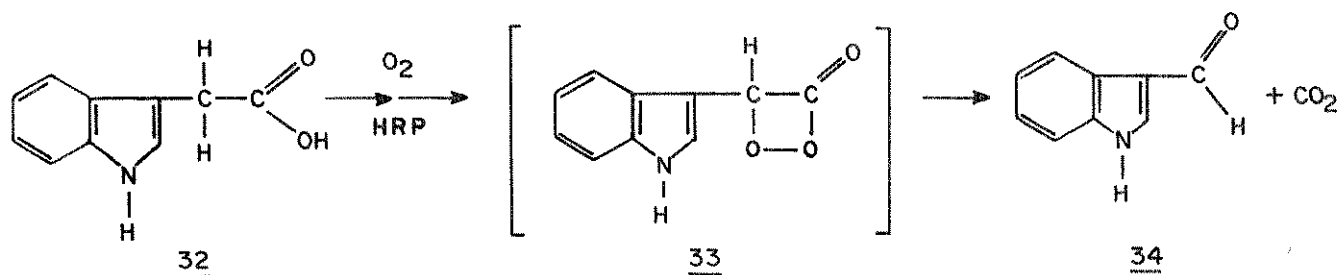
(Equação 1.7)

HRP converte propanaldeído (29) para acetaldeído (31) e ácido fórmico (28). Produz-se uma espécie eletronicamente excitada, presumivelmente o aldeído, como revelado pela emissão fotossensibilizada na presença de flavinas (Equação 1.8) (Haun e col., 1980).



(Equação 1.8)

Estudos sobre oxidação do ácido indol-3-acético (32) (um hormônio de planta catalizada por peroxidase) mostrou emissão e danos do grupo heme por quebra fotoquímica no escuro (Equação 1.9) (Vidigal e col. 1975).



(Equação 1.9)

1.2. Oxigênio Singlete

Oxigênio molecular no estado triplete ou fundamental (3O_2) é uma das poucas moléculas com um número nivelado de elétrons onde os orbitais ocupados de mais alta energia são um par de orbitais antiligantes duplamente degenerados contendo 2 elétrons (Kearns, 1971), com seus momentos angulares opostos mas com spins paralelos (Krinsky, 1977), (Fig. 1.3).

Estudos espectroscópicos identificaram oxigênio singlete em seus dois estados excitados, que são simbolicamente descritos na Tab. 1.1 (Bellus, 1979).

Em oxigênio líquido ou gasoso, bandas de absorção são observadas em 630 nm e 477 nm. Energeticamente, estas bandas correspondem a várias combinações de transições de pares de simples moléculas. Portanto, podem ser assinaladas como transições simultâneas, na qual um simples fóton é responsável pela excitação de duas moléculas (Kearns, 1971).

Tabela 1.1 - Os Estados Eletrônicos de Oxigênio Molecular e Suas Propriedades (Bellus, 1979)

Molécula Oxigênio	Configuração de elétrons em M.O. mais alto ocupa- dos	Energia Relativa (Kcal/mol)	Tempos de vida (seg)	
			fase gasosa	fase líquida
Segundo Estado Excitado $O_2(^1\Sigma_g^+)$		37,5	7-12 ^(a)	10^{-11} - 10^{-9}
Primeiro Esta- do Excitado $O_2(^1\Delta_g)$		22,5	2700 ^(a)	2×10^{-6} - $10^{-3(b)}$
Estado Funda- mental $(^3\Sigma_g^-)$		0	∞	∞

(a) Tempos de vida radiativo intrínseco (tempo médio que leva pa-
ra desativar o estado se nenhum processo não radiativo ocor-
rer).

(b) Valores que dependem fortemente do solvente.

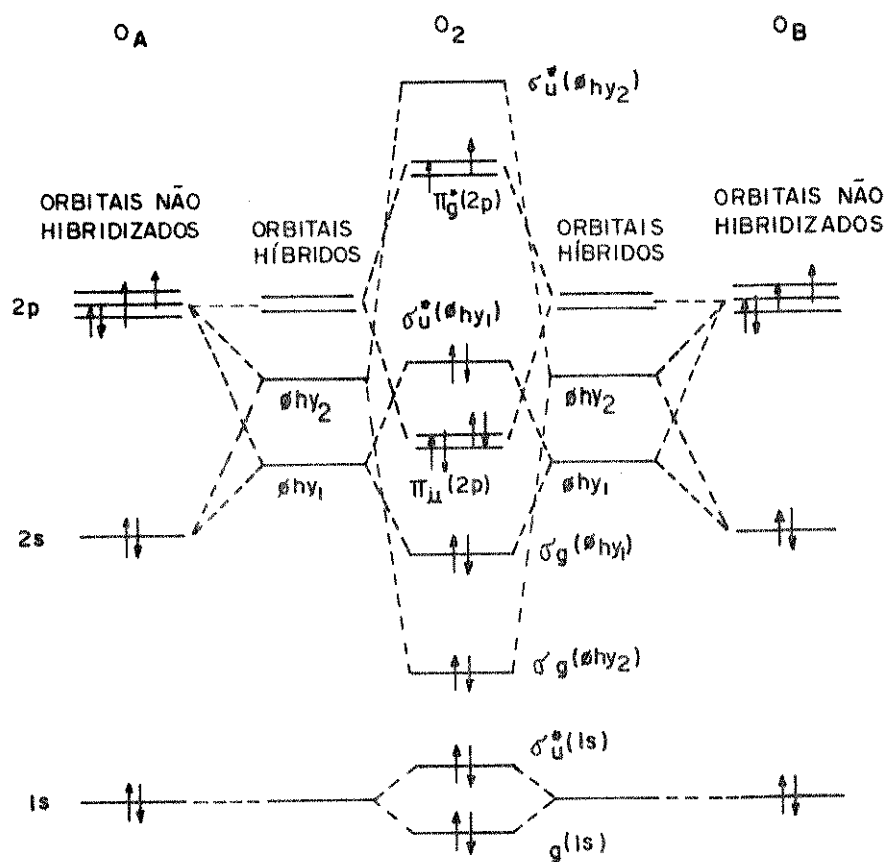


FIG. 1. 3 - NÍVEIS DE ENERGIA DO ORBITÁL MOLECULAR DO 3O_2

(HUHEEY, 1972)

Transições de moléculas simples

Energia, $\text{cm}^{-1}(\text{nm})$ 

Transições simultâneas



Na fase gasosa, $\text{O}_2 (^1\Sigma_g^+)$ é mais rapidamente desativado que $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ por todos os gases. Em solução através da desativação colisional, os tempos de vida são grandemente reduzidos, mas muito mais para $\text{O}_2 (^1\Sigma_g^+)$ (Tab. 1.1). Não existe evidência inequívoca para a formação fotossensibilizada de $\text{O}_2 (^1\Sigma_g^+)$ em solução, embora um tratamento teórico sugere que pode ser o estado singlete primeiramente formado com alguns sensibilizadores (Kawaoka e col., 1967). Ackerman e col., (1970) consideram que a diferença fundamental entre a ineficiência relativa de desativação do estado $^1\Delta_g$ e a alta eficiência de desativação do estado $^1\Sigma_g^+$ pode ser atribuída ao fato de que $\text{O}_2 (^1\Sigma_g^+)$ é transformado inicialmente para $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ por um processo spin-permitido, enquanto que $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ deve produzir uma transição spin-proibida para alcançar o estado fundamental. Assim, não é surpresa que para reações de oxigênio singlete em solução, o estado $^1\Delta_g$ é considerado uma espécie de oxigênio ativa. Consequentemente, os métodos de detecção e as reações de inibição discutidas, referir-se-ão a oxigênio molecular singlete em seu estado $^1\Delta_g$, simplesmente denotado como $^1\text{O}_2$ (Bel-lus, 1979).

1.2.1. Geração de Oxigênio Singlete

Há diversos métodos para gerar oxigênio singlete

e que tem sido discutidos em numerosas revisões: por fotossensibilização, por fontes químicas e por fontes físicas (Foote, 1976) e enzimáticas (Krinsky, 1977; Durán, 1982) (Fig. 1.4).

Como frequentemente ocorre, os métodos por fotossensibilização, fontes químicas e enzimáticas servem como modelo para reações bioquímicas, e são ilustrados na Fig. 1.4 e discutidos a seguir (Krinsky, 1977).

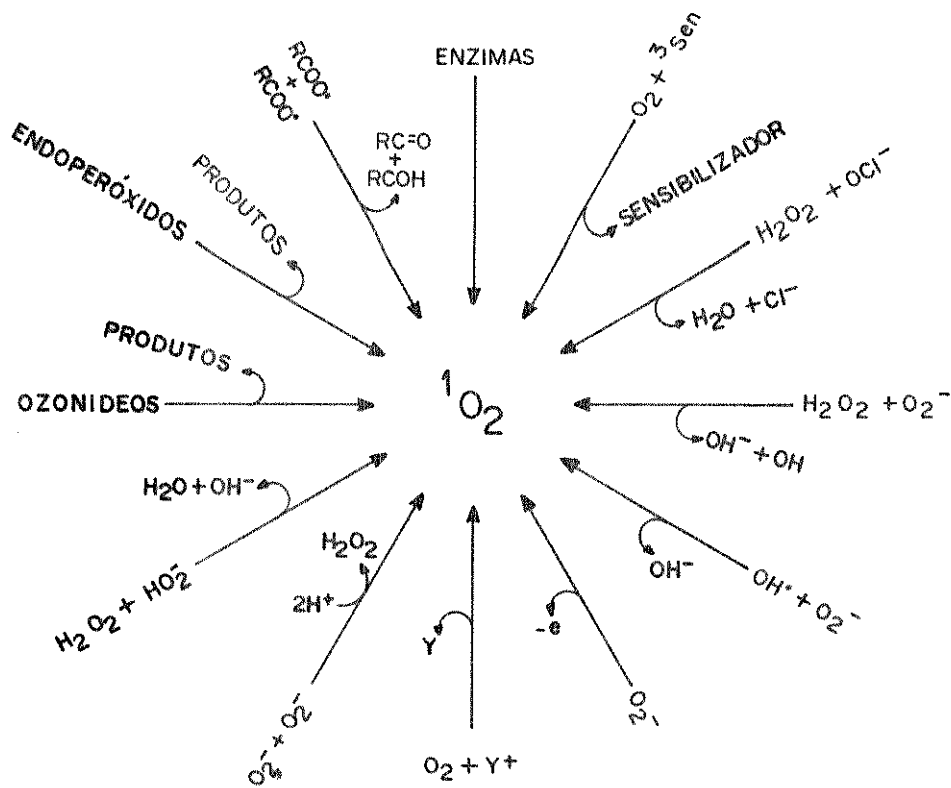
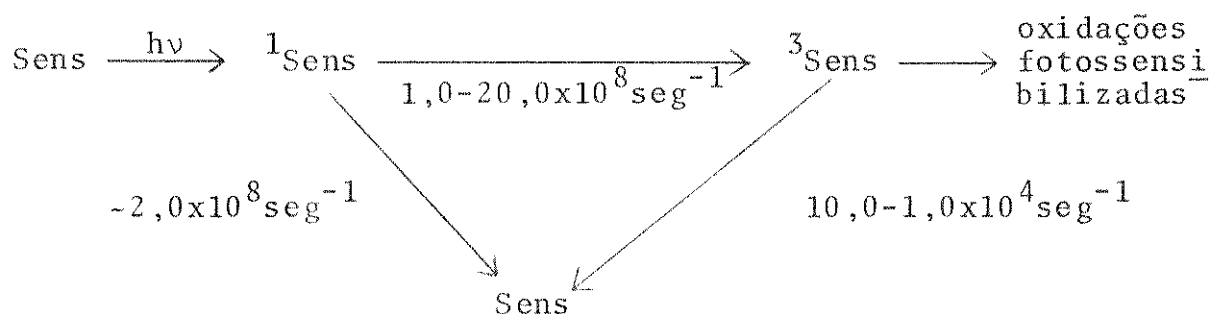


FIG. 1.4 - MÉTODOS PARA A GERAÇÃO DE $^1\text{O}_2$ (KRINSKY, 1977)

a) Geração fotossensibilizada de $^1\text{O}_2$

Os fotossensibilizadores (Sens) têm dois sistemas de estados eletronicamente excitados: o singlete ($^1\text{Sens}$) e o triplete ($^3\text{Sens}$). Normalmente o estado triplete tem vida muito mais longa que o singlete que é, portanto, o produto inicial de absorção

de luz. Os sensibilizadores mais efetivos são aqueles que dão um estado triplete de vida longa em alta eficiência quântica. Muitos corantes (azul de metileno, rosa bengala ou eosina), pigmentos (clorofila, hematoporfirina e flavinas) e hidrocarbonetos (rubreno e alguns antracenos) são sensibilizadores efetivos. Muitos destes compostos absorvem luz visível ou U.V. próximo; logo, estes comprimentos de onda são efetivos para oxidações fotossensibilizadas (Foote, 1976). Velocidades de formação e de desativação dos dois estados excitados mais baixos de sensibilizadores típicos são mostrados no Esquema 4 (Gollnick, 1968; Spikes e Mac Knight, 1970; Livingston, 1961).



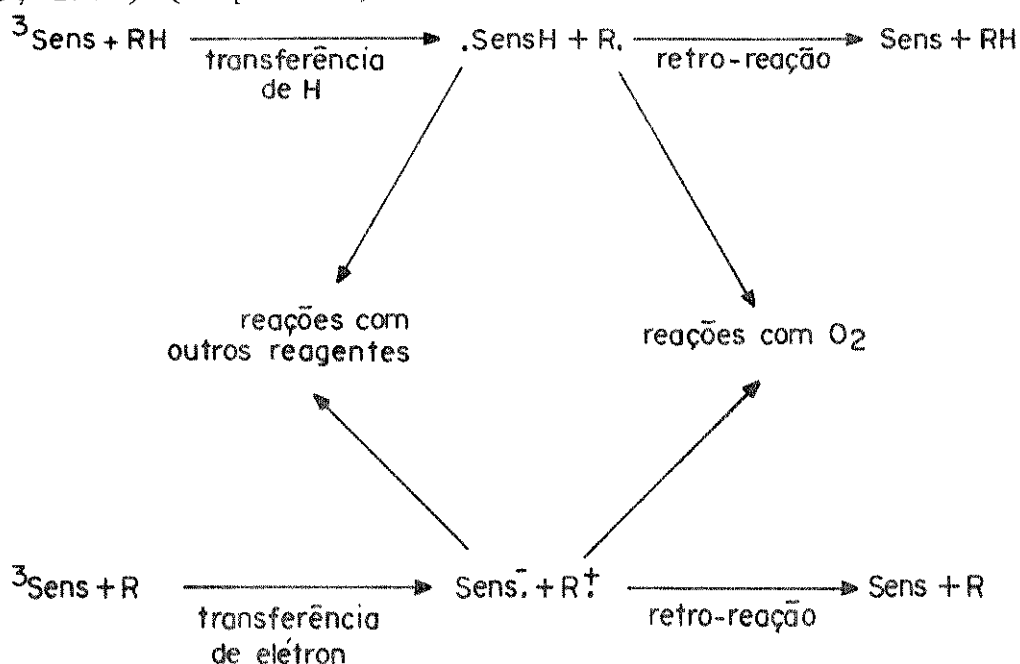
Esquema 1.4: Velocidades de formação e desativação dos dois estados excitados mais baixos de sensibilizadores.

Há duas grandes classes de reações possíveis para o sensibilizador triplete (Schenck e Koch, 1960; Foote, 1968). Estas reações são classificadas como Tipo I (Schenck e Koch, 1960; Gollnick, 1968) e Tipo II (Foote, 1976).

i. Reação do Tipo I

Envolve a produção de radicais ou íons radicalares por interação do sensibilizador triplete com um substrato redutor (RH ou R). Os produtos radicalares tem uma grande variedade de possíveis reações: transferência de elétrons para oxigênio, abstração

de elétrons ou hidrogênio a partir de outros substratos, iniciação de autooxidação de cadeia de radical livre, ou retro-reação (Foote, 1976) (Esquema 5).



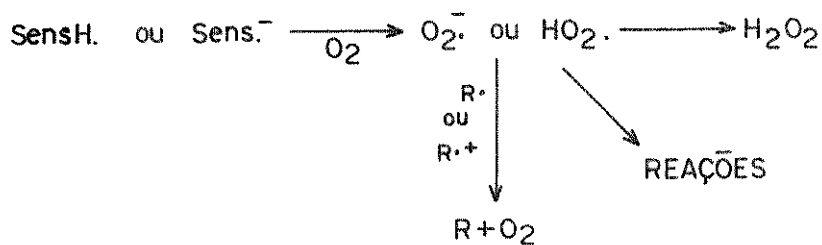
Esquema 1.5 - Química do tipo I: Interação direta do sensibilizador com outras moléculas.

A reação de sensibilizador com oxigênio produz $\text{O}_2^{\cdot -}$ ou seu ácido conjugado $\text{HO}_2^\cdot$ (Kepka e Grossweiner, 1972; Balny e Douzou, 1974). Esta espécie pode desproporcionar para H_2O_2 , reduzir o substrato oxidado ou sofrer outras reações (Esquema 6).

2i. Reação do tipo II

O sensibilizador triplete interage com oxigênio, e o tipo mais comum de interação envolve a transferência da excitação do sensibilizador para o oxigênio, produzindo oxigênio no estado excitado singlete (Foote, 1968; Wilson e Hastings, 1970; Politzer e col., 1971).

Menos eficientemente, ocorre transferência eletrônica do sensibilizador para oxigênio, levando ao íon superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) e uma forma oxidada do sensibilizador (Esquema 1.6) (Kepka e Grossweiner, 1972; Balny e Douzou, 1974).



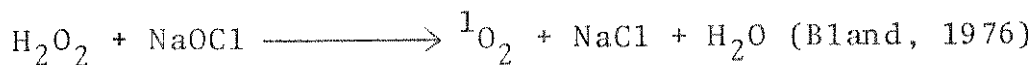
ESQUEMA 1.6

REAÇÃO DO SENSIBILIZADOR COM OXIGÊNIO

b) Fontes químicas de Geração de Oxigênio Singlete

i. Reação de H_2O_2 e um hipoclorito (OCl^-)

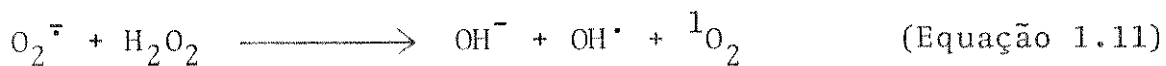
O oxigênio singlete é quimicamente gerado pela ação de hipoclorito com peróxido de hidrogênio (Equação 1.10) (Debey e Douzou, 1970).



(Equação 1.10)

2i. Reação de H_2O_2 e o radical $\text{O}_2^{\cdot -}$

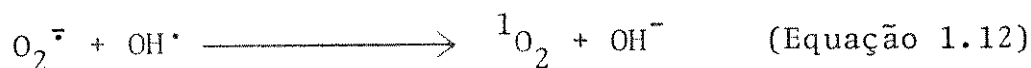
$\text{O}_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 reagem, gerando $\text{OH}^{\cdot}$ e ${}^1\text{O}_2$ (Equação 1.11).



Esta reação é referida como reação de Haber-Weiss (Halliwell, 1981) e ela tem sido considerada uma fonte potencial biológica de ${}^1\text{O}_2$ (Kelog e Fridovich, 1975).

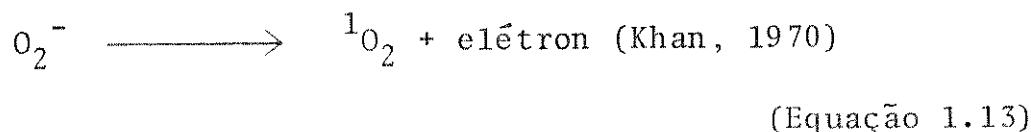
3i. Geração de $^1\text{O}_2$ a partir de $\text{O}_2^{\cdot -}$ e $\text{OH}^{\cdot}$

Um outro produto da reação de Haber-Weiss é o radical hidroxila $\text{OH}^{\cdot}$ (Krinsky, 1977). Tem-se sugerido que transferência de elétron de $\text{O}_2^{\cdot -}$ para $\text{OH}^{\cdot}$ resulta na geração de $^1\text{O}_2$ (Equação 1.12) (Arneson, 1970).



4i. Decomposição de íon $\text{O}_2^{\cdot -}$

A transferência de um elétron de $\text{O}_2^{\cdot -}$ para um acceptor adequado foi proposto no mecanismo onde $^1\text{O}_2$ é gerado na iluminação de cloroplastos (Equação 1.13) (Krinsky, 1977).

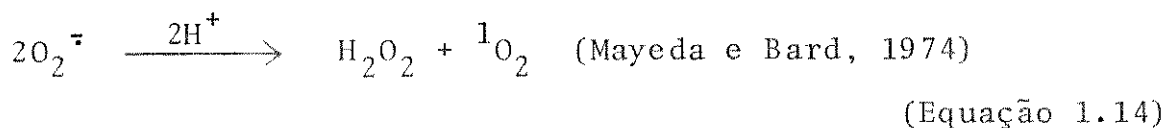


5i. Transferência de elétron de $\text{O}_2^{\cdot -}$ para radicais cátions

Uma evidência direta para transferência de elétron de $\text{O}_2^{\cdot -}$ para radicais cátions foi apresentada por Mayeda e Bard (1973).

6i. A dismutação de $\text{O}_2^{\cdot -}$

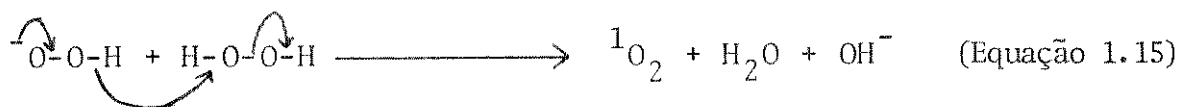
A dismutação espontânea de 2 moles de $\text{O}_2^{\cdot -}$ forma $^1\text{O}_2$ (Equação 1.14) (Arneson, 1970; Khan, 1970).



7i. Desproporcionação de H_2O_2

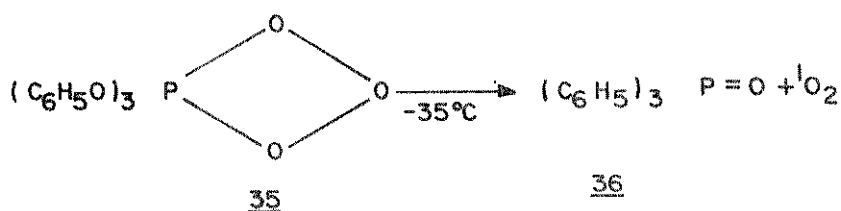
Smith e Kulig (1976), apresentaram evidências de que

$^1\text{O}_2$ pode surgir da desproporcionamento de H_2O_2 . A formação de $^1\text{O}_2$ pode se fazer através de um processo simultâneo de transferência de dois elétrons (Equação 1.15).



8i. Decomposição de ozonetos

Os ozonetos de estabilidade variada podem ser preparados com decomposição espontânea para $^1\text{O}_2$ (Krinsky, 1977). Os adutos entre aril fosfitos e ozônio(35), preparados a -70° , quando aquecidos acima de -35°C liberam $^1\text{O}_2$ de acordo com a reação (Equação 1.16) (Murray e Kaplan, 1968; Murray e col. 1970).



EQUAÇÃO 1.16

9i. Quebra de hidroperóxidos lipídicos

O $^1\text{O}_2$ pode ser formado durante a quebra de hidroperóxidos lipídicos pela oxidação de NADPH por microsomas de fígado. Este processo pode envolver a dismutação de dois radicais peróxidos (Nakano e col., 1975; King e col., 1975).

10i. Produção enzimática de $^1\text{O}_2$

Existe a possibilidade do oxigênio singlete ser formado em vários sistemas enzimáticos (Durán, 1982).

A mieloperoxidase, uma das principais enzimas localizadas nos grânulos primários de leucócitos polimorfonucleares, tem ação microbicidal na presença de H_2O_2 e um cofator haleto. É observada uma quimiluminescência no sistema mieloperoxidase/ H_2O_2 /haleto (Rosen e Klebanoff, 1977). Estes pesquisadores usaram combinação de análise de produtos inibidores de oxigênio singlete e efeitos de óxido de deutério, obtendo resultados satisfatórios. Para detecção de 1O_2 a xantina oxidase, quando incubada com um de seus substratos - xantina - dá uma quimiluminescência (Stauff e col., 1963; Stauff e Wolf, 1964). Com base em experimentos com rubreno (um inibidor de 1O_2), Khan (1976) concluiu que o sistema xantina oxidase gera 1O_2 . Até o presente, muitos autores estão a favor de que 1O_2 surge de uma reação por transferência de elétrons envolvendo O_2^- , ou através da reação de Haber-Weiss (Durán, 1982).

Goda e col. (1973) e Schaap e col. (1976) observaram uma quimiluminescência no sistema adrenoxina-adrenoxina redutase de bovino, dependente de NADPH, envolvendo possivelmente a formação de 1O_2 .

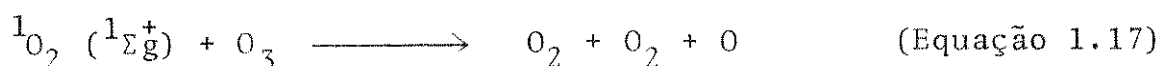
Trabalhos preliminares baseados em estudo espectral (Vidigal-Martinelli e col., 1979) mostraram que $^1O_2(^1\Delta_g \ ^1\Delta_g)$ pode ser formado pela oxidação enzimática de malonaldeído (M.A.) na presença de peroxidase do rabanete (HRP) e íons Mn^{++} .

c) Métodos físicos

i) Descargas gasosas

Tubos de descarga de radiofrequência são uma conveniente fonte de oxigênio no estado molecular excitado singlete para estudos espectroscópicos. É possível excitar 10% do oxigênio para o estado $^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g^+$ (este relaxando para $^1\Delta_g$) (Kearns, 1971).

Descargas de microonda produzem concentração substancial de $^1\text{O}_2$. Porém, pode ser suprimido pela interposição de um filme de óxido de mercúrio entre a descarga e a posição de observação; ozônio é um outro componente da descarga que pode reagir com o $^1\text{O}_2$ ($^1\Sigma_g^+$) de acordo com a reação (Equação 1.17):



Os átomos de oxigênio gerados por esta reação são então aniquilados por outras moléculas de ozônio (Equação 1.18).

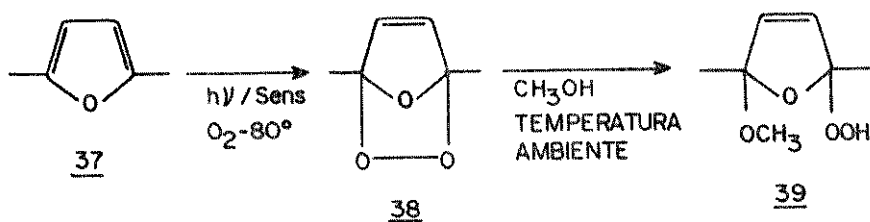


1.2.2. Identificação de Oxigênio Singlete

a) Análise de Produtos

i. Adição 1,4 a dienos e heterocíclicos, análogo a reação de Diels-Alder

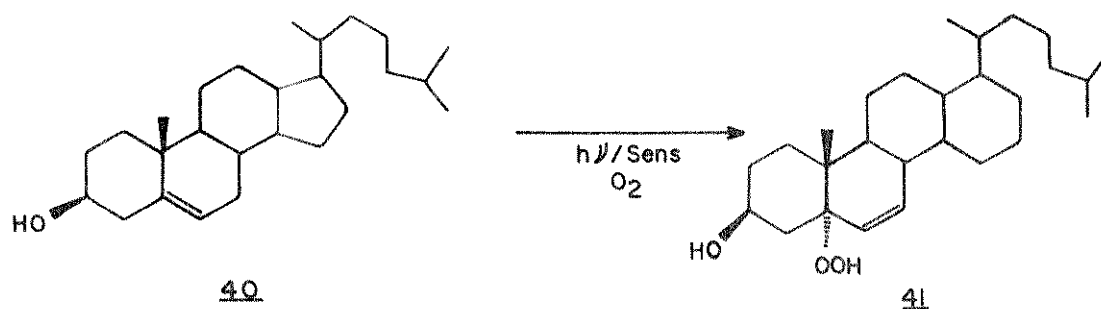
Os produtos iniciais para muitos dos heterocíclicos frequentemente produzem reações secundárias para dar produtos mais complexos. Por exemplo, a reação de dimetilfurano (37) forma o endoperóxido (38) que é estável somente em baixas temperaturas, onde tem sido caracterizado espectroscopicamente e por aniquiladores químicos. Em temperatura ambiente, o endoperóxido (38) reage com metanol para dar peróxido moderadamente estável (39) (Equação 1.19) (Foote e col., 1967).



EQUAÇÃO 1.19

2i. Reação-ene com olefinas

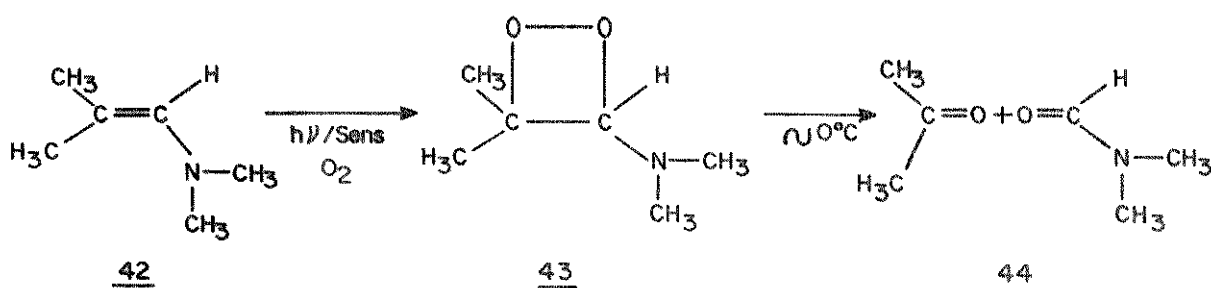
As olefinas com dois ou mais substituintes reagem para formar hidroperóxidos alílicos (Gollnick, 1968; Livingston, 1961). Embora muitas olefinas dissustituídas não sejam muito reativas, os ácidos graxos insaturados parecem ser uma exceção (Hall e Roberts, 1966; Cobern e col., 1966; Rawls e Van Santen, 1968; Clements e col., 1973). Nesta reação, a dupla ligação muda para a posição alílica, distinguindo assim a reação tipo-ene da reação de autooxidação (Gollnick e Kuhn, 1979) e, portanto, os radicais livres não são envolvidos. Como exemplo tem-se a fotooxidação de colesterol (40) para o hidroperóxido alílico, 3-β-hidroxi-5-α-colest-6-ene-5-hidroperóxido (41) (Equação 1.20) (Schenck e col., 1957; Schenk e Neumüller, 1958; Nickon e Bagli, 1959; Kulig e Smith, 1973).



EQUAÇÃO 1.20

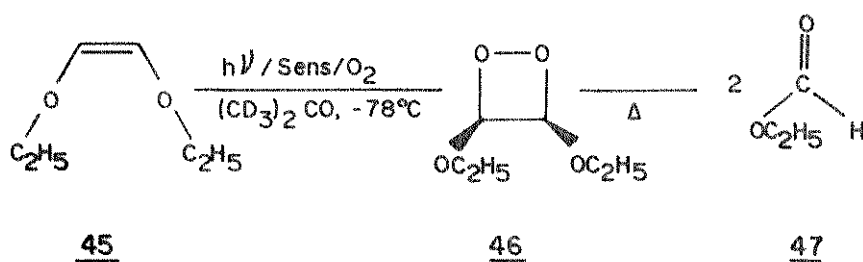
3i. Adição 1,2 à olefinas ricas em elétrons tais como ena-
minas e éteres vinílicos

Esta reação produz 1,2-dioxetanos monoméricos (43) que são frequentemente isoláveis. Em aproximadamente 0°C eles clivam para dois compostos carbonílicos, frequentemente com emissão de luz (Equação 1.21) (Foote e Lin, 1967). O produto é monomérico somente se a reação é feita em alta diluição e baixas temperaturas (Foote e col., 1975).



EQUAÇÃO 1.21

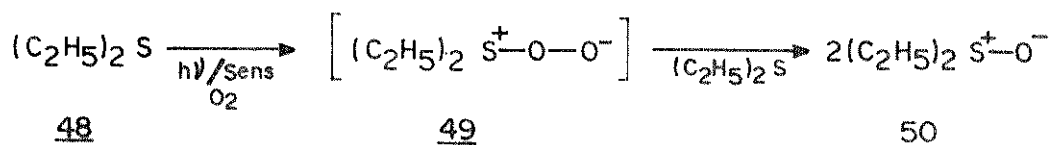
Os éteres vinílicos reagem facilmente com 1O_2 e a clivagem de produtos carbonílicos está numa produção essencialmente quantitativa (Equação 1.22) (Bartlett e Schaap, 1970; Schaap e Bartlett 1970).



EQUAÇÃO 1.22

4i. Oxidação de sulfetos para sulfóxidos

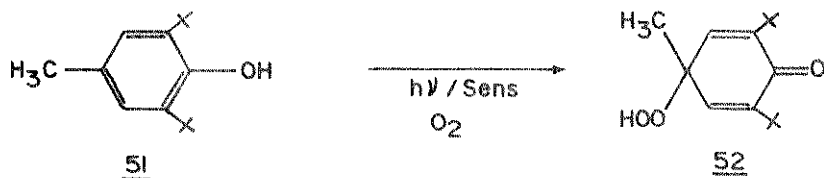
Na oxidação da dialquilsulfetos simples, tal como dietil, duas moléculas de sulfeto são oxidadas para cada molécula de oxigênio na formação de um intermediário persulfóxido (49), detectado por inibidores e experimentos cinéticos (Equação 1.23) (Foote e Peters, 1971).



EQUAÇÃO 1.23

5i. Oxidação de Fenóis

É provável que esta reação também proceda de reações sensibilizadas por meio do mecanismo Tipo I, dentro das mesmas condições, e os produtos obtidos sejam os mesmos de oxidações radicalares. (Foote, 1976); por exemplo, 2,6-di-tert-butil-4-metil-fenol (51) dá o composto (52) (Equação 1.24).



EQUAÇÃO 1.24

6i. β -caroteno

Foote e Denny (1968) encontraram que concentrações baixas de β -caroteno (da ordem de 10^{-4} M) inibe efetivamente $^1\text{O}_2$, transformando cis- β -caroteno em trans- β -caroteno.

b) Uso de água deuterada

Merkel e col. (1972) observaram que o tempo de vida de $^1\text{O}_2$ aumenta em 10 vezes na água deuterada, comparando-se com água comum (ver discussão).

c) Inibição por desativadores específicos

Estes compostos podem inibir oxidações por $^1\text{O}_2$ reagindo quimicamente ou fisicamente com elas.

i. Carotenóides

Os pigmentos carotenóides desativam $^1\text{O}_2$ fisicamente sem alterá-los quimicamente (Foote e Denny, 1968). Esta habilidade dos pigmentos carotenóides de desativarem $^1\text{O}_2$ é a base do papel protetor que estes pigmentos tomam contra a iniciação de quebras celulares por luz visível (Krinsky, 1977).

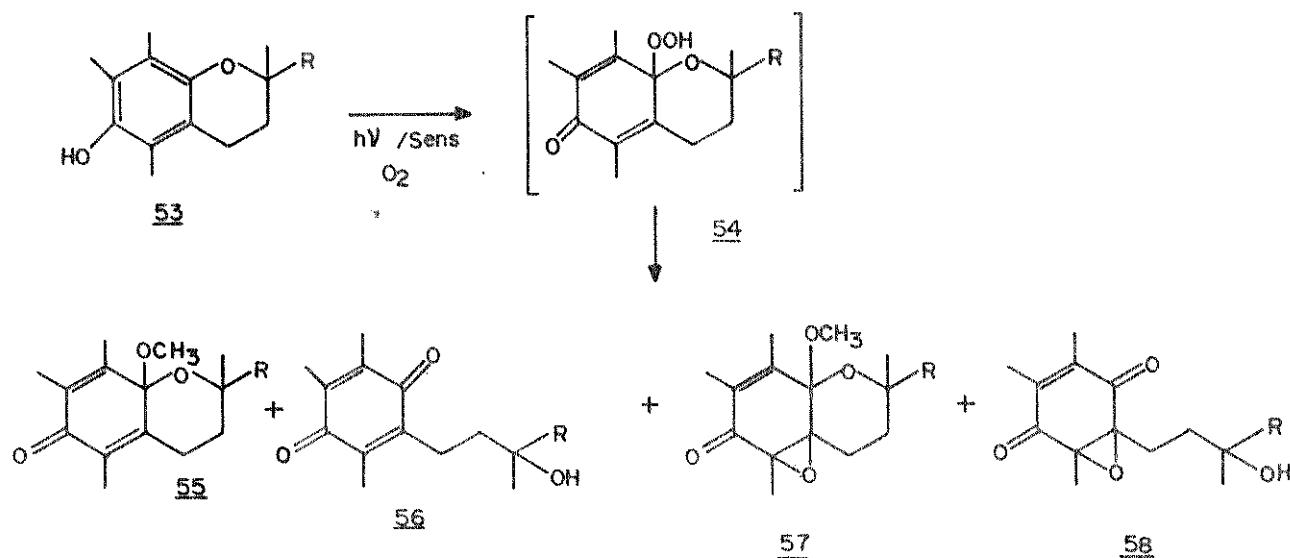
2i. Aminas

As aminas alifáticas primárias não desativam $^1\text{O}_2$ com muita eficiência. As aminas alifáticas secundárias e terciárias desativam em velocidades que variam de $1-100 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$ (Foote, 1979). DABCO desativa oxigênio singlete em todos os solventes investigados, sem reagir (Ouannès e Wilson, 1968; Foote e col., 1970; Smith, 1972; Gollnick e Lindner, 1973). Outras aminas reagem em

maior ou menor extensão - os produtos são complexos e frequentemente resultam de reações secundárias. Para que ocorra a reação é necessário haver abstração de átomos de hidrogênio α da amina; em sua ausência, aminas são somente desativadoras de oxigênio singlete (Gollnick e Lindner, 1973).

3i. Tocoferóis

A reação de α -tocoferol tem sido cuidadosamente estudada, envolvendo tanto a reação quanto desativação de 1O_2 , sendo que o último processo predomina. O tocoferol (53) é um bom desativador para 1O_2 e este pode ser um dos mecanismos pelo qual lipídeos são protegidos contra quebra oxidativa (Foote, 1976). Os productos são derivados de reações subsequentes de um hidroperoxidie-nona (54), embora o autor sugira o intermediário endoperóxido (Equação 1.25) (Grams e col., 1973; Grams e Eskins, 1972; Grams e Inglett, 1972).

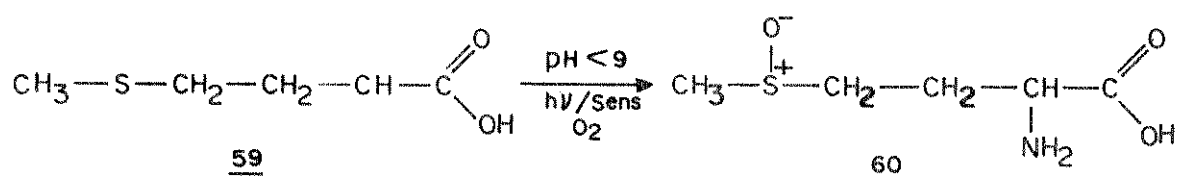


EQUAÇÃO 1:25

4i. Derivados de Aminoácidos e Peptídeos

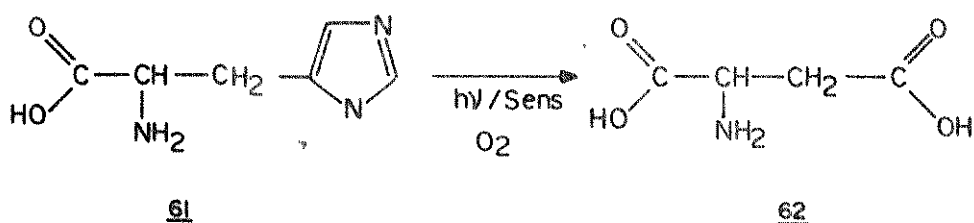
Os principais aminoácidos que sofrem a ação de 1O_2 , em todos os casos, com aminoácidos livres ou em peptídeos são: metionina, histidina, triptofano, tirosina e cisteína (Galiazzo e col. 1972).

A metionina (59) é oxidada à sulfóxido na presença da maioria dos sensibilizadores (Equação 1.26) (Weil e col., 1951).



