

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

CAMPINAS

- 1982 -

"MODIFICAÇÕES NO DNA POR ACETONA TRIPLETE GERADA NA OXI
DAÇÃO DE 2-METILPROPANAL EM PRESENÇA DE PEROXIDASE"

Lidia Andreu Guillo

TESE DE MESTRADO

Orientador: *Prof. Dr. Nelson Eduardo Duran
Caballero*

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À minha mãe,
meu exemplo de vida.

Agradeço ao Prof. Dr. Nelson Durã̃n
pela confiança em mim depositada
para a realização deste trabalho.

"É pela lógica que provamos, mas
é pela intuição que descobrimos"

H. POINCARÉ.

Às Dras. Sonia Maria de Toledo, Adelaide Faljoni e Marcela Haun pela colaboração significativa no desenvolvimento deste trabalho.

À Cida pela eficiente ajuda no laboratório.

À Sandra pela amizade e carinho dedicados.

À Maricilda, Cristina, Gastão, Regina e Graça, pela solícita colaboração em qualquer momento.

Ao Laurindo pela amizade e ajuda no xerox.

Ao grupo do Prof. Dr. G. Cilento em São Paulo pela ajuda na utilização dos aparelhos

Ao Instituto de Química da UNICAMP.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela ajuda material

A todos que pelo estímulo e colaboração permitiram que o objetivo deste trabalho fosse alcançado,

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS.

ABREVIACOES USADAS

AL	=	acridina laranja
AT	=	adenina-timina
CD	=	dicroísmo circular
CoA	=	coenzima A
DBAS	=	9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato
EDTA	=	ácido etilenodiaminotetracético
DMSO	=	dimetilsulfóxido
DPAS	=	9,10-difenilantraceno-2-sulfonato
DNA	=	ácido desoxirribonucleico
GC	=	guanina-citosina
HRP	=	peroxidase de rabanete
LB	=	Luria Broth
2-MP	=	2-metilpropanal
ORD	=	dispersão ótica rotatória
PF	=	proflavina
Pi	=	fosfato
PM	=	peso molecular
PPi	=	pirofosfato
SDS	=	dodecil sulfato de sódio
Rf	=	razão da distância percorrida pela amostra/distância percorrida pelo solvente
UV	=	ultravioleta

R E S U M O

A incubação de 2-metilpropanal em tampão saturado com ar causa uma reação de oxidação iniciada pela formação de composto-I de peroxidase (HRP-I) e HRP-II para produzir acetona no estado excitado e ácido fórmico. O pH "ótimo" é ao redor de 7,0 e o K_M a 40°C é 30 mM. Experimentos na presença e na ausência de íons metálicos sugerem que a peroxidase usa traços de H_2O_2 gerado durante a incubação, para a formação de HRP-I. Aparentemente em HRP-I e HRP-II o sítio de ligação do substrato está ocupado por espécies fortemente ligadas às quais cianeto (10 mM) e azoteto (10 mM) não podem deslocar. A não linearidade de resposta para concentrações superiores a 2,2 μM de peroxidase e a razão $k_{HAsO_4^{2-}}/k_{HPO_4^{2-}}$ indicam uma eficiência de catálise relacionada com enolização de cetonas.

As modificações estruturais do DNA depois do tratamento com acetona triplete gerada pelo sistema 2-metilpropanal/peroxidase/ O_2 foram estudadas, usando-se térbio (III), acridina laranja e proflavina como sondas fluorescentes. Os resultados mostraram que os sítios do DNA contendo AT-GC e/ou GC-GC foram modificados e que regiões de fita simples foram formadas. O espectro de dicroísmo circular de acridina laranja na presença de DNA submetido ao sistema enzimático, corrobora esses efeitos. Provavelmente tais alterações estariam relacionadas com a formação de adutos de pirimidina e/ou alterações na cadeia açúcar-fosfato.

A B S T R A C T

Incubation of 2-methylpropanal in air saturated buffer causes an oxidation reaction initiated by the formation of peroxidase compound-I (HRP-I) and then HRP-II to produce acetone in its excited state and formic acid. The optimum pH is around 7,0 and K_M is 30 mM at 40°C. Experiments in the presence and absence of metal ions suggested that peroxidase uses the traces of H_2O_2 generated during the incubation for generation of HRP-I. Apparently in HRP-I and HRP-II the binding site is occupied by a tightly coordinated species in which cyanide (10 mM) and azide (10 mM) are unable to displace. Non linearity of response with peroxidase concentration over 2,2 μM and the ratio of $k_{HAsO_4^{2-}}/k_{HPO_4^{2-}}$ indicate that such catalytic involvement is conceivable for ketone enolization.

Structural modifications of DNA after treatment with triplet acetone generated by 2-methylpropanal/peroxidase/ O_2 system were studied by using terbium (III), acridine orange and proflavine as fluorescent probes. These results showed that AT-GC and/or GC-GC sites in DNA were modified, and that single strand regions were formed. Circular dichroism (CD) of acridine orange in the presence of modified DNA corroborated these effects. Probably these alterations are related to pyrimidines adducts and/or modifications in the sugar-phosphate bond.

Í N D I C E

	Pág.
RESUMO	
ABSTRACTS	
INTRODUÇÃO	1
I. INTRODUÇÃO	1
II. ESTADOS EXCITADOS	2
II.1 Considerações gerais	2
II.2 Formação de estados excitados	4
II.2.1 Formação de estados excitados por reações químicas	5
II.2.1.1 Reações de transferência de eletrons	5
II.2.1.2 Reações de autoxidação en- volvendo radicais peróxidos	6
II.2.1.3 Reações via dioxetanos ...	7
II.2.2 Formação de estados excitados por transferência de energia	9
IIII. ESTADOS EXCITADOS GERADOS ENZIMATICAMENTE	12
III.1 Sistemas bioluminescentes	12
III.2 Sistemas biológicos não luminescentes	17
III.2.1 Transferência de energia para biom <u>o</u> léculas	19
III.3 Detecção de estados excitados em sistemas biológicos	21
IV. FOTOQUÍMICA DO DNA	22
1. Desoxirribose	25

	Pág.
2. Bases purínicas	25
3. Bases pirimidínicas	26
3.1 Reações unimoleculares	26
3.1.1 Hidratação	26
3.1.2 Oxidação e Redução	27
3.2 Reações bimoleculares	28
4. Quebras na cadeia açúcar-fosfato	31
V. DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES NO DNA	33
V.1 Método de sondas fluorescentes	33
V.2 Dicroísmo circular	38
VI. OBJETIVO DA TESE	41
PARTE EXPERIMENTAL	43
I. DROGAS	43
II. EQUIPAMENTOS	44
III. MÉTODOS	45
III.1 Preparação de soluções	45
III.2 Preparação de complexos com o DNA	47
III.2.1 Complexos de acridina laranja e pro- flavina com DNA	48
III.2.2 Complexos de Tb^{3+} e DNA	48
III.3 Extração de DNA de <u>E. coli</u>	49
III.4 Identificação de acetona no sistema Isobuti- ril-CoA	50
III.5 Cálculo da elipticidade específica	50
III.6 Determinação dos parâmetros cinéticos	51

	Pág.
IV. RESULTADOS	52
IV.1 Cinética enzimática	52
IV.1.1 Escolha das melhores condições para o sistema 2-metilpropanal (2-MP) / HRP / O ₂	52
IV.1.2 Variação da concentração de 2-metil- propanal (2-MP)	53
IV.1.3 Variação da concentração de HRP	55
IV.1.4 Influência da temperatura sobre a velocidade de consumo de O ₂	57
IV.1.5 Determinação de V _{max} e K _M	58
IV.1.6 Determinação da energia de ativação.	62
IV.1.7 Efeito de inibidores	64
IV.1.8 Efeito do pH sobre a reação enzimá- tica	65
IV.1.9 Efeito do tampão arseniato	66
IV.1.10 Estudo com o substrato isobutiril- coenzima A	68
IV.1.11 Efeito de peróxido de hidrogênio ...	70
IV.2 Estudos com o DNA	71
IV.2.1 Efeito do íon prata sobre a fluores- cência de AL e PF	71
IV.2.2 Efeito do íon prata sobre os comple- xos de DNA/PF e DNA/AL	74
IV.2.3 Complexos de DNA e Tb(III)	75
IV.2.4 Medidas de dicroísmo circular	75

	Pág.
DISCUSSÃO	81
I. ESTUDO CINÉTICO	81
II. ESTUDO COM O DNA	89
II.1 Discroísmo circular	89
II.2 Estudos de fluorescência	93
CONCLUSÕES	98
PROPOSTAS PARA FUTUROS ESTUDOS	100
APÊNDICE I	101
APÊNDICE II	103
APÊNDICE III	107
REFERÊNCIAS	109

I N T R O D U Ç Ã O

I. INTRODUÇÃO

A exposição de bactérias à radiação ultravioleta (UV), provoca uma série de efeitos, abrangendo inativação, mutação e até mesmo a morte. Dos componentes celulares, o ácido desoxirribonucleico (DNA), é o principal cromóforo da radiação UV e sabe-se que ao ser absorvida, esta leva à formação de estados excitados. Portanto, podemos dizer que os estados excitados formados nessa macromolécula por absorção de luz UV, são os responsáveis pelos efeitos observados.

Mas nem sô por absorção de luz se formam estados excitados, como veremos. Dos estudos sobre bioluminescência, iniciados há cerca de vinte anos atrás, constatou-se que espécies excitadas poderiam ser formadas durante reações enzimáticas nos seres vivos, tal como nos organismos luminescentes, mas para outros fins que não o de emitir luz. Uma possibilidade é que estejam envolvidas em fenômenos relacionados com mutação espontânea e carcinogênese, que como se sabe, não necessitam de exposição à luz UV para ocorrerem. Esse é contudo, um campo que começa a ser investigado. Nesse particular, o DNA deve também desempenhar um papel importante, uma vez que está intimamente ligado aos processos de reprodução celular. Se foram constatadas modificações em sua estrutura como consequência da ação de espécies excitadas formadas durante reações enzimáticas, mais um caminho estaria aberto para a compreensão dos vários processos patológicos relacionados com câncer desenvolvidos nos seres humanos.

II. ESTADOS EXCITADOS

II.1 Considerações gerais

Quando uma molécula possui uma banda de absorção na região visível ou UV, um fóton de apropriada energia ou comprimento de onda correspondente à absorção, pode causar uma transição eletrônica. Isto usualmente envolve promoção de um elétron de um orbital ligante ou não-ligante, para um orbital anti-ligante.

O estado excitado possui então, dois elétrons em orbitais diferentes (elétrons desemparelhados). Se os elétrons estiverem com spins opostos, o estado excitado será singlete e com spins paralelos, triplete (Figura 1).

Como o estado fundamental da maioria das moléculas têm os elétrons pareados (estado singlete), os estados excitados resultantes da absorção de um fóton serão quase sempre singlete, pois as regras de seleção favorecem a conservação de spin. Uma vez que a molécula esteja no estado excitado, é possível que haja inversão de spin (conhecido como cruzamento intersistema), produzindo o estado excitado triplete. O estado triplete tem energia menor que o estado singlete correspondente, devido à natureza repulsiva da interação spin-spin entre os elétrons de mesmo spin. A desativação destes estados excitados pode se dar por vários processos competitivos ilustrados no diagrama de Jablonski (Esquema 1).

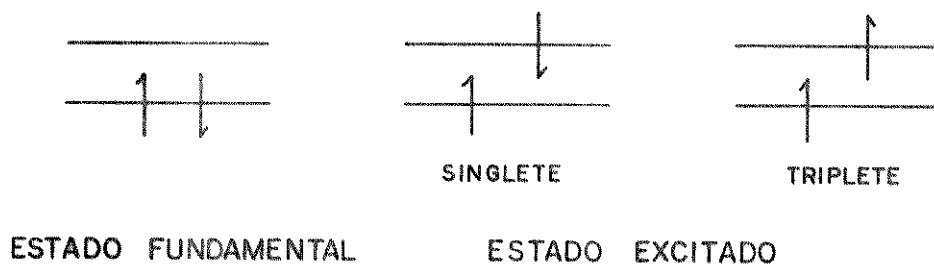
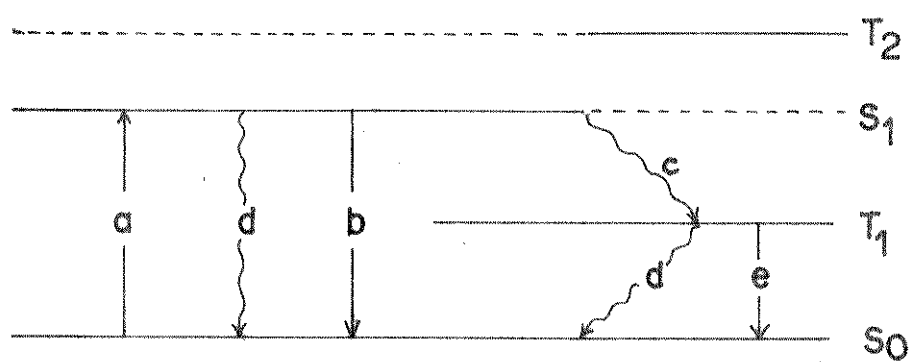


FIGURA 1



ESQUEMA 1. Diagrama de Jablonski

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| a = absorção | e = emissão (fosforescência) |
| b = emissão (fluorescência) | S_0 = estado singlete fundamental |
| c = cruzamento intersistema | S_1 = estado singlete excitado |
| d = desativação térmica | T_1, T_2 = estados triplete |

Como se pode observar, somente dois processos podem ser emissivos: $S_1 \rightarrow S_0$ e $T_1 \rightarrow T_0$. Não é comum ocorrer fosforescência em solução aerada, devido à supressão pelo oxigênio molecular de espécies triplete. Contudo, já foi detectada fosforescência na presença de oxigênio (1).

Os estados excitados singlete têm em geral, vida média (τ) muito curta em meio líquido (10^{-5} a 10^{-9} seg) ao passo que estados triplete têm vida mais longa (10^{-3} a alguns segundos) (2).

II.2 Formação de Estados Excitados

Como vimos, a excitação eletrônica pode ser feita por irradiação (Equação 1). Contudo, estados excitados (representados por asterisco) podem se formar como consequência de uma reação química (Equação 2) ou ainda por transferência de energia de uma molécula para outra no estado fundamental (Equação 3).

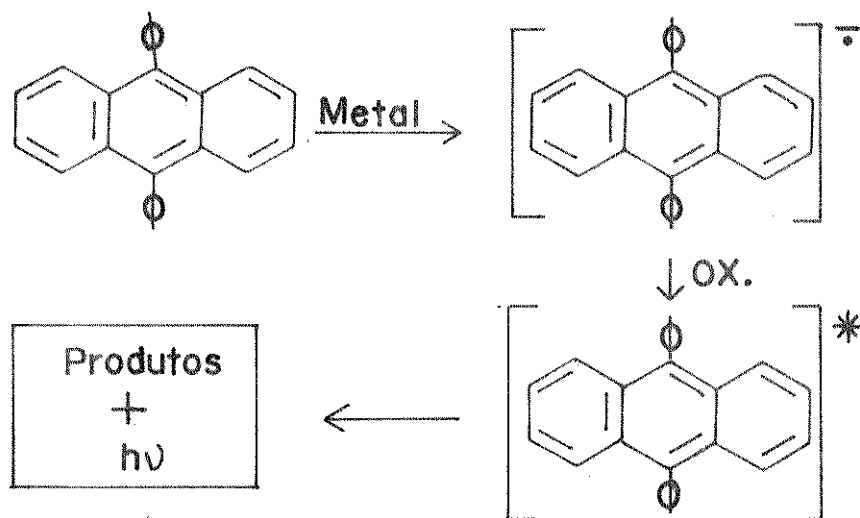


II.2.1 Formação de estados excitados por reações químicas

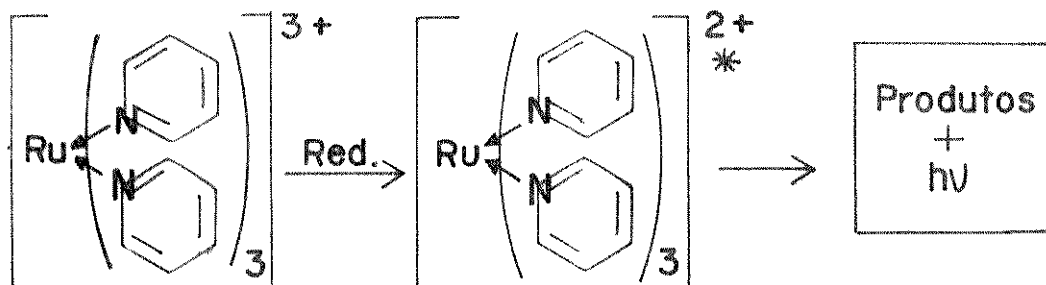
As reações químicas que podem fornecer estados excitados são as reações envolvendo transferência de elétrons e clivagem de peróxidos cíclicos e lineares.

II.2.1.1 Reações de transferência de elétrons

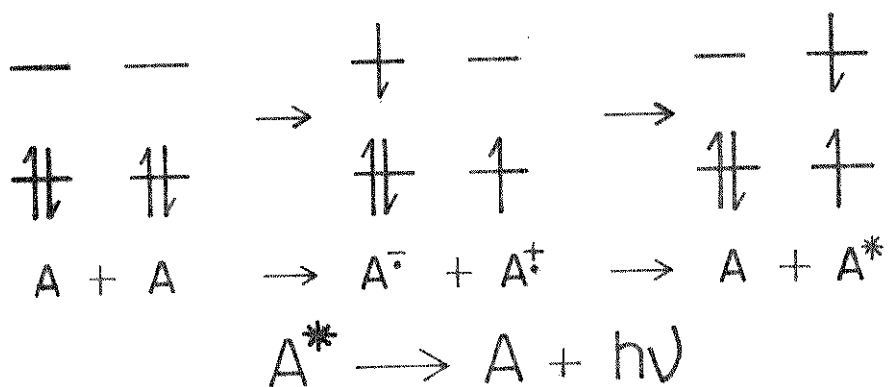
Nas reações de transferência de elétrons, moléculas excitadas podem resultar da remoção de um elétron de um ânion-radical (Esquema 2); da adição de um elétron a um cátion-radical (Esquema 3) ou ainda de um aniquilamento cátion-ânion. (Esquema 4) (3).



ESQUEMA 2



ESQUEMA 3

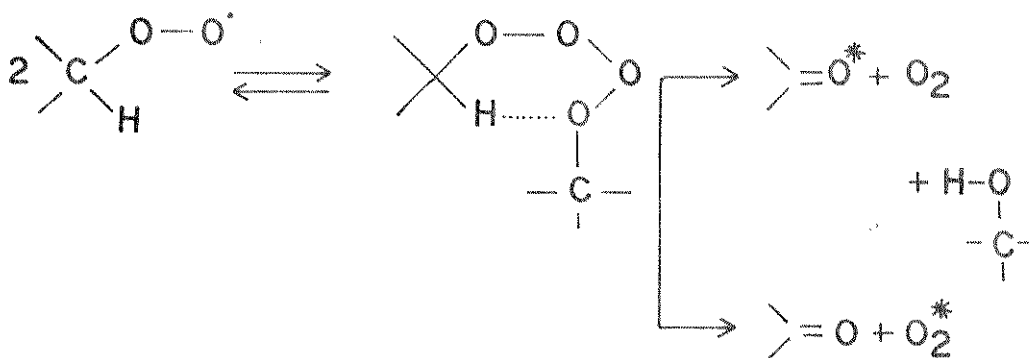


ESQUEMA 4

Na maioria dos casos estudados, o estado excitado é emissivo, e o processo global constitui um exemplo de quimiluminescência.

II.2.1.2 Reações de autoxidação envolvendo radicais peróxidos

Já são bastante conhecidas na literatura, as reações de autoxidação de hidrocarbonetos e polímeros, envolvendo radicais peróxidos (4, 5) (Esquema 5).

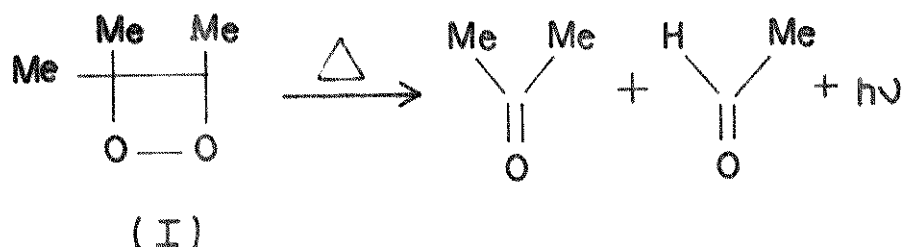


ESQUEMA 5

Pela regra de conservação de spin o O_2 formado deve estar no estado singlete, ou alternativamente, a cetona deve aparecer no estado triplete (6).

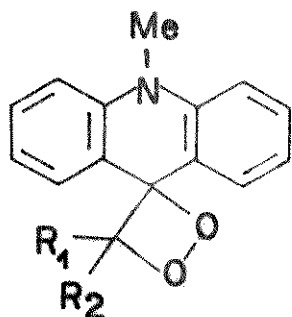
II.2.1.3 Reações via dioxetanos

Estados excitados podem se formar pela decomposição térmica dos 1,2-dioxetanos, como verificado inicialmente por Kopecky e Monford (7), na termólise do 3,3,4-trimetil-1,2-dioxetano (I) (Esquema 6).

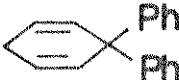


ESQUEMA 6

Os estados excitados formados na clivagem de dioxetanos são essencialmente tripletes, acompanhados de muito pouco singlete. Contudo, isso não é uma regra geral, visto que dioxetanos do tipo IIa,b,c geram após termólise, estados singletes em maior quantidade que os formados na clivagem de (I). Os mecanismos gerais propostos para a clivagem de dioxetanos (8,9), não explicavam a elevada proporção de singletes observada com os dioxetanos do tipo II. A recente descoberta de quimiluminescência quimicamente iniciada por troca de eletrons (CIEEL) por Koo e Schuster (10), permitiu o esclarecimento dos resultados obtidos com esses compostos.

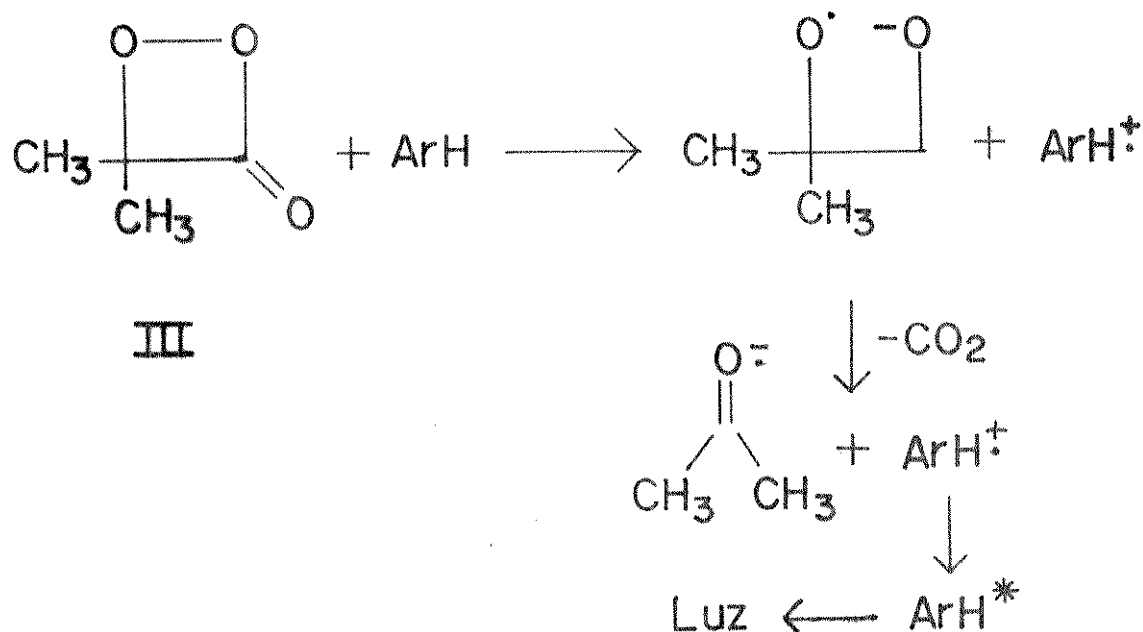


II a, $R_1 = H$, $R_2 = Ph$

b, $R_1 = R_2 =$ 

c, $R_1 = R_2 =$ adamantilo

Schmidt e Schuster (11) descobriram que dioxetanos com substituintes alquila (III), também geram luz na presença de hidrocarbonetos aromáticos (ArH), como resultado de um mecanismo CIEEL intermolecular (Esquema 7).

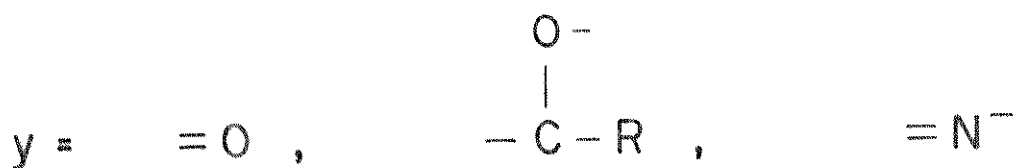
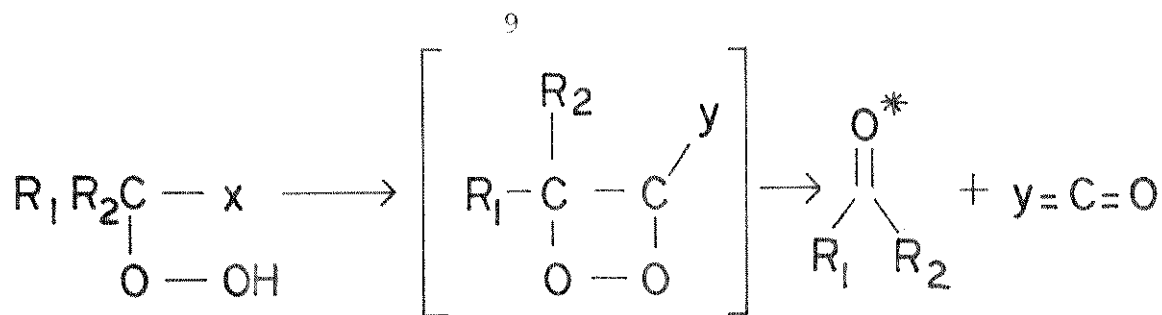


ESQUEMA 7

Esses mesmos autores atribuem a um mecanismo do tipo CIEEL, a alta eficiência de estados singletes formados em bioluminescência, como veremos mais adiante.

Muito antes dos dioxetanos serem isolados, postulava-se sua existência como intermediários de várias reações de hidroperóxidos e em reações de O_2 com compostos orgânicos.

Mais recentemente, Sawaki e Ogata (12) têm relatado sobre a quimiluminescência de reações catalisadas por base, de α -hidroperoxiêster (12), cetonas (13) e nitrilos (14) (Esquema 8).



ESQUEMA 8

II.2.2 Formação de estados excitados por transferência de energia

Estados excitados podem ainda ser formados por transferência de energia. O processo geral em que transferência de energia ocorre, constituem as reações fotosensibilizadas, onde o fotosensibilizador é o doador (D) e a molécula que recebe a energia é o acceptor (A) (Equações 4-6).



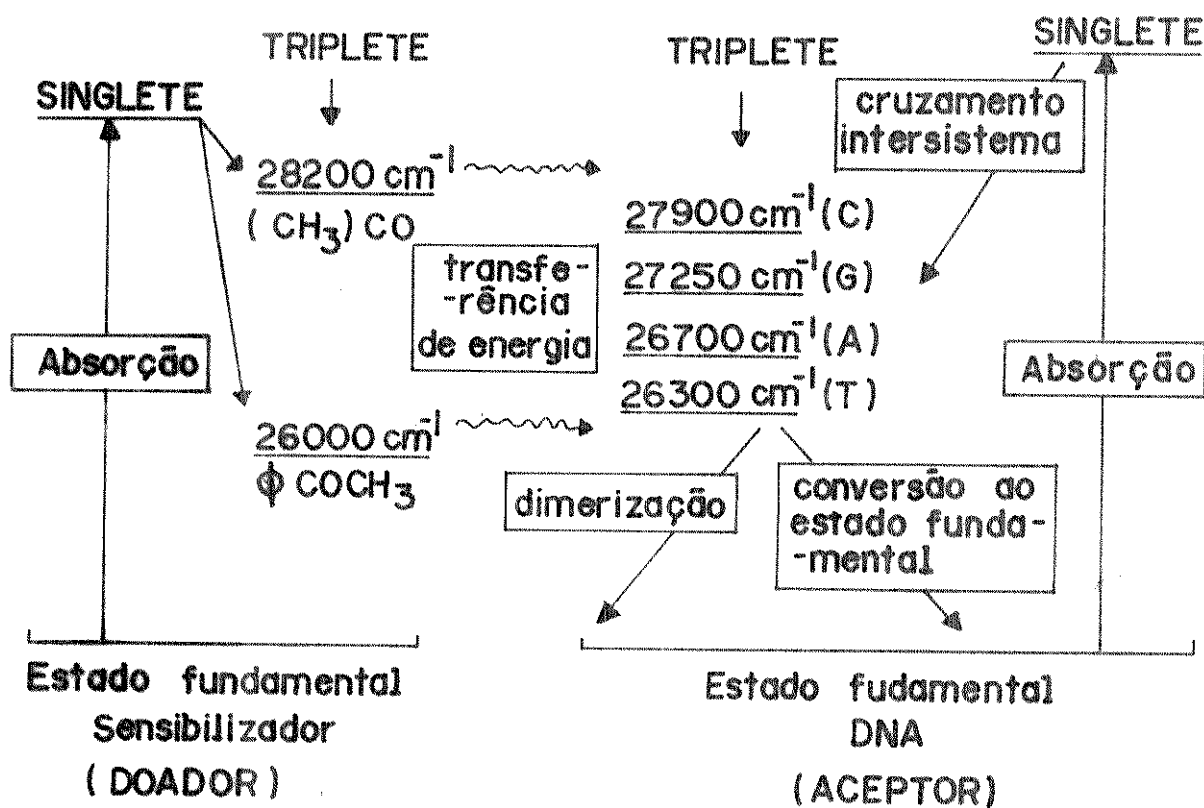
O conceito de transferência de energia triplete-triplete entre moléculas orgânicas surgiu em 1950, com os trabalhos de Terenin e Ermolev (15). Eles observaram que quando benzofenona e naftaleno são irradiados em um comprimento de onda absorvido por benzofenona, há significativa emissão de fos-

foreescência de naftaleno. Posteriormente com os trabalhos de Gilmore e col. (16) e Hammond e Moore (17), verificou-se que não são benzofenona, mas outros compostos com alta eficiência de cruzamento intersistema, podem ser empregados para sensibilizar uma série de reações químicas (18).

Em relação ao DNA, com o qual estamos particularmente interessados, a introdução do método da sensibilização do estado triplete do DNA (19), muito contribuiu para a tentativa de elucidação dos mecanismos de carcinogênese e mutagênese. Isso porque dímeros de pirimidina (uma lesão produzida por luz U.V. direta), podem ser induzidos em DNA através de transferência de energia de doadores apropriados tais como cetonas (acetona (20,21), benzofenona (22,24) e acetofenona (20,25)).

A acetofenona por exemplo, é excitada por comprimentos de onda superiores a 310 nm, onde o DNA não absorve, ao seu estado triplete por cruzamento intersistema. O estado triplete de acetofenona está num nível energético superior ao da timina, podendo portanto, transferir sua energia, levando à formação específica de dímeros de timina (ver Figura 11 e Esquema 9). As demais bases encontram-se em um nível superior ao da acetofenona, não podendo portanto, ser sensibilizadas.

Já a acetona, por ter o seu estado triplete acima de todas as bases do DNA, é capaz de produzir dímeros de timina-citosina e citosina-citosina (26).

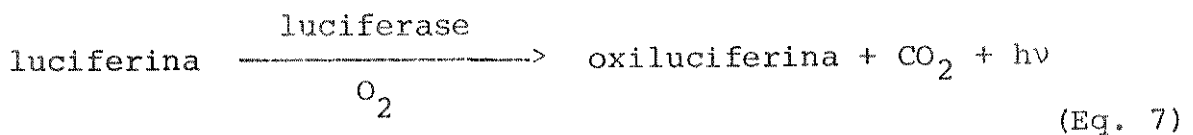


ESQUEMA 9

III. ESTADOS EXCITADOS GERADOS ENZIMATICAMENTE

III.1 Sistemas Bioluminescentes

A bioluminescência ou emissão de luz por seres vivos, resulta de uma reação oxidativa catalisada por enzima (27), (ver Apêndice II), em que o substrato recebe o nome genérico de luciferina (as luciferinas diferem entre si de um organismo para outro) e o enzima de luciferase. A reação pode ser esquematizada como segue abaixo (Equação 7).



A cor dessa luz emitida pelos diversos organismos vai desde o azul (460 nm) de certos crustáceos, passando pelo verde (530 nm) de cogumelos, pelo amarelo-esverdeado até a laranja (540-580 nm) de vagalume até o vermelho (600 nm) da forma larval do inseto Diplocardia longa (28).

Uma vez que os componentes de tal reação foram isolados e caracterizados (29-31), pode-se realizá-la in vitro com sucesso.

A luminescência de tal sistema enzimático provém de estados excitados singletes, que se desativam emitindo luz fluorescente, com alto rendimento quântico (0,88 hv por molécula de substrato, em vagalumes (32)).

Tem-se postulado que a espécie geradora de estados excitados em bioluminescência de vagalume Photinus (33) crustáceos Cypridina (34), celenterado Renilla (35) e molusco Latia (36), cujas luciferinas já foram isoladas e suas estrutu-

ras determinadas, seria um intermediário dioxetanona (IV, V, VI e VII, Figura 2, respectivamente).

