

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

4496

"OXIGÊNIO SINGLETE: GERAÇÃO, DETECÇÃO E
EFEITOS FOTO E BIOENERGIZADOS SOBRE
XANTINA-OXIDASE"

Regina Penha Fadel Riolino Gomes

Orientador: Prof. Dr. Nelson E. Durán Caballero

TESE DE MESTRADO

CAMPINAS

- 1982 -

G585o

4496/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

*Aos meus pais e irmãos
por acreditarem em mim...*

*Ao Faustinho, Natália e
Fernando, meus amores...*

*No fundo poço da infância
está o segredo do dedo mindinho
e quem dele se apossar
se apossará da Interessância :
o dom mágico de tornar,
ao todo toque de criança,
o mundo em palco, a vida em dança...*

(Siani)

Ao Nelson, que mais que orientador, foi meu amigo...

À Mari, Sônia, Lúcia, Lídia, Cristina, Luciana, Clarinha e Gastão, grandes companheiros...

À Cida e à Vanda, pelo carinho...

À Reni, pela colaboração com amostras de sangue...

Ao Camillo e à Riso, pela atenção dedicada na liofilização das amostras de Xantina-oxidase...

Ao Departamento de Bioquímica da Unicamp, por permitir o uso de sua aparelhagem...

Ao CNPq e FAPESP, pela ajuda material...

Enfim, a todos os amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho...

...meus agradecimentos.

RESUMO

Foi estudado o efeito de oxigênio singlete ($^1\Delta_g^1O_2$) na atividade catalítica de xantina-oxidase, gerado por: a) processos fotodinâmicos, usando azul de metileno e Eosina como sensibilizadores e b) processos bioenergizados, usando o sistema ácido fólico /HRP/glutathiona/catalase/ Mn^{+2}/O_2 .

Comprovou-se que xantina-oxidase pode ser facilmente inativada por oxigênio singlete produzido através de ambos processos. No caso de azul de metileno, além de oxigênio singlete, se tem também a produção de OH^\cdot , H_2O_2 e O_2^- , espécies ativas de oxigênio detectadas por supressores específicos e igualmente responsáveis pela inativação enzimática. Tal evento, não ocorre em presença de Eosina, produzindo especificamente oxigênio singlete. Sendo assim, esse sensibilizador é um bom modelo para sistemas enzimáticos geradores específicos de oxigênio singlete.

Xantina-oxidase foi também inativada por oxigênio singlete, produzido através do sistema enzimático ácido fólico.

Comprovou-se também que esta enzima atua como inibidor competitivo frente a histidina, um conhecido supressor de oxigênio singlete, utilizando-se técnicas de estado estacionário através da emissão fotônica do sistema Malonaldeído/HRP/ Mn^{+2}/O_2 .

ABSTRACT

The singlet oxygen ($^1\Delta_g^1O_2$) effect on Xanthine-oxidase activity generated by: a) photodynamic processes, using methylene blue and eosin as sensitizer and b) bioenergized processes, using the folic acid/HRP/glutathione/catalase/ Mn^{+2}/O_2 system was studied.

Xanthine-oxidase can be inactivated easily by singlet oxygen by both processes. Methylene blue generates OH^\cdot , H_2O_2 and O_2^\cdot besides singlet oxygen. They were detected by the proper quenchers and traps, and they are also responsible for Xanthine-oxidase inactivation. Eosin produces at the same condition specifically singlet oxygen, so this sensitizer is a good model for the enzymatic system which generates only singlet oxygen.

Xanthine-oxidase also was inactivated by singlet oxygen generated by folic acid system. It was found that Xanthine-oxidase acts as a competitive inhibitor with histidine, which is a singlet oxygen quencher, following the steady state method through the photon emission from the malonaldehyde/HRP/ Mn^{+2}/O_2 system.

ABREVIACES UTILIZADAS

AHP	-	2-amino-4-hidrxi-pteridina
ADHP	-	2-amino-4,7-dihidrxi-pteridina
AFO	-	cido Fólico
ATP	-	Adenosina trifosfato
EDTA	-	cido etilenodiaminatetractico
Eos	-	Eosina (2,4,5,7-tetrabromo fluoresceína)
FAD	-	Flavina adenina dinucleotídeo
Glut	-	Glutaciona
HRP	-	Peroxidase de rabanete (horseradish peroxidase)
M.A	-	Malonaldeído
MeB	-	Azul de Metileno
SOD	-	Superóxido Dismutase
X-O	-	Xantina-oxidase

INDICE

pag.

RESUMO

ABSTRACT

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

I - APRESENTAÇÃO.....	1
I.1 - Xantina-Oxidase.....	2
I.2 - Inibidores.....	3
I.3 - Mecanismo de ação.....	5
I.4 - Xantina-Oxidase em processos carcinogê - nicos.....	7
I.5 - Xantina-Oxidase e desintoxicação.....	9
II -PROCESSOS FOTODINÂMICOS.....	10
II.1 -Mecanismo de foto-sensibilização.....	11
III -OXIGÊNIO SINGLETE.....	13
III.1 - Natureza do oxigênio singlete.....	14
III.2 - Reações com Oxigênio singlete.....	15
III.2.a - Reações de foto-oxigenação..	15
III.2.b - Reações do tipo "ene" e die- nófilo.....	16
III.2.c - Gerais.....	17
III.3 - Detecção de Oxigênio singlete.....	17
III.4 - Oxigênio singlete e carcinogênese.....	19
III.5 - Espécies ativas de oxigênio.....	20
IV -PROCESSOS BIOENERGIZADOS.....	23
V - SISTEMA MALONALDEÍDO(M.A)/PEROXIDASE DE RABANE TE(HRP)/Mn ⁺²	24
VI -SISTEMA ÁCIDO FÓLICO.....	27

CAPÍTULO 2 - PARTE EXPERIMENTAL

I - MATERIAL.....	31
I.1 - Reagentes.....	31
I.2 - Aparelhagem.....	31
II - PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES.....	32
II.1 - Solução de Malonaldeído(M.A).....	32
II.2 - Solução de Xantina-Oxidase(X-O)....	32
II.3 - Solução de ácido fólico(AFo).....	33
II.4 - Solução de glutatona.....	33
II.5 - Solução de HRP tipo VI.....	33
II.6 - Solução de bilirrubina.....	34
II.7 - Solução de 2-amino-4-hidróxi-pteridina(AHP).....	34
II.8 - Solução de guanosina.....	34
II.9 - Solução de azul de metileno(MeB) e Eosina.....	34
II.10- Solução de sulfato de quinino.....	35
II.11- Solução de acetaldeído.....	35
II.12- Soluções tampão.....	35
II.13- Soluções de Superóxido dismutase e catalase.....	35
II.14- Soluções de supressores.....	36
II.15- Solução de alopurinol.....	36
III - MÉTODOS.....	36
III.1 - Purificação do ácido fólico.....	36
III.2 - Calibração do espectrofluorímetro.	37
III.3 - Obtenção do soro sanguíneo.....	37
III.4 - Preparação do soro fisiológico....	37
III.5 - Determinação de inativação de X-O.	38

III.6 - Determinação da atividade de X-O no soro sanguíneo.....	38
--	----

CAPÍTULO 3 - RESULTADOS

I - SISTEMA XANTINA-OXIDASE(X-O)/AHP/O ₂	41
I.1 - Análise de condições ótimas de rea- ção.....	41
I.2 - Análise do tempo ótimo de irradiação	41
I.2.a - Azul de metileno(MeB) como sensibilizador.....	41
I.2.b - Eosina como sensibilizador..	43
I.3 - Estudos com supressores.....	44
I.4 - Estudos com óxido de deutério(D ₂ O)..	44
II - SISTEMA MALONALDEÍDO(M.A)/HRP/Mn ⁺² /O ₂	48
II.1 - Cálculo da constante de Stern-Vol - mer(K _{sv}) para X-O.....	48
II.2 - Estudos de inibição.....	48
II.2.a - Método bioenergizado.....	48
II.2.b - Método foto-sensibilizado.	50
III - ESTUDOS DOS EFEITOS DE ¹ O ₂ GERADO BIOENER- GIZADAMENTE NA ATIVIDADE DE X-O.....	54
III.1 - Estudos dos efeitos de Malonaldeí- do sobre X-O.....	55
III.2 - Estudos espectrofluorimétricos....	56
III.3 - Consumo de oxigênio.....	57
III.4 - Estudos de quimiluminescência....	57
IV - SISTEMA ÁCIDO FÓLICO(AFo)/HRP/GLUTATIONA / CATALASE/Mn ⁺² /O ₂	64
V - ESTUDOS DE ATIVIDADE DE X-O NO SORO SANGUÍ- NEO.....	67

CAPÍTULO 4 - DISCUSSÃO

I - EVIDÊNCIAS DE GERAÇÃO DE 1O_2 NO PROCESSO FOTO-SENSIBILIZADO.....	71
II - SISTEMA MALONALDEÍDO.....	82
II.1 - Efeitos de Malonaldeído sobre X-O..	83
III - SISTEMA ÁCIDO FÓLICO.....	86
IV - XANTINA-OXIDASE DO SORO SANGUÍNEO.....	90
APÊNDICE I -	92
APÊNDICE II -.....	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

I - APRESENTAÇÃO

Os processos de câncer, suas implicações, suas causas, têm sido extensivamente estudados por pesquisadores do mundo inteiro. Vários experimentos foram e são realizados na tentativa de se poder, senão combatê-los ainda, no mínimo, entendê-los melhor.

Xantina-oxidase, uma flavoproteína complexa, apresenta baixa atividade nesses processos(1-7).

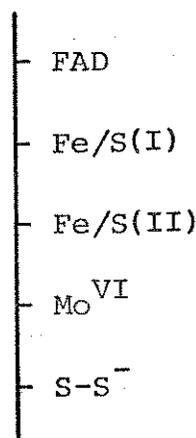
Sabe-se(8) que ela catalisa a oxidação de Pterin-6-aldeído a Pterin-6-ácido. Em condições normais, a concentração de Pterin-6-aldeído (um dos produtos da degradação do ácido fólico) é mínima, porém em casos de câncer, ela se apresenta bastante elevada(9). No processo de geração deste composto, é gerado concomitantemente, oxigênio singlete(10), espécie altamente reativa frente a proteínas(11).

O que se estudará então, é a relação entre a baixa atividade de xantina-oxidase e a produção de oxigênio singlete.

Em virtude do grande número de espécies ativas de oxigênio e sistemas envolvidos neste estudo, torna-se necessário introduzir alguns conceitos básicos e fazer uma breve revisão do que tem sido feito neste sentido.

I.1 - XANTINA-OXIDASE

Xantina-Oxidase (X-O) é uma metaloflavoproteína de peso molecular ao redor de 300.000. Esta enzima pode ser encontrada em diversos tecidos de mamíferos, aves, bactérias e no fluido corporal de cobras quentes (12). É extremamente adequada para a catálise de reações oxidativas pois contém 4 sítios ativos de oxi-redução: Molibdênio, Flavina Adenina dinucleotídeo (FAD) e um par de centros do tipo ferredoxina (Fe_2S_2) (13) (Esquema 1).



Esquema 1

Dois desses sítios são bem conhecidos e seus papéis, no mínimo em algumas reações catalíticas da enzima, parecem razoavelmente claros. O funcionamento do sítio de Molibdênio é dependente de um grupo persulfito próximo intacto, enquanto que as propriedades do sítio de flavina, parecem depender da presença ou ausência de um grupo tiol próximo (14).

X-O tem um papel importante entre metaloflavoproteínas pois catalisa uma reação única de hidroxilação

oxidativa do substrato, na qual o átomo de oxigênio incorporado ao produto, provém da água e não do oxigênio do ar (15).

Esta particularidade é atribuída à presença de Mo nesta enzima pois sabe-se que a hidroxilação do substrato ocorre neste centro (15).

X-O pode oxidar uma grande variedade de substratos tais como compostos heterocíclicos contendo nitrogênio bem como aldeídos alifáticos e aromáticos (16).

Muitos experimentos foram realizados em relação a falta de especificidade de X-O com respeito a seus substratos (16-18). Todas essas pesquisas concluem que as reações de X-O são em geral, particularmente sensíveis a inibição por excesso de substrato.

I.2 - INIBIDORES

Partindo-se do ponto que a hidroxilação do substrato ocorre no centro de Mo, o grupo de inibidores de X-O inclui substratos análogos que produzem inibição competitiva e reagentes que sofrem alguma tipo de interação com o centro de Mo (19).

De um modo geral, não há uma distinção muito rígida entre um inibidor da enzima e um reagente que a modifique quimicamente. Entre os inibidores particularmente potentes situam-se : 2-amino-4-hidroxi-pteridina-6-aldeído (Pterin-aldeído) (8), purina-6-aldeído (20) e alopurinol (21), sendo este último utilizado clinicamente no trata -

mento de hiperuricemia associada com gota(22). X-O pode também ser inibida por cianeto(23), arsenito(24), metanol(25), íons cobre(26), formaldeído(27) entre outros.

A inibição exercida por cianeto é considerada a típica quando comparada com outras enzimas, onde ele exerce seu efeito inibidor de maneira rápida. No caso de X-O, cianeto deve ser incubado com a enzima por um período mínimo de 1 hora a 37°C e, uma vez efetivada, essa inibição é irreversível. Dessa forma, a enzima é inativada, perdendo portanto seu poder catalítico(23). O mesmo tipo de ação é exercido por íons cobre, ressaltando-se aqui que o íon Cu^+ é um inativador mais potente que o íon Cu^{2+} (26). Os outros inibidores, em sua grande maioria, exercem seu efeito de maneira rápida e reversível.

É importante se destacar que, os efeitos desses inibidores na atividade enzimática, foram observados somente *in vitro*. Pterin-aldeído, p.ex., não se mostrou efetivo quando injetado em galinhas com alta atividade de X-O no fígado(28). Segundo De Renzo(29), o nível de X-O em tecidos pode ser diminuído por uma das seguintes maneiras : omissão simples ou múltipla de Riboflavina, Mo, Fe ou proteína da dieta.

Resultados positivos de inibição *in vivo* foram obtidos por Sweidsein e col.(30), utilizando altos níveis de cloranfenicol ; por Annau e col.(31), estudando ratos após a ingestão do inseticida Aldrin e também recentemente, por De Renzo e col.(29), utilizando tungstato.

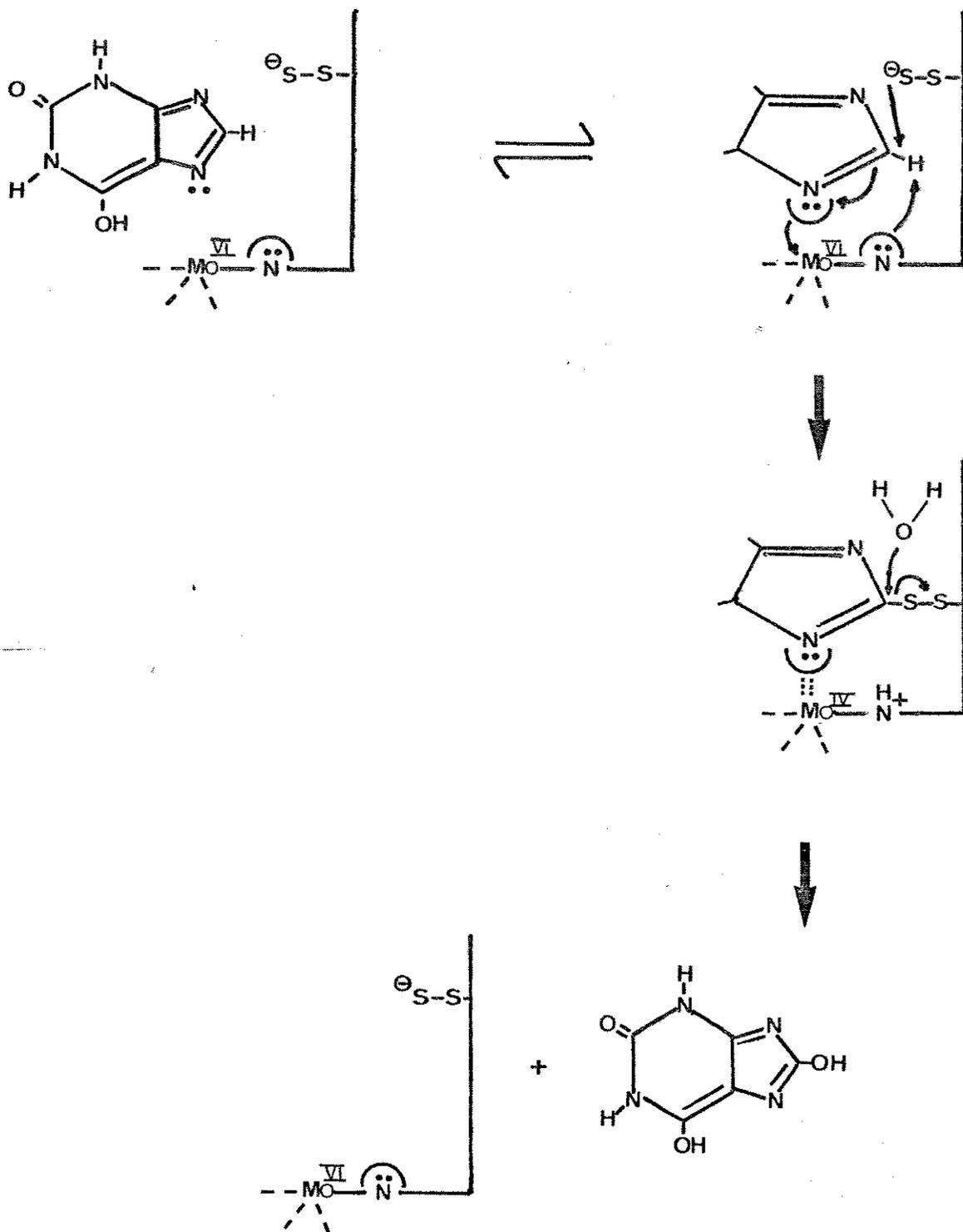
I.3 - MECANISMO DE AÇÃO

Várias pesquisas foram feitas na tentativa de se explicar o mecanismo preciso de ação catalítica de X-O. Uma variedade de técnicas tais como susceptibilidade magnética(32), espectroscopia de absorção(33), ressonância de spin eletrônico(e.s.r.)(34), espectrofotometria "stopped flow"(17), análise cinética de estado estacionário(17), dicróismo circular(35) e recentemente espectroscopia de absorção de Raio-X(36) foram empregadas na investigação da estrutura e da sequência de transferência de elétrons em X-O.

O problema central nesses estudos, parece ser o número e a natureza de sítios disponíveis na enzima para interação com os substratos. Existem discussões ainda, a respeito de possíveis sítios adicionais, embora não tenhamos até o momento, qualquer firme evidência sobre sua existência.

Parece não haver dúvidas de que ambos os sítios de Mo e FAD sejam disponíveis para interação com aceptores. Apesar disso, várias pesquisas foram feitas no sentido de se elucidar a natureza e comportamento desses sítios na oxidação do substrato.

Olson e col.(34) propuseram um modelo para o mecanismo de ação de X-O(Esquema 2). Neste mecanismo, o persulfito inicia a catálise por ataque nucleofílico no C₈ do substrato Xantina, seguido por hidrólise do intermediário covalente, dando ácido úrico e enzima reduzida por 2 elétrons.



ESQUEMA 2

Nessa mesma época, Edmondson e col.(17) investigaram a sequência de transferência de elétrons no mecanismo catalítico da enzima, estabelecendo que Mo é o acceptor eletrônico inicial, com subsequente transferência para FAD e Fe/S. O centro de Mo foi também investigado por Bordas e col.(36), utilizando absorção de Raio-X e por Malthouse e col.(37) e Bray e col.(38), utilizando técnicas de e.s.r..

Apesar de tudo, o mecanismo de ação de X-O continua sendo objeto de estudo de vários pesquisadores os quais, buscam com novas técnicas, a elucidação desse complexo sistema metal-flavina-proteína(39-41).

I.4 - XANTINA-OXIDASE EM PROCESSOS CARCINOGENICOS

Sabe-se atualmente que, X-O tem um importante papel em processos carcinogênicos(3-7). A extensão de sua participação em tais processos tem objetivado o estudo de vários pesquisadores. Porém, os resultados obtidos até o presente momento, são de difícil interpretação em virtude do número de condições a serem consideradas. Este fato, é mostrado por Lewin e col.(3) em seus estudos sobre a atividade de X-O durante carcinogênese em mama de ratos. Uma das dificuldades na interpretação dos resultados, segundo esses pesquisadores, reside no fato de que a atividade medida pelo ensaio enzimático *in vitro* não necessariamente reflete a atividade biológica dentro de célula intacta desde que, fatores limitantes como concentra

ção do substrato, natureza e concentração de ativadores e inibidores *in vivo* não são bem conhecidos. Apesar de carecer de uma definição mais contundente, os resultados em linhas gerais, indicam um decréscimo progressivo na atividade de X-O durante carcinogênese em mama de rato com fator leite.

Westerfeld e col. (4) realizaram uma série de estudos sobre X-O a partir da ação carcinogênica de p-dimetil-amino-azobenzeno. Deve existir, segundo os pesquisadores, uma ação sinérgica entre este composto e uma deficiência nutricional, a fim de que ele possa agir como um potente carcinogênico. As deficiências de proteína e Riboflavina, dois importantes fatores nutricionais relacionados com esse processo, são os mesmos fatores implícados no esgotamento de X-O do fígado. Os mesmos resultados foram obtidos por Reid e Lewin (42).

Esta relação é importante pois X-O é a única enzima envolvida no metabolismo de nucleotídeos em fígado de rato, que é significativamente afetada por uma dieta de baixa proteína (4).

Contudo, os resultados obtidos, não confirmam de todo a hipótese de uma relação entre X-O e a produção de cancer, em virtude dos vários tipos de comportamento apresentados por todos os ratos estudados. Este fato, levou os autores a concluírem que o esgotamento de X-O no fígado pela combinação dieta-corante, *pode ser* o efeito primário que permite a iniciação do processo carcinogênico.

I.5 - XANTINA-OXIDASE E DESINTOXICAÇÃO

X-O pode também estar envolvida num mecanismo de defesa natural. Este fato foi observado por Tubaro e col. (43) em seus experimentos com fígado de rato inoculado com células de carcinoma de Erlich, ou infectado com bactérias ou protozoários. A possibilidade de seu envolvimento num mecanismo de defesa natural foi aventada em virtude da magnitude do aumento de sua atividade em leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, que têm importância durante infecção bacteriana e resistência a tumores respectivamente. Essa hipótese baseou-se no fato de que X-O exógena administrada subcutaneamente a ratos com infecções bacterianas resultaram num aumento do tempo de sobrevivência.

O papel desintoxicante de X-O é considerado também por Rajagopalan (19), e ele o faz com reservas pois, a deficiência desta enzima em humanos, chamada xantinúria, é aparentemente benigna, desde que indivíduos deficientes, são física e mentalmente sadios. Porém, sabe-se que compostos nitro-orgânicos, p.ex. nitrosaminas, são convertidos a derivados hidroxiaminos por esta enzima (19), uma reação que poderia minimizar consideravelmente a formação de derivados nitrosos, podendo então ser incluída na classe de reação de desintoxicação.

Está claro aqui, o papel ambíguo desta enzima. Ao mesmo tempo em que apresenta uma ampla faixa de especificidade em relação ao substrato, o que a torna candidata em potencial para sistemas desintoxicantes, a X-O interage

com substratos produzindo espécies ativadas de oxigênio , entre as quais situa-se oxigênio singlete, possível entidade envolvida em processos carcinogênicos(44,45).

Esta última observação despertou nosso interesse e nos levou a pesquisar a influência desta espécie ativa de oxigênio sobre X-O, já que ambas as entidades, estão envolvidas em processos carcinogênicos.

Para melhor situar o problema, é preciso que se compreenda primeiramente o funcionamento dos processos que nos permitem gerar oxigênio singlete, bem como algumas peculiaridades desta espécie.

II - PROCESSOS FOTODINÂMICOS

Os efeitos biológicos da ação fotodinâmica foram observados em praticamente todas as classes de organismos. Estes efeitos incluem danos de membrana(46), mutações(47), hemólise de eritrócitos humanos(48) e muitos outros processos que interferem no nosso metabolismo e reprodução , podendo até serem letais(49).

A foto-oxidação de alguns constituintes da célula, p.ex. amino-ácidos(50), parece ser a causa das lesões. A inativação de muitas enzimas, é causada pela destruição de amino-ácidos essenciais ao seu sítio ativo, ou por danos que acarretem a perda de sua estabilidade conformacional(49).

Os processos fotodinâmicos, na maioria dos casos, requerem a presença de oxigênio e um sensibilizador, sendo

o estado triplete deste último, considerado responsável pela iniciação da reação(51).

De um modo geral, as reações foto-sensibilizadas diferem das reações fotoquímicas diretas. No primeiro caso, temos transferência de energia onde o foto-sensibilizador atua como doador e a molécula reagente como aceptor, ao passo que, no segundo caso, a luz é absorvida diretamente pela molécula reagente(52).

Esta classe de reações tem sido extensivamente estudada por diversos pesquisadores, com um interesse maior, concentrado em suas implicações biológicas.

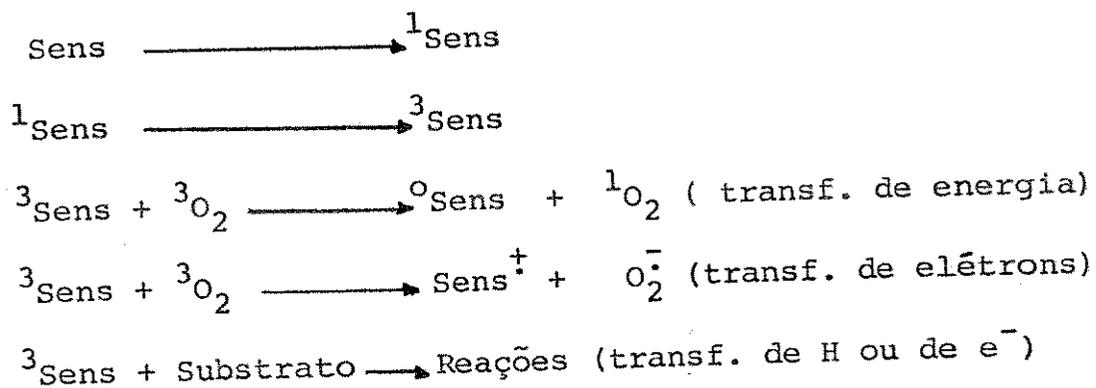
II.1 - MECANISMO DE FOTO-SENSIBILIZAÇÃO

Os sensibilizadores mais efetivos, são aqueles que possuem um estado triplete de vida longa e num alto rendimento quântico de produção. A maioria destes compostos, absorvem luz visível ou UV-próximo, de tal modo que estes comprimentos de onda são os mais efetivos para oxidações foto-sensibilizadas.