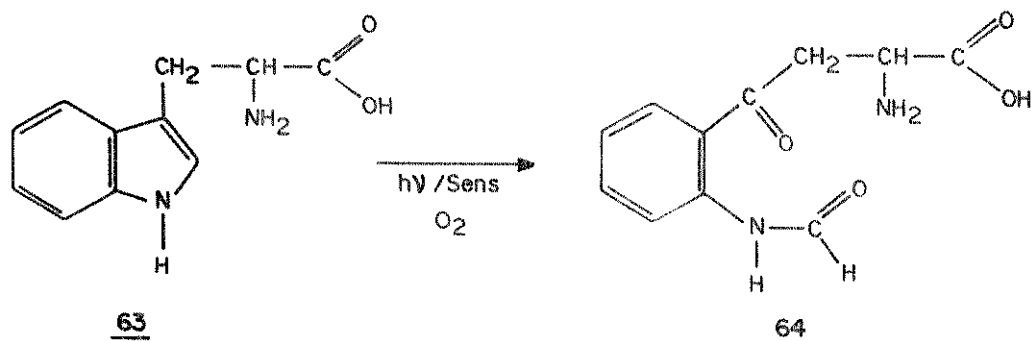
EQUAÇÃO 1.26

A histidina (61) dá produtos de clivagem do anel imidazol. Os produtos iniciais não foram isolados, mas estudos modelos com outros imidazóis sugerem que a clivagem da dupla ligação enamina (via dioxetano ou endoperóxido) seja o resultado primário seguido pela clivagem do ácido aspártico (Equação 1.27) (Wasserman, 1970; Tomita e col., 1969; Wasserman e col., 1968).



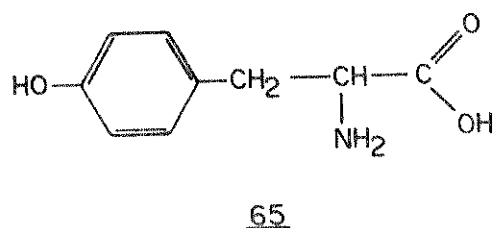
EQUAÇÃO 1.27

O triptofano (63) dá uma complexa mistura de produtos. O isolamento da N-formilquinurenina (64) como produto primário tem sido relatado por Spikes e Macknight (1970). Os produtos são formados pela clivagem da dupla ligação enamina, reação esperada com oxigênio singlete (Equação 1.28) (Witkop e Patrick, 1951; Witkop, 1956).

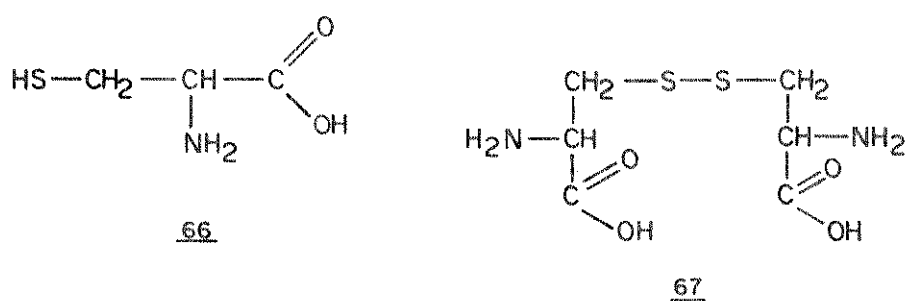


EQUAÇÃO 1.28

A tirosina (65) tem sido bastante estudada por espectroscopia de "flash". Os produtos não são conhecidos, mas acredita-se que o sítio da reação é o anel fenólico (Foote, 1976).



A cisteína (66) é lentamente oxidada a ácido cisteínico. A cistina (67) é aparentemente um produto dentro de certas condições (Foote, 1976).

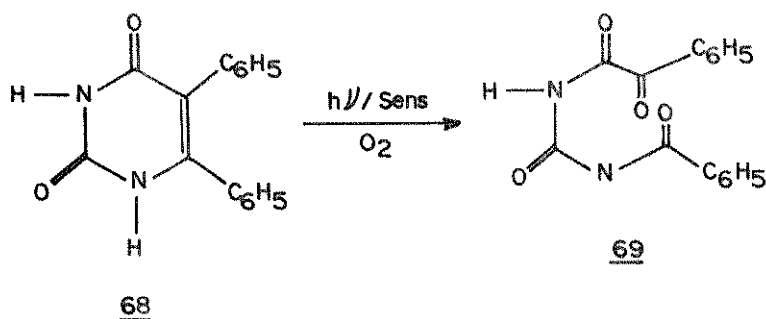


5i. Derivados de Ácidos Nucleicos

Os produtos primários de oxidação de ácidos nucleicos são muito pouco conhecidos. A guanina é o principal resíduo de bases destruído (Foote, 1976). Investigações das manifestações físico-químicas da degradação fotodinâmica mostram que azul de metile-

no e tiopironina atacam a guanina e timina de DNA. Tem-se observado que lumicromo (um derivado fotossensibilizado de riboflavina) pode causar fotooxidação de guanosina monofosfato pela ruptura do átomo de carbono-8 do resíduo purina (Sussenbach e Berends, 1963).

Observou-se que difeniluracil (68) e outros derivados de uracila oxidam-se em pH básico (Equação 1.29) (Foote, 1976).



EQUAÇÃO 1.29

O $^1\text{O}_2$ produzido quimicamente reage com bases livres e nucleotídeos em pH próximo e acima de 7, e que DABCO inibe a reação (Foote, 1976).

Porém, encontrou-se que a reação de $^1\text{O}_2$ com guanosina monofosfato é tão lenta que não é detectável em $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ não tamponado (Nilsson e col., 1972).

6i. Lipídeos ,

As olefinas com hidrogênio alílico são fotooxidadas a hidroperóxidos alílicos nas duplas ligações (Gollnick, 1968; Livingston, 1961). A oxidação lipídica é, provavelmente, a causa de danos da membrana comumente tidos como resultado de danos fotodinâmicos, embora os produtos não sejam conhecidos em muitos casos.

Pólen de pinheiros sujeitos ao ataque por $^1\text{O}_2$ mostra uma diminuição no conteúdo de ácidos graxos insaturados com relação aos análogos saturados. Os autores sugerem que isto demonstra um método pelo qual oxigênio singlete atmosférico pode produzir produtos tóxicos, como por exemplo os hidroperóxidos (Dowty e col., 1973).

1.2.3. Implicações médicas e biológicas

a) Porfiria

As porfirias humanas compreendem diversas síndromes diferentes que são causadas pelos defeitos no metabolismo de porfirinas no sangue (Foote, 1976). Algumas porfirias, especialmente a protoporfiria eritropoética (EPP), estão associadas com a fotossensibilidade. Pacientes com esta doença estão sujeitos a edema e eritema quando expostos à luz. Esta fotossensibilidade é causada pela deposição de porfirinas fotossensibilizantes na pele. Tais pacientes apresentam também elevado nível de protoporfirina nos glóbulos vermelhos (Magnus e col., 1961). Irradiação do sangue de tais pacientes causa hemólise, a qual requer tanto oxigênio quanto luz e está associada com peroxidação lipídica e aumento da fragilidade da membrana da célula vermelha (Goldstein e Haber, 1972; Schorsthurst e col., 1970; Hsu e col., 1971). Uma possível explicação é que hemólise no sangue porfírico é causada pela oxidação fotossensibilizada de colesterol em membranas de eritrócitos (Lamola e col., 1973).

b) Tratamento de Icterícia do Recém-Nascido

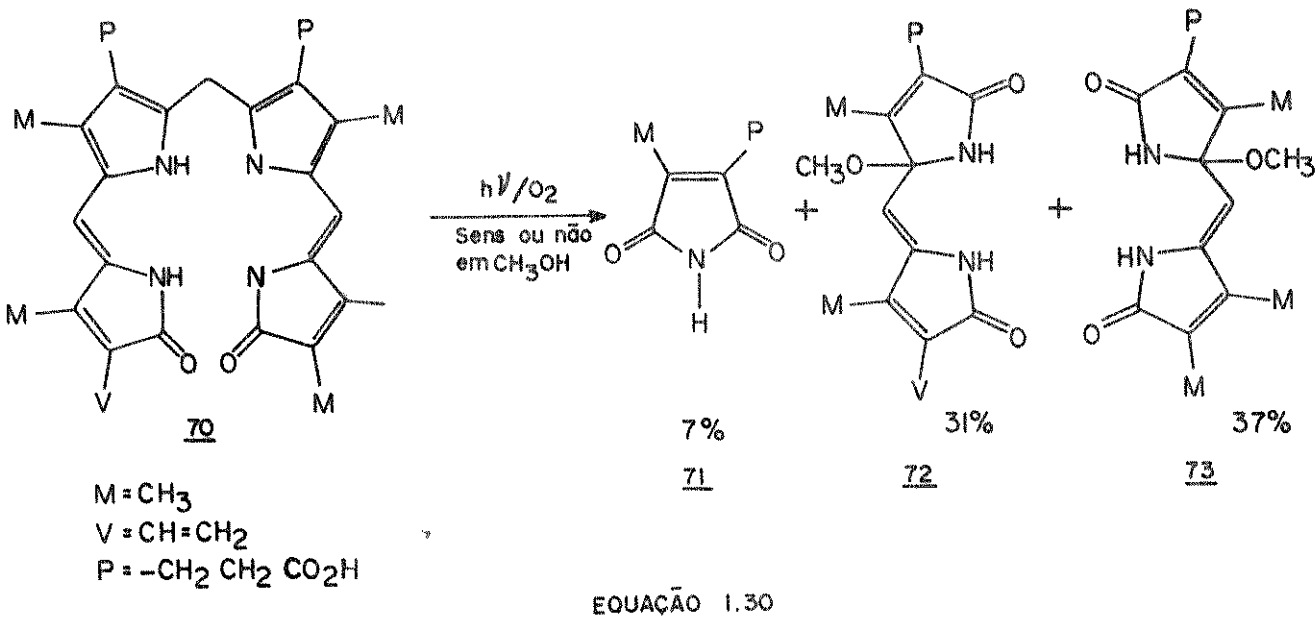
Um problema comum entre recém-nascidos (principalmente prematuros) é a icterícia; se não tratada, pode levar a danos no cérebro (Bergsma e col., 1970). A causa é a baixa atividade de glucuroniltransferase, que efetua a conversão da bilirrubina (pigmento amarelo solúvel em lipídeos) para o conjugado ácido glucurônico (solúvel em água). A concentração em excesso de bilirrubina se deposita sobre a pele e cérebro. O tratamento comum para icterícia neonatal é irradiação com luz nos comprimentos de onda absorvidos pela bilirrubina (centrados em 450 nm) (Bergsma e col.,

1970; Cremer e col., 1957).

A fotooxidação de bilirrubina in vitro tem sido estudada por diversos grupos (Foote e Ching, 1975). Os produtos são os esperados a partir do ataque de oxigênio singlete aos anéis pirrólicos. (Equação 1.30) (Foote e Ching, 1975).

Tem-se mostrado que bilirrubina pode atuar como um sensibilizador, formando $^1\text{O}_2$ que é rapidamente desativado por ela mesma (MacDonagh,1971; Bonnett e Stewart, 1972 a e b).

Atualmente, o mecanismo mais aceito como mecanismo de eliminação de bilirrubina por fototerapia é a fotoisomerização (MacDonagh e col., 1980).



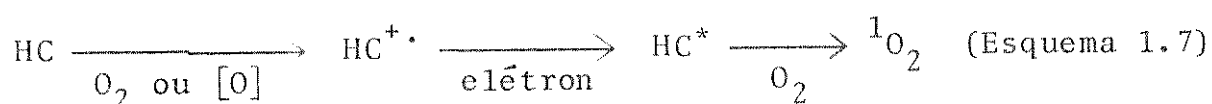
c) Tratamento de Herpes simplex

As lesões do vírus Herpes simplex são tratadas na presença do sensibilizador vermelho neutro, seguido de breve irradiação (Felber e col., 1973).

d) Fotocarcinogênese

A associação entre habilidade fotossensibilizante e

carcinogenicidade de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares tem sido repetidamente feita. Muitos fotossensibilizadores fotodinâmicos são capazes de produzir tumores sobre prolongada irradiação (Foote, 1976). Tem-se apontado que hidrocarboneto excitado pode também ser produzido na ausência da luz (Foote, 1972). Os hidrocarbonetos aromáticos polinucleares são facilmente oxidados pelo oxigênio molecular no estado triplete ou outros oxidantes a radicais cátions (Foote, 1976). Os radicais cátions aromáticos reagem com agentes redutores para produzir uma fração do hidrocarboneto produto no estado excitado (Hercules, 1969; Cruser e Bard, 1969). Este hidrocarboneto excitado gera então o oxigênio singlete. Este esquema produz um método potencial de geração de oxigênio singlete a partir de hidrocarbonetos carcinogênicos sem luz. (Esquema 1.7).

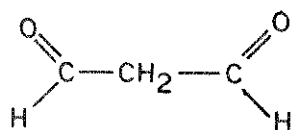


Oxigênio singlete a partir de hidrocarbonetos carcinogênicos sem luz.

1.3. Malonaldeído e sua Toxicidade

Tem-se sugerido um possível papel para peroxidação lipídica em carcinogênese e mutagênese, devido à habilidade de antioxidantes (incluindo vitamina E) em proteger contra a carcinogênese experimental (Haber e Wissler, 1962; Shamberger, 1970; Wattenberg, 1972). Há evidências de que altas dietas em ácidos graxos poliinsaturados conduz a uma maior incidência de câncer. A relação de peroxidação lipídica para carcinogênese e mutagênese entretanto permanece fraca, particularmente na ausência de um mecanismo claro pelo qual a quebra dos ácidos graxos insaturados da membrana celular poderia causar danos no material genético (Mukai e Goldstein, 1976).

Um intermediário potencial em tal processo é malonaldeído (M.A.H.)(74), um dialdeído de três carbonos



74

produzido durante a decomposição oxidativa do ácidos graxos poli-insaturados; pode ser formado durante o metabolismo de certos hidrocarbonetos carcinogênicos (Shamberger, 1972) e também em quantidades relativamente altas, durante a irradiação de soluções aquosas de glucose, glicerina e ácido glutâmico (Brooks e Klammerth, 1968).

A bleomicina é um antibiótico com atividade antitumor que provavelmente ocorre pela degradação de DNA, precedida pela formação de um complexo de bleomicina com Fe^{+2} e oxigênio molecular; quando Fe^{+2} é adicionado a misturas aeróbicas de bleomicina e DNA, a reação resultante produz um material que pode reagir com ácido 2-tiobarbitúrico para formar um aduto que tem as mesmas características espectrais dos adutos de M.A.H.-ácido 2-tiobarbitúrico (Burger e col., 1980). Estes pesquisadores encontraram resultados consistentes com a hipótese de que a mistura de reação contém um produto que pode ser convertido a M.A.H. por hidrólise. O produto é menos estável e reage mais rapidamente que M.A.H. na formação do aduto com ácido 2-tiobarbitúrico.

EDTA tem sido grandemente usado como preservativo do plasma. Nota-se, geralmente, que os antioxidantes naturais presentes no plasma são suficientes para protegê-lo de oxidação. Quando o plasma é exposto ao ar, a concentração de M.A.H. aumenta linearmente com o tempo durante estocagem, sempre que EDTA está

presente (Lee, 1980). A peroxidação lipídica afeta não somente a solubilidade e estrutura dos componentes do plasma, como também seu consumo pelas células (Lee, 1980). Fogelman e col. (1980) demonstraram que o consumo de lipoproteínas de baixa densidade (LDL nativo) e LDL modificado por M.A.H., foram significativamente diferentes. Tratamento de LDL por M.A.H. não muda o peso molecular da lipoproteína, mas altera sua mobilidade eletroforética, possivelmente pela formação de ligações intramoleculares de base de Schiff com o grupo ϵ - amino de lisinas em LDL, modificando assim sua carga (Fogelman e col., 1980). Estes pesquisadores encontraram que LDL nativo é incapaz de produzir acumulação de éster-colesteril em monócito-macrófagos humanos, mas que LDL modificado por M.A.H. produz acumulação de éster colessterol. Formaram assim, a hipótese de que uma modificação de LDL in vivo pode resultar de uma interação com M.A. que é liberado de plaquetas do sangue e produzido por peroxidação lipídica no local de lesão arterial. Como M.A.H-LDL pode ser absorvido por um receptor diferente do receptor de LDL nativo, explica-se então, hipoteticamente, a acumulação de ésteres colessterol dentro das células de reação aterosclerótica em pacientes homozigotos com receptor negativo tendo hipercolesterolemia hereditária.

O nitrito é usado como aditivo no alimento e é produzido enzimaticamente a partir do nitrato presente em vegetais. A reação de nitritos e aminas presentes nos alimentos produz nitrosaminas carcinogênicas durante o processamento de alimento ou no estômago humano (Kurechi e col., 1980). A formação de nitrosaminas é impedida em alimentos contendo lipídeos e resíduos de ácidos graxos insaturados (Kurechi e Kikugawa, 1979). Porém M.A.H., que pode ser formado pela peroxidação de lipídeos em gêneros alimentícios e células (Gardner, 1979), aumenta a formação de nitrosaminas em valores de pH relativamente altos (Kurechi e col., 1980).

Esta descoberta, e a recente informação de que formação de nitrosaminas aumenta em óleo de bacon frito (Mottram e col., 1977), sugere que M.A.H. formado na gordura do tecido adiposo poderia promover a formação de nitrosaminas; e aponte, assim, um possível efeito carcinogênico de M.A.H. (Kurechi e col., 1980).

A peroxidação lipídica in vitro e in vivo dá M.A.H., que pode reagir com uma grande variedade de compostos aminofóricos, incluindo ácidos nucleicos. A reação de M.A.H. com DNA produz efeitos fisicoquímicos que sugerem a reticulação interfita; também pode causar perda da atividade biológica de DNA (Summerfield e Tappel, 1981). Reticulação de DNA pode interferir com a síntese de mRNAs e proteínas, e assim prejudicar a função celular, causando envelhecimento e eventual morte (Summerfield e Tappel, 1981).

Quando DNA reage com M.A.H. gerado pela radiólise de ^{14}C -glucose, muito da radioatividade é encontrada em adutos contendo guanina e citosina. Observou-se a diminuição do número de células de fibroblastos humanos de DNA e síntese de proteína sob a influência de quantidades crescentes de M.A.H.. A 37°C a desnaturação de DNA causada pela incubação com M.A.H. é tão extensa, que parte do DNA torna-se completamente insolúvel em solução diluída do sal citrato (Brooks e Klammerth, 1968).

O M.A.H. inicia o câncer de pele em ratos (Andreone e Willis, 1973) e faz reticulação dos grupos amino de DNA em solução, presumivelmente através da formação das bases de Schiff (Brooks e Klammerth, 1968; Reiss e col., 1972).

O M.A.H. atua em envelhecimento celular (Munkres, 1976), carcinogênese (Kubinski e col., 1973) e danos por radiação (Packer e col., 1967).

Reiss e col., (1972) encontraram uma correlação entre a formação de produtos fluorescentes (atribuída à reticulação de

aminoácidos por M.A.H. com formação da base de Schiff) e a perda de atividade padrão("template"), mostrando evidências de que M.A.H. altera a estrutura de DNA.

A importância de M.A.H. em sistemas biológicos deve ser enfatizada. O M.A.H. é produzido durante irradiação- γ de aminoácidos tais como arginina, metionina e homocistina (Ambe e Tappel, 1961). É o maior constituinte em extrações aquosas na oxidação de metil araquidonato e metil-linolenato (Kwon e Olcott, 1966a e b). Interage com DNA in vivo e in vitro como demonstrado pelos perfis de desnaturação térmica, comportamento cromatográfico e degradação incompleta dos produtos de reação pela deoxirribonuclease (Brooks e Klammerth, 1968).

1.4. Oxigênio Singlete e DNA

Os ácidos desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA) são macromoléculas organizadas em cadeia, cuja função é armazenar e transmitir a informação genética. Estão entre os principais constituintes de todas as células, perfazendo juntos de 5 a 15% do peso seco celular. Os ácidos nucleicos estão também presentes nos vírus, complexos de proteína e ácidos nucleicos infectantes, capazes de dirigir sua própria replicação em células hospedeiras específicas. As unidades monoméricas do DNA são os desoxirribonucleotídeos (75). Cada nucleotídeo possui três componentes característicos: uma base hidrogenada heterocíclica (que é um derivado de pirimidina ou purina), uma pentose e uma molécula de ácido fosfórico. Os principais constituintes dos DNAs são quatro desoxirribonucleotídeos, que diferem entre si apenas nas bases nitrogenadas, segundo as quais são denominados. As quatro bases características das unidades desoxirribonucleotídicas do DNA são a adenina (76) a guanina (77) (derivados da purina), a citosina (79) e a ti

nina (78) (derivados da pirimidina). A pentose liga-se à base nitrogenada mediante uma ligação β -N-glicosídica entre o átomo de carbono 1 da pentose e o átomo de nitrogênio 9 das bases purínicas, ou átomo de nitrogênio 1 das bases pirimidínicas. O grupo de fosfato dos nucleotídeos está unido ao átomo de carbono 5 da pentose através de uma ligação de éster. Quando o grupo de fosfato de um nucleotídeo é removido por hidrólise, a estrutura restante recebe o nome de nucleosídeo (base + açúcar) (Lenhinger, 1976) (Fig. 1.5).

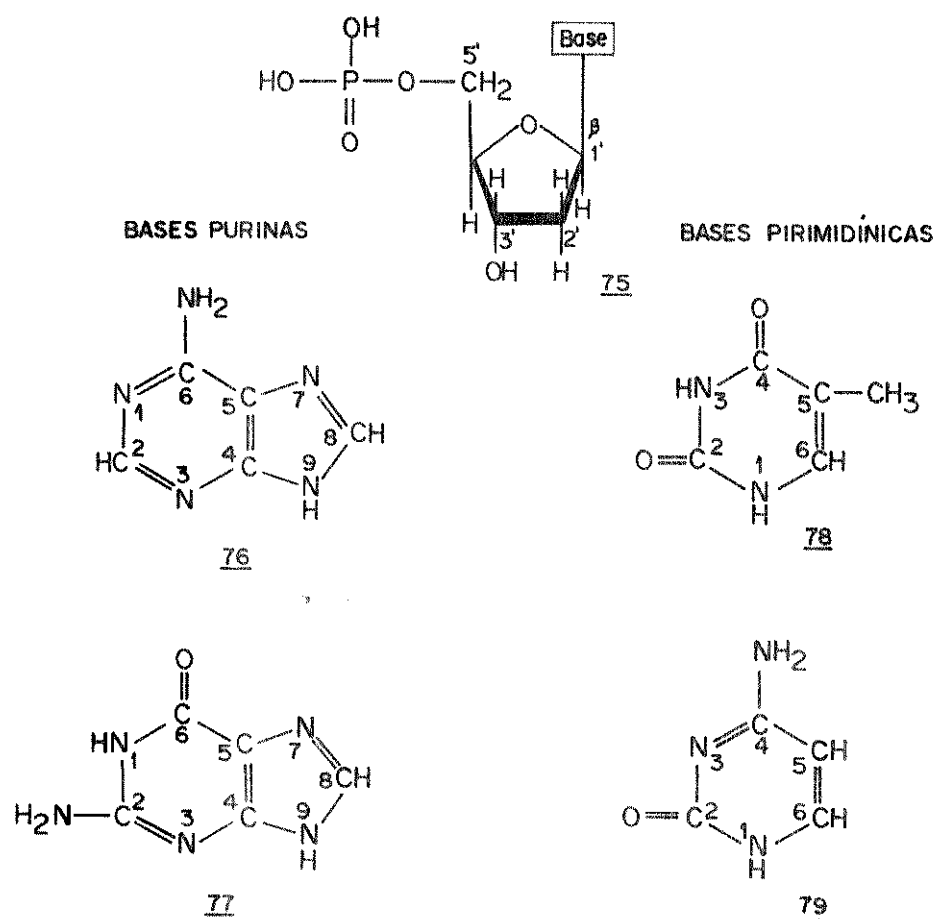


FIG. 1.5 : 2' — DESOXIRIBONUCLEOSÍDEO -5'-MONOFOSFATO E AS BASES PURINAS E PIRIMIDÍNICAS COMUNS AO DNA

Tem-se realizado vários estudos sobre a ação fotodinâmica de $^1\text{O}_2$ sobre DNA e sobre as bases constituintes do DNA. Iluminação de DNA de timo de bezerro ("calf thymus"), na presença de riboflavina, produz degradação em partes isoladas de cada cadeia de DNA. Sob irradiações prolongadas, ocorrem cisões nas cadeias duplas, indicadas pela diminuição da viscosidade do DNA (Speck e col., 1976). Tratamento fotodinâmico de guanosina usando azul de metileno e acridina laranja como sensibilizadores mostrou, que além de alterações químicas do anel da guanosina, podem ocorrer quebras de ligação dos N-glicosídeos (Sastry e Gordon, 1966; Was-kell e col., 1966).

1.5. Oxigênio Singlete e Supressores Biológicos

A histidina, guanosina, metionina, triptofano e bilirrubina são largamente usadas para detecção de oxigênio singlete. Estes aceptores tanto reagem quanto desativam as moléculas de oxigênio singlete.

A guanosina anteriormente foi empregada para a diferenciação das reações Tipo I de Tipo II, usando-se sua foto-oxidação por oxigênio singlete gerado pela sensibilização de rosa bengala, em várias técnicas (Foote, 1978).

A histidina livre 4,0 mM protege tripsina de fotoinativação usando azul de metileno ou eosina Y como sensibilizador (Glad e Spikes, 1966), Nilsson e col., (1972), Matheson e col. (1975) e Schmidt e Rosenkranz (1972), mostraram que a ação protetora de histidina, metionina e triptofano consiste na desativação física (k_q) e reativa de oxigênio singlete (k_r) sendo que $k_q \sim 10 k_r$.

Foote e Ching (1975) mostraram que bilirrubina é um dos aceptores mais reativos para oxigênio singlete; também desativa oxigênio singlete por supressão física numa velocidade um pou-

co mais rápida do que reage. Na conclusão do trabalho encontraram que oxigênio singlete gerado por fotossensibilização de azul de metileno e desativado por bilirrubina explica satisfatoriamente cerca de 83% da remoção total de oxigênio singlete, com o restante sofrendo reação.

DABCO também é um forte diagnóstico para oxigênio singlete. DABCO e os aminoácidos metionina, triptofano e histidina, numa concentração de 0,2 mM, inibiram a oxidação de difenilisobenzofurano (DFIBF) por oxigênio singlete gerado no sistema lactoperoxidase/ H_2O_2 /Br⁻/Triton X-100; esta oxidação foi acompanhada espectrofotometricamente pelo controle da diminuição da absorbância em 420 nm de DFIBF. Em concentrações maiores destes aceptores, ocorre inibição completa (metionina 1,0 mM inibiu 90%) (Piatt e col., 1977).

Ouannês e Wilson (1968) descobriram que DABCO é um forte inibidor de reações envolvendo oxigênio singlete em solução; também demonstraram que ele desativa oxigênio singlete na fase gasosa. DABCO não reage quimicamente com oxigênio singlete, tanto na fase gasosa quanto em solução ($k_q > 100 k_r$). Isto porque, embora haja hidrogênios- α presentes, o átomo de nitrogênio está numa posição cabeça de ponte; assim, qualquer oxidação levando a formação de dupla ligação C=N é restrita por razões estruturais ("regra de Bredt" - esta regra estipula que, exceto para sistemas muito grande de anéis, a introdução de uma dupla ligação na cabeça de ponte de sistemas bicíclicos é proibida por razões estruturais) (Bellus, 1979). Ouannês e Wilson (1968), estudaram o mecanismo de desativação de oxigênio singlete por DABCO. Praticamente não ocorre nenhuma reação química, e a existência de um estado triplete mais baixo de DABCO (abaixo de 22,5 kcal) para o qual $O_2 (^1\Delta_g)$ poderia transferir sua energia, parece improvável. Os pares de elétrons isolados de DABCO sugerem que a desativação de oxigênio singlete poderia ocorrer através de um processo de transferência de

carga (Ouannês e Wilson, 1968).

DABCO é grandemente usado como teste para a formação e participação ou não de oxigênio singlete em reações de oxigenação. Porém, anomalias durante os testes com DABCO podem surgir: aceleração da velocidade devido à reação com acceptor em reação competitiva de DABCO com acceptor (Jefford e col., 1976), aumento da emissão dimol de $^1\text{O}_2$ em 634 nm (Durán e Faljoni, 1978) ou nenhum efeito em reações bem estabelecidas de oxigênio singlete (Seely, 1977).

Cadet e Teoule (1978) mostraram que guanosina reage especificamente com oxigênio singlete, usando deoxi-(U- ^{14}C)-guanosina.

O efeito de solvente deutério sobre oxigênio singlete é um forte diagnóstico para o envolvimento de oxigênio singlete em vários processos fotofísicos e fotoquímicos (Kajiwara e Kearns, 1973).

Merkel e col., (1972) controlaram a fotossensibilização de azul de metileno pela oxidação de difenilbenzofurano (DFBF) em $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1 e $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1, e observaram um aumento em dez vezes na eficiência da fotooxidação no solvente deuterado. Como a constante de velocidade de reação não é afetada pela deuteração, este aumento de dez vezes é atribuído ao aumento do tempo de vida de oxigênio singlete. Também usaram soluções $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1 e $\text{D}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1 e encontraram que o tempo de vida de oxigênio singlete aumentou por um fator de 3.

1.6. Oxigênio Singlete e Lisozima

A lisozima é uma pequena proteína globular com um peso molecular de 14500 (Jollês, 1964).

A atividade enzimática de lisozima diminui por um processo de velocidade pseudo-primeira-ordem-total, durante a irradiação de uma solução de proteína com luz visível, contendo acrí-

dina laranja (Schmidt e Rosenkranz, 1976 e 1972). Estudos com solvente deuterado a íons N_3^- indicaram que o oxigênio singlete é envolvido na reação fotodinâmica com lisozima (Rosenkranz e col., 1978).

Kepka e Grossweiner (1973) fotossensibilizaram lisozima usando eosina Y como sensibilizador e observaram que o oxigênio singlete é o maior agente inativante (com contribuições menores para a oxidação de intermediários de corante). Observaram também que o triptofano foi destruído durante este tratamento, causando perda da atividade enzimática.

A fotooxidação de lisozima na presença de azul de metileno envolve a ação de oxigênio singlete. Provavelmente se deva à interação direta de lisozima com oxigênio singlete, com a destruição de triptofano e histidina (Churakova e col., 1973).

A lisozima fotooxidada por azul de metileno em solução de ácido acético 84% causa modificação seletiva de resíduos metionil, que são convertidos para sulfóxido, sendo que nenhum dos outros aminoácidos são afetados. A proteína fotooxidada mostra uma atividade enzimática drasticamente reduzida, que pode ser correlacionada com a mudança conformacional de proteína (Jori e col., 1968).

Em solução de ácido fórmico somente triptofano e metionina são fotoreativos, isto se a proflavina for usada como sensibilizador (Benassi e col., 1967; Galianzo e col., 1968).

Galianzo e col., (1968) sugerem que somente alguns dos seis resíduos triptofanil que estão presentes na molécula de lisozima estejam associados com a atividade catalítica da enzima.

CAPÍTULO 2

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Material

DROGAS	PROCEDÊNCIA
Acetato de Sódio	Dyne Produtos Químicos Indústria e Comércio Ltda.
Acetona	Carlo Erba
Ácido Acético	Carlo Erba
Ácido Clorídrico	J.T. Baker Chemical Co.
Ácido Fosfórico	J.T. Baker Chemical Co.
Benzoato de sódio	Aldrich Chemical Co.
Bilirrubina	Sigma Chemical Co.
Cacodilato de Sódio	Fisher Scientific Co.
Catalase	Sigma Chemical Co.
Citrato de Sódio	Dyne Produtos Químicos Indústria e Comércio Ltda.
Clorofórmio	Carlo Erba
1,4-diazobiciclo(2.2.2)octano	Aldrich Chemical Co.
Etanol	Aldrich Chemical Co.
Fenol	Fisher Scientific Co.
Fosfato dibásico de sódio	May e Baker Ltda.
Fosfato monobásico de sódio	Carlo Erba
Guanosina	Sigma Chemical Co.
Hematoporfirina dihidrocloreto	Sigma Chemical Co.
β -(3,4-dihidrofenil)-L-alanina	Merk
Hidróxido de sódio	Merk
Histidina	Sigma Chemical Co.
Lisozima de clara de ovo de galinha	Sigma Chemical Co.
Metionina	Sigma Chemical Co.
Peroxidase do rabanete (Tipo VI)	Sigma Chemical Co.

DROGAS	PROCEDÊNCIA
Peróxido de hidrogênio	Merk (30%)
Sulfato de manganês monohidratado	J.T. Baker Co.
Superóxido dismutase	Sigma Chemical Co.
1,1,3,3,tetra-etóxi-propano	Aldrich Chemical Co.
Triptofano	Sigma Chemical Co.
Bacto-Triptona	Difco Laboratories
Bacto-Extrato de Levedura	Difco Laboratories

2.2. Aparelhagem

As medidas de consumo de oxigênio foram feitas num monitor biológico da "Yellow Springs Instruments", modelo 53, termos-tatizado.

Os espectros da região ultravioleta e visível foram ob-
tidos num espectrofotômetro Zeiss DMR 21 com registrador, utili-
zando celas de 1 cm de caminho óptico.

A medida de emissão usando DNA como supressor foi fei-
ta num contador de cintilação líquida Beckman LS-250, com o cir-
cuito de coincidência desligado.

A intensidade de fluorescência foi medida no espectro-
fluorímetro Perkin-Elmer MPF-4, sem efetuar correções para o com-
primento de onda ou flutuação da intensidade de emissão da fonte
de excitação. A intensidade da emissão de luz com o tempo foi me-
dida num fotômetro Zinner-Shimizu equipado com uma fotomultiplica-
cora IP28 (Zinner e Shimizu, 1978).

Os valores de pH foram lidos num potenciômetro Metrhom,
tipo E-388.

A cromatografia de camada delgada bidimensional foi fei-
ta em papel Whatman nº 1, utilizando como eluentes primeiramente
clorofórmio/metanol/água na proporção de 4:2:1 e depois acetato
de etila/2-propanol/água na proporção de 75:16:9 (Cadet e Teoule,
1973).

A decomposição de (8-³H)-guanosina no sistema enzimáti-
co foi analisada pelo método de Cadet e Teoule (1978). O prato
cromatográfico de camada delgada resolvido foi tratado com 15 ml
de solução etérea de 2,5-difeniloxaxole 7% (PPO). O prato foi en-
tão exposto ao filme Raio-X e -80°C por mais de duas semanas.

A centrifugação de DNA a -4°C foi feita na centrífuga
Sorvall Superspeed RC 2-B Automatic Refrigerated, em rotor SS-34.

A análise de aminoácidos foi feita em um analisador Beckman 120 G no laboratório do Dr. E.Silva, Universidade Católica do Chile (Santiago, Chile), pelo método de Matsubara e Sasaki (1969).

2.3. Métodos

2.3.1. Síntese

a) Malonaldeído sódico (M.A.)

Usou-se uma modificação de Grabowski e Autrey (1969).

TEP 3,3 g, 1,2 ml de HCl e 1,6 ml de água foram agitados vigorosamente por 1,4 horas em temperatura ambiente. Em menos tempo de agitação, torna-se maior a possibilidade de BEA apresentar-se em quantidade significativa (Marnett e Tuttle, 1980); Se se ultrapassa o tempo, ocorre a formação de dímeros de M.A., constatado pela cor amarela que o pó adquire no final da síntese. A solução amarelo homogênea resultante foi esfriada em gelo e ajustada para pH 10 com NaOH 5N (ainda no gelo). A solução vermelha resultante foi gradualmente adicionada acetona 0,8 lt., ocorrendo a precipitação de cristais coloridos. O precipitado foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 42 lavado com acetona e secado em temperatura ambiente à vácuo por 12 horas. A dissolução do sal foi feita a quente, num volume mínimo (para dissolução) de CH_3OH , seguida da adição de carvão ativo. A solução foi mantida sobre uma chapa de aquecimento ligada no mínimo de temperatura, agitada por 0,5 horas e filtrada em papel de filtro Whatman nº 42. Ao filtrado foi adicionado vagorosamente 1 lt. de éter etílico. O precipitado incolor resultante foi filtrado e secado a temperatura ambiente à vácuo por 24 horas, produzindo 1,6 g (49%) de M.A.. A pureza do sal

preparado desta forma foi demonstrada pelo espectro U.V. em CH_3OH ($\lambda_{\text{max}} = 266 \text{ nm}$; $\epsilon = 22.700 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).

b) Malonaldeído ácido (M.A.H.)

Foi usada uma modificação de Summerfield e Tappel (1978).

O M.A. inicialmente preparado segundo o método de Grabowski e Autrey (1969); o pó incolor foi dissolvido em água, levado a pH 3,0 com HCl 1N e aquecido a 50°C . O M.A.H. foi volatilizado por um fluxo de nitrogênio (para evitar auto-oxidação) e então condensado a -78°C sob nitrogênio líquido, em tampão fosfato 0,01 M pH 7,0. A solução é estável quando estocada no freezer. A concentração da solução foi medida por espectro na região U.V. em H_2O ($\lambda_{\text{max}} = 267 \text{ nm}$; $\epsilon = 27.100 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$; Malhotra e Whiting, 1960).

c) β -Etoxi-acroleína (BEA)

Foi usada uma modificação do método de Marnett e Tuttle (1980).

Ácido tolueno sulfônico (13 mg) e água (0,5 g) foram adicionados a TEP (5,5 g) e agitados a 80°C por 2 horas ocorrendo a destilação do etanol, 1,5 ml. O condensador de refluxo foi trocado por um aparelho de destilação de pequeno tamanho, NaHCO_3 (0,2 g) foi adicionado e a mistura foi agitada em temperatura ambiente por 1 hora. O etanol foi removido por destilação à pressão reduzida (41 a 45°C a vácuo). BEA foi destilado de 120 a 150°C (à vácuo). A sua caracterização foi feita por NMR. NMR (CCl_4): δ 1.4 t, $J=7 \text{ Hz}$ (3H); 4,1 q, $J=7 \text{ Hz}$ (2H); 5,6 dd, $J=7, 13 \text{ Hz}$ (1H); 7,4 d, $J=13 \text{ Hz}$ (1H); and 9,3 d, $J=7 \text{ Hz}$ (1H) que corresponde aos dados da literatura (Marnett e Tuttle, 1980).

2.3.2. Ácido desoxirribonucleico (DNA)

a) Extração de DNA de *Escherichia coli* (*E.coli*) C-600

Usou-se uma modificação do método de Marmur (1961). Toda a vidraria usada nesta parte do experimento foi esterelizada na estufa e a água destilada autoclavada, evitando assim o crescimento de outros microorganismos e destruindo DNase que possivelmente estivessem na vidraria e na água (DNase digere DNA).

O meio de cultura usado foi L.B., ou seja, 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl, adicionando-se água para 1,0 l.

Um erlenmeyer de 250 ml com 200,0 ml de cultura L.B. foi flambado na boca, colocando-se *E.coli* no meio de cultura por meio de um fio de níquel-cromo também flambado; as células foram colocadas para crescer durante toda a noite a 37,0°C em um agitador-termostato.

No dia seguinte foram preparados 5 erlenmeyers de 250 ml contendo 200,0 ml de cultura L.B.; em cada um foi adicionado 50,0 ml de bactéria pré-inoculada. Estes erlenmeyers foram colocados em um agitador ("Shaker") e deixados por mais 24,0 horas a 37,0°C.

Após este tempo, a solução foi transferida para tubos plásticos e centrifugada, separando, assim, as bactérias do meio de cultura. Em seguida as bactérias foram ressuspensas em salina-EDTA (0,15 M-NaCl mais 0,1 M EDTA) a pH 8,0. O EDTA e/ou alto pH inibe a atividade da DNase. Lisozima 1 mg/ml foi adicionado à solução para rompimento das células e incubada por 0,5 horas a 37,0°C.