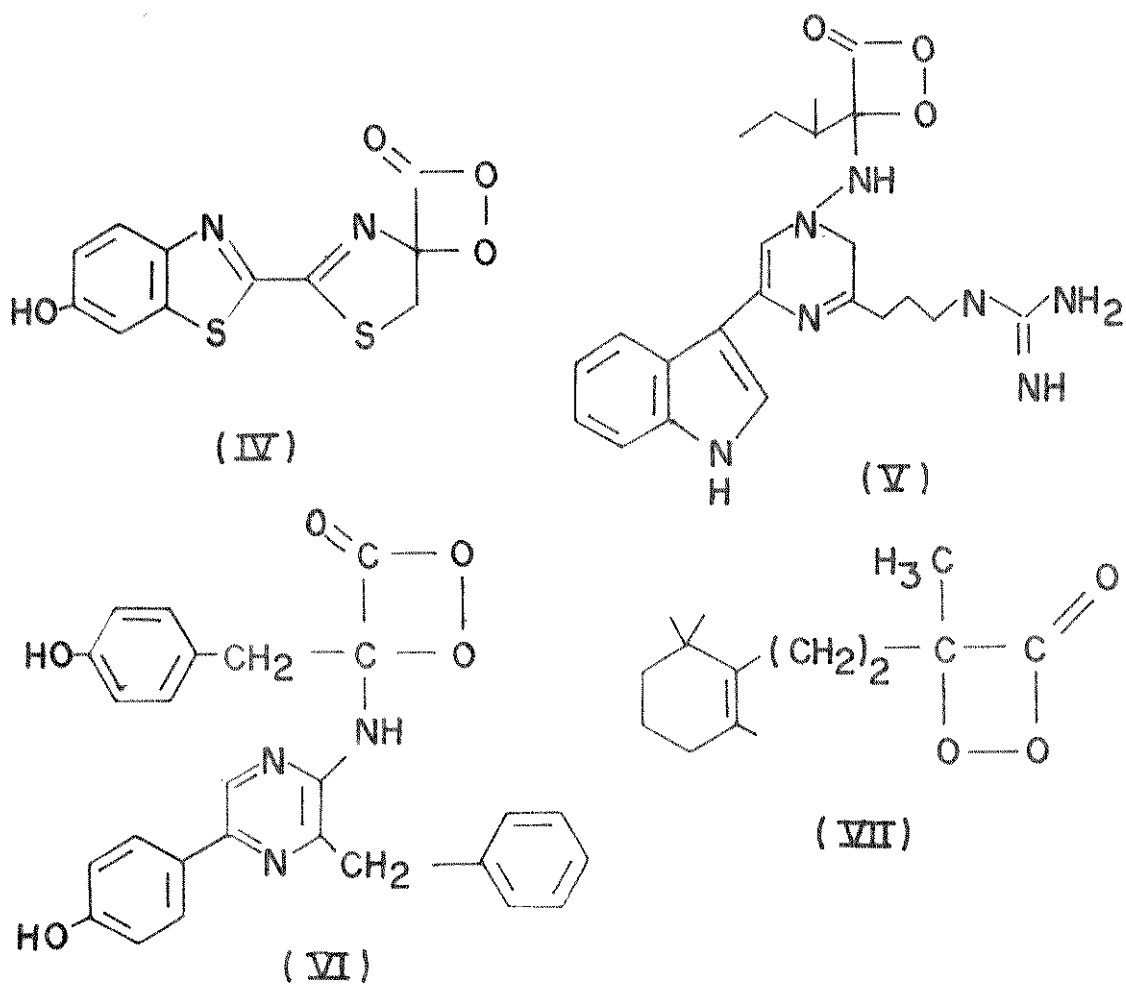
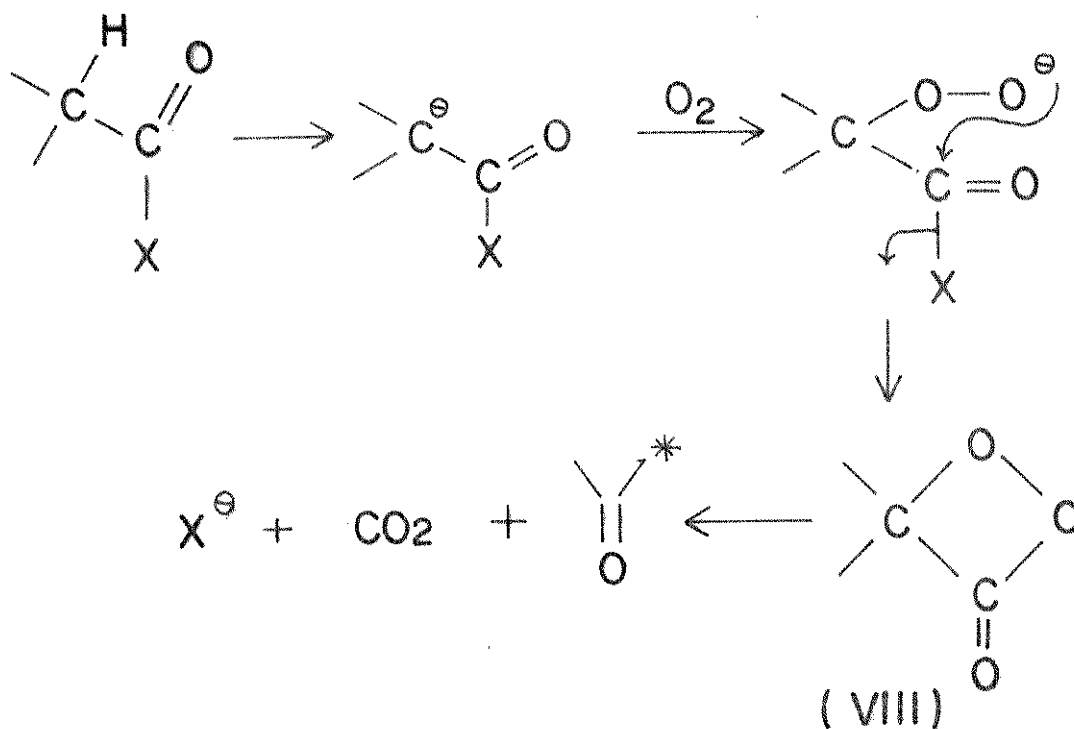


FIGURA 2

A formação desse intermediário (VIII) seguiria o mecanismo proposto por McCapra (37), o qual envolve:

1. geração de carbanion adjacente ao grupo carbonílico;
2. formação de ânion peróxido adjacente ao carbanion;

3. ataque nucleofílico interno, com expulsão de um bom grupo abandonador (Esquema 10).

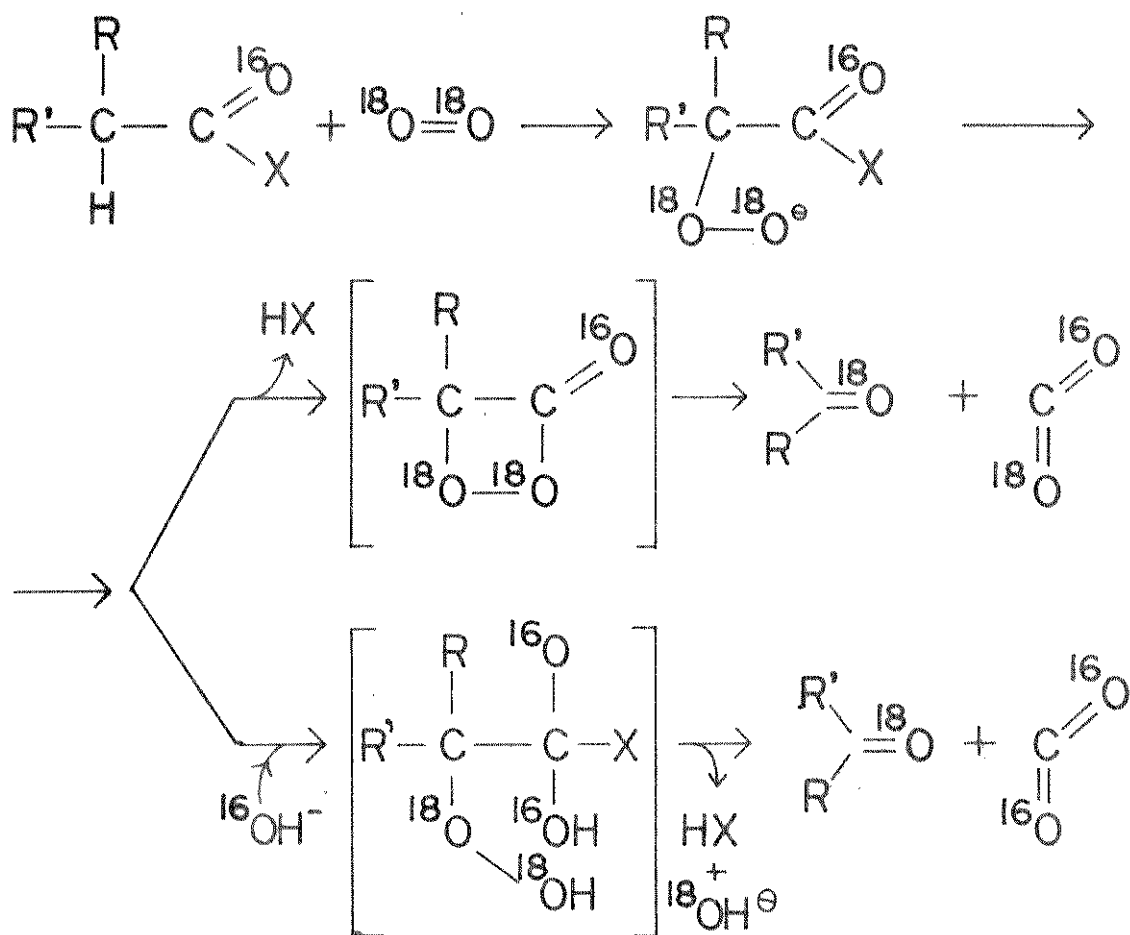


ESQUEMA 10

A formação do carbanion seria catalisada pela enzima luciferase. Como formulado acima, a formação do íon peróxido violaria a regra de conservação de spin. É, portanto, possível que ocorra o seguinte mecanismo em cadeia (38) (Equações 8-10).



Contudo, a simples postulação de um mecanismo contendo composto cíclico intermediário não é suficiente, uma vez que outras possibilidades mecanísticas existem. Um mecanismo frequentemente lembrado propõe a intervenção de um intermediário não cíclico. Ambos estão representados de maneira esquemática em uma reação empregando oxigênio molecular constituído de isótopo $^{18}\text{O}_2$ e não $^{16}\text{O}_2$ (Esquema 11).



ESQUEMA 11

A rota com intermediário cíclico prevê que 50% de $^{18}\text{O}_2$ faria parte do gás carbônico formado. No caso da segunda rota, o gás carbônico não estaria marcado com o isótopo-18.

Experiências realizadas com luciferinas de vagalume, Cypridina e Renilla mostraram resultados conflitantes: DeLuca e colaboradores não descobriram incorporação de $^{18}\text{O}_2$ em luciferina de vagalume (39) e Renilla (40), enquanto que Shimomura e Johnson descobriram incorporação de $^{18}\text{O}_2$ como previsto pela hipótese de um intermediário dioxetano, em luciferina de Cypridina (41) e vagalume (42).

Contudo, Shimomura e col. (43), parecem ter esclarecido a causa da controvérsia, mostrando que a proporção de $^{18}\text{O}_2$ é um fator decisivo no resultado: com quantidades muito pequenas de luciferina de Cypridina (<1 μmol), como nos experimentos de DeLuca, a troca de O_2 entre CO_2 e água domina a reação, resultando na aparente não incorporação de $^{18}\text{O}_2$ em CO_2 . Isso parece ser uma explicação satisfatória ao argumento em favor de um intermediário cíclico.

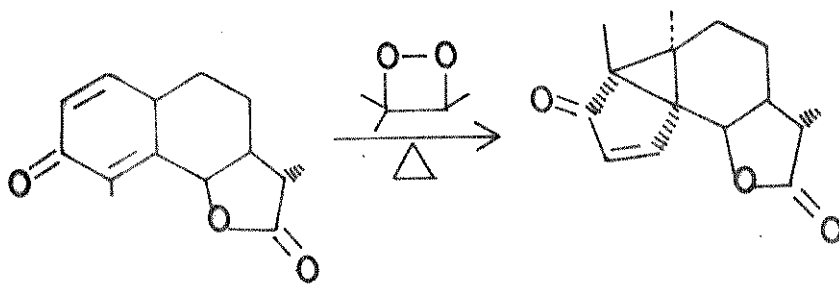
Outro fator que levaria a resultados antagônicos também levantada por Shimomura e col. (43), seria o efeito de CO_2 contaminante. Para eliminar esse efeito usaram luciferinas de vagalume marcadas (^{13}C , carbono carbonílico) no lugar de luciferinas regulares e também realizaram a reação em meio que CO_2 contaminante foi substituído por $^{13}\text{CO}_2$ a fim de distinguí-lo do CO_2 produto da reação. Em todos esses experimentos, os resultados levaram à sugestão do envolvimento de um intermediário dioxetânico.

III.2 Sistemas biológicos não luminescentes

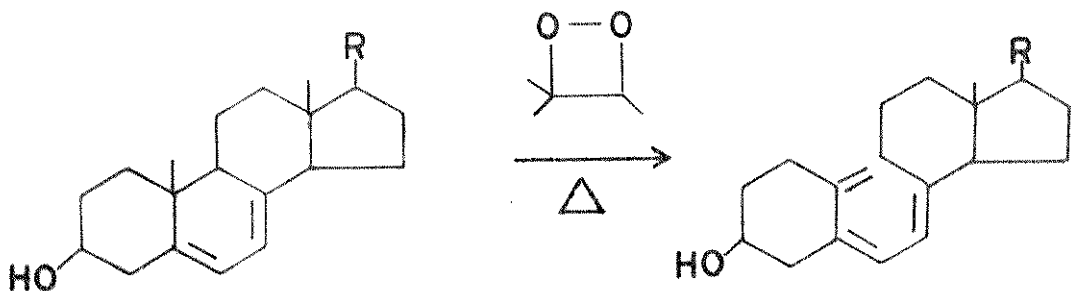
Como vimos, estados excitados podem ser formados quimicamente em sistemas biológicos, através de intermediário dioxetanico, como evidenciado pelo fenômeno da bioluminescência.

Muitos processos fotoquímicos têm sido induzidos no escuro usando-se dioxetanos como geradores de estados excitados, a saber:

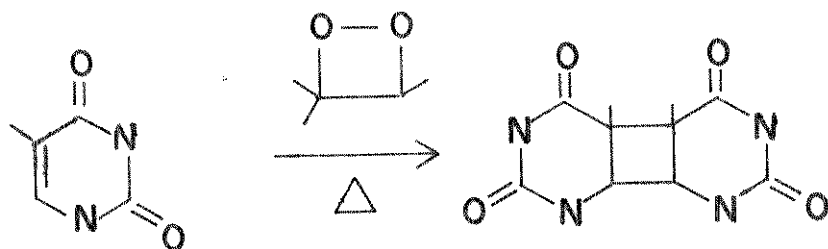
- conversão de santonin em lumisantonin (44) (Esquema 12);
- conversão de ergosterol em vitamina D₂ (45) (Esquema 13);
- formação de dímeros de pirimidina em DNA (46) (Esquema 14)



ESQUEMA 12



ESQUEMA 13



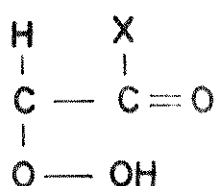
ESQUEMA 14

Os dioxetanos poderiam, portanto, também se formar em outros sistemas biológicos, porém não luminescentes (47-50).

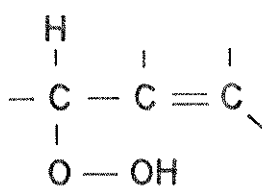
Os sistemas mais prováveis de gerar tais estados excitados são as reações catalisadas por hemoproteínas, principalmente as peroxidases (ver Apêndice I), devido ao fato de que as luciferases podem atuar como peroxidases (51).

Importante também foi o isolamento de um dioxetano como produto de uma oxidação catalisada por peroxidase (52).

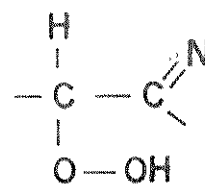
Recentes revisões a respeito dos sistemas envolvendo peroxidases têm sido publicadas (53,54) e todos eles sugerem um mecanismo via dioxetano, originado de um α -hidroperóxido, com formação de um composto carbonílico excitado triplete reforçando a hipótese de que estados excitados seriam formados em sistemas biológicos envolvendo as peroxidases ou enzimas correlatas, entre eles os sistemas onde atuam as α -peroxidases (IX) (55,56) as lipoxidases (X) (57,58) e talvez as triptofano-oxigenases (XI) (59).



(IX)



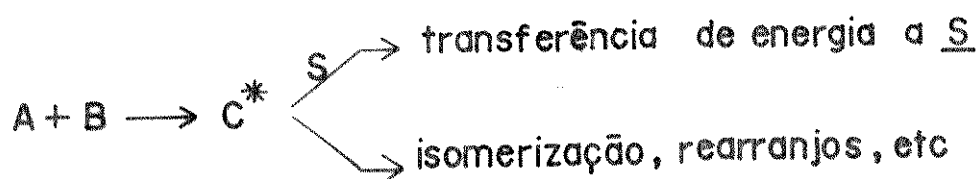
(X)



(XI)

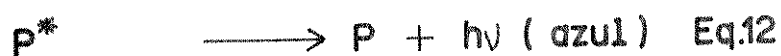
III.2.1 Transferência de energia para biomoléculas

Se os estados excitados gerados pelos sistemas de peroxidases não se destinam à emissão de luz, é natural suspeitar que eles sejam utilizados para outros fins, ou seja para realizarem trabalho, tal como em fotoquímica (Chamada fotoquímica sem luz) (Esquema 15).



ESQUEMA 15

A idéia da ocorrência de transferência de energia é fortalecida por exemplos encontrados até mesmo em sistemas bioluminescentes (Equações 11-14). (60,61).



Tem-se observado que em certos organismos vivos, a luz emitida era a mesma que a da reação realizada in vitro (62-67), correspondendo à transição na etapa da Eq.12. Mas, em muitas outras espécies, a cor da luz emitida era verde, enquanto que a emissão da reação in vitro era azul (68,69).

Isso indicaria que nos seres vivos estaria ocorrendo transferência de energia (Eqs. 13 e 14) de uma molécula no estado excitado (P^*) para outras espécies (B) não existentes na reação isolada, com emissão de seu estado excitado (B^*) (Eq. 14).

Em relação do DNA, a possibilidade de ocorrência de transferência de energia em processos relacionados com mutação espontânea e carcinogênese, não deve portanto, ser excluída (72).

III.3 Deteccão de estados excitados em sistemas biológicos

A deteccão de estados excitados em sistemas biológicos pode ser feita por via direta, ou seja, em um espectrofluorímetro convencional ou com um contador de fótons. Mesmo os estados tripletes (não emissivos em solução aerada), podem ser detectados em espectrofluorímetro normal, desde que protegidos da desativação por oxigênio.

Outro meio de deteccão de estados excitados seria por via indireta. Transferência de energia a aceptores apropriados é bastante útil. Assim quando não se sabe se o estado excitado é triplete ou singlete costuma-se usar 9,10-difenilantraceno-2-sulfonato de sódio (DPAS). Para espécies tripletes usa-se 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio (DBAS) e também eosina e rosa bengala. Tais agentes fluorescentes devem absorver na região de fosforescência do doador, ou seja, a banda de fosforescência do doador, deve sobrepor-se ao espectro de absorção do aceptor.

Quando não temos transferência de energia para um determinado aceptor, não quer dizer que o estado excitado não tenha sido produzido, já que poderia ser que a reação seja o passo mais importante. Assim, podemos procurar também os "fotoprodutos" provenientes das modificações químicas

cas de estados excitados, como rearranjo, isomerização, dimerização, clivagens, etc.

O emprego de sistema-modelo é um outro método bastante útil. Nestes casos a ação da enzima seria substituída por um solvente aprótico (DMSO) aerado na presença de base forte, tal como terc-butóxi. A ocorrência de emissão de luz no sistema modelo permite suspeitar que também no sistema enzimático há a produção de espécies excitadas.

IV. FOTOQUÍMICA DO DNA

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é constituído de cadeias de desoxirribonucleotídeos ligadas covalentemente (Figura 3).

Cada desoxirribonucleotídeo possui três componentes característicos:

1. uma pentose (2-desoxi-D-ribose);
2. uma base nitrogenada heterocíclica, que é um derivado de pirimidina ou purina;
3. uma molécula de ácido fosfórico.

As quatro bases características das unidades desoxirribonucleotídicas do DNA são: Adenina, Guânina (derivados da purina) e Citosina, Timina (derivados da pirimidina) (Figura 4).

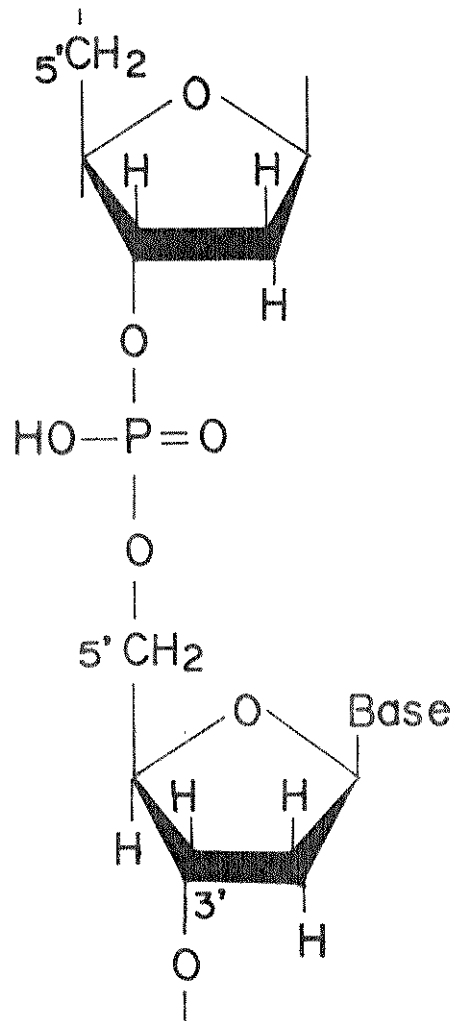
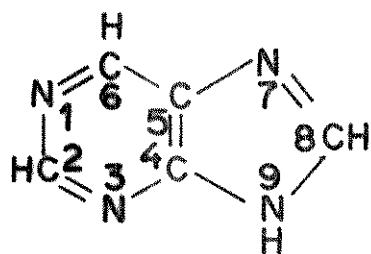
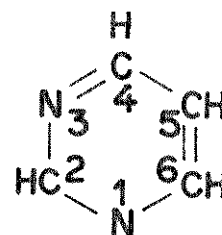


FIGURA 3. Estrutura do esqueleto covalente das cadeias de DNA.



Purina (composto de origem)



Pirimidina

(composto de origem)

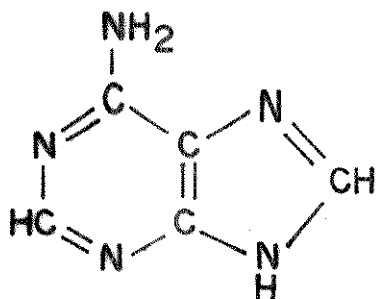
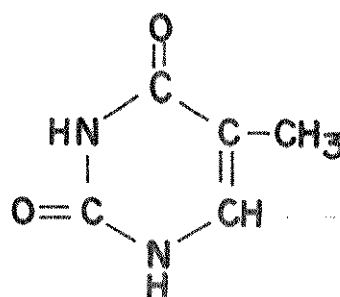
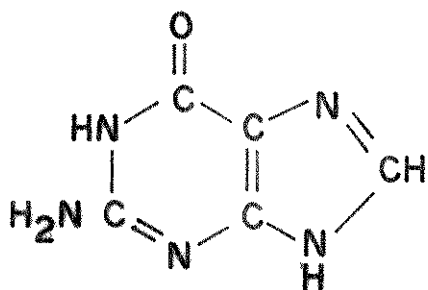
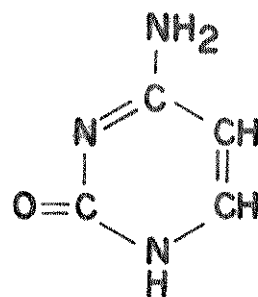
Adenina
(6 - aminopurina)Timina
(5 - metil - 2,4 - dioxopirimidina)Guanina
(2 - amino - 6 - oxopurina)Citosina
(4 - amino - 2 - oxopirimidina)

FIGURA 4. Estruturas das bases purínicas e pirimidínicas do DNA.

Para entendermos, portanto, que tipos de alteração um processo de transferência de energia estaria ocasionando, os aspectos da interação da radiação U.V. com o DNA, devem ser conhecidos. É o que veremos a seguir.

1. Desoxirribose

A desoxirribose constitui cerca de 40% do peso do DNA, mas como não apresenta nenhuma absorção U.V., em comprimentos acima de 230 nm, é de se esperar que não sofra alterações fotoquímicas diretas quando submetida a comprimentos de onda maiores que 230 nm.

Contudo, tal pentose pode sofrer fotoquímica indireta (isto é, reações fotosensibilizadas) nesses comprimentos de onda, levando a quebras na cadeia do DNA (73).

2. Bases purínicas

Desde que purinas em solução são cerca de 10 vezes mais resistentes às alterações fotoquímicas do que as pirimidinas, tem-se assumido que alterações fotoquímicas nas purinas não são biologicamente importantes. Dentro da célula, contudo, ácidos nucleicos não estão em solução pura e tem-se demonstrado que as purinas podem reagir fotoquimicamente muito mais rapidamente com outros compostos orgânicos do que as pirimidinas (74,75), para formar heteroadutos (Figura 5). Portanto, a fotoquímica das purinas é uma área que precisa de intensiva investigação, assim como os efeitos biológicos de fotoprodutos de purinas.

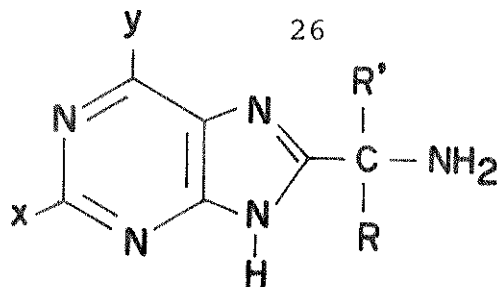


FIGURA 5. Heteroaduto de uma amina e uma purina.

3. Bases Pirimidínicas

3.1 Reações Unimoleculares

3.1.1 Hidratação

A primeira reação fotoquímica de pirimidinas descoberta que não causava destruição do anel, foi a adição de uma molécula de água à dupla ligação 5,6, para formar o que geralmente chamamos de fotohidrato (Figura 6).

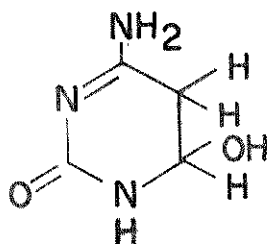


FIGURA 6. Fotohidrato de citosina

Os hidratos de pirimidina podem por eliminação da molécula de água, ser convertidos à estrutura original com boa eficiência através da alteração do pH ou elevação da temperatura da solução. O possível papel do hidrato de pirimidina de causar mutações devido aos erros de pareamento durante a replicação do DNA, tem sido demonstrado em sistema-modelo in vitro (76).

3.1.2 Oxidação e redução

O grupo metil da timina pode ser fotoquimicamente oxidado para formar grupos alcoólicos e aldeídicos in vitro (Figura 7) e a dupla ligação 5,6 pode ser reduzida pela adição de dois átomos de hidrogênio (Figura 8). A importância biológica de tais reações in vivo é, contudo, desconhecida.

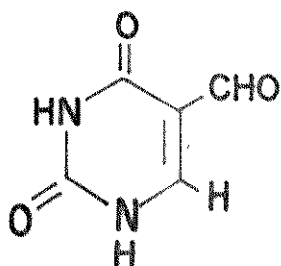
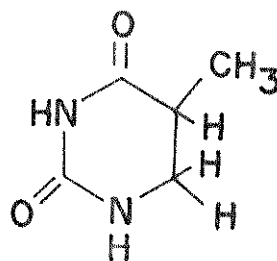


FIGURA 7. Timina cujo grupo metila foi oxidado a um aldeído

FIGURA 8. 5,6-dihidrotimina



Lesões do tipo 5,6-dihidroxitimina (Figura 9), são produzidas por radiação ionizante (77), mas recentemente elas tem sido observadas depois da irradiação U.V. (78).

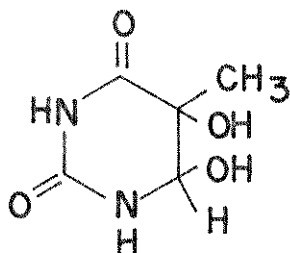


FIGURA 9. 5,6-dihidroxitimina

Em 280 nm, cerca de 0,06 moléculas desse produto é produzido para cada dîmero de timina do tipo ciclobutano (Figura 10), mas 0,73 são formadas por dîmero a 313 nm. Desde que a radiação U.V. próximo a 300 nm é a mais efetiva para pro-

duzir cancer de pele, torna-se interessante determinar o papel de fotoprodutos do tipo 5,6-dihidroxitimina.

3.2 Reações Bimoleculares

Enquanto que o número de reações fotoquímicas que purinas e pirimidinas podem sofrer é limitado, o número de reações bimoleculares é quase ilimitado. As reações bimoleculares podem ser divididas em duas classes: (A) aquelas que ocorrem entre as bases do DNA e (B) aquelas que ocorrem entre uma base e outro tipo de composto (isto é, reações de heteroadição).

(A) A reação bimolecular mais conhecida é a ligação de duas pirimidinas por duas ligações covalentes para formar um dímero do tipo ciclobutano (Figura 10). Tais dímeros são forma-

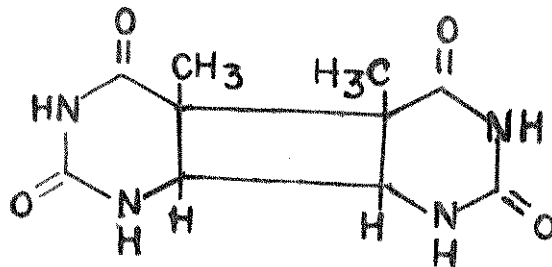


FIGURA 10. Dímero de timina do tipo ciclobutano.

mados in vivo através de doses de radiação U.V., entre dois resíduos adjacentes de timina, entre dois resíduos adjacentes de citosina e entre resíduos adjacentes de timina e citosina. Devido unicamente à estabilidade química do dímero de timina, e portanto à facilidade com que pode ser isolado e analisado, é o fotoproduto de DNA que tem sido mais estudado em termos de química e importância biológica.

Outros tipos de adutos entre pirimidinas também são conhecidos (Figuras 11 e 12). Em geral, esses produtos são produzidos em rendimento muito menor que os dímeros do tipo ciclobutano, mas isso não significa que eles possam ter uma importância biológica menor.

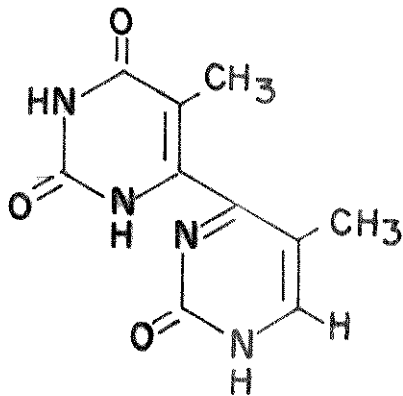


FIGURA 11. Aduto de timina

É bem conhecido que o rendimento de um dado fotoproduto de DNA é marcadamente afetado pelo estado físico do DNA. Por exemplo, em bactérias vegetativas submetidas à radiação U.V., o dímero de timina do tipo ciclobutano foi o maior fotoproduto encontrado, enquanto que, em bactérias na forma de esporos, muito pouco desse tipo de dímero foi formado, sendo que foi encontrado um novo tipo de aduto entre resíduos de timina (também chamado fotoproduto de esporos) (Figura 12).

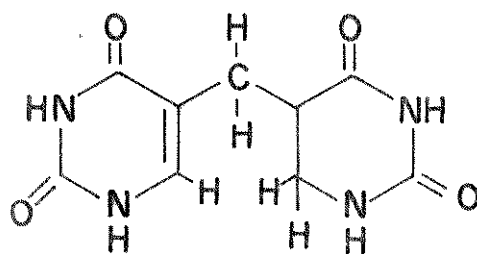


FIGURA 12. Fotoproduto de esporo (5-timinil-6-hidrotimina)

(B) O primeiro tipo de heteroadição descoberto in vivo, foi a reticulação de DNA e proteína. Foi produzido tanto pela exposição à luz U.V. (254 nm), como à luz visível em presença de um corante como acridina orange. A importância biológica de tal

tipo de reação tem sido documentada (77). Uma reação fotoquímica entre timina e aminocisteína, tem sido observada e poderia ser um mecanismo para a ligação entre proteínas e DNA in vivo (Figura 13).

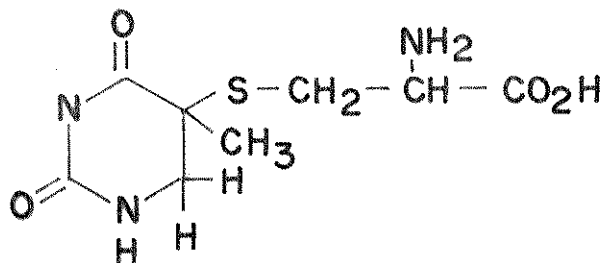


FIGURA 13. 5 -S-cisteína, 6-dihidrotimina

Tem-se conseguido combinar uma variedade de compostos com as bases do DNA durante irradiação. Algumas dessas reações são produzidas pela absorção direta de luz U.V., enquanto que outras requerem radiação U.V. ou visível e a intervenção de uma terceira molécula que age como sensibilizador (isto é, absorve a energia de irradiação e a transfere para as moléculas que irão se combinar com o DNA).

Ainda outras reações bimoleculares são produzidas por radiação gama e raios-X (78).

A importância biológica desse tipo de reação de heteroadição entre bases de DNA e outras classes de compostos, ainda está começando a ser investigada. Uma vez que DNA não existe na forma pura dentro das células, mas em íntimo contato com proteínas, lipídeos, carboidratos e metabólitos, é bastante provável que mais e mais exemplos desse tipo de reação serão encontrados (79).

4. Quebras na Cadeia Açúcar-Fosfato

Na Figura 14 vemos os diferentes lugares onde os grupos fosfo-éster e desoxirribose podem ser clivados, o que explica os muitos mecanismos de reparo de quebras hoje conhecidos (80).

Basicamente, as quebras podem ocorrer em uma fita ou nas duas fitas do DNA, sendo que a radiação ionizante (raios-X) é a mais efetiva em termos de indução desses dois tipos de quebras (Figura 15).

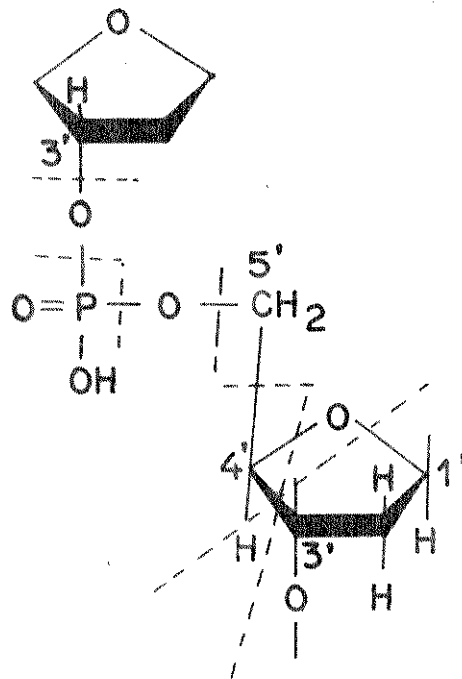


FIGURA 14. Sítios (linhas pontilhadas) onde podem ocorrer quebras.

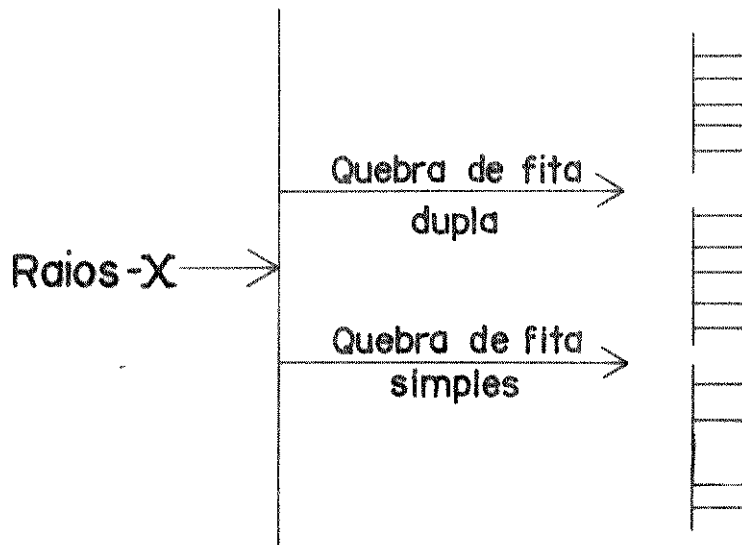


FIGURA 15. Representação esquemática de quebras em uma cadeia (fita simples) ou nas duas cadeias (fita dupla) do DNA.