Os processos foto-sensibilizados, podem ser divididos nos seguintes passos : A) formação de estados excitados do sensibilizador ; B) reações subsequentes do sensibilizador excitado e C) reações subsequentes de radicais secundários formando produtos e outros intermediários.

Este mecanismo se torna bastante complexo se são avaliadas todas as possíveis espécies produzidas em cada passo. Por esse motivo, damos aqui, um esquema simplifica

do o suficiente para que se possa entender suas bases fundamentais. O mesmo mecanismo pode ser encontrado em mais detalhes no artigo de Foote(49).



Esquema 3

Para distinguir se num determinado processo de foto-sensibilização ocorre um ou outro tipo de transferência é necessário usar supressores específicos para cada espécie. Este tópico será analisado mais detalhadamente no estudo de espécies ativas de oxigênio. É importante que se tenha em mente que o processo de foto-sensibilização envolve um esquema mais complexo do que aquele demonstrado no esquema 3, porém sua análise detalhada, foge aos objetivos desta tese.

Através do esquema 3, observa-se que a produção de oxigênio singlete é atingida por transferência de energia de um sensibilizador no estado triplete adequado para o oxigênio molecular no estado fundamental triplete. Desta maneira, o sensibilizador adequado, deverá possuir uma energia triplete maior que 23 kcal/mol, energia requerida para excitar o oxigênio no estado fundamental para oxigênio singlete.

Mas, qual a importância dessa espécie ativa de oxigênio ? Como é gerada e quais as suas implicações biológicas ?

Para que possamos encontrar respostas a essas e outras perguntas que possam eventualmente surgir, daremos agora, uma breve descrição sobre essa espécie.

III - OXIGÊNIO SINGLETE

Oxigênio singlete tem despertado o interesse de vários pesquisadores devido a sua reatividade em muitos sistemas químicos e biológicos.

Ele pode ser gerado facilmente por descarga de micro-onda(53), por reação de peróxido de hidrogênio com hipocloritos metálicos(54), por reação de átomos de hidrogênio com oxigênio molecular através de foto-ionização(55), por excitação direta de oxigênio a alta pressão por laser(56), por irradiação foto-sensibilizada(49), por reações enzimáticas(57,58) e também é encontrado na atmosfera, gerado por radiação solar que sensibiliza os poluentes atmosféricos comuns(59).

De um ponto de vista biológico, existem fortes evidências de que os sistemas vivos têm mecanismos para proteção de moléculas tais como lipídios e ácidos nucleicos, que poderiam de outra maneira serem danificados por oxigênio singlete exógeno(60).

A presença de oxigênio singlete em sistemas biológicos, deu origem a novas teorias sobre carcinogênese (44,61).

O número real de processos bioquímicos, normais e patológicos, que envolvem oxigênio singlete de uma maneira ou de outra, é provavelmente maior do que os presentemente suspeitos, pois ele pode ser produzido tanto dentro quanto fora do meio-ambiente celular por uma variedade de mecanismos (59).

III.1 - NATUREZA DO OXIGÊNIO SINGLETE

De modo a entender a diferença entre oxigênio singlete e oxigênio normal, apresentamos uma breve discussão sobre a estrutura eletrônica desta molécula.

Estado	Símbolo	Energia acima do estado fundamental	Ocupação do Orbital
29 Est. exc.	$1\Sigma_g^+$	37 Kcal	$\uparrow \uparrow$
19 Est. exc.	$1\Delta_g$	22 Kcal	$\uparrow\downarrow \text{---}$
Est. fundamental	$3\Sigma_g^-$	0 Kcal	$\uparrow \uparrow$

Os dois elétrons de maior energia no O_2 estão distribuídos entre dois orbitais moleculares \uparrow degenerados (energeticamente equivalentes). Se ambos os elétrons estão no mesmo orbital, seu momento angular deve estar na mesma direção (estado Δ), e seus spins devem ser opostos (emparelhados); esta última observação é denotada pelo índice 1, tal que este estado da molécula seja descrito espectroscopicamente como 1Δ .

Se os elétrons estão em orbitais diferentes , seus momentos angulares são opostos (estado Σ) e seus spins podem ser opostos ($^1\Sigma$) ou paralelos (desemparelhados, $^3\Sigma$).

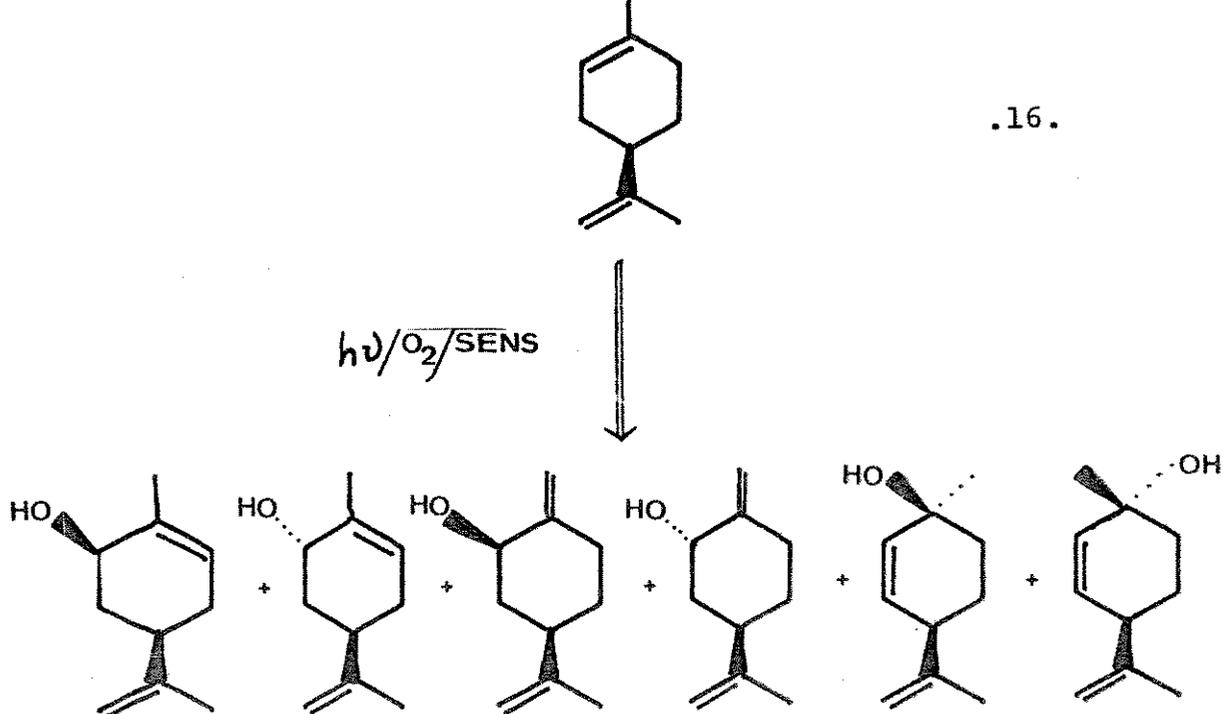
De uma representação de orbital molecular, pode-se antecipar a priori, que o estado $^1\Sigma$ de maior energia poderia exibir propriedades de radical livre como as observadas para o estado fundamental, que tem uma distribuição eletrônica similar. Em contraste, o estado $^1\Delta$ de menor energia, se comportaria de uma maneira quimicamente similar ao etileno, possuindo um caráter eletrofílico(59).

III.2 - REAÇÕES COM OXIGÊNIO SINGLETE

III.2.a - Reações de foto-oxigenação

Foote(62), estudando a química de oxigênio singlete molecular, gerado pela reação de peróxido de hidrogênio com hipocloritos metálicos, observou que ela é idêntica àquela do intermediário reativo na oxigenação de olefinas e dienos foto-sensibilizada por corantes. As técnicas utilizadas para comparação das duas reações, incluem estudos detalhados de estereoseletividade com uma variedade de aceptores, reatividades relativas dos aceptores, e efeitos de substituintes sobre o produto e a velocidade de reação.

Revisando os experimentos com limoneno, obteve através de foto-oxigenação todos os seis possíveis produtos.

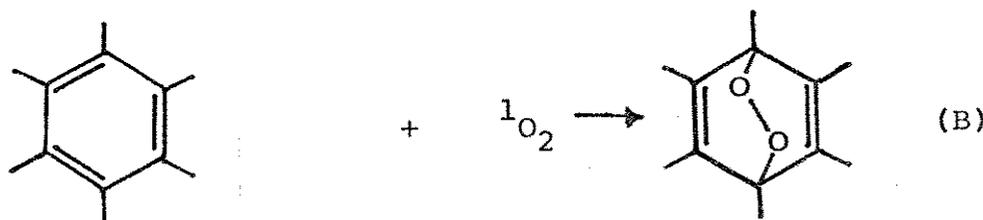
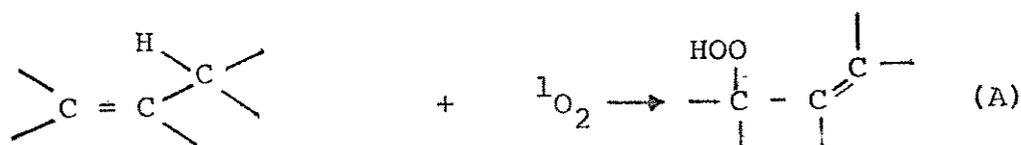


A oxigenação de limoneno com $\text{OCl}^-/\text{H}_2\text{O}_2$ deu uma mistura idêntica de produtos.

III.2.b - Reações do tipo "ene" e dienófilo

Monroe(63), em seus estudos sobre constantes de velocidade de adição de oxigênio singlete a olefinas, observou que a constante de velocidade de adição de oxigênio singlete aumenta com o número de grupos alquil substituídos na olefina e diminui a medida que os grupos alquil se tornam maiores.

Oxigênio singlete se adiciona a olefinas não conjugadas com hidrogênios alílicos formando hidroperóxidos alílicos(A) e a hidrocarbonetos aromáticos, formando endoperoxídeos(B) (63).



III.2.c - Gerais

Além dessas reações, podemos observar a participação de oxigênio singlete em muitos outros sistemas químicos. Os recentes desenvolvimentos incluem pesquisas sobre efeitos foto-dinâmicos utilizando Eosina(51,53,64,65) ou MeB(66,68), sensibilizadores mais utilizados ; tratamento terapêutico de recém-nascidos ictericos pela foto-oxigenação de bilirrubina(69) e estudos de possíveis efeitos de modificação de DNA utilizando riboflavina como sensibilizador provenientes deste tratamento terapêutico(70). A vitamina E(71) tem uma das mais altas reatividades frente a oxigênio singlete.

III.3 - DETECÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE

O oxigênio singlete tem uma vida média natural relativamente longa para uma espécie eletronicamente excitada. De acordo com Krinsky(72), o único ensaio direto para identificação de $^1O_2^{(*)}$ consiste na medida de energia liberada quando esta espécie decai para o estado fundamental, o estado triplete 3O_2 . Porém, adverte Khan(73), em sistemas que geram 1O_2 em pequenas quantidades ou num meio-ambiente onde ele é fortemente suprimido como em meio aquoso, a detecção através de sua emissão é quase impossível.

De acordo com Khan(73), somente a formação de peróxidos transanulares com hidrocarbonetos aromáticos é específico para 1O_2 como método químico de detecção.

(*)- Esta simbologia será usada para identificar a espécie

A presença de $^1\text{O}_2$ num sistema pode também ser detectada através do uso de supressores específicos. Aminas(63) são supressores bem conhecidos, assim como histidina(74), guanosina(53), metionina(45), triptofano(75) e bilirrubina(76).

Alguns experimentos mostram que β -caroteno suprime $^1\text{O}_2$ gerado por foto-sensibilização ou produzido a partir de uma reação química(70). Evidências recentes, mostram que a velocidade de supressão de $^1\text{O}_2$ por carotenóides, depende do comprimento da cadeia conjugada(77).

Azoteto(N_3^-) também é um conhecido supressor desta espécie. Este efeito, segundo Nilsson e col.(50), pode ser obtido a uma concentração baixa o suficiente de tal maneira que não afete o tripleto do sensibilizador.

Além desses métodos, a análise de produtos(53, 72, 73) e o emprego de técnicas de estado estacionário(78) (Ver apêndice 1, pg. 93), são igualmente importantes para detecção de $^1\text{O}_2$ (62).

Devido ao efeito extraordinariamente grande sobre a meia-vida de $^1\text{O}_2$, o uso de solventes deuterados se constitui num poderoso diagnóstico para identificação desta espécie. Essa observação pode ser comprovada através de vários trabalhos(50,53,66), nos quais ela é utilizada como dado importante da presença de $^1\text{O}_2$ nos diversos sistemas estudados. Porém, como afirma Khan(73), as variações introduzidas por solventes deuterados não se constituem em testes inequívocos da presença de $^1\text{O}_2$. Na verdade, nada se pode afirmar a respeito de um teste isoladamente. As observações feitas a partir de todos os experimentos, com

supressores específicos e solventes deuterados, nos darão então, as evidências de participação dessa espécie no sistema, e ainda assim, devem ser consideradas com reserva.

III.4 - OXIGÊNIO SINGLETE E CARCINOGENESE

Sabe-se que corantes foto-sensibilizantes podem sensibilizar a destruição oxidativa de ácidos nucleicos(53) e enzimas(29,79,80). Além disso, muitos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos carcinogênicos são reconhecidamente, bons sensibilizadores(54). No modelo proposto por Khan e Kasha(44), as regiões de densidade de carga sobre o hidrocarboneto policíclico determinam a ligação inicial do hidrocarboneto com o constituinte da célula. A potência carcinogênica da molécula depende então da geração subsequente de oxigênio singlete após a excitação óptica do resíduo de hidrocarboneto aromático ligado. A excitação óptica da molécula residual a um estado excitado singlete é seguida por um cruzamento entre sistemas a um estado tripleto de maior meia-vida, e a supressão do oxigênio no estado tripleto, gera oxigênio singlete por transferência de energia. Este último então, reage com o material celular tal como DNA, iniciando o processo carcinogênico.

Uma observação importante nesse processo, é que as propriedades ópticas do hidrocarboneto policíclico ligado devem ser tais que, a molécula residual ligada, continue a absorver luz natural (visível ou ultra-violeta próximo).

Experimentos feitos por Durán e Faljoni(45) nos dão indicações de um possível importante papel de oxigênio

singlete na carcinogênese de nitrosaminas.

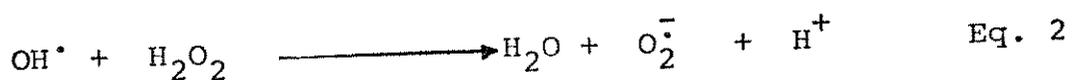
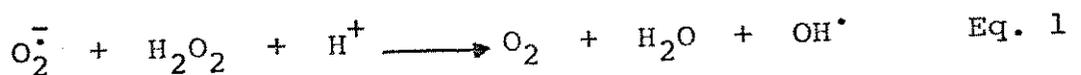
Todas essas teorias porém, carecem ainda de maior profundidade, já que se constituem num aspecto novo de especulações sobre processos carcinogênicos e como tal , devem ser tratadas com cautela.

III.5 - ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO

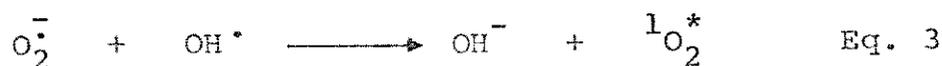
Embora menos eficientemente (49), podemos observar através do mecanismo de foto-sensibilização (pg.12) u ma produção de anion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que pode ser atingi da por transferência de elétrons do sensibilizador triple te para oxigênio molecular. Esta espécie ativa de oxigêni o pode originar uma série de reações em cadeia de radicais. Diversos experimentos (81 -84) demonstram a presença desta espécie.

A oxidação de hipoxantina, xantina ou acetaldeído por oxigênio molecular catalisada por X-O, produz $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 como intermediários (85).

Os experimentos realizados por Arneson (86), sobre a luz emitida quando X-O opera sobre seu substrato xantina concluíram que $O_2^{\cdot-}$ gerado por este sistema, era convertido a OH^{\cdot} via ciclo de Haber-Weiss :



Dessa forma, a reação responsável pela luminescência neste sistema poderia ser :



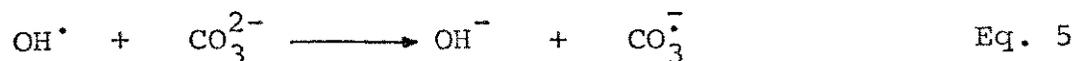
A luminescência proveniente do sistema X-O foi reinvestigada por Puget e Michelson(87) e Hodgson e Fridovich (88). No primeiro caso, estudou-se a oxidação de luminol por X-O e no segundo, estudou-se a oxidação de acetaldeído pelo mesmo sistema. Em ambos os casos, a emissão de luz proveniente do sistema foi acompanhada em tampão carbonato, e seus efeitos estudados.

O efeito carbonato sobre a luminescência deste sistema, não foi estudado por Arneson(86), levando-o a concluir que ${}^1\text{O}_2$ era a entidade responsável pela fraca luminescência observada, apontando ainda a geração de $\text{O}_2^{\cdot -}$ como intermediário importante na produção de ${}^1\text{O}_2$.

Esta observação foi contestada tanto por Puget e Michelson(87) quanto por Hodgson e Fridovich(88) que através de conhecidos testes para detecção de ${}^1\text{O}_2$ (72,74), comprovaram que o possível papel desta espécie na quimiluminescência deste sistema deve ser reavaliado.

Ambos os trabalhos, apontam a espécie produzida pela dimerização de radicais carbonato, como responsável direta pela emissão de luz deste sistema.

De acordo com Hodgson e Fridovich(88), $\text{O}_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 produzidos durante a ação aeróbica de X-O, interagem para gerar OH^{\cdot} o qual, por sua vez, reage com carbonato produzindo $\text{CO}_3^{\cdot -}$.



A supressão da quimiluminescência proveniente do sistema X-O/acetaldéido/bicarbonato, por derivados pterínicos, foi constatada recentemente por Gisler e col.(89). Novamente, neste trabalho, foi ressaltada a importância de íons carbonato na luminescência do sistema.

A produção fotoquímica de $\text{O}_2^{\cdot -}$ e $^1\text{O}_2$ usando Rosa de Bengala como sensibilizador, foi observada por Srinivasan e col.(83) e também por Evans e Tucker(56). Neste último caso, é ressaltada a relativa importância da concentração do substrato, no envolvimento de ambos os mecanismos.

Os supressores mais comumente usados para detecção dessas espécies ativas de oxigênio são :

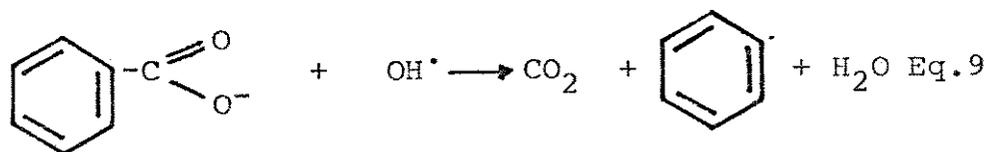
a) Superóxido dismutase(SOD) que dismuta $\text{O}_2^{\cdot -}$ (90)



b) Catalase, que desproporciona H_2O_2 (91)



c) Benzoato de sódio, para OH^{\bullet} (92)



A oxigenação aeróbica de sulfito, embora menos eficiente, também é utilizada como detector de $\text{O}_2^{\bullet -}$ (83).

Está claro aqui, que as reações são complexas, a possibilidade de intercadeamento é variada, e que os possíveis papéis de $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet -}$, OH^{\bullet} , $\text{CO}_3^{\bullet -}$ e $\text{CO}_2^{\bullet -}$ necessitam ainda de uma melhor elucidação.

É válido observarmos aqui, que um mesmo sistema fotoquímico pode originar diferentes espécies, dependendo do sensibilizador utilizado. Portanto, não é possível, extrapolarmos os efeitos de um sistema para outro, nem o comportamento de um sensibilizador para outro.

IV - PROCESSOS BIOENERGIZADOS

Vimos anteriormente como $^1\text{O}_2$ pode ser gerado a partir de processos fotodinâmicos. De acordo com o objetivo inicial deste trabalho, veremos agora, a produção desta espécie através de processos bioenergizados.

Entende-se por processos bioenergizados, aqueles que geram espécies eletronicamente excitadas, enzimaticamente e que induzem efeitos do tipo fotoquímico, porém na ausência de luz. São chamados portanto, Processos foto-bioquímicos "no escuro" (93)

Entre as reações bioquímicas mais importantes incluídas nesta classe de processos, destaca-se a formação de intermediários 1,2-dioxetanos como um dos melhores geradores químicos de espécies excitadas carbonílicas (93).

Alguns sistemas bioenergizados podem gerar, além de carbonilas excitadas, também $^1\text{O}_2$ (94), outros ainda, são geradores específicos de $^1\text{O}_2$ (95,96).

Para fins de nossos estudos, nos restringiremos somente aos sistemas bioenergizados geradores específicos de $^1\text{O}_2$. Estudamos portanto, o sistema malonaldeído e o sistema ácido fólico (*). A fim de melhor conhecer estes sistemas enzimáticos, será dada aqui, uma breve descrição dos mesmos, como também, algumas de suas implicações biológicas.

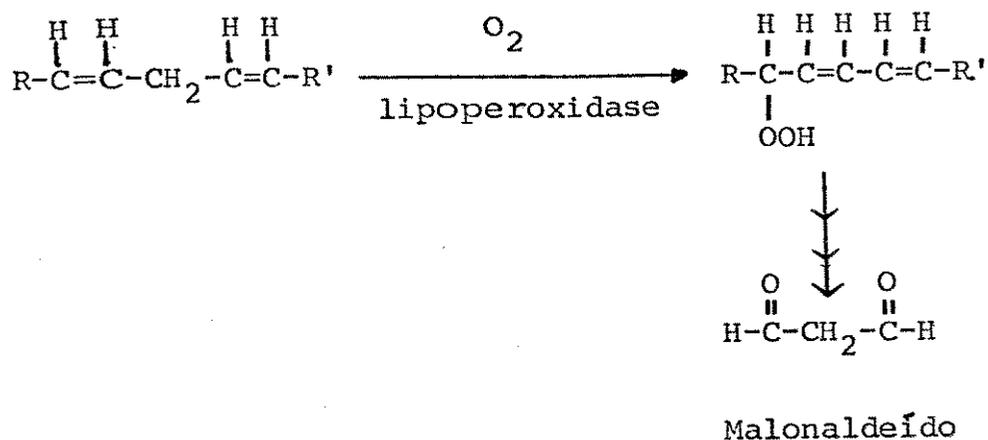
V - SISTEMA MALONALDEÍDO (M.A) / PEROXIDASE DE RABANETE (HRP) / Mn^{+2}

Os efeitos de lipídios insaturados e seus produtos sobre proteínas, englobam um conjunto muito complexo de reações, e estão implicados numa variedade de fenômenos biológicos deletérios (97). Contudo, o papel relativo dessas reações na modificação de proteínas, permanece obscuro.

O M.A, é formado durante a peroxidação lipídica e posteriormente metabolizado (98) (Esquema 4).

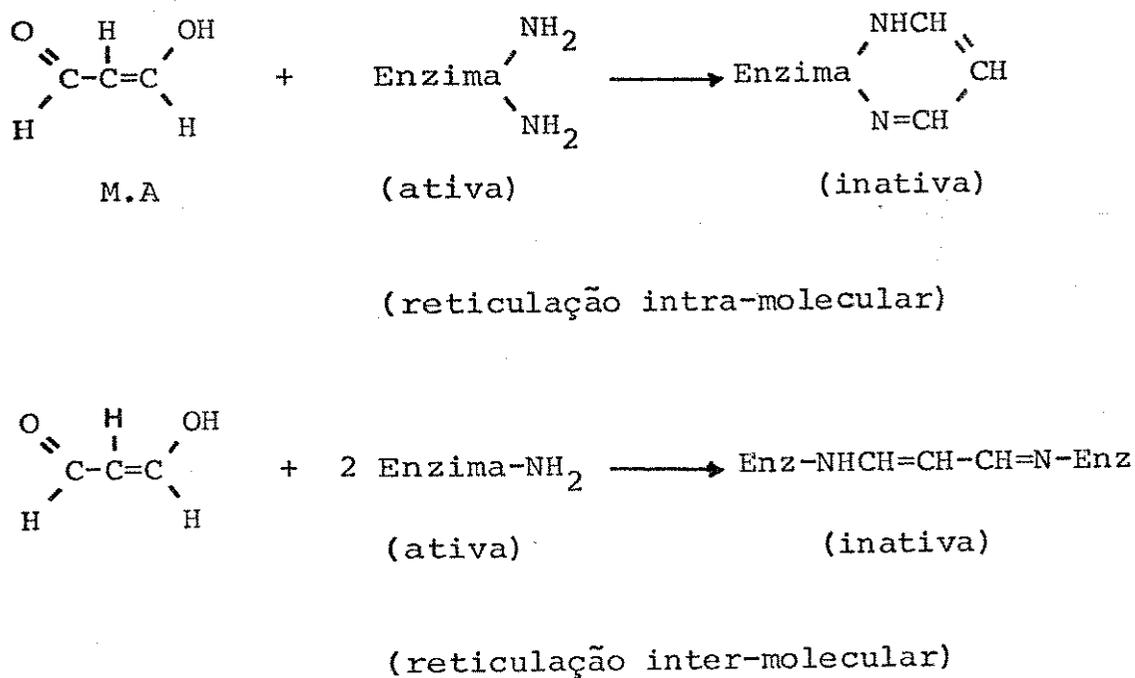
Chio e Tappel (99) demonstraram a formação de bases de Schiff conjugadas, quando amino-ácidos ou seus ésteres, reagem com malonaldeído.