Em seguida foi adicionado dodecil sulfato de sódio (SDS) 5% para rompimento dos núcleos e deixou-se por 0,16 horas a 37,0°C. Esta solução foi transferida para provetas com tampas,

adicionando-se NaClO_4 (5 g/40 ml) para a dissociação das proteínas do ácido nucleico e agitou-se. Colocou-se então igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico 25:1 para a desproteínização (o clorofórmio causa a desnaturação da superfície de proteínas; o álcool isoamílico reduz o aspecto "gelatinoso", ajuda a separação e mantém a estabilidade das camadas da solução desproteínizada e centrifugada). Esta solução foi agitada levemente por 0,5 horas. Centrifugou-se por 0,25 horas a 10.000 rpm a 4°C . O DNA foi precipitado com o etanol a frio. Em seguida tratou-se com RNase (50 mg/ml) para digerir RNA e facilitar sua separação de DNA. O DNA foi enrolado em bastõezinhos de vidro e conservado no etanol 70% em congelador.

b) Precipitação do ácido desoxirribonucleico (DNA)

O ácido desoxirribonucleico (100,0 $\mu\text{g/ml}$) foi tratado no sistema por 15,0 minutos. Após este tempo, adicionou-se de 15 a 20 gotas de fenol/clorofórmio 1:1 (o fenol foi previamente destilado), agitando e centrifugando-o para que houvesse melhor separação de clorofórmio de fase aquosa (nesta fase se dá a extração de enzima do sistema de reação. Retirou-se a camada aquosa (sobrenadante) e adicionou-se NaCl 1M em quantidade suficiente para que a concentração final fosse 0,1M. Em seguida colocou-se 3 vezes o volume da solução em etanol, centrifugou-se em rotor SS-34 a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C , lavando-se 3 vezes com etanol. Em seguida secou-se o etanol restante com um pequeno fluxo de N_2 .

c) Soluções

i) Estoque

O DNA, tanto de timo de bezerro quanto de E.coli, foi

32
dissolvido em tampão fosfato de potássio ($2,5 \times 10^{-3}$ M de K_2HPO_4 e $5,0 \times 10^{-3}$ M de KH_2PO_4) a pH 6,8 (Prusik e col., 1980), na concentração de aproximadamente 500 μ g/ml. A concentração foi determinada espectralmente pela absorção na região U.V., considerando que absorbância igual a 1 corresponde a 45 μ g/ml.

2i. Espectro na região U.V.

A solução para espectro U.V. (aproximadamente 95 μ g/2 ml de DNA de E.coli foi feita em NaCl/citrato de sódio $1,5 \times 10^{-2}$ M.

3i. Complexação com Tb^{+3}

O cloreto de térbio ($TbCl_3$) 10,0 μ M foi complexado com 11,0 μ g/ml de DNA de E.coli. A solução do DNA foi feita em tampão cacodilato de sódio 20,0 mM (preparado segundo Gomori, 1975) a pH 6,0 contendo 10,0 mM de KCl, e dializada por 24 horas em câmara fria contra este mesmo tampão. Para se evitar a quebra do DNA pelos íons Tb^{+3} (Eichhorn e Butzow, 1965; Rordorf e Kearns, 1976), os complexos foram preparados a 4°C esperando-se 10,0 minutos para a obtenção do equilíbrio em temperatura ambiente, antes de se fazer as medidas de fluorescência (Ringer e col., 1978).

2.3.3. Lisozima

A lisozima de clara de ovo de galinha (48 μ M) foi tratada no sistema e dializada contra água bidestilada por duas horas e novamente (trocando-se a água) por toda a noite. A diálise foi feita em câmara fria. A concentração estoque de lisozima foi de $2,49 \times 10^{-3}$ M.

2.3.4. Soluções em geral

a) Soluções estoques

As soluções de L-histidina $6,6 \times 10^{-2} \text{M}$, M.A. 2,2 M, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,33 M, β -(3,4-dihidrofênol)-L-alanina (DOPA) 0,1 M, L-metionina $1,2 \times 10^{-2} \text{M}$, D-triptofano $1,0 \times 10^{-2} \text{M}$, catalase 1500 unidade/ml e lisozima da clara de ovo de galinha $1,0 \times 10^{-4} \text{M}$ foram preparadas em água.

b) Peroxidase do rabanete ("horseradish peroxidase"-HRP)

A solução estoque de HRP (aproximadamente $1,0 \times 10^{-4} \text{M}$) (P.M.=40.000) foi preparada pela dissolução de massa adequada em água. A concentração foi determinada espectralmente pela absorção na região visível ($\epsilon_{403} = 103.000 \text{ cm}^{-1} \text{M}^{-1}$).

c) Tampão acetato

A preparação do tampão acetato 0,2M pH 4,8 foi feita segundo Gomori (1969).

d) Bilirrubina

A solução de bilirrubina $4,8 \times 10^{-4} \text{M}$ (P.M.258,5) foi feita em água, adicionando-se algumas gotas de NaOH 1,0M.

e) Hematoporfirina

A hematoporfirina $5,0 \times 10^{-3} \text{M}$ (P.M.267,2) foi dissolvida em NaOH 1,0N e levada a pH 6,0 com HCl 1,0N.

Para a irradiação de DNA de E.coli na presença de hematoporfirina, a relação DNA/hematoporfirina foi considerada igual a 0,179, ou seja, 100,0 $\mu\text{g/ml}$ de DNA/559,7 $\mu\text{g/ml}$ de hematoporfirina.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS

3.1. Estudos cinéticos para o sistema M.A./Mn⁺²/HRP/O₂

3.1.1. Otimização das condições experimentais para o sistema M.A./Mn⁺²/HRP/O₂

Procurou-se determinar as melhores condições para o sistema de degradação enzimática de M.A. Estas condições foram adequadas para a medida de consumo de oxigênio e emissão de moléculas excitadas. Devido a eficiente auto-oxidação do M.A. em solução aquosa (após 17 horas, a concentração da solução cai para aproximadamente 80% da solução inicial), fez-se necessário preparar uma nova solução a cada dia, conservando-a em banho de gelo durante os experimentos.

Foi também observado que M.A. de recente síntese e de melhor pureza (aproximadamente 100% puro, medida por U.V.) resultou em melhores curvas (menor tempo de indução) para consumo de oxigênio, tendo sido por esta razão, necessário sintetizar 1,5 g ou menos por síntese e com a melhor pureza possível.

3.1.2. Consumo de Oxigênio

Estudou-se o efeito de variações na concentração de íons Mn⁺², M.A., peroxidase e concentração do tampão acetato sobre a velocidade inicial da reação.

a) Efeito da concentração de íons Mn⁺²

O estudo do sistema M.A./HRP/O₂ na presença de íons Mn⁺² mostrou um aumento progressivo na velocidade de consumo de

O_2 numa concentração de 0,7 mM a 3,2 mM. A partir de 4,2 mM é atingida a velocidade máxima de consumo de O_2 (Fig. 3.1).

A velocidade máxima calculada através do gráfico duplo-recíproco (obtido de equação de Lineweaver-Burk (Equação 5.5), uma das transformações da equação de Michaelis-Menten) foi de 17,9 nmoles O_2 /ml/10 seg (Fig. 3.2).

b) Efeito de concentração da peroxidase

A ação da peroxidase sobre o sistema (usando-se as mesmas condições que para os íons Mn^{+2}) foi estudada num intervalo de concentração de 3,8 μM a 0,8 μM , apresentando uma reta no gráfico de velocidade de consumo de O_2 em função da concentração da enzima (Fig. 3.3).

Pelo gráfico de Lineweaver-Burk obteve-se uma velocidade máxima que tende ao infinito (Fig. 3.4).

c) Efeito da concentração do tampão acetato

Variando-se a concentração do tampão acetato de 0,1 M a 1,0 M no sistema M.A./ Mn^{+2} /HRP/ O_2 , obteve-se uma curva de velocidade inicial de consumo de O_2 em função da concentração do tampão (Fig. 3.5), indicando que a velocidade máxima do sistema é atingida em 0,7 M.

Pelo gráfico de Lineweaver-Burk, a velocidade máxima foi de 37,3 nmoles O_2 /ml/10 seg (Fig. 3.6).

d) Efeito da concentração de M.A.

A velocidade da reação aumenta marcadamente com o aumento da concentração de M.A. de 1,8 mM a 10,5 mM. Em concentrações maiores que 14,7 mM o aumento da velocidade torna-se mínimo (Fig. 3.7).

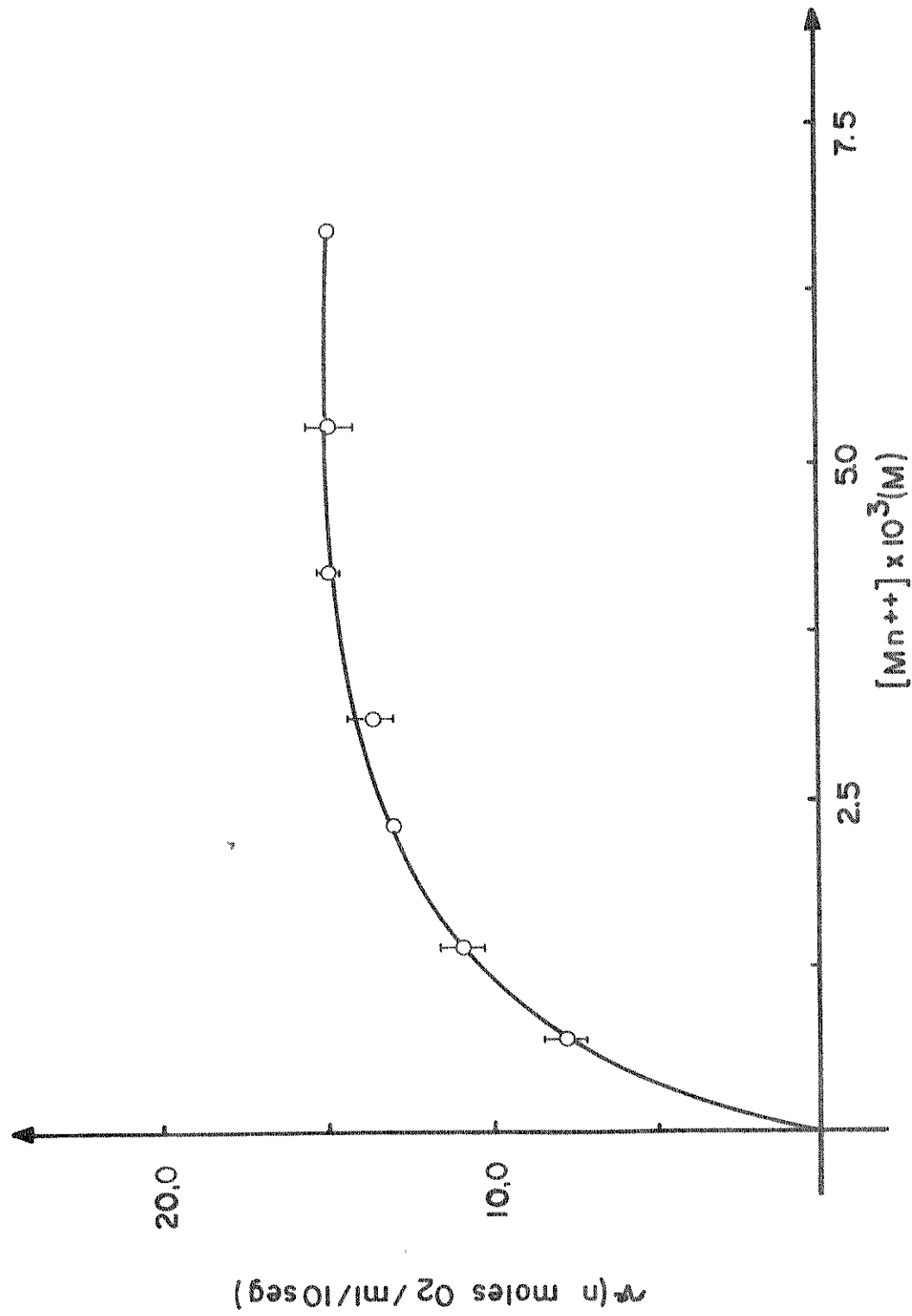


FIG. 3.1 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE Mn^{++} NO SISTEMA: Mn^{++} (NAS CONCENTRAÇÕES INDICADAS) / MA (10,5 mM) / HRP (3,8 μM) / O_2 EM TAMPÃO ACETATO 0,2 M. pH 4,8 A 38,0 °C

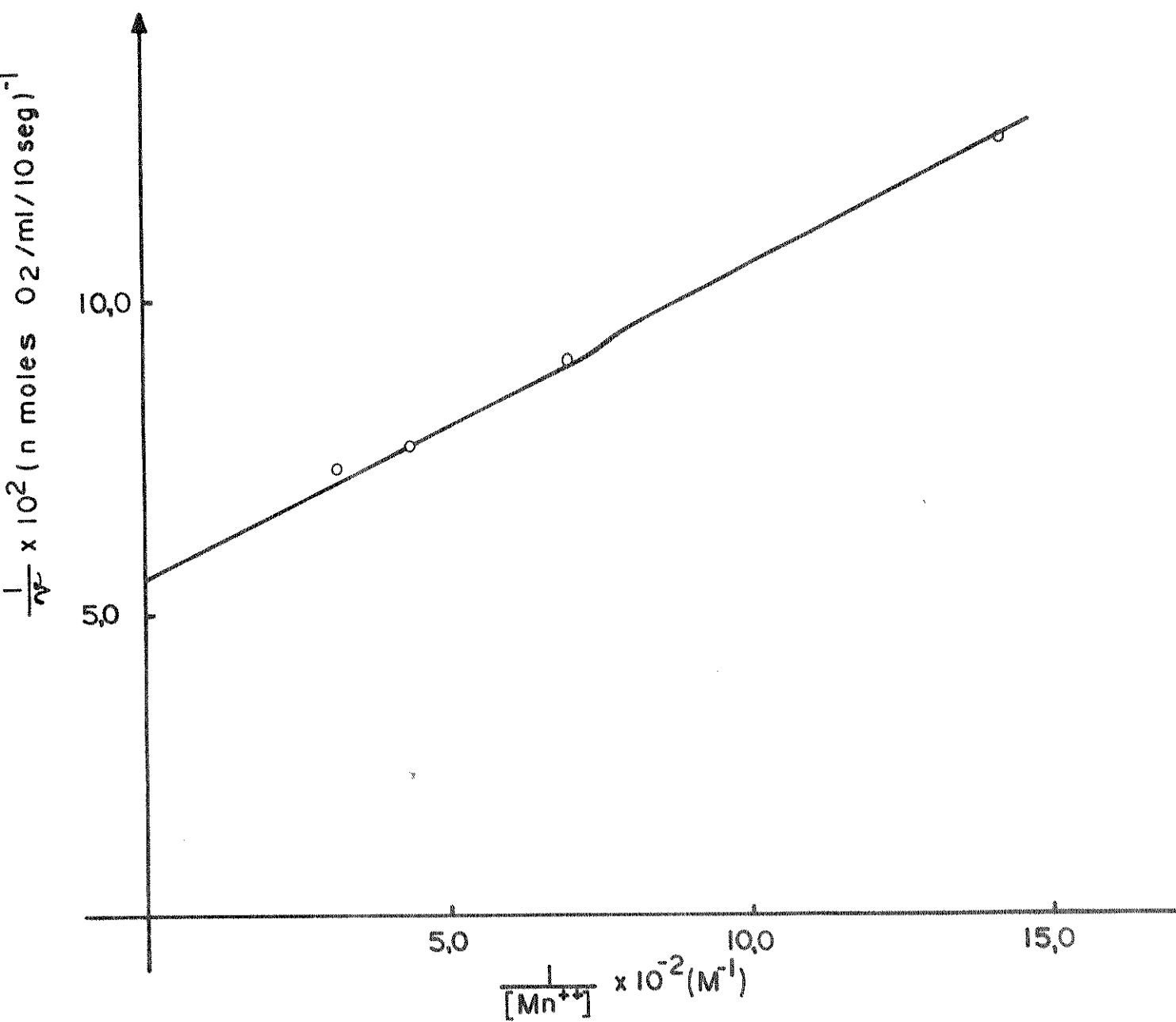


FIG 3.2 - DUPLO-RECÍPROCO PARA O EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE Mn^{++} NO SISTEMA: Mn^{++} (NAS CONCENTRAÇÕES INDICADAS) / MA (10,5 mM) / HRP (3,8 μM) / O_2 EM TAMPÃO ACETATO 0,2 M. pH 4,8 A 38,0 °C

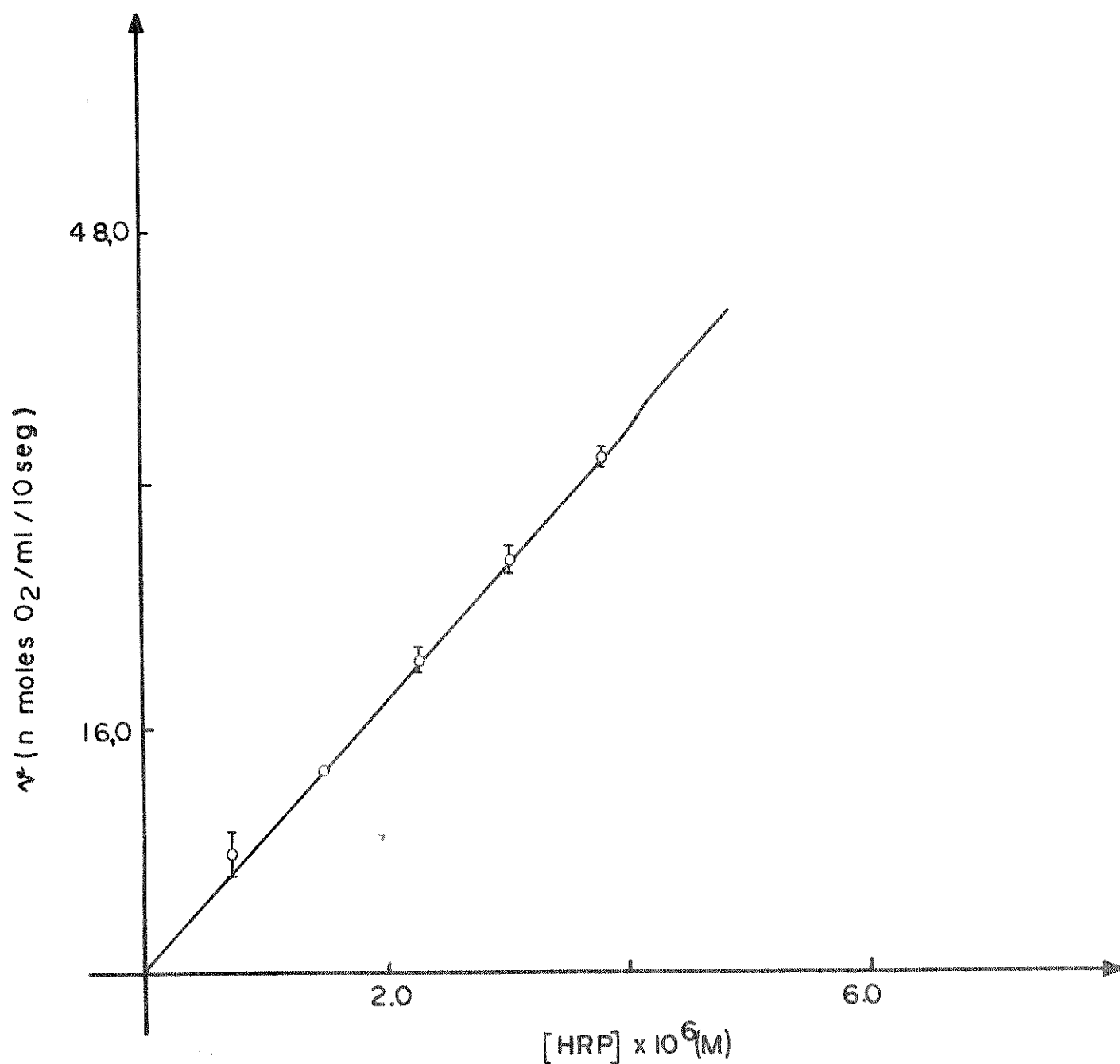


FIG. 3.3 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA NO SISTEMA: Mn^{++} (3,1 mM) / MA (10,5 mM) / HRP (NAS CONCENTRAÇÕES INDICADAS) / O_2 EM TAMPÃO ACETATO 0,2 M. pH 4,8 A $38,0^\circ\text{C}$

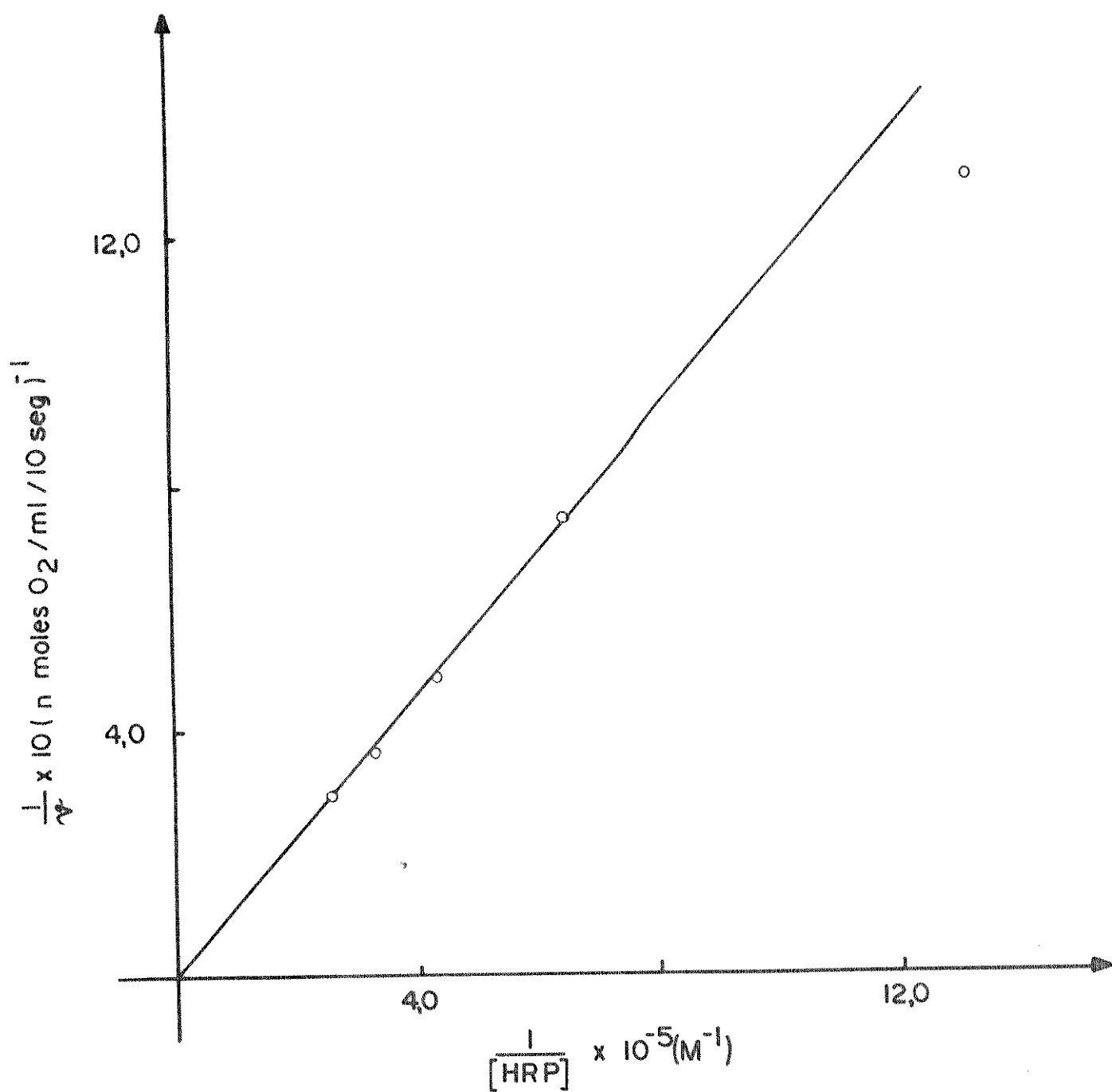


FIG. 3.4 - DUPLO-RECÍPROCO PARA O EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA NO SISTEMA: Mn^{++} (3,1 mM) / MA (10,5 mM) / HRP (NAS CONCENTRAÇÕES INDICADAS) / O_2 EM TAMPÃO ACETATO 0,2 M pH 4,8 A 38,0°

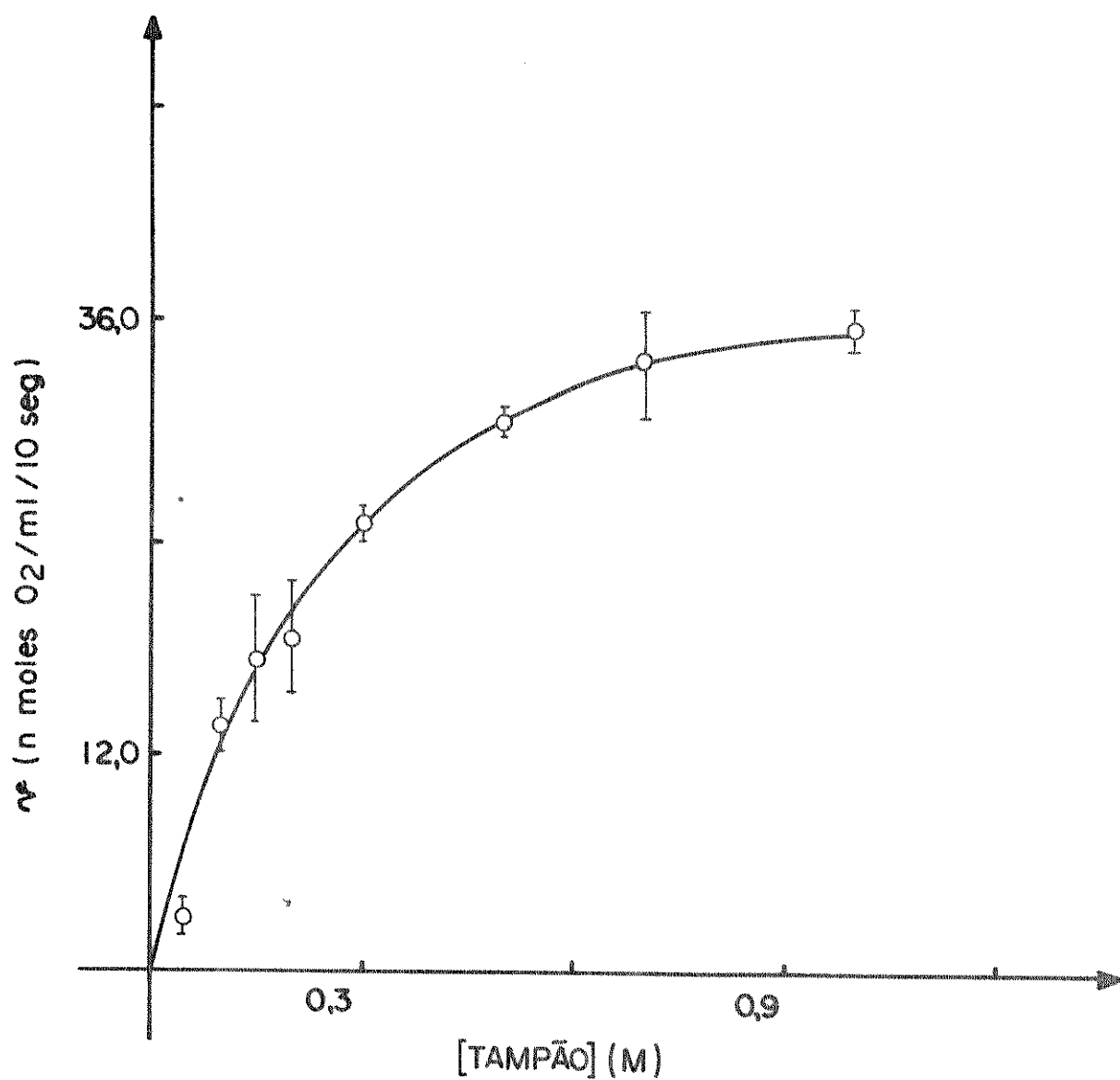


FIG. 3.5 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO NO SISTEMA:
 Mn^{++} (3,1 mM)/M.A. 10,5 mM)/HRP (3,8 μ M)/ O_2 EM TAMPÃO
 ACETATO pH 4,8 A 38,0

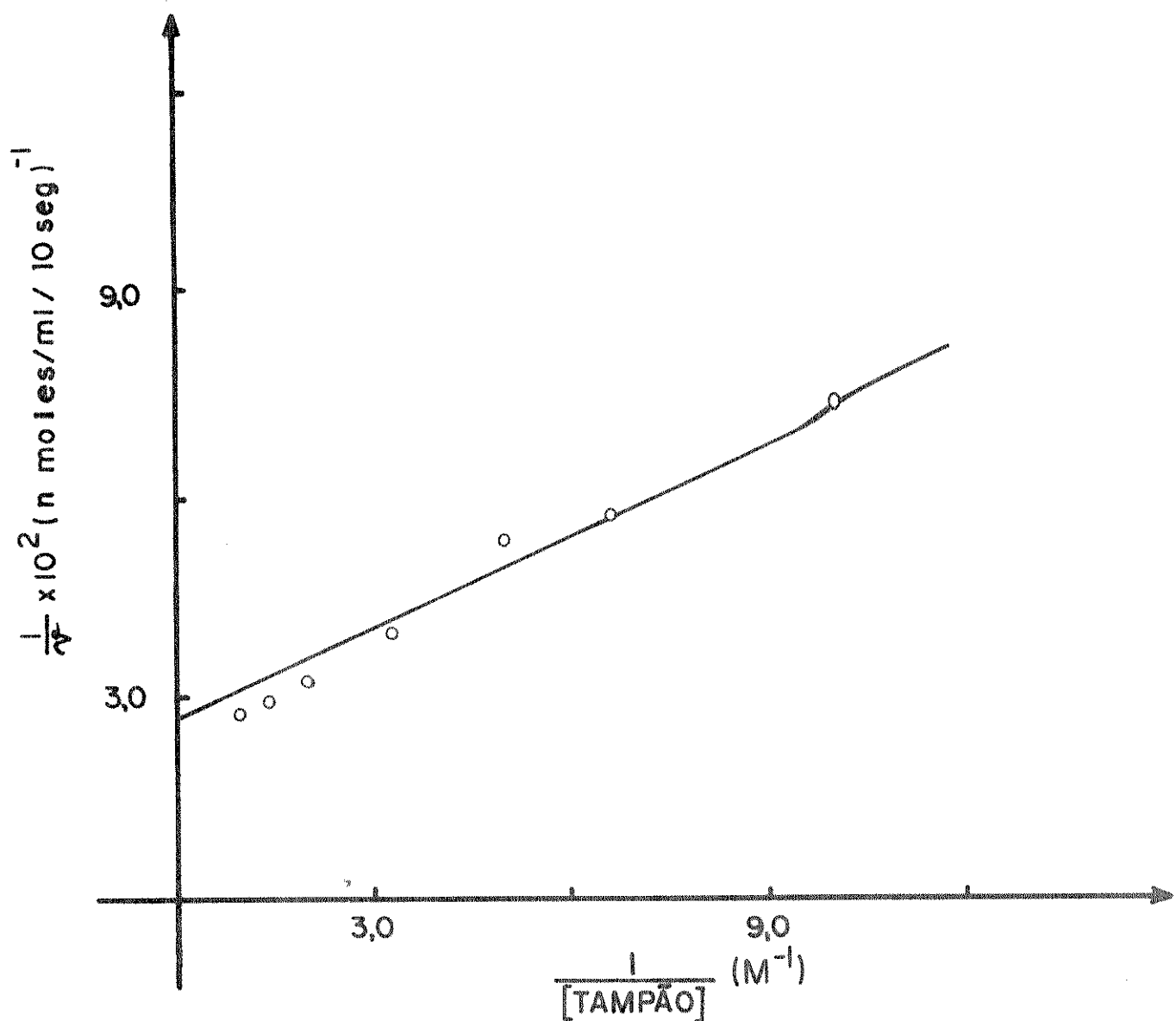


FIG. 3.6 - DUPLO-RECÍPROCO PARA O EFEITO DA FORÇA IÔNICA NO SISTEMA: Mn^{++} (3,1 mM)/MA(10,5 mM)/HRP (3,8 μM)/ O_2 EM TAMPÃO ACETATO pH 4,8 A 38,0 °C.

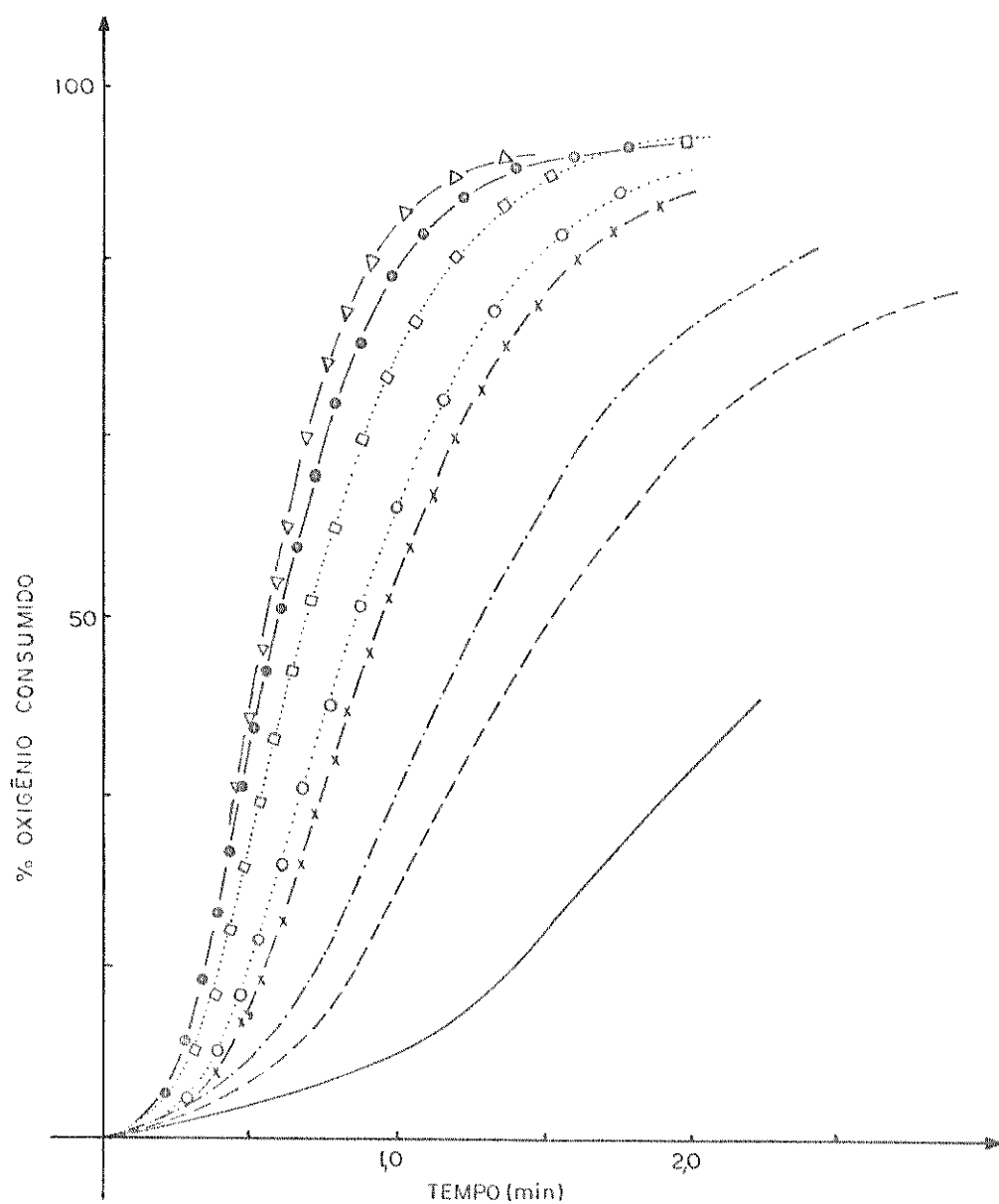


FIG 3.7 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO M.A. NA VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO PELO SISTEMA Mn^{++} (5,5 mM)/MA/HRP (2,3 μM)/ O_2 EM TAMPÃO ACETATO 0,2 M pH 4,8 A 38,0°C CONCENTRAÇÃO DE M.A. : (—) 1,8mM; (---) 2,7 mM; (-·-) 5,5 mM; (-x-) 7,3 mM; (-o-) 9,1 mM; (-□-) 10,5mM; (-●-) 15,0mM; (-Δ-) 18,0mM

Graficamente, o efeito da concentração de M.A. sobre a velocidade inicial da reação demonstra uma curva do tipo Michaelina (Fig. 3.8).

A velocidade máxima e o K_m foram calculados usando-se os valores da Fig. 3.8 e através do gráfico duplo-recíproco obtido da equação de Lineweaver-Burk (Fig. 3.9).

O valor da velocidade máxima foi de 53,4 nmoles O_2 /ml/10 seg, e o K_m foi $6,7 \times 10^{-3} M$.

3.1.3. Emissão

A emissão fotônica do sistema M.A./ Mn^{+2} /HRP/ O_2 foi estudada cineticamente variando-se o pH e as concentrações de peroxidase, M.A., íons Mn^{+2} e tampão acetato; observou-se também o efeito de malonaldeído ácido (M.A.H.).

a) Efeito da concentração de íons Mn^{+2}

Numa concentração até $0,9 \times 10^{-3} M$ tem-se uma intensidade de $2,0 \times 10^5$ contagens/min. Da mesma forma como na variação de M.A. a intensidade torna-se menos acentuada até $4,7 \times 10^{-3} M$ quando atinge um valor de $5,3 \times 10^5$ contagens/min (Fig. 3.10).

b) Efeito de concentração da peroxidase

Nas concentrações de 1,6 μM , 3,2 μM e 12,8 μM ocorre um aumento linear da intensidade de luz em relação à concentração da peroxidase. Em 12,8 μM obtém-se uma intensidade de $8,1 \times 10^5$ contagens/min. A partir de 12,8 μM o aumento da intensidade torna-se menos acentuado atingindo, assim, o valor de $11,0 \times 10^5$ contagens/min a uma concentração de 20,0 μM (Fig. 3.11).