Contudo, estudos com radiação acima de 365 nm têm revelado a formação de quebras de fita simples, a uma velocidade ligeiramente superior à metade da velocidade de indução de dímeros de timina (81). Quebras de fita dupla ainda se encontram em estudo, uma vez que na verdade, elas podem resultar da fragilidade da dupla hélice à quebras de fita simples.

V. DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES NO DNA

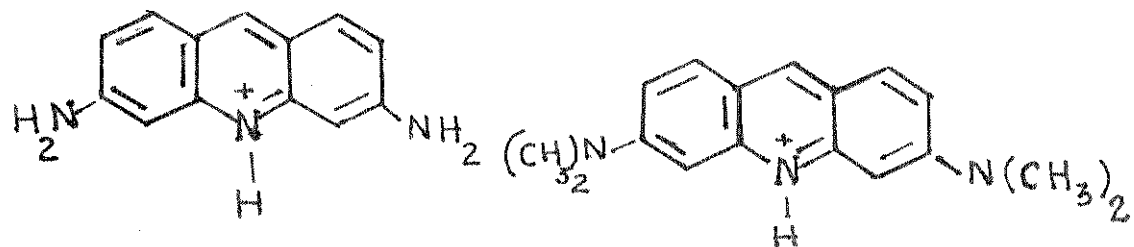
V.1 Método de sondas fluorescentes

O uso direto das propriedades emissivas dos ácidos nucleicos na investigação de alterações em sua estrutura, tem sido muito limitado. Isso tem-se devido ao fato de que dentro de pH fisiológico e à temperatura ambiente, os eletrons excitados dos ácidos nucleicos rapidamente sofrem decaimento não radiativo aos seus estados fundamentais (82-84). Uma possível solução consiste na utilização de substâncias que possuem a capacidade de sofrer aumento ou diminuição de sua fluorescência natural, quando interagem com os ácidos nucleicos. Tal classe de substâncias consiste de certos cátions da série dos lantanídeos e corantes derivados de acridina (Figura 16).

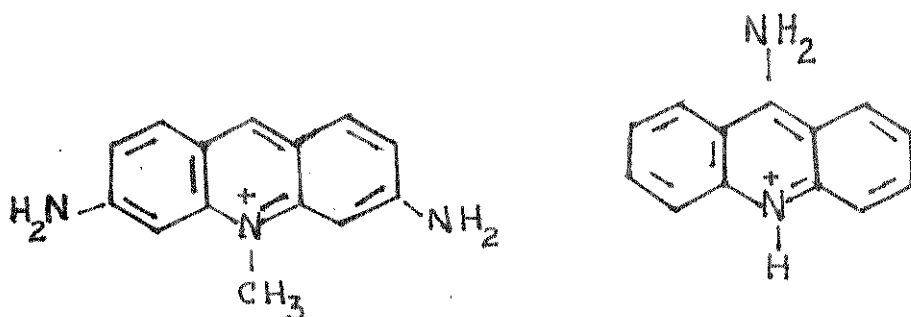
Na série dos lantanídeos, tem-se observado que o tório (Tb^{3+}) pode ser útil na detecção de mudanças nas regiões de fita simples do DNA (85). O Tb^{3+} sofre um aumento de várias vezes na intensidade de sua fluorescência, quando na presença de DNA ou RNA (86-89).

Mais recentemente, estudos em solução aquosa a pH 6,0, mostram que esse aumento está associado com os resíduos de desoxirribonucleotídeos de guanina em DNA (90).

Portanto, alterações químicas no anel de guanina, refletir-se-ão na intensidade de fluorescência do Tb^{3+} , de onde podemos concluir que tal sonda pode ser útil para detectar modificações químicas nos resíduos de guanina de ácidos nucleicos, que podem ocorrer durante suas funções biológicas, ou como resultado de ataques de agentes carcinogênicos.

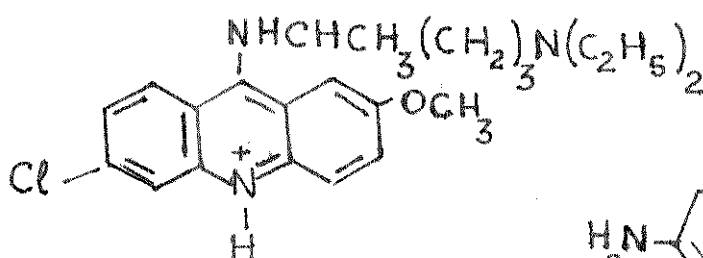


Proflavina (PF) Acridina Laranja (AL)

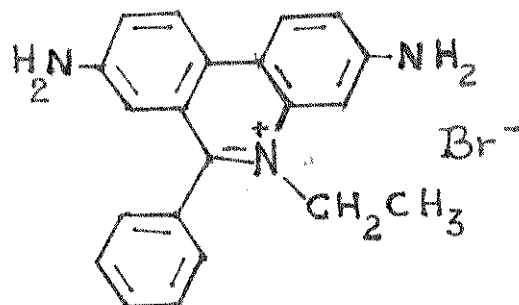


Acriflavina

9-aminoacridina



Quinaçrina



Brometo de etídio

FIGURA 16. Estrutura química de algumas drogas derivadas de acridina e da fenantridina, o brometo de etídio.

O estudo das interações de acridinas (Figura 16) com ácidos nucleicos tem sido uma área de intensa pesquisa (91-93).

O modelo intercalativo proposto por Lerman (94), segundo o qual a molécula de corante se intercala entre dois pares de bases adjacentes da hélice do DNA (Figura 17), explica as propriedades da forte interação que ocorre a razões de concentração de DNA-fosfato/concentração de corante altas.

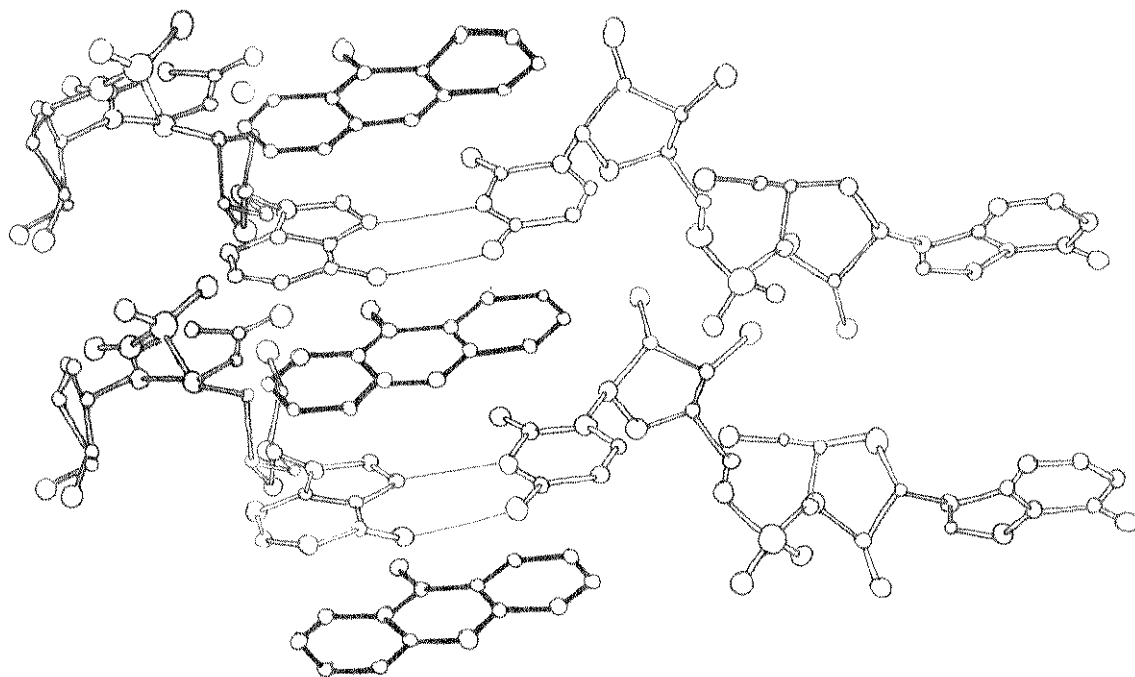


FIGURA 17. Modo da interação intercalativa de 9-amino-acridina com adenilil-3'-5'-uridina. As moléculas da acridina têm as ligações representadas em preto.

Tem-se descoberto que a intensidade de fluorescência de tais corantes difere bastante em termos dos efeitos dos diferentes sítios aos quais se liga no DNA. Especificamente quando proflavina (PF) está intercalada entre pares AT adjacentes no DNA, a intensidade de fluorescência é aproximada

mente a mesma que quando está livre em solução. A presença de um único par GC adjacente à PF ligada é suficiente para produzir a supressão de sua emissão (95-101). Acriflavina (102-103) e quinacrina (104-106), mostram comportamento similar. Ao contrário, a fluorescência de acridina laranja (AL), aumenta quando ligada ao DNA, parecendo indicar que exista um só tipo de interação com o DNA, não havendo portanto, sítios supressores de emissão (96,97,107,108).

Pode-se concluir que se ocorrer alguma alteração nos sítios de ligação de tais corantes com o DNA, a sua intensidade de fluorescência será afetada. Daí o nome de sonda atribuído a esses compostos, visto que elas proporcionam uma medida indireta das possíveis alterações na estrutura do DNA.

Íons metálicos tais como prata e mercúrio (109), podem fornecer informações sobre as interações dos corantes com o DNA, podendo portanto, fornecer também informações úteis.

A prata forma diferentes complexos com o DNA. Quando a razão \underline{r} (moles de íon metálico adicionado por moles de DNA), está abaixo de 0,2 a prata se liga aos sítios guanina-citosina (GC), especificamente entre o N₇ e o grupo -C₆O da guanina. Esse tipo de complexo é chamado tipo I (Figura 18). (110)

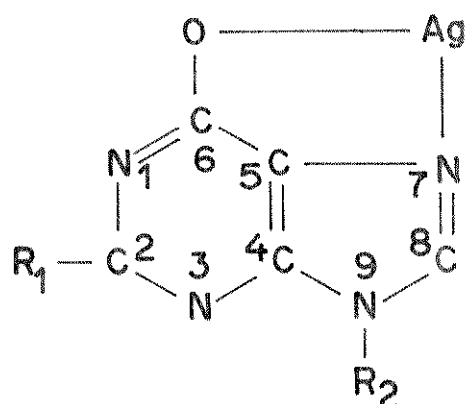


FIGURA 18. Modo de interação entre prata e guanina.

Para \underline{r} entre 0,2 e 0,5 a ligação é acompanhada por deslocamento de proton e acredita-se que as pontes de Ag^+ são formadas entre bases opostas de DNA, envolvendo a conversão da ligação de ponte de hidrogênio $\text{N-H}\dots\text{N}$ para uma ligação N-Ag-N . Tal tipo de interação envolve os pares adenina-timina (AT) e guanina-citosina (GC) e recebe o nome de complexo tipo II (Figura 19).

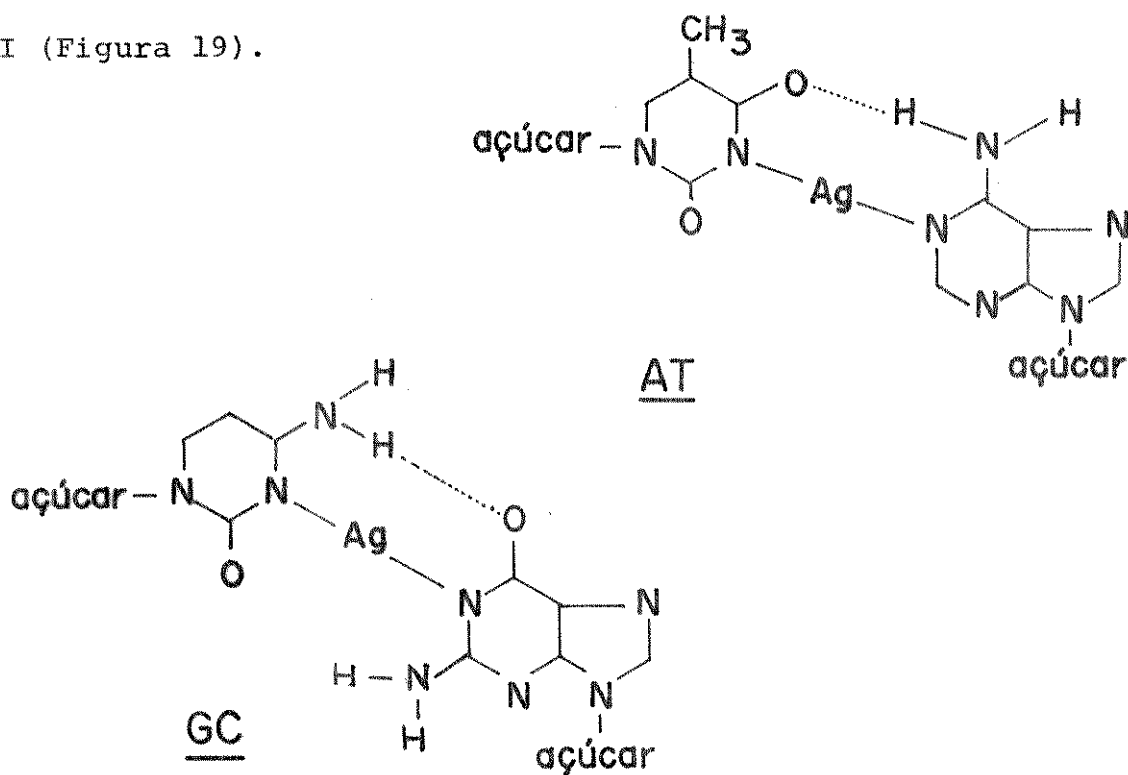


FIGURA 19. Complexos tipo II de prata com DNA.

Quanto ao mercúrio, tem-se proposto (111, 112), que para \underline{r} menor do que 0,5 pontes são formadas entre bases opostas com uma preferência por sítios ricos em timina. A preferência de Ag^+ por sítios GC e de Hg^{2+} por AT, tem sido utilizada para separar DNA's de diferentes proporções de AT (113).

V.2 Dicroísmo circular (CD)

Quando a luz linearmente polarizada passa através de uma banda de absorção, a intensidade dos componentes da luz circularmente polarizada é reduzida. Se os componentes da luz circularmente polarizada forem absorvidos de maneiras diferentes, a banda de absorção é dita ser óticamente ativa e teremos CD, a diferença em absorbância entre os dois componentes da luz circularmente polarizada. Portanto, podemos expressar CD simplesmente como uma diferença na absorvidade molar (ϵ) entre os componentes da luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita ($\epsilon_e - \epsilon_d$). Uma vez que a luz incidente nesse caso é convertida em luz elipticamente polarizada depois de sair do meio, nós podemos também expressar CD em termos de sua elipticidade ψ .

O espectro CD e seu correspondente ORD de uma banda de absorção óticamente ativa são comumente chamados efeitos Cotton. Na Figura 20 temos o efeito Cotton de uma banda de absorção com o seu máximo no comprimento de onda λ_i .

A rotação ótica tem sido usada nos últimos anos no estudo das conformações de numerosas macromoléculas de interesse biológico (114). Uma vez que as estruturas helicoidais são dissimétricas e contribuem para a rotação ótica da macromolécula (115), elas podem ser caracterizadas por esse método. Por exemplo, a estabilidade termodinâmica e a proporção de hélice presente em algumas proteínas (116) têm sido estimada. Também a ativação (117) e denaturação (118) de enzimas tem sido estudadas por esse método.

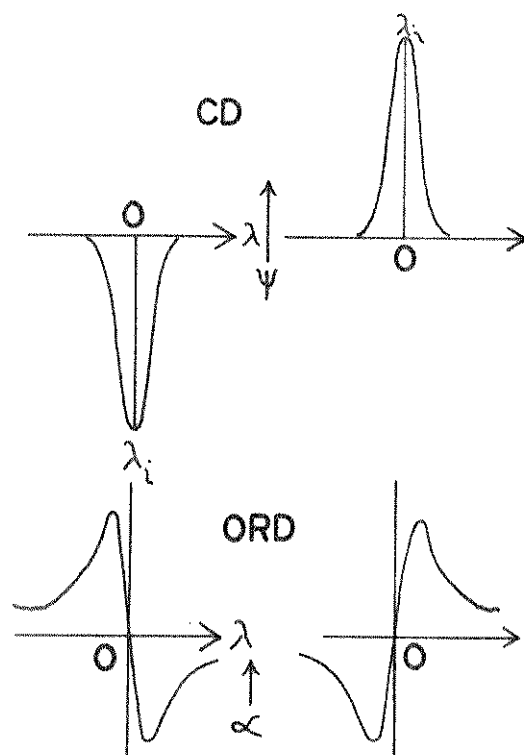


FIGURA 20. Efeitos Cotton de uma banda de absorção opticamente ativa com o máximo em λ_i .

Tem-se demonstrado (119-124), que a formação de dímeros de pirimidina em DNA, em reações fotoquímicas fotossensibilizadas com acetofenona, leva a mudanças conformacionais no DNA, podendo então ser estudadas por medidas de dicroísmo circular ou dispersão ótica rotatória.

Bastante útil foi a observação por Stryer e Blout (125) de efeitos Cotton na região visível da banda de absorção de acridina laranja (492 nm) quando esta encontrava-se ligada a um polipeptídeo helicoidal. Efeitos Cotton similares foram observados para AL ligada ao DNA (126), para proflavina ligada ao DNA (127-129), ao RNA (129) ou a polinucleotídeos (129) e para muitas outras aminoacridinas ligadas ao DNA (130).

O espectro CD de complexos DNA/AL na região visível, foram medidos para razões de concentração de DNA por concentração de corante (D/C) de 1 a 550 (131). Para razões D/C de 1 a 40, o espectro CD consiste de quatro componentes, isto é, duas bandas positivas a 510 e 480 nm e duas negativas a 497 e 468 nm, sendo que as bandas a 510 e 468 nm são máximas para D/C igual a 4 (131) (Figura 21). Para D/C maior que 40, não há alteração com a variação da razão D/C (Figura 22).

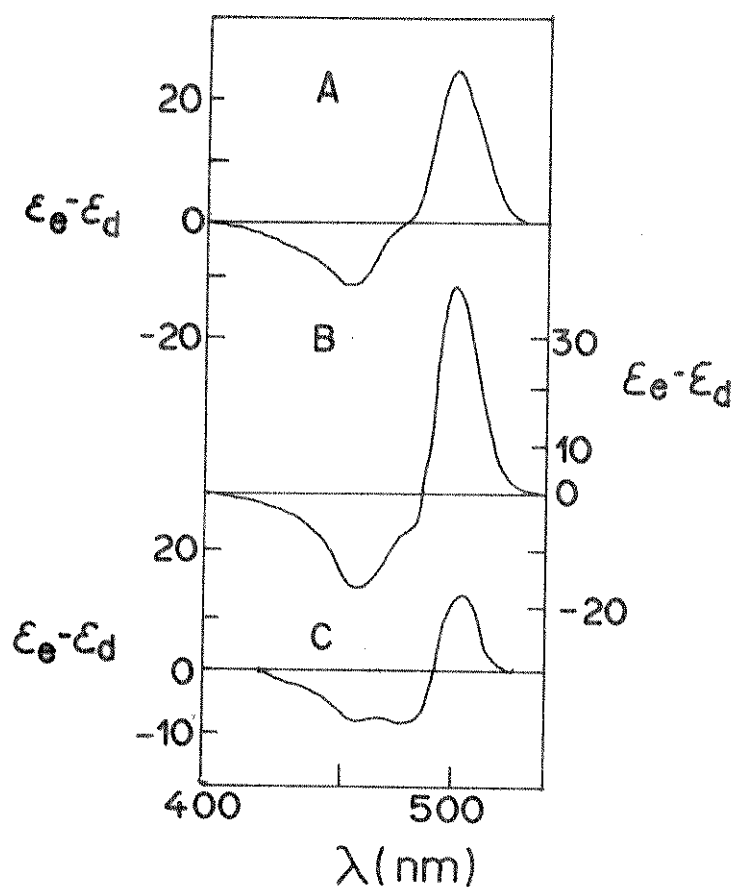


FIGURA 21. Curvas CD de complexos DNA/AL:
(A) D/C = 2; (B) 4,0; (C) D/C = 10

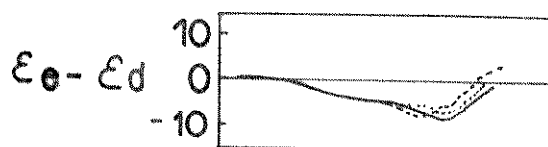
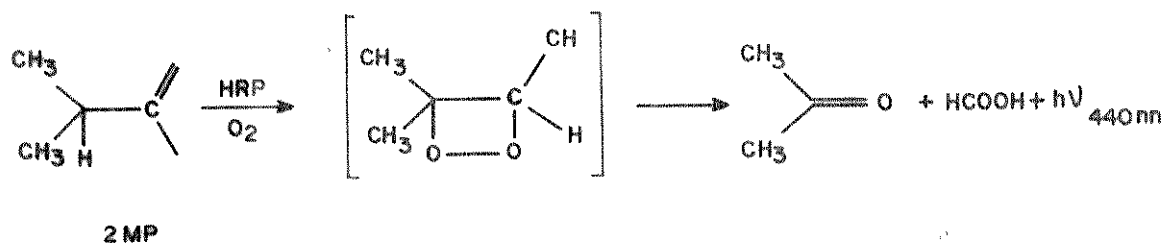


FIGURA 22. Curvas CD de complexos DNA/AL para: (---) D/C = 5,0; (...) D/C = 120; (—) D/C = 550.

VI. OBJETIVO DA TESE

A formação de espécies eletronicamente excitadas (via dioxetanos) em reações de oxidação catalisadas por peroxidase têm sido extensivamente estudadas por Cilento e col. (70, 132-134). As peroxidases funcionariam como uma oxidase. O isolamento de um intermediário dioxetânico em uma reação catalisada por peroxidase é um resultado muito importante neste aspecto (135).

Como nossa intenção era a de detectar modificações no DNA causadas por espécies excitadas geradas enzimaticamente, escolhemos o sistema com o substrato 2-metilpropanal (2-MP) e a enzima peroxidase de rabanete (HRP). Este sistema é bem conhecido tanto no aspecto enzimático como no fotoquímico (136-139), sendo capaz de gerar acetona excitada com rendimento quântico entre 10^{-1} a 10^{-2} (140) (Esquema 17).



ESQUEMA 17. Representação do sistema enzimático gerador de acetona triplete (2-MP/HRP/O₂).

Numa primeira etapa de nosso trabalho tentaremos determinar os parâmetros cinéticos, tais como a constante de Michaelis, velocidade máxima e energia de ativação. Também se usará o substrato isobutiril-coenzima-A, ao invés de

2-metilpropanal, na tentativa de aproximarmos nosso sistema modelo a um sistema biológico.

Estudos anteriores (141) haviam sugerido a possibilidade de transferência de energia de acetona triplete gerada enzimaticamente ao DNA. Dessa maneira, numa segunda etapa, pensamos em detectar as prováveis alterações em DNA, fazendo o uso de substâncias cujas propriedades emissivas e óticas variam de acordo com as mudanças estruturais do DNA.

Se forem confirmadas as alterações no DNA causadas por acetona triplete enzimaticamente gerada in vitro, podemos visualizar uma série de implicações biológicas onde estados excitados seriam responsáveis pela evolução dos muitos processos carcinogênicos até hoje conhecidos.

PARTE EXPERIMENTAL

I. DROGAS

Nome comum	Procedência
Ácido clorídrico	Carlos Erba
Acridina laranja hidrocloreto	Sigma Chem. Co.
Álcool isoamílico	Reagen
Arseniato bibásico de sódio	Carlo Erba
Azida sódica	Carlo Erba
Cacodilato de sódio	Fisher Scientific Co.
Cianeto de potássio	Carlo Erba
Cloreto de sódio	Carlo Erba
Cloreto de térbio hexa-hidratado	Alfa Products
Clorofórmio	Carlo Erba
Etanol	Carlo Erba
Extrato de levedura	Difco Laboratories
Fenol	Carlo Erba
Fosfato dibásico de potássio	Carlo Erba
Fosfato monobásico de potássio	Carlo Erba
Isobutiril-Coenzima-A	Sigma Chem. Co.
2-Metil-propanal	Carlo Erba
Nitrato de prata	Carlo Erba
Peroxidase de rabanete Tipo VI	Sigma Chem. Co.
Peróxido de hidrogênio	Carlo Erba
Pirofosfato de potássio	Carlo Erba
Proflavina hemi-sulfato	Sigma Chem. Co.

II. EQUIPAMENTOS

Para:

Consumo de oxigênio:

Monitor de oxigênio da Yellow Springs Instruments, modelo 53, com termostatização.

Espectros visível e U.V.:

Espectrofotômetro ZEISS, tipo DMR-21.

Espectros de dicroísmo circular:

Espectropolarímetro Cary-60, modelo 6002 equipado com acessório de dicroísmo circular.

Espectros de fluorescência:

Espectrofluorímetro Perkin-Elmer MPF-44B.

Contagens de fótons:

1. Contador de cintilação líquida Beckman LS-100;
2. Fotômetro tipo Mitchell-Hastings equipado com uma fotomultiplicadora IP28.

Leitura do pH das soluções-tampão:

Potenciômetro Metrhom Herisan modelo E512

Centrifugação do DNA:

Centrífuga refrigerada Sorvall, modelo RC-2B equipada com rotor SS-34.

III. MÉTODOS

III.1 Preparação de soluçõesTampão:

Na preparação de soluções-tampão foram utilizadas as tabelas de Gomori (142).

Peroxidase:

(PM = 40000) Dissolução de massa apropriada em água. Sua concentração foi determinada espectrofotometricamente usando-se $\epsilon = 1,02 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 403 nm (143). A concentração estoque foi $2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$.

2-Metilpropanal:

(PM = 72) Dissolução em etanol (1:4; V/V), imediatamente antes de seu uso. A concentração estoque foi de 2,2M.

Acridina laranja:

Este composto foi purificado através do procedimento modificado de Ichimira e col. (144), para remoção de zinco e outros íons de metais divalentes. O procedimento foi o seguinte: adicionou-se vagarosamente 50 ml de NaOH 0,2 M a aproximadamente 2 g de acridina laranja comercial sob agitação magnética. Deixou-se por mais trinta minutos sob agitação. A seguir, a suspensão foi filtrada e lavada com 50 ml de EDTA 0,3mM e 10 ml de NaOH 0,4M. O resíduo filtrado foi então resuspenso em 10 ml de água e neutralizado com HCl e o sólido precipitado pela adição gôta a gôta de uma solução etanólica 10% fria em

10 volumes de éter etílico. Finalmente, o precipitado foi evaporado a vácuo para secar. O peso molecular do sólido assim purificado é de 301,5 (145).

Uma vez purificado preparou-se uma solução-estoque (100 μM) por dissolução de massa adequada em tampão cacodilato 0,01M, pH 7,0. A concentração de acridina laranja na preparação de complexos com o DNA, foi calculada espectrofotometricamente usando-se $\epsilon = 54000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 492 nm (146).

Proflavina:

(PM = 258,3) Usou-se este composto comercial sem posterior purificação. A solução-estoque foi preparada por dissolução em tampão cacodilato 0,01M, pH 7,0 (μM) e sua concentração na preparação de complexos com DNA, foi calculada espectrofotometricamente usando-se $\epsilon = 41000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 444 nm (145).

Cloreto de tório hexahidratado

(PM = 453) A solução-estoque foi de 100 mM, sendo preparada pela dissolução de massa adequada em tampão cacodilato 20 mM (pH 6,0) e 10 mM de KCl, segundo Prados e col. (146) para prevenir a precipitação de hidróxidos.

Ácido desoxirribonucleico:

A solução-estoque de DNA de E. coli (580 $\mu\text{g}/\text{ml}$) foi preparada em tampão fosfato (2,5 mM Na_2HPO_4 e 5,0 mM NaH_2PO_4), pH 6,8 segundo Prusik e col. (147). Sua concentração foi calculada espectrofotometricamente usando-se $\epsilon = 6700 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 260nm (148). Não se deve dissolver tal composto com agitação violenta. O ideal é deixar em repouso até a dissolução completa do DNA.

III.2 Preparação de complexos com o DNA

Os complexos de DNA com AL, PF e Tb³⁺ eram preparados após a extração do DNA do sistema enzimático ou do sistema controle. A extração consistia de: adição de aproximadamente 5 gotas de uma mistura de fenol-clorofórmio (1:1; V/V) seguido de agitação em centrífuga Sorvall a 2000r.p.m. por três minutos. Retirava-se então, o sobrenadante adicionando-se a este, dois a três volumes de etanol absoluto frio, para precipitação de DNA e deixando-se por 24 horas no freezer. Seguia-se uma centrifugação por 10 minutos, a 4 °C e 10.000 rev./min em centrífuga Sorvall, rotor SS-34, para a deposição do DNA. O sobrenadante era jogado fora, resuspendendo-se o DNA em 3 ml de tampão cacodilato 0,01M, pH 7,0.

O sistema enzimático consistia de 95 mM de 2-metilpropanal, 2,2 µM de HRP, 0,59 ml de tampão fosfato 1M e 0,33 ml de tampão pirofosfato 0,1M (pH 7,4). O DNA (100 µg/ml) era incubado nesse sistema por três minutos a 37°C. A reação era iniciada pela adição de 2-metilpropanal.

No sistema controle tínhamos igualmente 100 µg/ml de DNA e 0,62 ml de tampão fosfato 1,0 M e 0,35 ml de tampão pirofosfato 0,1M (pH 7,4), também incubado por três minutos a 37°C.

Essas condições do sistema enzimático e do controle foram usadas em todos os experimentos realizados.

Após a incubação, procedia-se à extração, de acordo com o procedimento acima descrito.

III.2.1 Complexos de acridina laranja e proflavina com DNA

Os complexos de AL e PF eram preparados segundo o procedimento de Armstrong e col. (145), da seguinte maneira: adicionava-se a uma alíquota de 1 ml de DNA já resuspenso em tampão cacodilato 0,01M (pH 7,0), 1 ml de AL ou PF gota a gota, sob agitação magnética. A concentração final de DNA nos complexos foi da ordem de $1,0 \times 10^{-4}$ M, enquanto que a de AL e PF foi de $1,0 \times 10^{-6}$ M. Assim, a razão D/C (moles de DNA/moles de corante) foi cerca de 100, para cujo valor todo o corante está ligado ao DNA por intercalação (147). No estudo do efeito do íon prata sobre a luminescência de AL ou PF, adicionaram-se a esses complexos quantidades apropriadas de nitrato de prata, tal que $0 < r < 0,6$, onde $r = \text{moles de íon prata/moles de DNA}$.

Após a preparação de todos os complexos, estes eram deixados por 10 minutos à temperatura ambiente e logo em seguida eram feitas as medidas de fluorescência.

Para as medidas de dicroísmo circular, os complexos eram preparados de maneira análoga ao descrito acima, sendo que a concentração final de AL no complexo era $2,5 \times 10^{-5}$ M e de DNA era 1×10^{-4} M, para que a razão D/C fosse 4, para cujo valor se obtinham bandas máximas de CD (131).

III.2.2 Complexos de Tb^{3+} e DNA

A fim de reduzir a possibilidade de erros resultantes dos diferentes cátions existentes nas amostras de DNA que podem competir com Tb^{3+} pela ligação ao DNA, após a extração do DNA do sistema enzimático e do sistema controle e

resuspensão em tampão cacodilato, as amostras foram dialisadas contra um tampão cacodilato 20 mM (pH 6,0) e 10 mM KCl (1:200) por 20 horas, segundo o procedimento de Ringer e col. (85).

Os complexos de Tb^{3+} e DNA eram então, preparados segundo Ringer e col. (90), da seguinte maneira: adicionava-se a uma alíquota de 1 ml de DNA previamente dialisado, 1 ml de solução de cloreto de térbio, tal que a razão da concentração molar de DNA por concentração de Tb^{3+} fosse aproximadamente 6, condição necessária segundo Ringer e col. (90), para se obter uma maior intensidade de fluorescência.

Uma vez que as cadeias polinucleotídicas se rompem em presença de íons lantanídeos (149), foi necessário preparar tais complexos a $4^{\circ}C$, sendo que antes das medidas de fluorescência, deixava-se por 10 minutos à temperatura ambiente.

III.3 Extração do DNA de *E. coli*

Partindo-se de células de *E. coli* incubadas em meio de cultura L.B. (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl, completando-se o volume para 200 ml), procedia-se à extração segundo Marmur e col. (161) que consistia corriqueiramente de:

- a) rompimento das células com lisozima (1 mg/ml), incubando-se a $37^{\circ}C$ por 30 min.;
- b) rompimento dos núcleos com dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% a $37^{\circ}C$ por 10 min;
- c) extração com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1; V/V);
- d) tratamento com ribonuclease ($37^{\circ}C$ por 60 min);

e) precipitação com etanol 99% a 4°C.

A seguir era estocado em bastões de vidro em etanol 70% no freezer.

A pureza do DNA assim extraído era testada através de medidas de absorbância (A) a 260 nm, 280 e 232 nm, sendo que se $A_{260}/A_{280} > 1,7$ ou $A_{260}/A_{232} > 2,3$, o DNA está praticamente puro, isento de proteínas.

III.4 Identificação de acetona no sistema isobutiril-CoA

Quando a reação isobutiril-CoA/proxidase/O₂ tinha fim (após 10 segundos), adicionava-se 2,4-dinitrofenilhidrazina e a identificação era feita em cromatografia de camada delgada em sílica gel (eluente de benzeno-hexano, 1:1), comparando-se com o Rf do controle com acetona pura.

III.5 Cálculo da elipticidade específica

Os dados de CD do complexo de DNA e acridina laranja, foram expressos em elipticidade específica ($|\psi|_{\lambda}$), calculada através da seguinte fórmula:

$$|\psi|_{\lambda} = \frac{\theta \times 10}{l \times c'} \text{ (grau} \times \text{cm}^2 \times \text{decagrama}^{-1}\text{)}$$

onde:

θ é a elipticidade observada em graus.

l é o caminho ótico em cm.

c' é a concentração em grama/cm³ de acridina laranja no complexo.

III.6 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os valores da velocidade máxima (V_{\max}) e constante de Michaelis (K_m), foram obtidos diretamente do gráfico duplo-recíproco, originado da equação de Lineweaver-Burk (ver Apêndice III).

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{|S|} + \frac{1}{V_{\max}}$$

onde:

v_o é a velocidade inicial do consumo de oxigênio.

K_m é a constante de Michaelis-Menten.

V_{\max} é a velocidade máxima de consumo de oxigênio.

$|S|$ é a concentração do substrato, no nosso caso, 2-metilpropanal.