(*) - Essa terminologia é utilizada com o objetivo de simplificar a leitura desta tese.

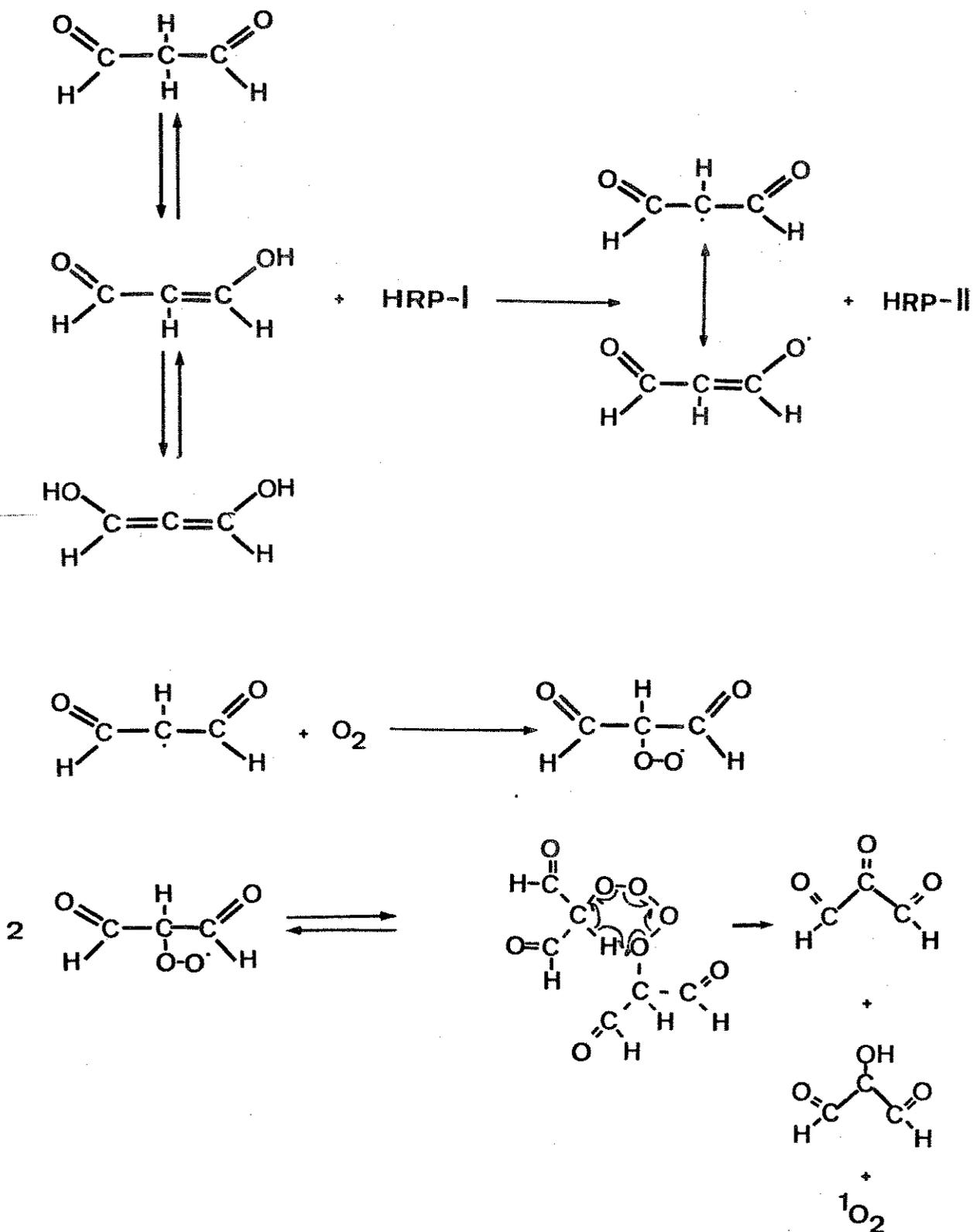


Esquema 4

Num outro trabalho (100), estes mesmos pesquisadores, estabeleceram que malonaldeído é o agente necessário para promover a reticulação e a inativação de RNase A (enzima que hidrolisa RNA's) (Esquema 5).



Esquema 5



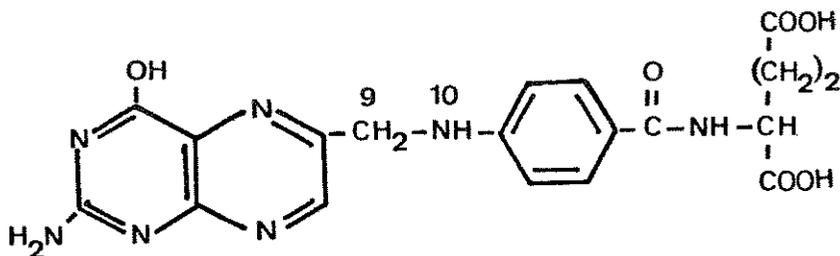
M.A tem um importante papel também na formação de produtos eletronicamente excitados(58). Atuando como substrato para HRP em presença de Mn^{+2} , ele consome O_2 numa reação que emite luz. Esta emissão foi atribuída a 1O_2 gerado possivelmente pelo mecanismo de Russell(Esquema 6) e confirmada por conhecidos supressores desta espécie(95).

O_2^- e OH^\cdot , não estão aparentemente envolvidos neste processo, uma vez que, a adição de supressores específicos para estas espécies, não resultou em alteração da emissão(58).

A ação de 1O_2 gerado neste sistema, causa modificações no DNA, similares às produzidas por efeitos foto dinâmicos(101).

VI - SISTEMA ÁCIDO FÓLICO

O ácido fólico tem a seguinte fórmula estrutural:



(ácido fólico(ácido pteroilglutâmico))

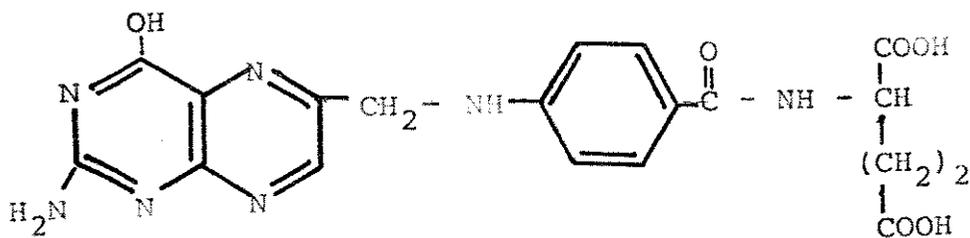
As maiores porções da molécula compreendem uma mistura pteridina ligada por uma ponte de metileno ao ácido p-amino-benzóico, o qual por sua vez, é ligado ao ácido glutâmico através de uma ligação peptídica(102).

Os folatos são espalhados na natureza, ocorrendo em quase todos os alimentos. Aparece no plasma sanguíneo, 1/2 hora após a ingestão e é rapidamente convertido a várias formas de folato, ativas metabolicamente.

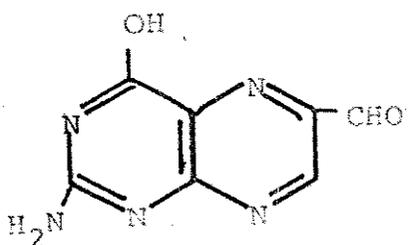
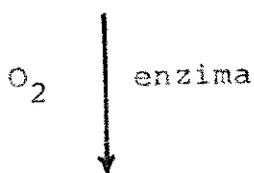
Segundo Bragança e col.(103), o ácido fólico pode ser degradado enzimaticamente(Esquema 7), sob condições de pH fisiológico, ocorrendo quebras na ligação C₉-N₁₀ produzindo ácido p-amino-benzoil-glutâmico e Pterin-6-aldeído. Este último, por sua vez, é vagarosamente oxidado a Pterin-6-carboxílico, num processo catalisado por X-O(8,104).

Os experimentos realizados por Braganca e col.(103) demonstram que a atividade da enzima responsável pela degradação do ácido fólico é máxima, a pH 5,5 e é dependente da presença de 3 cofatores : ATP, Mn⁺² e glutathiona. Esta afirmação é contestada por Inocentinni(96) demonstrando que a presença ou ausência de ATP, não altera a eficiência da reação.

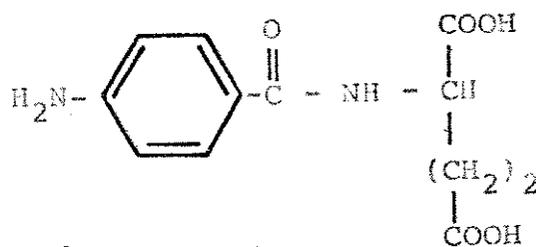
Neste último experimento, estudando a degradação oxidativa do ácido fólico em presença de HRP, concluiu-se que além de Mn⁺² e glutathiona, a presença de catalase se faz importante, uma vez que a geração de H₂O₂ na reação foi confirmada e tida como prejudicial ao sistema(106).



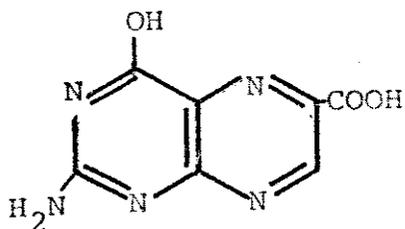
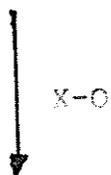
Ácido Fólico



Pterin-6-aldeído



ácido p-aminobenzoico



Pterin-6-carboxílico

OBJETIVOS DA TESE

As diversas pesquisas realizadas sobre a participação de oxigênio singlete em processos biológicos e suas implicações em carcinogênese, levou-nos a estudar seus efeitos sobre xantina-oxidase, já que esta enzima apresenta baixa atividade em casos de câncer.

Este trabalho, portanto, tem como objetivo, investigar e comparar os efeitos de oxigênio singlete gerado através de processos foto-sensibilizados e bioenergizados na atividade de xantina-oxidase.

Seguimos então, a seguinte sistemática :

1 - Investigação da produção fotoquímica de oxigênio singlete, utilizando-se dois sensibilizadores diferentes (Eosina e azul de metileno). Já que outras espécies ativas de oxigênio (que podem ser igualmente produzidas num processo de foto-sensibilização) também são responsáveis pela inativação enzimática, é de nosso interesse trabalhar com o sensibilizador que seja mais específico em termos de produção de oxigênio singlete.

2 - Investigação dos efeitos de oxigênio singlete produzido bioenergizadamente sobre a atividade de X-O.

3 - Estabelecimento de uma correlação entre os dois processos de geração de oxigênio singlete, através de uma análise de amino-ácidos de X-O destruídos após ambos os tratamentos.

4 - Estudo da atividade de X-O presente no soro sanguíneo de pessoas normais e portadoras de câncer. Neste caso, intenta-se estabelecer um método fácil e barato de análise, que possa contribuir para o campo de detecção precoce de câncer.

Capítulo 2

PARTE EXPERIMENTAL

I - MATERIAL

I.1 - Reagentes

Os reagentes obtidos da Sigma Chemical Co. foram os seguintes : 2-amino-4-hidrôxi-pteridina(AHP), benzoato de sódio, bilirrubina, catalase, glutathione, guanosina , histidina, peroxidase de rabanete(HRP tipo VI), superóxido dismutase(SOD) e xantina-oxidase(X-O).

Ácido fólico, D_2O , Eosina e hidróxido de sódio , foram obtidos da Merck.

Cloreto de sódio, cianeto de potássio, fosfato mono e dibásico de sódio, foram obtidos da Carlo Erba.

Etanol , fosfato mono e dibásico de potássio, da Qeel Ind. Químicas S.A.

Acetato de sódio da Dyne Produtos Químicos; Ácido acético da J.T.Baker e sulfato de manganês da BDH Chem. Ltda.

Todos os reagentes foram de pureza analítica e usados diretamente, exceto ácido fólico que foi previamente purificado.

I.2 - Aparelhagem

As pesagens foram efetuadas em uma balança Mettler Modelo ME-22.

Para o controle de pH, utilizou-se um potenciômetro da Methrom Herisau Modelo E-512.

As medidas de absorção na região do ultra-violeta e visível, foram registradas num espectrofotômetro da Zeiss DMR-21.

Para os estudos de foto-emissão, utilizou-se um contador de cintilação líquida Beckman Modelo LS-100c, com o circuito de coincidência desligado.

Os espectros de excitação e emissão, foram registrados num espectrofluorímetro da Perkin-Elmer, modelo MPF 44B.

As medidas de consumo de oxigênio, foram feitas em um monitor da Yellow Spring Inst, modelo 53, acoplado a um registrador da Phillips, modelo 8202.

Para obtenção do soro sanguíneo, utilizou-se uma centrífuga da Sorval super speed, modelo RC-2B.

Para as cromatografias preparativas, foi utilizado o papel 3-MM. A lâmpada UV usada para revelação cromatográfica é da Ultra-Violet Products Inc., modelo-IVSL-25.

II - PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

II.1 - Solução de Malonaldeído(M.A)

M.A foi sintetizado em nosso laboratório, tendo como composto de partida, tetra-etóxi propano, seguindo-se o procedimento de Farias-Furtado(95). 20,68 mg de M.A (PM=94 g) são dissolvidos em 0,1 ml de água destilada, para uma concentração estoque de 2,2M. Esta solução deve ser renovada a cada experimento.

II.2 - Solução de xantina-oxidase(X-0).

A solução estoque(1,5 mg/ml) de X-0 de leite (PM=300.000) é preparada pela dissolução de 28,6 μ l de enzima comercial(10,5 mg/ml), em 0,2 ml de água destilada. A mesma, deve ser conservada em gelo, para evitar desnaturação.

II.3 - Solução de ácido fólico (Afo)

44,14 mg de Afo (PM=441,41 g) purificado, são dissolvidos em 1,0 ml de solução aquosa de NaOH a 20% para uma concentração de $10^{-1}M$, e estocada no escuro para evitar foto-decomposição.

II.4 - Solução de glutatona (glut)

A solução $10^{-1}M$ de glutatona (PM=307,3 g) foi preparada pela dissolução de 30,73 mg do composto em 1,0 ml de tampão fosfato de sódio (0,5M, pH 5,5) e estocada no escuro para evitar foto-decomposição.

II.5 - Solução de HRP tipo VI

A solução estoque de HRP (PM=40.000), foi preparada dissolvendo-se 4 mg de enzima em 1,0 ml de água destilada para se obter uma concentração aproximada de $10^{-4}M$. Após a preparação da solução, lê-se a intensidade de absorção na região visível ($\lambda = 403 \text{ nm}$) diluindo-se 3,0 μl da solução estoque em 2,5 ml de água. A concentração (c') é calculada por :

$$A = \epsilon l c'$$

onde ϵ é o coeficiente de extinção molar de HRP neste comprimento de onda e vale $102.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (105), e l , o comprimento do caminho óptico (1cm). Sabendo-se c' , a concentração real da solução é dada por :

$$c = \frac{2,5 \text{ ml} \times c'}{3,0 \times 10^{-3} \text{ ml}}$$

II.6 - Solução de bilirrubina

Para uma solução estoque $10^{-1}M$, dissolveu-se 58,47 mg de bilirrubina (PM=584,7 g) em 1,0 ml de solução aquosa de NaOH 5%. Esta solução deve ser estocada no escuro para evitar foto-oxidação para biliverdina, devendo portanto ser renovada a cada experimento.

II.7 - Solução de 2-amino-4-hidroxi-pteridina (AHP)

A solução estoque ($5,0 \times 10^{-4}M$) de AHP (PM=163,12g) é preparada, dissolvendo-se 0,815 mg de AHP em 10,0 ml de água destilada, adicionando-se algumas gotas de NaOH 0,2N. É aconselhável aquecer-se levemente esta solução antes de cada experimento, a fim de se obter um maior grau de homogeneidade.

II.8 - Solução de guanosina

28,32 mg de guanosina (PM=283,2 g) são dissolvidos em 1,0 ml de água destilada com algumas gotas de NaOH 0,2N, para dar uma concentração estoque de $10^{-1}M$.

II.9 - Solução de azul de metileno (MeB) e Eosina

7,48 mg de MeB (PM=374,0 g) e 1,4 mg de Eosina (PM=698,0 g) foram dissolvidos separadamente em 2,0 ml de água destilada, dando uma solução estoque de 10^{-2} e $10^{-3} M$ respectivamente. As soluções de corantes devem ser protegidas da luz e renovadas a cada experimento.

II.10 - Solução de sulfato de quinino

Esta solução foi preparada, tomando-se 6,25 ml de sulfato de quinino comercial (PM=782,97g) de concentração igual a $1,28 \times 10^{-3}$ M em 0,1N de H_2SO_4 , e diluindo a 5,0 ml com H_2SO_4 0,1N, obtendo-se uma solução 1,6 μ M.

II.11 - Solução de acetaldeído

A solução de acetaldeído (PM=44,0 g) deve ser destilada a cada experimento (P.E=21,0°C), para obtenção de sua forma monomérica. Em seguida, toma-se 35,0 μ l do destilado e dilui-se a 10,0 ml com tampão carbonato de sódio (0,5 M, pH 10,0).

II.12 - Soluções tampão

A preparação dos tampões foi feita, segundo o método de Gomori (107). Para a preparação do tampão deutera-do, considerou-se : $pH = pD + 0,4$ (108).

II.13 - Soluções de superóxido dismutase (SOD) e catalase

1,034 mg de SOD (PM=32.500) e 2,0 mg de catalase (PM=200.000), são dissolvidas separadamente em 1,0 ml de água destilada, para dar uma solução estoque de aproximadamente 3000 u/mg de sólido. Estas soluções foram desnaturadas aquecendo-se uma alíquota de cada uma das soluções estoque, por um período de 6 horas.

II.14 - *Soluções de supressores*

Histidina (PM=209,63 g), benzoato de sódio (PM=144,0 g) e manitol (PM=182,17 g), foram todos dissolvidos em água destilada, para dar soluções estoque 10^{-1} M.

II.15 - *Solução de alopurinol*

A solução estoque de alopurinol (PM=136,0 g) foi preparada, dissolvendo-se 15,0 mg do composto em 5,0ml de água destilada, dando uma concentração de $2,2 \times 10^{-2}$ M.

III - *MÉTODOS*

III.1 - *Purificação do ácido fólico*

Ácido fólico comercial foi purificado através de sucessivas cromatografias preparativas em papel 3-MM utilizando NH_4OH 1% como solvente de arraste. As manchas fluorescentes atribuídas à contaminação por Pterin-6-aldeído foram desprezadas, e a fração com $R_f=0$ atribuída ao ácido fólico puro, foi redissolvida em NaOH 0,1N. Sua concentração (0,88M) foi determinada através da leitura de intensidade de absorção, utilizando-se os valores dos coeficientes de extinção molar $\epsilon_{255} = 565 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{282} = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; e $\epsilon_{365} = 195 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (109).

III.2 - Calibração do espectrofluorímetro

O espectrofluorímetro foi calibrado para sensibilidade máxima, usando-se uma solução de sulfato de quinino $1,28 \times 10^{-3} \text{M}$ em H_2SO_4 0,1N segundo o método de Chen (110). As condições do aparelho foram testadas, mantendo-se $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ e observando-se $\lambda_{\text{emis}} = 456 \text{ nm}$. As condições ideais foram ajustadas para se obter um pico em cerca de 80% do papel.

III.3 - Obtenção do soro sanguíneo

O soro sanguíneo foi obtido, deixando-se as amostras de sangue decantarem à temperatura ambiente. A seguir, a separação do plasma é efetuada através de uma centrifuga refrigerada (10 min a $11.000 \times g^*$).

A concentração aproximada de proteína no soro, foi calculada, aplicando-se a seguinte fórmula (103) :

$$C = 1,45 A_{280} - 0,74 A_{260} \quad (\text{mg proteína/ml})$$

As alíquotas de soro sanguíneo para determinação das concentrações foram dissolvidas em soro fisiológico.

III.4 - Preparação do soro fisiológico

O soro fisiológico consiste de uma mistura de fosfato de sódio dibásico (0,0088M), fosfato de sódio monobásico (0,001M) e cloreto de sódio (0,139M) para $\text{pH} = 7,4$ (111).

* $11.000 \times g = "11.000 \text{ vezes a aceleração da gravidade terrestre}"$.

III.5 - *Determinação de inativação de X-O*

O ensaio fluorimétrico é baseado na conversão do substrato 2-amino-4-hidróxi-pteridina(AHP) para o produto fluorescente 2-amino-4,7-dihidróxi-pteridina(ADHP), catalisada por X-O. As medidas de inativação enzimática foram baseadas no decréscimo da emissão fluorescente do produto ADHP a 421 nm , com $\lambda_{exc} = 355$ nm.

III.6 - *Determinação da atividade de X-O no soro sanguíneo*

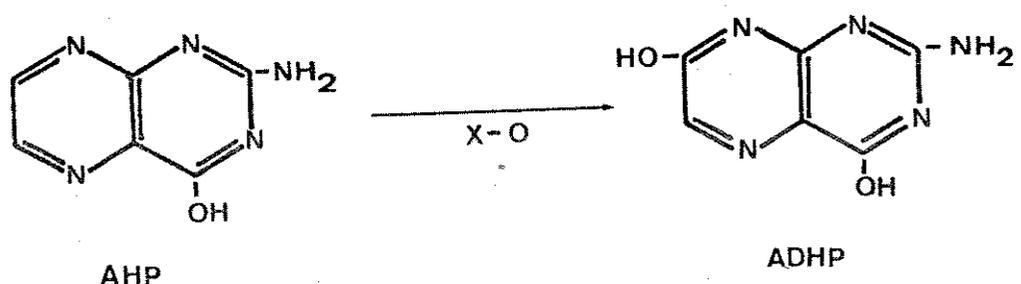
A atividade de X-O no soro sanguíneo de paciente normais e portadores de cancer, foi realizada num contador de cintilação líquida. O ensaio foi baseado no método de Hodgson e Fridovich(88) utilizando acetaldeído 10 mM como substrato, em tampão carbonato de sódio 0,5M , pH = 10,0.

A especificidade da atividade de X-O no soro é medida através do uso de alopurinol (0,22mM), um potente inibidor enzimático.

Capítulo 3

RESULTADOS

Baseando-se nos experimentos feitos por Haining e Legan (112) e também por McHale e col. (113), tentou-se inicialmente investigar as condições ótimas de reação para a oxidação de AHP para o produto fluorescente ADHP, catalisada por X-O (ítem III.5 da parte experimental).



Conhecidas as condições ótimas de reação, investigamos o comportamento do sistema sob irradiação em presença e ausência dos sensibilizadores MeB e Eosina. A partir desses dados, foi analisada a especificidade do sistema com cada um dos sensibilizadores em termos de espécies ativas de oxigênio produzidas.

Concluído o estudo fotoquímico, passamos então a analisar a influência de sistemas enzimáticos produtores de espécies excitadas, na atividade de X-O, com a finalidade de se comparar os efeitos provocados por ambos os métodos.

Foram estudados os sistemas Malonaldeído(M.A)/HRP/ Mn^{+2}/O_2 (57,58) e ácido fólico(AFo)/HRP/glutathiona(glut)/catalase/ Mn^{+2}/O_2 (57), ambos geradores específicos de 1O_2 , na atividade catalítica de X-O.

Os efeitos dos sistemas fotoquímico e bioenergizado , foram comparados em termos de porcentagem de inativação enzimática sob os diferentes tratamentos.

Finalmente, investigou-se a atividade de X-O no soro sanguíneo de pessoas portadoras de cancer, comparando-se com o soro de pessoas normais e com X-O obtida comercialmente.

Os resultados, portanto, serão discutidos baseando-se nesta ordem de comentários.

I - SISTEMA XANTINA-OXIDASE(X-O)/2-AMINO-4-HIDRÓXI-PTERIDI
NA(AHP)/O₂

I.1 - Análise de condições ótimas de reação

A mistura de reação consiste de : tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,8, com EDTA 0,1mM ; AHP $4,5 \times 10^{-6}$ M e X-O $2,0 \times 10^{-8}$ M, perfazendo um volume total de 2,5 ml.

Investiga-se inicialmente o tempo adequado de reação. Deixou-se a mistura reagindo por diferentes tempos e observou-se que, entre 20 e 30 minutos, não houve muita variação na intensidade da banda de emissão do produto fluorescente ADHP a 421 nm.

Concluiu-se então, por um tempo ótimo de reação de 30 minutos para garantir o máximo de produto.

I.2 - Análise do tempo ótimo de irradiação

I.2.a - Azul de Metileno(MeB) como sensibilizador

O sistema de reação do item I.1 (menos o substrato AHP), foi irradiado no espectrofluorímetro em presença de MeB($1,6 \times 10^{-4}$ M). Essa irradiação foi efetuada a 694 nm, correspondente ao comprimento de onda de excitação de MeB neste pH.

Após a irradiação a diferentes tempos, adicionamos o substrato AHP e observamos um decréscimo na intensidade da banda de emissão de ADHP(Fig. 1).