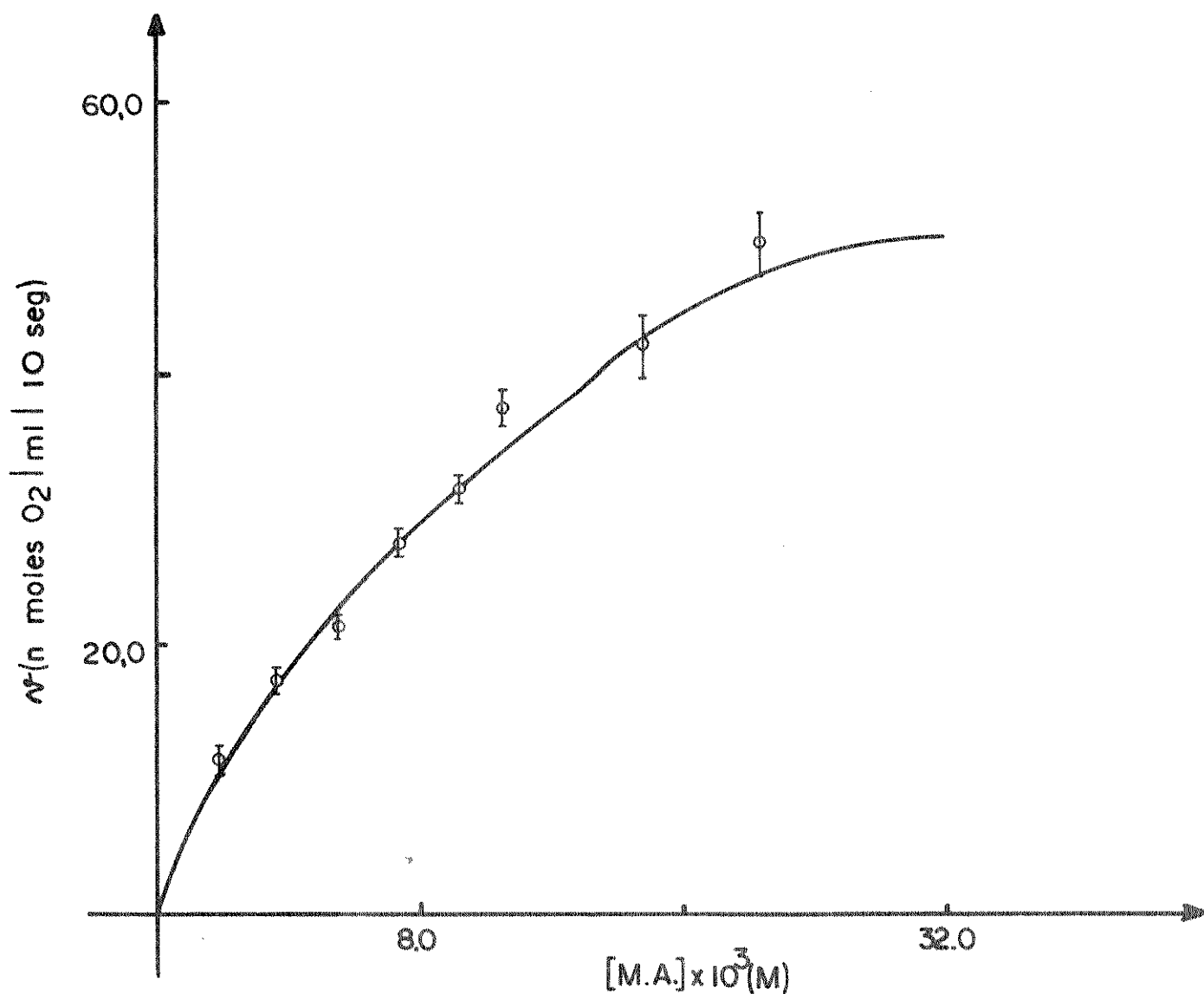


FIG. 3.8 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE M.A. NO SISTEMA Mn^{++} (5,5 mM) / M (NAS CONCENTRAÇÕES INDICADAS) / HRP (2,3 μM) / O_2 EM TAMPÃO ACETATO 0,2 M, pH 4,8 A 38,0°C

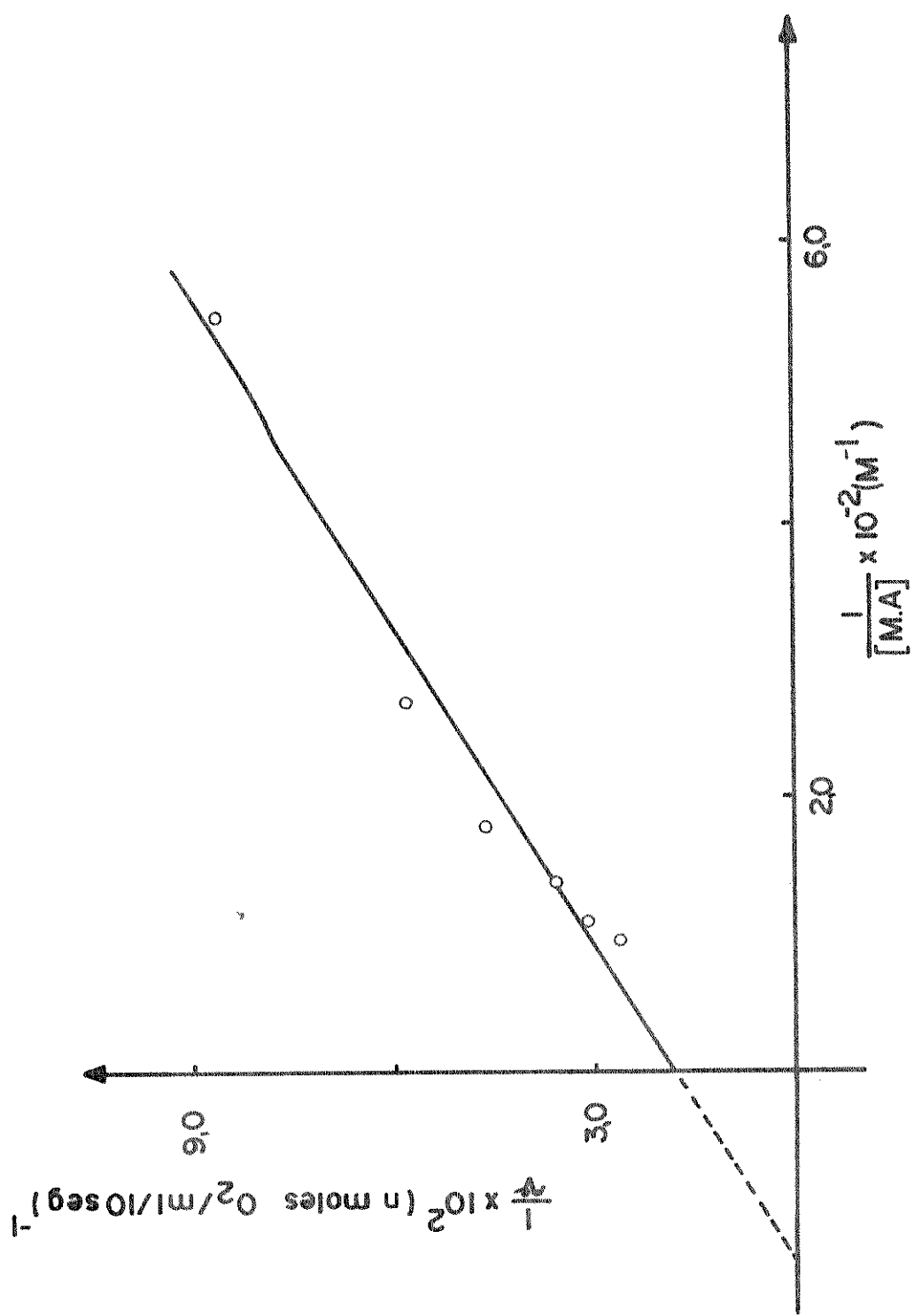


FIG. 3.9 - DUPLO-RECÍPROCO PARA O EFEITO DA CONTRAÇÃO DA ENZIMA
 NO SISTEMA: Mn^{++} (5,5 μM) / MA (NAS CONCENTRAÇÕES INDICADAS) /
 HRP (2,3 μM) / O_2 EM TAMPÃO ACETATO 0,2 M. PH 4,8 A 38,0 °C

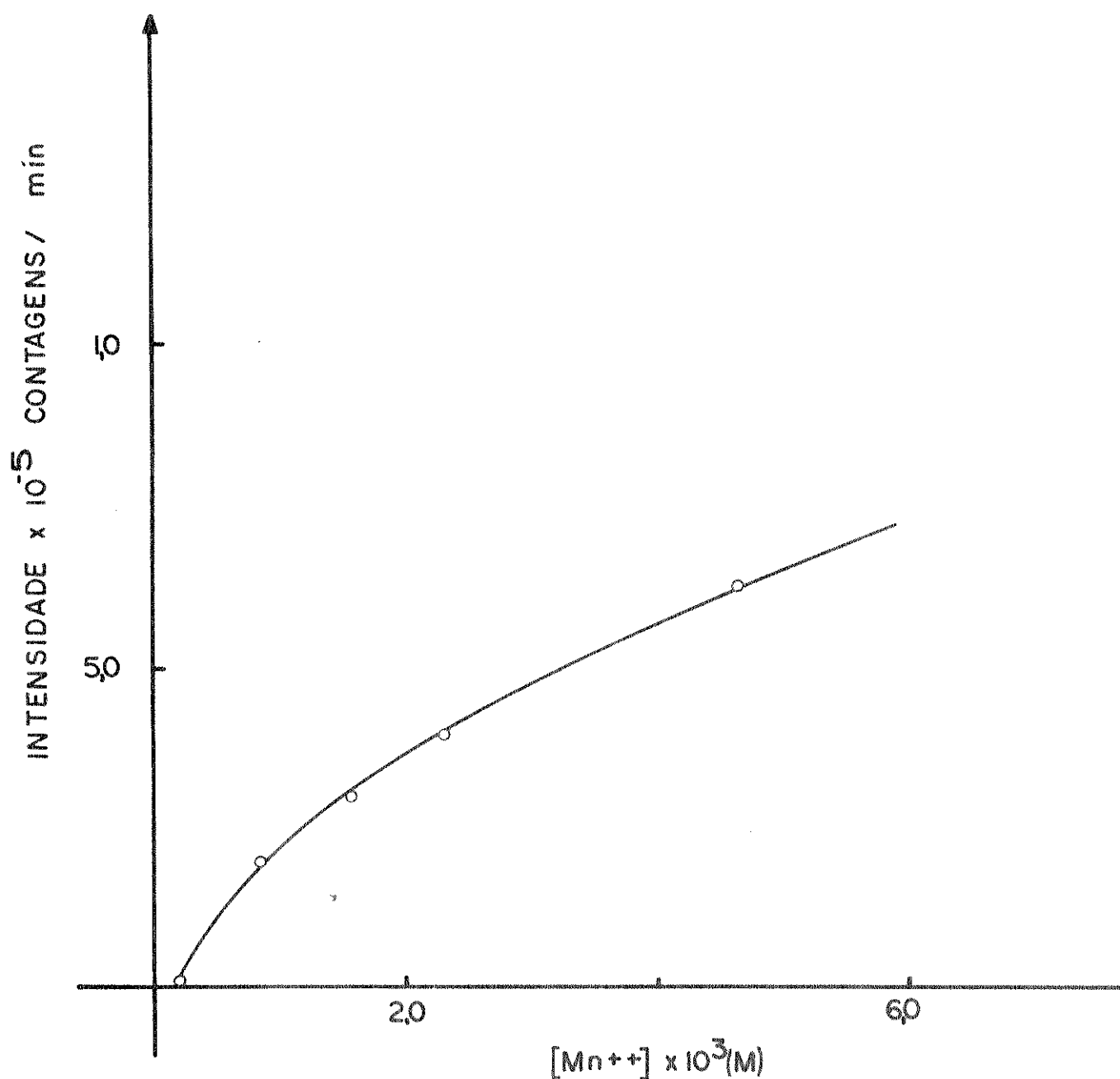


FIG. 3.10 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO Mn^{++} NO SISTEMA: Mn^{++} (NAS CONCENTRAÇÕES INDICADAS) / MA (0,7 mM) / HRP (70 μ M) EM TAMPÃO ACETATO 0,2M pH 4,8 A 38,0 °C

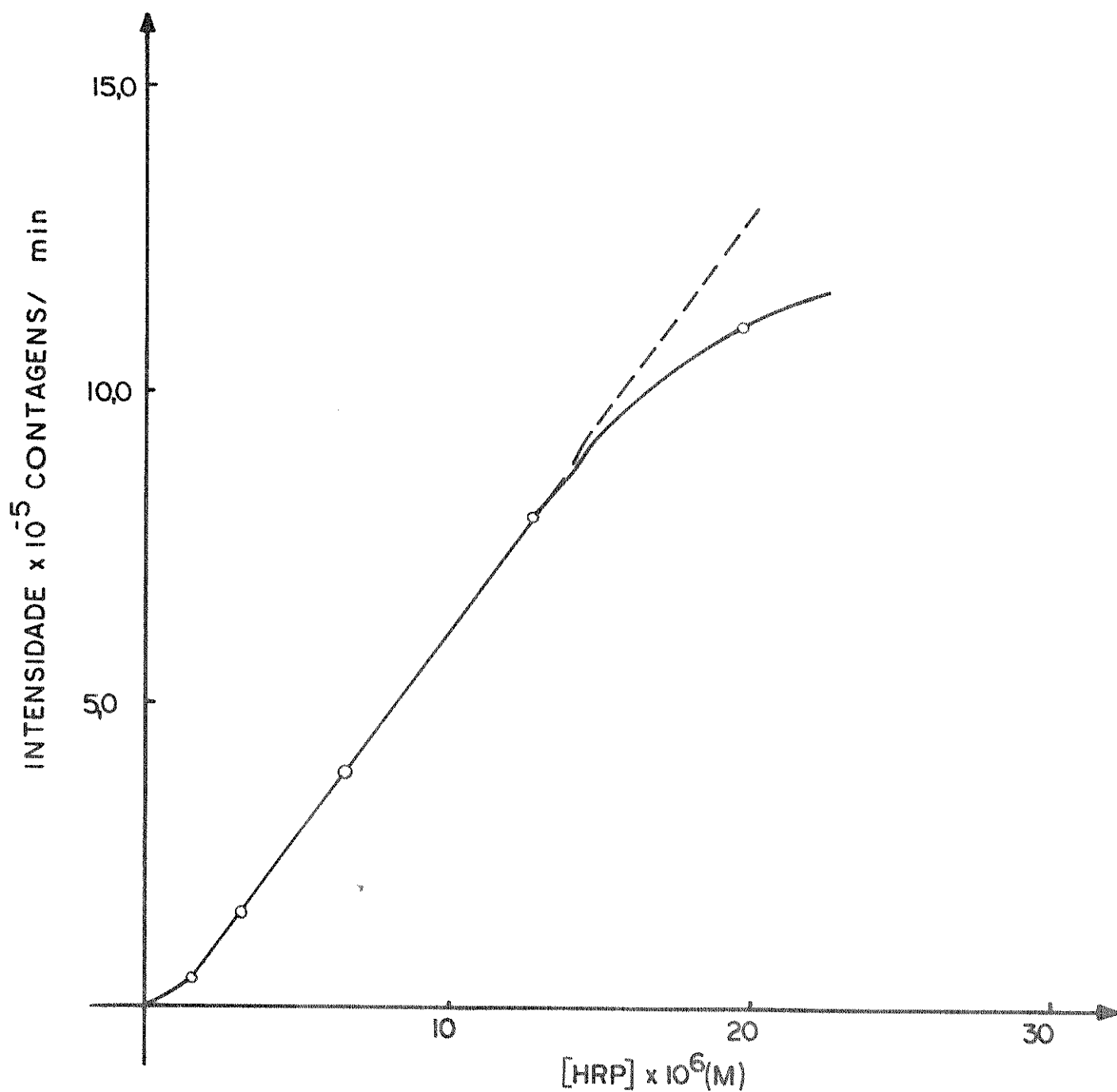


FIG 3.11 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA PEROXIDASE NO SISTEMA: Mn^{++} (2,0 mM) / MA (0,7 mM) / HRP (NAS CONCENTRAÇÕES INDICADAS) / O_2 EM TAMPÃO ACETATO 0,2 M pH 4,8 A 38,0 °C

c) Efeito de concentração do tampão acetato

Numa concentração de 0,1 M a 0,5 M de tampão acetato pH 4,8 ocorre um aumento na intensidade de emissão de luz quando esta atinge um valor constante de aproximadamente $5,5 \times 10^5$ contagens/min (Fig. 3.12).

d) Efeito do pH

A intensidade de luz aumenta do pH 4,5 para o pH 4,8 quando, então, atinge um máximo com $3,2 \times 10^5$ contagens/min. Em pH acima de 4,8 a intensidade decai para $2,4 \times 10^5$ contagens/min (Fig. 3.13).

e) Efeito da concentração de M.A.

A intensidade de luz aumenta com o aumento da concentração de M.A. até $3,4 \times 10^{-4}$ M de M.A.. Desta concentração até $13,3 \times 10^{-4}$ M, o aumento torna-se mais gradativo e a intensidade máxima atingida é de $5,0 \times 10^5$ contagens/min (Fig. 3.14).

f) Efeito da concentração de M.A.H. (malonaldeído ácido)

O efeito da concentração de M.A.H. foi estudado no intervalo de 10,5 mM a 0,7 mM (Fig. 3.15). Foram estudados os efeitos da concentração sobre a intensidade máxima e o tempo em que se inicia a emissão.

3.1.4. Estudos para a proposição do mecanismo

Para se propor um mecanismo de reação do sistema, estudou-se os seguintes efeitos: íons N_3^- , H_2O_2 e catalase (todos os três usando a técnica de consumo de O_2), intermediários da pe-

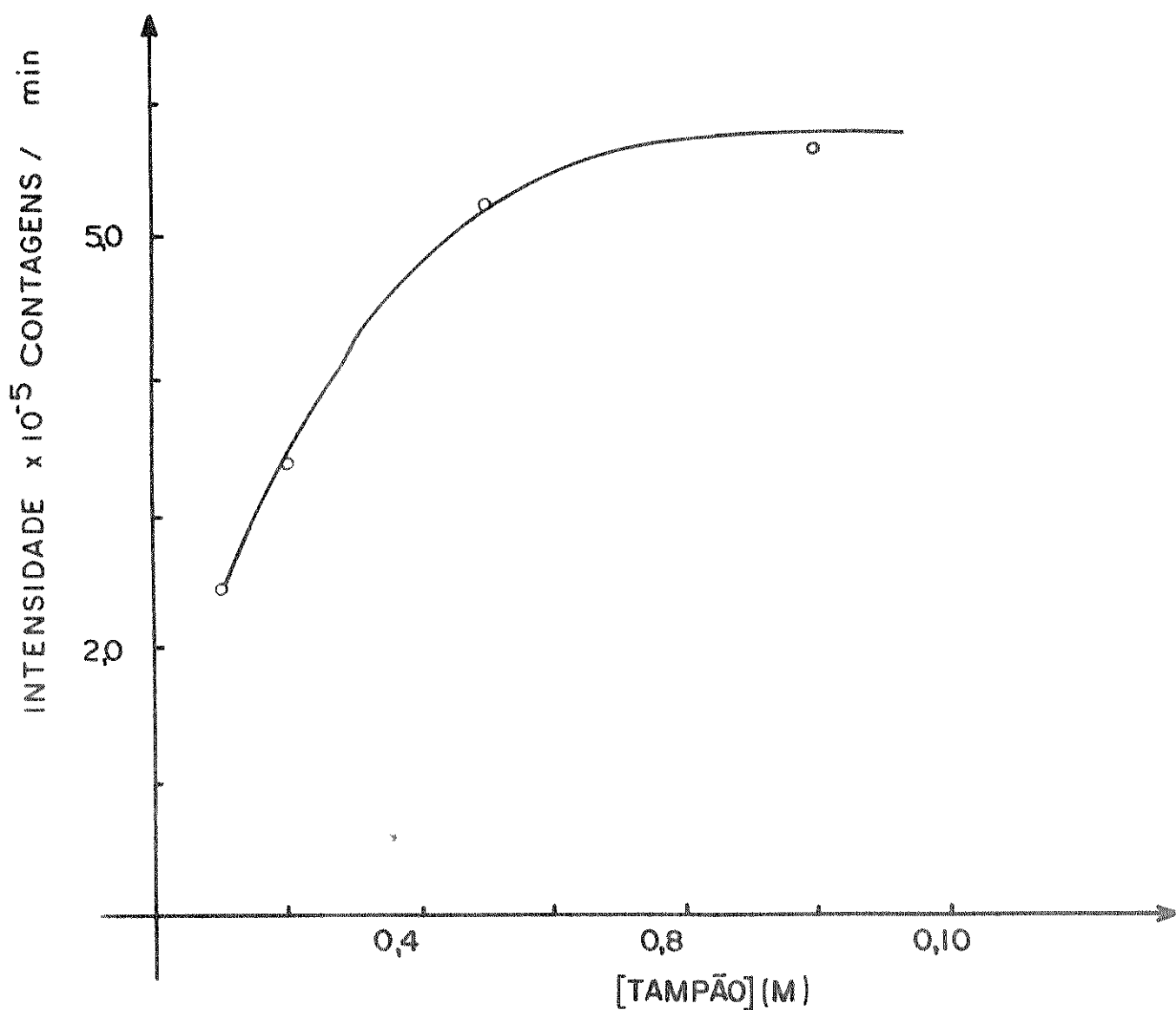


FIG. 3.12 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO NO SISTEMA: $Mn^{++}(2,0mM)/$
M.A. (0,7 mM)/HRP(7,0 μ M)/O₂ EM TAMPÃO ACETATO pH 4,8 A

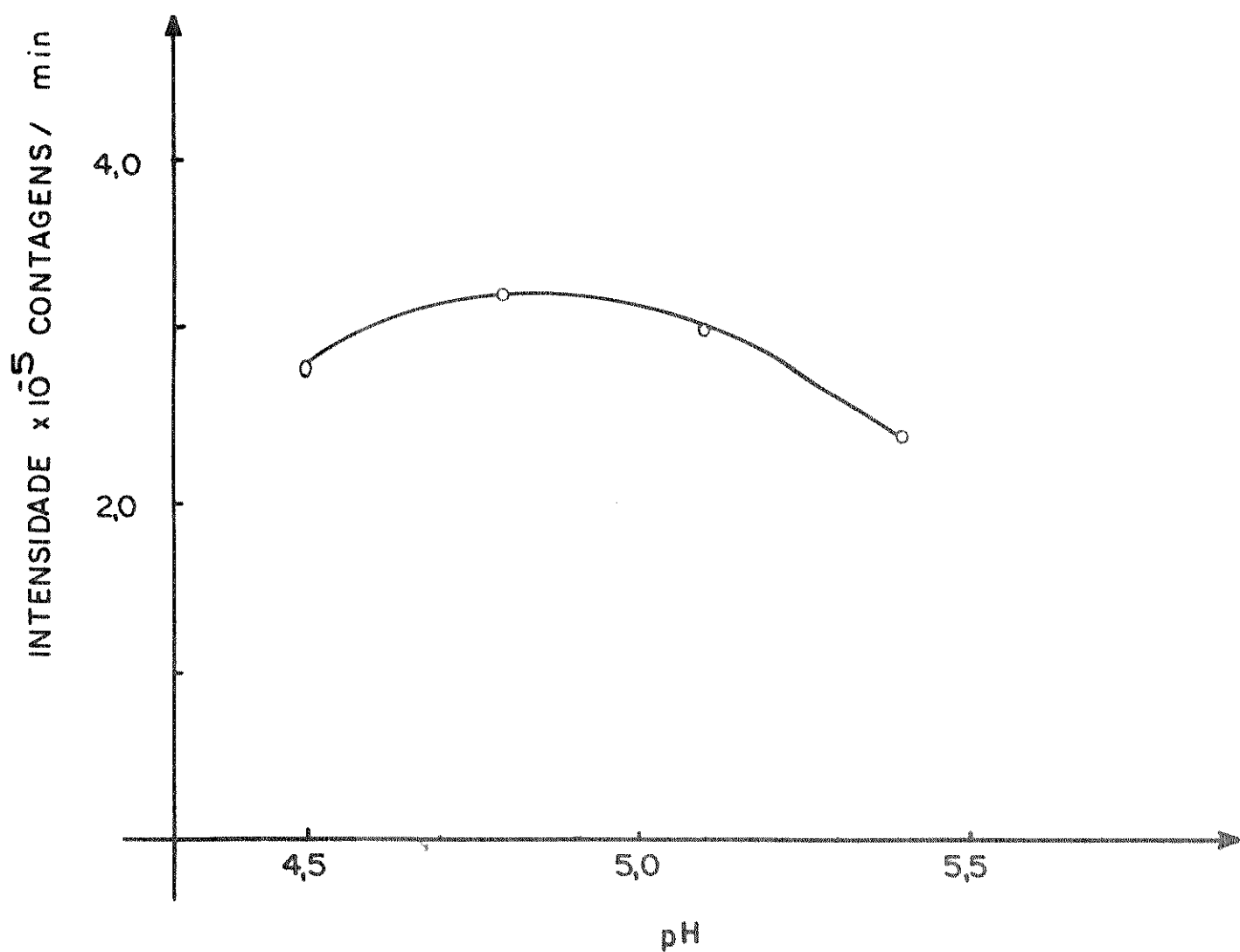


FIG. 3. 13 - EFEITO DO pH NO SISTEMA: Mn^{++} (2,0 mM) / MA (0,7 mM) / HRP (7,0 μ M) / O_2 EM TAMPÃO ACETATO 0,2 M A 38,0 °C

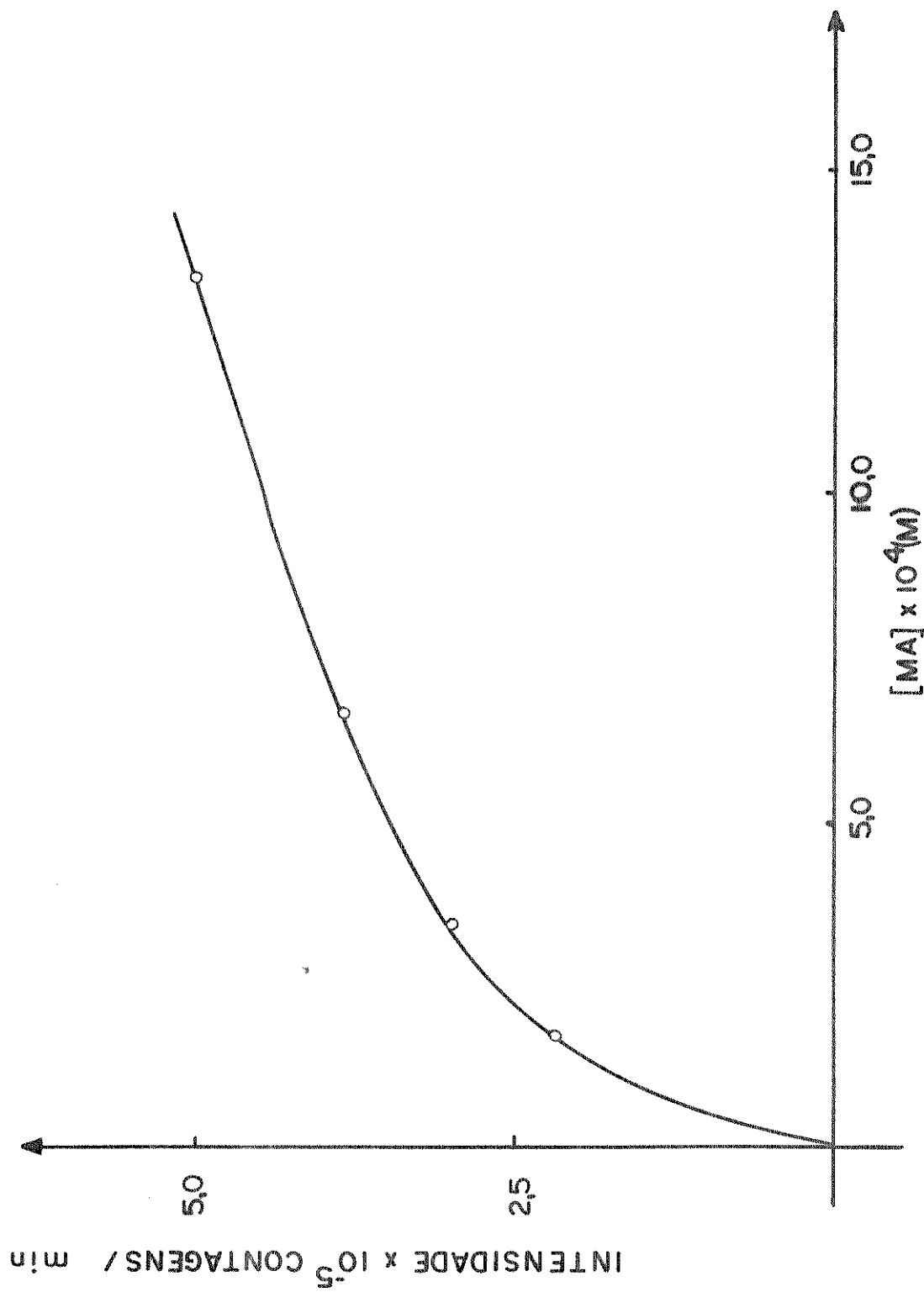


FIG. 3.14 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO M.A. DO SISTEMA
 Mn^{++} (2,0 mM) / MA (NAS CONCENTRAÇÕES INDICADAS) / HRP
(7,0 μM) / O_2 EM TAMPÃO ACETATO pH 4,8 A 38,0 °C

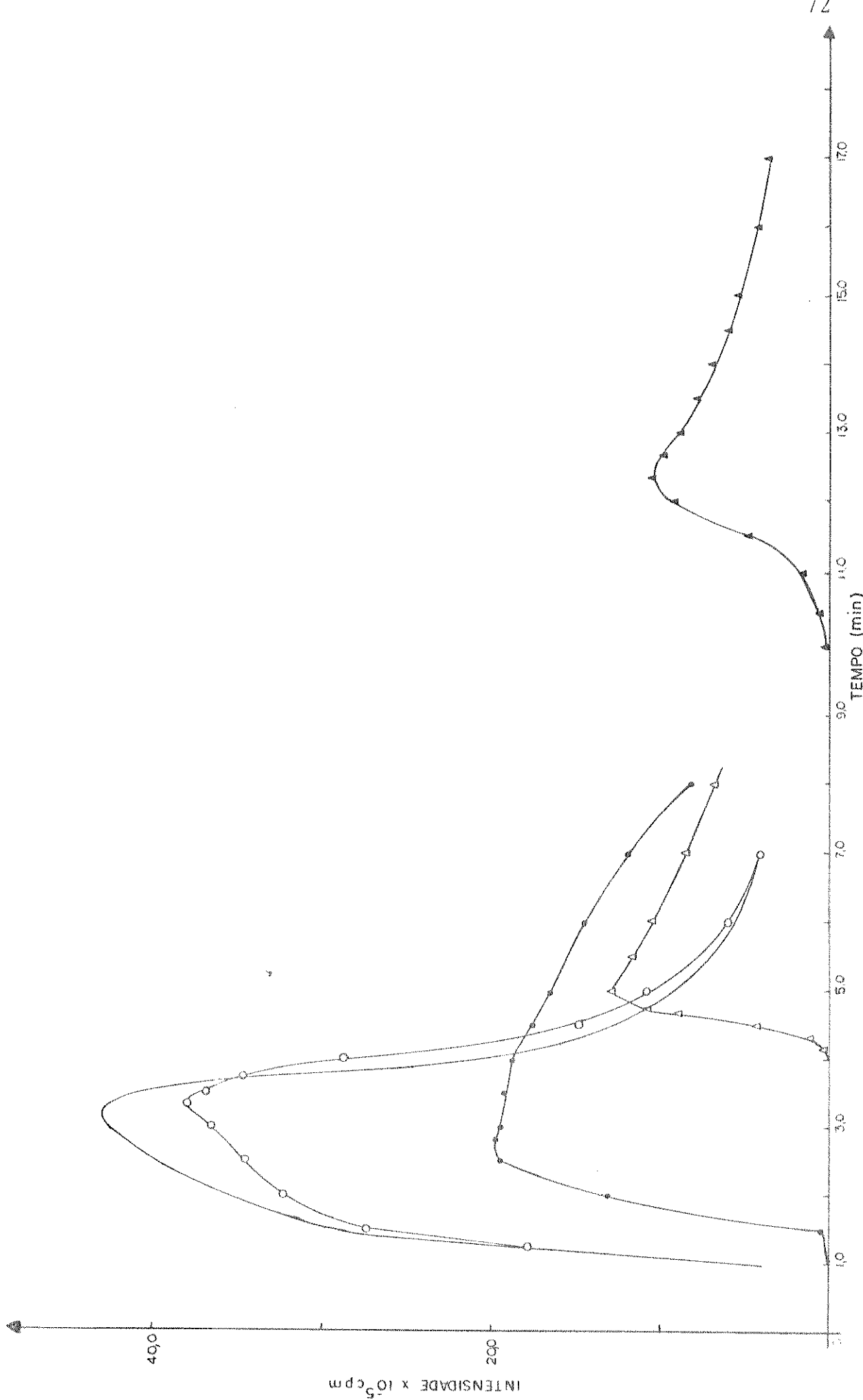


FIG. 3.15- VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO M.A.H. NO SISTEMA Mn^{++} (3.1 mM) / MAH / HRP (3.4 mM) / O_2 EM TAMPÃO ACETATO Q2M pH 4.8 A 38.0°C: (—) 10.5 mM; (—) 5.0 mM; (—) 2.5 mM; (—) 1.3 mM; (—) 0.7 mM

75
roxidase (usando absorção na região do visível) e H_2O_2 (na emissão).

a) Efeito do íon N_3^- na atividade de HRP

A fim de verificar se M.A. é oxidado no sítio ativo da enzima, estudou-se o efeito do íon N_3^- na atividade da HRP. A velocidade de consumo de oxigênio é totalmente inibida numa concentração de 10,0 mM e 1,0 mM de NaN_3 .

b) Efeito de H_2O_2 e catalase no consumo de O_2

A H_2O_2 adicionada ao sistema numa concentração de 96,0 μ M retira totalmente o tempo de indução da reação, enquanto que a catalase, adicionada numa concentração de 125 unidades, aumenta o tempo de indução em relação ao controle (Fig. 3.16). Em ambos os casos a cinética de consumo de oxigênio não foi alterada.

c) Estudo cinético dos intermediários da peroxidase durante a reação

Acompanhou-se espectrofotometricamente a 400, 411 e 420 nm os intermediários da HRP durante o ciclo catalítico (Fig. 3.17). Estes comprimentos de onda referem-se a:

- 1) alterações a 400 nm correspondente a mudanças na concentração de HRP nativa;
- 2) alterações a 420 nm correspondente a mudanças na concentração de HRP-composto II (HRP-II);
- 3) ponto isobéstico entre HRP e HRP-II em 411 nm, e que indica a presença de HRP-I.

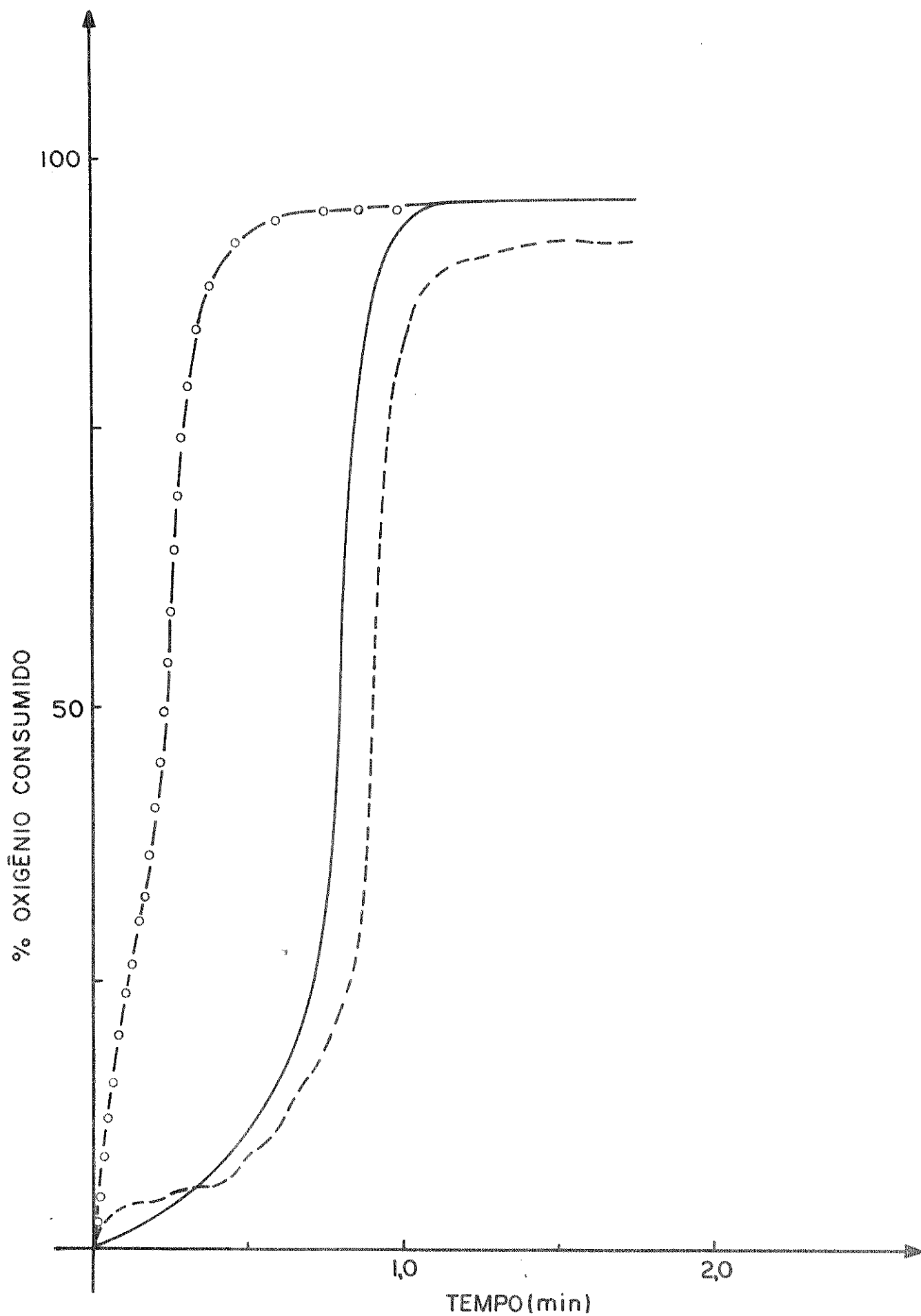


FIG. 3.16 - EFEITO DE H_2O_2 E CATALASE SOBRE O SISTEMA $Mn^{++}(3,1 \text{ mM}) / M.A. (4,3 \text{ mM}) / HRP (3,8 \mu M) / O_2$ TAMPÃO ACETATO $0,2 \text{ M}$ pH 4,8 A $38,0^\circ C$; (—) REAÇÃO CONTROLE; (---) CATALASE 125 UNIDADES; (—o—) $H_2O_2 \ 9,6 \times 10^{-5} \text{ M}$.

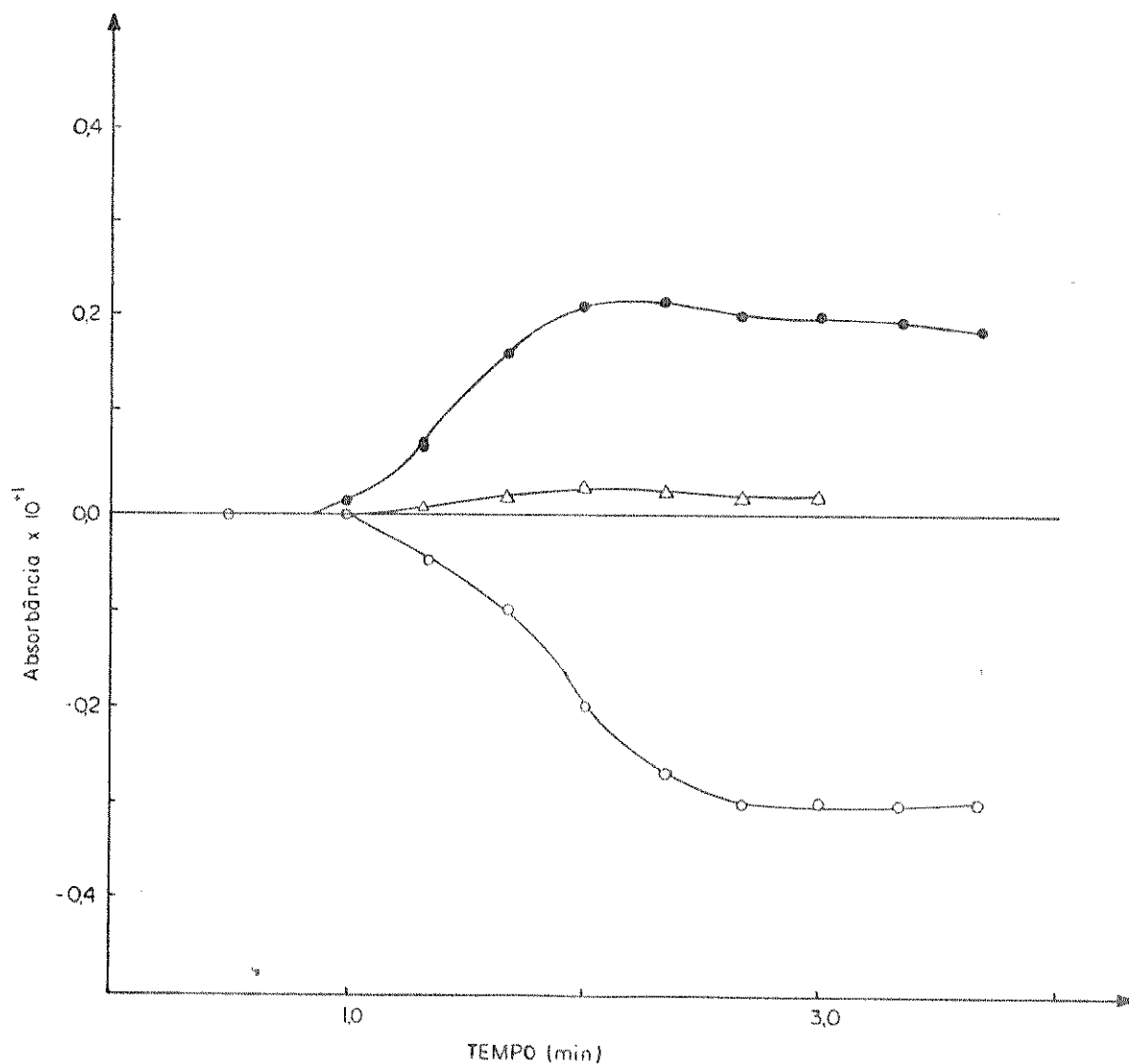
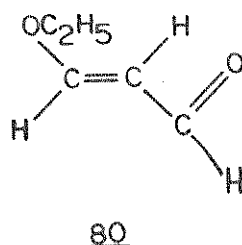


FIG. 3. 17 - VARIAÇÃO DA ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DO TEMPO, DO SISTEMA $Mn^{++}/M.A./HRP$ EM TAMPÃO ACETATO 0.2 M pH 4.8 A $20.0^{\circ}C$: (—●—) 420nm CORRESPONDE A HRP-II; (—△—) 411nm CORRESPONDE AO PONTO ISOBÉSTICO ENTRE HRP E HRP II; (—○—) 400nm CORRESPONDE A HRP NATIVA

d) Efeito de H_2O_2 na emissão do sistema (com M.A.H.)