A energia de ativação (E_a) foi calculada diretamente do gráfico $\log V_{\max}$ versus $1/T$ originado da forma logarítmica da equação de Arrhenius (ver Apêndice III).

$$\log k = \log V_{\max} = \frac{E_a}{2,3 RT} \times \frac{1}{T} + \log A$$

onde:

T é a temperatura em $^{\circ}K$,

R é a constante dos gases

A é uma constante.

IV. RESULTADOS

IV.1 CINÉTICA ENZIMÁTICA

IV.1.1 Escolha das melhores condições para o sistema 2-metilpropanal (2-MP)/HRP/O₂

Resultados anteriores (138) demonstraram que para se obter um rápido consumo de oxigênio e intensa emissão de luz, as concentrações finais de 2-MP, HRP, fosfato (Pi) e pirofosfato (PPi) poderiam ser 95 mM, 2,2 μ M, 0,6M e 0,3M, respectivamente em pH 7,4. Estas foram, portanto, as concentrações utilizadas nos estudos com o DNA.

Nos estudos sobre o comportamento cinético da enzima, as concentrações de HRP e 2-MP eram mantidas constantes nos valores acima citados quando variamos 2-MP e HRP, respectivamente. Também utilizamos as concentrações dos tampões acima citadas.

IV.1.2 Variação da concentração de 2-metilpropanal (2-MP)

A variação da concentração de 2-MP sobre a velocidade de consumo de oxigênio, mostrou que a enzima segue a cinética de Michaelis-Menten (ver Apêndice II) (Figura 23).

O estudo sobre a velocidade de emissão de luz revelou uma dependência de primeira ordem em relação à concentração de 2-MP (Figura 24).

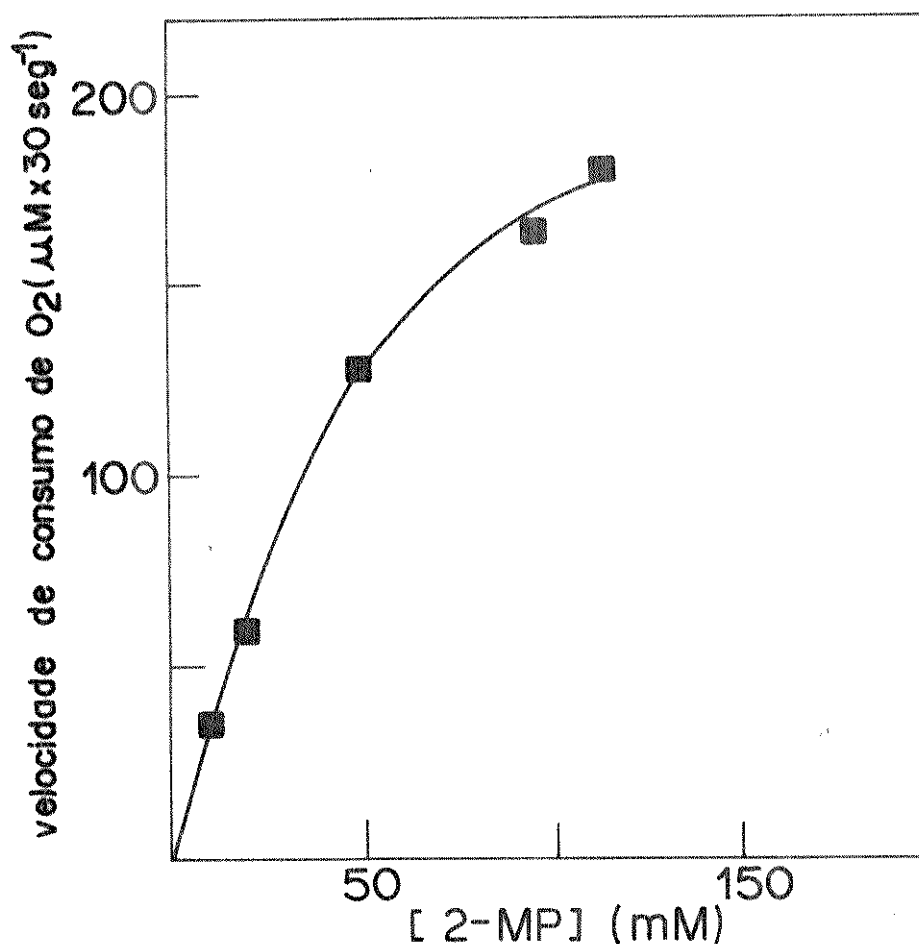


FIGURA 23. Efeito da concentração de 2-MP sobre a velocidade de consumo de O₂ pelo sistema 2-MP/HRP (2,2 μM)/O₂ em tampão Pi 0,6M, Ppi 0,3M, pH7,4 a 35°C.

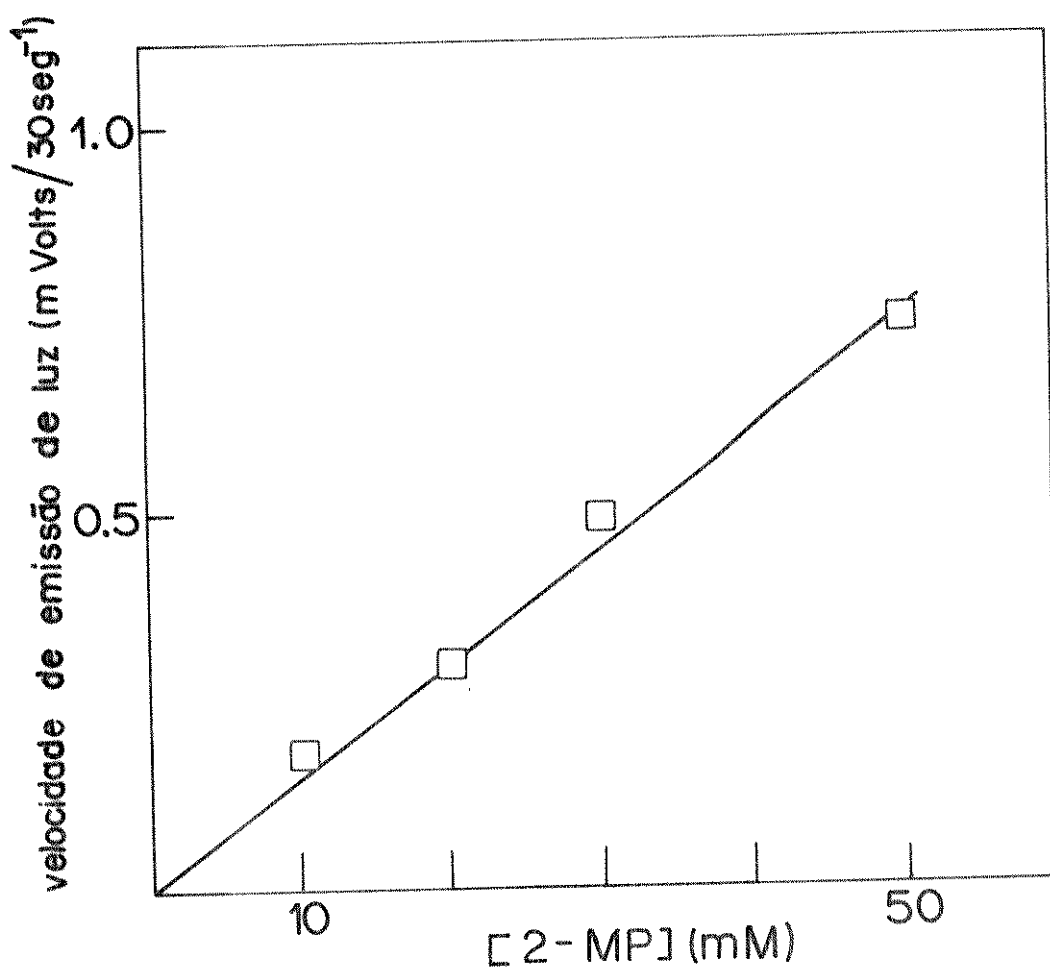


FIGURA 24. Efeito da concentração de 2-MP sobre a velocidade de emissão de luz pelo sistema 2-MP/HRP (2,2 μ M)/O₂ em tampão Pi 0,6M, PPi 0,3M, pH 7,4 a 35°C.

IV.1.3 Variação da concentração de HRP

Uma vez que a velocidade inicial é sempre proporcional à concentração total da enzima ($|e_0|$, ver Apêndice II), podemos observar o efeito da variação da concentração de HRP sobre a velocidade inicial de consumo de O_2 (Figura 25) e sobre a velocidade inicial de emissão de luz (Figura 26).

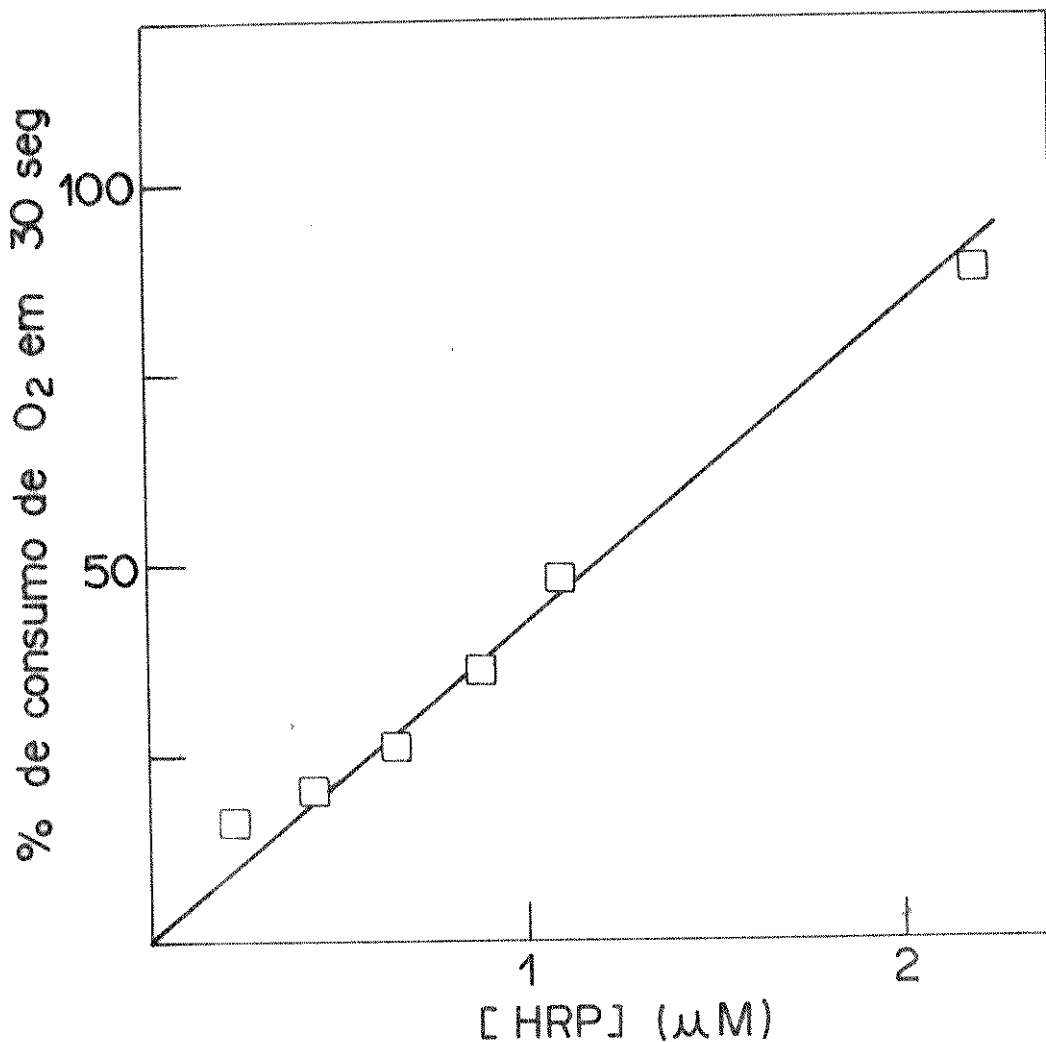


FIGURA 25. Efeito da concentração de HRP sobre a velocidade de consumo de O_2 pelo sistema 2-MP (95 mM)/HRP/ O_2 , em tampão Pi 0,6M, Ppi 0,3M, pH 7,4 a 37°C.

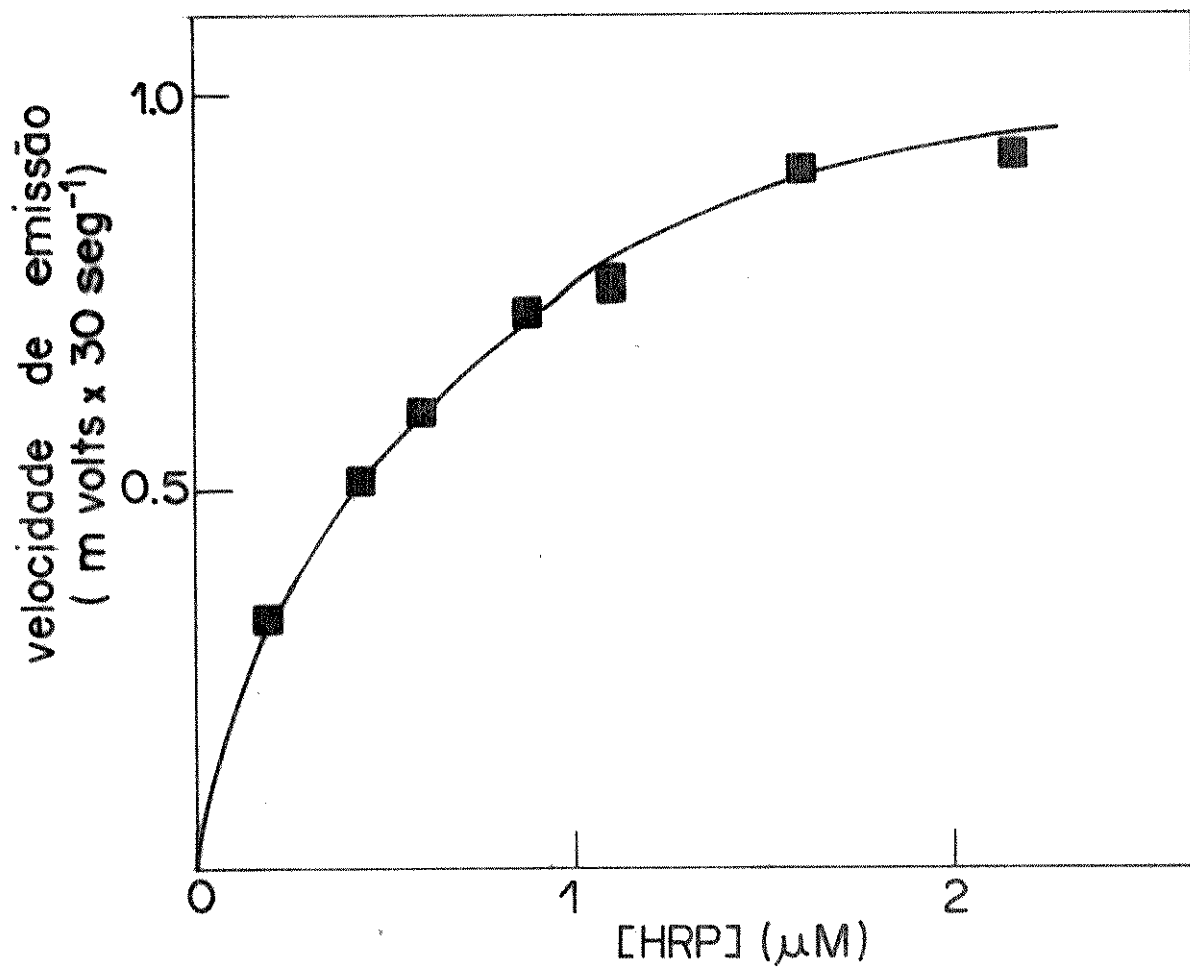


FIGURA 26. Efeito da concentração de HRP sobre a velocidade de emissão de luz pelo sistema 2-MP (95 mM/HRP/O₂), em tampão Pi 0,6M, PPi 0,3M, pH 7,4 a 37°C.

IV.1.4 Influência da temperatura sobre a velocidade de consumo de O_2

A reação mostrou ser dependente da temperatura, como toda reação enzimática. Houve um aumento acentuado no consumo de O_2 de $25^\circ C$ a $37^\circ C$, observando-se um decrescimo a $40^\circ C$. (Figura 27).

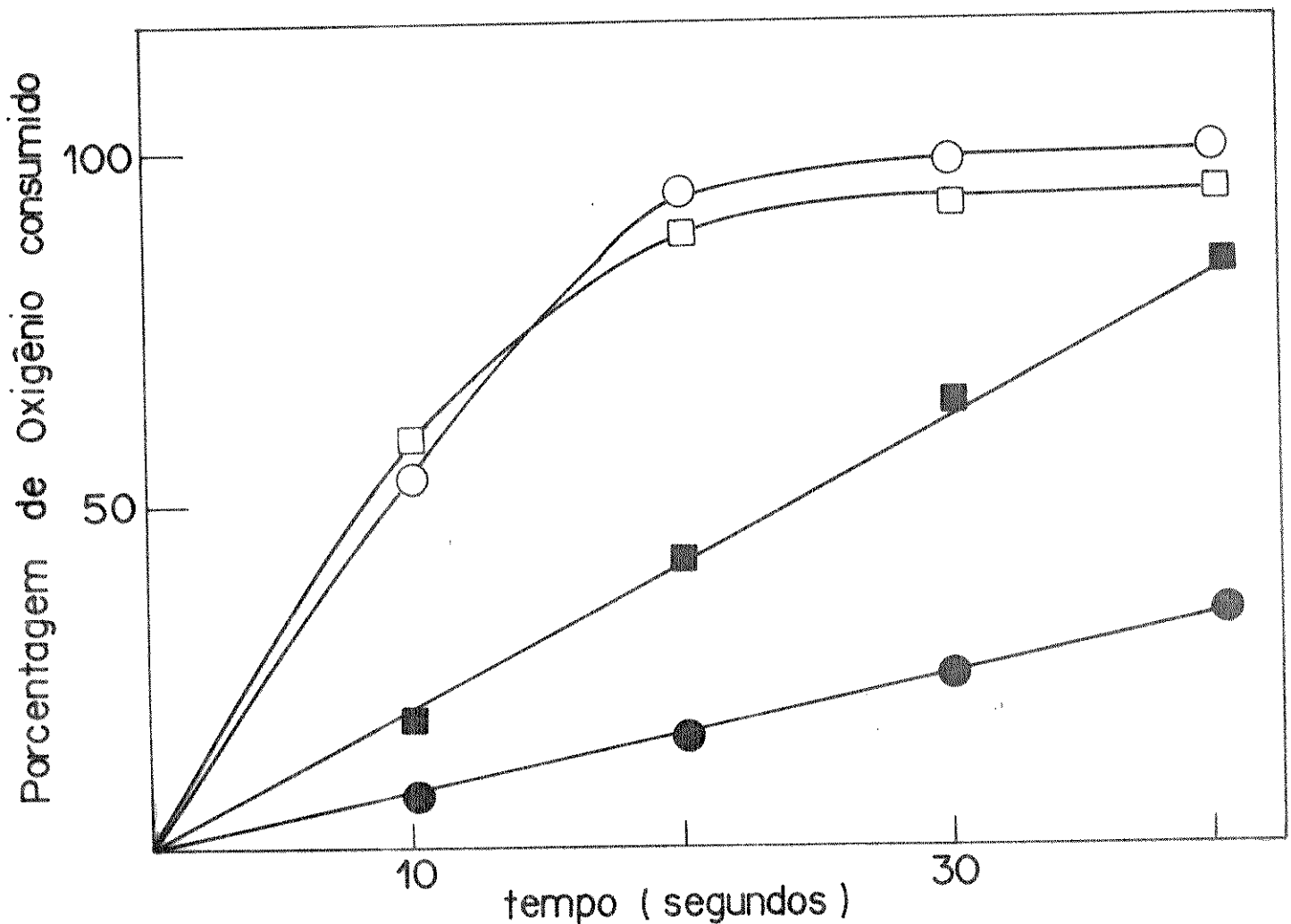


FIGURA 27. Oxigênio consumido pelo sistema 2-MP (95 mM), HRP (2,2 μM)/ O_2 em tampão Pi 0,6M, PPI 0,3M, pH 7,4 a diferentes temperaturas.
 (●) $25^\circ C$; (■) $30^\circ C$; (○) $37^\circ C$; (□) $40^\circ C$.

IV.1.5 Determinação de V_{\max} e K_m

Devido à dificuldade em se determinar a V_{\max} e K_m diretamente do gráfico velocidade versus $[2\text{-MP}]$ usou-se o gráfico duplo-recíproco (ver Apêndice II). O estudo foi realizado a várias temperaturas, para uso posterior na determinação de E_a . Os gráficos são mostrados nas Figuras 28 (25°C), 29 (30°C), 30 (37°C) e 31 (40°C).

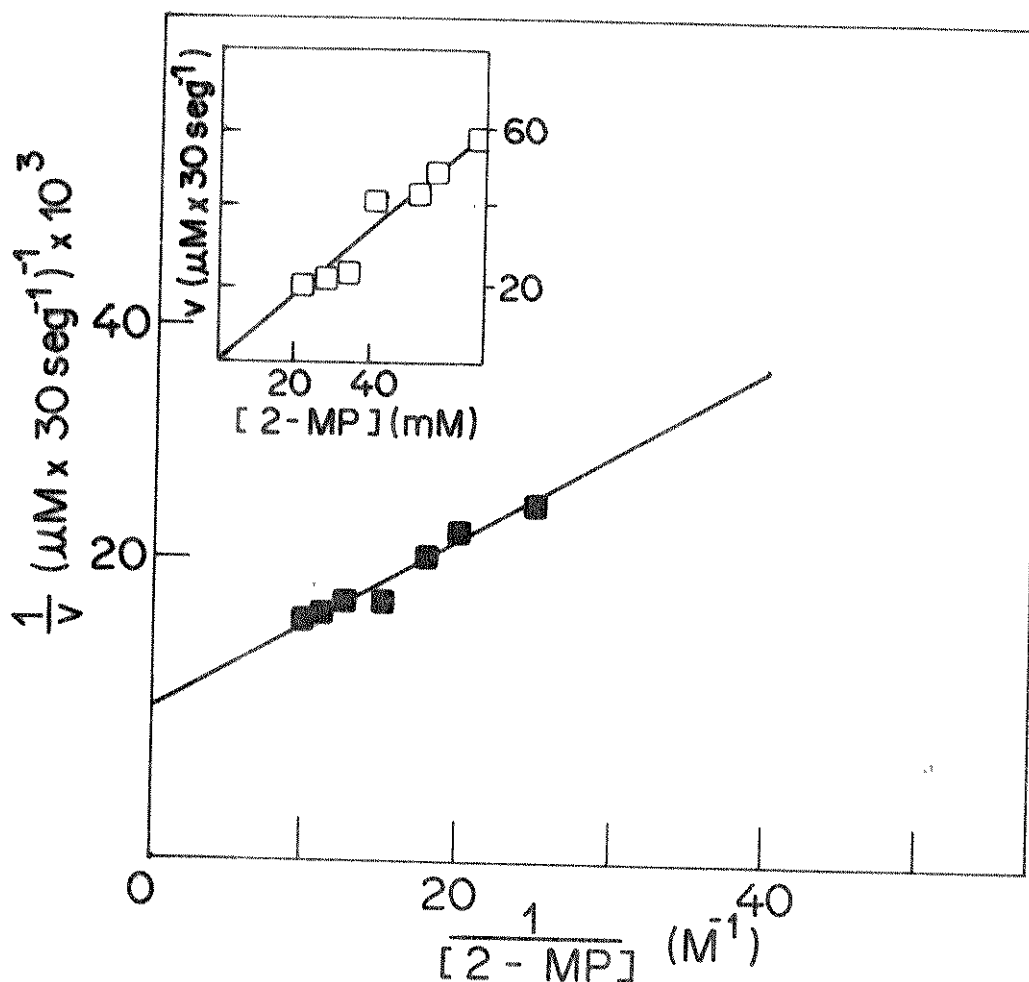


FIGURA 28. Gráfico duplo-recíproco da velocidade de consumo de O_2 (v) versus concentração de 2-MP do sistema 2-MP/HRP ($2,2 \mu\text{M}$)/ O_2 (Inserido) a 25°C .

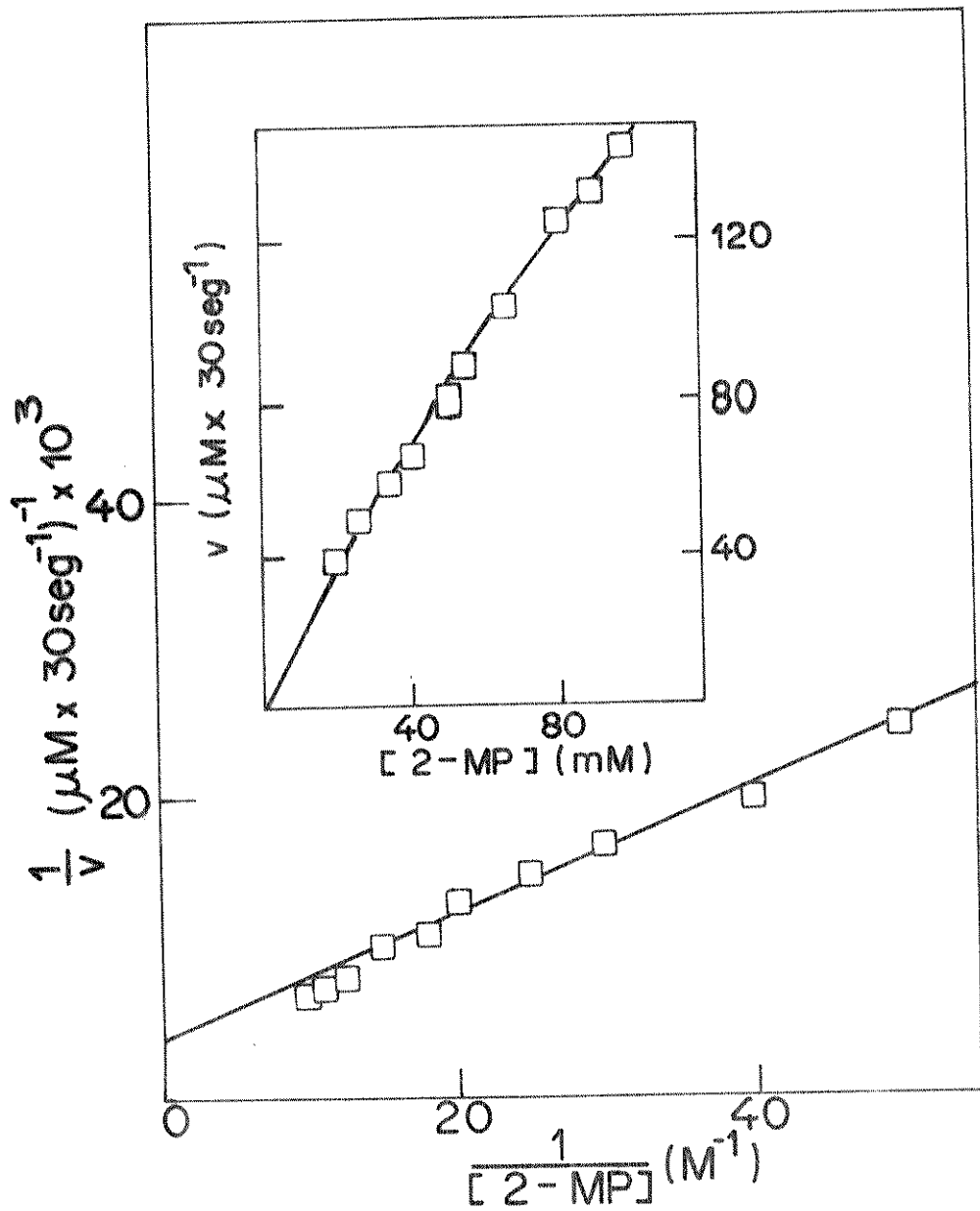


FIGURA 29. Gráfico duplo-recíproco da velocidade de consumo de O_2 (v) versus concentração de 2-MP do sistema 2-MP/HRP ($2,2 \mu\text{M}$)/ O_2 Pi 0,6M, PPI 0,3M, pH 7,4 (Inserido), a 30°C.

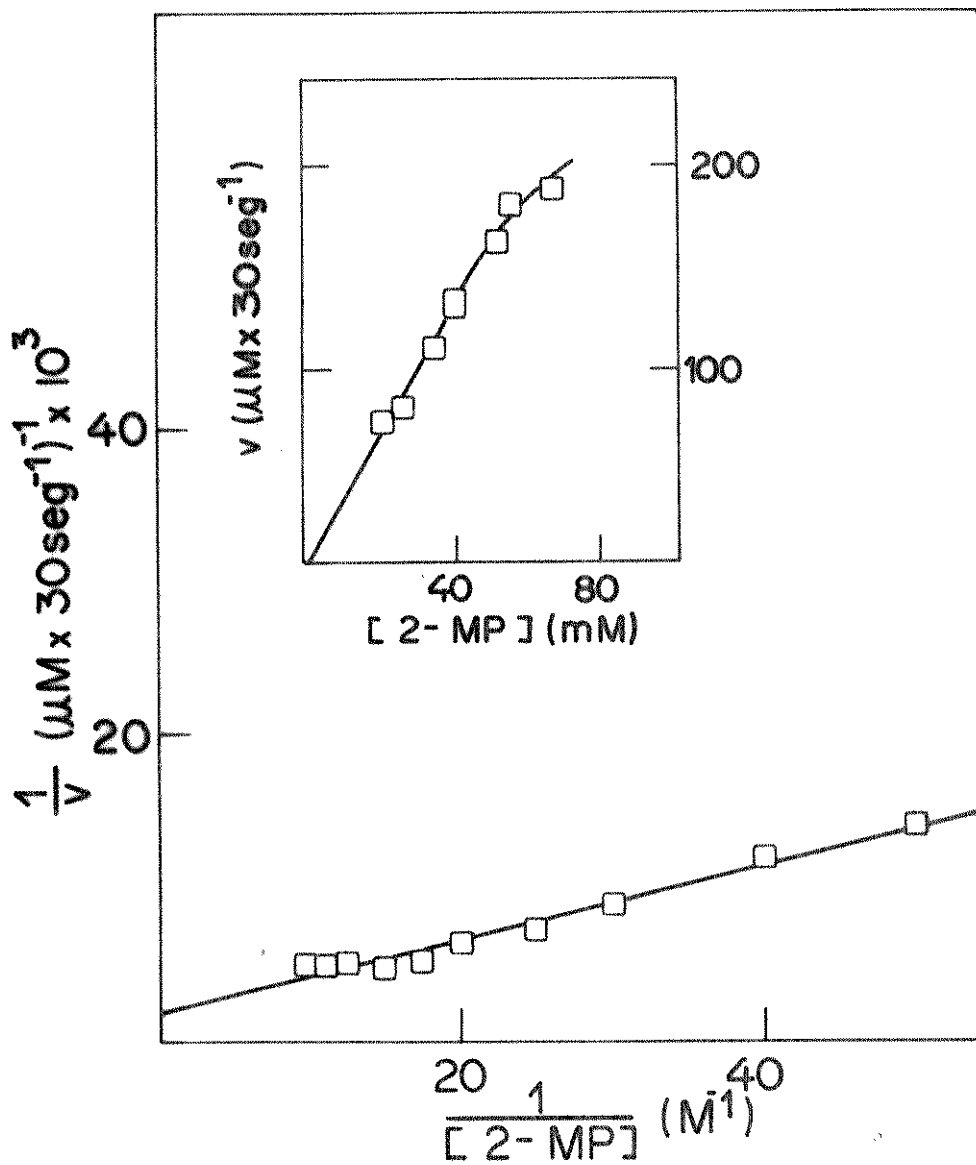


FIGURA 30. Gráfico duplo-recíproco da velocidade de consumo de O_2 (v) versus concentração de 2-MP do sistema 2-MP/HRP ($2,2 \mu\text{M}$)/ O_2 , Pi 0,6M, PPi 0,3M, pH 7,4 (Inserido) a 37°C .

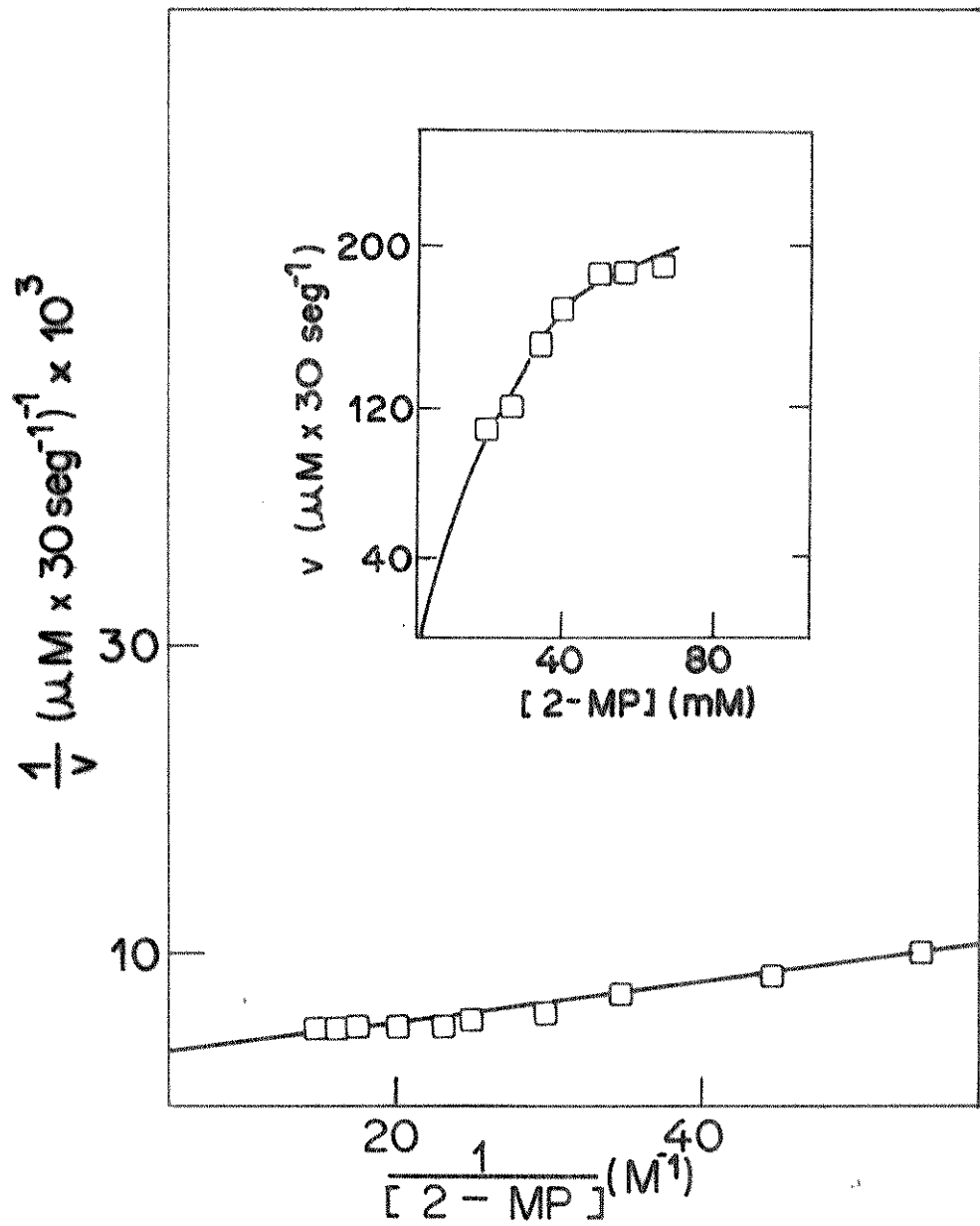


FIGURA 31. Gráfico duplo-recíproco da velocidade de consumo de O_2 (v) versus concentração de 2-MP do sistema 2-MP/HRP ($2,2 \mu\text{M}$)/ O_2 Pi 0,6M, PPI 0,3M, pH 7,4 (Inserido) a 40°C .