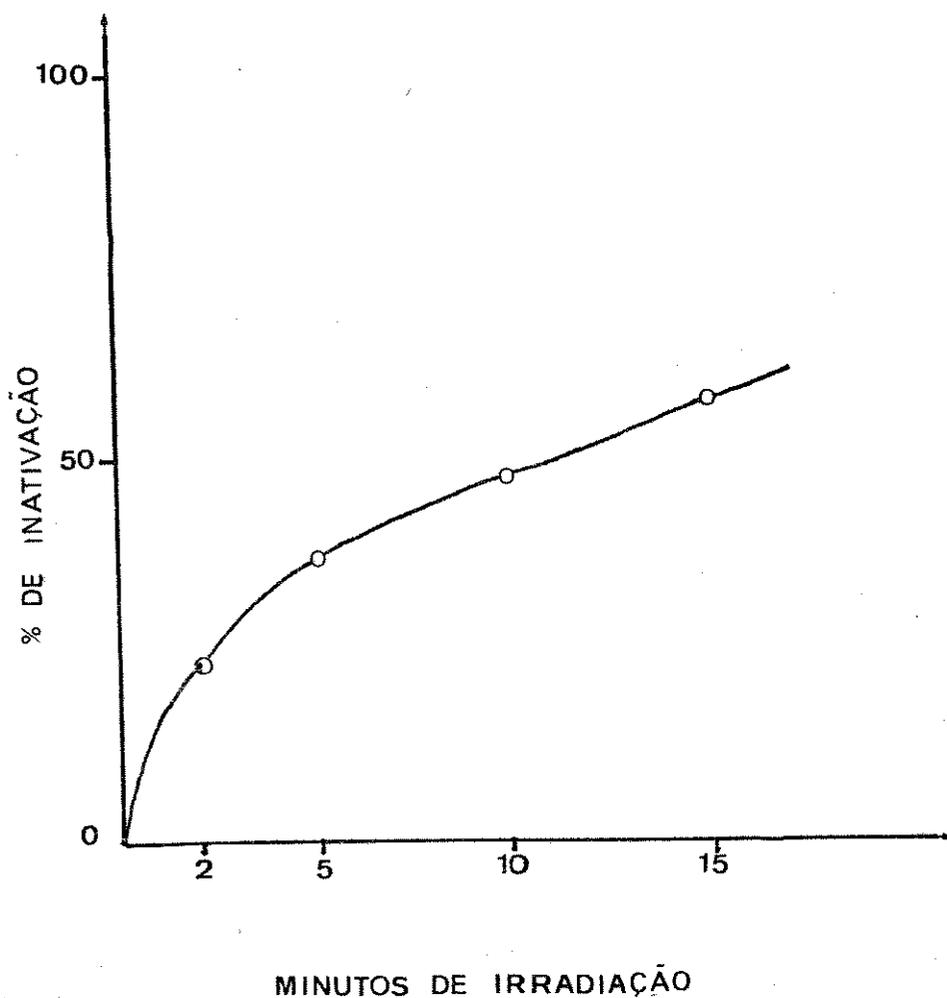


Fig. 1 - Estudos de foto-inativação enzimática usando o sistema : X-O ($2,0 \times 10^{-8}M$)/AHP ($4,5 \times 10^{-6}M$)/MeB ($1,6 \times 10^{-4}M$). Irradiação feita a 694 nm em tampão fosfato de potássio 0,05M , pH 7,8.

Através da Fig. 1, podemos verificar que 10 minutos é um tempo adequado de irradiação, conseguindo-se neste espaço de tempo, uma redução de aproximadamente 50% na atividade de X-O.

Isto nos permite avaliar as modificações introduzidas pelos diversos tratamentos a que nos propomos realizar.

I.2.b - Eosina como sensibilizador

O sistema de reação do item I.1 (menos o substrato AHP), foi concentrado em tampão fosfato de sódio 0,05M (pH = 6,2) (11) e irradiado no espectrofluorímetro em presença de Eosina $10,0 \mu\text{M}$. Essa irradiação foi efetuada a 500 nm, correspondente ao comprimento de onda de excitação do corante, neste pH.

Após a irradiação a diferentes tempos, o sistema é diluído a 2,5 ml com tampão fosfato de potássio 0,05M (pH = 7,8), que é o meio de reação para teste de atividade de X-O, e o substrato AHP é adicionado.

Nesta etapa, é seguido o mesmo procedimento do item I.2.a e, igualmente observamos um decréscimo na atividade de X-O, que pode ser visto na Fig. 2.

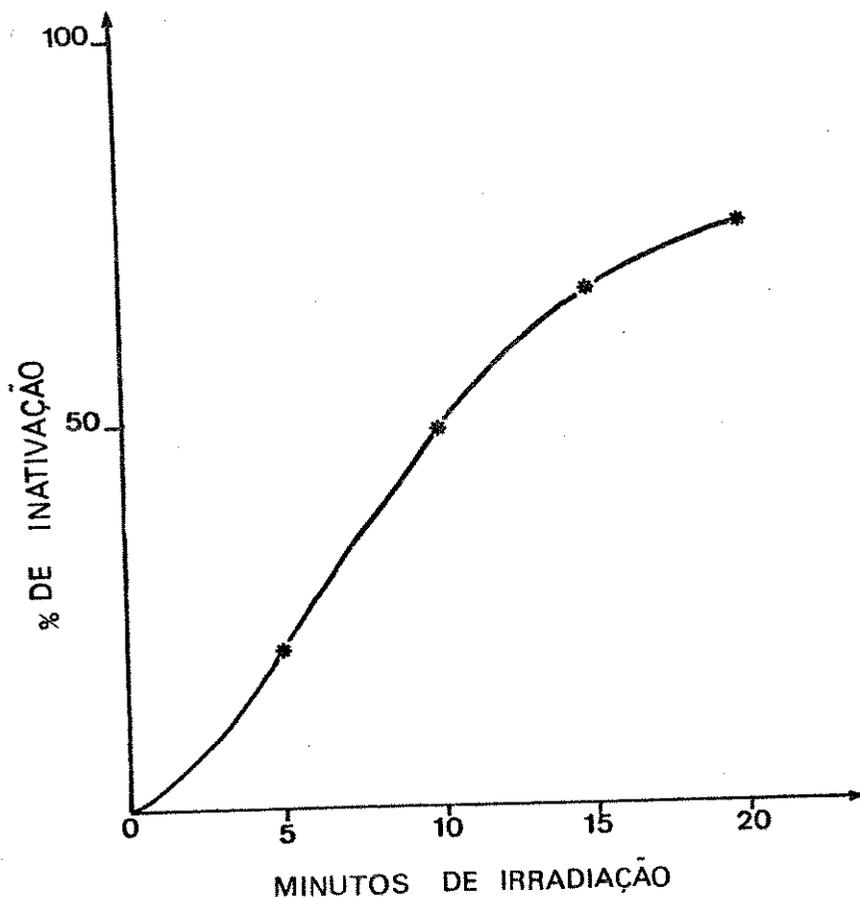


Fig. 2 - Estudos de foto-inativação enzimática usando o sistema : X-O($2,0 \times 10^{-8}\text{M}$)/AHP($4,5 \times 10^{-6}\text{M}$)/Eosina($10,0 \times 10^{-6}\text{M}$). Irradiação feita a 500 nm em tampão fosfato de sódio 0.05M , pH 6.2.

I.3 - Estudos com supressores

Este estudo, tem por objetivo, investigar as possíveis espécies que estariam sendo geradas através do processo de irradiação foto-sensibilizada.

Os sistemas de reação dos itens I.2.a (com MeB) e I.2.b (com Eosina) foram irradiados nos respectivos comprimentos de onda de excitação em presença de supressores específicos para cada espécie ativa de oxigênio, cuja presença ou ausência, se investigava.

Observa-se que no caso de MeB (Tab. 1) todos os supressores utilizados forneceram proteção ao sistema, o mesmo não acontecendo com Eosina (Tab. 2), onde somente histidina e guanossina foram efetivos.

I.4 - Estudos com óxido de Deutério (D_2O)

Conforme foi observado no item III.3(pg.17), o uso de tampão deuterado, visa confirmar a participação de 1O_2 no processo de irradiação foto-sensibilizada.

As variações nas porcentagens de inativação enzimática introduzidas pela substituição do tampão aquoso por deuterado, durante este processo, podem ser vistas na Tab.3.

Tabela 1 - *Investigação de espécies ativas de oxigênio na foto-inativação de X-0 sensibilizada por MeB^a*

	% de inativação	% de proteção ^b
Controle	45,2	—
+ 5 mM de guanosina	14,8	67,3
+ 5 mM de histidina	27,6	39,0
+ 5 mM de manitol	8,9	80,3
+ 10 mM de manitol	6,5	85,7
+ 5 mM de benzoato de sódio	0,0	100,0
+ 50 unidades de SOD	19,9	56,0
+ 50 unidades de SOD (desnat.)	59,3	0,0
+ 50 unidades de catalase	0,4	99,1
+ 50 unidades de catalase (desnat.)	8,8	80,5

a) Sistema controle : X-0($2,0 \times 10^{-8}M$) / AHP($4,5 \times 10^{-6}M$) / MeB($1,6 \times 10^{-4}M$) / tampão fosfato de potássio 0,05 M ; pH 7,8 .

b) As porcentagens de proteção foram calculadas em termos da porcentagem de inativação do controle sem supressor.

Tabela 2 - *Investigação das espécies ativas de oxigênio na foto-inativação de X-0 sensibilizada por Eosina^a*

	% de inativação	% de proteção ^b
Controle	49,2	—
+ 5 mM de histidina	15,8	67,9
+ 5 mM de guanosina	2,5	94,8
+ 5 mM de benzoato de sódio	47,0	4,5
+ 50 unidades de SOD	49,8	0,0
+ 50 unidades de catalase	8,4	82,9
+ 50 unidades de catalase (desnat.)	7,1	85,5

a) Sistema controle : X-0($2,0 \times 10^{-8}M$) / AHP($4,5 \times 10^{-6}M$) / Eosina($1,0 \times 10^{-6}M$) / tampão fosfato de potássio 0,05 M pH = 7,8 .

b) As porcentagens de proteção foram calculadas em termos da porcentagem de inativação do controle sem supressor.

Tabela 3 - Efeitos de D_2O na inativação de $X-O^a$

% de inativação		
	Eosina ^b	MeB ^c
H ₂ O	49,2	45,2
D ₂ O	73,8	83,2
D ₂ O/H ₂ O	1,5	1,8

a) As condições de reação são as mesmas descritas nas Tabelas 1 e 2.

b) Eosina ($1,0 \times 10^{-6} M$)

c) MeB ($1,6 \times 10^{-4} M$)

II - SISTEMA MALONALDEÍDO(M.A)/HRP/Mn⁺²/O₂

II.1 - Cálculo da Constante de Stern-Volmer (K_{sv}) para X-O.

Este experimento tem como objetivo, a determinação do grau de supressão de X-O com o sistema M.A/HRP / Mn⁺²/O₂, através do cálculo de K_{sv} .

O sistema de reação utilizado, se constitui de: M.A (10,48 mM), sulfato de manganês(3,13 mM), tampão acetato de sódio 0,2M (pH = 4,8) e solução de HRP tipo VI(2,29 x 10⁻⁶M), num volume final de 3,0 ml.

A operação de adição dos reagentes e colocação no contador de cintilação líquida para posterior leitura, deve ser feita de maneira rápida pois, o máximo de emissão fotônica, é obtido nos primeiros 5 minutos(95).

O gráfico da relação de Stern-Volmer, nos dá uma linha reta, cujo coeficiente angular é igual a K_{sv} (Ver apêndice 1). Através da Fig. 3, obtivemos para X-O um valor de K_{sv} igual a 5,0 x 10⁷M⁻¹. Encontrou-se portanto, uma eficiente supressão de X-O sobre a emissão de ¹O₂ gerado neste sistema.

II.2 - Estudos de inibição

II.2.a - Método bioenergizado

Este experimento, tem por objetivo, investigar o comportamento inibidor de X-O pela emissão fotônica atribuída a ¹O₂ gerado no sistema de reação do item II.1 em competição com histidina, um conhecido supressor desta espécie(95).

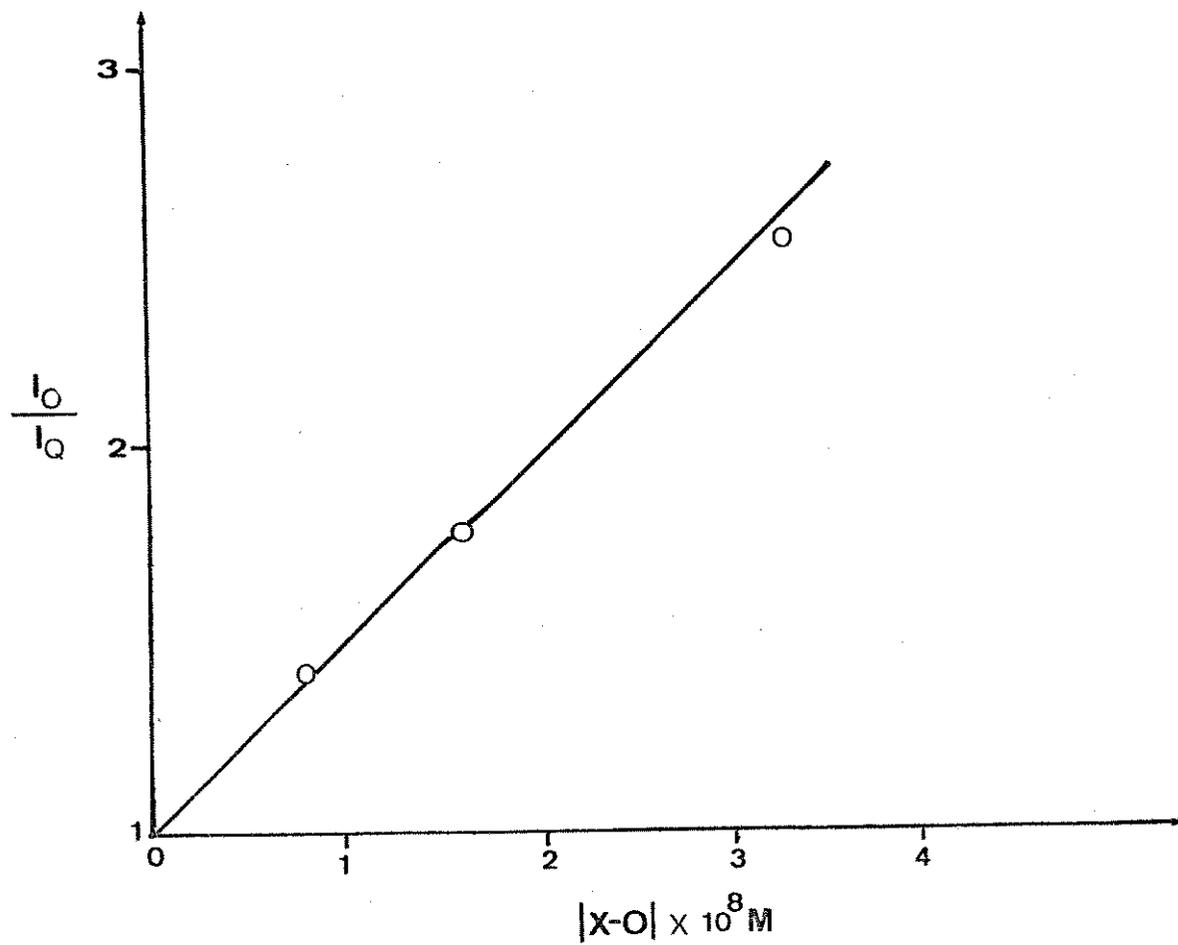


Fig. 3 - Cálculo da constante de Stern-Volmer (K_{sv}) para Xantina-Oxidase.

Sistema utilizado : M.A(10,48 mM); HRP(2,29 $\times 10^{-6}$ M) ; Mn^{+2} (3,13 mM)

$$K_{sv} = 5,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$$

Inicialmente, fizemos um controle da emissão do sistema na ausência dos supressores. A partir daí, fixamos uma concentração de histidina e variamos a concentração de X-O.

As medidas de intensidade, foram lidas no contador de cintilação líquida e integradas de 12 em 12 segundos. Os valores reais tomados, representam uma média entre várias determinações e podem ser vistos nas Figs. 4 e 5.

Através do gráfico $I_0/(I_0 - I_Q)$ vs $1/[X-O]$ onde I_0 e I_Q , são as intensidades máximas de emissão na ausência e em presença do supressor, obtivemos $\alpha_1 = 1,58 \times 10^{-8}$ e $\alpha_2 = 0,71 \times 10^{-8}$, sendo α_1 e α_2 , os coeficientes angulares das retas 1 e 2.

Este gráfico nos indica que X-O se comporta como um inibidor competitivo (Ver apêndice 1, pg.93) em relação a histidina frente a emissão de 1O_2 gerado neste sistema.

II.2.b - Método foto-sensibilizado

Para a realização deste experimento, utilizou-se o sistema de reação do item I.2.b, pg.43, com Eosina como sensibilizador.

O procedimento do item anterior foi repetido para X-O e histidina, sendo as medidas desta feita, obtidas num espectrofluorímetro, através do decréscimo de emissão fluorescente do produto ADHP (Fig. 6).

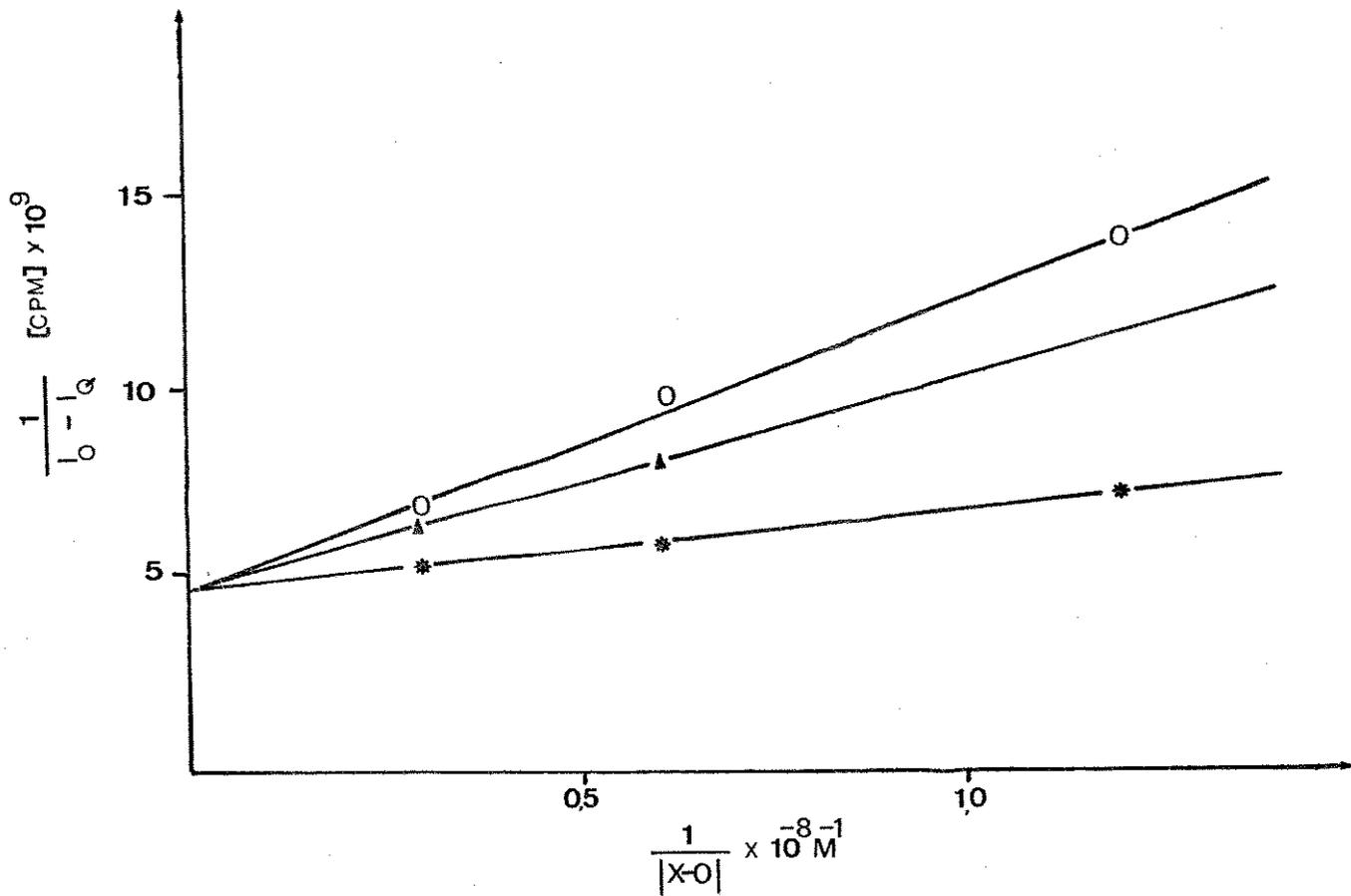


Fig. 4 - Gráfico duplo-recíproco para o sistema M.A(10,48 mM)/HRP($2,29 \times 10^{-6} M$)/Mn⁺²(3,13mM) em tampão acetato de sódio 0,2M, pH 4,8 . (-O-) - 0,0M de histidina, (-▲-) - $0,33 \times 10^{-3} M$ de histidina, (-*) - $10,00 \times 10^{-3} M$ de histidina.

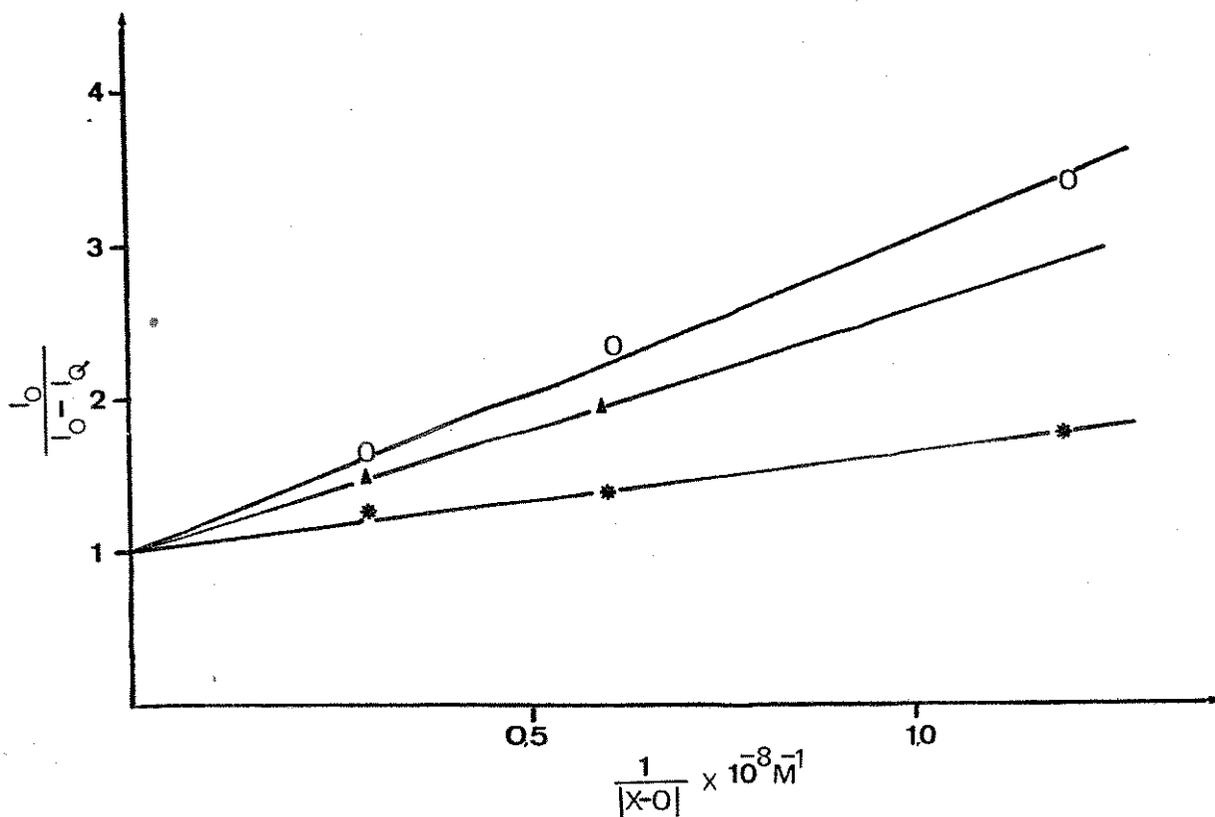


Fig. 5 - Gráfico da supressão da energia do sistema
 M.A(10,48 mM)/HRP(2,29 x 10⁻⁶M)/Mn⁺²(3,13mM)
 em tampão acetato de sódio 0,2M , pH 4,8.
 (-O-) - 0,0M de histidina, (-Δ-) - 0,33 x 10⁻³M
 de histidina, (-*) - 10,00 x 10⁻³M de histi-
 dina.

$$\alpha_1 = 1,58 \times 10^{-8} \quad e \quad \alpha_2 = 0,71 \times 10^{-8}$$

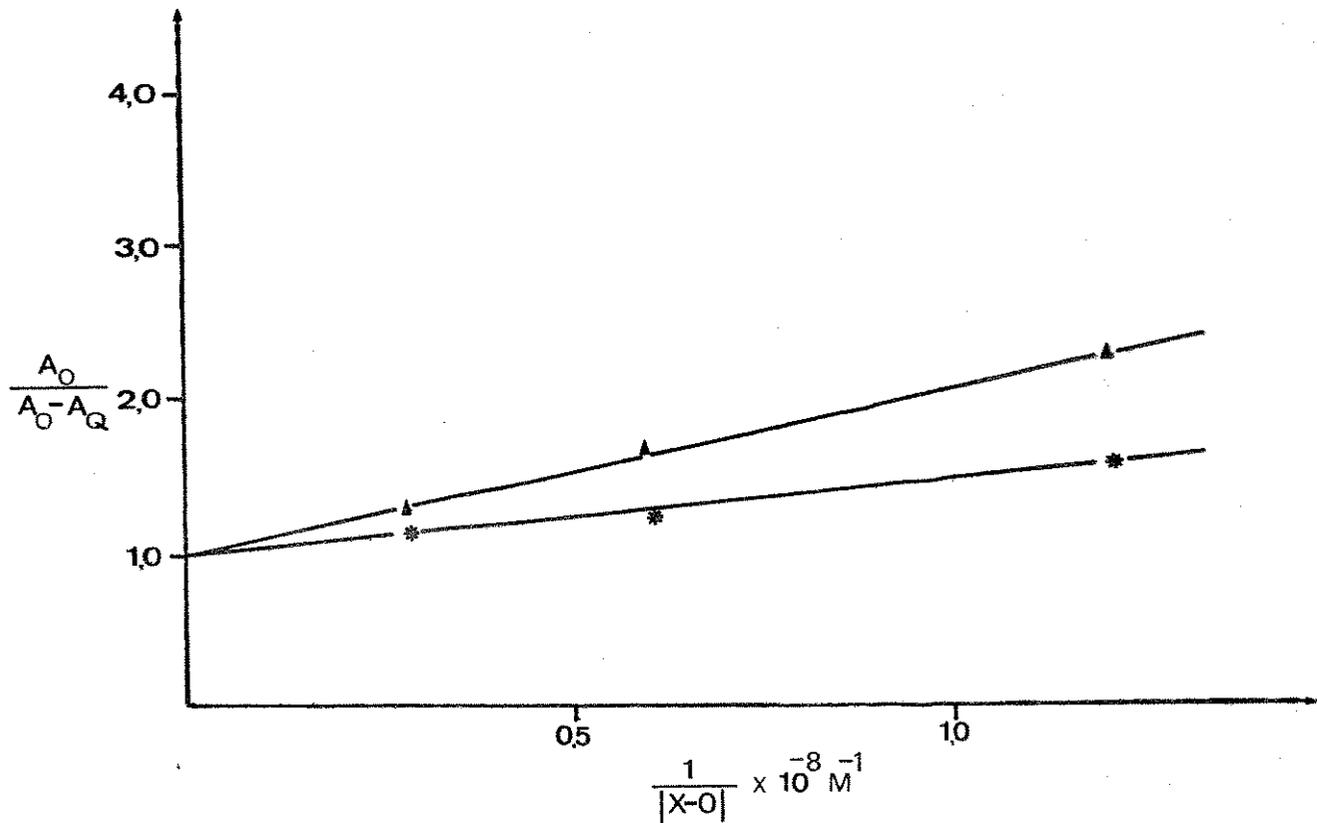


Fig. 6 - Gráfico de supressão de energia do sistema AHP($4,5 \times 10^{-6} \text{ M}$)/ Eosina($1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$), irradiado a 500 nm em tampão fosfato de sódio 0,05M , pH 6,2. Atividade enzimática medida em tampão fosfato de potássio, 0,05M, pH 7,8.