Foi estudado o efeito de H_2O_2 1,0 μM , 3,0 μM e 80,0 μM na emissão sem alteração do consumo de oxigênio; quando H_2O_2 é adicionada na ausência de M.A.H., não dá fotoemissão (Fig. 3.18).

3.1.5. Comparação entre β -etóxi-acroleína (BEA) (80) e malonaldeído



Nas condições M.A. (5,0 mM)/ Mn^{+2} (3,1 mM)/HRP (3,8 μM)/ O_2 em tampão acetato 0,2 M pH 4,8 a 24°C, o pico máximo de emissão foi $2,3 \times 10^6$ cpm; enquanto que, para o sistema BEA (10,0 mM)/ Mn^{+2} (3,1 mM)/HRP (3,8 μM)/ O_2 em tampão acetato 0,2 M pH 4,8 a 24°C, o pico máximo de emissão foi $2,2 \times 10^6$ cpm. Ambos foram atingidos em 3,5 minutos.

3.2. Deteccão de Oxigênio Singlete

A oxidação de M.A. em tampão acetato 0,2 M pH 4,8 leva a produção de uma espécie emissiva, evidenciado pelos espectros de emissão. O oxigênio singlete ($^1\Delta_g$ $^1\Delta_g$) parece ser o emissor responsável e isto é demonstrado pelos resultados apresentados nesta seção. Estes efeitos foram estudados, sem que se alterasse o consumo de oxigênio. Eles estão sumarizados na tabela 3.1 e 3.2.

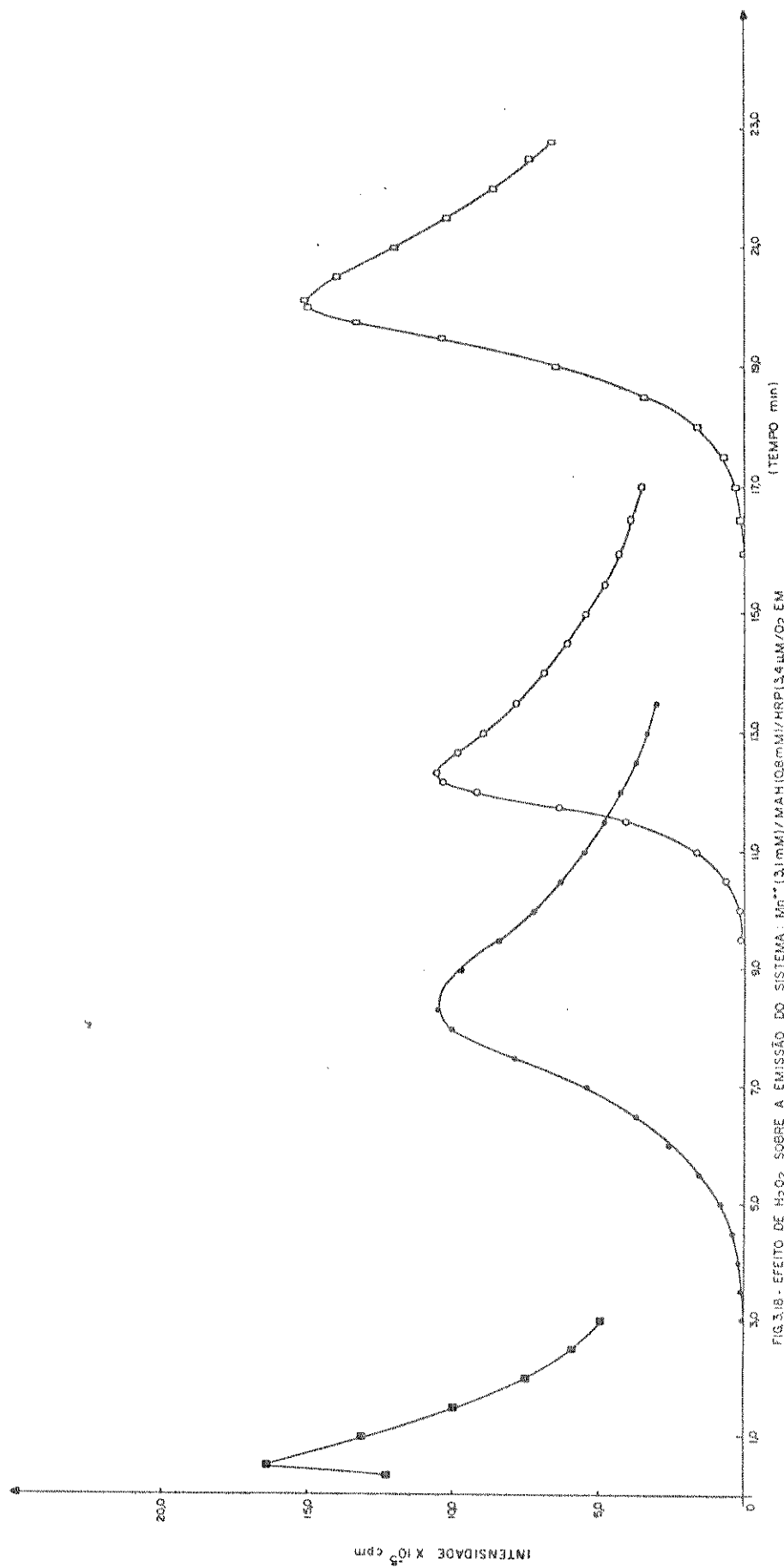


Tabela 3.1 - Constante Stern-Volmer, constante de velocidade de inibição, tempo de vida e valor β para oxigênio singlete gerado pela decomposição de M.A. catalizada por peroxidase.

Inibidor	$K_{SV}(M^{-1})$	$k_q M^{-1}$	$\tau^o \times 10^6 \text{ seg}$	$\beta \times 10^3 (M)$	
				$\frac{1}{K_{SV}}$	duplo recíproco
guanosina	150	$10^8(a)$	1,5	6,7	2,9
histidina	866	$1,7 \times 10^8(b)$	5,1	1,1	1,2
INA	900	$10^8(a)$	9,0	1,1	-
bilirrubina (25 μM a 100 μM)	59000	$2,9 \times 10^{10}$	2,0(c)	$1,7 \times 10^{-2}$	-

(a) Foote, 1978.

(b) Bellus, 1979.

(c) Merkel e col., 1972.

Tabela 3.2 - Formação de Oxigênio Singlete durante decomposição de M.A. catalizada por peroxidase.

O meio de reação continha Mn^{++} (3,1 mM), M.A. (10,5 mM), HRP (3,8 μ M), em tampão acetato 0,2 M pH 4,8 a 38,0°C.

	Intensidade máxima x 10^{-5} cpm/min	% inibição	Ação
Controle	15,0	-	-
0,3 mM metionina	12,5	16,7	1O_2
0,1 mM triptofano	12,0	20,0	1O_2
1,0 mM triptofano	9,7	35,3	1O_2
1,2 mM guanosina	12,1	19,3	1O_2
5,8 mM guanosina	8,2	45,6	1O_2
0,6 mM histidina	9,7	35,5	1O_2
1,9 mM histidina	2,1	86,2	1O_2
0,6 mM bilirrubina	12,2	18,4	1O_2
2,5 mM bilirrubina	5,2	65,3	1O_2
2,0 mM DABCO	13,2	12,3	1O_2
9,4 mM DABCO	12,3	18,0	1O_2
0,1 mM benzoato	13,5	10,0	$\cdot OH$
0,2 mM benzoato	12,3	18,0	$\cdot OH$
12,3 mM bicarbonato	14,7	2,0	$\cdot OH$
203 unidades SOD	11,5	23,3	$O_2^{\cdot -}$
203 unidades SOD desnaturada	9,7	35,3	$O_2^{\cdot -}$
150 unidades catalase	12,5	16,7	H_2O_2
600 unidades catalase	9,7	35,3	H_2O_2
150 unidades catalase desnaturada	6,7	55,3	H_2O_2

3.2.1. Efeito de guanosina sobre a emissão

Estudou-se o efeito de guanosina sobre a emissão do sistema num intervalo de concentração de 1,2 mM a 5,8 mM. Considerando a intensidade de emissão em função do tempo, observou-se que à medida que aumenta a concentração de guanosina, diminui a intensidade máxima de emissão. O pico máximo de emissão foi atingido em 2 minutos (Fig. 3.19).

a) Análise Stern-Volmer para guanosina

Analizando-se o efeito de guanosina por projeção Stern-Volmer (Fig. 3.20) na faixa de concentração de 1,2 mM a 5,8 mM, observou-se uma linearidade dos resultados passando pelo ponto (0,1). O K_{SV} obtido foi de $1,5 \times 10^2 M^{-1}$ e o valor de τ foi de $1,5 \times 10^{-6}$ seg. admitindo-se que k_q é aproximadamente $10^8 M^{-1} \text{seg}^{-1}$ (Foote, 1978).

$$K_{SV} \cong k_q \tau = 1,5 \times 10^2 M^{-1}$$

$$10^8 M^{-1} \text{seg}^{-1} \times \tau = 1,5 \times 10^2 M^{-1}$$

$$\tau = 1,5 \times 10^{-6} \text{ seg.}$$

b) Análise Duplo-recíproco para guanosina

Na análise Duplo-Recíproco do sistema para guanosina obteve-se uma linha reta com intercessão em $1,1 \times 10^{-4} \text{cpm}^{-1}$ e uma inclinação de $3,3 \times 10^{-7} \text{cpm}^{-1} \times M$ (Fig. 3.21). O valor β obtido foi de $2,9 \times 10^{-3} M$.

$$\beta = \frac{\text{inclinação}}{\text{intercessão}} = \frac{3,2 \times 10^{-7} \text{cpm}^{-1} \times M}{1,1 \times 10^{-4} \text{cpm}^{-1}}$$

$$\beta = 2,9 \times 10^{-3} M$$

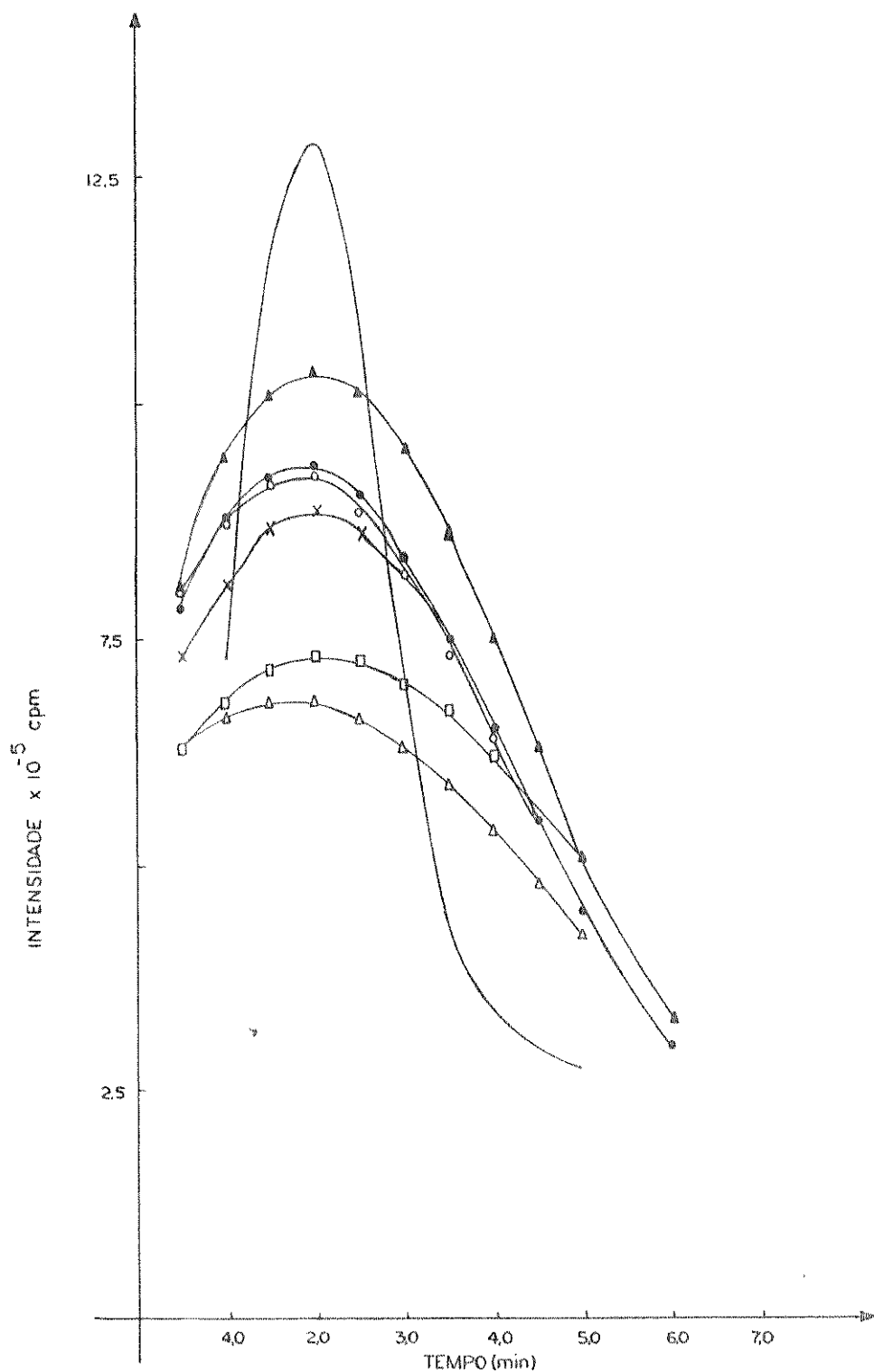


FIG. 3.19 - SUPRESSÃO DE EMISSÃO DO SISTEMA: Mn^{++} (3.1mM)/MA (10.5mM)/HRP (3.8 μ M)/ O_2 EM TAMPÃO ACETATO (0.2M) A pH 4.8 A 38.0°C POR GUANOSINA: (—) 0.0 mM; (—▲—) 1.2 mM; (—●—) 1.8 mM; (—○—) 2.5 mM; (—x—) 3.0 mM; (—□—) 5.3 mM; (—△—) 15.8 mM FOTOCOUNTER

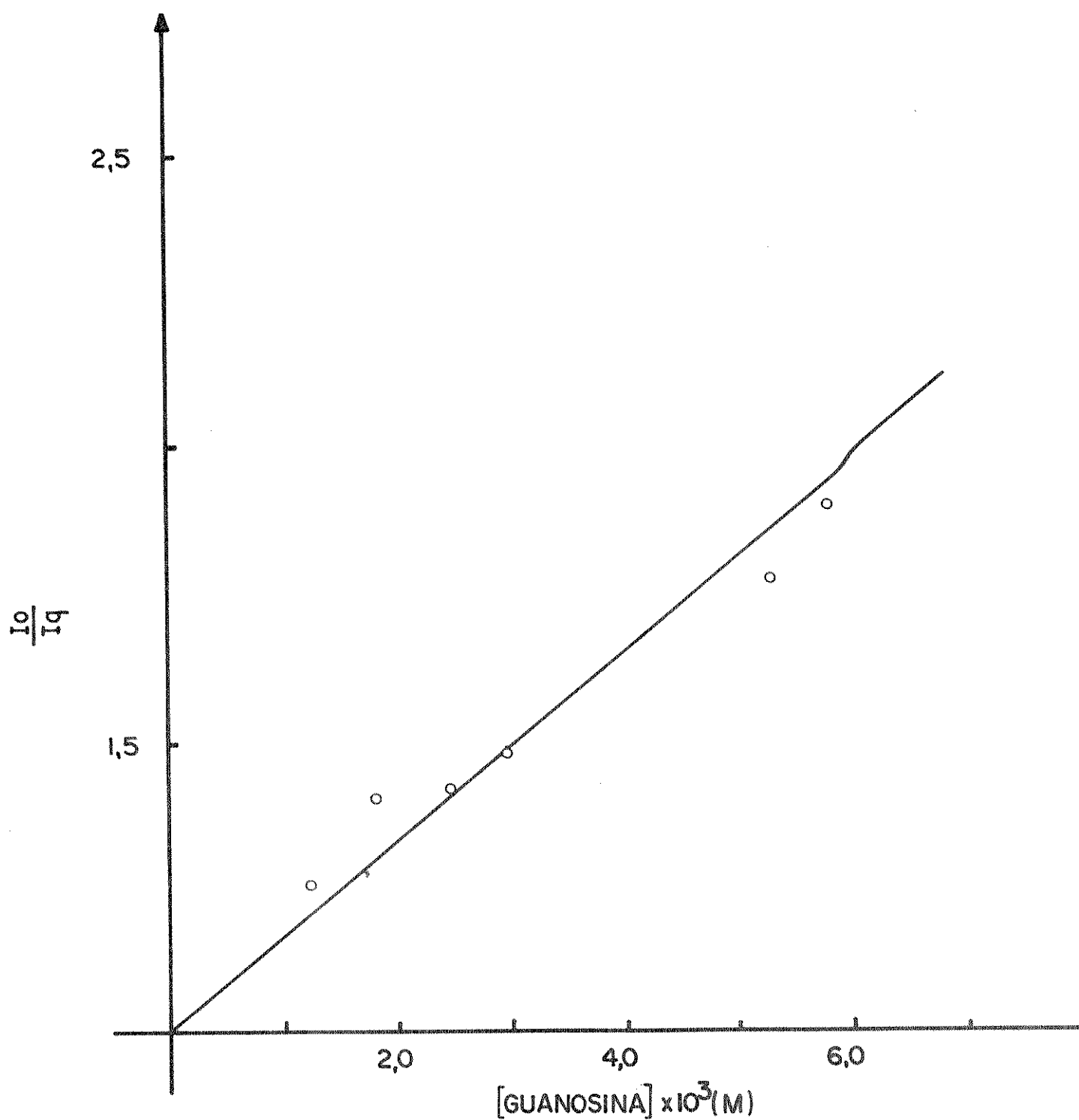


FIG. 3.20- STERN-VOLMER PARA EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA GUANOSINA NA EMISSÃO DE LUZ DO SISTEMA Mn^{++} (3,1 mM) / MA. (10,5 mM) / HRP (2,3 μ M) / O_2 EM TAMPÃO ACETATO (0,2 M) A pH 4,8 E 38,0°C

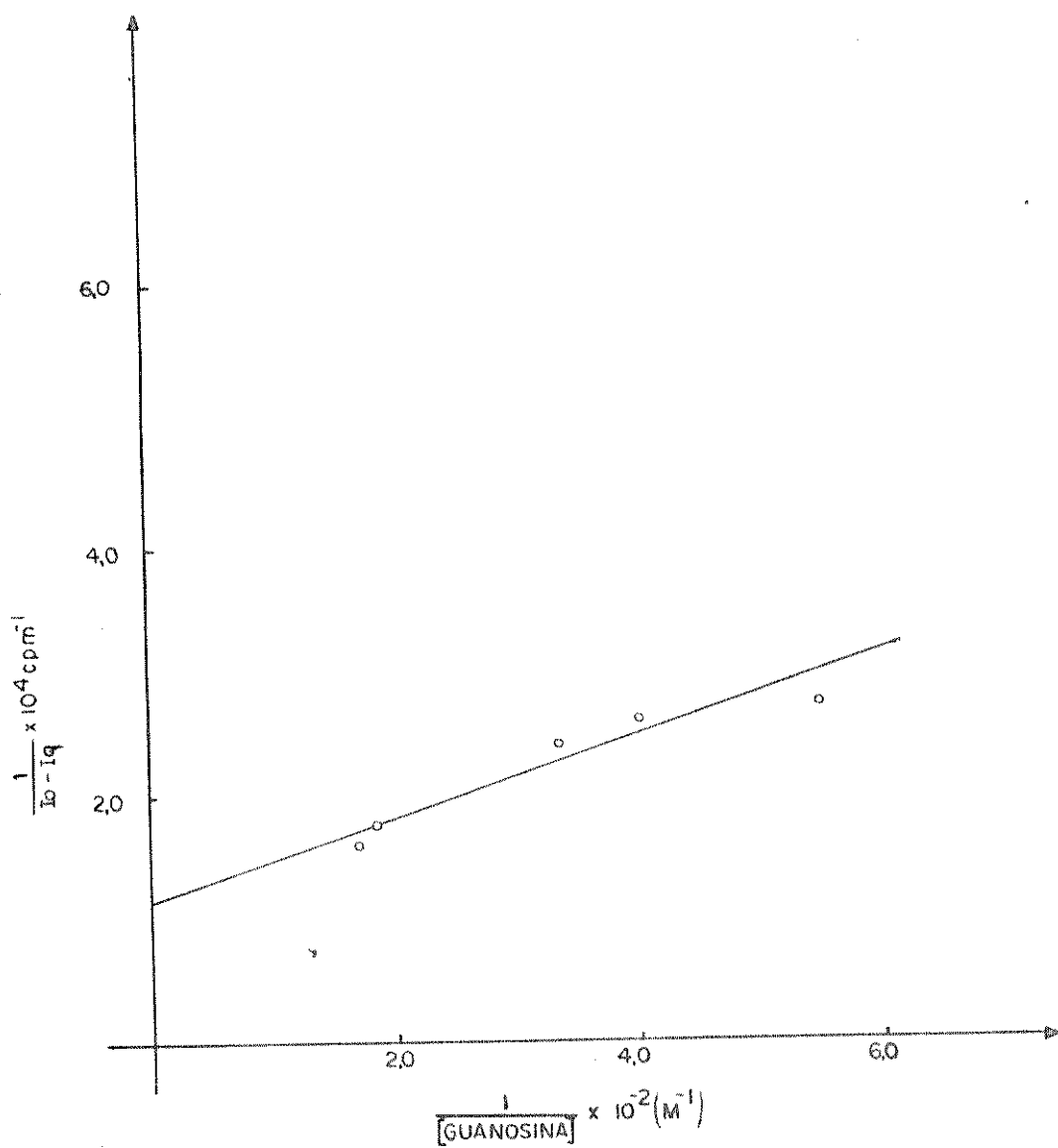


FIG. 3.21 - DUPLO-RECÍPROCO PARA O EFEITO DA GUANOSINA NA EMISSÃO DE LUZ DO SISTEMA Mn^{++} (3,1 mM)/MA (10,5 mM)/HRP (2,3 μM)/ O_2 EM TAMPÃO ACETATO (0,2 M) pH 4,8 E 38,0°C

O valor β obtido pelo inverso de K_{SV} foi de $6,9 \times 10^{-3} M$.

3.2.2. Efeito de histidina sobre a emissão

A histidina, no intervalo de concentração de 0,6 mM a 3,8 mM, afeta a emissão do sistema e diminui à medida que aumenta sua concentração; isto pode ser observado melhor através do efeito de intensidade de luz em função do tempo (Fig. 3.22). O pico máximo foi atingido em 2,5 min.

a) Análise Stern-Volmer para histidina

A análise Stern-Volmer para histidina apresenta uma reta com intercepto no ponto (0,1) no gráfico de I_0/I_Q em função de concentração de histidina (Fig. 3.23). O K_{SV} da reta foi $8,7 \times 10^2 M^{-1}$ e o valor de τ igual a $5,1 \times 10^{-6}$ seg., considerado o valor de k_q igual a $1,7 \times 10^8 M^{-1} \text{seg}^{-1}$ (Bellus, 1979).

$$K_{SV} = k_q \tau = 8,7 \times 10^2 M^{-1}$$

$$1,7 \times 10^8 M^{-1} \text{seg}^{-1} \times \tau = 8,7 \times 10^2 M^{-1}$$

$$\tau = 5,1 \times 10^{-6} \text{ seg.}$$

b) Análise Duplo-Recíproco para histidina

Para histidina, o gráfico Duplo-Recíproco de $1/I_0 - I_Q$ em função de $1/[Histidina]$ mostra uma linha reta com intercessão em $6,9 \times 10^{-7} \text{ cpm}^{-1}$ e uma inclinação de $8,1 \times 10^{-10} \text{ cpm}^{-1} \times M$ (Fig. 3.24). O valor β obtido foi de $1,1 \times 10^{-3} M$.

$$\beta = \frac{\text{inclinação}}{\text{intercessão}} = \frac{8,0 \times 10^{-10} \text{ cpm}^{-1} \times M}{7,1 \times 10^{-7} \text{ cpm}^{-1}}$$

$$\beta = 1,1 \times 10^{-3} M$$

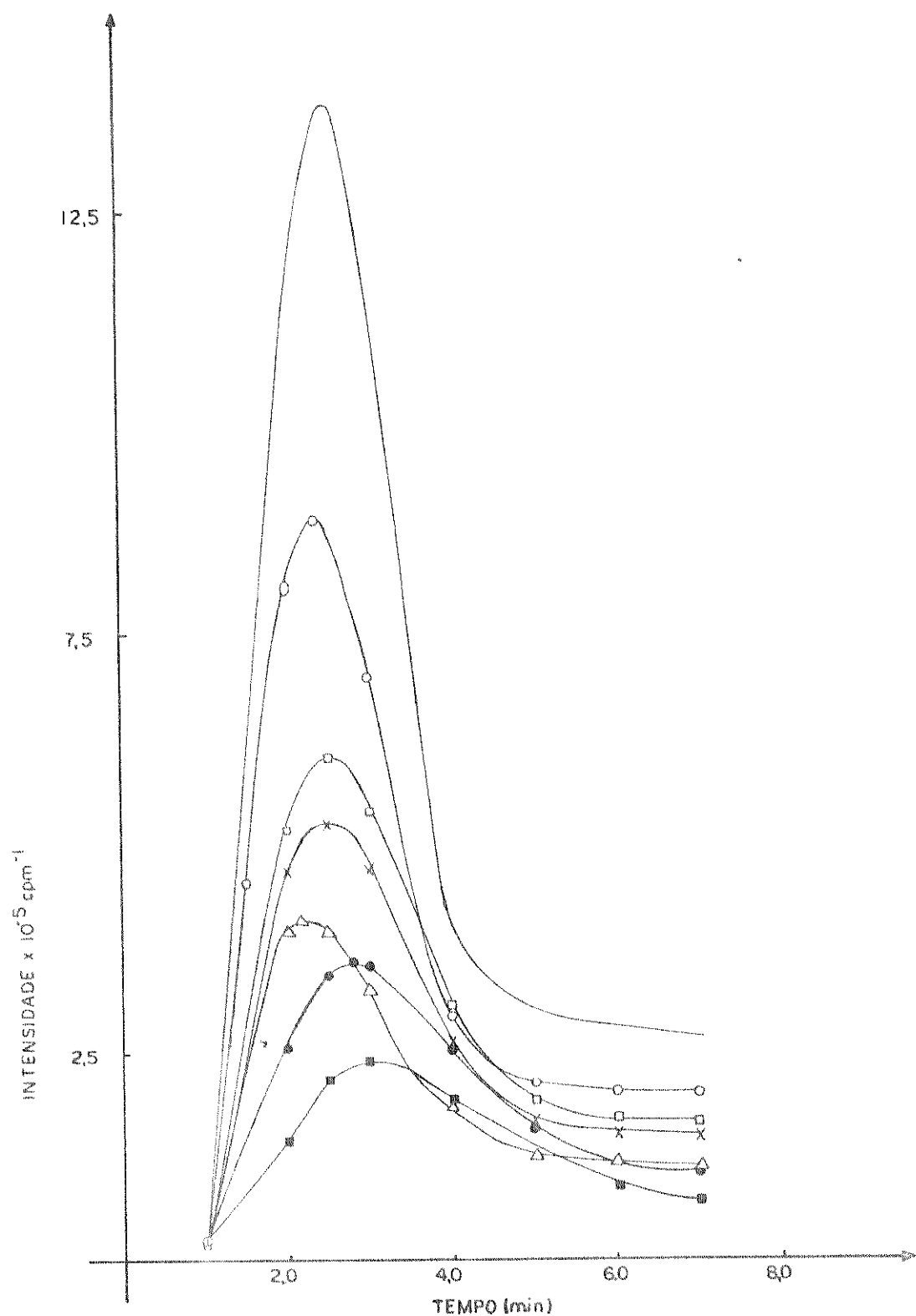


FIG. 3. 22 - SUPRESSÃO DE EMISSÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO DO SISTEMA: Mn^{++} (3,1 M)/MA (10,5 mM)/HRP (3,9 μM)/ O_2 EM TAMPÃO ACETATO (0,2 M) A pH 4,8 A 38,0°C POR HISTIDINA: (—) 0,0 mM; (○) 0,6 mM; (□) 1,2 mM; (x) 1,9 mM; (△) 2,5 mM; (●) 3,1 mM; (■) 3,8 mM

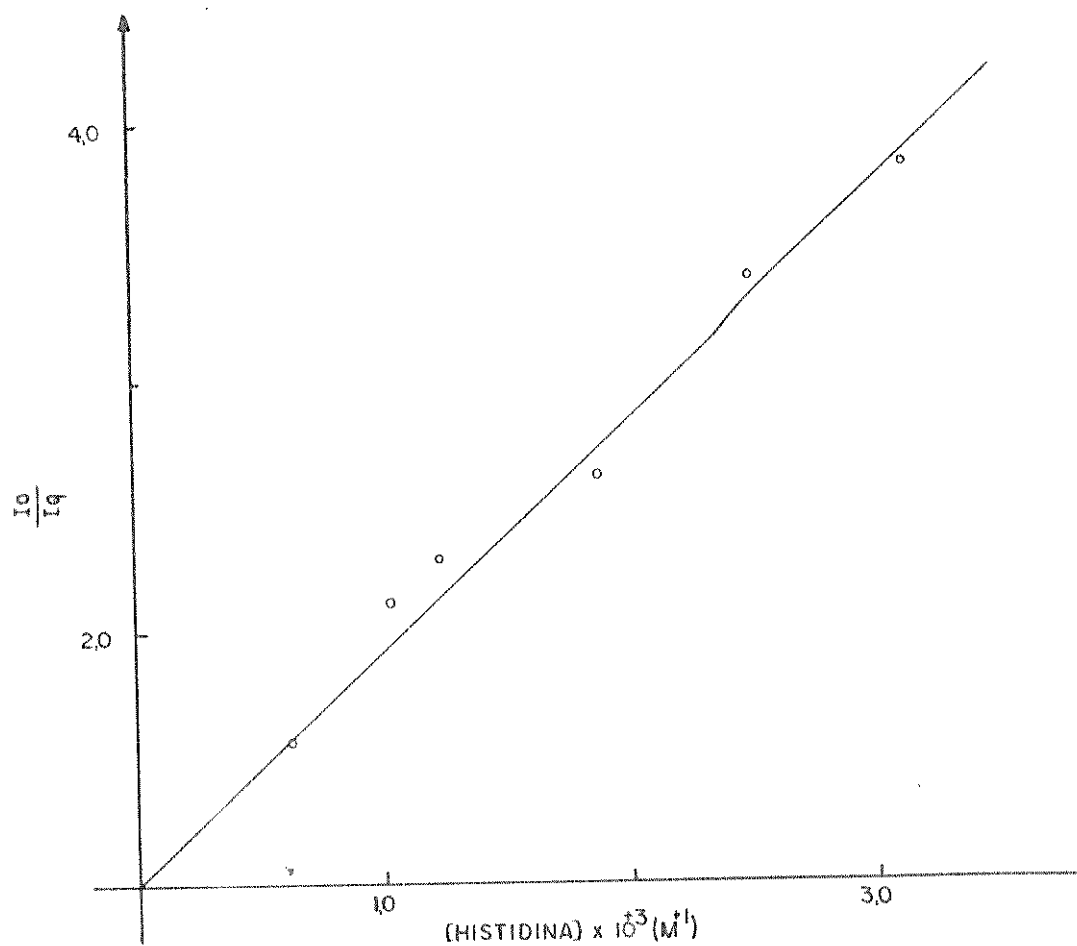


FIG. 3.23-STERN-VOLMER PARA EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA HISTIDINA NA EMISSÃO DE LUZ DO SISTEMA Mn^{++} (3,1 mM)/MA (10,5 mM)/HRP (2,3 μM)/ O_2 EM TAMPÃO ACETATO (0,2 M) A pH 4,8 E 38,0°C

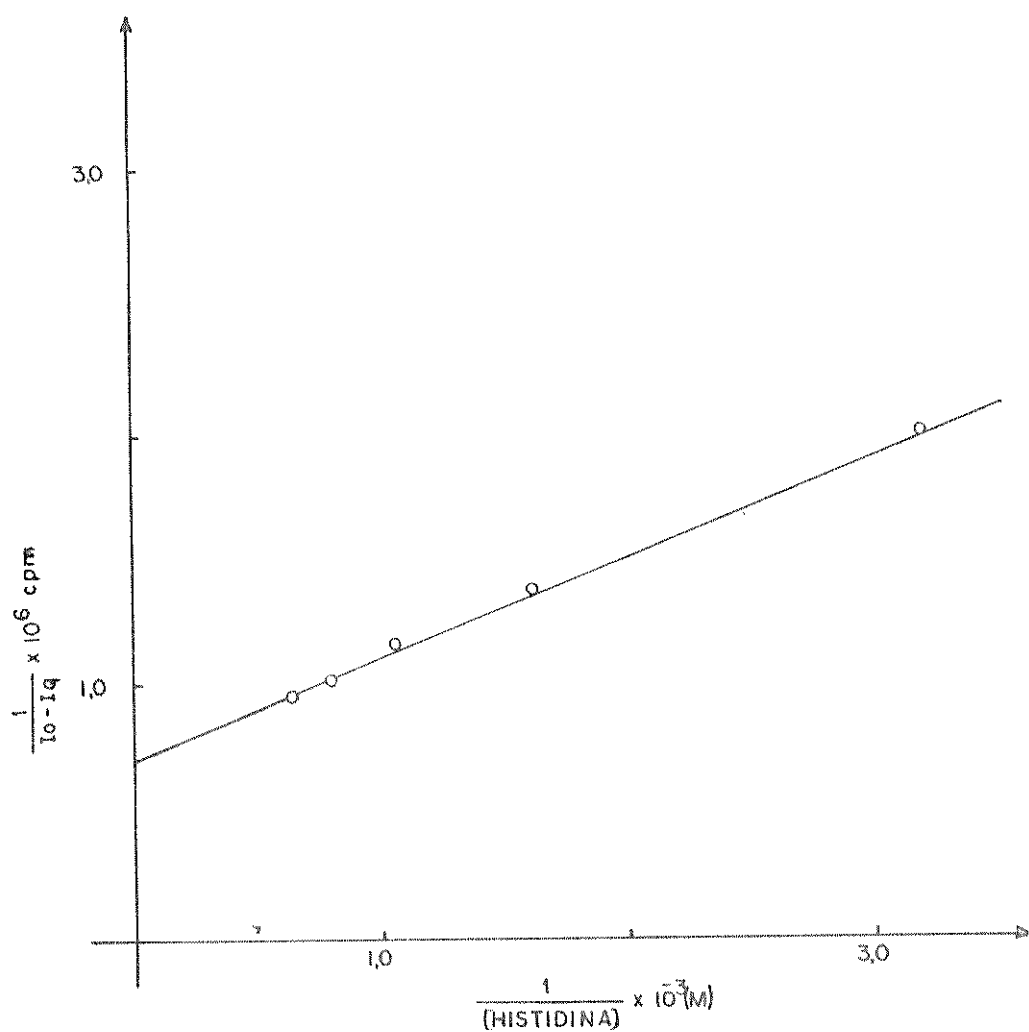


FIG. 3. 24 - DUPLO-RECÍPROCO PARA O EFEITO DA HISTIDINA NA EMISSÃO DE LUZ DO SISTEMA Mn^{++} (3,1 mM)/MA (10,5 mM)/HRP (2,3 μM)/ O_2 EM TAMPÃO ACETATO (0,2 M) pH 4,8 A 38,0 °C

O valor β obtido pelo inverso de K_{SV} foi de $1,1 \times 10^{-3} M$.

3.2.2. Efeito de bilirrubina e 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato sobre a emissão

A bilirrubina foi estudada num intervalo de concentração de $0,6 \mu M$ a $2,5 \mu M$ e $25,0 \mu M$ a $100,0 \mu M$. O valor de K_{SV} encontrado para o intervalo de concentração de $25,0 \mu M$ a $100,0 \mu M$ foi de $5,9 \times 10^4 M^{-1}$. Adicionando-se 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato (DBAS) numa concentração de $2,0 \mu M$, logo após a adição de bilirrubina $0,6 \mu M$ (antes do início da reação), observa-se um aumento da intensidade de emissão em relação a bilirrubina presente no sistema na ausência de DBAS. Quando DBAS foi adicionado 13,5 minutos após o início de reação - na presença de bilirrubina - apareceu um pico de emissão em 15,5 minutos com uma intensidade de $6,5 \times 10^5$ cpm (Fig. 3.25).

3.2.4. Efeito de β -(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina

Não se conseguiu resultados coerentes para o efeito de β -(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina (DOPA) trabalhando-se com concentrações usadas por De Mol e van Henegouwen (1979), $0,3 mM$ a $1,2 mM$ ou mesmo em concentrações mais baixas ($0,2 \mu M$ a $1,0 \mu M$).

3.2.5. Efeito de 1,4-diazobiciclo(2.2.2)octano, metionina e triptofano

1,4-Diazobiciclo(2.2.2)octano (DABCO) $2,0 mM$, e $12,3 mM$ diminui a emissão do sistema de $15,0 \times 10^5$ cpm para $13,1 \times 10^5$ cpm, $12,3 \times 10^5$ cpm e $12,2 \times 10^5$ cpm respectivamente. Para verificar se DABCO reagia com um intermediário de reação da oxidação enzimática de M.A. fez-se, por consumo de O_2 , uma experiência de dupla-

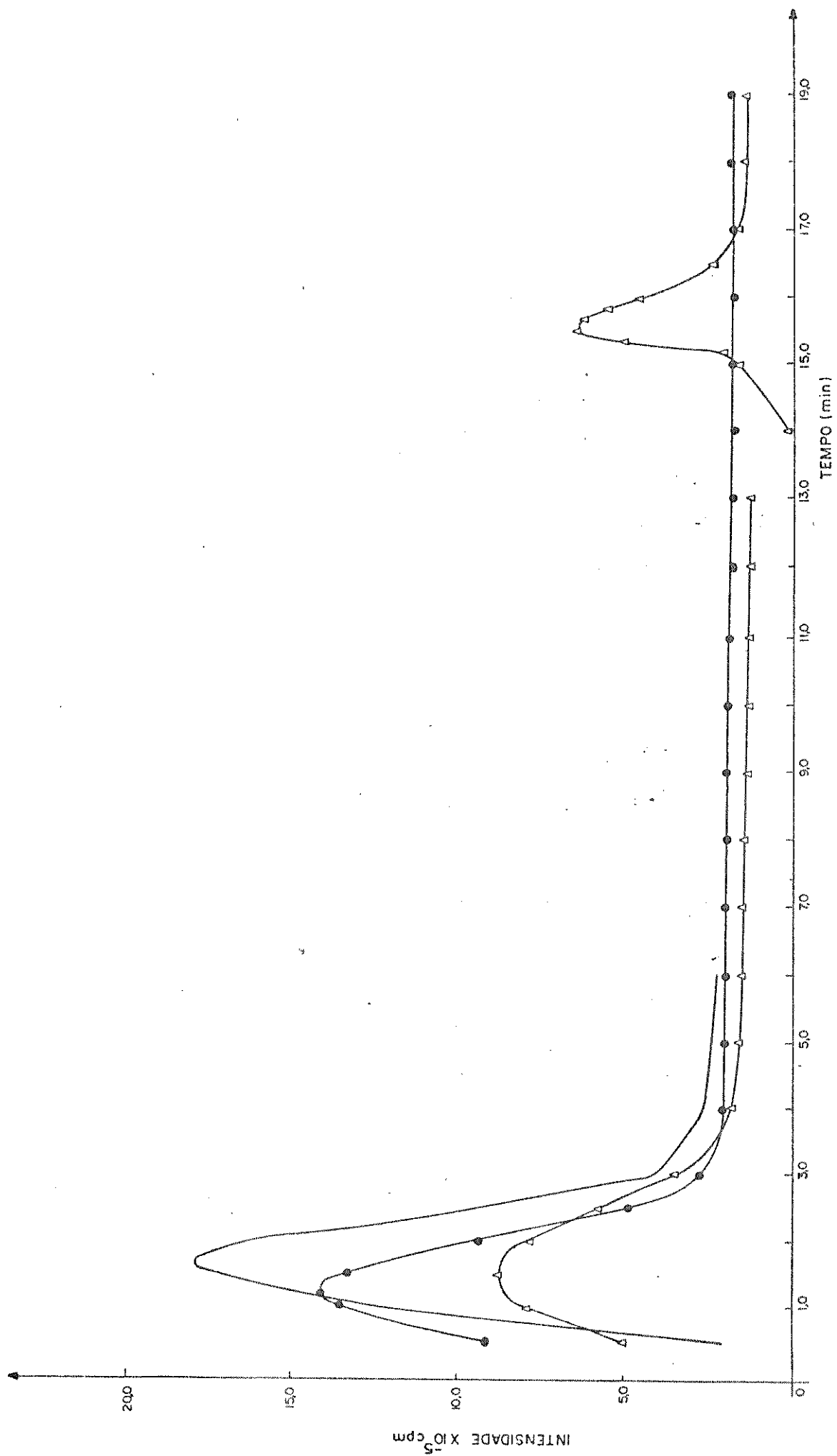


FIG. 3. 25 - EFEITO DA BILIRRUBINA E DBAS NO SISTEMA $Mn^{++}(3.1 \text{ mM})$ M.A. (10.5 mM) /HRP $(2.3 \mu\text{M})$ /O₂ EM TAMPÃO ACETATO (0.2 M) pH 4.8 A 38.0 °C

— $1.0 \mu\text{M}$ DE BILIRRUBINA E DBAS);
 —●— $0.6 \mu\text{M}$ DE BILIRRUBINA E $2.04 \mu\text{M}$ DBAS);
 —△— $0.6 \mu\text{M}$ DE BILIRRUBINA E $2.04 \mu\text{M}$ DBAS ADICIONADO 13.5 MINUTOS APÓS O INÍCIO

adição de M.A. (Nakajima e Yamazaki, 1979). Uma vez atingido o estado estacionário nas condições M.A. (4,5 mM)/Mn⁺²(3,1mM/HRP (2,3 µM)/O₂ em tampão acetato 0,2 M pH 4,8 a 38,0°C, fez-se uma segunda adição de M.A., iniciando-se novamente o consumo de oxigênio. Na segunda adição de M.A. o consumo de oxigênio é cerca de 49,7% (menor que na primeira adição). Quando a segunda adição é precedida de DABCO nas concentrações de 7,5 mM, 10,0 mM e 12,2 mM, não é alterada a velocidade inicial da reação. A relação molar total de M.A. adicionado para consumo de oxigênio foi de 42,7 na primeira adição e de 87,4 na segunda adição.