IV.1.6 Determinação da Energia de Ativação

Os valores encontrados para V_{\max} e K_m nas diferentes temperaturas estudadas, encontram-se na Tabela I.

O gráfico de Arrhenius (Figura 32), não foi linear, sendo 37°C a temperatura ótima. O valor da energia de ativação obtida do gráfico foi de $25,1 \pm 4,4$ kcal/mol.

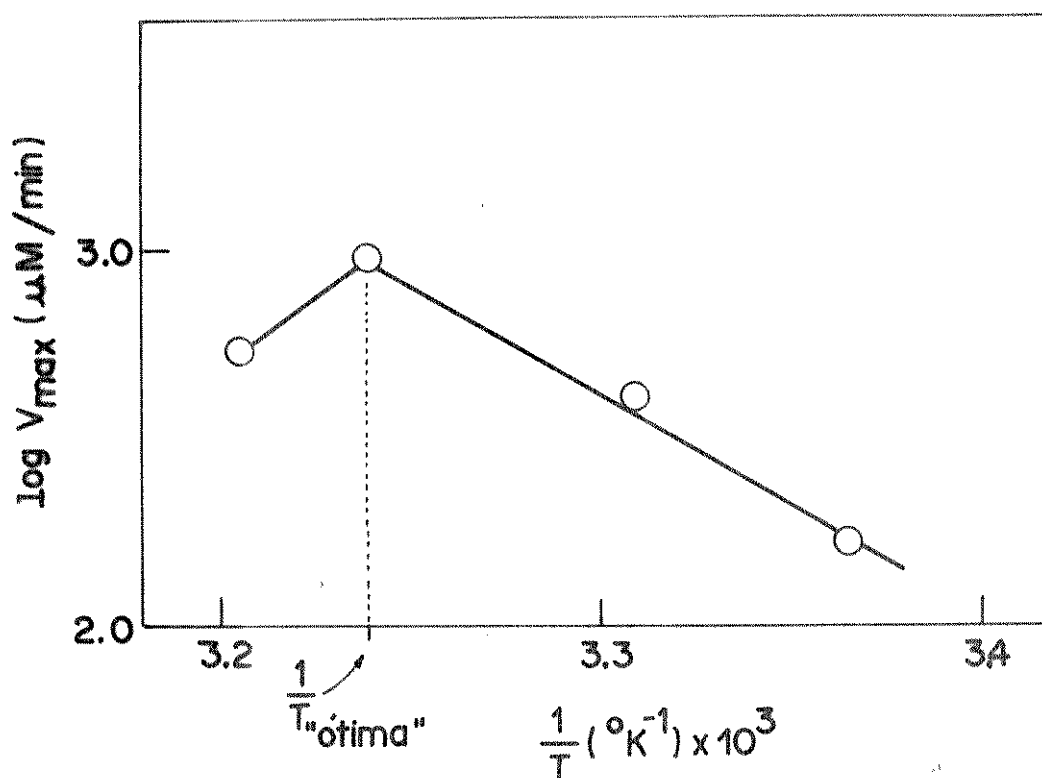


FIGURA 32. Gráfico de Arrhenius para a determinação da energia de ativação do sistema 2-MP/HRP/ O_2 .

$t (^{\circ}\text{C})$	$T (^{\circ}\text{K})$	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	$\log V_{\text{max}}$	$(1/T) \times 10^3$ ($^{\circ}\text{K}^{-1}$)	K_m (mM)
25	298	200	2,30	3,356	54
30	303	500	2,69	3,300	100
37	310	1000	3,00	3,226	130
40	313	588	2,77	3,195	30

TABELA I. Dados cinéticos obtidos dos gráficos "duplo-recíproco", segundo apêndice II, do sistema 2-MP/HRP (2,2 μM)/ O_2 .

IV.1.7 Efeito de Inibidores

Os conhecidos inibidores de peroxidase nativa, cianeto (CN^-) e azoteto (N_3^-), foram estudados em nossa reação enzimática, e os resultados podem ser vistos nas Figuras 33 e 34, respectivamente.

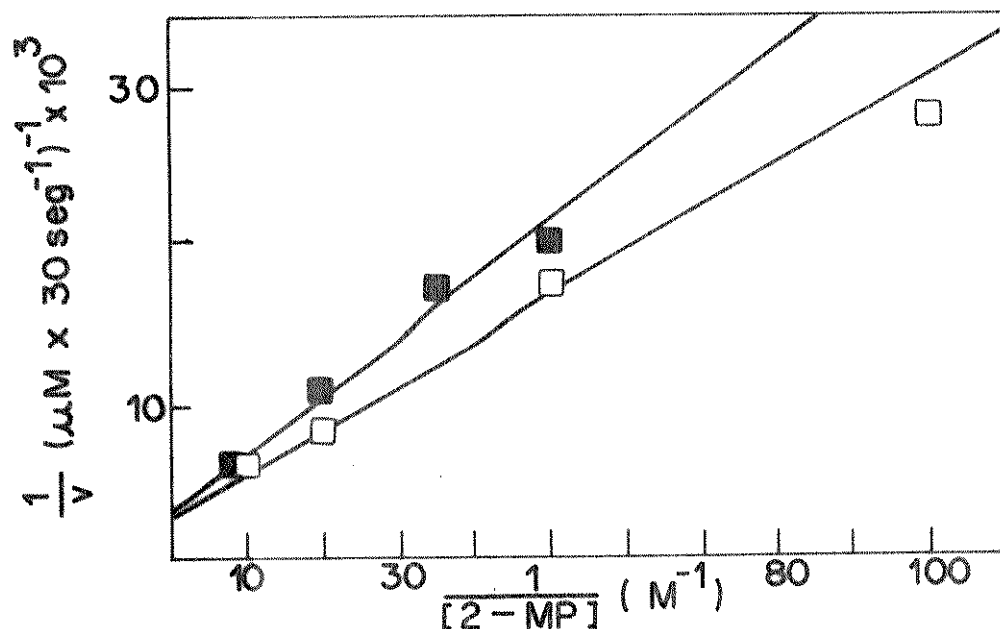


FIGURA 33. Gráfico duplo-recíproco do sistema 2-MP/HRP (2,2 μM)/ O_2 , Pi 0,6M, PPI 0,3M, pH 7,4 Sozinho (-□-) e com cianeto (10mM) (-■-).

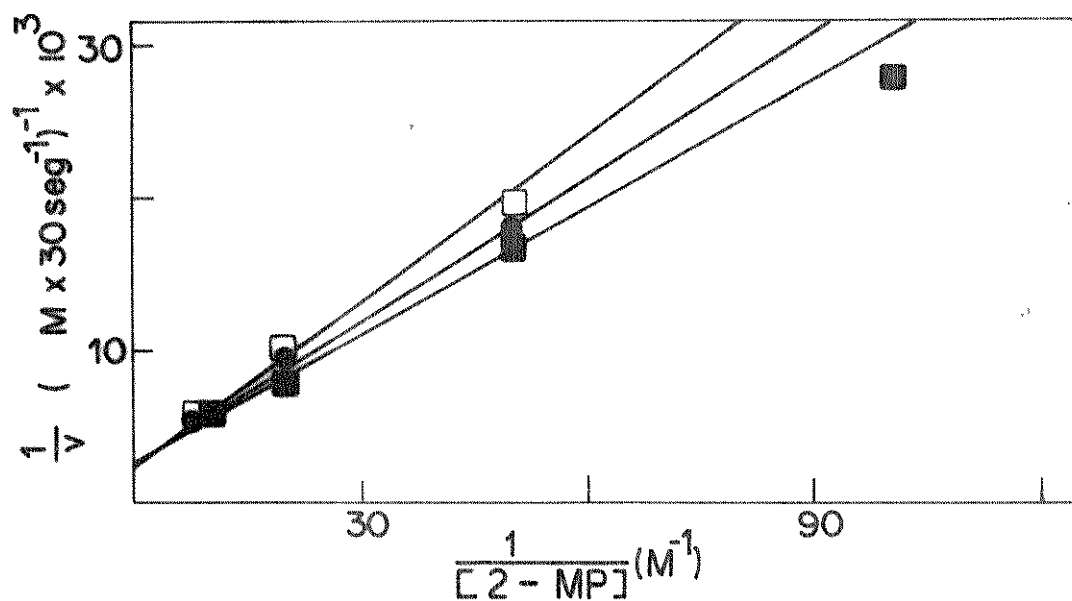


FIGURA 34. Gráfico duplo-recíproco do sistema 2-MP/HRP (2,2 μM)/ O_2 , Pi 0,6M, PPI 0,3M, pH 7,4 Sozinho (-■-); com 5mM (-●-) e 10 mM (-□-) de azoteto.

IV.1.8 Efeito do pH sobre a reação enzimática

A variação do pH afetou a velocidade de consumo de O_2 , como visto na Figura 35. O pH "ótimo" foi 7,0. A enzima foi mantida saturada com o substrato em todos os valores de pH testados.

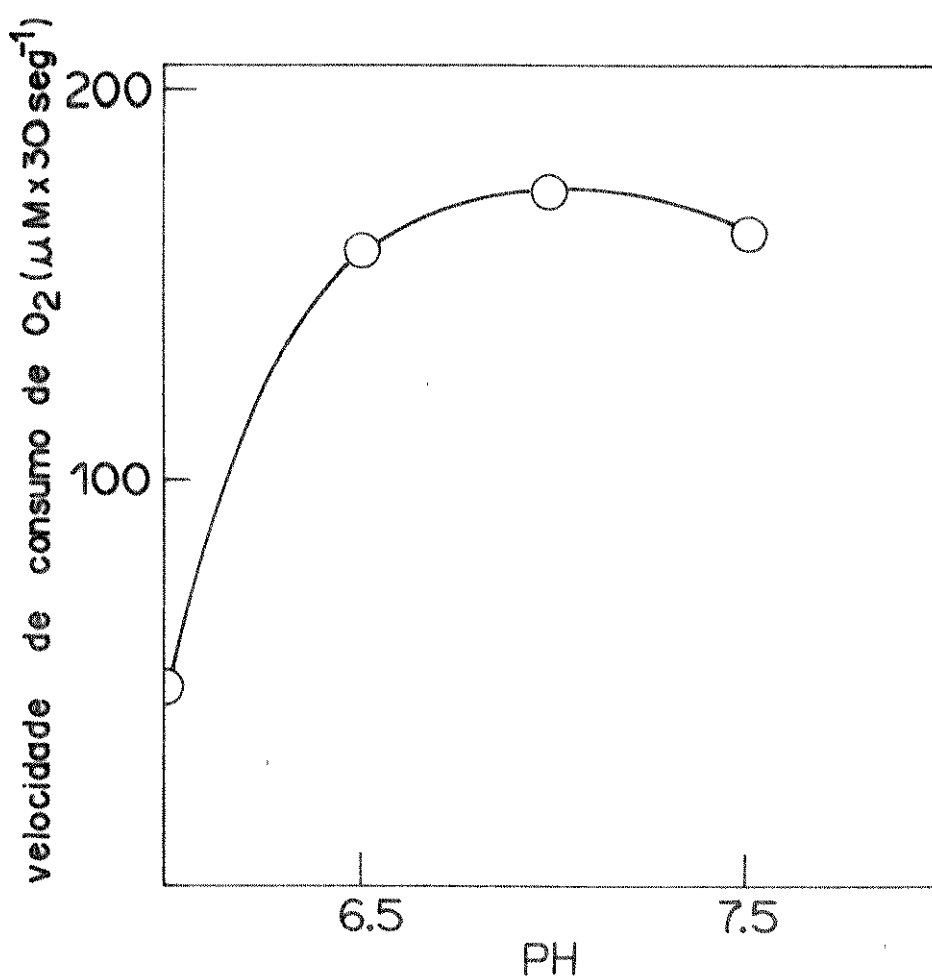


FIGURA 35. Efeito do pH sobre a velocidade de consumo de O_2 do sistema 2-MP (95 mM), HRP (2,2 μM)/ O_2 , Pi 0,6M, PPI 0,3M a 37°C.

IV.1.9 Efeito do tampão arseniato

Estudos anteriores (137), haviam demonstrado que a velocidade de emissão de luz na presença de tampão arseniato 1,0M era muito maior do que na presença do tampão fosfato 1,0M.

Nossos resultados demonstraram que a velocidade de consumo de O_2 na presença de arseniato é duas vezes maior do que na presença de tampão fosfato (Figura 36). O K_M permaneceu inalterado (Figura 37).

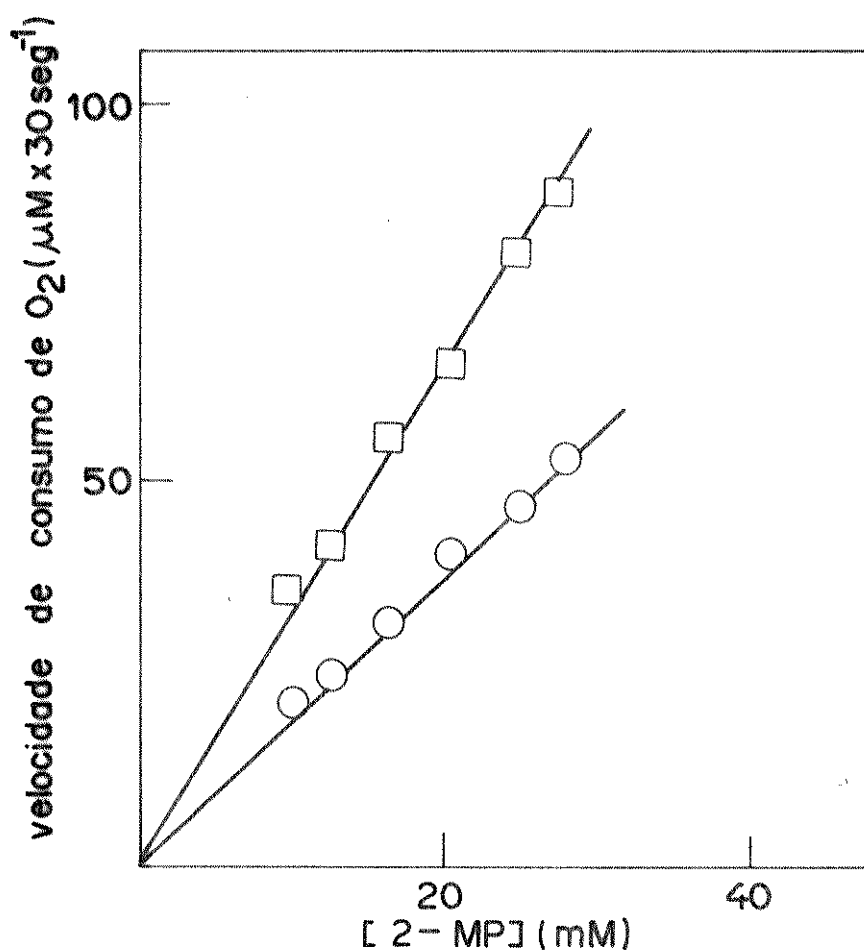


FIGURA 36. Efeito do tampão sobre a velocidade de consumo de O_2 pelo sistema 2-MP/HRP ($2,2\mu M$)/ O_2). Tampão fosfato (○) 0,6M, tampão arseniato (□) 0,6M, pH 7,4 a $30^\circ C$.

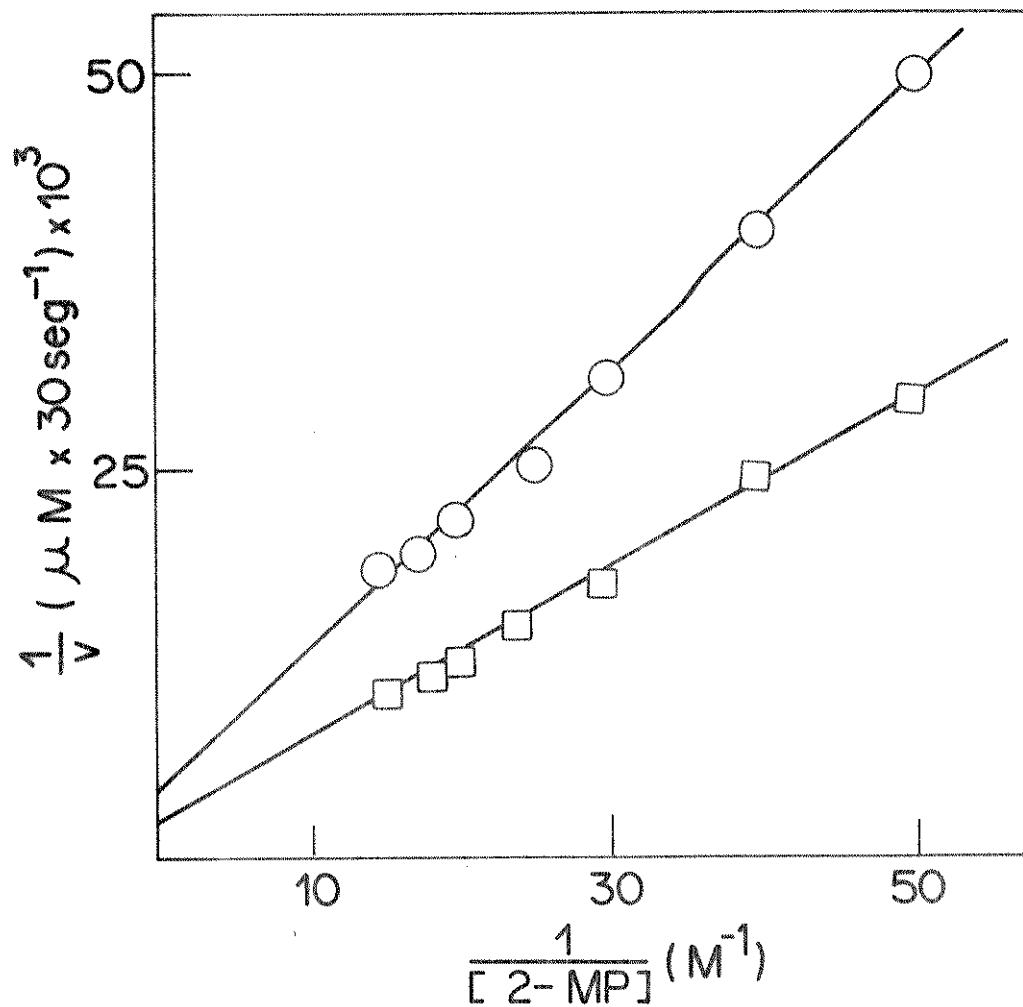


FIGURA 37. Gráfico duplo-recíproco do sistema 2-metilpropional HRP (2,2 μM)/O₂ em tampão fosfato (○) 0,6M e tampão arseniato (□) 0,6M, pH 7,4 a 30°C.

IV.1.10 Estudo com o substrato Isobutiril-Coenzima-A

O sistema Isobutiril-Coenzima-A/HRP/O₂ apresentou uma rápida emissão de luz (Figura 38). O uso de DBAS e DPAS incubados no sistema de reação ou adicionados após 30 segundos de reação não mostraram nenhum efeito sobre a intensidade de emissão. O consumo de oxigênio foi muito pequeno (Figura 39).

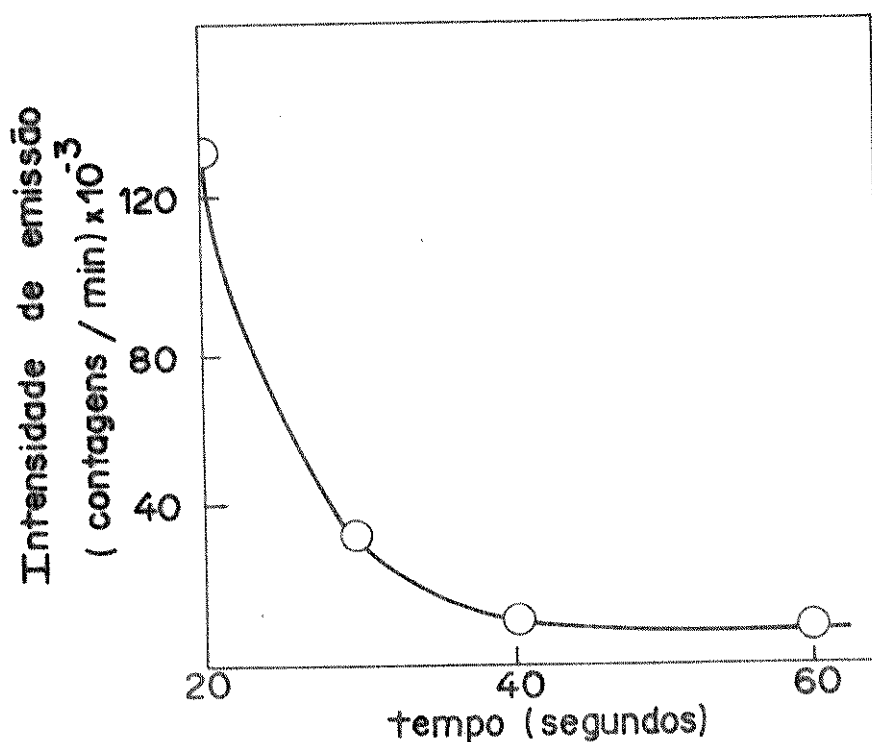


FIGURA 38. Velocidade de emissão de luz pelo sistema isobutiril-CoA (2,6 mM)/HRP (2,0 μ M)/O₂, tampão Pi 0,6 M, PPI 0,3M, pH 7,4 a 30°C. O mesmo gráfico foi obtido incubando-se DBAS ou DPAS (2,0 μ M), ou adicionando-se após 30 segundos de reação.

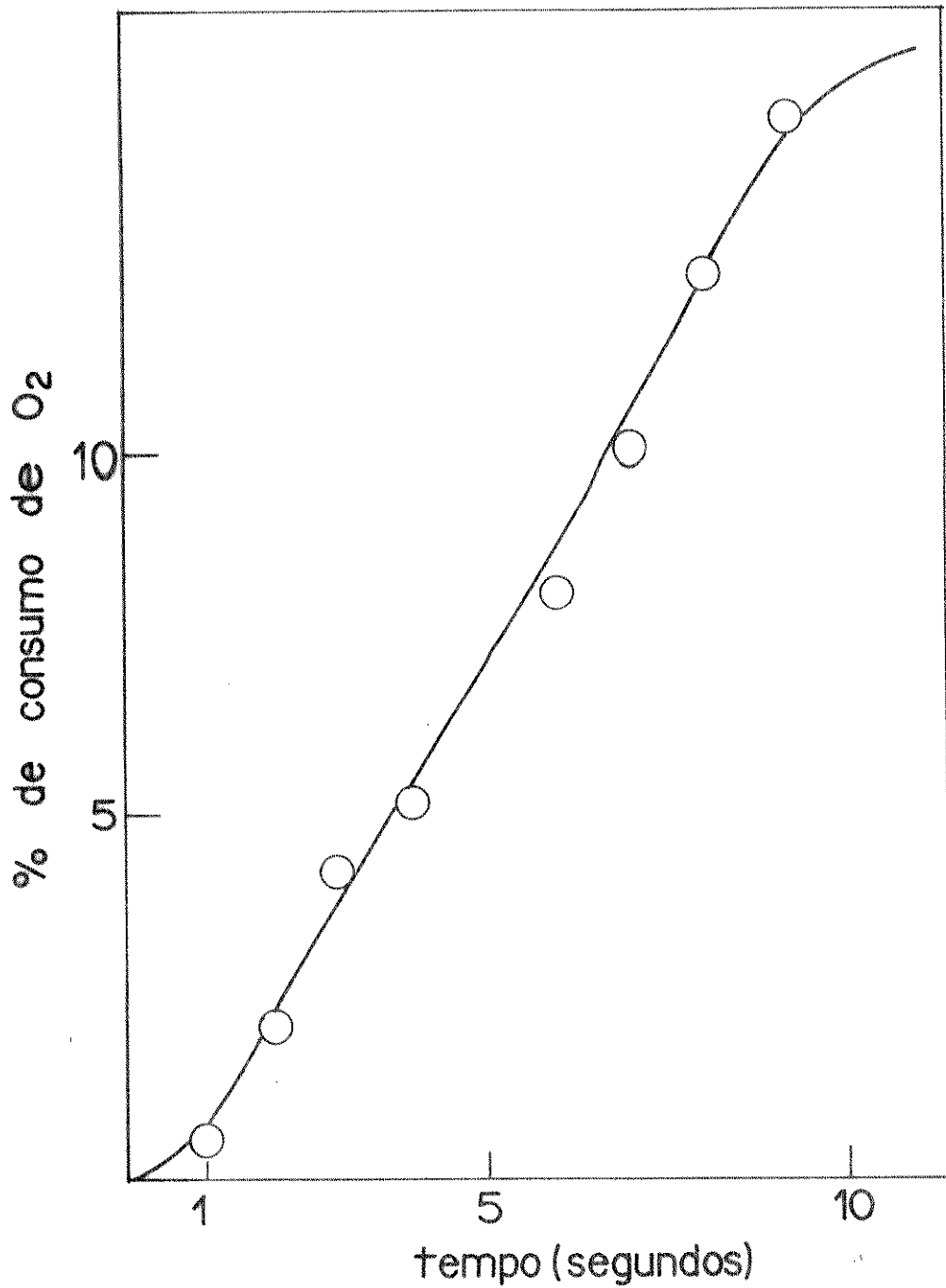


FIGURA 39. Consumo de O₂ pelo sistema Isobutiril-CoA (2,6 mM)/HRP (2,0 μM)/O₂ em tampão Pi 0,6M, PPI 0,3M, pH 7,4 a 30°C.

Um dos produtos dessa reação foi a acetona, identificada segundo o descrito no ítem III.4 da PARTE EXPERIMENTAL.

IV.1.11 Efeito de peróxido de hidrogênio

A adição de H_2O_2 (1 nM) ao sistema enzimático não altera a velocidade de consumo de oxigênio, mas retira o período de indução comparado ao sistema controle. Entretanto, a peroxidase dialisada em água pentadestilada, além de aumentar o período de indução, altera a velocidade inicial da reação (Fig.40).

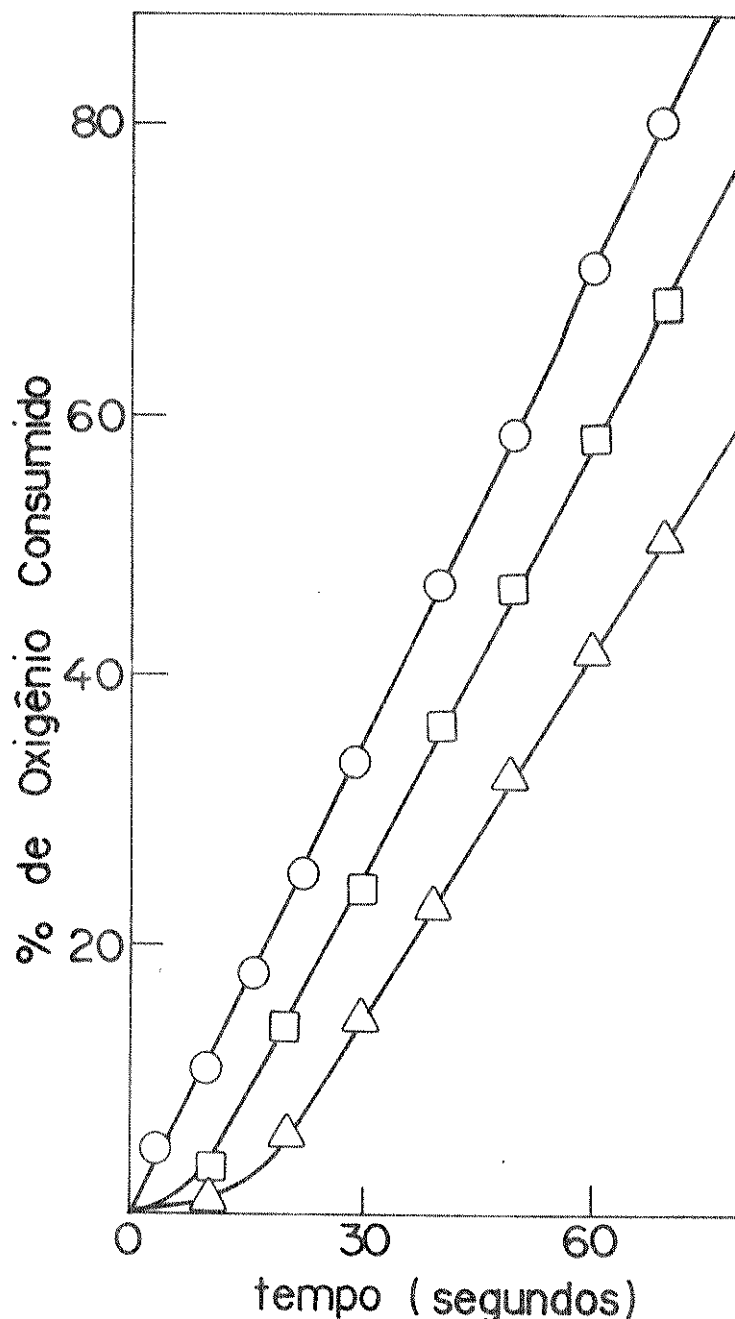


FIGURA 40. Consumo de oxigênio pelo sistema 2-MP (95mM)/HRP (2,2 μ M)/ O_2 . HRP em água destilada (□); HRP dialisado em água pentadestilada (Δ) e HRP na presença de traços de H_2O_2 (1,0 nM) (o) a 25°C.

IV.2 ESTUDOS COM O DNA

IV.2.1 Efeito do íon prata sobre a fluorescência de AL e PF

O espectro de absorção dos complexos de DNA com acridina e proflavina podem ser vistos nas figuras 41 e 42, respectivamente.

Na figura 43 vemos o efeito do íon prata sobre a fluorescência de acridina laranja e proflavina. O íon prata suprime a emissão de proflavina e acridina laranja, como visto na figura 43.

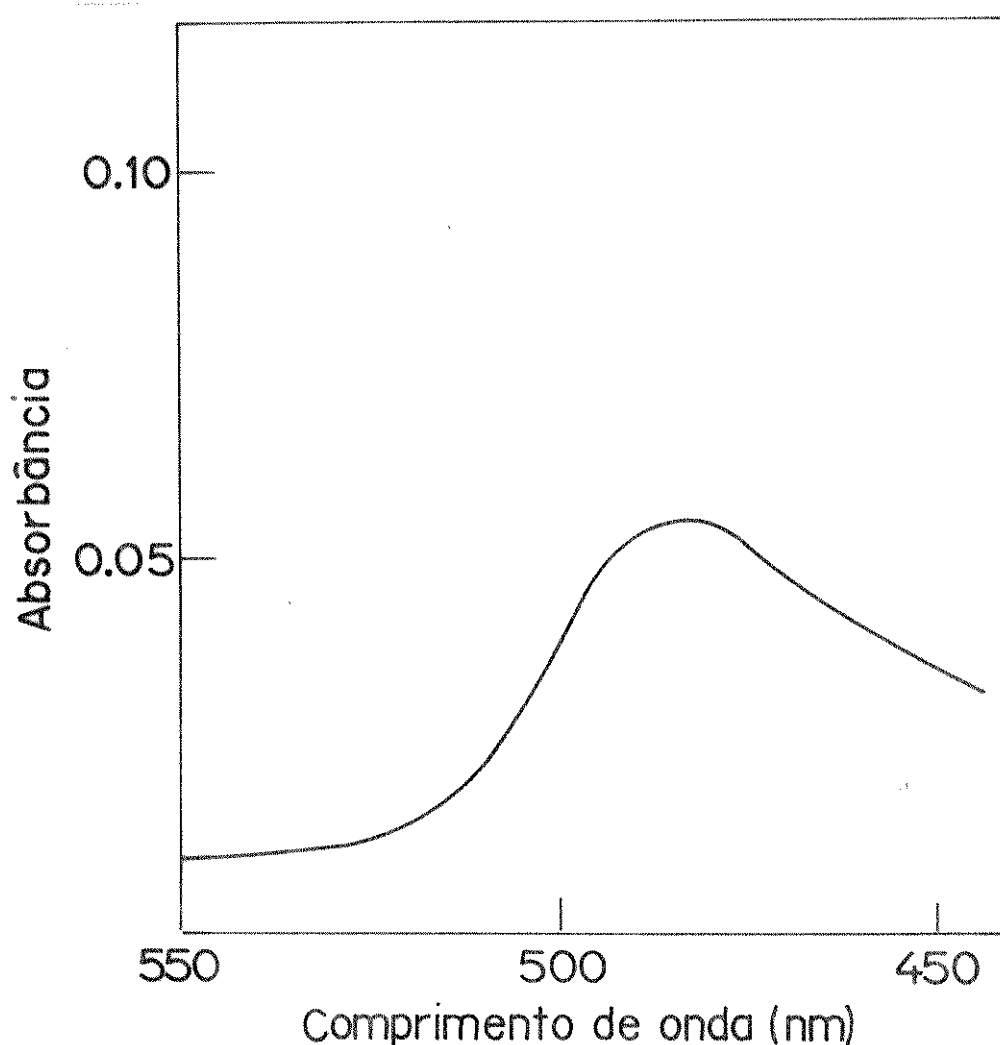


FIGURA 41. Espectro de absorção do complexo DNA ($1,0 \times 10^{-4} M$) e acridina laranja ($1,0 \times 10^{-6} M$). O mesmo espectro foi obtido para o complexo com DNA previamente submetido ao sistema enzimático.