(-▲-) - $0,33 \times 10^{-3} \text{ M}$ de histidina
 (-*-) - $10,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ de histidina
 $\alpha_1 = 1,11 \times 10^{-8}$ e $\alpha_2 = 0,53 \times 10^{-8}$

Através do gráfico $A_0/(A_0 - A_Q)$ vs $1/|X-O|$ onde A_0 e A_Q são as atividades máximas da enzima na ausência e em presença do supressor, confirmamos o comportamento de inibidor competitivo de X-O em relação a histidina. Da mesma forma, obtivemos $\alpha_1 = 1,11 \times 10^{-8}$ e $\alpha_2 = 0,50 \times 10^{-8}$. Estes valores são coincidentes com os obtidos por medida de emissão fotônica, dentro do erro experimental.

III - ESTUDOS DOS EFEITOS DE 1O_2 GERADO BIOENERGIZADAMENTE NA ATIVIDADE DE X-O

Para fins de comparação com o sistema foto-químico, tentamos analisar os efeitos de 1O_2 gerado através do sistema M.A/HRP/Mn⁺²/O₂ sobre a atividade de X-O.

Como um passo inicial, fizemos um estudo da influência de cada componente do sistema sobre a atividade enzimática. Cada um desses componentes, isoladamente, foi incubado por 10 minutos com X-O $2,0 \times 10^{-8}$ M e a mistura de reação concentrada em tampão acetato de sódio 0,2M, pH 4,8.

Após esse período, diluímos a amostra a 2,5 ml com tampão fosfato de potássio 0,05M, pH 7,8, e o substrato AHP é adicionado.

As medidas foram feitas no espectrofluorímetro seguindo o procedimento do item I.2.a. As variações introduzidas pela incubação de X-O com os diferentes componentes do sistema, e com o sistema total propriamente dito, são sumarizadas na Tab. 4. Observa-se que a incubação de M.A com a enzima nos dá um pronunciado efeito inativador.

Tabela 4 - Efeitos do sistema Malonaldeído na atividade de xantina-oxidase^a

	% de inativação
Controle	—
HRP + X-O	3,3
Mn ⁺² + X-O	0,0
M.A + X-O	95,2
HRP + M.A + X-O	96,5
HRP + M.A + X-O + Mn ⁺²	93,8

a) Sistema controle : X-O($2,0 \times 10^{-8}$ M) / AHP($4,5 \times 10^{-6}$ M) / tampão fosfato de potássio(0,05 M, pH 7,8). M.A(10,48mM) HRP($2,29 \cdot 10^{-6}$ M), Mn⁺²(3,13 mM). Tempo de incubação = 10 minutos.

III.1 - Estudos dos efeitos de Malonaldeído sobre X-O

Pela observação do efeito de M.A sobre X-O (Tab. 4), tornou-se necessário submeter este sistema a uma diálise prolongada por 22 horas a 0°C, visando investigar o tipo de ligação X-O/M.A.

Após a diálise (feita em tampão fosfato de potássio 0,05M, pH 7,8), o substrato AHP foi adicionado e novas leituras fluorimétricas foram obtidas (Tab. 5). Podemos observar que a % de inativação foi um pouco menor para o caso do sistema dialisado. Isto indica a complexidade do sistema M.A/HRP/Mn⁺²/O₂ em tempos longos de incubação.

Tabela 5 - Estudo dos efeitos de Malonaldeído sobre X-O após diálise^a

	% de inativação	
	não dialisado	dialisado
M.A + X-O	95,2	62,5
HRP + M.A + X-O + Mn ⁺²	93,8	56,7

a) M.A(10,48 mM) , HRP(2,29 x 10⁻⁶M) , Mn⁺²(3,13 mM) e X-O(2,0 x 10⁻⁸M). A diálise foi feita em tampão fosfato de potássio (0,05M , pH 7,8) por 22 horas a 0°C.

III.2 - Estudos espectrofluorimétricos

Neste experimento, foi investigada a influência de M.A sobre X-O através dos espectros de excitação e emissão da enzima, após incubação com M.A nas condições padrão descritas no item III.

As modificações causadas nos respectivos espectros de excitação e de emissão de fluorescência, podem ser vistas nas Figs. 7 , 8 , 9 e 10.

Através da distribuição espectral da enzima (Fig. 7), observa-se após a incubação de X-O com M.A, o desaparecimento dos picos na região de 300 a 400 nm, permanecendo o restante, praticamente inalterado. Excitando-se o sistema a 328 nm(Fig. 8), observa-se um pronunciado decréscimo na emissão a 370 nm após a incubação da enzima com M.A. Inversamente, excitando-se o sistema a 468 nm (Fig.9),

correspondente a parte flavínica, observa-se um aumento bastante significativo na emissão fluorescente a 554 nm, após esse tratamento. Este fato, embora menos pronunciado, ocorre também ao excitarmos o sistema a 400 nm (Fig.10).

III.3 - Consumo de oxigênio

Com o intuito de verificar se M.A estaria atuando como substrato para X-O, já que a mesma sofre mudanças drásticas após incubação com este composto, verificamos o consumo de oxigênio da reação.

Observa-se através da Fig. 11, que a velocidade de consumo de oxigênio de X-O incubada com M.A, não se alterou com respeito ao M.A isoladamente (auto-oxidação).

III.4 - Estudos de quimiluminescência

Sabe-se que acetaldeído é um bom substrato para X-O (88), dando origem a uma intensa quimiluminescência facilmente detectável num contador de cintilação líquida.

Em virtude de uma semelhança estrutural entre M.A e acetaldeído, foi conveniente verificar se M.A poderia atuar como substrato para X-O nas condições descritas por Hodgson e Fridovich (88).

O sistema de reação utilizado para este ensaio consiste de : tampão carbonato de sódio 0,5M, pH 10,0; X-O $2,0 \times 10^{-8}$ M e M.A 10,48 mM, num volume total de 3,0 ml. Através da Fig. 12, observa-se que não há diferença significativa entre a emissão do sistema controle e a emissão do sistema com M.A.

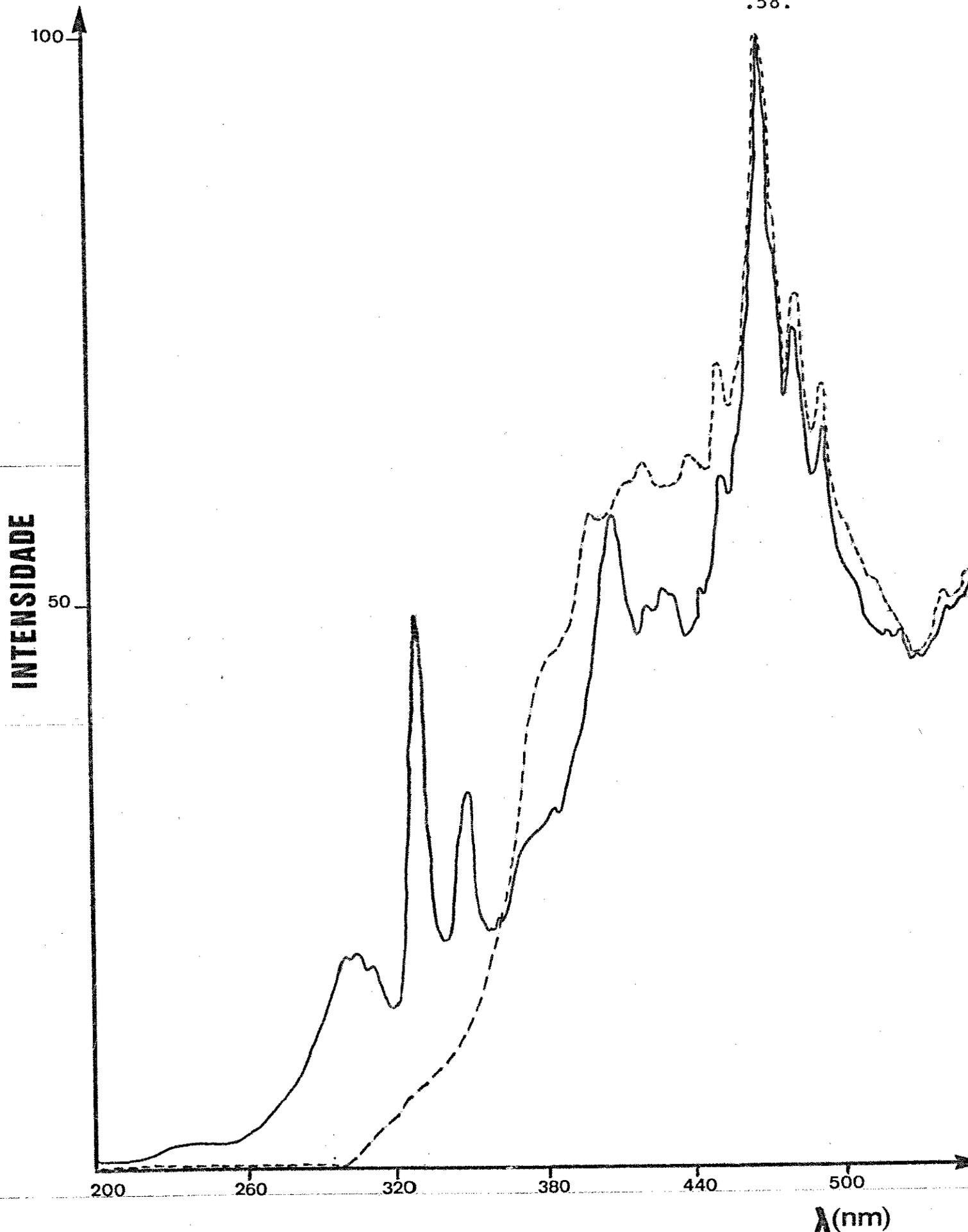


Fig. 7 - Distribuição espectral de X-0(—) e X-0 + M.A(---).
Condições padrão : M.A(10,48 mM), X-0($2,0 \times 10^{-8}$ M),
incubação feita por 10 min em tampão Acetato de sódio,
0,2M, pH 4,8. Atividade enzimática medida em tampão
fosfato de potássio 0,05M, pH 7,8.

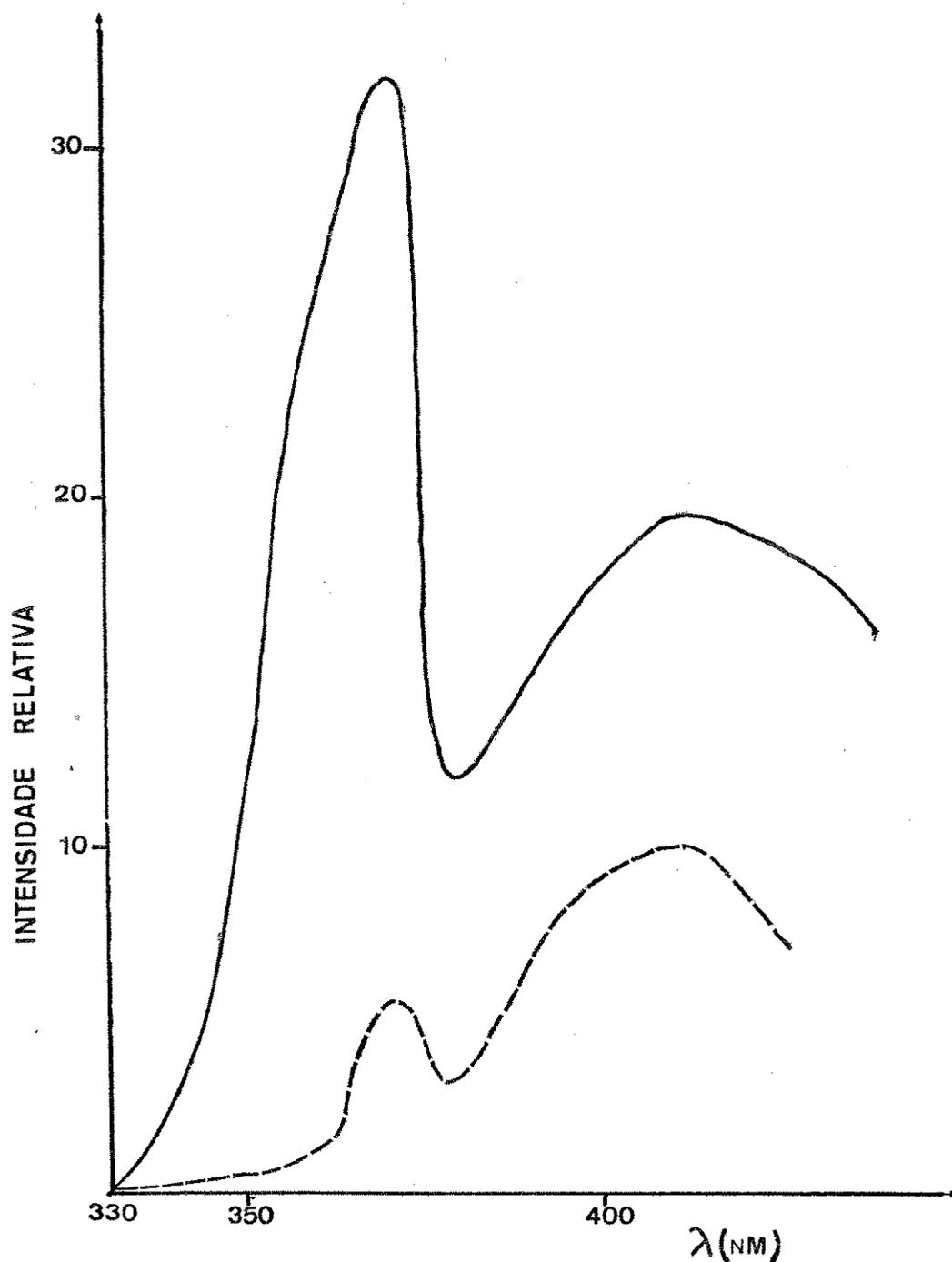


Fig. 8 - Gráfico de emissão fluorescente do sistema

(---) - M.A(10,48 mM)/X-0($2,0 \times 10^{-8} M$)

(—) - X-0($2,0 \times 10^{-8} M$)

A enzima foi incubada com M.A por 10 min em tampão acetato de sódio 0,2M, pH 4,8, e a emissão fluorescente registrada em tampão fosfato de potássio 0,05M, pH 7,8 com $\lambda_{exc} = 328 \text{ nm}$.

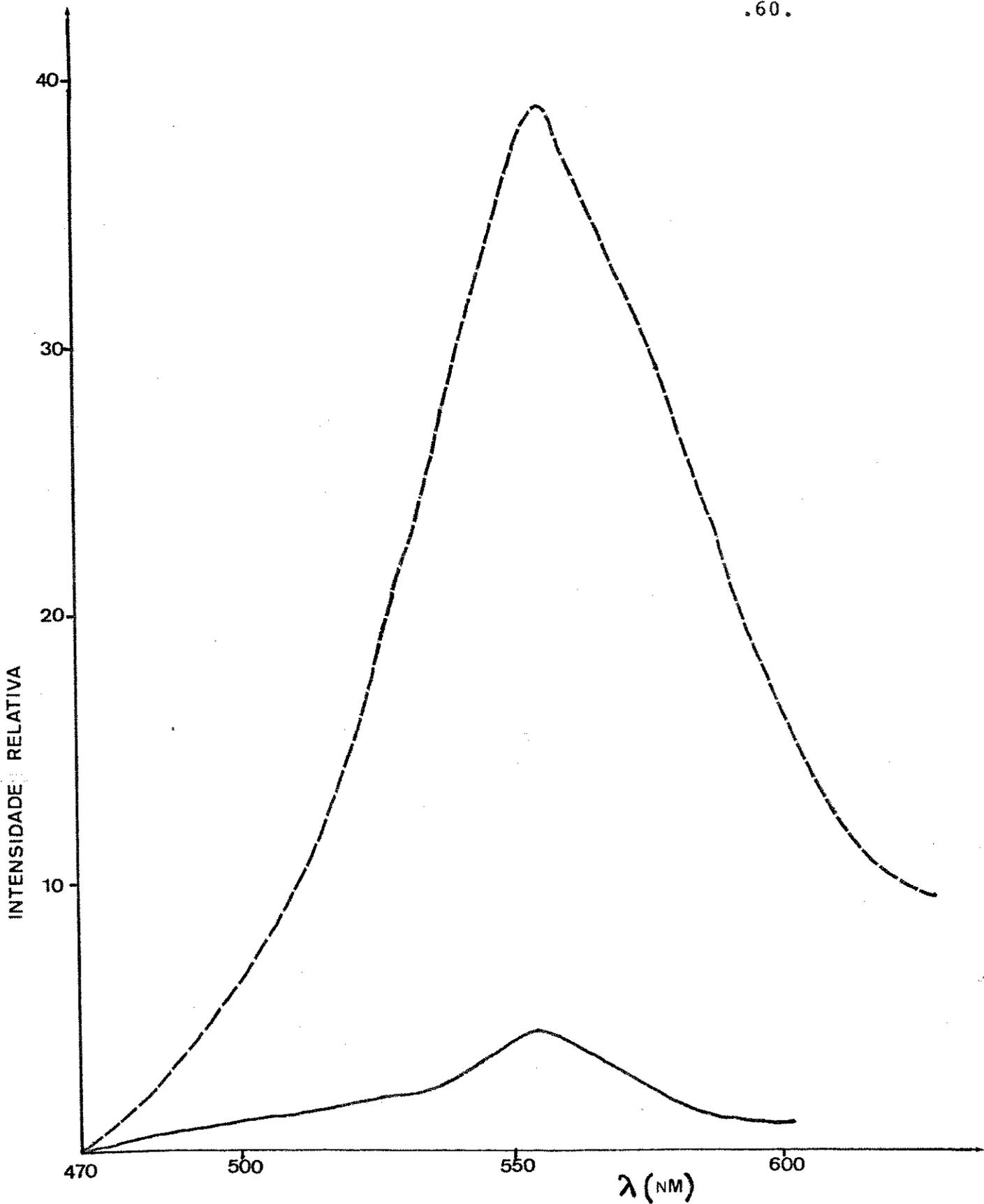


Fig. 9 - Gráfico de emissão fluorescente do sistema

(---)- M.A/X-0 ; (—)- X-0

Condições padrão descritas na Fig. 8.

$\lambda_{exc} = 468 \text{ nm.}$

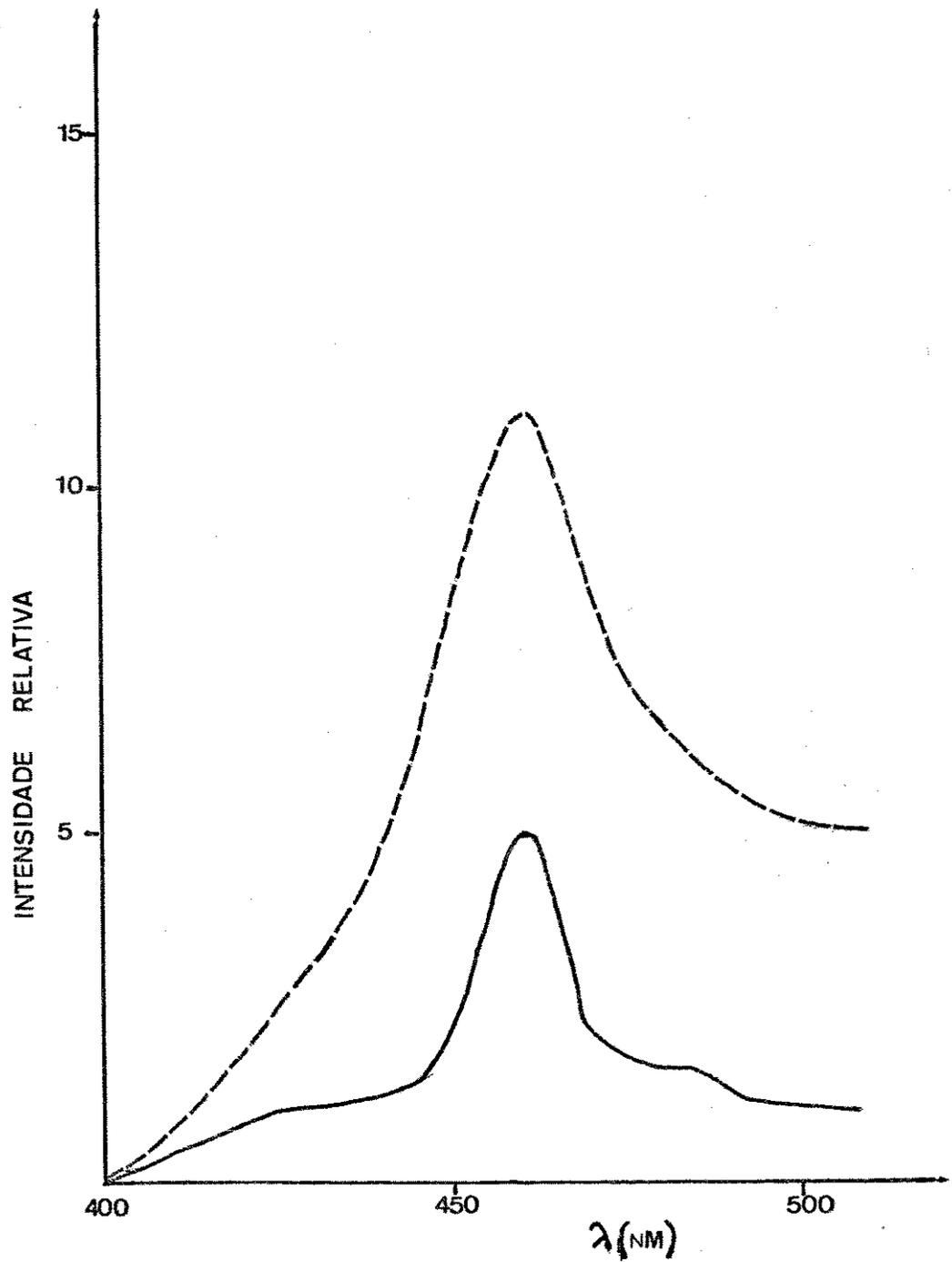


Fig. 10 - Gráfico de emissão fluorescente do sistema

(---) - M.A/X-0 ; (—) - X-0

Condições padrão descritas na Fig. 8

$\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$

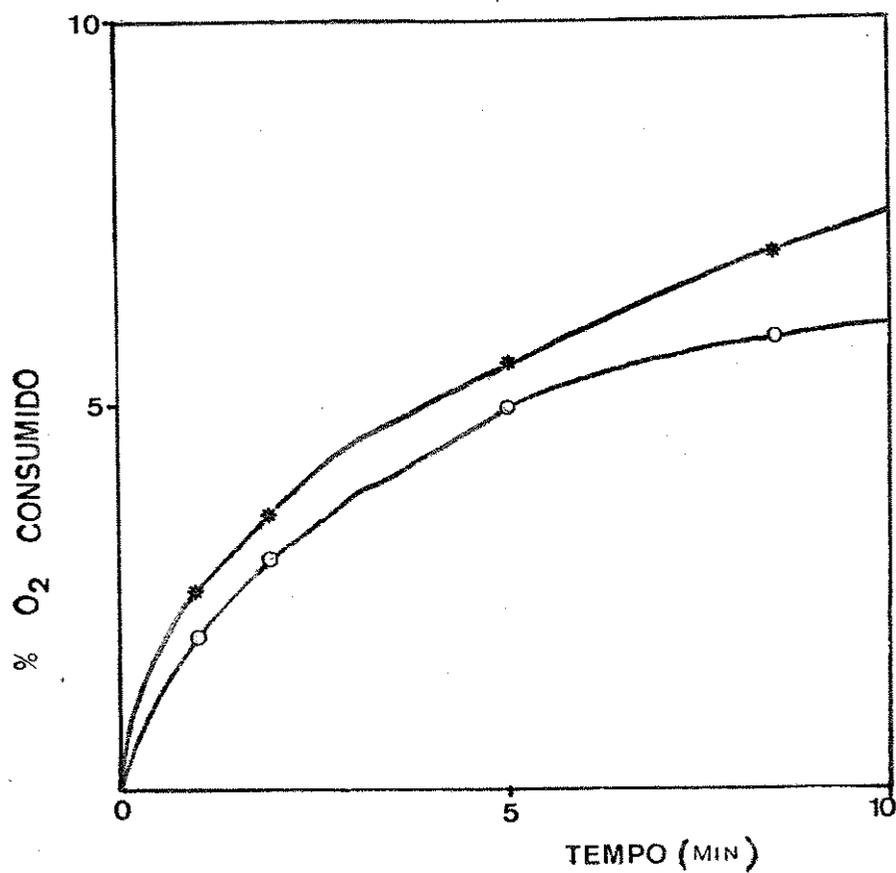


Fig. 11 - Gráfico da cinética de consumo de oxigênio da reação M.A(10,48 mM) / X-O($2,0 \times 10^{-8} M$) (-*-) comparando-se com M.A (-O-), ambas em tampão acetato de sódio 0,2M, pH 4,8.