A metionina 0,3 mM e triptofano 0,1 mM e 1,0 mM provocam uma queda de emissão de 15,0x10⁵ cpm/min para 12,5x10⁵ cpm/min, 12,0x10⁵ cpm/min e 9,7x10⁵ cpm/min respectivamente (Tab.3.2).

3.2.6. Efeito de (8-³H)-guanosina

Além de N(2-dioxi-D-eritro-pentossil)uréia (Rf 0,18) - observado através do método de Cadet e Tecule (1978), em cromatografia de camada fina - foi ainda detectado N¹(2-deoxi-β-eritro-pentofuranosil) N²-formiluréia (Rf 0,31) e também um composto desconhecido (composto nº 4 no trabalho de Cadet e Teoule, Rf 0,23).

3.2.7. Efeito de deutério

Estudou-se o efeito de deutério sobre a emissão, trabalhando com tampão acetato deuterado e não deuterado, nas seguintes condições: M.A. (0,7 mM)/Mn⁺²(1,5 mM)/HRP(6,7 µM)/O₂ em tampão acetato 0,2 M pH 4,8 a 38°C. Foi encontrado um aumento de aproximadamente três a quatro vezes do deuterado para o não deuterado.

3.2.8. Efeito de catalase, superóxido dismutase (SOD), benzoato e bicarbonato na emissão

A fim de verificar se as espécies $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 teriam alguma participação no efeito de emissão de fóton causado pela oxidação enzimática de M.A., foram feitos estudos na presença de captadores destas espécies (benzoato e bicarbonato, SOD e catalase respectivamente). Não houve alteração no pico máximo de emissão (Tab. 3.2).

3.3. Efeito de oxigênio singlete sobre ácido desoxirribonucleico e lisozima

Nesta seção é mostrado o efeito de oxigênio singlete gerado enzimaticamente no sistema $\text{M.A.}/\text{Mn}^{+2}/\text{HRP}/\text{O}_2$ sobre DNA (mostrando que possivelmente a guanina é afetada) e lisozima. Apresenta também a formação do complexo DNA-M.A., com a possível formação da estrutura amino-imino-propeno, $\text{R}-\text{N}=\text{C}-\text{C}=\text{N}-\text{R}$ (Reiss e col., 1972).

3.3.1. Estudo de ácido desoxirribonucleico (DNA) sobre a emissão

Estudou-se o efeito de DNA de timo de bezerro ("calf thymus") na emissão, num contador de cintilação líquida de Beckmann, no intervalo de concentração de $0,2 \times 10^{-4} \text{M}$ a $2,7 \times 10^{-4} \text{M}$ (a concentração de DNA é dada em moles/nucleotídeo). Através do gráfico de intensidade de luz em função do tempo, observa-se uma queda na emissão fotônica à medida que aumenta a concentração de DNA (Fig. 3.26).

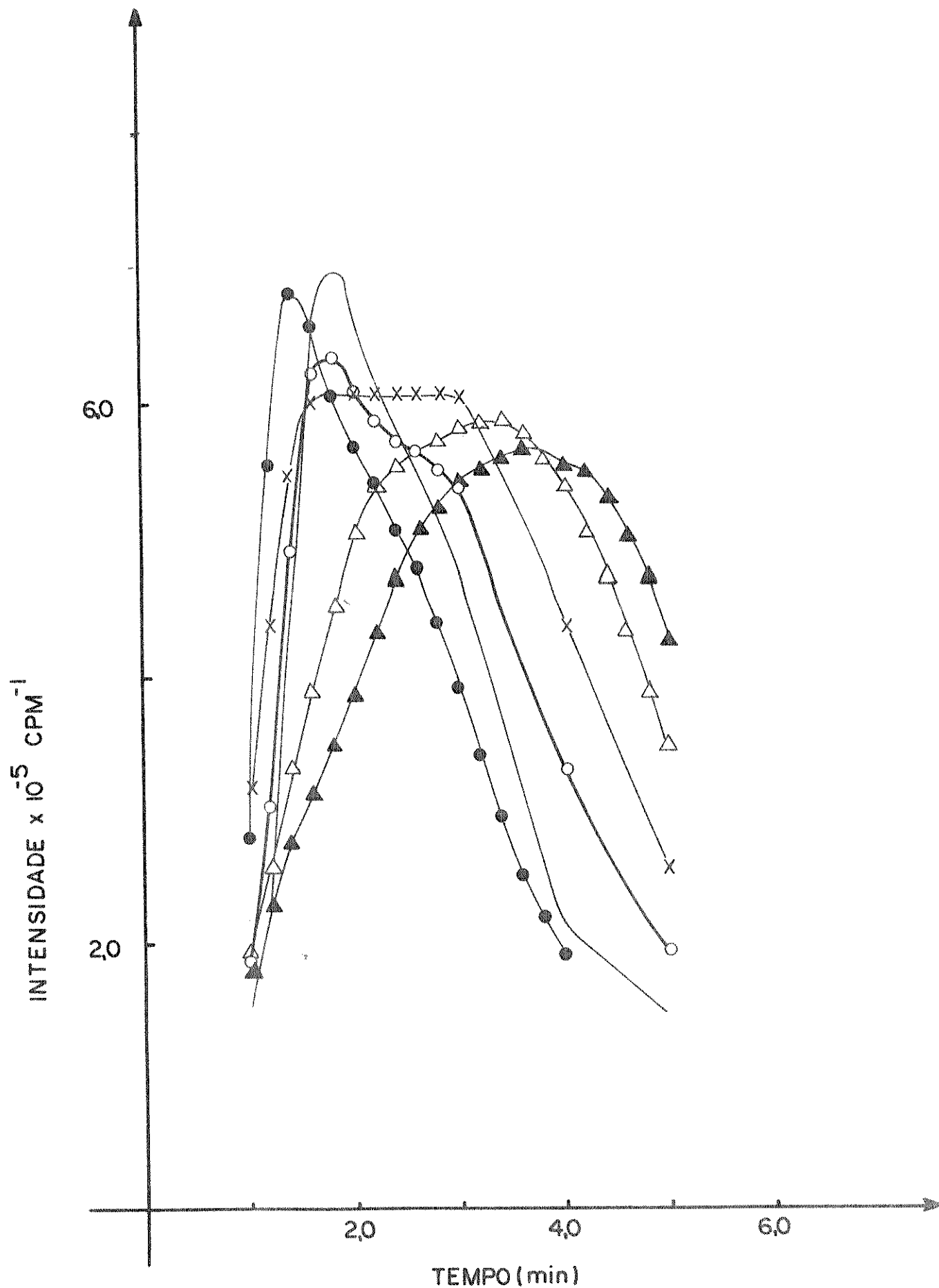


FIG. 3. 26 - SUPRESSÃO DE EMISSÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO, SISTEMA: Mn^{++} (3,1 mM/MA (10,5 mM)/HRP (2,3 μ M)/ O_2 EM TAMPÃO ACETATO (O_2 M) A pH 4,8 A 25,0°C POR DNA: (—) 0,0 mM, (●) $0,2 \times 10^{-4}$ M (○) $0,7 \times 10^{-4}$ M; (x) $1,4 \times 10^{-4}$ M; (△) $2,0 \times 10^{-4}$ M; (▲) $2,7 \times 10^{-4}$ M A CONCENTRAÇÃO DO DNA É DADO POR NUCLEOTÍDEO CINTILADOR

a) Análise Stern-Volmer para ácido desoxirribonucleico

Graficamente, as intensidades máximas da Fig. 3.26 em função das respectivas concentrações mostra um valor de K_{SV} de $9,0 \times 10^2 M^{-1}$ e um valor de $9,0 \times 10^{-6}$ para τ (Fig. 3.27).

$$K_{SV} = k_q \tau = 9,0 \times 10^2 M^{-1}$$

$$10^3 M^{-1} \text{seg}^{-1} \times \tau = 9,0 \times 10^2 M^{-1}$$

$$\tau = 9,0 \times 10^{-6} \text{seg.}$$

b) Análise Duplo-Recíproco para ácido desoxirribonucleico

O gráfico Duplo-Recíproco de $1/I_0 - I_Q$ em função de $1/|\text{DNA}|$ para o efeito de DNA sobre a emissão do sistema, apresenta uma linha reta com intercessão em $3,7 \times 10^{-6} \text{cpm}^{-1}$ e uma inclinação de $1,0 \times 10^{-9} \text{cpm}^{-1} \times M$ (Fig. 3.28). O valor β assim obtido foi de $0,3 \times 10^{-4} M$.

$$\beta = \frac{\text{inclinação}}{\text{intercessão}} = \frac{1,0 \times 10^{-9} \text{cpm}^{-1} \times M}{3,7 \times 10^{-6} \text{cpm}^{-1}}$$

$$\beta = 0,3 \times 10^{-4} M$$

O valor β obtido pelo inverso de K_{SV} foi de $1,1 \times 10^{-3} M$.

3.3.2. Espectro na região U.V. de ácido desoxirribonucleico (DNA) de E. coli

a) Iluminação na presença de hematoporfirina

O tratamento de DNA de E.coli por luz, na presença de hematoporfirina, mostrou uma mudança do pico máximo de absorção

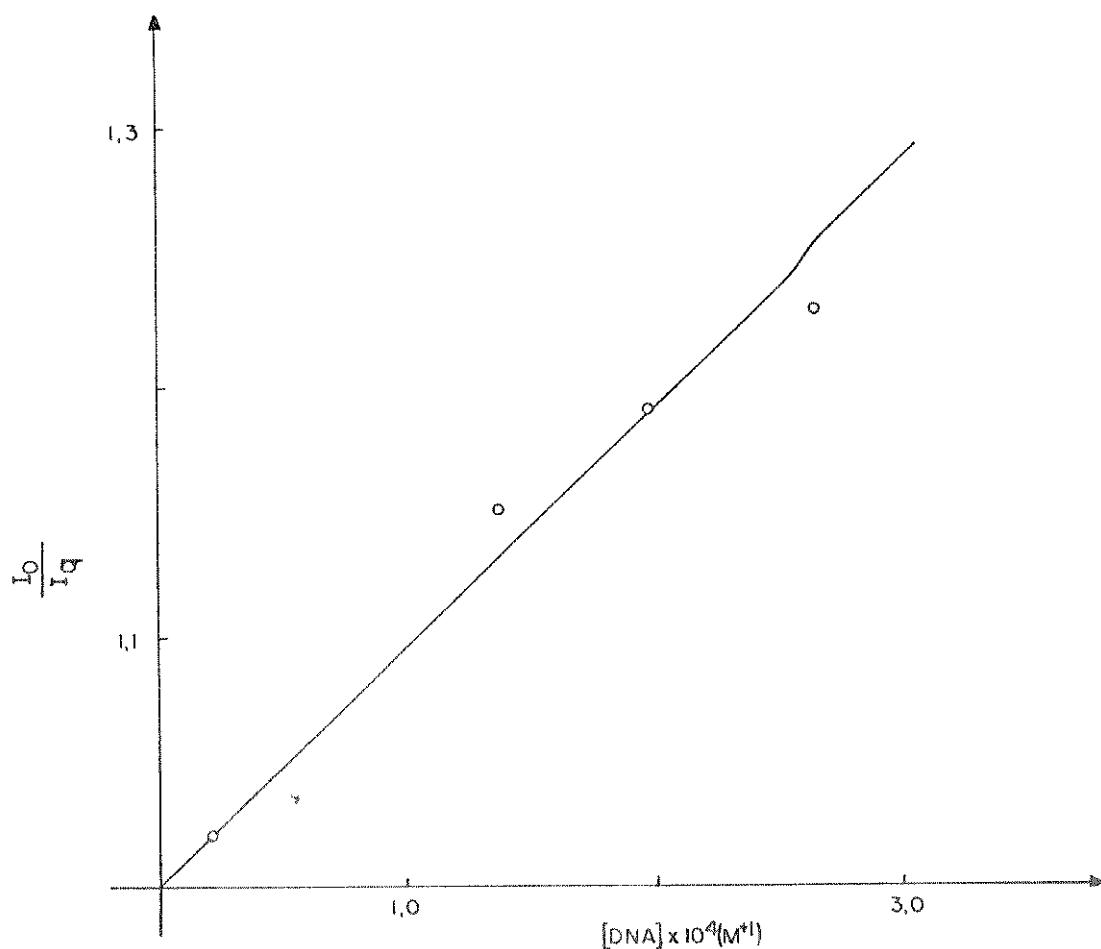


FIG. 3. 27- STERN-VOLMER PARA EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO DNA NA EMISSÃO DE LUZ NO SISTEMA Mn^{++} (3,1 mM) / M.A. (10,5 mM) / HRP (2,3 μ M) / O_2 EM TAMPÃO ACETATO (0,2M) A pH 4.8 E 25°C. A CONCENTRAÇÃO DO DNA É DADA POR NUCLEOTÍDEO.

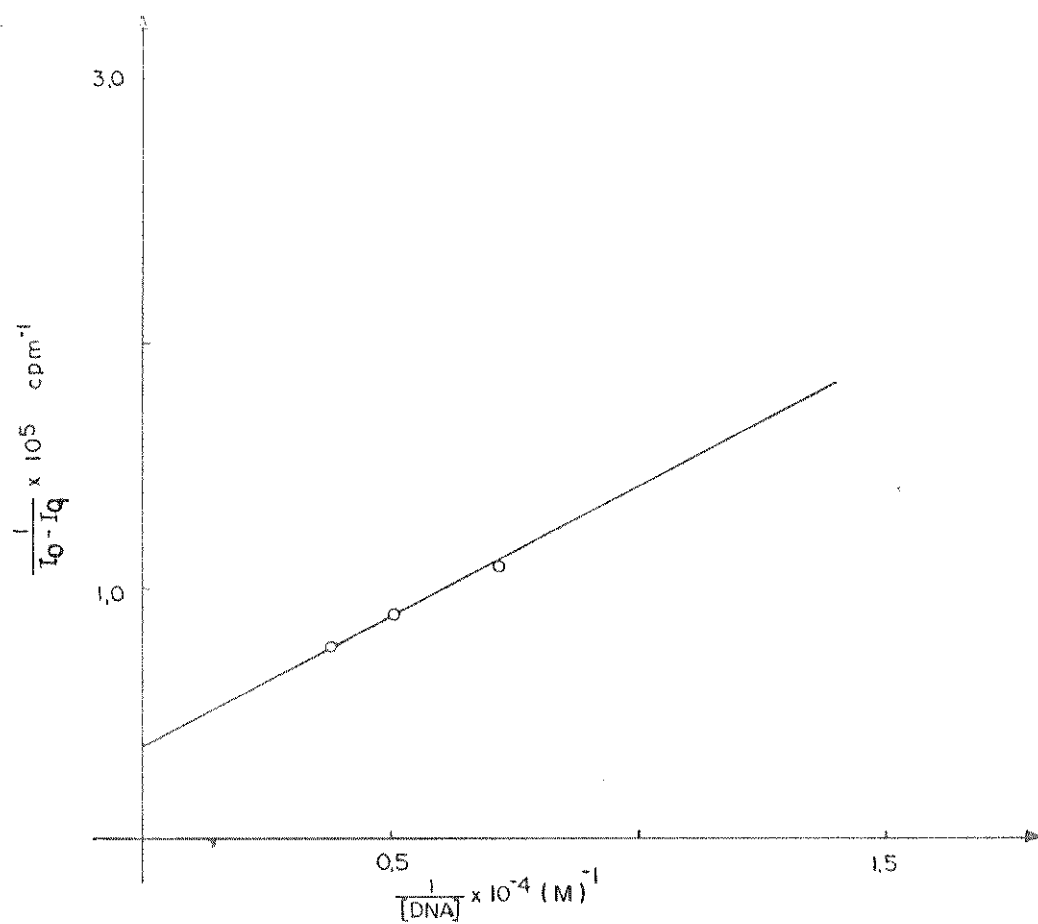


FIG. 3.28 - DUPLO-RECÍPROCO PARA O EFEITO DE DNA NA EMISSÃO DE LUZ DO SISTEMA Mn^{++} (3,1 nM) / MA (10,5 nM) / HRP (2,3 μ M) / O_2 EM TAMPÃO ACETATO (0,2M) pH 4,8 E 25,0°C. A CONCENTRAÇÃO DO DNA É DADO POR NUCLEOTÍDEO

de 257,5 para 260 nm (Fig. 3,29, 3,30, 3,31).

b) Tratamento de *E.coli* no sistema

i. DNA sem sofrer desnaturação

O DNA de *E.coli* nativo apresenta um pico máximo em 257,5 nm; o que foi tratado no sistema desloca o pico máximo para 254,5 nm, apresentando um ombro acentuado em 270 nm, indicando que o pico máximo possivelmente seria em 260 nm. No espectro diferencial deste DNA pode-se observar efetivamente que em 260 nm apresenta-se um pico. Tratou-se então o DNA na presença de M.A. e Mn^{+2} (ausente HRP e portanto oxigênio singlete); o espectro exibiu um pico máximo em 254,5 nm (Fig. 3.29).

2i. DNA tratado no sistema e depois desnaturado

O DNA de *E. coli* desnaturado, apresenta um pico máximo em 257,5 nm. O tratado no sistema e depois desnaturado mostra um pico máximo em 254,5 nm, aparecendo o ombro em 270 nm, agora bem mais acentuado que no espectro de DNA sem sofrer desnaturação (Fig. 3.30).

3i. DNA desnaturado e depois tratado

Ainda outra vez o DNA de *E.coli* desnaturado apresenta um pico máximo em 257,5 nm. O desnaturado e tratado no sistema mostra um pico máximo em 254,5 nm, aparecendo o ombro em 270 nm, menos acentuado que nos casos anteriores (Fig. 3.31).

3.3.3. Aumento de fluorescência de Tb^{+3} por DNA de *E.coli*

Um espectro de fluorescência de Tb^{+3} complexado

B - ESPECTRO DIFERENCIAL NA REGIÃO
U.V. DE DNA DE *E. coli*

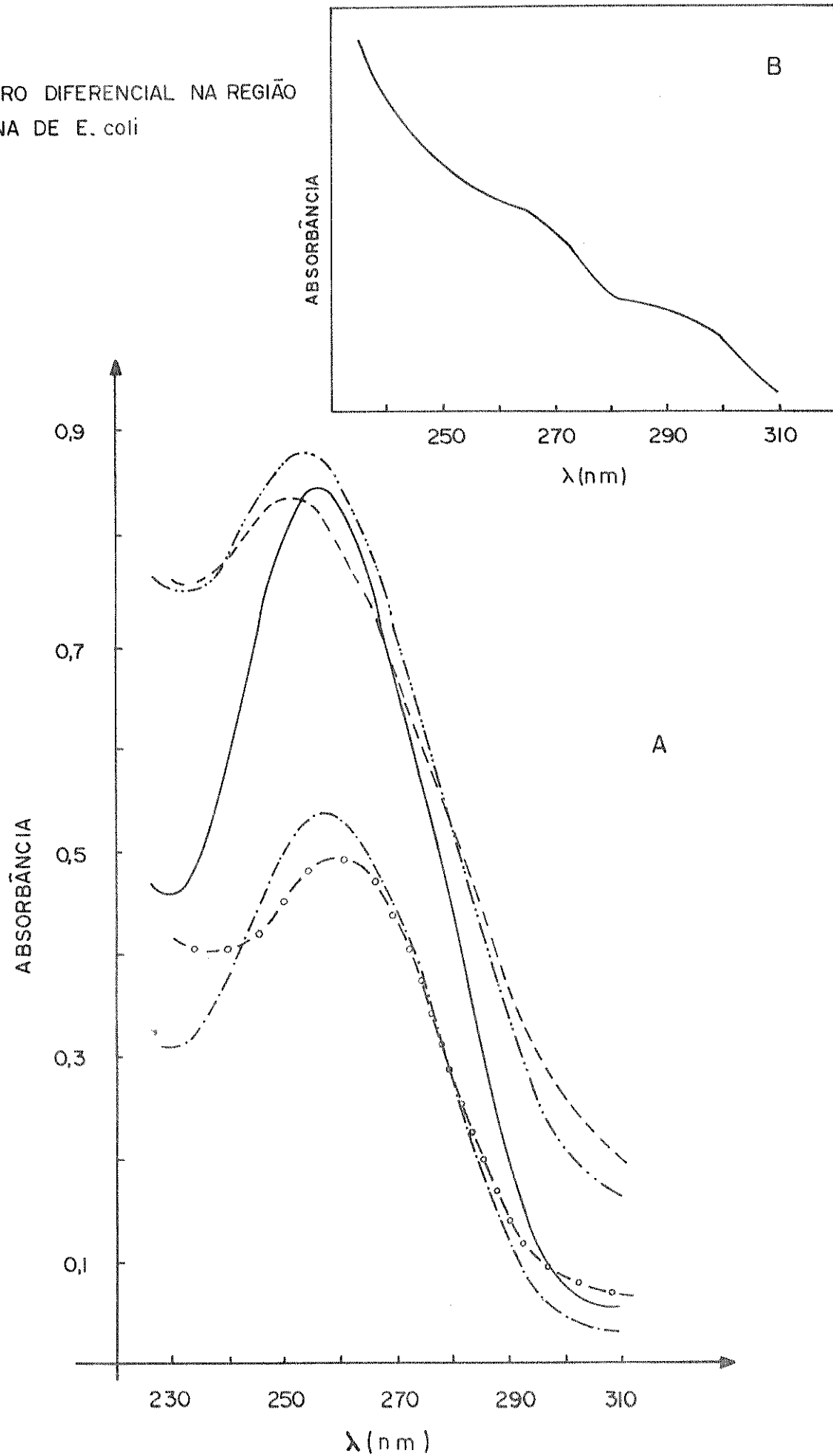


FIG 3.29 - A - ESPECTRO NA REGIÃO U.V. DE DNA DE *E. coli*
 (—) nativo, (---) tratado no sistema, (— · —) DNA-MA.
 (····) desnaturado e exposto à luz por 16,3h
 (—○—) irradiado na presença de hematoporfirina por 16,3h

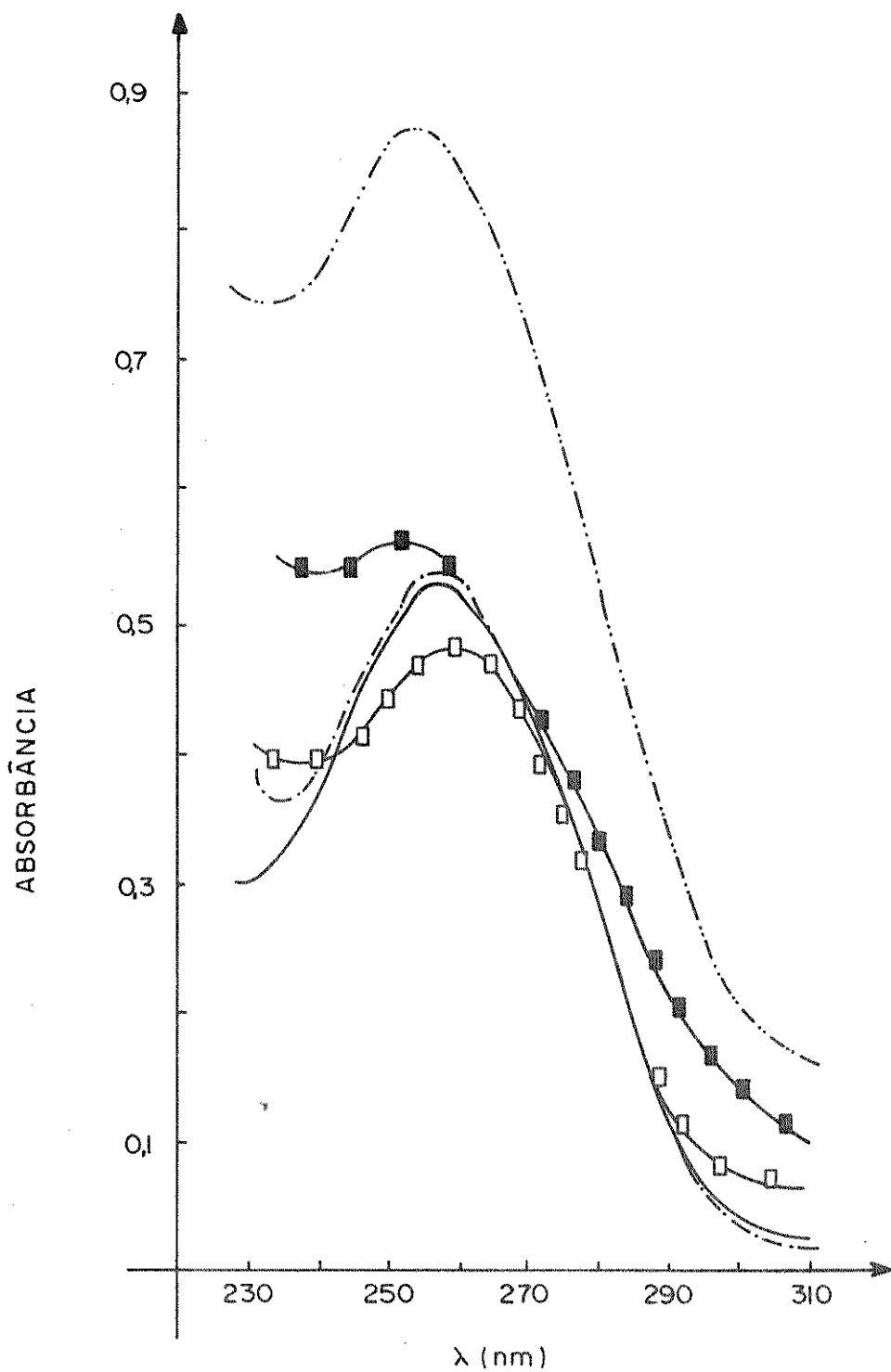


FIG. 3. 30-ESPECTRO NA REGIÃO U.V. DE DNA DE *E. coli*

- (—) desnaturado e exposto à luz por 16,3h
- (—□—) irradiado na presença de hematoporfirina por 16,3h
- (—) nativo (depois desnaturado)
- (—■—) tratado no sistema e depois desnaturado
- (—) DNA - MA (sem desnaturação)

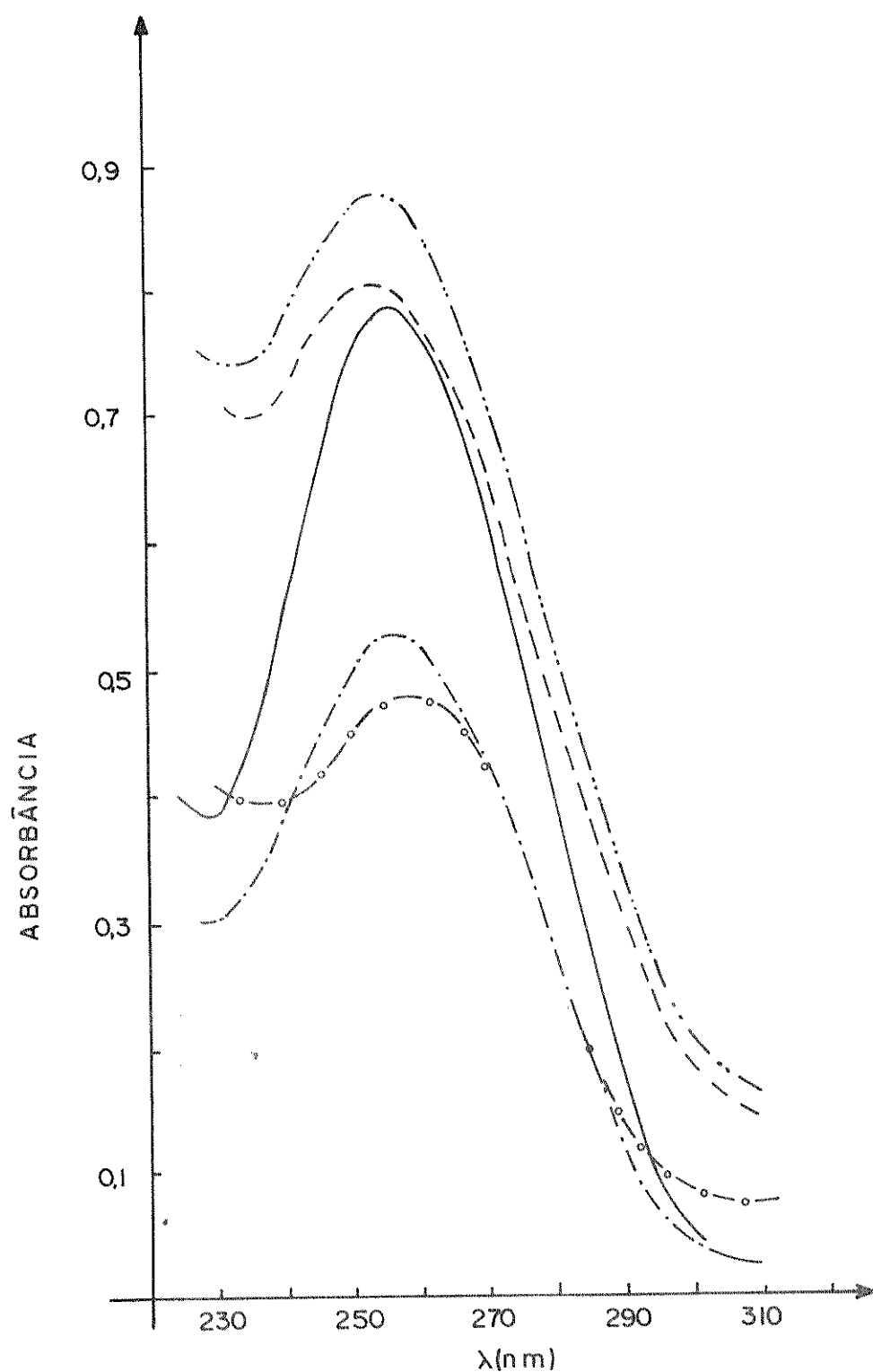


FIG. 3.31-ESPECTRO NA REGIÃO U.V. DE DNA DE *E.coli*

- (— · —) desnaturado e exposto à luz por 16,3h
- (— ° —) irradiado na presença de hematoporfirina por 16,3h
- (——) desnaturado
- (---) desnaturado e depois tratado no Sistema
- (.....) DNA-MA(sem desnaturação)

com DNA de E.coli mostra um aumento de fluorescência de Tb^{+3} complexado com DNA nativo em relação ao Tb^{+3} não complexado. Quando complexado com DNA tratado no sistema a fluorescência diminui em relação ao nativo, mas ainda é maior que a fluorescência de Tb^{+3} não complexado. Observou-se dois picos característicos da fluorescência do Tb^{+3} em 545 nm e 488 nm com λ de excitação em 290 nm (Fig. 3.32).

3.3.4. Análise de Aminoácidos de Lisozima

A lisozima foi tratada por 1O_2 gerado no sistema enzimático; os resultados estão na Tab. 3.3.

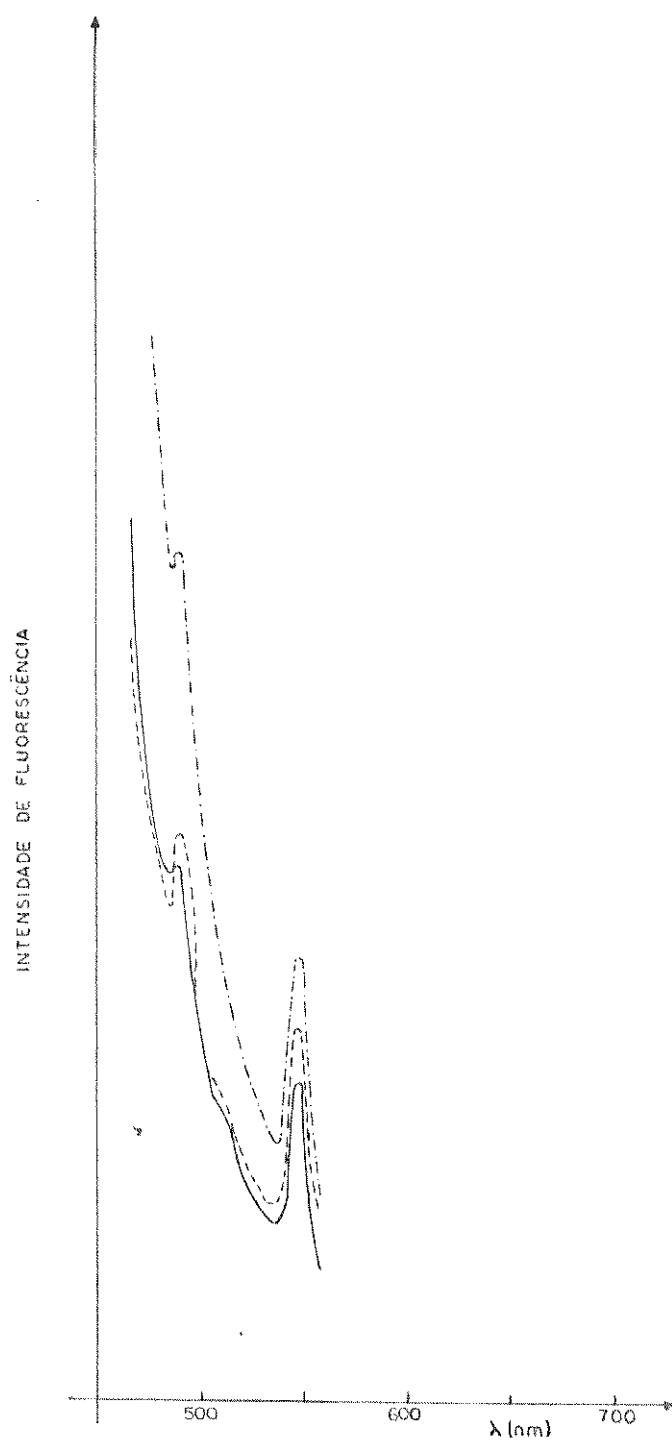


FIG 3.32 - AUMENTO DE FLUORESCÊNCIA DE Tb^{+3} POR DNA DE *E. coli* (λ_{ex} . 290nm)
 Tb^{+3} (10,0 μ M)/DNA (11,0) μ g/ml
 (—) Tb^{+3}
 (---) DNA nativo
 (-.-) DNA tratado no sistema

Tabela 3.3 - Alteração da Lisozima^(a) exposta a oxigênio singlete gerado pelo sistema Mn⁺⁺/M.A./HRP/O₂.

	LISOZIMA		LISOZIMA/ ¹ O ₂ ^(b)
	Teórico	Experimental	
Triptofano	6,0	5,9	4,6 (1,3) ^(c)
Histidina	1,1	0,9	1,0 (0)
Metionina	2,0	2,1	1,3 (0,8) ^(c)

(a) Também foram analisados os seguintes aminoácidos: lisina, arginina, asparagina, treonina, serina, ácido glutâmico, glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, encontrando-se que não foram alterados.

(b) Sistema bioenergizado de ¹O₂.

(c) Valores corrigidos para ação de HRP e M.A.

CAPÍTULO 4

4. DISCUSSÃO

4.1. Estudos Cinéticos

A reação de oxidação de M.A. catalizada pela peroxidase do rabanete apresenta uma cinética típica de Michael-Menten (Fig. 3.8 e 5.3), demonstrando uma dependência de primeira ordem em relação ao substrato na faixa de 1,8 mM a 10,5 mM (observado pelo gráfico de logarítmo da velocidade inicial de oxigênio consumido em função do logarítmo da concentração do substrato) e ordem zero em relação ao oxigênio.

O valor de 6,7 mM para o K_m e o valor de $8,0 \times 10^{-3}/10$ seg. para a relação $V_{\text{máx}}/K_m$ indica que M.A. é um bom substrato para a enzima comparando-os com o valor bem maior de K_m (100,0 mM) e bem menor de $V_{\text{máx}}/K_m$ ($1,3 \times 10^{-3}/10$ seg), obtidos por Guillo e Durán (1980) no sistema 2-metilpropanal/HRP/ O_2 na temperatura de $38,0^\circ\text{C}$, em nosso laboratório.

Pela relação linear obtida entre velocidade inicial de consumo de O_2 e a variação da concentração de enzima (Fig. 3.3 e 3.4), tem-se a certeza de estar trabalhando com velocidades iniciais dentro deste intervalo de concentração enzimática (0,8 μM a 3,8 μM), (Segel, 1979).

Observou-se neste mesmo sistema, mas em concentrações diferentes, que na emissão de luz o efeito da peroxidase também é linear porém, só até a concentração de 12,9 μM ; embora o intervalo de concentração usada também esteja dentro dos limites para velocidades iniciais, após a concentração de 12,9 μM , a emissão começa a diminuir com o aumento da concentração de peroxidase. Provavelmente isto se dê ao fato da HRP, em sua composição, conter aminoácidos entre os quais histidina, que é um bom supressor

de oxigênio singlete; em concentrações maiores que 12,9 μM de HRP, a própria peroxidase passa a suprimir a emissão.

No estudo de M.A.H. observou-se que para uma mesma concentração de M.A. e M.A.H. (por exemplo. 10,5), nas mesmas condições, a intensidade máxima de emissão difere grandemente na proporção de 1:3 de M.A. para o M.A.H. Na concentração de 10,5 mM com M.A.H., a emissão atinge um valor de $4,3 \times 10^6$ cpm enquanto que para M.A., $1,5 \times 10^6$ cpm (Fig. 3.15).

Para se obter uma intensidade máxima próxima da obtida com M.A. 10,5 mM, a concentração de M.A.H. necessária é de 1,3 mM; porém, apresenta um tempo de 5,0 minutos até atingir o pico máximo, enquanto que com o M.A. é atingido em 2,0 minutos aproximadamente.

Possivelmente a eficiência de M.A.H. em apresentar uma elevada contagem de fótons se deva à ausência de impurezas como BEA e dímeros de M.A. que se apresentam em M.A.

Pode-se verificar também que à medida que se abaixa a concentração de M.A.H., aumenta o tempo para atingir o pico máximo de emissão. Isto porque a velocidade inicial diminui com a diminuição da concentração do substrato (Fig. 3.15).

Acredita-se que M.A. produzido a partir da hidrólise ácida de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) seja um mutagênico menos eficiente (18 a 20 vezes menos) que BEA, também produzido a partir de TEP (Marnett e Tuttle, 1980). Pensou-se então que BEA, estando como impureza na síntese de M.A., pudesse ser responsável por parte de emissão gerada pelo sistema. Todavia, nos estudos de emissão com BEA e M.A., observou-se que é necessário utilizar uma concentração de BEA duas vezes maior que M.A., para se obter a mesma intensidade de emissão.

Nos estudos com BEA também observou-se uma rápida hidrólise de BEA para M.A.; assim, é provável que a maior emissão

venha do M.A. produzido nesta hidrólise.