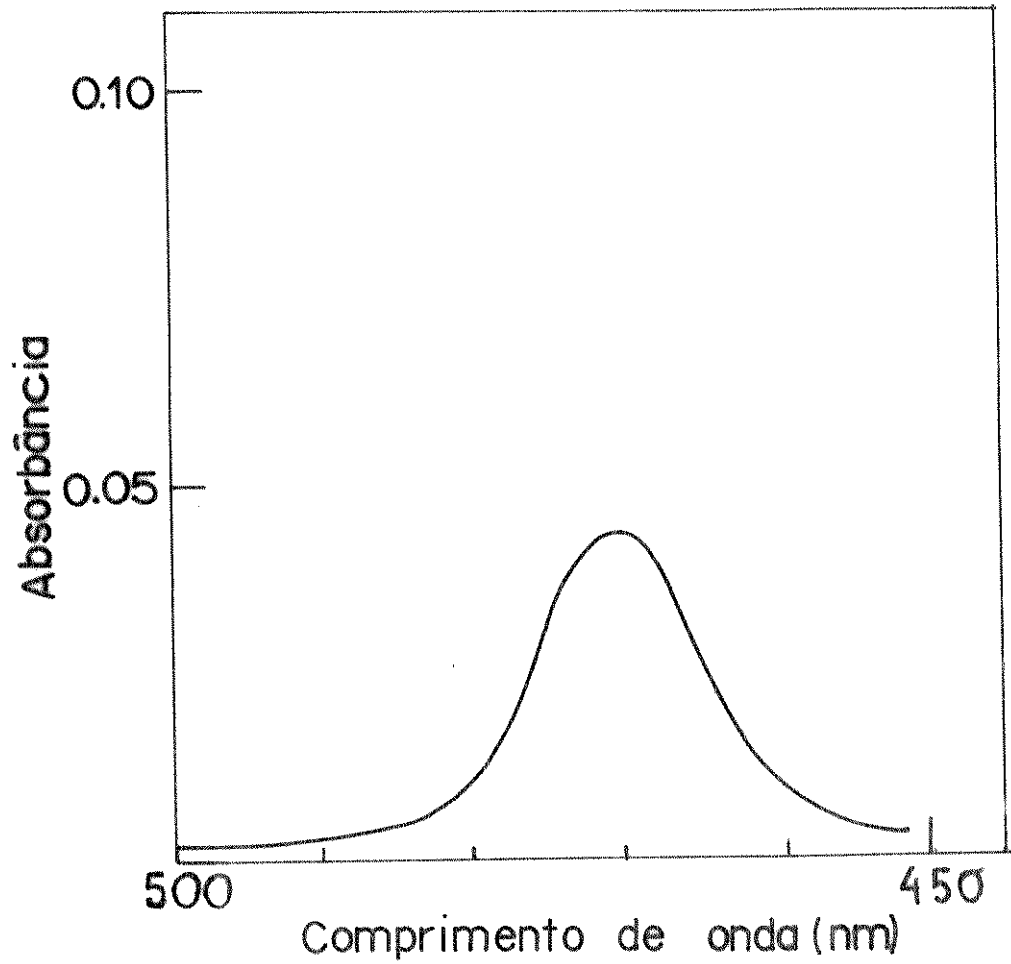


FIGURA 42. Espectro de absorção do complexo DNA ($1,0 \times 10^{-4} \text{M}$) e proflavina ($1,0 \times 10^{-6} \text{M}$). O mesmo espectro foi obtido para o complexo com DNA previamente submetido ao sistema enzimático.

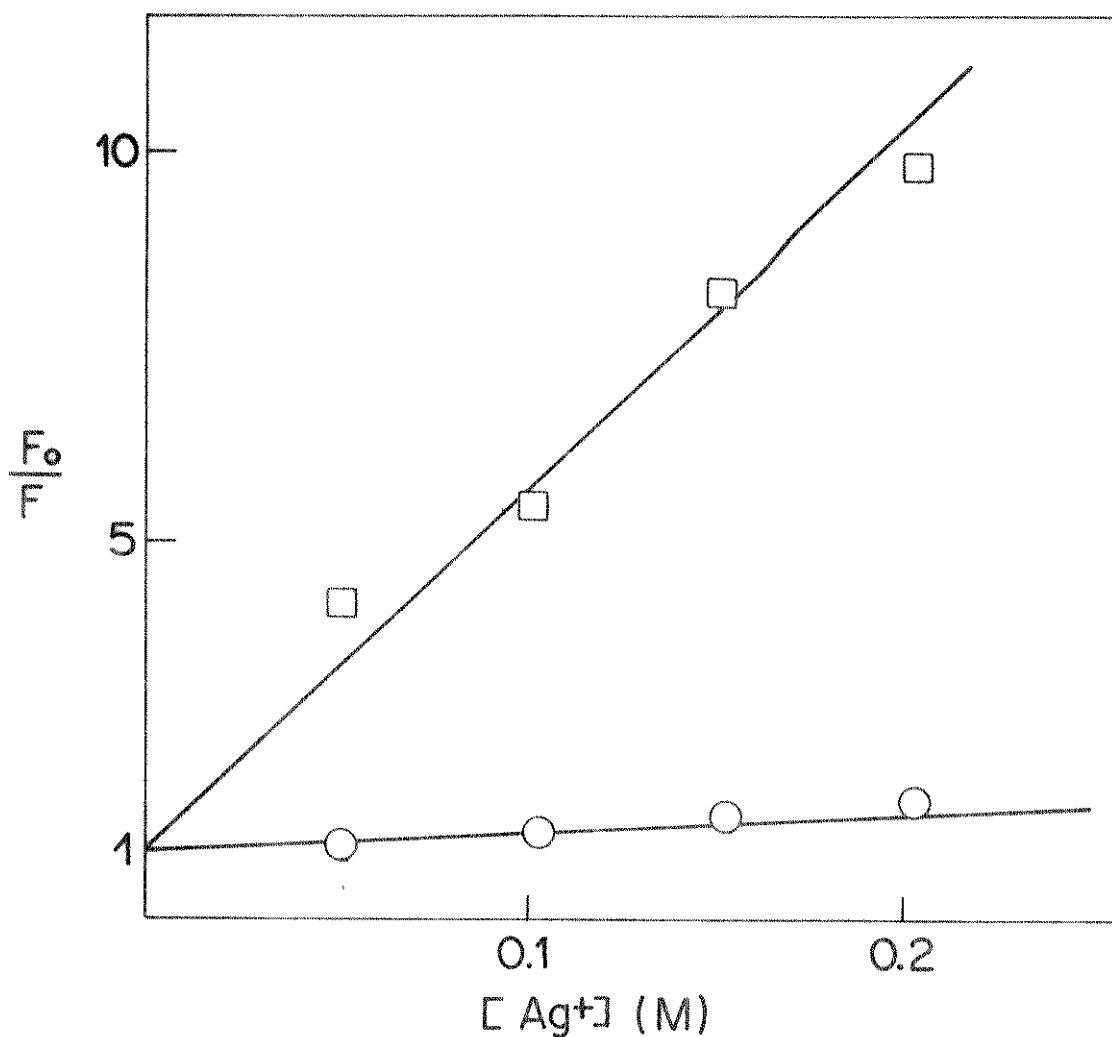


FIGURA 43. Efeito do íon prata sobre a intensidade de fluorescência F de $0,5 \mu\text{M}$ de acridina laranja (o) e $2 \mu\text{M}$ de proflavina (\square). F_0 é a intensidade na ausência do íon prata. AL foi excitada a 470 nm e sua fluorescência medida a 530 nm . Os correspondentes comprimentos de onda para proflavina foram 440 nm e 520 nm .

IV.2.2 Efeito do íon prata sobre os complexos de DNA/PF e DNA/AL

Antes de tratarmos o DNA com o sistema enzimático, tentamos reproduzir os resultados da literatura a fim de nos certificarmos se nossos métodos experimentais de preparação dos complexos eram satisfatórios. Os resultados podem ser vistos na figura 44.e estes, estão plenamente de acordo com a literatura (147).

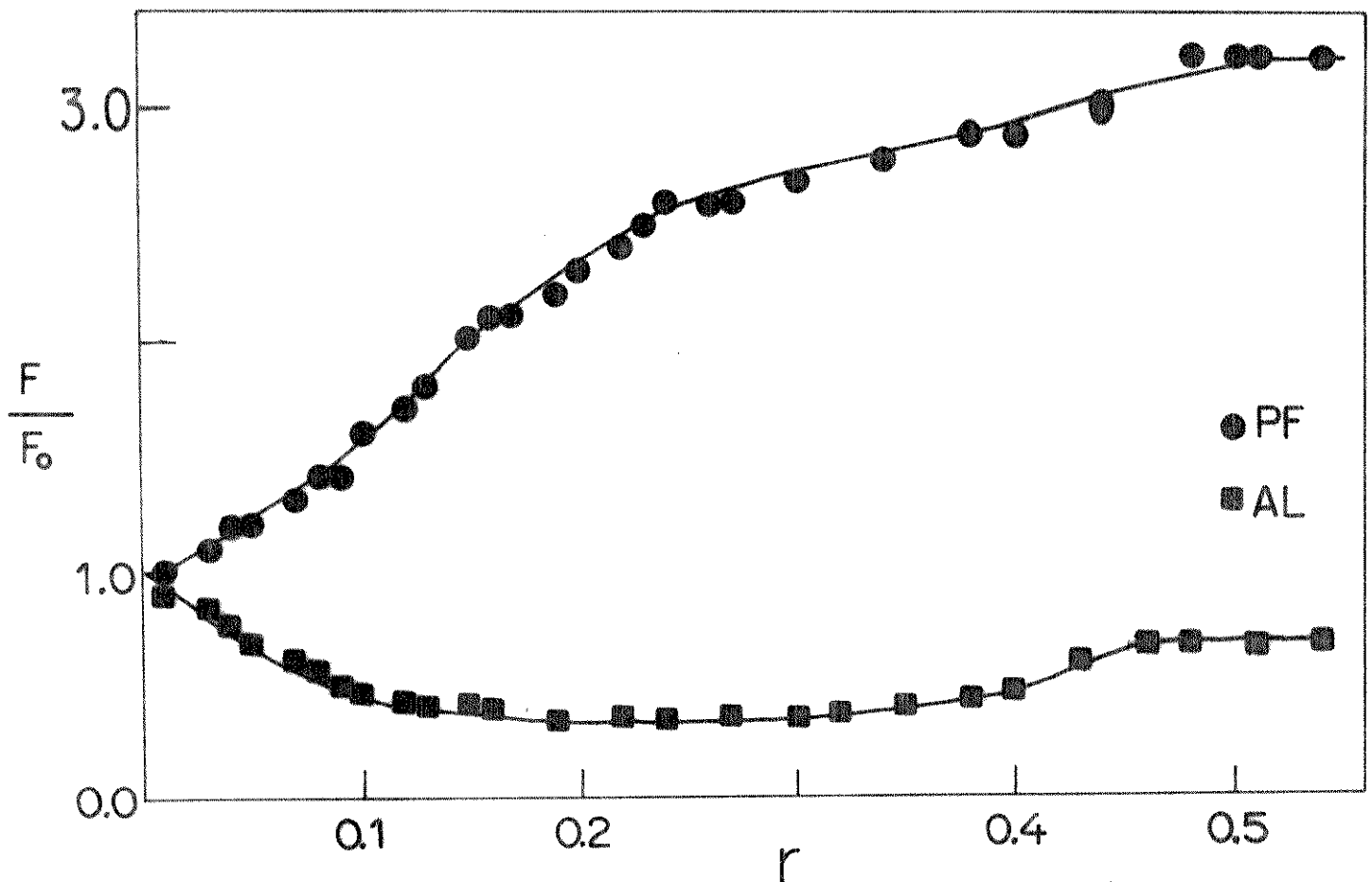


FIGURA 44. Efeito do íon prata sobre a fluorescência de proflavina (●) e acridina laranja (■) ligadas ao DNA de *E. coli*. A razão r (moles DNA/moles Ag^+) foi igual a 100. \bar{F} e \bar{F}_0 são as intensidades na presença e na ausência de prata, respectivamente. $r =$ moles de íon prata/moles de DNA. O complexo DNA/proflavina foi excitado a 468 nm e sua intensidade de emissão medida a 500 nm. Os correspondentes comprimentos para DNA/AL foram 480 e 530 nm.

Os resultados com DNA submetido ao sistema enzimático e ao sistema controle, segundo o item III.2., podem ser vistos nas figuras 45 e 46.

IV.2.3 Complexos de DNA e Têrbio (III)

Quando Tb^{3+} se liga ao DNA do sistema controle, sua intensidade de fluorescência aumenta, como já previsto pela literatura (90), devido ao nucleotídeo de guanina. Entretanto, quando Tb^{3+} se liga ao DNA extraído do sistema enzimático, há um maior aumento em relação à fluorescência de têrbio ligado ao DNA extraído do sistema controle (Figura 47) (Tabela II).

IV.2.4 Medidas de dicroísmo circular

Estudos de dicroísmo circular dos complexos de DNA e acridina laranja, mostraram que quando se tem DNA submetido ao sistema enzimático, mudanças ocorrem no espectro CD de acridina laranja, indicando que o sítio de ligação desta ao DNA foi alterado (Figura 48).

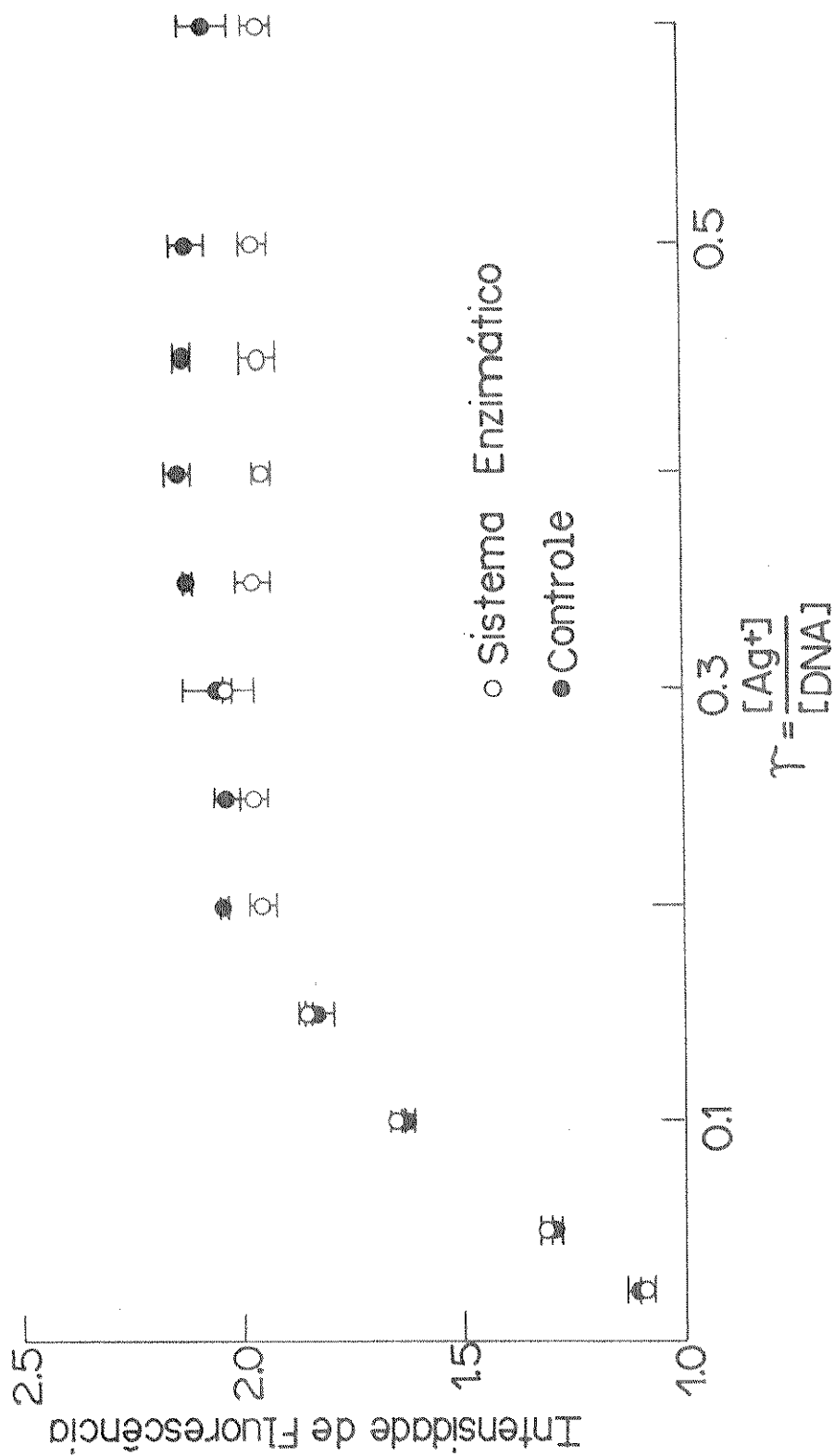


FIGURA 45. Efeito do íon prata sobre a intensidade de fluorescência do complexo DNA previamente submetido ao sistema controle (●) e ao sistema enzimático (○) e proteína flavina. As concentrações de DNA e PF nos complexos foram $1,0 \times 10^{-4}$ M e $1,0 \times 10^{-6}$ M, respectivamente. A emissão foi medida em 500 nm e a excitação foi em 468 nm.

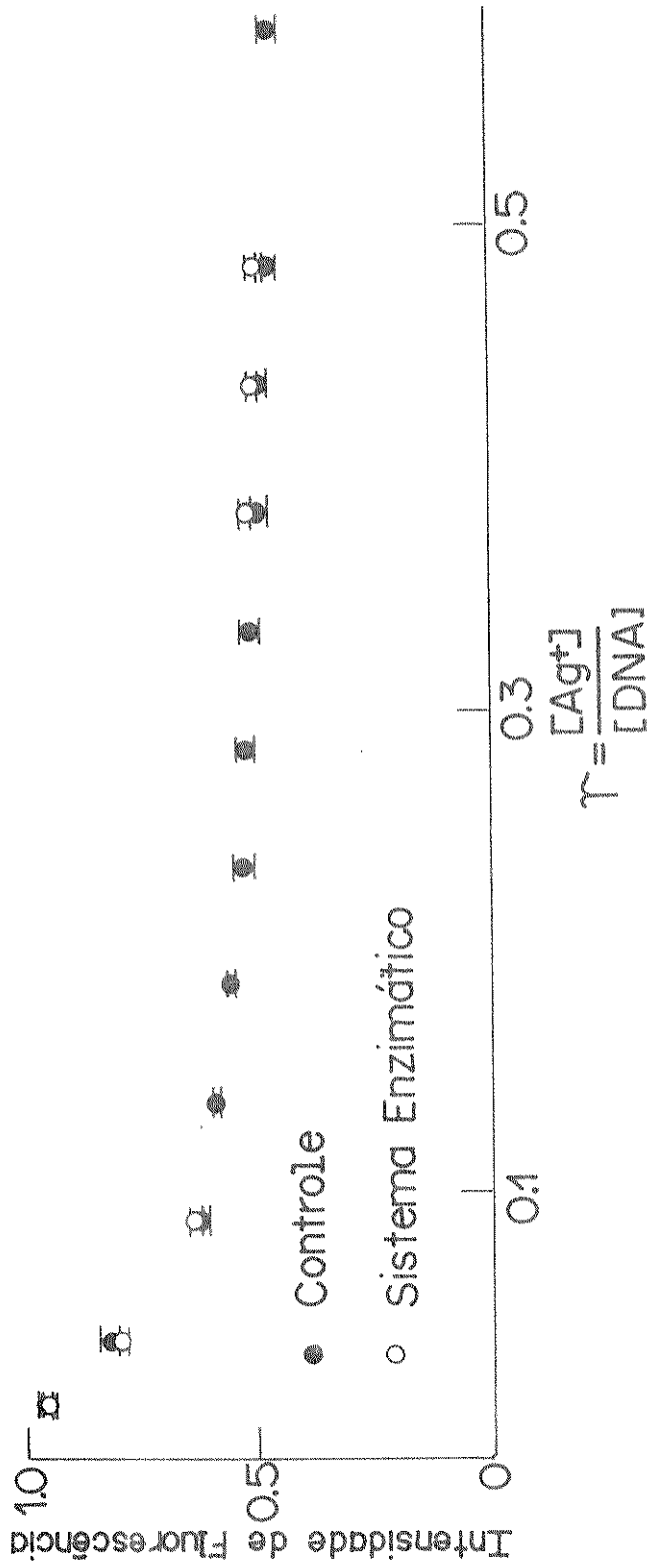


FIGURA 46. Efeito do íon prata sobre a intensidade de fluorescência do complexo DNA previamente submetido ao sistema controle (●) e ao sistema enzimático (○) e a cridina laranja. As concentrações de DNA e AL nos complexos foram $1,0 \times 10^{-4} M$ e $1,0 \times 10^{-6} M$, respectivamente. A emissão foi medida em 530 nm e a excitação em 480 nm.

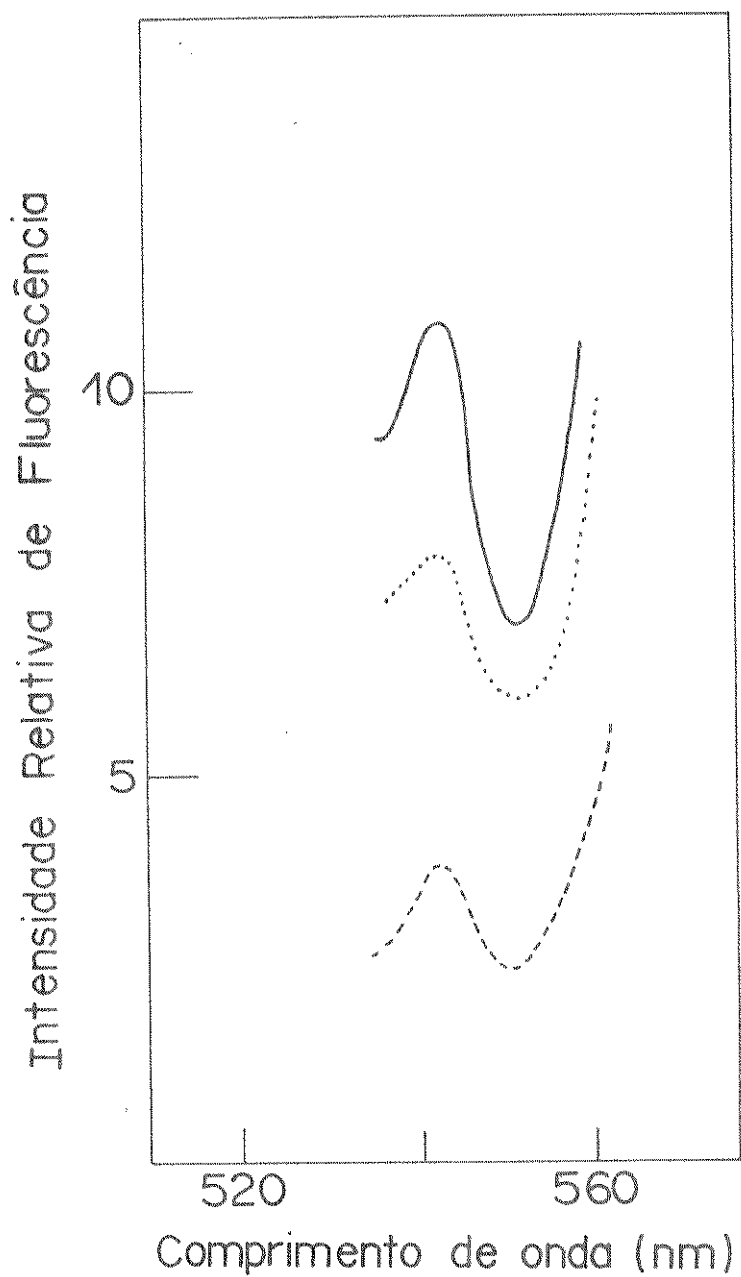


FIGURA 47. Intensidade de fluorescência de Têrbio sôzinho ($16\mu\text{M}$) (---); Tb^{3+} ($16\mu\text{M}$) ligado ao DNA ($1,0 \times 10^{-4}\text{M}$) (....) no sistema controle e (—) no sistema enzimático. O comprimento de onda de excitação foi de 290 nm.

	Fluorescência de Tb^{3+} a 540 nm
(A) DNA no sistema controle	$1,9 \pm 0,1$
(B) DNA no sistema enzimático	$2,7 \pm 0,1$
Razão B/A	1,4

TABELA II. Efeito do sistema enzimático (em condições padrão) sobre a fluorescência do complexo Tb^{3+} e DNA.

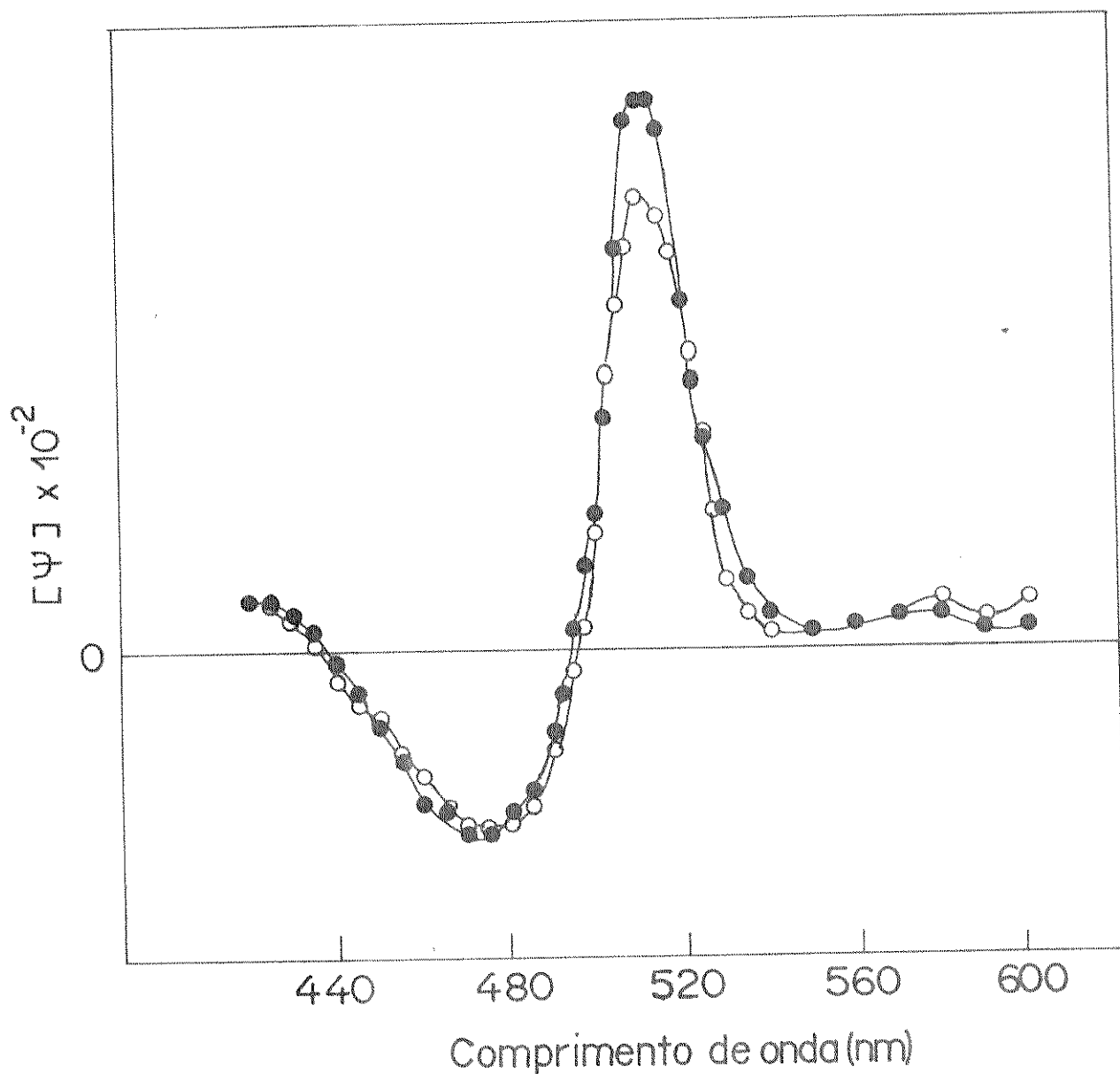


FIGURA 48. Espectro CD de acridina laranja ($7,5 \mu\text{g/ml}$) ligada ao DNA ($1,0 \times 10^{-4}\text{M}$) (●) previamente submetido ao sistema controle e (○) ao sistema enzimático.

D I S C U S S Ã O

I. ESTUDO CINÉTICO

Sabe-se que para a maioria das reações químicas catalisadas por enzimas, a velocidade da reação geralmente aumenta com o aumento da temperatura, dentro de certa faixa na qual a enzima é estável e mantém atividade integral.

As enzimas, contudo, são proteínas complexas cujas atividade catalítica resulta de uma estrutura terciária altamente ordenada mas é mantida por ligações fracas não covalentes. Isso resulta, em termos práticos numa estrutura frágil e delicada que pode se romper se a molécula absorver muita energia (denaturação). Por isso, o esperado aumento na velocidade com o aumento da temperatura, resultante do aumento das colisões enzima + substrato, é compensado pelo aumento na velocidade de denaturação. Por isso, a enzima apresenta uma temperatura "ótima", na qual ela exibe uma atividade constante com o tempo pelo menos tão longo quanto o tempo de análise e à temperaturas maiores que essa temperatura máxima, a velocidade tende a cair.

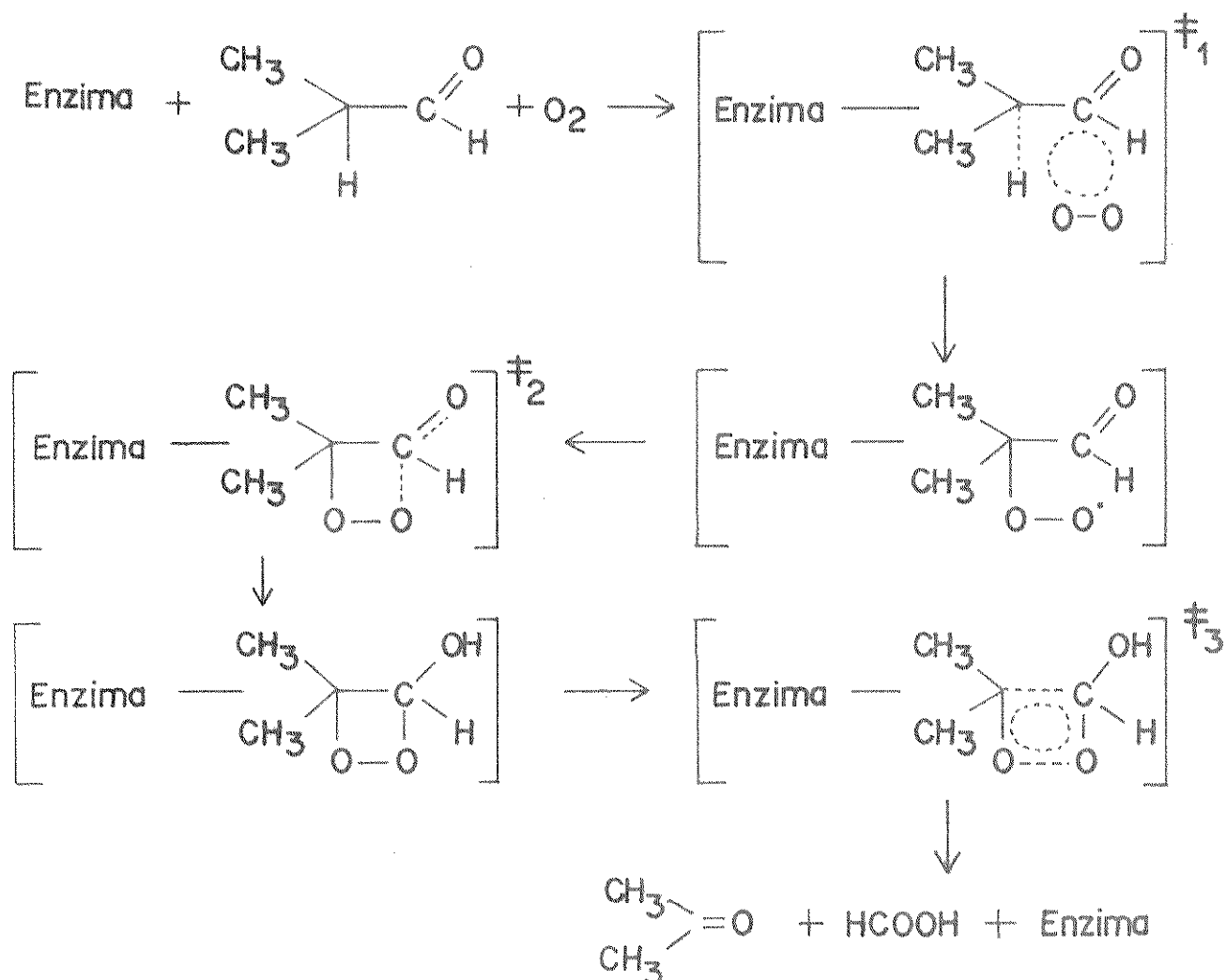
Observando-se os gráficos das páginas 58, 59, 60, e 61, sobre a velocidade de consumo de oxigênio versus concentração de 2-MP para as temperaturas 25°C, 30°C, 37°C e 40°C (Figuras 28 a 31, respectivamente), notamos que a velocidade aumenta com o aumento da temperatura numa faixa de concentração de substrato que vai de 20 a 80 mM. Contudo, para concentrações maiores que 80 mM, a velocidade aumenta quando varia

mos de 25°C a 30°C, indicando que a atividade catalítica máxima da enzima ainda não foi atingida. Na faixa de 37°C a 40°C, há um ligeiro decréscimo na velocidade. Isso indicaria que a enzima a partir de 37°C perde parte de sua atividade, sendo portanto, 37°C a temperatura "ótima" dessa enzima.

À primeira vista, o valor de 130 mM para o K_M a 37°C, indicaria pouca afinidade da enzima pelo substrato 2-metilpropanal (o K_M da catalase é 25 mM). Contudo, deve-se ter em mente que nem sempre K_M é uma medida da afinidade da enzima pelo substrato, somente o sendo quando $k_2 \ll k_{-1}$ (ver Apêndice II). Portanto, o conhecimento das constantes de velocidade da reação faz-se necessário antes de se afirmar algo sobre a afinidade da enzima pelo substrato.

O valor da energia de ativação obtido diretamente do gráfico $\log V_{\max}$ versus $1/T$ (Figura 32, página 62) foi de $25,1 \pm 4,4$ kcal/mol, na faixa de 25°C a 37°C, uma vez que a partir de 37°C a reação não segue a lei de Arrhenius provavelmente devido a modificações conformacionais no sítio ativo da enzima. Esse valor, apesar de ser alto em relação ao valor de E_a para a maioria das reações enzimáticas, que se encontra na faixa de 12 kcal/mol, é esperado, uma vez que deve corresponder ao total de E_a do sistema, onde pelo menos 3 estados de transição podem ser previstos (Esquema 18). Um primeiro estado de transição seria formado para a incorporação do oxigênio, resultando no radical hidroperóxido. Um outro estado de transição deve anteceder a formação do intermediário dioxetano e finalmente um terceiro estado de transição deve anteceder a clivagem de tal dioxetano para formar os produtos. Deve-se lembrar aqui que todos esses prováveis estados de transição

são formados juntamente com a enzima e formam por sua vez os chamados complexos ativados citados no Apêndice III.



ESQUEMA 18

Os estudos com cianeto e azoteto (Figuras 33 e 34, página 64), mostraram um pequeno efeito inibidor para concentrações superiores a 5 mM. Uma vez que segundo

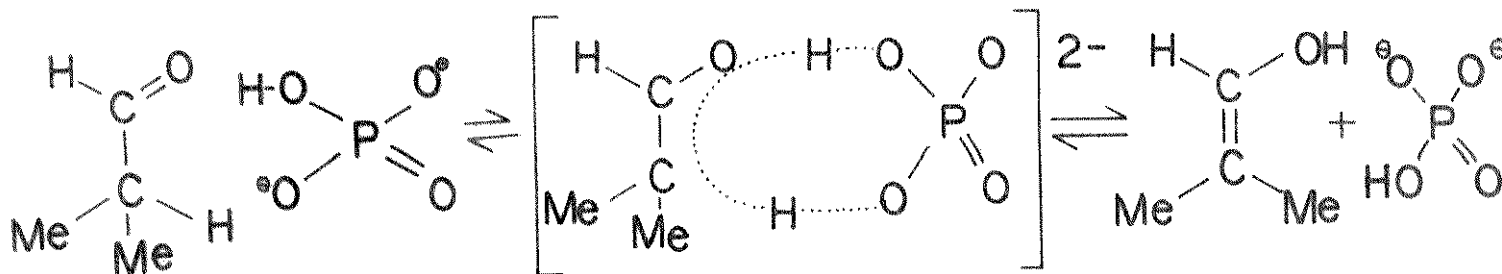
Saunders e col. (152), a enzima normalmente é inibida para concentrações de CN e N_3^- na faixa de 10^{-5} a 10^{-6} M, podemos considerar que o nosso sistema é praticamente insensível à ação de tais inibidores de peroxidase nativa. Sabe-se que tais íons são capazes de formar complexos estáveis com o grupo ferriporfirínico de HRP nativa (153) envolvendo a interação com o grupo heme na sexta posição de coordenação (154). Entretanto, estudos com cianeto sobre o ciclo de oxidação-redução de HRP (155), demonstraram que em HRP-I e HRP-II (ver Apêndice I) esse sítio de ligação está ocupado por espécies fortemente coordenadas as quais cianeto é incapaz de deslocar. Estudos anteriores com o sistema de reação, indicaram que durante a reação devemos ter essencialmente HRP-II e alguma HRP-I (138) (ver Apêndice I). Portanto, podemos concluir que provavelmente a total insensibilidade da reação enzimática frente ao cianeto e azoteto deve-se à existência de tais formas oxidadas de HRP.