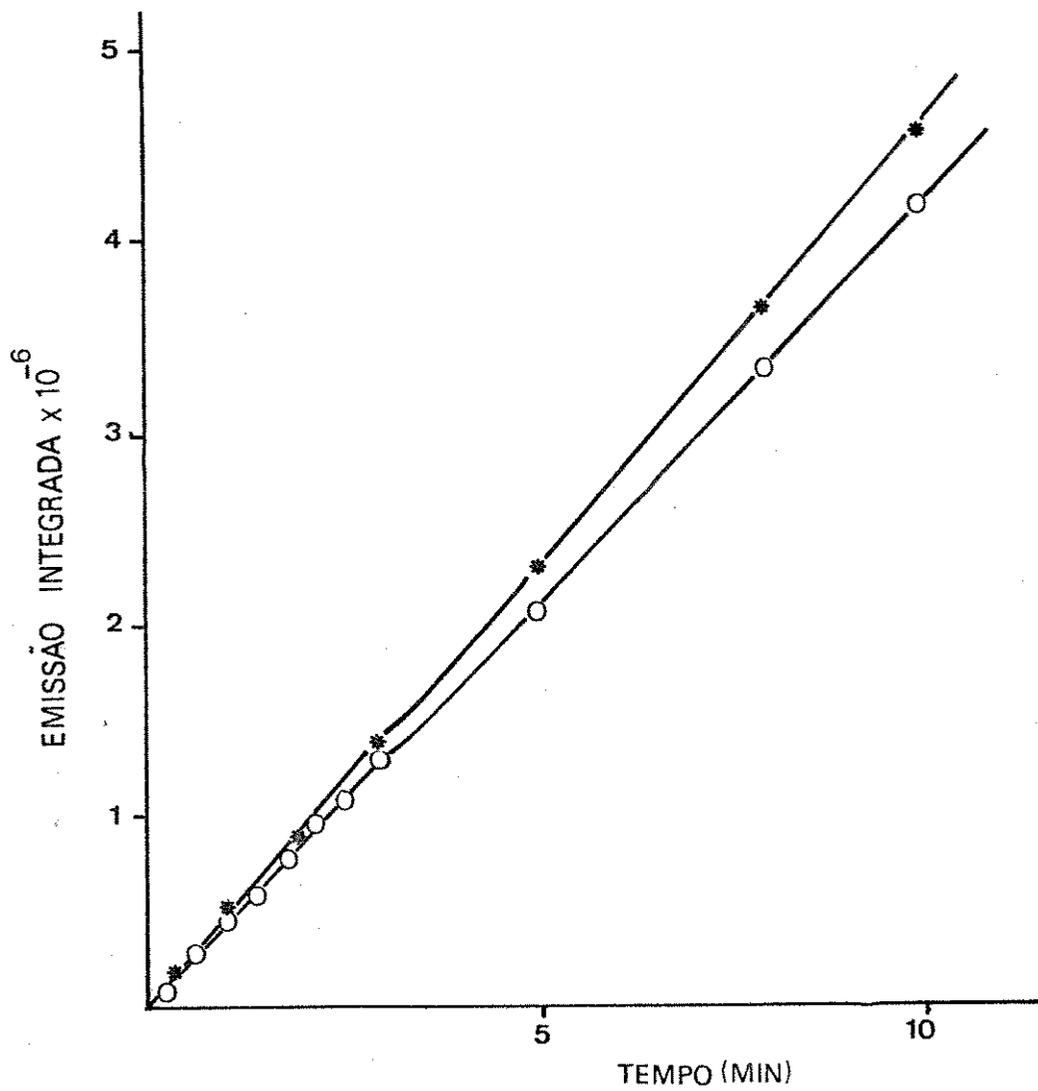


Fig. 12 - Gráfico da cinética de emissão integrada do sistema (-O-)M.A(10,48mM)/tampão carbonato de sódio 0,5M, pH 10,0 e (*-)M.A/tampão/X-O($2,0 \times 10^{-8}$ M).

IV - SISTEMA ÁCIDO FÓLICO (AFO)/HRP/GLUTATIONA(Glut)/CATALASE/Mn⁺²/O₂

Em vista dos resultados complexos obtidos com o sistema Malonaldeído, estudamos o efeito de um outro sistema bioenergizado gerador de ¹O₂, que é o sistema AFO, sobre a atividade de X-O.

O sistema total de reação se constitui de :AFO (1,2 x 10⁻³M); HRP tipo VI(2,2 x 10⁻⁶M); Glut.(5,0 x 10⁻⁴M); catalase(150 unidades/ml) e Mn⁺²(77,5 x 10⁻⁶M).

Inicialmente, de acordo com o procedimento do item III, fizemos um estudo sobre a influência de cada componente do sistema sobre a atividade enzimática. Os diferentes componentes foram incubados com a enzima por 5 minutos em tampão fosfato de sódio 0,5 M (pH 5,5) num volume total de 0,2 ml. Após esse tempo, seguimos o procedimento dos itens anteriores para teste de atividade enzimática.

Como os componentes individuais do sistema não produziram alterações significativas na atividade enzimática, passamos a analisar os efeitos do sistema total de reação sobre X-O.

Observa-se, através da Tab. 6, que o sistema total se mostrou bem efetivo, inativando a enzima consideravelmente (~ 68,0 %), sendo protegido em 26,5% por guanosina, um excelente supressor de ¹O₂, em concentração de 20 mM.

Tabela 6 - Análise dos efeitos do sistema enzimático ácido fólico/HRP/Glut/Catalase/ Mn^{+2}/O_2 sobre a atividade de Xantina-oxidase ^a

Componentes	% de inativação total	% de inativação por 1O_2 ^b
X-O	0,0	0,0
Sistema enzimático + X-O (não dialisado)	87,8	
Produtos do sistema enzimático + X-O (não dialisado)	21,2	66,6
Sistema enzimático + X-O (dialisado)	79,0	
Produtos do sistema enzimático + X-O (dialisado)	9,8	69,2
Sistema enzimático + Guanosina(20 mM) + X-O (não dialisado)	71,2	
Produtos do sistema enzimático + Guanosina(20mM) + X-O(não dialisado)	21,2	50,0

a) Afo ($1,2 \times 10^{-3}M$), HRP($2,2 \times 10^{-6}M$), Glut($5,0 \times 10^{-4}M$), Catalase(150 unidades/ml), Mn^{+2} ($77,5 \times 10^{-6}M$) e X-O ($2,0 \times 10^{-8}M$).

b) Outros supressores, ou aniquiladores de $OH\cdot$ e $O_2\cdot^-$, não forneceram proteção ao sistema.

Um dos objetivos deste trabalho, seria comparar os efeitos de $^1\Delta_g\ ^1O_2$ produzido fotoquimicamente (usando Eosina como sensibilizador) e enzimaticamente (usando o sistema ácido fólico) sobre a atividade de X-O, em termos de uma análise de amino-ácidos afetados por ambos os tratamentos.

As amostras de X-O foram submetidas aos respectivos tratamentos, dialisadas, liofilizadas e hidrolisadas.

Porém, por uma série de problemas alheios à nossa vontade, tal análise não pode ser realizada a tempo. A mesma, todavia, se encontra em andamento, e seus resultados serão publicados em revistas especializadas.

V - ESTUDOS DE ATIVIDADE DE X-O NO SORO SANGUÍNEO

Considerando-se que : a) X-O apresenta baixa atividade em processos de câncer(1 - 7), b) que oxigênio singlete inativa esta enzima (conforme demonstrado neste trabalho) e c) em casos de câncer, a atividade de ácido fólico oxidase (*) é alta(produzindo altas concentrações de oxigênio singlete)(132), tentou-se conciliar estes tres fatos.

Este ensaio, portanto, é baseado nos experimentos de Hodgson e Fridovich(88), usando acetaldeído como subtrato para X-O. Investigamos então, a atividade desta enzima no soro sanguíneo frente a este mesmo substrato, comparando a mesma em indivíduos normais com pacientes portadores de câncer.

O soro é obtido através de decantação das amostras de sangue e posterior centrifugação refrigerada. A concentração aproximada de proteína no soro, é calculada baseando-se na seguinte fórmula(103) :

$$C = 1,45 A_{280} - 0,74 A_{260} \quad (\text{mg de proteína/ml})$$

Este cálculo, nos permite fixar uma concentração padrão para todas as amostras (0,37 mg/ml). O volume do soro correspondente é adicionado em tampão carbonato 0,5M , pH 10,0 juntamente com acetaldeído 10,0 mM, perfazendo um volume total de 3,0 ml.

As medidas de quimiluminescência foram registradas em termos de contagens integradas(Fig. 13). Alopurinol, um conhecido inibidor de X-O, é utilizado com o intuito de

(*) - Enzima que metaboliza o ácido fólico para produzir Pte benzoilalutâmico.

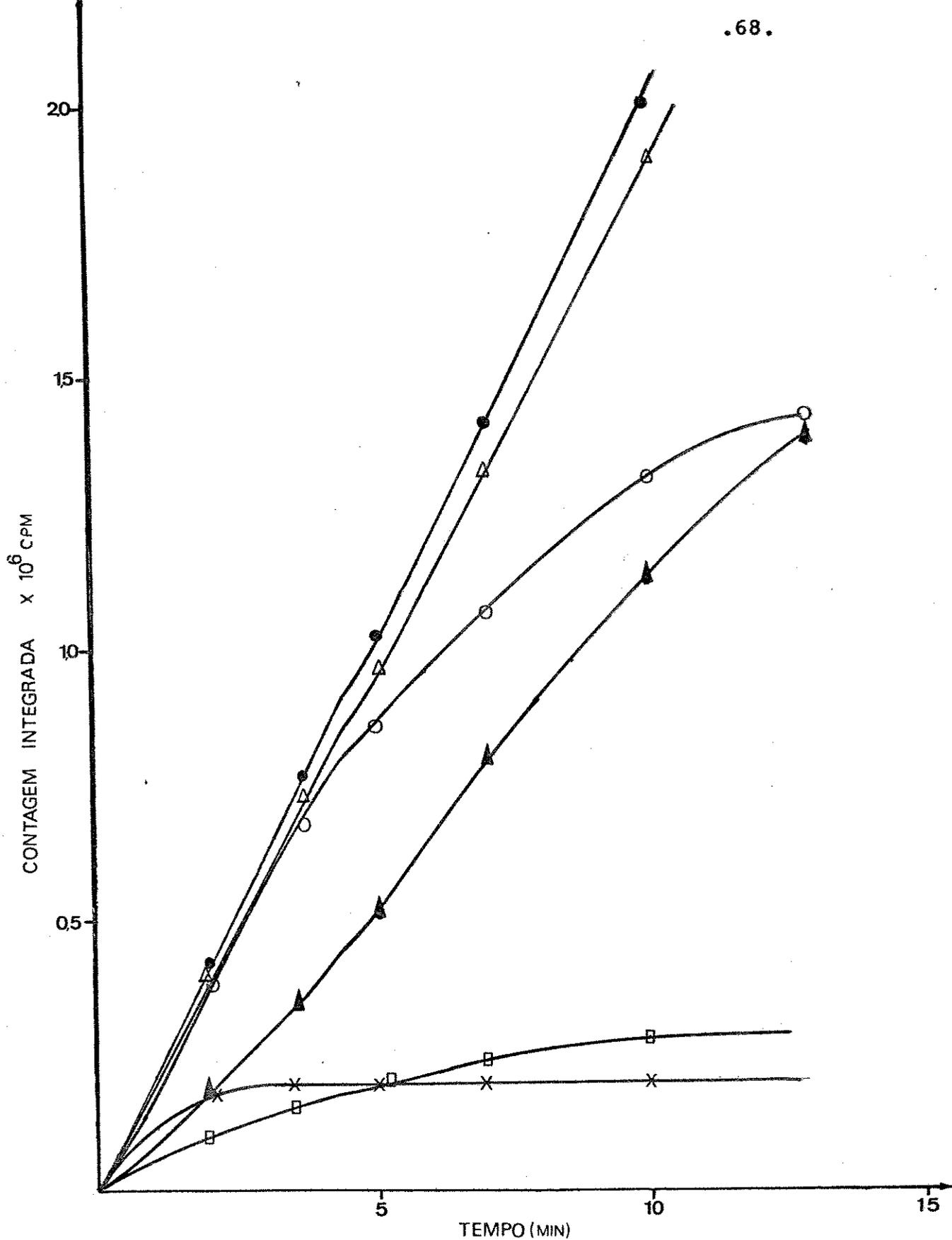


Fig. 13 - Gráfico da cinética de emissão do sistema :
 soro(0,37 mg/ml)/acetaldeído(10,0 mM)/ tampão
 carbonato(0,5M, pH 10,0). (●) e (△), X-O pu
 ra ; (▲) e (○), amostras de indivíduos nor
 mais, ambos do sexo feminino ; (□) e (X) a
 mostras de pacientes portadores de cancer, do
 sexo masculino e feminino, respectivamente.

A Fig. 13, mostra duas amostras de pacientes portadores de câncer (um do sexo masculino e outro feminino), com baixa atividade de X-O no soro. Observa-se também que a atividade desta enzima no soro de dois indivíduos normais (ambos do sexo feminino) é bastante comparável à atividade de X-O pura.

Há uma diferença muito pronunciada entre as atividades de X-O do soro de indivíduos normais e portadores de câncer, sendo a primeira, significativamente maior.

Estes resultados foram resumidos e comparados com uma análise de atividade de ácido fólico oxidase e quimiluminescência espontânea do plasma, obtida no estudo de Gisler(132)(Tabela 7), mostrando-se portanto, como um bom suporte para sistemas de detecção precoce de câncer.

Tabela 7 - Análise de amostras de sangue de pacientes portadores de câncer, comparadas com indivíduos normais.

	<u>Normal</u>	<u>Câncer</u>	<u>Emissão integrada</u> (contagens/10 min)	<u>Emissão integrada</u> (contagens/10min)	<u>Emissão integrada</u> média de normais (contagens/10min)
Atividade de ácido fólico oxidase (132)	$0,98 \times 10^6$	$12,7 \times 10^6$			$(0,74 \pm 0,15) \times 10^6$
Quimiluminescência do plasma (132)			Emissão (contagens/6seg) ciclos (a 160)		
	10	20	10	20	20
Temperatura	3300	3200	3770	6070	---
Razão (20/10)	0,97	1,61			$1,05 \pm 0,16$
Atividade de X-O ^a			Emissão integrada (5 min) Emissão integrada de X-O pura		
		$0,85 \times 10^6$	$0,20 \times 10^6$		$1,0 \times 10^6$

(a) - Os casos normais, câncer e controle (X-0 pura), têm a mesma concentração de proteína (0,37 mg/ml).

Capítulo 4

DISCUSSÃO

I - EVIDÊNCIAS DE GERAÇÃO DE $^1\Delta_g^1O_2$ NO PROCESSO FOTO-SENSIBILIZADO

Observa-se através da Tab. 1 (pg.45) (com MeB como sensibilizador) que, todos os supressores utilizados, foram efetivos em termos de proteção enzimática contra os efeitos de $^1\Delta_g^1O_2$, OH^\cdot , H_2O_2 e O_2^\cdot , numa escala variada.

No caso de guanosina e histidina, ambos supressores de $^1\Delta_g^1O_2$, o primeiro revelou-se mais eficiente. Esta observação vem de acordo com os dados obtidos da literatura onde as velocidades de reação de guanosina e histidina, considerando-se $^1\Delta_g^1O_2$ como espécie reativa são : $5,0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ (62) e $5,0 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ (50), respectivamente.

Diversos autores (74,113,114), demonstraram que a ação protetora de histidina e guanosina bem como de outros amino-ácidos e proteínas, consiste de uma somatória de efeitos provenientes de supressão física (k_q) e reativa (k_r^O) de $^1\Delta_g^1O_2$ e de supressão do estado triplete do sensibilizador (k_q^{3S}). Dependendo da estrutura do amino-ácido como uma molécula separada ou como um constituinte da proteína, um ou outro tipo de reação prevalecerá.

Uma análise de constantes de velocidade, indica que com histidina $10^{-3} M$ (concentração utilizada para nossos estudos), a supressão do estado triplete do sensibilizador é $\sim 10^3$ vezes mais lenta que a supressão por O_2 . Estes dados cinéticos obtidos por Nilsson e col. (50), concluem que para histidina, a foto-oxidação ocorre por um mecanismo de $^1\Delta_g^1O_2$.

Embora histidina seja um supressor de $^1\Delta_g^1O_2$ menos eficiente que β -caroteno ($k_q = 1,5 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$ (115)), p. ex., tem sido muito utilizada por ter baixa velocidade de supressão de triplete de diversos sensibilizadores ($k_q^{3S} \leq 10^5 M^{-1} s^{-1}$ para Eosina ; $\leq 5,0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ para tionina e $2,0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ para MeB em H_2O a pH 7,0 (116)).

Experimentos feitos com guanosina mono-fosfato (GMP) na inibição da degradação de 1,3-difenil-isobenzofurano (DPBF), indicam que este efeito se deve principalmente a supressão do triplete de MeB, ao invés de supressão de $^1\Delta_g^1O_2$. Tal fato porém, foi observado somente a concentrações de GMP acima de $10^{-2} M$ (114).

Não existe até o presente momento, um mecanismo preciso de ação desses supressores. Sabe-se que guanosina é foto-degradada por 1O_2 dando uréia, ácido cianúrico, formil uréia e o açúcar como produtos da oxidação deste nucleotídeo (53). Estes compostos foram também identificados por de Mello (94), através de análise cromatográfica dos produtos da foto-degradação de guanosina durante o tratamento com o sistema ácido indol-3-acético (IAA)/HRP/ O_2 .

No caso de histidina, os produtos de foto-oxidação não foram identificados. Experimentos feitos com compostos modelo, sugerem a formação de intermediários dioxetanos ou endoperóxidos (74).

Manitol e benzoato, ambos supressores de OH^\bullet (ítem III.5, pag. 23), fornecem uma boa proteção enzimática, ressaltando-se aqui, que o efeito provocado por benzoato está associado a um ligeiro efeito estabilizante da enzima (26) (Tabela 1, pag. 45).

Os estudos com SOD e catalase foram feitos com o intuito de analisarmos a presença de O_2^- e H_2O_2 através de supressão enzimática.

Observa-se que, no caso de SOD, o efeito é eminentemente enzimático, pois após a desnaturação (processo no qual sua atividade enzimática é perdida), SOD não produz qualquer efeito de proteção contra o anion superóxido (O_2^-).

No caso de catalase, a diferença entre as porcentagens de proteção da enzima nativa e desnaturada, sugere uma ligeira produção de H_2O_2 e também uma inespecífica proteção por proteína.

Utilizando-se Eosina como sensibilizador para o mesmo sistema, observamos somente proteção por histidina e guanosina (Tab. 2, pg. 46). Este último, como no caso de MeB, mostrou-se mais efetivo.

Não foi necessário neste caso, fazermos um teste com SOD desnaturada, pois a mesma na forma nativa, não ofereceu qualquer proteção ao sistema.

As diferenças nas porcentagens de inativação enzimática obtidas com catalase nativa e desnaturada, não foram significativas, sendo atribuídas aos desvios normais entre uma e outra preparação.

Para maiores evidências de participação de $^1\Delta_g^1\text{O}_2$ em ambos os processos, foram feitos estudos com ôxido de deutério (D_2O).

A partir da Tab. 3, pg. 47, podemos observar tanto para MeB como para Eosina, uma maior porcentagem de inativação enzimática, a medida que substituímos o tampão aquoso por deuterado.

Merckel e col.(118), medindo a eficiência de foto-oxidação de DPBF numa mistura de D_2O-CD_3-OD , mostraram que esta era dez vezes maior quando comparada a mistura H_2O-CH_3-OH . Tal fato foi atribuído a um aumento na vida média de $^1\Delta_g\ ^1O_2$ gerado neste sistema, em meio deuterado.

Devido a complexidade do sistema utilizado para estes estudos, parece razoável o fato de não ter obtido um aumento de mesma dimensão. Tal aumento, também não é observado numa série de outros experimentos com sistemas contendo principalmente proteínas(53,64,119).

Segundo Foote(120), o aumento da vida-média de $^1\Delta_g\ ^1O_2$ em D_2O , pode variar entre 1,0 e um máximo. A expressão real para o efeito de D_2O é :

$$\frac{r_D}{r_H} = \frac{k_d^H + k_a |A|}{k_d^D + k_a |A|}$$

onde r = velocidade da reação em D_2O e H_2O ,

k_d = constante de velocidade de decaimento de $^1\Delta_g\ ^1O_2$ em D_2O e H_2O , e

k_a = constante de velocidade de $^1\Delta_g\ ^1O_2$ com o acceptor A.

Se $k_a |A|$ for pequeno, obtém-se um máximo de efeito em D_2O ; quando este termo for grande, a razão se torna igual a 1,0.

Portanto, o comportamento do sistema em D_2O , depende inteiramente se k_d ou $k_a A$ são limitantes da vida-média de $^1\Delta_g\ ^1O_2$. Este estudo cinético, torna-se bastante com-

plicado num sistema heterogêneo como é o caso.

Observa-se que a razão entre as porcentagens de inativação em D_2O e H_2O é um pouco maior no caso de MeB. Este fato, a primeira vista, parece contraditório visto que, no caso de Eosina, temos produção específica de ${}^1\Delta_g {}^1O_2$, o que poderia ocasionar uma maior variação ao estudarmos o sistema em tampão deuterado. Contudo, da literatura, temos que :

$$k_q \text{ (MeB)} = 3,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \quad \text{Ref.121}$$

$$k_q \text{ (Eos)} = 1,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \quad \text{Ref.122}$$

onde k_q é a constante de velocidade para a supressão do tripleto do sensibilizador por O_2 .

Observe que o tripleto de MeB é mais eficientemente suprimido por O_2 que o tripleto de Eosina. Além disso estudos de eficiência de produção de ${}^1\Delta_g {}^1O_2$ ($\phi {}^1O_2$) com vários sensibilizadores nos indicam que :

$$\phi {}^1O_2 \text{ (MeB)} = 0,52 \quad \text{Ref.123}$$

$$\phi {}^1O_2 \text{ (Eos)} = 0,43 \quad \text{Ref.124}$$

Observa-se que $\phi {}^1O_2 \text{ (MeB)} > \phi {}^1O_2 \text{ (Eosina)}$, confirmando mais uma vez, os resultados obtidos em nossos estudos. Corrigindo-se então, ambas as razões em termos de eficiência de produção de ${}^1\Delta_g {}^1O_2$ ($\phi {}^1O_2$) (Tab. 8), temos :

Tab. 8 - Efeitos de D_2O na atividade de X-O corrigidos para ϕ^1O_2 .

	D_2O/H_2O	D_2O/H_2O (corrigido) ^a
MeB	1,84	3,53
Eosina	1,50	3,50

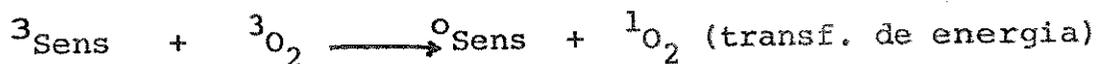
a) A correção para as razões D_2O/H_2O foi efetuada, dividindo-se ambos os valores pelas respectivas eficiências de produção de $^1\Delta_g^1O_2$ (ϕ^1O_2)

É importante observarmos também que, as variações na porcentagem de inativação enzimática introduzidas pela substituição do tampão aquoso por deuterado, considera tão somente, a presença de $^1\Delta_g^1O_2$ no meio de reação. Deve-se levar em conta que, no caso de foto-sensibilização por MeB, outras espécies ativas de oxigênio estão envolvidas.

Os resultados obtidos com o uso de D_2O , juntamente com os estudos de supressão, nos fornecem portanto, fortes evidências da participação de $^1\Delta_g^1O_2$ na foto-inativação de X-O sensibilizada por MeB e por Eosina.

Surge então uma outra questão: Porque, utilizando-se MeB como sensibilizador, temos a produção de $^1\Delta_g^1O_2$, OH^\cdot , H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ ao passo que, com Eosina temos produção específica de $^1\Delta_g^1O_2$?

Vamos então, rever duas etapas do mecanismo de foto-sensibilização :



Ambos os sensibilizadores preenchem a condição primeira para que a transferência de energia do sensibilizador triplete (${}^3\text{Sens}$) para o oxigênio molecular (O_2) possa se efetuar. Inicialmente, para que possamos formar ${}^1\Delta_g {}^1\text{O}_2$ por transferência de energia, o sensibilizador utilizado deverá ter uma energia triplete (E_T) acima de 22,6 Kcal/mol (energia requerida para excitar o oxigênio no estado fundamental para oxigênio singleto).

Tabela 9 - Valores de Energia Triplete (E_T) (Kcal/mol)

${}^1\Delta_g {}^1\text{O}_2$	Eosina	MeB
22,6 (125)	45,5 (126)	34,0 (127)

Podemos observar através da Tab. 9 que, ambos os sensibilizadores, obedecem tal condição, sendo portanto efetivos quanto ao processo de transferência de energia.

No processo de transferência de elétrons, o sensibilizador triplete funciona como um agente redutor de O_2 , portanto se oxidando.

Tabela 10 - Potencial de Oxidação (Volts)

	<i>Eosina</i>	<i>MeB</i>
H_2O	- 1,70 ⁽⁶⁴⁾	0,011 ⁽¹²⁸⁾
MeOH/KCl	0,99 ⁽¹²⁹⁾	>1,10 ⁽¹²⁹⁾

Observa-se pela Tab.10 que, MeB tem um potencial de oxidação maior que Eosina, sendo portanto um melhor redutor de O_2 .