Portanto, a conclusão de que BEA seja 18 a 20 vezes mais mutagênico que M.A. (Marnett e Tuttle, 1980) provavelmente indique que BEA tenha maior penetrabilidade na célula que M.A., mas como BEA se hidrolisa a M.A. possivelmente qualquer efeito mutagênico vem da oxidação deste produto.

Dentro das nossas condições, trabalhando com M.A. 99%-100% puro (detectada por U.V.), pode-se considerar que a emissão observada provém totalmente da oxidação de M.A., uma vez que é grande a possibilidade de BEA estar presente apenas como traços de impureza.

Conclui-se portanto, através dos estudos de consumo de oxigênio e emissão, que as concentrações dos reagentes que produzem maior porcentagem de consumo de oxigênio e melhor intensidade de emissão (observando-se os efeitos de pH, tampão acetato, íons Mn^{+2} , peroxidase e M.A.) com menor tempo de indução foram: M.A. (10,5 mM)/ Mn^{+2} (3,1 mM)/HRP (3,8 μ M) em tampão acetato 0,2M pH 4,8 a 38,0°C. Decidiu-se por esta maneira usá-las como controle em todo o trabalho. Com estas condições, obtém-se cerca de 94% de consumo de oxigênio com uma velocidade inicial de 38,1 nmoles O_2 /ml/10 seg e uma intensidade de emissão de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ cpm. Em alguns experimentos HRP foi usada na concentração de 2,3 μ M; nesta concentração a intensidade chega a $7,0 \times 10^5$ cpm.

Dados normalizados para consumo de oxigênio e emissão total de luz mostram que o consumo de oxigênio é mais rápido que a emissão, sugerindo que esta venha de um intermediário que se acumula durante a reação (Vidigal-Martinelli e col., 1979).

Nos estudos para a proposição do mecanismo, observou-se que quando N_3^- é adicionado ao sistema de oxidação enzimática de M.A., nas concentrações de 10,0 mM e 1,0 mM, o consumo de oxigê-

nio é totalmente inibido, indicando que possivelmente M.A. complexa-se diretamente no sítio ativo da enzima.

No consumo de oxigênio, com a adição de H_2O_2 96,0 μM e catalase 125 unidades, pode-se verificar que a reação é dependente de HRP-I, pois H_2O_2 retira totalmente o tempo de indução, e a catalase (altamente eficiente na decomposição de H_2O_2 para água (Dunford e Stillman, 1976)) aumenta o tempo de indução (Fig. 3.16).

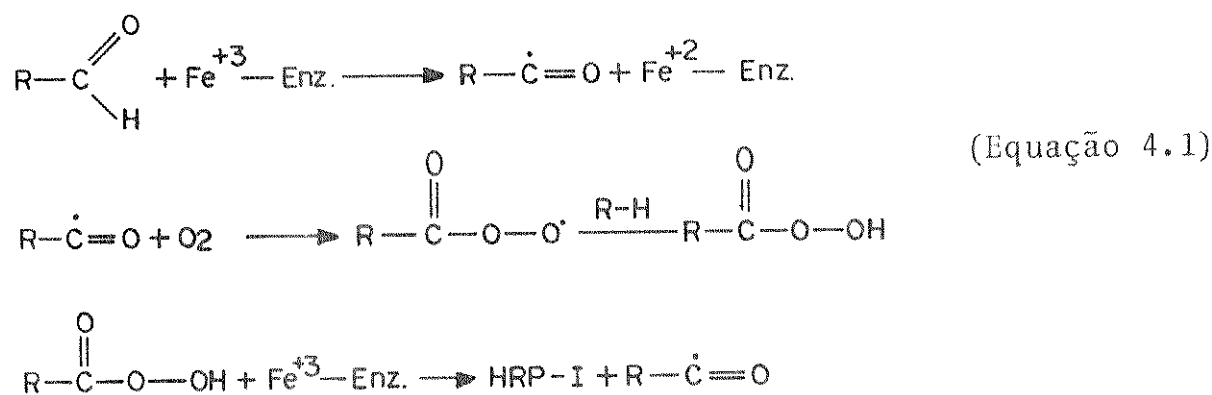
Uma melhor evidência de que o sistema é dependente de peróxidos foi observada na emissão (Fig. 3.18). Na ausência de H_2O_2 , o tempo de indução é de 9,5 minutos; com a adição de H_2O_2 3,0 μM , o tempo de indução diminui para 3,0 minutos e na concentração de 80,0 μM é eliminado quase que totalmente. A intensidade da emissão, na presença ou na ausência de 3,0 μM de H_2O_2 é semelhante. Com 1,0 μM de H_2O_2 incubado por 9,2 min. a intensidade de emissão é levemente maior que o controle, o mesmo acontecendo com a adição de 80,0 μM de H_2O_2 .

Portanto, de acordo com estes resultados, a enzima deve catalisar a inserção de oxigênio e para isto, mover-se entre dois estados de oxidação diferentes. Isto torna-se óbvio pela absorção do sistema reagente (Fig. 3.17), que indica a presença de HRP-II e HRP-I. É provável que o tempo de indução de um minuto (maior que o esperado em relação ao consumo de oxigênio) ocorra devido à baixa temperatura ($24,0^\circ\text{C}$) em que foi feito o experimento e também ao tipo de experimento (a reação foi iniciada por M.A. e não por HRP, conforme o comumente feito, o que resulta num menor tempo de indução).

O comportamento cinético da peroxidase do rabanete a 420 nm, 411 nm e 400 nm, indica que durante a reação teve-se essencialmente HRP-II e, em baixas concentrações, HRP-I. A HRP

nativa está sendo transformada no sistema reagente, o que é evidenciado pela curva negativa na região Soret.

A HRP-I poderia ser formada por traços de H_2O_2 obtidos, talvez, por uma reação catalisada por metal ou então pelo aldeído presente, pois sabe-se que aldeído em presença de Fe^{+3} produzem radicais acila que podem levar à formação de HRP-I (Equação 4.1) (Haun, 1979).



Tais resultados são semelhantes aos obtidos com os sistemas 2-metilpropanal/HRP/ O_2 (Bechara e col., 1979) e propanal/HRP/ O_2 (Haun e col., 1980) e, analogamente, pode-se sugerir o seguinte mecanismo para a etapa de propagação (Equação 4.2).

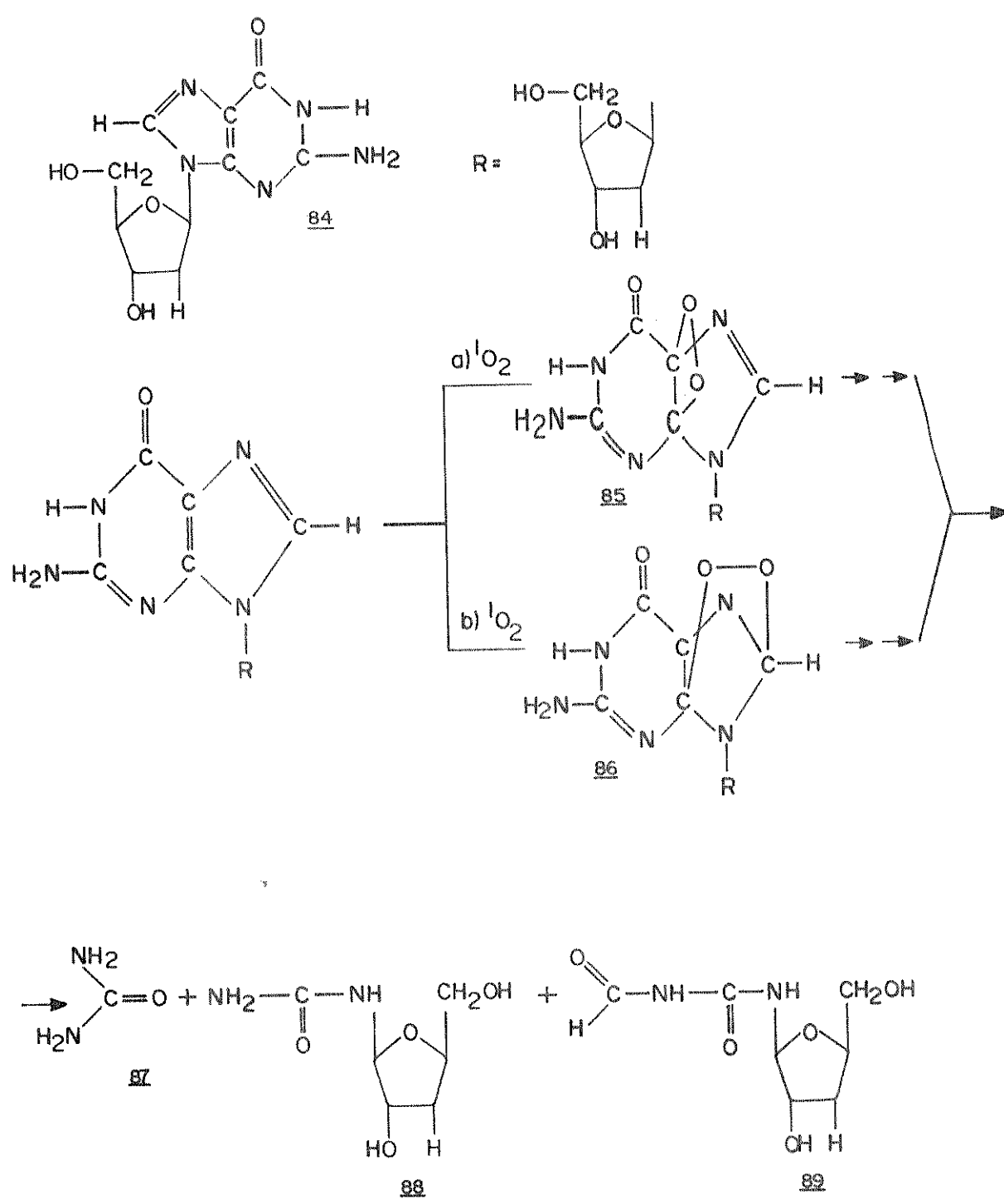
A decomposição de (81) segundo o mecanismo de Russell (Howard e Ingold, 1968), não viola a regra de conservação de spin, pois Oxigênio Singlete ($^1\text{O}_2$) é formado na reação, conforme será discutido a seguir.

4.2. Detecção de Oxigênio Singlete

Neste trabalho foram usados vários aceptores de $^1\text{O}_2$.

Tratou-se (8- ^3H)-guanosina (84) no sistema reagente, detectando-se N(2-deoxi-D-eritro-pentosil uréia), o mesmo resultado pode ser devido à 1,4-cicloadição de oxigênio singlete nas duplas ligações 7,8 e 4,5 e decomposição subsequente do 4,8 endoperóxido (Equação 4.3a) (Matsubara e col., 1972). Um composto desconhecido (composto nº4 no trabalho de Cadet e Teoule) e N¹(2-deoxi-β-D-eritropentofuranosil)N²-formil uréia (89) foram também detectados.

É possível que haja também a 1,2-cicloadição de oxigênio singlete na dupla ligação 4,5 e decomposição do 4,5 endoperóxido formado (Equação 4.3b).



EQUAÇÃO 4.3

A guanosina (84) e a histidina (61) suprimiram a emissão da espécie excitada (Fig. 3.19 e Fig. 3.22). Calculou-se o valor de β (concentração do aceptor necessário para inibir metade da concentração da espécie excitada) e o valor de τ (o tempo da meia vida da espécie excitada) (Fig. 3.20, Fig. 3.21, Fig. 3.23 e Fig. 3.24). Calculou-se também o β para bilirrubina (Tab. 3.1).

O valor de β encontrado para guanosina (81) ($2,9 \times 10^{-3} \text{M}$) e para histidina (61) ($1,1 \times 10^{-3} \text{M}$) obtidos por duplo-recíproco, são valores próximos aos obtidos da literatura ($\sim 3,0 \times 10^{-3} \text{M}$) (Foote, 1978).

A bilirrubina (70) foi usada na concentração de 0,6 μM a 100,0 μM e mostra dois comportamentos: o primeiro, de 0,6 μM a 2,5 μM — no tratamento Stern-Volmer — apresenta uma assíntota oblíqua, não se podendo neste caso se determinar o β do aceptor e o τ da espécie excitada, do mesmo modo como para guanosina e histidina. Neste comportamento da bilirrubina, a intercessão da assíntota oblíqua é menos que 1,0 e a inclinação assintótica é maior que a inclinação inicial do gráfico Stern-Volmer; a curva desloca-se para cima da assíntota oblíqua (Fig. 4.1) e o cálculo de β e τ exige tratamentos matemáticos mais complexos (Dalton e Turro, 1970); o segundo de 25,0 μM a 100,0 μM apresenta um comportamento semelhante à guanosina e histidina, podendo-se calcular então o β . O valor de K_{SV} encontrado foi $5,9 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ e o valor de β obtido pelo inverso de K_{SV} foi $1,7 \times 10^{-5} \text{M}$. Considerando o tempo de vida de oxigênio singlete em água igual à $2,0 \times 10^{-6} \text{seg}$ (Merkel e col., 1972) o valor de K_Q é $3,0 \times 10^{10} \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$, valor diferente ao publicado ($2,0 \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$) (Foote e Ching, 1975) e semelhante ao de β -caroteno-1,3 - $3,0 \times 10^{10} \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$ (Wilkinson, 1978). Sabendo-se que caroteno desativam oxigênio singlete por um mecanismo de transferência de energia (Foote, 1979) — pois desativação de oxigênio singlete por 15,15'-cis- β -caroteno é acompanhado por isome-

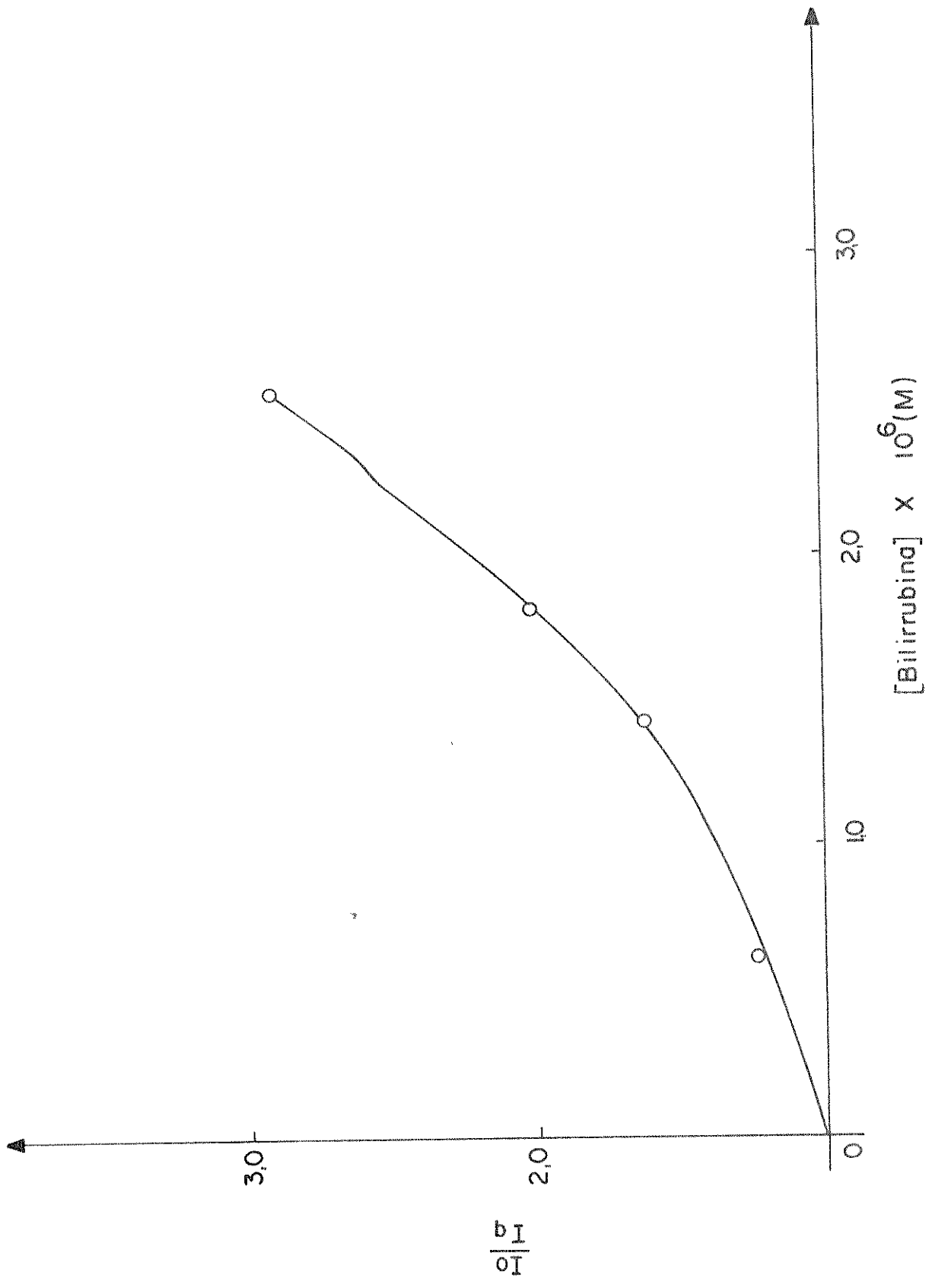


FIG. 4.1 - STERN-VOLMER PARA O EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE BILIRRUBINA NA EMISSÃO DE LUZ DO SISTEMA Mn^{++} (3,1 mM) / MA. (10,5 mM) / HRP (2,3 μM) O_2 EM TAMPÃO

rização para o isômero trans (Foote e col., 1970) — é bem possível que dentro desta faixa de concentração (25,0 μM a 100,0 μM) de bilirrubina, o mecanismo de desativação de oxigênio singlete seja também por transferência de energia, com competição de reação química (Durán e col., 1981). Também existe uma outra explicação para a alta eficiência de bilirrubina em suprimir $^1\text{O}_2$. Esta seria uma ligação da bilirrubina com a enzima permitindo maior eficiência na supressão.

É provável que um composto cetônico triplete seja formada na reação de bilirrubina com oxigênio singlete, o que pode ser observado nos estudos com DBAS, um acceptor emissivo que aumenta grandemente a emissão da espécie excitada triplete (Haun e col., 1980).

A bilirrubina (70) 0,6 μM inibe a emissão de $18,0 \times 10^5$ cpm para $8,8 \times 10^5$ cpm. Adicionando-se DBAS 2,0 μM após 13,5 minutos de reação do sistema na presença de bilirrubina, quando a quimiluminescência estava em aproximadamente $1,8 \times 10^5$ cpm, a emissão aumenta para $5,6 \times 10^5$ cpm (Fig. 3.25); provavelmente este aumento se deva à transferência de energia do composto cetônico triplete para DBAS que então emite. Quando DBAS 2,0 μM é adicionado no início da reação após a adição de bilirrubina, a intensidade de luz é inibida para $14,0 \times 10^5$ cpm, um pouco maior que na ausência de DBAS; é possível que neste caso haja a somatória de dois efeitos: inibição da emissão bimol $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$ $^1\Delta_g$) por bilirrubina (reação formando endoperóxido e logo decomposição) e aumento da emissão causado pela transferência de energia de fragmentos cetônicos de bilirrubina no estado triplete para DBAS (Fig. 3.25).

O DABCO neste sistema funcionou normalmente como um desativador, não apresentando nenhuma das anomalias citadas (Tab. 3.2). Procurou-se verificar se ele reagia com algum intermediário da reação, porque esperava-se que tivesse o efeito de aumento da emissão dimol de oxigênio singlete em 634 nm (Durán e Faljoni,

1978). Porém, a não modificação da velocidade inicial na segunda adição de M.A. indica que DABCO não reage com intermediário da reação.

É conhecido que numa dupla adição de mesma concentração, após atingir o estado estacionário, obtém-se o mesmo valor de consumo de oxigênio em reações de oxidação catalizada por peroxidase (Nakajima e Yamazaki, 1979); isto é indicativo de perda da atividade da enzima se na segunda adição não se atingir o mesmo valor em consumo de oxigênio. Neste trabalho, uma dupla adição de M.A. (4,6 mM) mostra que a segunda adição não atinge 50% do consumo de oxigênio original. Isto indica que, possivelmente, na presença de M.A. a enzima é inativada em aproximadamente 50%.

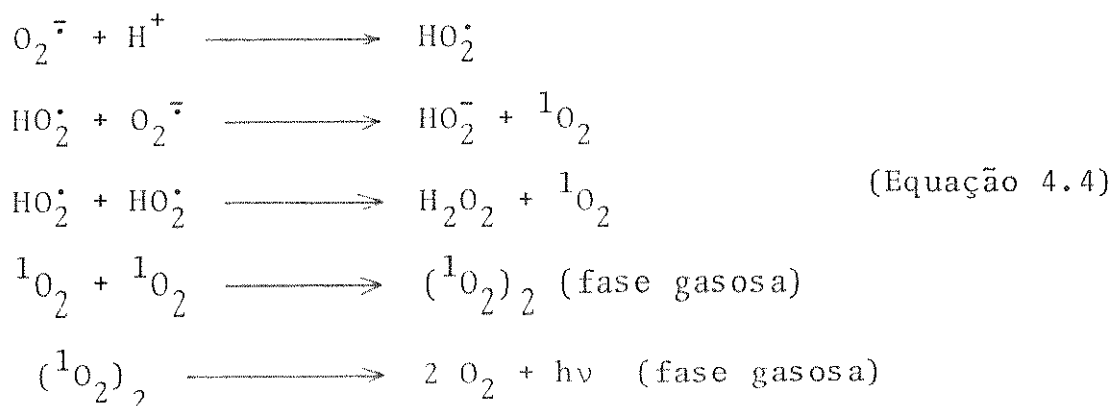
A metionina e triptofano agiram normalmente como aceptores de oxigênio singlete, inibindo a emissão (Tab. 4-2).

O estudo de água deuterada indicou um efeito três a quatro vezes maior em relação ao não deuterado, que corresponde a um valor menor ao da literatura (para sistemas fotoquímicos o valor é dez vezes mais, (Kajiwara e Kearns, 1973). Isto indica que o oxigênio singlete está sendo suprimido por alguns aminoácidos da proteína, razão pela qual foi observada a inativação da enzima

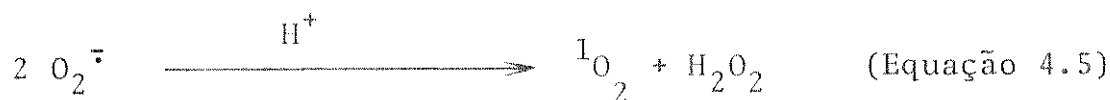
O espectro de emissão no sistema M.A./Mn⁺²/HRP/O₂ e a intensidade de luz foi tão intensa que foi possível observá-lo em um fluorímetro convencional em H₂O ou D₂O (Durán e col., 1981). O principal pico de emissão é exatamente sobre 700 nm e ocasionalmente um pico menor foi observado em 630 nm, em concordância com trabalhos prévios (Vidigal-Martinelli e col., 1979).

Procurou-se também descobrir se a espécie emissiva era produzida diretamente da reação de oxidação enzimática de M.A. ou se surgia de reações de $\cdot\text{OH}$, O_2^- ou H_2O_2 , pois oxigênio singlete pode ser gerado a partir destas espécies também (Equação 4.4 a Equação 4.10). Conseguiu-se gerar oxigênio singlete através da

reação entre um radical cátion e superóxido ânion (Mayeda e Bard, 1973). Observou-se também uma fraca emissão em 630 nm, característica do estado dimérico $^1\Delta_g$ de O_2 , a partir da dismutação do íon O_2^- na presença de doadores de prótons e propôs-se o seguinte esquema de reação de acordo com os resultados (Equação 4.4) (Mayeda e Bard, 1974):

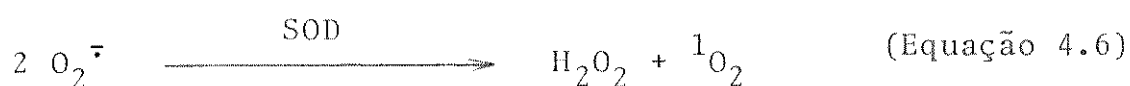


O oxigênio singlete também pode ser formado pela reação de dismutação de radicais superóxido ânion segundo a equação 4.5 (Schaap e col., 1974):

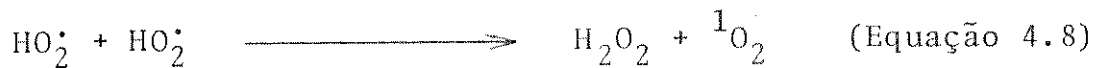
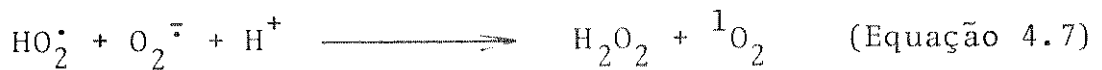


Todavia, esta reação é um processo muito lento, provavelmente devido à repulsão eletrostática (Halliwell, 1981).

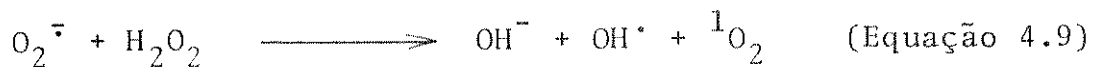
SOD, uma metaloproteína que contém dois átomo-gramas de Cu e dois átomo-gramas de Zn, cataliza a reação de dismutação de O_2^- para dar oxigênio molecular (Equação 4.6) Schaap e col., 1974).



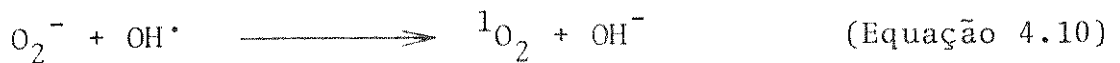
A dismutação de O_2^- normalmente ocorre devido à formação de $HO_2^{\bullet}$, através das reações (Equação 4.7 e Equação 4.8) (Halliwell, 1981).



É provável que oxigênio singlete (${}^1\Delta_g$ ${}^1\Delta_g$) seja produzido durante a dismutação de $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Equação 4.7 e Equação 4.8) ou reação de Haber-Weiss (Equação 4.9) (Halliwell, 1981). Propõe-se também que $\text{O}_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 reagem para gerar $\text{OH}^\bullet$ como se segue (Equação 4.9) (Halliwell, 1981; Kellog e Fridovich, 1975):



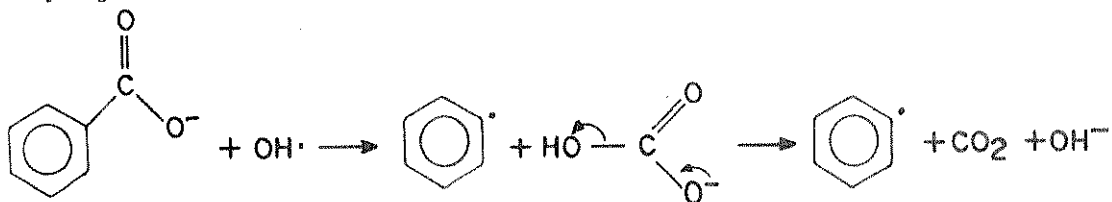
O íon $\text{O}_2^{\cdot -}$ pode também sofrer interação com $\text{OH}^\bullet$ formando o oxigênio singlete segundo a equação (4.10) (Arneson, 1970).



Por outro lado, sabe-se que a atividade catalítica de catalase é altamente eficiente na decomposição de peróxido de hidrogênio para oxigênio e água (Equação 4.11) (Dunford e Stillman, 1976):



e que benzoato e bicarbonato são captadores de $\text{OH}^\bullet$ (Equação 4.12 e Equação 4.13) (Durán e Faljoni, 1978)



EQUAÇÃO 4.12



(Equação 4.13)

Neste trabalho foi usado SOD, catalase, bicarbonato e benzoato, não se encontrando efeito algum sobre a emissão (Tab. 4.2); portanto, a espécie emissiva não provém de $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 ou $OH^{\cdot}$ mas sim como um produto direto da oxidação enzimática de M.A.

Todos estes resultados (inibição de emissão por aceptores específicos, análise de produtos, efeito de deutério, espectro de emissão, efeito de DABCO e eliminação de outras espécies ativadas de oxigênio por inibidores próprios para estas espécies) permitem concluir que oxigênio singlete, provavelmente no estado ($^1\Delta_g$ $^1\Delta_g$) seja a espécie emissiva formada como um produto direto no sistema de reação $M.A./Mn^{+2}/HRP/O_2$. Embora a eficiência quântica desta emissão $^1O_2(^1\Delta_g$ $^1\Delta_g)$ seja de aproximadamente 10^{-6} Einstein/mol, a eficiência de quimioexcitação é muito maior (10^6 vezes maior) e portanto quase quantitativa (Vidigal-Martinelli, 1979).

4.3. Ácido Desoxirribonucleico e Oxigênio Singlete

Reiss e col. (1972) caracterizaram os complexos amino-imino-propeno na reação de M.A. com DNA de timo de bezerro. Com duas horas de incubação, há uma absorção de aproximadamente 0,04 atribuída ao produto DNA-M.A. em 325 nm (Reiss e col., 1972).

Com a iluminação de DNA de timo de bezerro na presença de hematoporfirina resulta a destruição seletiva de resíduos guanina; este efeito é dependente da concentração de hematoporfirina e não foi observado quando o DNA foi incubado com hematoporfirina no escuro (ou quando iluminado na ausência desta). O tratamento de luz de DNA na presença de hematoporfirina resultou na mudança do pico máximo de absorção de 257,5 nm para 260 nm, e isto está de acordo com uma degradação específica do resíduo guanina do DNA (das quatro bases, a guanina é a que apresenta absorção máxima mais baixa, Gutter e col., 1977).

Neste trabalho estudou-se primeiramente o efeito de DNA de tимо de bezerro sobre a quimiluminescência do sistema, observando-se a queda da emissão (Fig. 3.26). O tratamento Stern-Volmer para supressão da emissão por DNA (concentração por nucleotídeo) mostra um valor de τ de $9,0 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ e um valor de $1,1 \times 10^{-3} \text{ M}$ para β , ou seja, um valor 6 vezes mais eficiente que a guanosina livre em solução (Tab. 3.1). Isto está de acordo com a importância de uma estrutura fixa para que os efeitos sejam maiores e mais eficientes.

Pensou-se então que oxigênio singlete gerado enzimaticamente poderia estar atacando uma das bases constituintes do DNA. Tentou-se trabalhar com o método de fluorescência, através da complexação de DNA de tимо de bezerro com proflavina, mas não foram obtidos resultados satisfatórios.

Usou-se então o método de absorção; o trabalho foi feito com DNA de E.coli sem sofrer desnaturação, desnaturado e depois tratado e, tratado e depois desnaturado (Fig. 3.29, Fig. 3.30, Fig. 3.31). Em todos os casos foi observado a presença de um ombro com tendência a formar um pico em 260 nm, porém este deslocava-se para 254,5 nm. Foi feito então o estudo da formação do complexo DNA-M.A. dentro das mesmas condições em que DNA de E.coli foi tratado com $^1\text{O}_2$ gerado no sistema.

Este composto, provavelmente, possui a mesma estrutura amino-imino-propeno observada por Chio e Tappel (1969), e apresenta um pico de absorção máxima em 254,5 nm e não em 257,5 nm, que seria o esperado caso DNA houvesse sido precipitado sem sofrer alteração (Fig. 3.29, Fig. 3.30, Fig. 3.31). Observou-se inclusive, em duas horas de reação, uma absorção de 0,08 em 325 nm, um pouco maior que a observada por Reiss e col. (1972) e que, segundo estes pesquisadores, corresponde à estrutura amino-imino-propeno.

Foi feito então a irradiação de DNA de E.coli na presença de hematoporfirina. Há evidências de que a hematoporfirina exerce sua ação fotossensibilizante sobre células vivas através da produção de oxigênio singlete (Weishaupt e col., 1976 ; Moan e col. 1979).

Observaram-se os mesmos resultados obtidos por Gutter e col. (1977) no espectro de absorção de DNA e E. coli irradiado na ausência e na presença de hematoporfirina (fig. 3.29, Fig. 3.30 e Fig. 3.31). O DNA foi desnaturado antes de sofrer o processo de irradiação porque Gutter e col. observaram que assim os efeitos eram mais acentuados.

O pico máximo de DNA de E.coli na ausência de hematoporfirina ocorreu em 257,5 nm e, na presença desta em 260 nm, havendo um deslocamento de 2,5 nm; isto indica que possivelmente a guanina foi destruída.

Chegou-se então à conclusão de que, no tratamento de DNA com $^1\text{O}_2$ gerado enzimaticamente, observava-se a somatória de dois efeitos: a formação da estrutura amino-imino-propeno com deslocamento do pico para 254,5 nm (antes de DNA ser isolado dos constituintes do sistema, fica duas horas em contato com M.A.) e o ataque de $^1\text{O}_2$ sobre DNA destruindo possivelmente a guanina.

Observando-se mais atentamente as Fig. 3.29, Fig.3,30 e Fig. 3.31, verifica-se que a acentuação do ombro faz-se na seguinte ordem: desnaturado e depois tratado - sem sofrer desnaturação - tratado e depois desnaturado.

Isto provavelmente indique que a reação $^1\text{O}_2$ - guanina deva ocorrer com maior probabilidade quando guanina está numa posição preferencial, que é adquirida quando DNA está na forma de dupla hélice. Em fita simples, além da reação $^1\text{O}_2$ - guanina ocorrer com menor probabilidade, provavelmente a estrutura amino-imino-propeno ocorra mais facilmente, uma vez que não há pontes de hidrogênio entre as duas fitas para serem rompidas.

Para melhor detecção de qual base $^1\text{O}_2$ estaria atacando, utilizou-se a fluorescência do cátion lantanídeo Tb^{+3} , que apresenta dois picos máximos característicos em 488 e 545 nm no espectro de emissão fluorescente; usou-se este artifício porque a fluorescência de ácidos nucleicos e purinas, pirimidinas e nucleosídeos na investigação de suas propriedades biológicas, tem sido quase limitada (Ringer e col., 1978). Isto acontece porque dentro de um pH fisiológico (intervalo de 5 a 9), e em temperatura ambiente, os elétrons excitados de ácidos nucleicos em solução aquosa seguem um passo de decaimento não radiativo rápido para seus estados fundamentais e não emitem níveis significativamente de fluorescência (Udenfriend e Zaltzman, 1962; Borrensen, 1963).

A fluorescência de Tb^{+3} excitado em 290 nm é aumentada quando complexado com DNA ou RNA, comparando-se com a fluorescência gerada sozinha por Tb^{+3} em 10 μM . Estudando-se o aumento da fluorescência de Tb^{+3} ao nível de nucleotídeos (uma vez que nem guanosina nem desoxiguanosina aumentam a fluorescência do Tb^{+3}), encontrou-se que guanina nucleotídeo aumenta a fluorescência de Tb^{+3} trezentas vezes ou mais que adenina, uracila, citosina e timina nucleotídeo (Ringer e col., 1978; Formoso, 1973).

Portanto, o aumento de fluorescência de Tb^{+3} parece ser uma prova segura para detectar resíduos guanina em ácidos nucleicos.

No trabalho de Tb^{+3} complexado com DNA nativo houve aumento de sua fluorescência, indicando que havia ocorrido a complexação Tb^{+3} -DNA. Quando complexado com DNA tratado no sistema (sob o efeito de oxigênio singlete gerado enzimaticamente) diminuiu a intensidade de fluorescência, mas ainda era maior que com DNA nativo. Isto implica que parte da guanina nucleotídeo foi destruída diminuindo a concentração do complexo Tb^{+3} -DNA (Fig. 3.32).

4.4. Oxigênio Singlete e proteínas

As enzimas expostas à luz visível, na presença de oxigênio e um corante sensibilizador, perde atividade catalítica devido a foto-oxidação de resíduos de aminoácidos susceptíveis incluindo histidina, triptofano, tirosina, metionina e cisteína (Spikes, 1968; Spikes e Livingston, 1969).

A perda da atividade enzimática durante o tratamento fotodinâmico pode ocorrer não somente por alteração química de cadeias laterais de aminoácidos localizados no sítio ativo da enzima, mas também pela destruição de resíduos de aminoácidos essenciais para a manutenção da conformação nativa (Hopkins e Spikes, 1970).

Neste trabalho, a lisozima foi tratada na presença de oxigênio singlete gerado enzimaticamente no sistema M.A./Mn⁺²/HRP/O₂ obtendo-se, por análise de aminoácidos, que houve perda de triptofano e metionina, nada ocorrendo com histidina ou com os outros aminoácidos analisados (Tab. 3.3). Houve total perda de atividade, indicando que, possivelmente os triptofanos atingidos estavam no sítio ativo da enzima, ou então ocorreu mudança conformacional da mesma (pois metionina também sofreu ação de oxigênio singlete); é também possível que a perda da atividade catalítica se deva a ambos os efeitos.

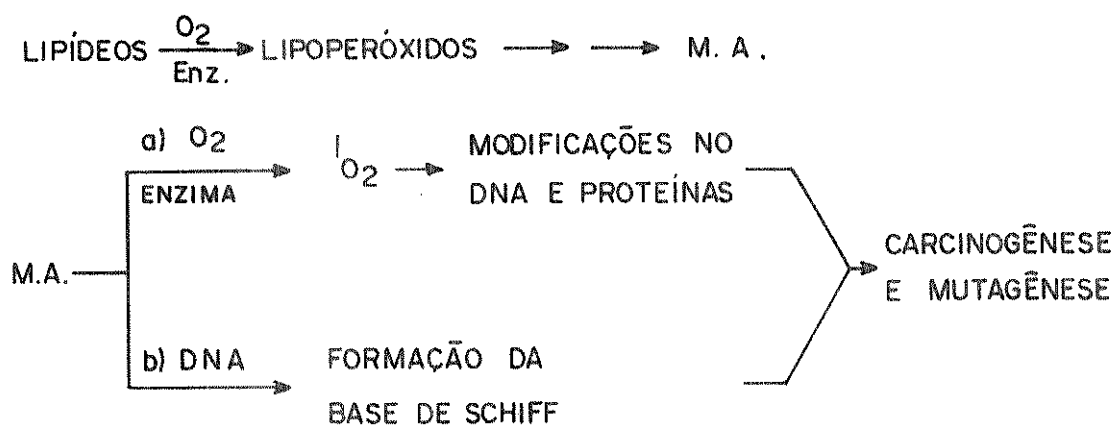
4.5. Conclusões Gerais

O Malonaldeído oxidado por O₂ na presença de HRP gera oxigênio singlete, possivelmente no estado (¹Δg ¹Δg) e este por sua vez pode causar danos em DNA e proteínas in vitro.

In vivo tem-se verificado que M.A. inicia carcinogênese de pele em ratos (Mukai e Goldstein, 1976). O padrão de mutage

nicidade específica demonstrado por M.A. é semelhante a atividade de mutagênica de Mitomicina C, um antibiótico bifuncional e que é um agente de reticulação em DNA (Mukai e Goldestein, 1976).

Propõe-se então que mutagênese e carcinogênese causada por M.A., um produto da peroxidação lipídica, possa ser devido à somatória de dois efeitos: reticulação dos grupos amino de DNA, presumivelmente através da formação de bases de Schiff (Brooks e Klammerth, 1968; Reiss e col., 1972) e ação de oxigênio singlete ($^1\Delta_g$ $^1\Delta_g$) sobre as bases do DNA e proteínas que se encontram nas células.



ESQUEMA 4.1
CARCINOGENESE E MUTAGENESE DO M.A.

Possivelmente, o passo a (Esquema 4.1) seja mais rápido do dado que, in vitro a produção máxima de 1O_2 ocorre aproximadamente em dois minutos, enquanto que no passo b, a formação da base de Schiff foi detectada com um tempo de duas horas de incubação de M.A.-DNA.