O perfil do consumo de oxigênio em função do pH, mostrou que a enzima tem um pH "ótimo" ao redor de 7,0 (Figura 35, página 65). Considerando-se que a peroxidase nesse sistema, age como uma oxidase e que os seres humanos contêm uma variedade enorme de enzimas com tal função, poderíamos supor que os tampões biológicos $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ (intracelular) e H_2CO_3/HCO_3^- (extracelular), contribuiriam para que essas enzimas atingissem a capacidade máxima de oxidação de um substrato análogo ao 2-metilpropanal.

Estudos anteriores (156), haviam demonstrado preliminarmente, que a velocidade de consumo de oxigênio e de emissão de luz eram muito maiores em tampão fosfato do que em tampão tris-acetato no mesmo pH e que em tampão arseniato, a

velocidade inicial de emissão de luz era muito maior do que a velocidade em tampão fosfato.

Os resultados obtidos agora com o tampão arseniato, revelaram que a velocidade de consumo de O_2 foi cerca de duas vezes maior que em tampão fosfato (Figuras 36 e 37, páginas 66, 67). Tem-se sugerido em estudos sobre a hidratação de aldeídos (157) que o tampão fosfato está envolvido no equilíbrio ceto-enólico, agindo como um catalisador bifuncional (158). Verificou-se também que a velocidade de enolização de cetonas em tampão $HAsO_4^{2-}$ é cerca de duas vezes maior do que em tampão HPO_4^{2-} (159). Estudos anteriores com o sistema 2-MP/HRP/ O_2 (138), sugeriram que a enzima deve abstrair um hidrogênio de forma enólica do substrato. A importância da forma enólica pode também ser vista no sistema bioluminescente de Latia, onde a luciferina é uma forma enólica de uma cetona (160). Assim, o tampão fosfato seria responsável pelo equilíbrio ceto-enólico de 2-metilpropanal (Esquema 19), o que explicaria a maior velocidade observada nesse tampão do que em tris-acetato. Também o fato da velocidade de consumo de oxigênio em tampão arseniato no sistema 2-MP/HRP/ O_2 ser duas vezes maior do que em tampão fosfato, está de acordo com os resultados obtidos para a enolização de cetonas, onde a relação $k_{HAsO_4^{2-}}/k_{HPO_4^{2-}}$ também foi dois.



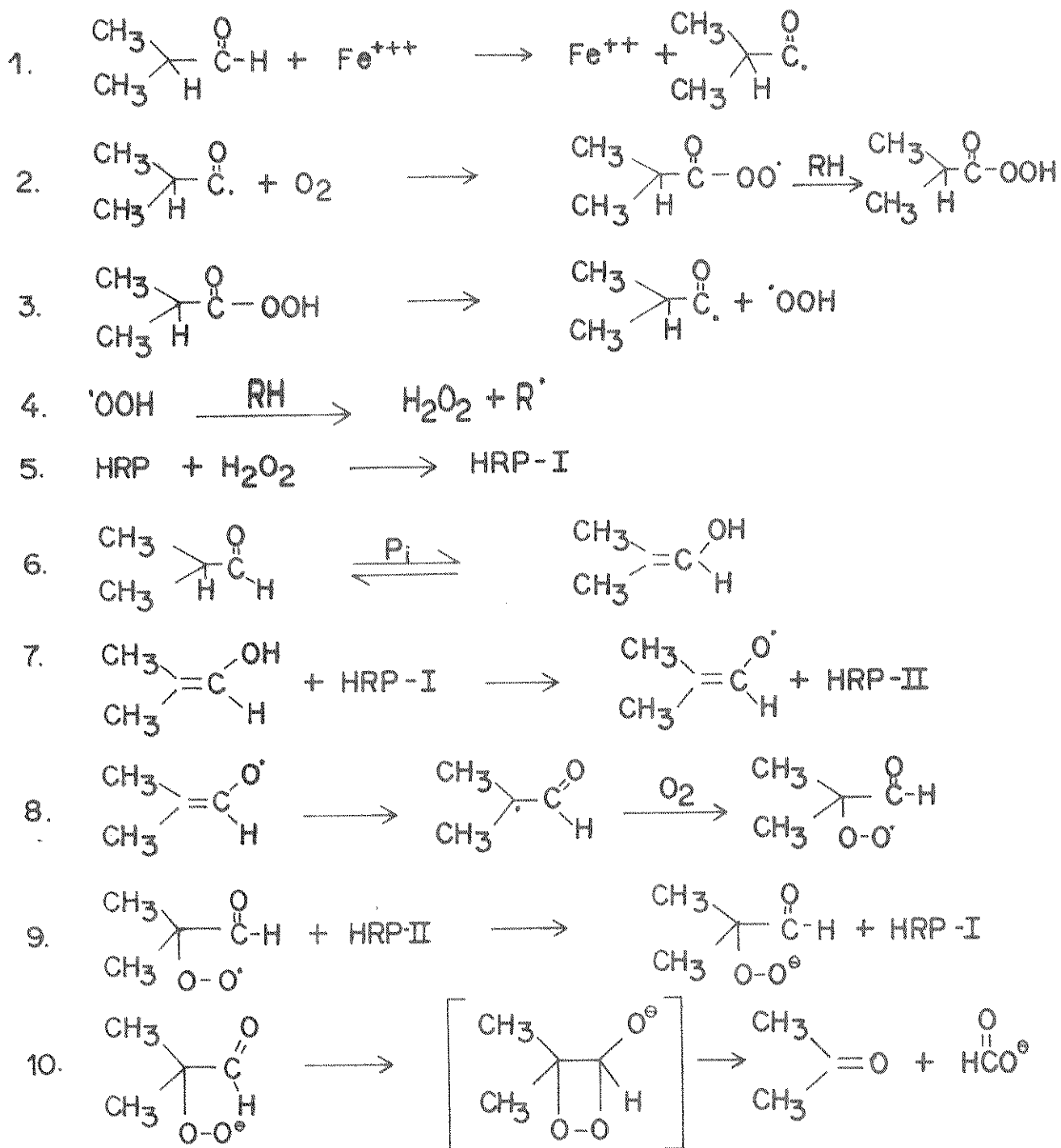
ESQUEMA 19

Quando o sistema enzimático contém peroxidase dialisada, o tempo de indução aumenta, sendo que a presença de traços de H_2O_2 retira o tempo de indução (Figura 40, página 70). Isso provavelmente indicaria que durante o período de indução, H_2O_2 deve ser formado por via catalisada por metal para dar origem ao HRP-I (Esquema 20). Acredita-se que H_2O_2 participe na geração de radicais livres que provavelmente aceleram a reação. Dos resultados obtidos neste estudo e estudos anteriores (138), podemos o mecanismo segundo o Esquema 20.

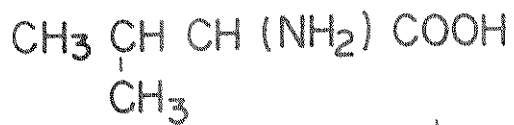
Na tentativa de aproximarmos nosso sistema a um sistema biológico, usamos o substrato isobutiril-CoA, que é um intermediário da degradação oxidativa do aminoácido valina (Esquema 21) e succinil-CoA, que por sua vez é um intermediário de uma sequência de reações responsáveis pela respiração celular.

Nossos resultados demonstraram que há uma emissão muito rápida de luz (Figura 38, página 68), indicando que a velocidade de formação de produtos é muito alta. Tal fenômeno é esperado, uma vez que a presença do grupo-S-CoA por ser um bom grupo abandonador, favorece a inserção de O_2 no substrato, e por conseguinte, a velocidade de formação de produtos é muito alta. A detecção de acetona por cromatografia, sugere o mecanismo do esquema 20, por analogia ao proposto para 2-metilpropanal.

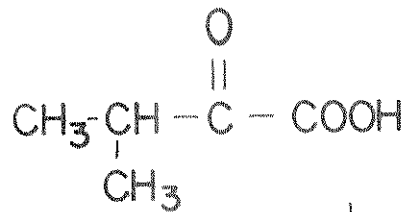
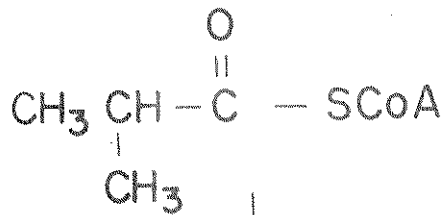
Poderíamos então supor que haja a formação de estados excitados durante a oxidação de valina na mitocôndria (compartimento celular onde se processa a oxidação de carboidratos, lipídeos e aminoácidos a CO_2 e H_2O), por um meca-



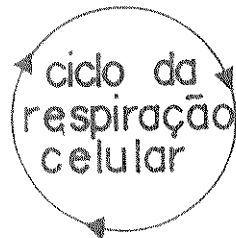
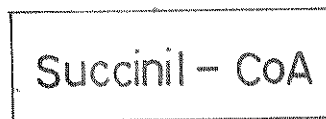
ESQUEMA 20



Valina

Acido - α - cetoisovalérico

Isobutiril - CoA



ESQUEMA 21

nismo via dioxetano, uma vez que no interior da mitocôndria encontram-se muitas enzimas que catalisam a incorporação de O_2 , tal qual a função desempenhada por HRP no sistema de 2-metilpropional.

O fato do tempo de emissão ser muito curto sugere a formação de espécies singletes. Contudo, torna-se prematuro qualquer afirmação a respeito do tipo de estado excitado formado, visto que os resultados com os aceptores emissivos (DBAS e DPAS), não foram conclusivos. Caso se deseje estudar esse sistema, um estudo mais detalhado das melhores condições de reação faz-se necessário realizar. O mesmo comportamento que tem o sistema α -cetoisovalérico/HRP/ O_2 , que é dependente de íons Mn^{++} .

II. ESTUDO COM O DNA

II.1 Dicroísmo circular

Estudos de dicroísmo circular de DNA irradiado a 254 nm (119), demonstraram que a variação na elipticidade a 275 nm do espectro CD de DNA (Figura 49), estaria relacionada à mudanças conformacionais consequentes da formação de dímeros de pirimidina, especialmente dos dímeros de timina. Um comportamento similar da elipticidade a 275 nm (Figura 50) foi observado em reações fotosensibilizadas com acetofenona que levam à formação específica dos dímeros de timina (124). Contudo, para altas concentrações de sensibilizador, foram observadas variações mais pronunciadas nessa elipticidade, que talvez estivessem relacionadas com quebras na cadeia açúcar-fosfato de

tectadas por Rahn e col. (161).

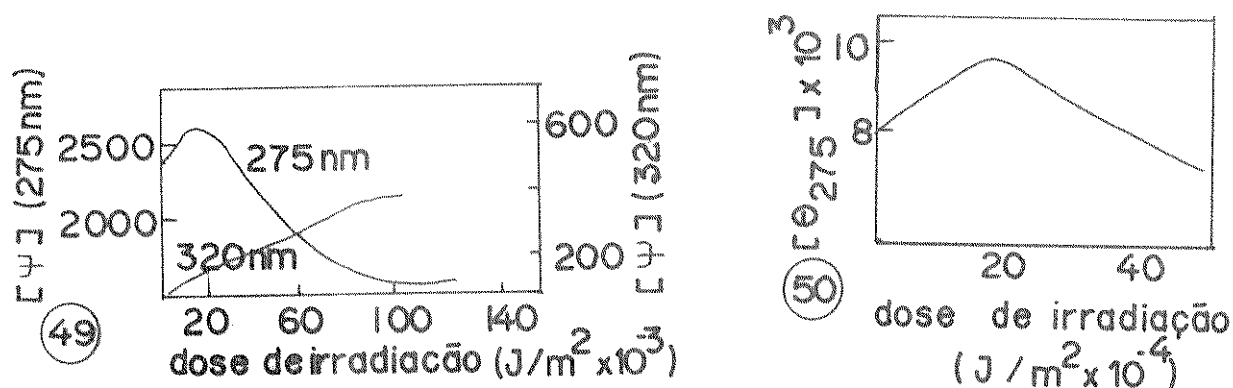


FIGURA 49. Variação na elipticidade a 275 e 320 nm do espectro de dicroísmo circular de DNA Calf thymus como função da dose de radiação a 254 nm (Figura extraída da ref. 119).

FIGURA 50. Variação na elipticidade a 275 nm como função da dose de radiação a 313 nm em presença de acetofenona ($7,6 \times 10^{-4}M$) (Figura extraída da ref. 124).

O aparecimento de uma nova banda ao redor de 320 nm e a mesma dependência com relação à dose de radiação, foi observada no espectro CD de DNA irradiado a 254 nm e em reações fotosensibilizadas. Tem sido proposto que essa banda é devido a alguma transição $n-\pi^*$ que é favorecida em DNA irradiado (119).

As mesmas variações espectrais de CD, ou seja, diminuição da elipticidade a 275 nm e o aparecimento de uma nova banda a 320 nm já foram observadas em DNA tratado com o sistema enzimático gerador de acetona triplete (141) (Figura 51). Verificou-se também que o DNA não afeta a velocidade de consumo de oxigênio, mas diminui consideravelmente a fosforescência de acetona formada (Figura 52).

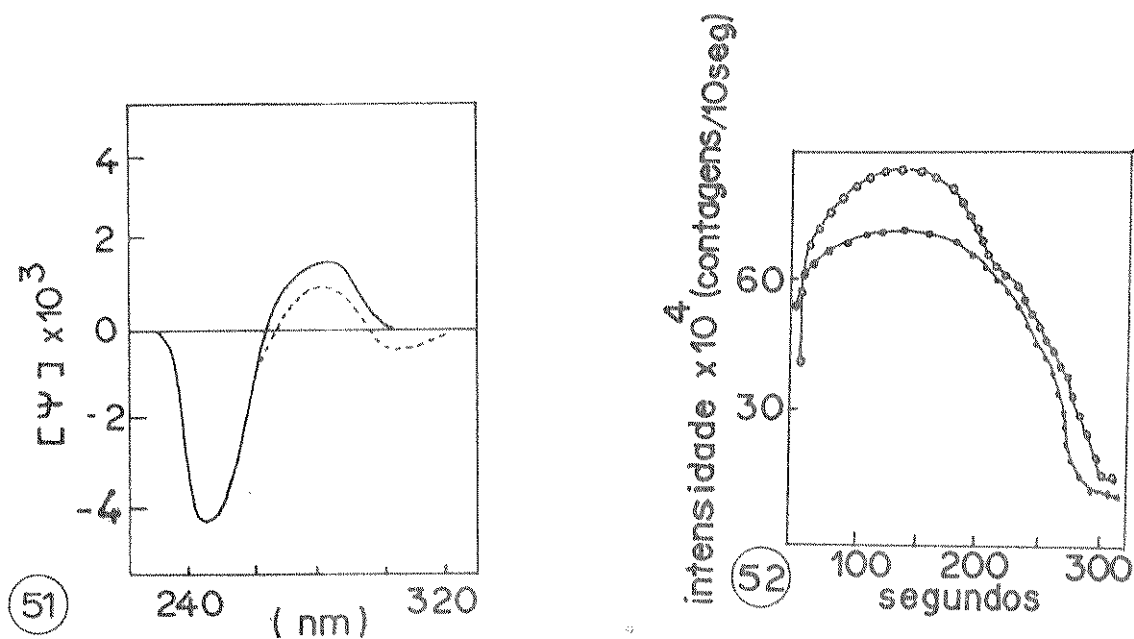


FIGURA 51. Espectro CD de DNA: (—) sozinho; (---) quando presente no sistema de reação 2-MP/HRP/O₂. (Figura extraída da ref. 141).

FIGURA 52. Fotoemissão como função do tempo pelo sistema 2-MP/HRP/O₂ na ausência (-O-O-O-) e presença (-●-●-) de DNA (50 µg/ml). (Figura extraída da ref. 141).

Portanto, as alterações observadas no espectro CD (Figura 51), poderiam estar relacionadas com mudanças estruturais devido à transferência de energia de acetona triplete para o DNA (141).

Nossos resultados com o espectro CD dos complexos DNA e acridina laranja, revelaram um decréscimo na banda de absorção do complexo em 510 nm, quando o DNA foi tratado com o sistema 2-MP/HRP/O₂ (Figura 48, página 80).

Um comportamento semelhante foi observado no estudo do efeito da temperatura sobre os complexos de DNA e acridina laranja (131) (Figura 53).

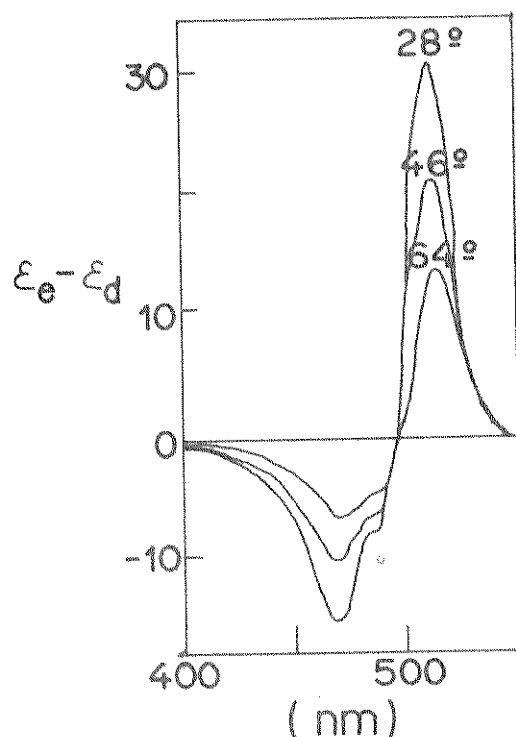


FIGURA 53. Curvas CD do complexo DNA/AL para D/C = 4,0 nas 3 temperaturas (Figura extraída da ref. 142).

O espectro de absorção do complexo DNA/AL depois da interação com acetona triplete não apresenta variação (Figura 41, página 71) (analogamente ao observado no estudo do efeito da temperatura), indicando que as moléculas do corante ainda estão todas ligadas ao DNA. Portanto, o decréscimo em CD acompanhando a interação de acetona triplete não seria devido a alterações no equilíbrio termodinâmico entre corante e DNA e sim a alguma mudança na relação estereoquímica entre duas moléculas de corante que permanecem ligadas ao DNA. O efeito observado em estudos anteriores no espectro CD de DNA submetido ao sistema enzimático (Figura 51), poderia ser a cau

sa de tal mudança na relação estereoquímica das moléculas do corante.

II.2 Estudos de fluorescência

Resultados anteriores (141) sobre a fluorescência do DNA submetido ao sistema gerador de acetona triplete, mostraram o aparecimento de uma nova banda ao redor de 400 nm (Figura 54), que poderia estar relacionada com a formação de adutos de pirimidina (Figura 55), uma vez que estes apresentam fluorescência ao redor de 400 nm (162).

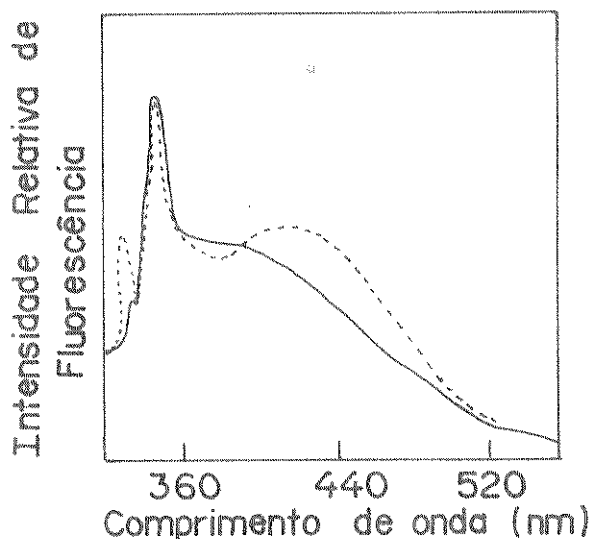


FIGURA 54. Espectro de fluorescência de DNA: (—) sozinho; (---) quando presente no sistema de reação 2-MP/HRP/O₂. (Figura extraída da ref. 141).

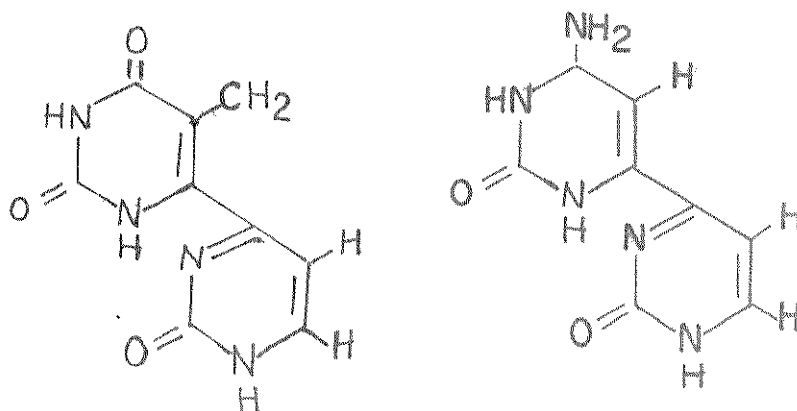


FIGURA 55. Adutos de pirimidina isolados de DNA irradiado a 254 nm.

Nossos estudos de fluorescência revelaram o seguinte: não houve alteração na intensidade de fluorescência do complexo DNA/AL ou DNA/PF quando DNA foi previamente submetido ao sistema enzimático, em relação aos mesmos complexos com DNA não previamente tratado.

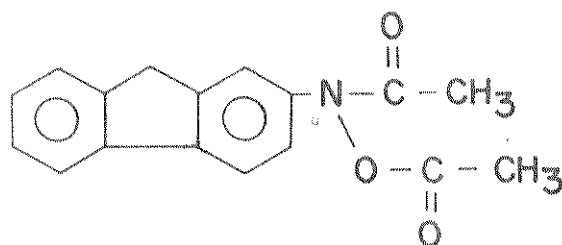
Os resultados com tais complexos foram mais positivos na presença de prata. Assim, a intensidade da fluorescência do complexo de DNA após interação com o sistema enzimático e proflavina quando na presença de prata, diminuiu em relação ao complexo de DNA controle e proflavina (Figura 45, página 76). Esse efeito ocorreu na região em que $0,2 < r < 0,5$ (Figura 19, página 37). Isso indicaria que o modo de interação de proflavina com DNA foi modificado pela ação do sistema enzimático, refletindo-se na diminuição da intensidade de fluorescência. Sabe-se que a prata quando em presença de complexos de DNA e proflavina, tende a anular o efeito supressor da guanina sobre a proflavina (147), daí resultando o esperado aumento na intensidade de fluorescência, como observado por nós (Figura 44 página 74). Portanto, o decréscimo observado quando tínhamos DNA tratado no sistema enzimático, estaria indicando que a supressão da fluorescência de proflavina pela guanina em sítios AT-GC ou GC-GC não foi anulada, provavelmente devido a alguma alteração nesses sítios provocada por acetona bioenergizada. Como os resultados anteriores sobre a fluorescência do DNA, indicaram que a nova banda ao redor de 400 nm, poderia ser devido à formação de adutos de pirimidina, podemos supor que a alteração detectada com o uso de proflavina e prata seja uma consequência da formação desses adutos. Sabe-se que as ligações de pontes de hidrogênio entre as bases são quebradas para que sejam forma

dos os adutos. Isso acontecendo, a prata não pode se ligar covalentemente às bases, causando a alteração observada na intensidade de fluorescência de proflavina (Figura 45, página 76).

A intensidade de fluorescência do complexo DNA controle e acridina laranja na presença de prata, não sofre alteração com relação ao DNA submetido ao sistema enzimático (Figura 46, página 77). Como nos complexos de acridina laranja com DNA não existem sítios supressores de fluorescência, sendo que a acridina laranja fluoresce igualmente de todos os sítios do DNA aos quais se intercala, a presença do íon prata apenas exerce um efeito de átomo pesado, aumentando o cruzamento intersistema (Esquema 1, página 3), que irá por conseguinte, diminuir a intensidade de fluorescência de AL. Foi o que observamos nos experimentos das figuras 44 e 46, páginas 74 e 77, respectivamente. O fato de não observarmos alteração entre os complexos de AL com DNA submetido ao sistema enzimático e com o DNA controle (Figura 46), provavelmente indicaria que o efeito de anulamento da supressão tal como exercido no complexo de DNA e proflavina, predomina sobre o simples efeito de átomo pesado exercido sobre AL, como já verificado por Prusik e col. (147), indicando assim que proflavina na presença de prata seria mais útil em termos de detecção de alterações em DNA.

Nossos estudos com térbio revelaram que a intensidade de fluorescência do complexo com DNA previamente tratado no sistema enzimático é maior do que com DNA no sistema controle (Figura 47, página 78). Estudos com DNA nativo, DNA denaturado e tratado previamente com uma nuclease que hidrolisa as regiões de fita simples do DNA (85), demonstraram que quando térbio está ligado ao DNA denaturado ou tratado com nu-

clease, sua intensidade de fluorescência é cerca de 14 vezes maior que quando ligado ao DNA nativo. Por outro lado, quando está presente em DNA que sofreu tratamento com N-acetoxi-2-acetalamino-fluoreno (XIII), sua intensidade de fluorescência diminui cerca de 70% (90). Sabe-se que tal composto reage principalmente na posição 8 da guanina e portanto, a diminuição na intensidade de fluorescência do tório é devido à modificação química do anel guanidínico.



XIII

Como observamos um aumento na intensidade de fluorescência de Tb^{3+} ligado ao DNA previamente submetido ao sistema enzimático em relação ao DNA controle (Figura 47, página 78), provavelmente nosso sistema não está causando quebra do anel de guanina e sim algum tipo de mudança semelhante a pequenas regiões de fita simples, já que o aumento na intensidade de fluorescência foi pequeno (cerca de 1,4 vezes, Tabela II, página 79). Há também a possibilidade de que tais regiões de fita simples sejam formadas não como consequência da formação de adutos, mas sim de outro tipo de lesão causada por acetona bioenergizada na cadeia açúcar-fosfato, que necessitem de álcali para sua evidência, como já observado por Meneghini e col. (72).

Supondo então que a ação de acetona triplete gerada enzimaticamente sobre o DNA induza a formação de adutos de pirimidina e de regiões de fita simples, vemos abaixo (Figura 56) as possíveis consequências sobre a intensidade de fluorescência dos complexos de DNA e proflavina na presença de prata e de DNA em Tb^{3+} , observadas em nosso estudo.

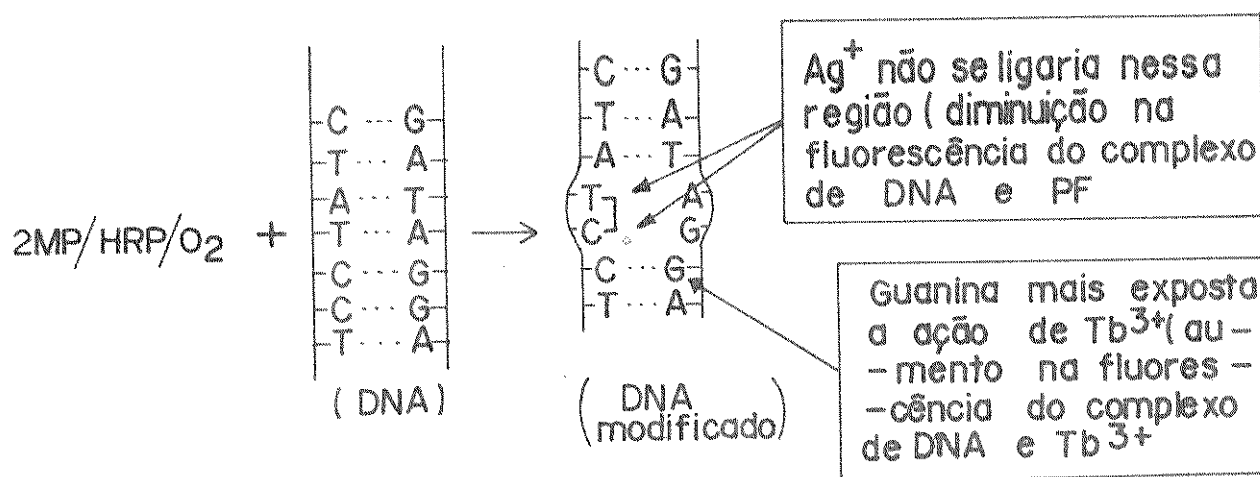


FIGURA 56

CONCLUSÕES

A oxidação de 2-metilpropanal catalisada por HRP, formando acetona triplete segue um comportamento Michelia-
no, em que V_{\max} é de 500 $\mu\text{M}/\text{min}$ e o K_M é de 30 mM a 40^o). O
pH "ótimo" é 7,0. Os tradicionais inibidores de enzimas con-
tendo Fe(III), cianeto e azoteto, não afetam esta reação de oxi-
dação, indicando que compostos HRP-I e HRP-II são formados duran-
te o ciclo catalítico da enzima. O tampão fosfato desempenha um
papel importante na manutenção do equilíbrio ceto-enólico do
substrato. A velocidade de consumo de oxigênio aumenta com o
aumento da temperatura numa faixa que vai de 25^oC a 37^oC, sendo
que a partir dessa temperatura, a velocidade tende a diminuir,
possivelmente devido a alterações estruturais no sítio ativo da
enzima.

A geração enzimática de espécies excitadas
in vitro é muito importante uma vez que abre caminho para a
possibilidade de formação de estados excitados in vivo, nas mui-
tas reações de oxidação em que há a participação de sistemas
peroxidase-oxidase.

Importante também foram as observações ante-
riores de transferência de energia de acetona gerada pelo sis-
tema 2-Metilpropanal/HRP/O₂ para clorpromazina, fitocromo, fla-
vinas e DNA. Podemos então supor que as alterações que ocorrem
com tais componentes celulares poderiam ocorrer in vivo, devido
a processos de transferência de energia de espécies excitadas ge-
radas pelos sistemas peroxidase-oxidase.

O estudo com DNA neste trabalho mostrou que o sistema 2-Metilpropanal/HRP/O₂ não causa destruição do anel guanidínico, ao contrário, induz a formação de regiões de fita simples em que a guanina se encontra mais exposta, provocando o aumento verificado na intensidade de fluorescência do Tb³⁺. Pontes de hidrogênio entre bases nos sítios AT-GC e/ou GC-GC são rompidas, provavelmente devido à formação de adutos de pirimidina. As regiões de fita simples observadas com Tb³⁺ poderiam ser consequência da formação de tais adutos ou de lesões na cadeia açúcar-fosfato.

O fato do efeito Cotton provocado na banda de absorção de acridina laranja ser semelhante ao efeito provocado sobre o complexo por aumento de temperatura, vem confirmar as suposições anteriores levantadas neste trabalho, de que a estrutura do DNA assumiu uma conformação tal qual a verificada por aumento de temperatura, em que ocorrem quebras de pontes de hidrogênio entre as bases.

PROPOSTAS PARA FUTUROS ESTUDOS

Nossos resultados sobre fluorescência de AL e PF ligada ao DNA, na ausência de prata, não mostraram nenhuma alteração causada ao DNA pelo sistema 2-MP/HRP/O₂. Somente pudemos detectar alguma variação quando usamos proflavina na presença de prata. Contudo, tem-se sugerido o uso da fluorescência de AL em estudos com DNA irradiado (163) o invés de tempo de meia vida de AL, para determinar a porcentagem de regiões de fita simples em DNA, uma vez que o método de fluorescência exige a manipulação de aparelhagem menos sofisticadas que a empregada para o cálculo do tempo de meia vida. Podemos então, supor que o método de fluorescência com AL proposto acima, não seria muito útil para detectar pequenas alterações como as supostamente causadas pelo sistema 2-MP/HRP/O₂ sobre o DNA.

Contudo, pudemos detectar alterações no DNA com o uso de Íon prata. Por isso, acreditamos que um estudo com todos os corantes relacionados com acridina e brometo de etídio, juntamente com os Íons prata e mercúrio poderiam nos fornecer resultados adicionais que nos levariam a uma conclusão sobre qual o efeito específico causado pelo sistema enzimático sobre o DNA.

APÊNDICE I

Propriedades da enzima peroxidase de rabanete (HRP)

A peroxidase de rabanete pertence ao grupo das heme-enzimas que incluem a catalase e citocromos. Tais heme-enzimas caracterizam-se por possuir um anel porfirínico, a protoporfirina IX, que tem o Fe-III mantido por quatro ligações de coordenação. Na HRP, a quinta posição do ferro é ocupada por um grupo imidazólico de um resíduo de histidina aqui representado por BH^+ e a sexta posição está ocupada por uma molécula de H_2O (Figura I.1).

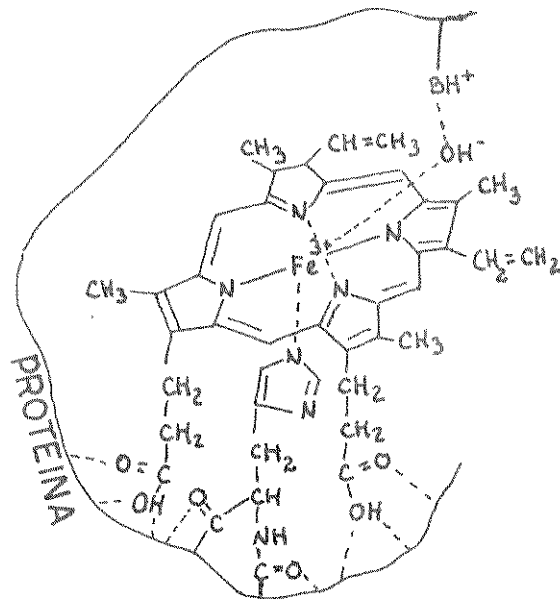
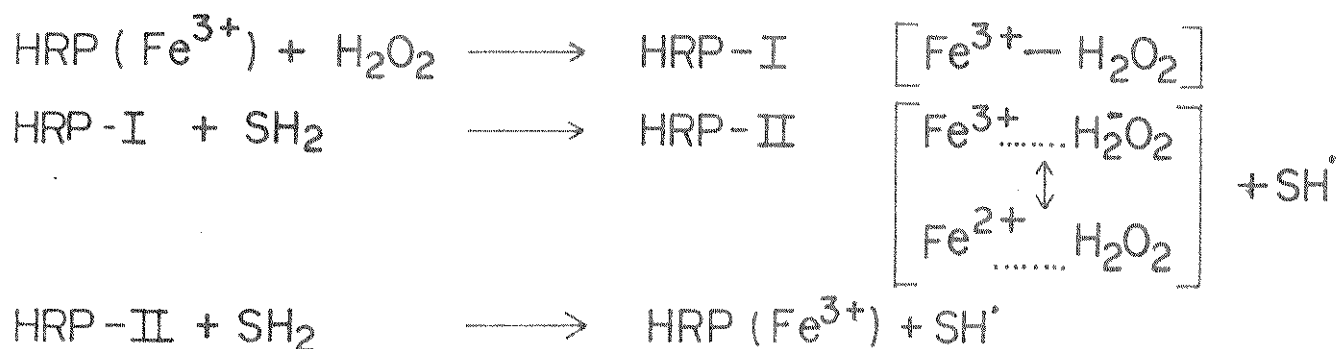


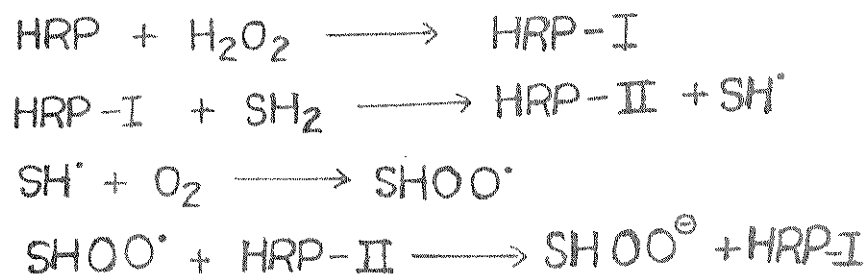
FIGURA I.1. Interação do heme com os grupos da proteína em peroxidase.