Segundo Kepka e Grossweiner(64), a transferência de elétrons de Eosina triplete para O_2 ocorre em menos que 1% das colisões desativantes de O_2 com Eos^T , explicando portanto, sua baixa eficiência na produção de $O_2^{\cdot-}$.

O sensibilizador triplete, pode também interagir com um substrato redutor (RH ou R), originando radicais que iniciam uma série de reações. Este processo, embora pouco eficiente em comparação com os processos de transferência de energia e de elétrons para O_2 , pode levar inclusive à formação de $O_2^{\cdot-}$ (62).

O pH é também um fator muito importante no processo de foto-sensibilização pois, as propriedades físicas e químicas das espécies iônicas envolvidas no equilíbrio

ácido-base para os estados tripletes de corantes, são muito diferentes.

Para MeB, p.ex., a vida média das espécies tripletas ácida (${}^3\text{BMH}^{2+}$) e básica (${}^3\text{BM}^+$) diferem por um fator de 20 (123). Sendo assim, é lógico pensar que a velocidade de produção de ${}^1\Delta_g {}^1\text{O}_2$ também varie em função do pH. Observe pela Tab. 11 que, a supressão por O_2 é mais eficiente para BM^+ do que para BMH^{2+} .

Tabela 11 - Constante de velocidade de supressão dos estados tripletes de MeB por O_2 (123).

	O_2 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	pH
${}^3\text{BM}^+$	$2,6 \times 10^9$	8,5
${}^3\text{BMH}^{2+}$	$1,3 \times 10^8$	3,0

Bonneau e col. (123), estudando a foto-oxidação de triptofano sensibilizada por MeB, demonstraram que a produção de ${}^1\Delta_g {}^1\text{O}_2$ é aproximadamente 5 vezes mais eficiente em meio básico do que em meio ácido.

Dessa forma, o valor de pH 7,8 para irradiação foto-sensibilizada por MeB foi escolhido, em virtude de ser o valor ótimo de pH para o ensaio de atividade enzimática.

Experimentos feitos com fluoresceína (130), demonstram que a pH 5,5, se obtém a molécula neutra, sendo as formas aniônica e catiônica obtidas somente a extremos de

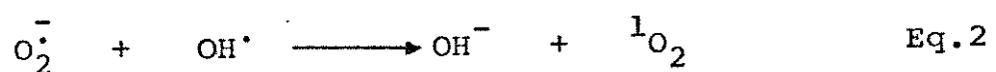
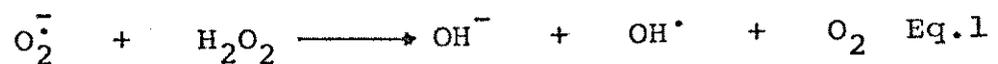
de pH (12 e 1, respectivamente). Medidas de rendimento de fluorescência, mostraram que este era menor para a molécula neutra de fluoresceína, do que para as formas aniônica e catiônica.

Já que no mecanismo de foto-sensibilização, a espécie triplete do corante é importante, é necessário trabalhar com a forma que mais favoreça o cruzamento inter-sistemas, a fim de ter a máxima produção possível de tal espécie.

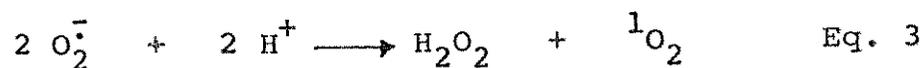
Para Eosina(tetra-bromo fluoresceína), este processo é ainda mais favorecido pela presença de átomos pesados na molécula. De fato, a pH 6,2, temos um mínimo de fluorescência deste corante(64), razão pela qual, este valor foi escolhido para irradiação foto-sensibilizada por Eosina.

Verificamos portanto que X-O pode ser inativada por $^1\Delta_g^1O_2$, OH^\cdot , H_2O_2 e O_2^- num sistema foto-sensibilizado por MeB, ao passo que a mesma enzima é inativada somente por $^1\Delta_g^1O_2$, num sistema foto-sensibilizado por Eosina.

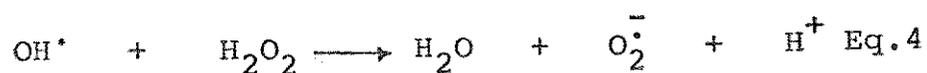
Essas espécies ativas de oxigênio se encontram inter-relacionandas por diversas maneiras, funcionando ora como produto, ora como reagente. OH^\cdot produzido através da reação de Haber-Weiss(Eq.1) é usado na Eq.2 como reagente:



Assim como a dismutação de $\text{O}_2^{\cdot -}$ pode ser relacionada com a produção de oxigênio singlete pelas Eqs. 2 e 3.



Observa-se que na Eq. 3, é produzido H_2O_2 que funciona como reagente para a Eq. 1 e 4, sendo esta última, geradora de $\text{O}_2^{\cdot -}$.



Portanto, quando se trata de um sistema complexo como é o caso da foto-sensibilização por MeB, não podemos atribuir a nenhuma dessas espécies ativas de oxigênio, o papel de principal responsável pela foto-inativação de X-O. Os efeitos observados, se constituem assim, numa soma de contribuições das várias espécies envolvidas.

Logo, Eosina, mostrou-se um modelo foto-químico excelente para comparação com sistemas biológicos geradores de oxigênio singlete.

II - SISTEMA MALONALDEÍDO

Vimos anteriormente que o sistema malonaldeído é um sistema enzimático produtor específico de ${}^1\Delta_g {}^1O_2$ (95) .

Estudando-se o poder de supressão de X-O pela emissão fotônica atribuída a ${}^1\Delta_g {}^1O_2$ gerado neste sistema , obtivemos um $K_{sv} = 5,0 \times 10^7 M^{-1}$ (Fig. 3, pg.49) .

Embora a maioria dos supressores conhecidos possuam um K_{sv} da ordem de $10^3 - 10^5 M^{-1}$ (62), proteínas em geral, suplantam esse valor. Fitocromo, p.ex., suprime a quimifosforescência de acetonas tripletes com uma constante de velocidade de transferência de energia (k_{ET}) da ordem de $10^{12} M^{-1}s^{-1}$ (131). Isto nos fornece um valor de $K_{sv} = 2,2 \times 10^7 M^{-1}$, considerando-se $\tau({}^1O_2) = 2,0 \times 10^{-6} s$ (em H_2O).

O valor de K_{sv} obtido para X-O, nos indica seu forte poder de supressão. Provavelmente, certos amino-ácidos de X-O, em particular histidina, estariam reagindo com 1O_2 gerado neste sistema, ocasionando supressão química desta espécie.

Em seguida, X-O e histidina, foram utilizadas em conjunto, num experimento envolvendo técnica de estado estacionário (Ver apêndice 1 , pg. 93). Partindo-se do ponto que, tanto X-O ($K_{sv} = 5,0 \times 10^7 M^{-1}$) e histidina ($K_{sv} = 8,7 \times 10^2 M^{-1}$ (95)) suprimem 1O_2 efetivamente, foi de interesse investigar se havia competição por este intermediário comum.

Observamos através das Fig. 4 e 5 (pgs.51,52) (método quimiluminescente) e Fig. 6 (pg.53) (método fluorimétrico), que os coeficientes lineares das curvas obtidas são

idênticos e iguais a 1 . Cabe evidenciarmos aqui, a boa cor relação existente entre ambos os métodos de análise, cuja verificação pode ser feita em termos dos coeficientes angulares das retas obtidas pelos dois métodos (Tab. 12).

Tabela 12 - Valores de coeficientes angulares (α)

{histidina}	Método quimiluminescente (α)	Método fluorimétrico (α)
$0,33 \times 10^{-3} M$	$1,58 \times 10^{-8}$	$1,11 \times 10^{-8}$
$10,0 \times 10^{-3} M$	$0,71 \times 10^{-8}$	$0,50 \times 10^{-8}$

A coincidência no coeficiente linear é diagn^os tico de oxigênio singlete gerado, usando-se supressores es- pecíficos (62).

Estes resultados nos indicam que X-O e histidi na, competem por $^1\Delta_g\ ^1O_2$ produzido tanto enzimaticamente (a- través do sistema malonaldeído), quanto foto-sensibilizada- mente (usando Eosina como sensibilizador).

II.1 - Efeitos de malonaldeído sobre X-O

Através da Tab. 4, pag. 55 , observamos que ma lonaldeído incubado com X-O, causa um pronunciado efeito em sua atividade enzimática. A observação deste fato, se cons- titui num grave problema pois, se um dos participantes do sistema, causa tamanho efeito sobre a enzima, não podemos a valiar o efeito provocado por $^1\Delta_g\ ^1O_2$ gerado neste sistema.

Tentamos então, investigar tal efeito com o objetivo de verificar se o mesmo poderia de uma forma ou de outra, ser eliminado.

Inicialmente, pensamos tratar-se de interações fracas de malonaldeído com o sítio ativo da enzima, sendo então tal efeito, eliminado após diálise prolongada. Os resultados obtidos com o sistema dialisado (Tab. 5, pg.56) não confirmam de todo esta hipótese.

Observa-se uma diferença de 34,3% na porcentagem de inativação enzimática entre a preparação de malonaldeído + X-O antes e após diálise. Essa diferença é de 39,5% no caso do sistema total submetido ao mesmo tratamento. Isto nos sugere que uma pequena fração de malonaldeído estaria interagindo com a enzima através de ligações fracas, podendo portanto, ser eliminada quando submetida à diálise. Porém, a margem de inativação enzimática obtida mesmo após esse tratamento, foi consideravelmente alta, indicando que um outro tipo de modificação mais drástica estaria ocorrendo.

Fizemos então, estudos de velocidade de consumo de oxigênio e emissão quimiluminescente, com o objetivo de verificar se, a exemplo de acetaldeído, malonaldeído poderia atuar como substrato para X-O.

Os resultados obtidos pela observação das Figs. 11 e 12, pags.62 e 63, nos indicam que tal proposta não foi confirmada, haja visto que, nem a velocidade de consumo de oxigênio, nem a emissão quimiluminescente de malonaldeído, foram alteradas significativamente pela adição de X-O.

Uma análise prévia, em termos de modificações espectrais, nos revelou que malonaldeído não afeta a fluo -

rescência do substrato AHP. Na Fig. 7, pg.58 , temos a distribuição espectral de X-O antes e após incubação com malonaldeído. Observa-se no último caso, o desaparecimento dos picos na região de 300 a 350 nm, indicativos da parte proteica da enzima.

O pico a 468 nm, correspondente à parte flavínica da enzima, não mostrou alterações nem mesmo quanto a intensidade. Baseando-se neste dado, analisamos a fluorescência da parte flavínica e da parte proteica, com o intuito de verificar se havia ou não ocorrido alterações.

A Fig. 9, pg. 60, nos mostra que após a incubação com malonaldeído, a fluorescência de flavina é mais intensa, nos sugerindo que este resíduo estaria de uma forma ou de outra , mais livre.

Os experimentos feitos por Chio e Tappel(99) , com RNase incubada com malonaldeído, nos dão evidências de formação de bases de Schiff derivadas de amino-ácidos. Segundo esses autores, essas bases de Schiff fluorescem em solução aquosa com um máximo de excitação a 400nm e emissão a 460 nm.

Na Fig. 10, pg.61 , temos o espectro de emissão de fluorescência (com $\lambda_{exc}=400$ nm) de X-O antes e após incubação com malonaldeído. Observa-se um nítido aumento na intensidade de fluorescência a 460 nm para este último caso , sugerindo possível formação de bases de Schiff, como postulada por Chio e Tappel(100).

Estes resultados, juntamente com os obtidos nas Figs. 8 e 9, pgs.59 e 60 , nos sugerem que malonaldeído ao ser incubado com X-O, origina possivelmente a formação de

bases de Schiff derivadas de amino-ácidos com terminal NH⁻ , deixando o resíduo flavínico numa forma mais livre tal que , sua intensidade de fluorescência aumente.

Sendo assim, conforme proposição feita por Chio e Tappel(100), é possível que a enzima se torne inativa devido a um processo de reticulação inter- e intra-molecular via bases de Schiff produzidas na reação com malonaldeído (pg. 25).

Estes resultados não invalidam os resultados obtidos pelo método quimiluminescente pois, no primeiro caso, temos interações que ocorrem sob incubação prolongada dos reagentes ao passo que, no segundo caso, a reação é processada em poucos segundos.

III - SISTEMA ÁCIDO FÓLICO

Em virtude dos resultados obtidos com malonaldeído, tornou-se necessário o estudo de um outro sistema bioenergizado, produtor de $^1\Delta_g^1O_2$.

Uma análise prévia, mostrou que o efeito exercido pelos diferentes componentes do sistema na atividade enzimática, foi insignificante em relação ao efeito provocado pelo sistema total.

Segundo Inocentinni(96), a oxidação do ácido fólico neste sistema, é acompanhada de foto-emissão que foi atribuída à formação de $^1\Delta_g^1O_2$, evidenciada por supressores específicos para esta espécie. Nesta mesma pesquisa, foi estudado o efeito do sistema ácido fólico sobre X-O, através de cinética de consumo do substrato Xantina pela enzima.

Para confirmarmos a inativação enzimática efetuada por $^1\Delta_g^1O_2$, submeteu-se o sistema a diálise prolongada

por 22 horas, a fim de eliminarmos a contaminação por outros componentes do sistema.

Para o sistema não dialisado (Tab.6,pg. 65), consideramos os efeitos provocados pelos diferentes componentes do sistema enzimático na atividade de X-O. A porcentagem de inativação por ${}^1\Delta_g {}^1O_2$ (66,6%) seria portanto, a diferença entre a porcentagem de inativação provocada pelo sistema total (87,8%) e a porcentagem de inativação provocada pelos diferentes constituintes do sistema(21,2%).

Ao submetemos o sistema total à diálise, obtivemos uma redução na porcentagem de inativação. Isto se deve a eliminação de possíveis traços de Pterin-6-aldeído (já que a inibição exercida por este composto sobre a enzima é reversível, e eliminada após diálise(96)), e também de componentes do sistema enzimático de baixo peso molecular, tais como Mn^{+2} e glutathiona. Catalase e HRP, devido a seu alto peso molecular (200.000 e 40.000 respectivamente), não foram eliminadas após diálise, resultando portanto, em 9,8% de inativação enzimática. Considerando-se este fato, obtivemos 69,2% de inativação enzimática atribuída a ${}^1\Delta_g {}^1O_2$.

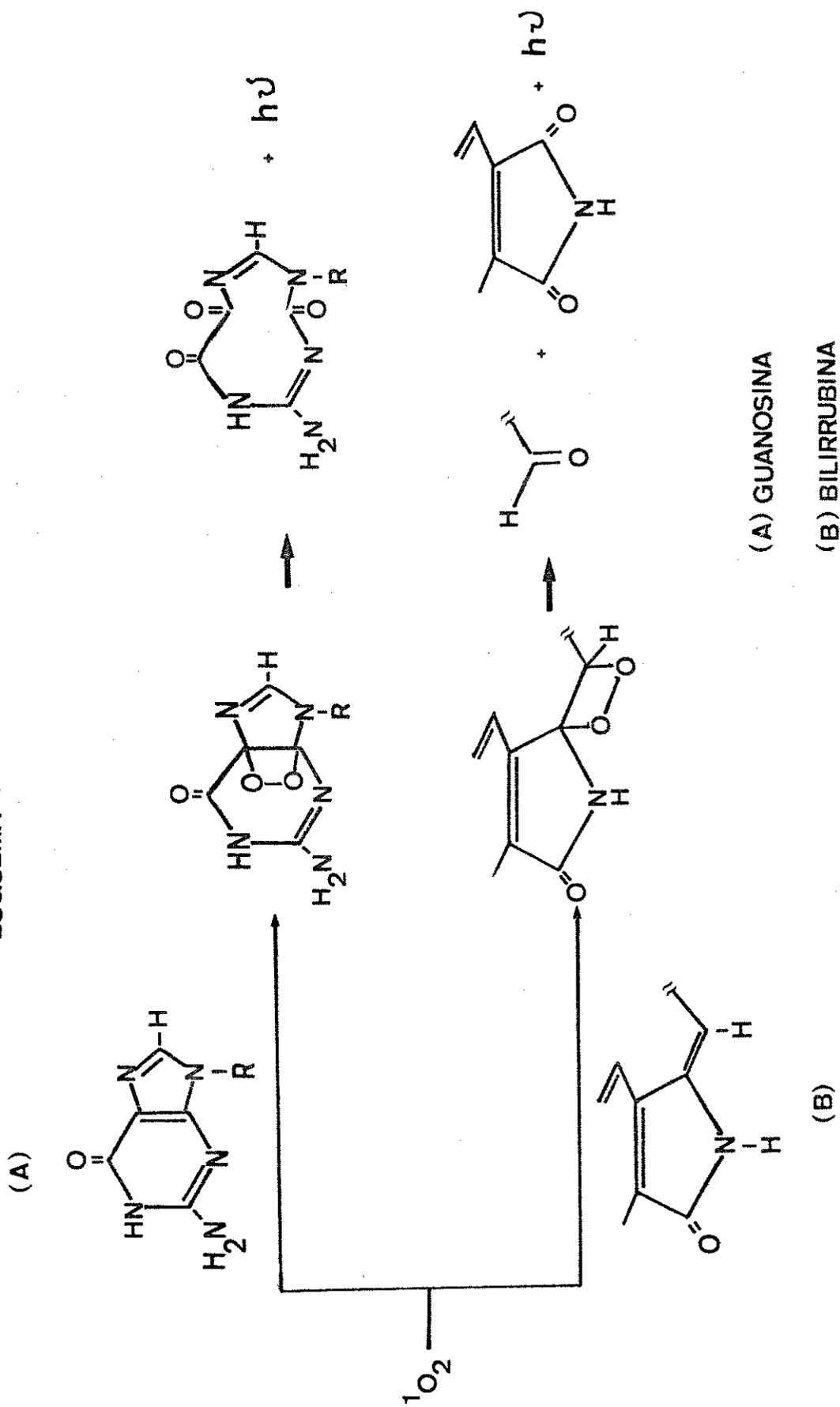
Baseando-se nas porcentagens de inativação de X-O obtidas com o sistema ácido fólico antes e após diálise (Tab. 6, pg. 65), obtivemos um efeito inativador de 68,0% atribuído a ${}^1\Delta_g {}^1O_2$.

Ao efetuarmos o estudo com supressores específicos de ${}^1\Delta_g {}^1O_2$, observa-se que guanosina(5 mM) oferece uma pequena proteção ao sistema, aumentando para 26,5% (Tab.6, pag. 65), no caso de aumentarmos sua concentração para 20 mM. Porém, quando esta última concentração é dobrada, não mais se observa este efeito protetor.

Este mesmo efeito foi observado para bilirrubina; esta, não protege X-O da ação de $^1\Delta_g^1O_2$. Este resultado concorda com os experimentos feitos por Inocentinni(96).

Nestes dois casos, é suposto que um dos produtos resultantes da foto-oxidação de bilirrubina e guanosina, após reagirem com oxigênio singlete, estejam no estado eletronicamente excitado, contribuindo igualmente para inativação enzimática(96) (Esquema 9). É possível que isto aconteça pois, os intermediários podem ser 1,2-dioxetanos que, por quebras térmicas, geram grupos carbonilas excitadas(85 Kcal/mol) no estado triplete. (93).

ESQUEMA 9



IV - X-O DO SORO SANGUÍNEO

Os resultados obtidos com X-O do soro sanguíneo de indivíduos normais e portadores de câncer pelo método desenvolvido nesta tese, embora preliminares, mostraram -se concordantes com os fatos discutidos anteriormente (item V pg.67).

Em virtudes de problemas de obtenção do sangue, foram testadas apenas duas amostras de soro de indivíduos normais e duas amostras de portadores de câncer(Fig. 13, pg. 68).

Contudo, esses experimentos preliminares, nos permitiram observar uma diferença bastante pronunciada na emissão do sistema soro/acetaldéido/tampão carbonato de pacientes portadores de câncer em relação aos normais. A atividade de X-O no soro (confirmada pelo uso de Alopurinol, mostrando que a atividade medida era devido a X-O) se mostrou significativamente menor no caso de pacientes com câncer(Tabela 7, pg.70).

Considerando-se esses prévios resultados como bastante promissores, evidencia-se aqui, a necessidade de uma série muito maior de testes pois, se comprovado, constituir-se-á num método simples e rápido de análise, que em muito contribuirá para o campo de detecção precoce do câncer apoiando assim, os métodos desenvolvidos por nosso grupo nesta área.

Esta experiência indica que, uma vez que a atividade de ácido fólico oxidase é aumentada em câncer, e por conseguinte a geração de oxigênio singlete é maior(132), po-

APÊNDICE I

I - CÁLCULO DE K_{sv}

O valor de K_{sv} de um determinado supressor nos dá uma idéia de sua eficiência na supressão de energia de espécies excitadas geradas num determinado sistema. Deste modo, fazendo-se a cinética de emissão de um sistema e adicionando-se a cada medida, uma concentração gradativamente maior de supressor, obteremos o seguinte gráfico :

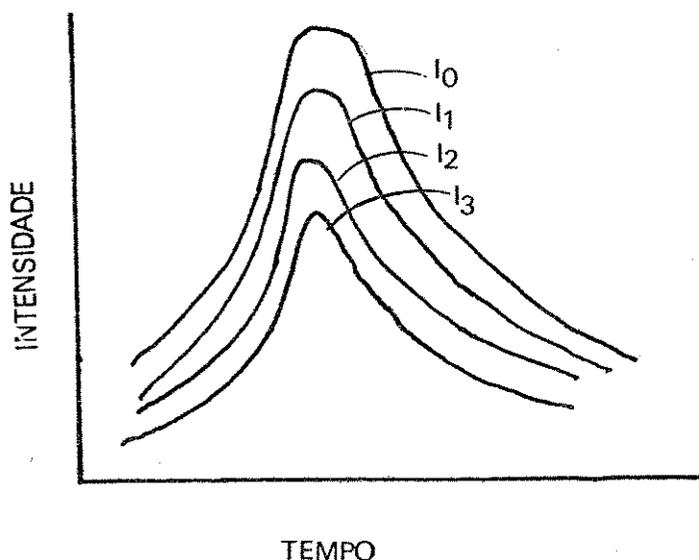


Fig. 1 - Cinética de emissão em presença de supressores.

onde I_0 , I_1 , I_2 e I_3 , representam as intensidades máximas sem e com supressor, observando-se que $Q_1 < Q_2 < Q_3$.

Analisando-se então a equação de Stern-Volmer, para um supressor :

$$\frac{I_0}{I_Q} = 1 + k_q \tau^0 |Q| \quad \text{Eq. 1}$$

onde k_q é a constante de velocidade de supressão e τ^0 é a vida média da espécie emissora.

O produto $k_q\tau^0$ é designado também por K_{SV} (constante de Stern-Volmer). Seu valor portanto, pode ser determinado através do gráfico mostrado abaixo :

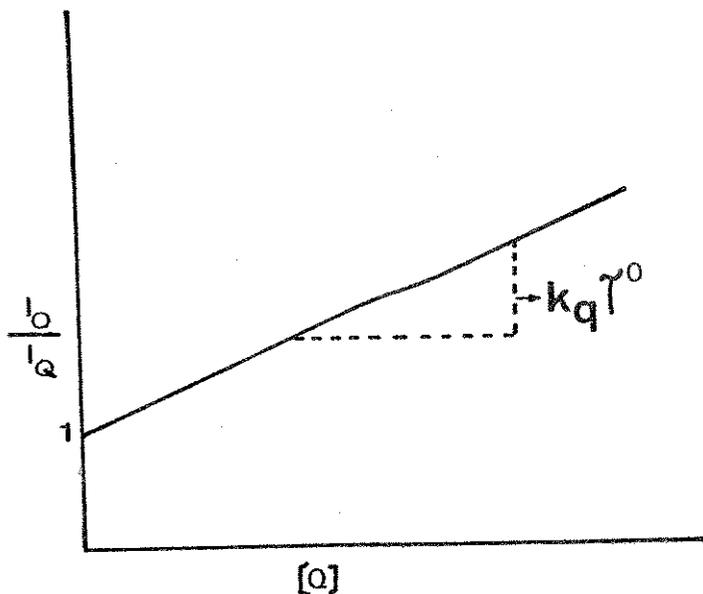


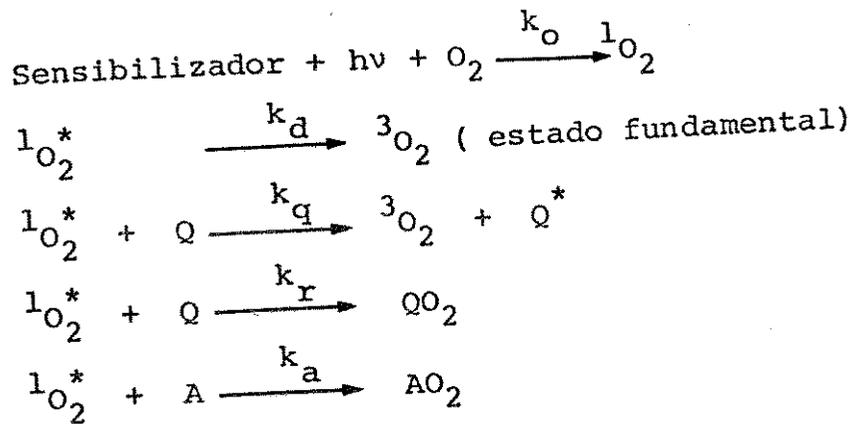
Fig. 2 - Gráfico Stern-Volmer para o efeito de supressão da emissão

Como se trata de uma equação do 1º grau, o gráfico obtido é uma reta, com coeficiente linear igual a 1, e coeficiente angular igual a $k_q\tau^0$ (ou K_{SV}).

II - TÉCNICA DE ESTADO ESTACIONÁRIO

Esta técnica é muito utilizada para o estudo de supressão de 1O_2 por competição entre dois supressores.