CAPÍTULO 5

5. APÊNDICES

5.1. Apêndice 1 (Turro, 1967)

5.1.1. Cálculo de τ (tempo de meia vida da espécie excita da

Processo		Velocidade
Absorção	$D_o + h\nu \xrightarrow{I_a} D^*$	I_a (Einstein/lxseg)
Emissão	$D^* \xrightarrow{k_1} D_o + h\nu$	$k_1 [D^*]$
Aniquilação	$D^* + A_o \xrightarrow{K_2} D_o + A^*$	$k_2 [D^*] [A_o]$
Desativação	$D^* \xrightarrow{k_3} D_o + \text{calor}$	$k_3 [D^*]$

$$\frac{d[D^*]}{dt} = I_a - (k_1 [D^*] + k_2 [D^*] [A_o] + k_3 [D^*])$$

num estado estacionário

$$I_a = (k_1 + k_2 [A_o] + k_3) [D^*]$$

Sendo ϕ_o a eficiência quântica para emissão de D^* , na ausência de A

$$\phi_o = \frac{k_1 [D^*]}{k_1 [D^*] + k_3 [D^*]} = \frac{k_1}{k_1 + k_3} \quad e$$

ϕ_A a eficiência quântica para emissão de D^* , na presença de A.

$$\phi_A = \frac{k_1 [D^*]}{k_1 [D^*] + k_2 [D^*] [A_o] + k_3 [D^*]} = \frac{k_1}{k_1 + k_2 [A_o] + k_3}$$

fazendo-se $\frac{\phi_o}{\phi_A}$, obtêm-se

$$\frac{\phi_o}{\phi_A} = \frac{k_1 + k_2 [A_o] + k_3}{k_1 + k_3} = \frac{k_1 + k_3}{k_1 + k_3} + \frac{k_2}{k_1 + k_3} [A_o]$$

$$\frac{\phi_o}{\phi_A} = 1 + k_2 \tau [A_o] \quad \text{Equação de Stern-Volmer} \quad (\text{Equação 5.1})$$

onde τ , tempo que uma fração de moléculas num estado excitado leva para decair 1/e do valor inicial

$$\ln \frac{1}{e} = -(k_1 + k_3) \tau$$

$$\tau = \frac{1}{k_1 + k_3}$$

Traçando-se um gráfico de ϕ_o/ϕ_A em função de $[A_o]$ obtêm-se uma reta com intercessão em ϕ_o/ϕ_A de 1 com inclinação igual a $k_2 \tau$.

Neste trabalho, analogamente, ϕ_o/ϕ_A foi substituído por I_o/I_Q onde I_o é a intensidade máxima de emissão na ausência de um inibidor e I_Q é a intensidade máxima de emissão na presença de um inibidor.

$$\text{inclinação} = k_2 \tau$$

$$\tau = \frac{\text{inclinação}}{k_2}, \text{ onde } k_2 \text{ é a constante de inibição.}$$

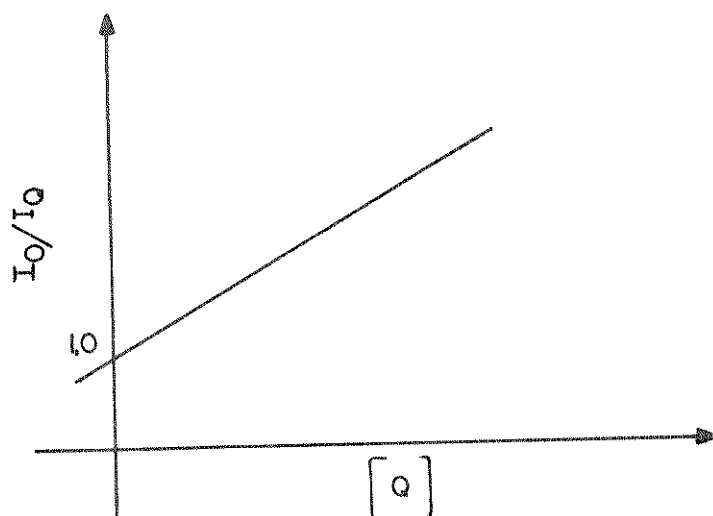


FIG. 5.1- ANALISE STERN-VOLMER PARA INIBIDORES DE ESPÉCIE EXCITADA

5.1.2. Cálculo de β (concentração do supressor que inibe metade da concentração da espécie emissiva)

Tomando-se a equação de Stern-Volmer

$$\frac{\phi_o}{\phi_A} = 1 + k_2 \tau [A_o]$$

Considere que $[A_o]_{1/2}$ como a concentração de A que reduz ϕ_o para a metade de seu valor inicial (ou o valor de β).

$$\frac{\phi_o}{\phi_A} = \frac{1}{0,5} = 1 + k_2 \tau [A_o]_{1/2}$$

$$[A_o]_{1/2} = \frac{1}{k_2 \tau}$$

$$\beta = \frac{1}{k_2 \tau} \quad \text{ou}$$

(Equação 5.2)

β é o inverso da inclinação da reta obtida pelo gráfico Stern-Volmer. Ou então, pelo método duplo-recíproco:

$$\phi_o = \frac{k_1}{k_1 + k_3} \qquad \phi_A = \frac{k_1}{k_1 + k_2 [A_o] + k_3}$$

$$\phi_o - \phi_A = \frac{k_1}{k_1 + k_3} - \frac{k_1}{k_1 + k_2 [A_o] + k_3}$$

$$\phi_o - \phi_A = \frac{k_1(k_1 + k_2 [A_o] + k_3) - k_1(k_1 + k_3)}{(k_1 + k_3)(k_1 + k_2 [A_o] + k_3)}$$

$$\frac{1}{\phi_o - \phi_A} = \frac{(k_1 + k_3)(k_1 + k_2 [A_o] + k_3)}{k_1(k_1 + k_2 [A_o] + k_3) - k_1(k_1 + k_3)}$$

$$= \frac{(k_1 + k_3)(k_1 + k_2 [A_o] + k_3)}{k_1[(k_1 + k_2 [A_o] + k_3) - (k_1 + k_3)]}$$

$$= \frac{(k_1 + k_3)(k_1 + k_2 [A_o] + k_3)}{k_1 \cdot k_2 [A_o]}$$

$$= \frac{k_1^2 + k_1 k_2 [A_o] + 2k_1 k_3 + k_2 k_3 [A_o] + k_3^2}{k_1 k_2 [A_o]}$$

$$= 1 + \frac{k_3}{k_1} + \frac{k_1}{k_2} \frac{1}{[A_o]} + \frac{2k_3}{k_2} \frac{1}{[A_o]} + \frac{k_3^2}{k_1 k_2} \frac{1}{[A_o]}$$

$$= 1 + \frac{k_3}{k_1} + \left(\frac{k_1}{k_2} + \frac{2k_3}{k_2} + \frac{k_3^2}{k_1 k_2} \right) \frac{1}{[A_o]}$$

$$= 1 + \frac{k_3}{k_1} + \left(\frac{k_1^2 + 2k_1 k_3 + k_3^2}{k_1 k_2} \right) \frac{1}{[A_o]}$$

$$\frac{1}{\phi_o - \phi_A} = 1 + \frac{k_3}{k_1} + \left(\frac{(k_1 + k_3)^2}{k_1 k_2} \right) \frac{1}{[A_o]}$$

Neste trabalho, analogamente, $1/\phi_0 - \phi_A$ foi substituído por $1/I_0 - I_Q$.

$$\text{inclinação} = \frac{(k_1 + k_3)^2}{k_1 k_2}$$

$$\text{intercessão} = 1 + \frac{k_3}{k_1} = \frac{k_1 + k_3}{k_1}$$

fazendo-se inclinação/intercessão, obtém-se

$$\frac{(k_1 + k_3)^2}{k_1 k_2} \times \frac{k_1}{k_1 + k_3} = \frac{k_1 + k_3}{k_2}$$

$$\beta = \frac{k_1 + k_3}{k_2}$$

(Equação 5.3)

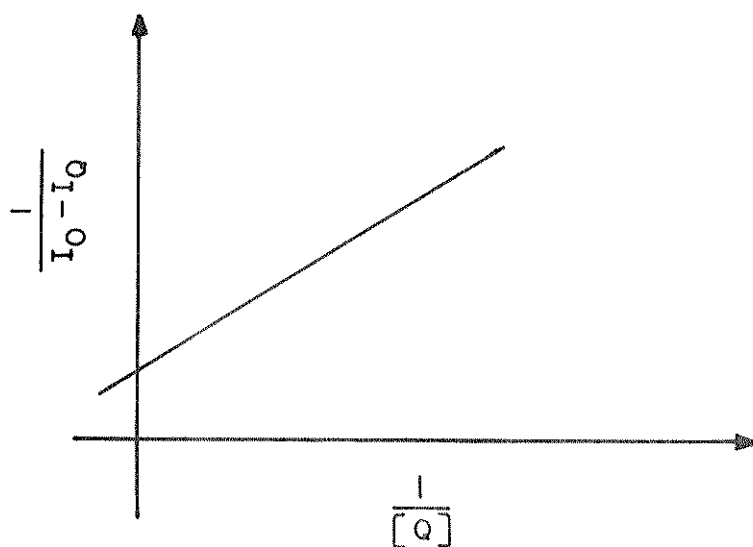


FIG. 5.2- ANÁLISE DUPLO-RECÍPROCO PARA INIBIDORES DE ESPÉCIE EXCITADA

5.2. Apêndice 2 (Lehninger, 1970)

5.2.1. Equação de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk

Equação de Michaelis-Menten



E = enzima; S = substrato; ES = complexo enzima-substrato; k_1, k_2, k_3, k_4 , constantes de velocidades específicas para as reações designadas.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 ([E] - [ES] [S]) \quad (3)$$

onde $d[ES]/dt$ é a velocidade de formação de ES a partir de E + S; $[E]$ é a concentração total da enzima (enzima livre + enzima combinada), $[ES]$ concentração do complexo enzima-substrato, $[E] - [ES]$ representa a concentração da enzima livre ou não combinada, $[S]$ é a concentração do substrato que é maior que $[E]$ (a quantidade de S ligado a E é desprezível quando comparável à S).

A velocidade de formação de ES a partir de E+P é muito pequena, e portanto, desprezível.

$$- \frac{d[ES]}{dt} = k_2 [ES] + k_3 [ES] \quad (4)$$

onde $-d[ES]/dt$ é a velocidade de quebra de ES.

Quando o sistema de reação está num estado estacionário com a concentração de ES permanecendo constante.

$$k_1 ([E] - [ES]) [S] = k_2 [ES] + k_3 [ES] \quad (5)$$

Rearranjando a expressão tem-se

$$\frac{[S] ([E] - [ES])}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m \quad (6)$$

onde K_m é chamada de constante de Michaelis-Menten.

A concentração no estado estacionário do complexo ES é

$$[ES] K_m = [S] [E] - [S] [ES]$$

$$[ES] K_m + [ES] [S] = [S] [E]$$

$$[ES] (K_m + [S]) = [S] [E]$$

$$[ES] = \frac{[S] [E]}{K_m + [S]} \quad (7)$$

Uma vez que a velocidade inicial v de uma reação enzimática é proporcional à concentração do complexo ES, pode-se escrever

$$v = k_3 [ES] \quad (8)$$

Quando a concentração de substrato é tão alta que, essencialmente, toda a enzima no sistema está presente como complexo ES, alcança-se a velocidade máxima $V_{m\acute{a}x}$.

$$V_{m\acute{a}x} = k_3 [E] \quad (9)$$

Substituindo-se o valor de $[ES]$ da equação (7) na equação (8) tem-se:

$$v = k_3 \frac{[S] [E]}{K_m + [S]} \quad (10)$$

dividindo-se a equação (10) pela (9) tem-se

$$\frac{v}{V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}} = \frac{k_3 \frac{[S] [E]}{K_m + [S]}}{k_3 [E]} \quad \text{e}$$

$$v = \frac{V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equação de Michaelis-Menten} \quad (\text{Equação 5.4})$$

A equação de Michaelis-Menten define a relação quantitativa entre a velocidade de reação da enzima v e a concentração do substrato $[S]$ se $V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}$ e K_m são conhecidos.

$$\text{Se } v = \frac{1}{2} V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}, \text{ tem-se que}$$

$$\frac{V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}}{2} = \frac{V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}} [S]}{K_m + [S]}$$

dividindo-se por $V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}$ obtém-se:

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$K_m + [S] = 2 [S]$$

$$K_m = [S]$$

Portanto, K_m é igual à concentração do substrato quando a velocidade de reação da enzima é metade da velocidade máxima; as dimensões de K_m são moles litro⁻¹.

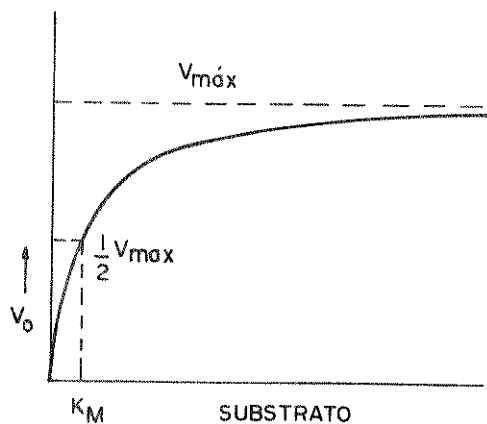


FIG 5.3 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO SOBRE A VELOCIDADE DE UMA REAÇÃO CATALIZADA POR ENZIMA (Lehninger, 1970)

5.2.2. Equação de Lineweaver-Burk

É uma das transformações da equação de Michaelis-Menten.

Toma-se o recíproco de equação de Michaelis-Menten.

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{m\acute{a}x} [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x} [S]} + \frac{[S]}{V_{m\acute{a}x} [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad \text{Equação de Lineweaver-Burk}$$

(Equação 5.5)

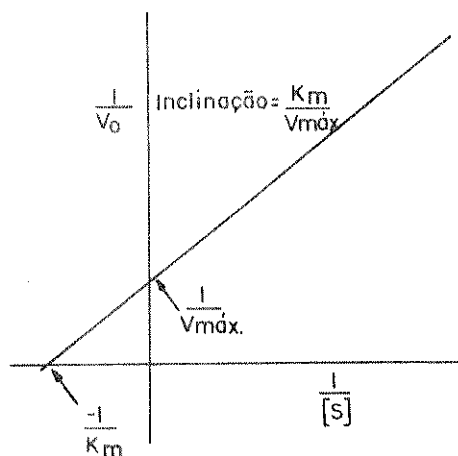


FIG. 5.4 - UM GRAFICO DUPLO-RECIPROCO
(Lehninger, 1970)

5.3. Apêndice 3 (Robinson e Cooper, 1970)

5.3.1. Cálculo da velocidade de consumo de oxigênio

A concentração inicial de oxigênio no meio reacional após 10 segundos de reação foi de 200 nmoles/ml (Robinson e Cooper, 1970) e a partir disto, foram calculadas as velocidades de consumo de oxigênio através da relação:

$$\begin{array}{ccc}
 200 \text{ nmoles } O_2/\text{ml}/10 \text{ seg} & \longrightarrow & 100\% \text{ de consumo de } O_2 \\
 \underline{w} & \longrightarrow & \underline{y} \\
 \underline{w} = \frac{200 \text{ nmoles } O_2/\text{ml}/10 \text{ seg}}{100\%} \times \underline{y}
 \end{array}$$

onde $\underline{y}$ é a porcentagem de consumo de O_2 obtidos pela curva de consumo de O_2 e $\underline{w}$ é a velocidade de consumo de O_2 .

BIBLIOGRAFIA

- Ackerman, R.A., J.N. Pitts, Jr., e R.P. Steer (1970), J. Chem. Phys., 52, 1603.
- Ambe, K.S. e A.L. Tappel (1961), J. Food Sci., 26, 448.
- Andreone, T.L. e C.E. Willis (1973), J. Natl. Cancer Inst., 53, 1771.
- Arneson, R.M. (1970), Arch. Biochem. Biophys., 136, 352.
- Balny, C. e P. Douzou (1974), Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 386.
- Bartlett, P.D. (1976), Chem. Soc. Rev., 5, 149.
- Bartlett, P.D. e A.P. Schaap (1970), J. Am. Chem. Soc., 92, 3223.
- Bechara, E.J.H., O.M.M. Faria Oliveira, N. Durán, R. Casadei de Baptista e G. Cilento (1979), Photochem. Photobiol., 30, 101.
- Bellus, D. (1979), Adv. Photochem., 17, 105.
- Benassi, C.A., E. Scoffone, O. Caliazzo e G. Jori (1967), Photochem. Photobiol., 6, 857.
- Bergsma, D.D., Y.Y. Hsia e C. Jackson (1970), (Eds.), "Bilirrubin Metabolism in the Newborn" Williams, e Silkins, Baltimore, Maryland.
- Bland, J. (1976), J. Chem. Educ., 53, 274.
- Bonnett, R. e J.C.M. Stewart (1972 a), J. Chem. Soc. Chem Commun., 596.
- Bonnett, R. e J.C.M. Stewart (1972 b), Biochem. J. 130, 895.
- Borrensen, H.C. (1963), Acta Chem. Scand., 17, 921.
- Brooks, B.R. e D. L. Klameth (1968); Eur. J. Biochem., 5, 178.
- Burger, R.M.A.R. Berkowtz, J. Peisach e S.B. Horwitz; (1980), J. Biol. Chem., 255, 11832.

- Cadet, J. e R. Teoule (1978); Photochem. Photobiol., 28, 661.
- Cadet, J. e R. Teoule (1973); J. Chromatogr., 76, 407.
- Calvert, J.G. e J.N. Pitts, Jr. (1966), "Photochemistry", Wiley, N. York.
- Chio, K.S. e A.L. Tappel (1969), Biochemistry, 8, 2821.
- Churakova, N.I., N.A. Kravchencho, E.P. Serebryakov, I.A. Lavrov e E.D. Kaversneva (1973), Photochem. Photobiol., 18, 201.
- Cilento, G. (1980 a), Photochem. Photobiol. Rev., 5, 199.
- Cilento, G. (1980 b), Acc. Chem. Res., 13, 225.
- Cilento, G., K. Zinner, E.J. H. Bechara, N. Durán, R.C. Baptista, Y. Shimizy, O. Augusto, A. Feljoni-Alário, C.C.C. Vidigal, O. M.M. Faria Oliveira e M. Haun (1979), Ciência e Cultura, 31, 290.
- Clements, A.H., R.H. Van den Engh, D.J. Frost, K. Hougenhout e J. R. Nooi (1973), J. Am. Oil Chem. Soc., 50, 325.
- Cobern, D., J.S. Hoobs, R.A. Lucas e D.J. MacKenzie (1966), J. Chem. Soc., C, 1897.
- Cremer, R.J., P.W. Perryman e D.H. Richards (1957), Lancet, 1, 1094.
- Cruser, S.A. e A.J. Bard (1969), J. Am. Chem. Soc., 91, 267.
- Dalton, J.C. e N.J. Turro (1970), Mol. Photochem., 2, 133.
- Debey, P. e P. Douzou (1970), Israel J. Chem., 8, 115.
- De Mello, M.P., S.M. de Toledo, M. Haun, G. Cilento e N. Durán (1980), Biochemistry, 19, 5270.
- De Mol, N.J. e G.M.J.B. van Henegouwen (1979), Photochem. Photobiol. 30, 331.
- Dowty, B.J.L. Laseter, G.W. Griffin, I.R. Politzer e C.H. Walkinshaw (1973), Science, 181, 669.
- Dunford, H.B. e J.S. Stillman (1976), Coord. Chem. Rev., 19, 187.

- Durán, N. (1982), em "Excited States Generation in Chemical and Biological System", (W. Adam. e G. Cilento, Eds.), Academic Press, N. Y., no prelo .
- Durán, N. e A. Faljoni (1978), Biochem. Biophys. Res. Commun., 83, 287.
- Durán, N., M. Haun e J.E. Brunet (1981), Rev. Latinoam. Quim., 12, 1.
- Durán, N., O.M.M. Faria Oliveira, M. Haun e G. Cilento (1977), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 13, 442.
- Durán, N., S.T. Farias-Furtado, M.P. de Mello, L.H. Innocentini , S.M. de Toledo, A. Campa e J.E. Brunet (1981), submetido a Photochem. Photobiol.
- Eichhorn, G.L. e J.J. Butzow (1965), Biopolymers, 3, 79.
- Faljoni, A., M. Haun, M.E. Hoffmann, R. Meneghini, N. Durán e G. Cilento (1978), Biochem. Biophys. Res. Commun., 80, 490.
- Faria Oliveira, O.M.M., M. Haun, N. Durán, P.J. O'Brien, C.R. O'Brien, E.J.H. Bechara e G. Cilento (1978), J. Biol. Chem., 253, 4707.
- Felber, T.D., E.B. Smith, J.M. Knox, C. Wallis, e J.L. Melnick (1973), J. Am. Med. Ass., 223, 289.
- Fogelman, A.M., I. Shechter, J. Seager, M. Hokom, J.S. Child e P. A. Edwards (1980), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 77, 2214
- Foote, C.S. (1979), em "Singlet Oxygen" (editado por H.H. Wasserman e R.W. Murray), 139, Academic Press Inc. N. York.
- Foote, C.S. (1978), em "Singlet Oxygen Reactions with Organic Compounds e Polymers" (editado por B. Ranby e J. F. Rabek), 135, A. Wiley-Interscience Publication by John Wiley e Sons, N. York.
- Foote, C.S. (1976), em "Free Radical in Biology" (W. A. Pryor Ed.) 85, Academic Press, N. York.
- Foote, C.S. (1972) em "Particulate Polycyclic Organic Matter", Committee on Biologic Effects of Atmospheric Pollutants, 63 , Nat. Acad. of Sci., Washington, D.C.

- Foote, C.S. (1968), *Science*, 162, 963.
- Foote, C.S. e T.Y. Ching (1975), *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 6209.
- Foote, C.S. e R.W. Denny (1968), *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 6233.
- Foote, C.S. e J.W.P. Lin (1967), *Tetrahedron Lett*, 3267.
- Foote, C.S. e J.W. Peters (1971), *Chem. Soc.*, 93, 3795.
- Foote, C.S., A. Dzakpasu e J.W.-P. Lin (1975), *Tetrahedron Lett*, 1247.
- Foote, C.S., R.W. Denny, L. Weaver, Y. Chang e J. Peter (1970), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 171, 139.
- Foote, C.S., M.T. Wuesthoff, S. Wexler, I. Ge. Burtain, R. Denny, G.O. Schenck e K.H. Schulte-Elte (1967), *Tetrahedron*, 23, 2583.
- Formoso, C. (1973), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 53, 1084.
- Galiazzo, G., G. Jori e E. Scoffone (1972), em "Research Progress in Organic, Biological, e Medicinal Chemistry", Vol. III, 124, Am. Elsevier, Holanda.
- Galiazzo, G., G. Jori e E. Scoffone (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 31, 158.
- Gardner, H.W., *J. Agric. Fd. Chem.*, (1979), 27, 220.
- George, P., e L.J. Lyster (1958), *Biochemistry*, 44, 1013.
- Glad. B.W. e J.D. Spikes (1966), *Radiat. Res.*, 27, 237.
- Goda, K.J.,-W. Chu, T. Kimura e A.P. Schaap (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 52, 1300.
- Goldstein, B.C. e L.C. Harber (1972), *J. Clin. Invest.* 51, 892.
- Gollnick, K., (1968), *Advan. Photochem.* 6, 1.
- Gollnick, K., e H.J. Kuhn (1979), em "Singlet Oxygen", (editado por H.H. Wasserman e R.W. Murray), 287, Academic Press, N.York.
- Gollnick, K., e J.H.E. Lindner (1973), *Tetrahedron Lett*, 1903.

- Gomori, G., (1969), *Methods Enzymol.*, 1, 138.
- Grabowski, E.J. e R.L. Autrey (1969), *Tetrahedron*, 25, 4315.
- Grams, G.W. e K. Eskins (1972), *Biochemistry*, 11, 606.
- Grams, G.W. e G.E. Inglett (1972), *Lipids*, 7, 442.
- Grams, G.W., K. Eskins e G.E. Inglett (1973), *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 866.
- Guillo, L.A. e N. Durán (1980), *Arq. Biol. Tecnol.*, 23, 165.
- Gutter, B., W.T. Speck e H.S. Rosenkranz (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, 475, 307.
- Haber, S.L. e R.W. Wissler (1962), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111, 774.
- Hall, G.E. e D.G. Roberts (1966), *J. Chem. Soc.*, 8, 1109.
- Halliwell, B. (1981) *Bull. Europ. Physiopath. Resp.* 17, 21.
- Hastings, J.W. (1975), em "Energy Transformation in Biological System", CIBA Foundation Symposium, 31, pag. 125, Elsevier, Ed. Amsterdam, Holanda.
- Hastings, J.W. e T. Wilson (1976), *Photochem. Photobiol.*, 23, 461.
- Haun, M. (1979), Tese de Doutorado, Inst. de Química da USP.
- Haun, M., N. Durán, O. Augusto, e G. Cilento (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, 200, 245.
- Heller, A. e E. Wasserman, (1965), *J. Chem. Phys.*, 42, 949.
- Hercules, D.M. (1969), *Acc. Chem. Res.*, 2, 301.
- Hopkins, T.R. e J.D. Spikes (1970) *Photochem. Photobiol.*, 12, 175.
- Hsu, J., B.D. Goldstein e L.C. Harber, (1971), *Photochem. Photobiol.* 13, 67.
- Howard, J.A. e K.U. Ingold (1968), *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 1056.

- Huheey, J.E. (1972), "Inorganic Chemistry - principles of Structure and Reactivity", 110, Harper e Row. Publishers, N. York.
- Jefford, C.W. e A.F. Boschung, T.A.B.M. Bolsman, R.M. Moriarty e B. Melnick (1976), J. Am. Chem. Soc., 98, 1017.
- Johns, H.E. e A. M. Rauth (1965), Photochem. Photobiol., 4, 673.
- Jollès, P. (1964), Angew. Chem., 76, 20.
- Jori, G., G. Galiazzo, A. Marzotto e E. Scoffone (1968), J. Biol. Chem. 243, 4272.
- Kajiwarara, T. e D.R. Kearns (1973), J. Am. Chem. Soc., 95, 5886.
- Kawaoka, K., A.U. Khan e D.R. Kearns (1967), J. Chem. Phys., 46, 1842.
- Kearns, D.R. (1971), Chem. Rev., 71, 395.
- Keilin, D. e T. Mann (1937), Proc. Roy. Soc. Ser. B, 122, 119.
- Kellogg, E.W. e I. Fridovich (1975), em "Oxygen Free Radicals and Tissue Damage", (CIBA Foundation Symposium 65 (Novas séries) - Excerpta Medica in Amsterdam), 228.
- Kepka, A.G. e L.I. Grossweiner (1973), Photochem. Photobiol., 18, 49.
- Kepka, A.G. e L.I. Grossweiner (1972), Photochem. Photobiol., 14, 621.
- Khan, A.U. (1970), Science, 168, 476.
- Khan, A.U. (1976), J. Phys. Chem. 80, 2219.
- King, M.M., E.K. Lai e P.B. McCay (1975), J. Biol. Chem., 250, 6496.
- Kopecky, K.R., e C. Mumford (1969), Can. J. Chem., 47, 1103.
- Krinsky, N.I. (1977), TIBS, 35.
- Kubinsky, H., M.A. Strangstalin, W.M. Baird, e R.K. Bountwell (1973), Can. Res. 33, 3103.

- Kulig, M.J. e L.L. Smith (1973), J. Org. Chem., 38, 3639.
- Kurechi, T., K. Kikugawa e M. Ozawa (1980), Food Cosmet. Toxicol., 18, 119.
- Kurechi, T., e K. Kikugawa (1979), J. Food Sci., 44, 1263.
- Kwon, T.W. e H.S. Olcott, (1966 a), J. Food Sci. 31, 552.
- Kwon, T.W. e H.S. Olcott, (1966 b), Nature, 210, 214.
- Lamola, A.A., e M.J. Turro (1977), em "The Sciences of Photobiology", 62, (K.C. Smith Ed.) Plenum Press.
- Lamola, A.A., T. Yamane, e A.M. Trozzolo; (1973), Science, 179 1131.
- Lee, D.M. (1980), Biochem. Biophys. Res. Commun 95, 1663.
- Leermakers, P.A. (1969), em "Energy Transfer and Organic Photochemistry", (P.A. Leermakers e T.R. Evans Eds.), 1, Intersc. Publ. N. York.
- Lehninger, A.L. (1970), "Biochemistry", 153, Worth Publishers, Inc.
- Lehninger, A.L. (1976), "Bioquímica", vol. 1, 126 e 212, tradução da 2a. edição americana, supervisão J. R. Magalhães. São Paulo, Edgard Blücher.
- Lighmer, P.A. e G.B. Quistad (1972), FEBS Lett, 25, 94.
- Livingston, R. (1961), em "Autoxidation and Antioxidants", (W.O. Lundberg, ed.) Vol. 1, 249, Wiley, N. York.
- McCapra, F. (1970), Pure Appl. Chem., 24, 611.
- McDonagh, A.F. (1971), Biochem. Biophys., Res. Commun, 44, 1306.
- McDonagh, A.F., L.A. Palma e D.A. Lightner (1980), Science, 208, 145.
- Magnus, I.A.A., A. Jarret, T.A.J. Prankad, e C. Rimington (1961), Lancet, 2, 448.
- Malhotra, S.S., e M.C. Whiting (1960), J. Chem. Soc., 3812.

- Marmur, J. (1961), J. Mol. Biol., 3, 208.
- Marnett, L.J. e M.A. Tuttle, (1980), Cancer Res., 40, 276.
- Matheson, I.B.C., R.D. Etheridge, N.R. Kratowich e J. Lee (1975), Photochem. Photobiol., 21, 165.
- Matsubara, H. e R.M. Sasaki (1969), Biochem. Biophys. Res. Commun, 35, 175.
- Matsuura, T.I., I. Saito e S. Kato, (1972), em "The Purines - Theory and Experiment" (Editado por F.D. Bergmann e B. Pullman), Vol. IV, 418, The Israel Acad., Sci. and Humanities, Jerusalem.
- Mayeda, E.A. e A.J. Bard (1974), J. Am. Chem. Soc., 96, 4023.
- Mayeda, E.A. e A.J. Bard (1973), J. Am. Chem. Soc., 95, 6223.
- Merkel, P.B., R. Wilsson, D.R. Kearns (1972), J. Am. Chem. Soc., 94, 1030.
- Moan, J., E. O. Pettersen, e T. Christensen (1979), Br. J. Cancer, 39, 398.
- Mottram, D.S., R.L.S. Patterson, R.A. Edwards e T.A. Gough (1977), J. Sci. Ed. Agric. 28, 1025.
- Mukai, F.H., e B.D. Goldstein (1976), Science, 191, 868.
- Munkres, O.K.D., (1976), Mech. Aging Devel., 5, 171.
- Murray, R.W. e M.L. Kaplan (1968), J. Am. Chem. Soc. 90, 537.
- Murray, R.W., W.C. Lumma e J.W. -P. Lin (1970), J. Am. Chem. Soc. 92, 3205.
- Nakajima, R., e I. Yamazaki (1979), J. Biol. Chem., 264, 872.
- Nakano, M., T. Noguchi, H. Sugioka, M. Fukuyama, M. Sato, Y. Shimizu, Y. Tsuji e H. Inaba, (1975), J. Biol. Chem., 250, 2404.
- Nickon, A., e J. F. Bagli, (1959), J. Am. Chem. Soc., 81, 6330.
- Nilsson, R., P.B. Merkel, e D.R. Kearns(1972), Photochem. Photobiol. 16, 117.

- Ouannès, C., e T. Wilson (1968), J. Am. Chem. Soc., 90, 6527.
- Packer, L., D.W. Deamer, e R.L. Heath (1967), Advan. Gerontol. Res., 2, 23.
- Piatt, J.F., A.S. Cheema, e P.J. O'Brien (1977), FEBS Lett., 74, 251.
- Politzer, I.R., G.W. Griffin, e J. Laseter, (1971), Chem., Biol. Interact, 3, 73.
- Prusik, T., T. Kolubayev, M.J. Morelli e H.C. Brenner (1980), Photochem. Photobiol., 31, 315.
- Rawls, H.R. e P.J. Van Santen (1968), Tetrahedron Lett., 1965.
- Reiss, V., A.L. Tappel, e K.S. Chio (1972), Biochem. Biophys. Res. Commun, 48, 921.
- Ringer, D.P., S. Burchett, e D.E. Kizer (1978), Biochemistry, 17, 4818.
- Robinson, J., e J.M. Cooper (1970), Anal. Biochem., 33, 390.
- Rordorf, B.F., e D.R. Kearns (1976), Biopolymers, 15, 1491.
- Rosen, H., e S.J. Klebanoff (1977); J. Biol. Chem. 252, 4803.
- Rosenkranz, P., A. Al-Ibrahim, e H. Schmidt (1978), em "Singlet Oxygen Reactions with Organic Compounds e Polymers", (editado por B. Ranby e J.F. Rabek) 195, A. Wiley - Interscience Publication by John Wiley e Sons, Ltd. N. York.
- Russell, G.A. (1957), J. Am. Chem. Soc. 79, 3871.
- Salem, L. (1976), Science, 191, 822.
- Sastry, L.A. e M.P. Gordon, (1966), Biochim. Biophys. Acta, 129, 42.
- Seely, G.R. (1977), Photochem. Photobiol., 26, 115.
- Segel, I.H., (1979), "Bioquímica; teoria e problemas", tradução de Denise Mattatia Grassiano, 342, Livros Técnicos e Científicos Editora, São Paulo.

- Schaap, A.P., A.L. Thayer, G.R. Faler, K. Goda e T. Kimura (1974), J. Am. Chem. Soc., 96, 4025.
- Schaap, A.P., K. Goda e T. Kimura (1976), "Excited States of Biological Molecules", (J.B. Birks, Ed.), 78, Wiley, N. York.
- Schaap, A.P., e P.D. Bartlett (1970), J. Am. Chem. Soc., 92, 6055.
- Schenck, G.O. e E. Koch (1960), Z. Elektrochem., 64, 170.
- Schenck, G.O. e O.A. Neumüller (1958), Justus Liebigs Ann. Chem., 618, 194.
- Schenck, G.O., K. Gollnick e O.A. Neumüller (1975), Justus Leibigs Ann. Chem., 603, 46.
- Schmidt, H., e P. Rosenkranz (1976), Z. Naturforsch, 31c, 29.
- Schmidt, H., e P. Rosenkranz (1972), Z. Naturforsch, 27 b, 1436.
- Schothorst, A.A., J. van Steveninck, L.N. Went, D. Suurmand (1970), Clin. Chim. Acta, 28, 41.
- Shamberger, R.J. (1972), J. Natl. Cancer Inst. 48, 1491.
- Shamberger, R.J. (1970), J. Natl. Cancer Inst. 44, 931.
- Shinomura, O., F.H. Johnson (1979), Photochem. Photobiol., 30, 89.
- Smith, W.F., Jr. (1972), J. Am. Chem. Soc., 94, 186.
- Smith, L.L., e M.J. Kulig (1976), J. Am. Chem. Soc., 98, 1027.
- Speck, W.T., S. Rosenkranz e H.S. Rosenkranz (1976), Biochim. Biophys. Acta. 435, 39.
- Spikes, J.D. (1968), em Photophysiology" (Edited by A.C. Giese) Vol. III, 33, Academic Press, N. York.
- Spikes, J.D. e R. Livingston (1969), Advan., Radiation Biol. 3, 29.
- Spikes, J.D., e M.L. MacKnight (1970), Ann. N. York Acad. Sci., 171, 149.
- Stauff, J. e H. Wolf (1964), Z. Naturforsch., B. 19, 87.
- Stauff, J., H. Schmidkunz e G. Hartmann (1963), Nature 198, 281.

- Summerfield, F.W., e A. L. Tappel (1981), *Anal. Biochem.*, 111, 77.
- Summerfield, F.W., e A. L. Tappel (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 82, 547.
- Sussenbach, J.S. e W. Berends (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, 76, 154.
- Theorell, H., (1941), *Enzymology*, 10, 250.
- Tomita, M., M. Iril, e T. Ukita (1969), *Biochemistry*, 8, 5149.
- Turro, N.J. (1967), em "Molecular Photochemistry", capítulo 5, 92, W.A. Benjamin, Inc. N. York.
- Udenfriend, S., P. Zaltzman (1962), *Anal. Biochem.*, 3, 49.
- Ugarova, N.N. e O.V. Lebedeva (1978), *Biokhimiya*, 43, 1731.
- Vasil'ev, R.F., (1967), *Prog. Reaction Kinetics*, 4, 305.
- Vasil'ev, R.F., (1962), *Nature*, 196, 668.
- Vidigal, C.C.C., K. Zinner, N. Durán, E.J.H. Bechara e G. Cilento (1975), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 65, 138.
- Vidigal-Martinelli, C.K. Zinner, B. Kachar, N. Durán e G. Cilento (1979), *FEBS Lett.*, 108, 266.
- Waskell, L.A., K.S. Sastry, em P. Gordon (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, 129, 49.
- Wasserman, H.H. (1970), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 171, 108.
- Wasserman, H.H., K. Stiller e M.B. Floyd (1968), *Tetrahedron Lett.*, 3277.
- Wattenberg, L.W. (1972), *J. Natl. Cancer Inst.*, 48, 1425.
- Weil, L., W.G. Gordon e A.R. Buchert (1951), *Arch. Biochem. Biophys.*, 33, 90.
- Weishaupt, K.R., C.J. Gomer e T.J. Dougherty (1976), *Cancer Res.*, 36, 2326.
- White, E.M.H., J.D. Miano, C.J. Watkins e E.J. Breaux (1974), *Angew. Chem. Int., Ed.*, 13, 229.

- Wilkinson, F. (1978) em "Singlet Oxygen - Reaction With Organic Compounds and Polymers". (Edited by B. Rauby e J.F. Rabeck), 27, John Wiley e Sons, N. York.
- Wilson, T., (1976), "Dioxetane Chemiluminescence" em "Chemical Kinetic", 265 série 2, D.R. Herschbach, Ed. MTP Int., Rev. Sci., Butter worth, Londres.
- Wilson, T., e J.W. Hastings (1970), Photophysiology, 5, 49.
- Witkop, B. (1956), Bull. Soc. Chim. Fr., 423.
- Witkop, B. e J.B. Patrick (1951), J. Am. Chem., Soc., 73, 2196.
- Woodward, R.B. e R. Hoffmann (1969), Angew. Chem. Int. Ed., 8, 781.
- Zinner, K., e Y. Shimizu (1978), Química Nova, 1, 38.

Os resultados conseguidos durante a realização deste trabalho foram referidos nas seguintes publicações e apresentações:

P U B L I C A Ç Õ E S

1. N. Durán, S.T. Farias-Furtado, M.P. de Mello, L.H. Innocentini, S.M. de Toledo, A. Campa e J.E. Brunet, "Singlet Oxygen Generation from Peroxidase Catalysed Aerobic Oxidation of Activated-CH₂-Substrates", Photochem. Photobiol., submetido.
2. S.T. Farias-Furtado e N. Durán, "Detecção de Oxigênio Singlete no Sistema Malonaldeído/Mn⁺²/Peroxidase/O₂" (resumo), Arq. Biol. Tecnol. (Brasil), 23, 163, 1980.
3. S.T. Farias-Furtado e N. Durán, "Efeito de Oxigênio Singlete Gerado Enzimaticamente sobre DNA" (resumo), Química Nova, 4, 23, 1981.
4. S.T. Farias-Furtado, L.A. Guillo e N. Durán, "Efeitos de Oxigênio Singlete Bioenergizado no DNA" (resumo), Arq. Biol. Tecnol. (Brasil), 24, 84, 1981.
5. S.T. Farias-Furtado e N. Durán, "Ação de Oxigênio Singlete gerado enzimaticamente Sobre DNA" (resumo), Química Nova, no prelo.
6. N. Durán, S.T. Farias-Furtado, M.P. de Mello, L.H. Innocentini, S.M. de Toledo e J.E. Brunet, "Geração de Oxigênio Singlete em Oxidações Aeróbicas Catalizadas pela Peroxidase" (resumo), Ciência e Cultura, 33, 797, 1981.

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

1. S.T. Farias-Furtado e N. Durán, "Detecção de Oxigênio Singlete no Sistema Malonaldeído/Peroxidase/ Mn^{+2}/O_2 ", IX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, abril 1980, Caxambu, MG, Brasil.
2. S.T. Farias-Furtado e N. Durán, "Efeito de Oxigênio Singlete Gerado Enzimaticamente Sobre DNA", II Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Química, novembro 1980, Araraquara, SP, Brasil.
3. S.T. Farias-Furtado, L.A. Guillo e N. Durán, "Efeitos de Oxigênio Singlete Bioenergizado no DNA", X Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, abril 1981, Caxambu, MG, Brasil.
4. S.T. Farias-Furtado e N. Durán, "Ação de Oxigênio Singlete gerado enzimaticamente Sobre DNA", III Encontro Regional de Química, outubro 1981, Ribeirão Preto, SP, Brasil.
5. N. Durán, S.T. Farias-Furtado, M.P. de Mello, L.H. Innocentini, S.M. de Toledo e J.E. Brunet, "Geração de Oxigênio Singlete em Oxidações Aeróbicas Catalizadas pela Peroxidase", XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, julho 1981, Salvador, Bahia, Brasil.

SEMINÁRIOS APRESENTADOS NO INSTITUTO DE QUÍMICA,
UNICAMP, GRUPO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

1. "Geração e Detecção de Oxigênio Singlete", abril-1979.
2. "Matagenicidade do Malonaldeído", outubro-1979.
3. "Detecção de Oxigênio Singlete no Sistema Malonaldeído/
 $Mn^{+2}/HRP/O_2$ ", maio-1980.
4. "Oxigênio Singlete em Sistemas Bioenergizados", outubro-
1980.