Essa enzima possui duas funções. A função peroxidática na qual a enzima utiliza H_2O_2 para catalisar a oxidação do substrato (SH_2). O ciclo enzimático é o seguinte (Esquema I).



ESQUEMA I

A outra função seria a de uma oxidase, em que há a incorporação de dois átomos de oxigênio na molécula do substrato. Contudo, traços de H_2O_2 ($\sim 10^{-9}M$) são necessários para iniciar a reação, formando-se também HRP-I e HRP-II durante tal ciclo catalítico (Esquema II). Por isso quando usamos a notação peroxidase (oxidase), na verdade estamos nos referindo à função da HRP como uma oxidase.



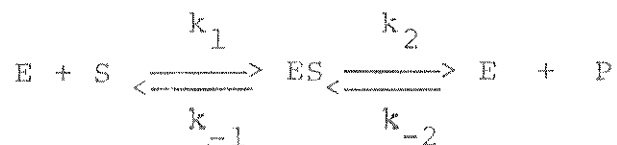
ESQUEMA II

APÊNDICE II

Abordagem cinética. A equação de Michaelis-Menten

A diferença existente entre a maioria das reações químicas e aquelas catalisadas por enzima, reside no fato de que estas últimas apresentam o fenômeno da saturação com o substrato.

Em 1913, L. Michaelis e M.L. Menten, desenvolveram uma teoria de ação enzimática e cinética que foi mais tarde ampliada por G.E. Briggs e J.B.S. Haldane, que se tornou fundamental para a análise quantitativa de todos os aspectos de cinética enzimática e inibição. O mecanismo consiste na formação de um complexo enzima-substrato (ES) que se decompõe originando os produtos (P) em uma função que limita a velocidade, assim:



Em termos experimentais podemos chegar a tal equação, da seguinte maneira, ao medirmos a velocidade inicial (v_0) de uma reação simples $S \rightarrow P$ quando esta é catalisada por uma dada concentração de enzima ($|e_0|$) sob condições constantes de reação, verificaremos que v_0 varia com a concentração do substrato $|S|$. Quando os valores medidos de v_0 são traçados contra os valores correspondentes de $|S|$ como na Figura II.1, comumente se obtém um gráfico hiperbólico retangular característico que demonstra que, em baixos valores de S, a ve-

locidade inicial da reação é diretamente proporcional à concentração de substrato, mas que, em valores maiores de $|S|$, a velocidade inicial é máxima, e seu valor (V_{\max}) é independente da concentração real de substrato, desde que esta esteja saturada em excesso.

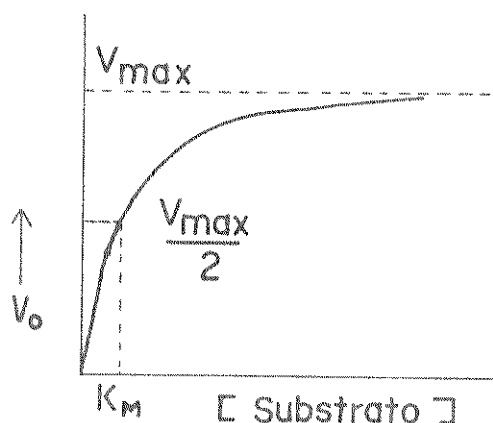


FIGURA II.1. Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima.

Isto significa que:

a) em concentrações muito baixas de substrato, a reação é de 1ª ordem em relação ao substrato:

$$v_0 = k |S|$$

b) em altas concentrações de substrato, v_0 tem valor máximo (V_{\max}) e a reação é de ordem zero em relação ao substrato,

$$V_{\max} \text{ é independente de } |S|,$$

desde que $|S|$ seja suficientemente alta.

Estas equações simples de velocidade inicial somente definem o comportamento da reação nos extremos do intervalo de concentração de substrato empregadas na Figura

II.1, mas, nesta mesma figura, vemos que, quando traçamos o gráfico de valores medidos de v_o contra $|S|$, obteremos uma hipérbola retangular para este propósito, podemos escrever sob a forma

$$v_o = \frac{a |S|}{|S| + b},$$

onde a e b são constantes.

Aplicando esta equação ao gráfico experimental, verificaremos que a é igual à velocidade máxima (V_{max}) e b é a concentração de substrato na qual a reação se processa a uma velocidade igual à metade da velocidade máxima inicial (esta é geralmente simbolizada por K_M). Assim, a equação experimentalmente derivada e que relaciona v_o com $|S|$ é normalmente escrita como:

$$v_o = \frac{V_{max} |S|}{|S| + K_M}$$

Esta é conhecida como a equação de Michaelis-Menten e a constante K_M é chamada de constante de Michaelis. Por definição, $K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$. Quando $k_2 \ll k_{-1}$, $K_M = K_S$ (Constante de dissociação do complexo ES). Nesse sentido, K_M representa a afinidade da enzima pelo substrato. K_M 's altos significam pouca afinidade. Evidentemente, embora K_M seja um parâmetro cinético experimentalmente mensurável, seu valor somente pode ser interpretado em termos de constantes de velocidade que podem intervir, se o mecanismo de reação é conhecido.

A equação de Lineweaver-Burk nada mais é do que uma transformação da equação de Michaelis-Menten, sendo útil na obtenção de gráficos dos dados experimentais.

Quando $\frac{1}{v_0}$ é colocado em um gráfico contra $1/|S|$ obtém-se uma linha reta. Essa linha reta terá uma inclinação de K_M/V_{max} ; a interseção será $1/V_{max}$ no eixo $1/v_0$ e uma intercepção de $-1/K_M$ no eixo de $1/|S|$ (Figura II.2). Esse gráfico duplo-recíproco tem a vantagem de permitir uma determinação muito mais exata de V_{max} que pode somente ser obtida como um valor limite para concentrações infinitamente elevadas de substrato a partir de um gráfico simples de v_0 contra $|S|$, como vimos na Figura 2.

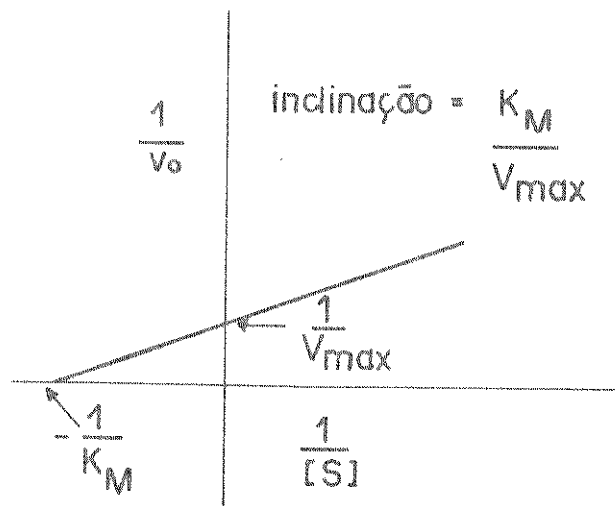


FIGURA II.2 Um gráfico duplo-recíproco (Lineweaver-Burk).

Embora a linha hiperbólica entre v_0 e $|S|$ na Figura II.1 seja para uma reação de um só substrato, um gráfico semelhante é obtido para uma reação de muitos substratos em que se varia a concentração de um só substrato enquanto as concentrações dos outros são mantidas constantes.

APÊNDICE III

Determinação da energia de ativação (E_a)

A energia de ativação de uma reação enzimática corresponde à barreira energética que as moléculas do substrato devem romper, passando por um complexo ativado ($ES...EP$)[‡] antes de formar os produtos e regenerar a enzima (Figura III.1). Por definição $E_a = \Delta H + RT$.

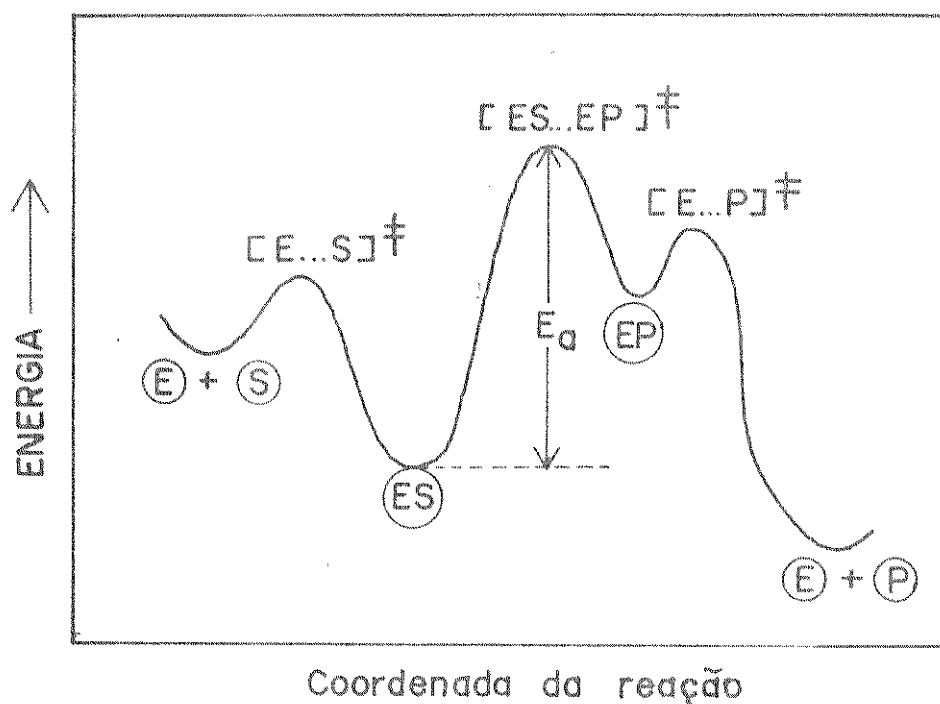
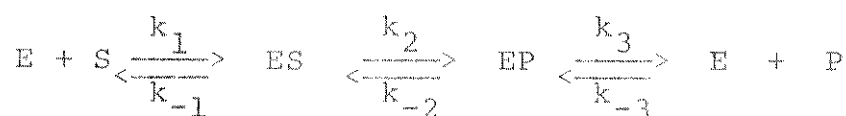


FIGURA III.1 Provável perfil de entalpia para a reação catalisada por enzima.

Suponhamos que a reação enzimática possua o seguinte mecanismo, no qual k_2 é muito menor que k_1 ou k_3 e k_{-2} é igualmente muito menor que k_{-3} ou k_{-1} .



A temperatura afeta a velocidade de decomposição de ES, provocando variação no valor de k_2 . Assim é possível estudar especificamente o efeito da variação de temperatura sobre a velocidade deste segundo passo, visto que em concentrações saturantes de substrato, quando ES é igual a e_0 , $v_0 = V_{\max} = k_2 e_0$. Pode-se calcular, assim o valor aproximado para E_a a partir dos valores de V_{\max} a duas temperaturas (V''_{\max} e V'_{\max} correspondem às temperaturas T_2 e T_1 , respectivamente), como previsto pela equação de Arrhenius:

$$\log \frac{V''_{\max}}{V'_{\max}} = \log \frac{k''_2 e_0}{k'_2 e_0} = \log \frac{k''_2}{k'_2} = \frac{E_a (T_2 - T_1)}{4,576 \cdot T_1 \cdot T_2}$$

Um valor mais exato é obtido traçando-se $\log V_{\max}$ contra $1/T$ e medindo a inclinação da linha reta obtida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. J. Stauff e P. Bartolmes, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 9, 307 (1970).
2. J.G. Calvert e J.N. Pitts (Eds.), "Photochemistry", Wiley, N.Y. (1966).
3. E.H. White, J.D. Miano, C.J. Watking e E.J. Breaux, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 13, 229 (1974).
4. R.F. Vassilev, *Prog. React. Kinet.*, 4, 305 (1967).
5. J.A. Howard e K.U. Ingold, *J. Amer. Chem. Soc.*, 90, 1056 (1968).
6. R.E. Kellog, *J. Amer. Chem. Soc.*, 91, 5433 (1969).
7. K.R. Kopecky e C. Monford, *Can. J. Chem.*, 47, 709 (1969).
8. F. McCapra, *Chem. Commun.*, 155 (1968).
9. W.H. Richardson, M.B. Yelvington e H.E. O'Neal, *J. Amer. Chem. Soc.*, 94, 1619 (1972).
10. J-y Koo e G.B. Schuster, *J. Amer. Chem. Soc.*, 99, 6107 (1977).
11. S.P. Schmidt e G.B. Schuster, *J. Amer. Chem. Soc.*, 100, 1966 (1978).
12. Y. Sawaki e Y. Ogata, *J. Org. Chem.*, 42, 40 (1977).
13. Y. Sawaki e Y. Ogata, *J. Amer. Chem. Soc.*, 99, 5412 (1977).
14. Y. Sawaki e Y. Ogata, *J. Amer. Chem. Soc.*, 99, 6313 (1977).
15. A. Terenin e V. Ermolev, *Trans. Faraday Soc.*, 52, 1042 (1956).

16. E.H. Gilmore, G.E. Gibson e D.S. McClure, *J. Chem. Phys.*, 20, 829 (1952).
17. G.S. Hammond e W.M. Moore, *J. Amer. Chem. Soc.*, 81, 6334 (1959).
18. G.S. Hammond, P.A. Leermakers e A. Fischer, *J. Amer. Chem. Soc.*, 83, 4674 (1961).
19. A.A. Lamola, *Photochem. Photobiol.*, 9, 291 (1969).
20. R. Ben-Ishai, E. Ben-Hurand e Y. Hornfeld, Israël *J. Chem.* 6, 769 (1968).
21. H.D. Mennigmann e A. Wacker, *Photochem. Photobiol.*, 11, 291 (1970).
22. M. Charlier e C. Hêlene, *Photochem. Photobiol.*, 6, 501 (1967).
23. C.L. Greenstock e H.E. Johns, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 30, 21 (1968).
24. M. Charlier, C. Hêlene e M. Dourlent, *J. Chim. Phys.*, 66, 700 (1969).
25. A.A. Lamola e T. Yamane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 58, 443 (1967).
26. C. Hêlene e M. Charlier, *Biochimie*, 60, 1111 (1978).
27. J.W. Hastings, *Curr. Top. Bioenerg.*, 1, 113 (1966).
28. J.W. Hastings, "Energy transformations in Biological Systems", *CIBA Foundation Symposium*, 31, Elsevier, Amsterdam, p. 125 (1975).
29. J.W. Hastings, *Ann. Rev. Biochem.*, 37, 597 (1968).

30. F.H. Johnson, em "Comprehensive Biochemistry", M. Florkin E.H. Stots (Eds.), p.79 (1967).
31. J.W. Morin e J.W. Hastings, J. Cell. Physiol., 77, 313 (1971).
32. H.H. Seliger e W.D. McElroy, Arch. Biochem. Biophys., 88, 136 (1960).
33. T.H. Hopkins, H.H. Seliger, E.H. White e M.W. Cass, J.Amer. Chem. Soc., 89, 7148 (1967).
34. Y. Kishi, T. Goto, S. Inone, S. Sugiura e H. Kishimoto, Tetrahedron Lett., 3445 (1966).
35. K. Hori, J.C. Wampler, J.C. Matthews e M.J. Cormier, Biochemistry, 12, 4463 (1973).
36. F. McCapra e R. Wrigglesworth, J.Chem. Soc. Commun., 91, (1969).
37. F. McCapra, Photochemistry, 3, 611 (1970).
38. H.R. Gersmann e A.H. Bickel, J. Chem. Soc. (B), 2230 (1971),
39. M. DeLuca e M.E. Dempsey, Biochem. Biophys. Res. Commun., 40, 117 (1970).
40. M. DeLuca, M.E. Dempsey, K. Hori, J.E. Wampler e M.J. Cormier, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68, 1658 (1971).
41. O. Shimomura e F.H. Johnson, Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 340 (1971).
42. O. Shimomura, T. Goto e F.H. Johnson, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74; 2799 (1977).
43. O. Shimomura e F.H. Johnson, Photochem. Photobiol., 30, 89 (1979).

44. E.H. White e C.C. Wei, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39, 1219 (1970).
45. E.F. Ullman, *Chem. Abstr.*, 78, 3585r PAT. US 3689.
46. A.A. Lamola, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43, 893 (1971).
47. G. Cilento, *Quart. Rev. Biophys.*, 6, 485 (1973).
48. G. Cilento, M. Nakano, H. Fukuyama, K. Suwa e I. Kamiya, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58, 296 (1974).
49. C.C.C. Vidigal e G. Cilento, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 62, 184 (1975).
50. K. Zinner, N. Durán, C.C.C. Vidigal, Y. Shimizu e G. Cilento, *Arch. Biochem. Biophys.*, 173, 58 (1976).
51. M.J. Cormier e J.R. Totter, *Ann. Rev. Biochem.*, 33, 431 (1964).
52. E. Wong e J.M. Wilson, *Phytochemistry*, 15, 1325 (1976).
53. G. Cilento, *Acc. Chem. Res.*, 13, 225 (1980).
54. G. Cilento, *Photochem. Photobiol. Rev.*, 5, 199 (1980).
55. R.O. Martin e P.K. Stumpf, *J. Biol. Chem.*, 234, 2548 (1959).
56. W.E. Shine e P.K. Stumpf, *Arch. Biochem. Biophys.*, 162, 147 (1974).
57. T. Galliard e J.A. Matthew, *Phytochemistry*, 16, 339 (1977).
58. T. Galliard e J.A. Matthew, *Biochim. Biophys. Acta*, 424, 26 (1976).
59. O. Augusto e G. Cilento, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 79, 1238 (1977).
60. J.E. Wampler, K. Hori, J.W. Lee e M.J. Cormier, *Biochemistry*, 10, 20903 (1971).

61. H.H. Seliger e W.D. McElroy, Arch. Biochem. Biophys., 88, 136 (1960).
62. R.L. Airth e G.E. Forster, J. Cell Comp. Physiol., 56, 173 (1960).
63. J.W. Hastings e T. Wilson, Photochem. Photobiol., 23, 461 (1976).
64. V.C. Bode e J.W. Hastings, Arch. Biochem. Biophys., 103, 488 (1963).
65. W.D. McElroy e C.S. Rainwater, J. Cell. Comp. Physiol., 32, 421 (1948).
66. J.W. Hastings, W.H. Riley e L. Massa, J. Biol. Chem., 24, 1473 (1975).
67. J.W. Hastings, M. Vergin e R. Desa, em "Bioluminescence in Progress", F.H. Johnson e Y. Haneda (Eds.), Princeton Univ. Press, p. 301 (1966).
68. J.W. Hastings e J.G. Morin, Biol. Bull., 137, 402 (1963).
69. O. Shimomura e F.H. Johnson, Nature, 256, 236 (1975).
70. G. Cilento, J. Theor. Biol., 55, 471 (1975).
71. N. Durán, M. Haun e J.E. Brunet, Rev. LatinoAmer. Quim., 12, 1 (1981).
72. R. Meneghini, M.E. Hoffmann, N. Durán, A. Faljoni e G. Cilento, Biochim. Biophys. Acta, 518, 177 (1978).
73. R.O. Rahn, L.C. Landry e W.L. Carrier, Photochem. Photobiol., 19, 75 (1974).
74. D. Lenov, J. Salomon e D. Elad, Photochem. Photobiol., 17, 465 (1973).

75. D. Elad, em "Aging Carcinogenesis and Radiation Biology", K. C. Smith (Ed.), Plenum Press, N.Y., p. 263 (1976).
76. G.R. Banks, D.M. Brown, D.G. Streeter e L. Grossman, J.Mol. Biol., 60, 425 (1971).
77. K.C. Smith (Ed.), "Aging Carcinogenesis and Radiation Biology", Plenum Press, N.Y. (1976).
78. G. Sholes, em "Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids", S.Y. Wang (Ed.), vol. I, Academic Press, N.Y., p. 251 (1976).
79. M.H. Patrick e R.O. Rahn, em Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids", S.Y. Wang (Ed.), vol. II, Academic Press, N.Y., p. 35 (1976).
80. C.D. Town, K.C. Smith e H.S. Kaplan, Curr. Topics Radiat. Res. Quart., 8, 351 (1973).
81. M. Tyrrell, R.D. Ley e R.B. Webb, Photochem. Photobiol., 20, 395 (1974).
82. S. Udenfriend e P. Zaltzman, Anal. Biochem., 3, 49 (1962).
83. E. Walaas, Acta Chem. Scand., 17, 461 (1963).
84. H.C. Borresen, Acta Chem. Scand., 17, 921 (1963).
85. D.P. Ringer, B.A. Howell e D.E. Kizer, Anal. Biochem. 103, 337 (1980).
86. C. Formoso, Biochem. Biophys. Res. Commun., 53, 1084 (1973).
87. M.S. Kayne e M. Cohn, Biochemistry, 13, 4159 (1974).
88. T.D. Barela, S. Burchett e D.E. Kizer, Biochemistry, 14, 4887 (1975).
89. G. Yonuschot e G.W. Mushrush, Biochemistry, 14, 1677 (1975).

90. D.P. Ringer, S. Burchett e D.E. Kizer, *Biochemistry*, 17, 4818 (1980).
91. A.R. Peacocke, em "Acridines", R.M. Acheson (Ed.), 2 ed., Interscience, N.Y., p. 723 (1973).
92. C.R. Cantor e T. Tao, em "Procedures in Nucleic Acids Research", G.L. Cantoni e D.R. Davies (Eds.), vol. 2, Harper & Row, N.Y., p. 31 (1971).
93. E.R. Lochmann e A. Miceheler, em "Physico-Chemical Properties of Nucleic Acids", J. Duchesne (Ed.), vol. 1, Academic Press, N.Y., p. 223 (1973).
94. L.S. Lerman, *J. Mol. Biol.*, 3, 18 (1961).
95. G. Weill, *Biopolymers*, 3, 567 (1965).
96. Y. Kubota, *Chem. Lett.*, 299 (1973).
97. J.P. Schreiber e M.P. Daune, *J. Mol. Biol.*, 38, 487 (1974).
98. J.C. Thomes, G. Weill e M.P. Daune, *Biopolymers*, 8, 647 (1969).
99. N.F. Ellerton e I. Isemberg, *Biopolymers*, 8, 767 (1969).
100. L.M. Chan e J.A. McCarter, *Biochim. Biophys. Acta*, 204, 252 (1970).
101. S. Georghiou, *Photochem. Photobiol.*, 22, 103 (1975).
102. R.K. Tubbs, W.E. Ditmars e Q. van Winkle, *J. Mol. Biol.*, 9, 545 (1964).
103. L.M. Chan e Q. van Winkle, *J. Mol. Biol.*, 40, 491 (1969).
104. B. Weisblum e P.-L. de Haseth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69, 629 (1972).
105. U. Pachmann e R. Rigler, *Exp. Cell. Res.*, 72, 602 (1972).

106. S.A. Latt, S. Brodie e S.H. Munroe, *Chromosoma*, 49, 17 (1974).
107. G. Weill e M. Calvin, *Biopolymers*, 1, 401 (1963).
108. E. Fredericq, C. Houssier, *Biopolymers*, 11, 2281 (1972).
109. T. Prusik, T. Kolubayev, M.J. Morelli e H.C. Brenner, *Photochem. Photobiol.*, 31, 315 (1979).
110. M. Jensen e N. Davidson, *Biopolymers*, 4, 17 (1966).
111. S. Katz, *Biochim. Biophys. Acta*, 68, 240 (1963).
112. S. Aktipis e W. Martz, *Fed. Proc.*, 28, 833 (1969).
113. N. Davidson, J. Widholm, U.S. Nandi, R. Jensen, E.M. Oliveira e J.C. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 53, 111 (1965).
114. J.R. Fresco, *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 21, 653 (1959).
115. C. Cohen, *Nature*, 175, 129 (1955).
116. P. Doty, *Rev. Modern. Phys.*, 31, 107 (1959).
117. K.U. Linderstrom-Lang e J.A. Schellman, (Eds.), "The Enzymes", vol. 1, Academic Press, N.Y., p. 477 (1959).
118. N.S. Simmons e E.R. Blout, *Biophys. J.*, n° 1, 55 (1960).
119. H. Lang e G. Luck, *Photochem. Photobiol.*, 17, 387 (1973).
120. H. Lang, *Stud. Biophys.*, 42, 157 (1974).
121. D. Porschke, *J. Amer. Chem. Soc.*, 95, 8440 (1973).
122. D. Porschke, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 2683 (1973),
123. A.A. Lamola, *Photochem. Photobiol.*, 9, 291 (1969).
124. H. Lang, *Nucleic Acids Res.*, 2, 179 (1975).
125. L. Stryer e E. Blout, *J. Amer. Chem. Soc.*, 83, 1411 (1961).
126. D.M. Neville Jr. e D.F. Bradley, *Biochim. Biophys. Acta*, 50, 397 (1961).

127. A. Blake e A.R. Peacocke, *Nature*, 206, 1009 (1965).
128. A. Blake e A.R. Peacocke, *Biopolymers*, 4, 1091 (1966).
129. A. Blake e A.R. Peacocke, *Biopolymers*, 5, 383 (1967).
130. A. Blake e A.R. Peacocke, *Biopolymers*, 5, 871 (1967).
131. M. Zama e S. Ichimura, *Biopolymers*, 9, 53 (1970).
132. C.C.V. Vidigal, K. Zinner, N. Durán, E.J.H. Bechara e G. Cilento, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65, 138 (1975).
133. K. Zinner, C.C.C. Vidigal, N. Durán e G. Cilento, *Arch. Biochem. Biophys.*, 180, 452 (1977).
134. N. Durán, K. Zinner, C.C.C. Vidigal e G. Cilento, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 74, 1146 (1977).
135. J.M. Wilson e E. Wong, *Phytochemistry*, 15, 1333 (1976).
136. N. Durán, O.M.M. Faria Oliveira, M. Haun e G. Cilento, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 442 (1977).
137. O.M.M. Faria Oliveira, M. Haun, N. Durán, P.J. O'Brien, C. R. O'Brien, E.J.H. Bechara e G. Cilento, *J. Biol. Chem.*, 253, 4707 (1978).
138. E.J.H. Bechara, O.M.M. Faria Oliveira, N. Durán, R.C. de Baptista e G. Cilento, *Photochem. Photobiol.*, 30, 101 (1979).
139. R.H. Kenten, *Biochem. J.*, 55, 350 (1953).
140. G. Cilento, N. Durán, K. Zinner, C.C.C. Vidigal, O.M.M. Faria Oliveira, M. Haun, A. Faljoni, O. Augusto, R. Casadei de Baptista e E.J.H. Bechara, *Photochem. Photobiol.*, 28, 445 (1978).

141. A. Faljoni, M. Haun, M.E. Hoffmann, R. Meneghini, N. Durán e G. Cilento, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80, 490 (1978).
142. G. Gomori, Em "Methods in Enzymology", S.P. Colowick e N. O. Kaplan (Eds.), Academic Press, N.Y., vol., p.138 (1955).
143. G.R. Schonbaum e S. Lo, *J. Biol. Chem.*, 247, 3353 (1972).
144. S. Ichimura, M. Zama, H. Fujita e T. Ito, *Biochim. Biophys. Acta*, 190, 116 (1969).
145. R.W. Armstrong, T. Kurucsev e U.P. Strauss, *J. Amer. Chem. Soc.*, 92, 3179 (1970).
146. R. Prados, L.G. Stadtherr, H. Donatato e R.B. Martin, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 36, 689 (1974).
147. T. Prusik, T. Kolubayev, M.J. Morelli e H.C. Brenner, *Photochem. Photobiol.*, 31, 315 (1980).
148. B.N. Ames e D.T. Dubin, *J. Biol. Chem.*, 235, 769 (1970).
149. B.F. Rordorf e D.R. Kerns, *Biopolymers*, 15, 1491 (1976).
150. J. Marmur, *J. Mol. Biol.*, 3, 208 (1961).
151. K.H. Horn, J-y Koo e S.P. Schmidt, *Mol. Photochem.*, 9, 1 (1979).
152. B.C. Saunders, A.G. Holmes-Sielle e B.P. Stark (Eds.), "Proxidase", Butterworth Co. LTD, London, p.8 (1964).
153. N.N. Ugarova e O.V. Lebedeva, *Biokimiya*, 43(10), 1731 (1978).
154. D.W. Smith e R.J.P. Williams, *Struct. Bend.*, 7, 1 (1970).
155. M.L. Cotton, H.B. Dunford e J.M.T. Raycheba, *Can. J. Biochem.*, 51, 627 (1973).

156. O.M.M. Faria de Oliveira, Tese de Doutorado apresentada à Universidade de São Paulo, 1978.
157. P.R. Rony, J. Amer. Chem. Soc., 91, 6090 (1969).
158. W.P. Jencks (Ed.), "Catalysis in Chemistry and Enzymology", McGraw Hill, New York, p. 215 (1969).
159. J. Spaulding, J.E. Stein e J.E. Meany, J. Phys. Chem., 81, 1359 (1977).
160. O. Shimomura, F.H. Johnson, Y. Kohana, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2086 (1972).
161. R.O. Rahn, L.C. Landry e W.L. Carrier, Photochem. Photobiol., 19, 75 (1974).
162. W. Hauswirth e S.Y. Wang, Biochem. Biophys. Res. Commun., 51(3), 819 (1973).
163. R.O. Rahn e M.H. Patrick, em "Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids", Shih Yi Wang (Ed.), vol. II, Academic Press, N.Y., p. 119 (1976).

ATIVIDADES DURANTE A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS

1. L.A. Guillo e N. Durán, "Estudos em Fotobioquímica: Cinética enzimática do sistema 2-metilpropanal/peroxidase/ H_2O_2 ", IX Reunião Anual da SBBq, Abril 1980, Caxambú, MG.
2. L.A. Guillo e N. Durán, "Estudos conformacionais de DNA utilizando-se sondas de fluorescência", 2º Encontro Regional de Química, SBQ, Novembro 1980, Araraquara, SP.
3. L.A. Guillo, S.T.F. Furtado, J.E. Brunet, E. Garces e N. Durán, "Estudos cinéticos de reações catalisadas pela peroxidase em substratos com grupos-CH-ativados", V Congresso Anual da SBBq, Dezembro 1980, São Paulo, SP.
4. L.A. Guillo e N. Durán, "DNA modifications by bioenergized molecules generated by peroxidase" XIV Congresso Latino Americano de Química, Fevereiro de 1981, San Jose de Costa Rica, Costa Rica.
5. L.A. Guillo e N. Durán, "Efeitos de acetona triplete bioenergizada no DNA", X Reunião Anual da SBBq, Abril 1981, Caxambú, MG.
6. S.T.F. Furtado, L.A. Guillo e N. Durán, "Estudos em Fotobioquímica: Efeitos de oxigênio singlete bioenergizado no DNA", X Reunião Anual da SBBq, Abril 1981, Caxambú, MG.

7. L.A. Guillo e N. Durán, "Acridina laranja na detecção de mudanças no DNA", XXXIII Reunião Anual da SBPC, Julho 1981, Salvador, BA.
8. L.A. Guillo e N. Durán, "Single strand breaks in DNA induced by bioenergized process. A fluorescent probe method". VII Congresso Internacional de Biofísica e III Congresso Pan-Americano de Bioquímica, Agosto 1981, Cidade do México, México.
9. L.A. Guillo e N. Durán, "Alterações em DNA: Detecção por fluorescência", III Encontro Regional da SBQ, Outubro 1981, Ribeirão Preto, SP.
10. N. Durán e L.A. Guillo, "Estudos cinéticos da oxidação de 2-metilpropanal", I Conferência de Físico Química Orgânica, Março 1982, Florianópolis, SC.
11. L.A. Guillo e N. Durán, "Estudos com DNA após interação com acetona bioenergizada", XI Reunião Anual da SBBq, Abril 1982, Caxambú, MG.

PUBLICAÇÕES

1. L.A. Guillo e N. Durán, "Cinética enzimática do sistema 2-metilpropanal/peroxidase/O₂", Arq. Biol. Tecnol. (Brasil), 23, 165 (1980) (Res.).
2. L.A. Guillo e N. Durán, "Estudos conformacionais de DNA utilizando sondas de fluorescência", Química Nova, 4, (1981) (Res.).

3. L.A. Guillo, S.T. Farias-Furtado, J.E. Brunet, E. Garces e N. Durán, "Kinetic study of Peroxidase-catalyzed reactions of substrats with actived -CH- groups", Brazilian J. Med. Biol. Res., 14, 220 (1981) (Res.)
4. L.A. Guillo e N. Durán, "Estudos em Fotobioquímica: Efeitos de acetona triplete bioenergizada no DNA", Arq. Biol. Tecnol. (Brasil), 24, 84 (1981) (Res.).
5. S.T. Farias-Furtado, L.A. Guillo e N. Durán, "Estudos em Fotobioquímica: Efeitos de oxigênio singlete bioenergizado no DNA", Arq. Biol. Tecnol. (Brasil), 24, 84 (1981) (Res.).
6. L.A. Guillo e N. Durán, "Uso de acridina laranja na detecção de mudanças no DNA", Ciência e Cultura, 33, 785 (1981) (Res.).
7. L.A. Guillo, E. Garces e N. Durán, "Oxidation of 2-methyl propanal by Horseradish peroxidase. Involvement of hydrogen peroxide in the reaction mechanism". Submetido à Biochim. Biophys. Acta.
8. L.A. Guillo, S.M. De Toledo e N. Durán, "DNA modifications caused by bioenergized triplet acetone". Submetido à Nucleic Acids Res.

SEMINÁRIOS NO INSTITUTO DE QUÍMICA - UNICAMP

1. Cinética enzimática de acetona bioenergizada
(Setembro/79)
2. Interação de acetona Foto e Bioenergizada com DNA
(Novembro/79)
3. Estados excitados em sistemas biológicos
(Novembro/79)
4. Ação da radiação UV sobre a estrutura de ácidos nucleicos
(Junho/80)
5. Mudanças no DNA por processos bioenergizados
(Junho/81)