O esquema 1, representa uma simplificação do esquema total de reações envolvidas no processo de formação e supressão de 1O_2 . Contudo, esses passos determinantes, tornam-se suficientes para compreensão desta técnica.



ESQUEMA 1

Utilizando-se a equação de estado estacionário, podemos obter para este processo, a seguinte expressão :

$$\frac{1}{|\text{AO}_2|} = \frac{1}{|{}^1\text{O}_2|} + \frac{(k_q + k_r) |\text{Q}| + k_d}{k_a} \frac{1}{|\text{A}|} \frac{1}{|{}^1\text{O}_2|} \quad \text{Eq. 2}$$

onde $|{}^1\text{O}_2|$, $|\text{A}|$ e $|\text{Q}|$ representam as concentrações de ${}^1\text{O}_2$ gerado, do aceptor e do supressor, respectivamente. k_q , k_r , k_a e k_d são as constantes de velocidade para supressão, reação com Q, reação com A, e decaimento não radiativo de ${}^1\text{O}_2$ respectivamente.

Tratando-se do método bioenergizado, $|\text{AO}_2|$ que é a quantidade de produto, pode ser representado por $I_o - I_{A,Q}$. Neste caso, I_o é a intensidade de emissão na ausência de A e Q.

A partir da Equação 2, podemos traçar um gráfico de $1/I_o - I_{A,Q}$ vs $1/|\text{A}|$, onde o coeficiente linear é igual a $1/|{}^1\text{O}_2|$ e o coeficiente angular igual a $\frac{1}{|{}^1\text{O}_2|} \frac{(k_q + k_r) |\text{Q}| + k_d}{k_a}$.

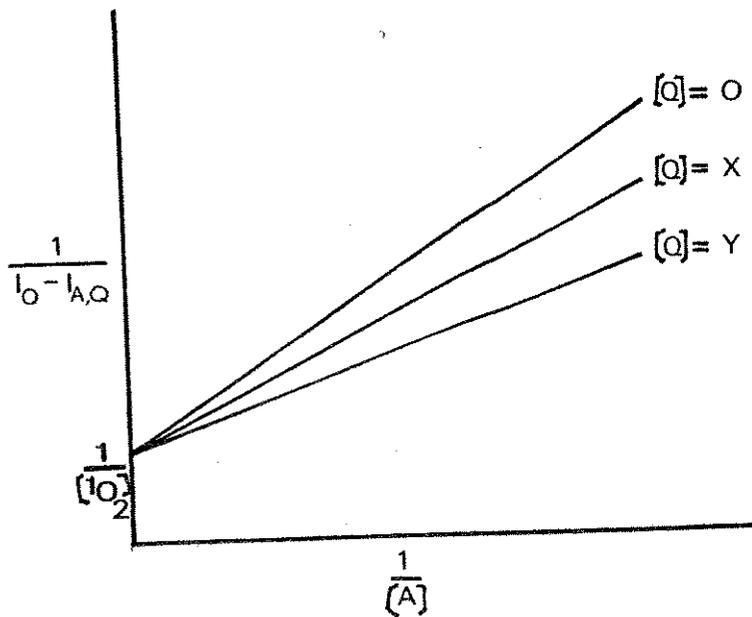


Fig. 3 - Gráfico duplo recíproco para o efeito competitivo de dois supressores.

Se os supressores utilizados forem específicos para $^1\text{O}_2$ e, se os coeficientes lineares das retas obtidas para cada concentração de Q forem idênticos, pode-se dizer que a espécie excitada envolvida no processo é $^1\text{O}_2$. Este fato leva ainda a concluir que, A e Q competem por um intermediário comum.

Ao multiplicar a Eq. 2 por $|^1\text{O}_2|$, obtém-se :

$$\frac{|^1\text{O}_2|}{|\text{AO}_2|} = 1 + \frac{(k_q + k_r)|Q| + k_d}{k_a} \frac{1}{|A|} \quad \text{Eq. 3}$$

Considerando-se $|^1\text{O}_2| = I_0$ e $|\text{AO}_2| = I_0 - I_{A,Q}$, pode-se traçar um gráfico de $I_0 / (I_0 - I_{A,Q})$ vs $1/|A|$, cuja representação será uma reta de coeficiente angular igual a $((k_q + k_r)|Q| + k_d) / k_a$ e coeficiente linear igual a 1.

Portanto, para cada concentração de Q, somente o coeficiente angular irá variar.

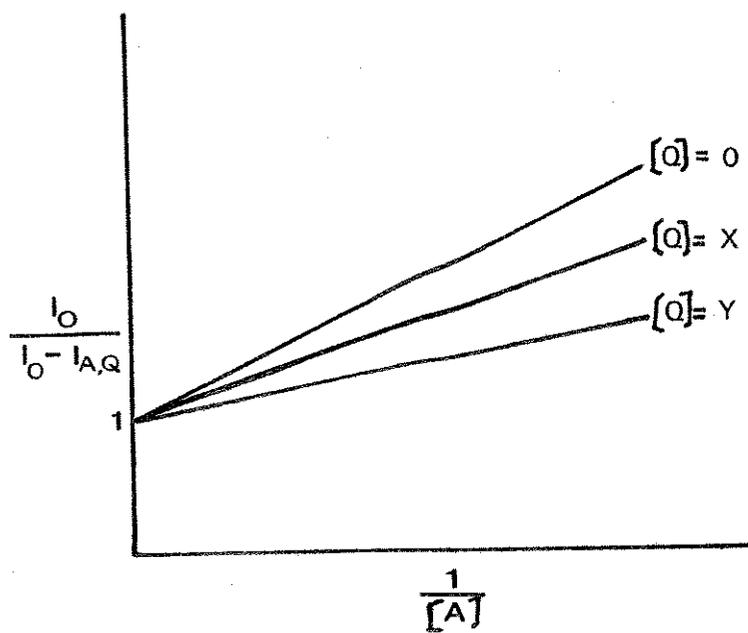
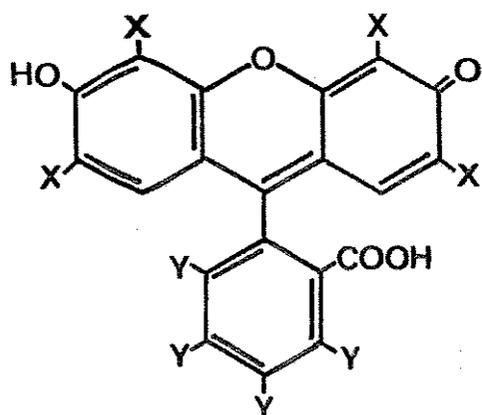


Fig. 4 - Gráfico de cinética de estado estacionário para o efeito competitivo de dois supressores.

APÊNDICE II



X = Y = H

FLUORESCEÍNA

X = Br Y = H

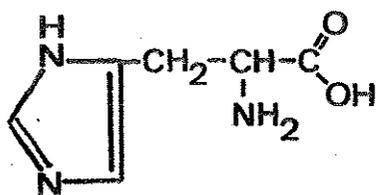
EOSINA

X = I Y = H

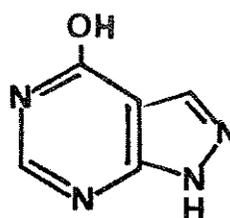
ERITROSINA B

X = I Y = Cl

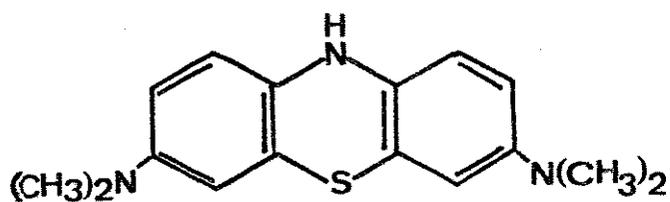
ROSA BENGALA



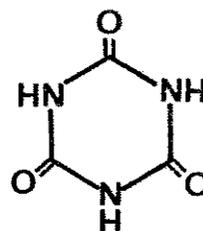
HISTIDINA



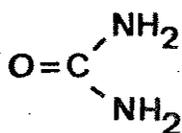
ALOPURINOL



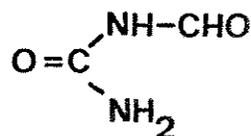
AZUL DE METILENO



ACIDO CIANÚRICO



UREIA



FORMIL UREIA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - G. de Lamirande, C.Allard e A.Cantero, *Cancer Res.*, 18, 952(1958).
- 2 - M.Feigelson, P.Feigelson e P.R.Gross, *J.Gen.Physiol.*, 41, 233(1957).
- 3 - I.Lewin, R.Lewin e R.C.Bray, *Nature*, 180, 763(1957).
- 4 - W.W.Westerfeld, D.A.Richert e M.F.Hilfinger, *Cancer Res.*, 10, 486(1950).
- 5 - P.Feigelson, J.E.Ultmann, S.Harris e T.Dashman, *Cancer Res.*, 19, 1230(1959).
- 6 - N.Pradjá e G.Weber, *FEBS Lett*, 59, 245(1975).
- 7 - G.Weber em "The Molecular Biology of Cancer", (H.Bush, Ed.), Academic Press, N.Y., 487(1974).
- 8 - O.H.Lowry, O.A.Bessey e E.J.Crawford, *J.Biol.Chem.*, 180, 389(1949).
- 9 - B.Stea, R.M.Halpern, B.C.Halpern e R.A.Smith, *Clin.Chim. Acta*, 113, 231(1981).
- 10 - L.H.Innocentini e N.Durán, *Brazilian J.Med.Biol.Res.*, no prelo.
- 11 - T.R.Hopkins e J.O.Spikes, *Photochem.Photobiol.*, 12, 175(1970).
- 12 - A.Cantarow e B.Shepartz, em "Bioquímica", (W.B.Saunders Company, Eds.), Philadelphia, London, pag.215(1973).
- 13 - R.Hille e V.Massey, *Pharmac.Ther.*, 14, 249(1981).
- 14 - R.C.Bray, em "The Enzymes", (P.D.Biwer, Ed.), Academic Press, 12, pag.305(1975).

- 15 - R.C.Bray, em "The Enzymes", (P.D.Biwer, Ed.), Academic Press, 09, pag.299(1975).
- 16 - T.A.Krenitzky, S.M.Neil, G.B.Elion e G.H.Hitchings, Arch. Biochem.Biophys., 150,585(1972).
- 17 - D.Edmondson, D.Ballou, A.V.Heuvelen, G.Palmer e V.Massey, J.Biol.Chem., 248,6135(1973).
- 18 - V.H.Booth, Biochem.J., 32,503(1938).
- 19 - K.V.Rajagopalan, em "Enzymatic basis of detoxication", (W.B.Jakoby, Ed.), 1, pag.295(1980).
- 20 - D.A.Gilbert, Biochem.J., 93,214(1964).
- 21 - R.W.Rundles e J.B.Wyngaarden, Ann.Rev.Pharmacol., 9,345(1969).
- 22 - G.B.Elion, S.Callahan, H.Nathan, S.Bieber, R.W.Rundles e G.H.Hitchings, Biochem.Pharmacol., 12,85(1963).
- 23 - M.Dixon e D.Keilin, Proc.Roy.Soc., 119,159(1936).
- 24 - B.Mackler, H.R.Mahler e D.E.Green, J.Biol.Chem., 210,149(1954).
- 25 - M.P.Coughlan, K.V.Rajagopalan e P.Handler, J.Biol.Chem., 244,2658(1969).
- 26 - F.Bergel e R.C.Bray, Biochem.J., 73,182(1959).
- 27 - F.M.Pick, M.A.McGartoll e R.C.Bray, Eur.J.Biochem., 18, 65(1971).
- 28 - L.S.Dietrich, W.J.Monson, J.N.Williams e C.A.Elvehjem, J.Biol.Chem., 197,37(1952).
- 29 - E.C.De Renzo, Advances Enzymol., 17,293(1956).
- 30 - M.E.Sweindseid, A.L.Swanson e F.H.Bethell, J.Biol.Chem., 201,811(1953).

- 31 - E. Annau e H. Konst, *Can. J. Med. Sci.*, 31, 146 (1953).
- 32 - A. Ehrenberg e R. C. Bray, *Arch. Biochem. Biophys.*, 109,
199 (1965).
- 33 - K. V. Rajagopalan e P. Handler, *J. Biol. Chem.*, 239, 1509 (1964).
- 34 - J. S. Olson, D. P. Ballou, G. Palmer e V. Massey, *J. Biol. Chem.*,
249, 4363 (1974).
- 35 - K. Garbett, R. D. Gillard, P. F. Knowlles e J. E. Stangroom,
Nature, 215, 824 (1967).
- 36 - J. Bordas, R. C. Bray, D. Garner, S. Gutteridge e S. S. Hasnain,
Biochem. J., 191, 499 (1980).
- 37 - J. P. G. Malthouse, J. W. Williams e R. C. Bray, *Biochem. J.*,
197, 421 (1981).
- 38 - R. C. Bray, S. Gutteridge, D. A. Stotter e S. J. Tanner, *Biochem.*
J., 177, 357 (1979).
- 39 - K. V. Rajagopalan, F. O. Brady e M. Kanda, *Vitamins and Hormones*,
28, 303 (1970).
- 40 - V. Massey, H. Komai, G. Palmer e G. B. Elion, *Vitamins and*
Hormones, 28, 505 (1970).
- 41 - E. Bayer, A. Bacher, P. Krauss, W. Veoelter, G. Barth e C. Djerass,
Eur. J. Biochem., 22, 580 (1971).
- 42 - E. Reid e I. Lewin, *Biochem. J.*, 64, 730 (1956).
- 43 - E. Tubaro, B. Lotti, C. Santiangeli e G. Cavallo, *Biochem.*
Pharmacol., 29, 1945 (1980).
- 44 - A. U. Khan e M. Kasha, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 171, 5 (1970).
- 45 - N. Durán e A. Faljoni, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83,
287 (1978).

- 46 - T.Ito e K.Kobayashi, Photochem.Photobiol., 25,399(1977).
- 47 - B.Gutter, W.T.Speck e H.S.Rosenkranz, Cancer Res., 37,
1112(1977).
- 48 - R.Nilsson, G.Swanberck e G.Wennersten, Photochem.Photobiol.,
22,183(1975).
- 49 - C.S.Foote, em "Free Radicals in Biology", (W.A.Pryor,Ed.),
2,pag.85(1976).
- 50 - R.Nilsson, P.B.Merckel e D.R.Kearns, Photochem.Photobiol.,
16,117(1972).
- 51 - A.G.Kepka e L.I.Grossweiner, Photochem.Photobiol.,14,
621(1971).
- 52 - P.A.Leermaker, em "Fundamental Concepts - Energy transfer
and Organic Photochemistry", Interscience Publ.,14,pag.9,
(1969).
- 53 - J.Cadet e R.Teoule, Photochem.Photobiol., 28,66(1978).
- 54 - C.S.Foote, Acc.Chem.Res., 1,104(1968).
- 55 - N.Washida, H.Akimoto e M.Okuda, J.Phys.Chem., 82,18(1978).
- 56 - D.F.Evans e J.N.Tucker, J.Chem.Soc.Faraday Trans.II,72,
1661(1976).
- 57 - N.Durán, em "Chemical and Biological Generation of
Excited State", Academic Press, N.Y.,pag.345(1982).
- 58 - C.C.C.Vidigal-Martinelli, K.Zinner, B.Kachar, N.Durán e
G.Cilento, FEBS Lett., 108,266(1979).
- 59 - I.R.Politzer, G.W.Griffin e J.L.Laseter, Chem.Biol.
Interactions, 3 ,73(1971).

- 60 - A.M.Michelson, em "Superoxide and Superoxide Dismutase", (A.M.Michelson, J.M.McCord e I.Fridovich,Eds.),Academic Press,pag.245(1977).
- 61 - H.H.Seliger e W.D.McElroy, em"Light : Physical and Biological Action",Academic Press,N.Y.,London,pag.325(1965).
- 62 - C.S.Foote, em "Singlet Oxygen - Reactions with Organic Compounds & Polymers", (B.Ranby e J.F.Rabek,Eds.),Wiley-Interscience Publ.,pag.140(1978).
- 63 - B.M.Monroe, J.Phys.Chem., 82,15(1978).
- 64 - A.G.Kepka e L.I.Grossweiner, Photochem.Photobiol.,18, 49(1973).
- 65 - N.I.Churakova, N.A.Kravchenko, E.P.Serebryakov, I.A.Lavrov e E.D.Kaversneva, Photochem.Photobiol.,18,201(1973).
- 66 - L.S.Jahnke e A.W.Frenkel, Photochem.Photobiol., 28,517(1978).
- 67 - G.Jori, G.Galiazzo, A.Marzotto e E.Scoffone, J.Biol.Chem., 243,4272(1968).
- 68 - E.Silva, Rad.and Environm.Biophys.,16,71(1979).
- 69 - R.Bonnett e J.C.M.Stewart, Biochem.J., 130,895(1972).
- 70 - W.T.Speck, S.Rosenkranz e H.S.Rosenkranz, Biochim.Biophys. Acta, 435,39(1976).
- 71 - G.W.Grams e K.Eskins, Biochemistry, 11,606(1972).
- 72 - N.I.Krinsky, Trends Biochem.Sci.,2,35(1977).
- 73 - A.U.Khan, J.Phys.Chem., 80,2219(1976).
- 74 - D.Bellus, Adv.Photochem,17, 105(1979).

- 75 - H.H.Wasserman e B.H.Lipshuts, em "Singlet Oxygen", (H.H. Wasserman e R.H.Murray, Eds.), Academic Press, N.Y., pag.429 (1979).
- 76 - E.J.Land, Photochem.Photobiol., 24,475(1976).
- 77 - C.S.Foote, R.W.Denny, L.Wedner, Y.Chang e J.Petters, Ann.N.Y.Acad.Sci., 171,130(1970).
- 78 - A.Zweig e N.A.Henderson, J.Polym.Sci.Polym.Chem.Ed., 13,717(1975).
- 79 - R.Gomes e N.Durán, 3º Encontro Regional de Química, Ribeirão Preto, SP(1981).
- 80 - D.B.S.Millar, G.W.Schwerst, J.Biol.Chem.,238,3249(1963).
- 81 - M.Nakano, T.Noguchi, Y.Tsutsumi, K.Sugioka, Y.Shimizu, Y.Tsuji e H.Inaba, Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,147,140(1974).
- 82 - C.Balny e P.Douzou, Biochem.Biophys.Res.Comm., 56, 386(1974).
- 83 - V.S.Srinivasan, D.Podolski, J.J.Westrick e D.C.Neckers, J.Am.Chem.Soc.,100,6513(1978).
- 84 - A.U.Khan, Science, 168,476(1970).
- 85 - J.P.Henry, A.M.Michelson, em "Superoxide and Superoxide Dismutase", (A.M.Michelson, J.M.McCord e I.Fridovich, Eds.), Academic Press, pag.283(1977).
- 86 - R.M.Arneson, Arch.Biochem.Biophys.,136,352(1970).
- 87 - K.Puget e A.M.Michelson, Photochem.Photobiol.,24,499(1976).
- 88 - E.K.Hodgson e I.Fridovich, Arch.Biochem.Biophys.,172, 202(1976).

- 89 - G.C.Gisler, L.H.Inocentinni e N.Durán, *Química Nova*, 4,22(1981).
- 90 - A.P.Schaap, A.L.Thayer, G.R.Faler, K.Goda e T.Kimura, *J.Am.Chem.Soc.*, 96,4025(1974).
- 91 - D.Keilin e E.F.Hartree, *Biochem.J.*, 39,293(1945).
- 92 - L.Beaucamp e I.Fridovich, *J.Biol.Chem.*, 245,4641(1970).
- 93 - G.Cilento, *Photochem.Photobiol.Rev.*, 5,199(1980).
- 94 - M,P.de Mello, Tese de Doutorado, Unicamp(1982).
- 95 - S.T.Farias-Furtado, Tese de Mestrado, Unicamp(1982).
- 96 - L.H.Inocentinni, Tese de Mestrado, Unicamp(1981).
- 97 - B.C.Shin, J.W.Huggins e K.L.Carraway, *Lipids*,7,229(1972).
- 98 - Z.Placer, A.Veselkova e R.Rath, *Experientia*, 21,19(1965).
- 99 - K.S.Chio e A.L.Tappel, *Biochemistry*,8,2821(1969).
- 100 - K.S.Chio e A.L.Tappel, *Biochemistry*,8,2827(1969).
- 101 - S.M.de Toledo, A.Zaha e N.Durán, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 104,990(1982).
- 102 - V.Herbert, em "The Pharmacological Basis of Therapeutic", (L.S.Goodman e A.Gilman,Eds.), pag.1431(1963).
- 103 - B.M.Braganca, I.Aravindakshan e D.S.Ghanekar, *J.Gen.Physiol.*, 41,233(1957).
- 104 - J.A.Blair, *Biochemistry*, 65,209(1956).
- 105 - H.B.Dunford e J.S.Stillman, *Coord.Chem.Rev.*,19,187(1976).
- 106 - L.H.Inocentinni e N.Durán, *Brazilian J.Med.Biol.Res.*, no prelo.

- 107 - G.Gomori, *Methods Enzymol.*, 1,144(1965).
- 108 - P.A.Srere, G.N.Kosicki e R.Lunry, *Biochem.Biophys.Acta* ,
50,184(1961).
- 109 - R.L.Blankley, em "The Biochemistry of folic acid and related Pteridines",North Holland,Amesterdan,pg.92(1969).
- 110 - R.F.Chen, *Anal.Biochem.*, 19,374(1967).
- 111 - A.K.Parpart, P.B.Lorenz, E.R.Parpart, J.R.Greg e A.M.Chose,
J.Clin.Invest.,26,626(1947).
- 112 - J.L.Haining e J.S.Legan, *Anal.Biochem.*,21,337(1967).
- 113 - A.McHale, H.Grimes e M.P.Coughlan, *Int.J.Biochem.*,10,
317(1979).
- 114 - I.B.C.Matheson, R.D.Etheridge, N.R.Kratowich e J.Lee,
Photochem.Photobiol., 21,165(1975).
- 115 - R.Nilsson, P.B.Merckel e D.R.Kearns, *Photochem.Photobiol.*,
16,147(1972).
- 116 - R.H.Young e D.R.Brewer, em "Singlet Oxygen", (B.Ranby e
J.F.Raber,Eds.),Wiley-Interscience Publ.,pag.45(1978).
- 117 - I.Kraljic e S.El Moshni, *Photochem.Photobiol.*,28 ,
577(1978).
- 118 - P.B.Merckel e D.R.Kearns, *J.Am.Chem.Soc.*,94,2744(1972).
- 119 - T.Ito e K.Kobayashi, *Potochem.Photobiol.*,26,581(1977).
- 120 - C.S.Foote, *Photochem.Photobiol.*, 28,922(1978).
- 121 - R.Nilsson, P.B.Merckel e D.R.Kearns, *Photochem.Photobiol.*,
16,109(1972).
- 122 - B.Nathason, M.Brody, S.Brody e S.B.Broyde, *Photochem.*
Photobiol., 6, 177(1967).

- 123 - R.Bonneau, R.Pottier, O.Bagno e J.Joussot-Dubien ,
Photochem.Photobiol., 21,159 (1975).
- 124 - K.Golnick, Adv.Photochem.,6,1(1968).
- 125 - K.Golnick, T.Franken, G.Schade e G.Dorhofer, Ann.N.Y.
Acad.Sci., 171,89 (1970).
- 126 - D.S.Burch, S.J.Smith e L.M.Branscombe, Phys.Rev.,112,
171(1958).
- 127 - D.R.Kearns, R.A.Hollins, A.U.Khan, R.W.Chambers e P.
Radlick, J.Am.Chem.Soc., 89,5455(1967).
- 128 - H.R.Mahler e H.Cordes, "Biological Chemistry", Harper
Intern Ed.,N.Y.,pag.13(1971).
- 129 - L.Gouverneur, G.Leroy e I.Zador , Eletrochim.Acta, 19,
215(1974).
- 130 - M.M.Martin e L.Lindqvist, J.Luminesc., 10,38(1975).
- 131 - O.Augusto, G.Cilento, J.Jung e P.S.Song, Biochem.Biophys.
Res.Comm., 83,963(1978).
- 132 - G.C.Gisler, Tese de Mestrado, Unicamp(1982).

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O TRABALHO DE TESE

SEMINÁRIOS

- 1 - "Oxigênio singlete : Geração e Detecção" - Unicamp - 1980.
- 2 - "Foto-inativação de Flavoproteínas" - Unicamp - 1980.
- 3 - "Oxigênio singlete : combinação dos efeitos de N_3^- e D_2O " - Unicamp - 1980.
- 4 - "Efeito do íon superóxido na carcinogênese"- Unicamp -1981.
- 5 - "Flavoproteínas e sua importância na geração de espécies ativas de oxigênio"- Unicamp - 1981.
- 6 - "Foto e bioinativação de xantina-oxidase" - Unicamp - 1982.

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

- 1 - R.Gomes e N.Durán, "Foto-inativação de xantina-oxidase", 2º Encontro Regional de Química - Araraquara,SP(1980).
- 2 - R.Gomes e N.Durán, "Ensaio fluorimétrico para xantina - oxidase em estudos de foto-inativação", 3º Encontro Regional de Química, Ribeirão Preto,SP(1981).
- 3 - R.Gomes e N.Durán, "Detecção de espécies ativas de oxigênio em estudos de foto-inativação de xantina-oxidase", VI Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Biofísica, São Paulo,SP(1981).
- 4 - R.Gomes e N.Durán, "Foto e bioinativação de xantina-oxidase", XI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bio - química - Caxambú,MG(1982).

PUBLICAÇÕES

- 1 - R.Gomes e N.Durán, "Foto-inativação de Xantina-oxidase", *Química Nova*, 4, 20(1981) (Resumo).
- 2 - R.Gomes e N.Durán, "Foto e Bioinativação de Xantina - oxidase", *Arq.Biol.Tecnol.*, 25, 149(1982) (Resumo).
- 3 - R.Gomes e N.Durán, "Photodynamic action on Xanthine-oxidase", *Photochem.Photobiol.*, submetido.
- 4 - R.Gomes e N.Durán, "Photo and Bioenergized inactivation of xanthine-oxidase", *Photophysic. Photobiochem.*, submetido.