

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

"EFEITOS DE INDOL-3-ALDEÍDO ELETRONICAMENTE
EXCITADO GERADO POR MÉTODO FOTOQUÍMICO E
BIOENERGIZADO SOBRE RNA DE TRANSFERÊNCIA"

Maricilda Palandi de Mello

Orientador: Prof.Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

TESE DE DOUTORADO

CAMPINAS

-1982-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Em memória de minha mãe
Celeste, que, com seu
exemplo, nos ensinou a
enfrentar a vida e ...
... a morte.

Ao meu pai, João Baptista ...

*À Marina, Marisa, Iberê, Diogo
e Margarida ...*

... nosso carinho especial.

"... Não vos conformeis com este mundo, mas transformai-vos pela renovação do vosso entendimento ..."

Rm. 12:2

Ao Prof. Dr. Nelson Durán, pela orientação dinâmica e segura e pela ampla e necessária compreensão dedicada durante a elaboração deste trabalho ...

À Profa. Dra. Marcela Haun, pelo valioso auxílio durante todo trabalho e pela dedicada amizade ...

À Sonia, pela significativa colaboração, apoio e interesse com que acompanhou o desenvolvimento deste trabalho ...

À Profa. Dra. Adelaide Faljoni pelo auxílio na obtenção dos espectros C.D. ...

Ao Prof. Dr. Hiroshi Aoyama, pela disponibilidade em realizar os testes de aminoacilação ...

À Lúcia H. Baptistella, pela solícita colaboração na obtenção do fotoaduto e pela amizade de tantos anos...

À Yoshiko, Lúcia, Lídia, Sandra, Regina, Cristina, Gastão, pelo carinho e por estarem sempre prontos a prestar sua valiosa colaboração ao longo de todo trabalho ...

À Cida e ao Jefferson, pela eficiência e pelo prestimoso auxílio dedicados no decorrer deste trabalho...

À Graça, pelo apoio, incentivo e disponibilidade em todos os momentos ...

Ao Prof. Dr. Fred Fijiwara, pela obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear ...

Ao Yoshiaki Shimizu pela valiosa colaboração na obtenção dos espectros de quimiluminescência ...

À Profa. Dra. Concetta Kasheres pela obtenção dos espectros de massa ...

Ao Prof. Camillo Novello, pela atenção dedicada na liofilização do fotoaduto ...

Ao Prof. Dr. Giuseppe Cilento, por ter prontamente cedido seu laboratório e materiais indispensáveis à realização deste trabalho...

Ao Departamento de Bioquímica da UNICAMP por permitir o uso de sua aparelhagem, facilitando o desenvolvimento deste trabalho ...

À Taka, pelo excelente trabalho de datilografia ...

Ao Sidney, pela dedicação na elaboração dos desenhos ...

Ao CNPq e FAPESP, pela ajuda material ...

A todos aqueles cujo estímulo e colaboração forneceram condições para que o presente trabalho fosse realizado ...

... nosso agradecimento.

ABREVIações UTILIZADAS

Abreviação	Nome
Arg	Arginina
AS	Antraceno-2-sulfonato sódico
CD	dicroísmo circular
d	sinal duplete (RMN)
DABCO	1,4-diazobiciclo(2.2.2)octano
DBAS	9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato sódico
DOPA	L-β-3,4-dihidroxifenilalanina
DPAS	9,10-difenilantraceno-2-sulfonato sódico
<u>E.coli</u>	Escherichia coli
EDTA	ácido etilenodiaminotetra acético
EM	espectro de massa
HRP	peroxidase de rabanete
IAA	ácido indol-3-acético
2- ¹⁴ C-IAA	ácido indol-3-acético marcado no C-2
IAL	indol-3-aldeído
1- ¹⁴ C-IAL	indol-3-aldeído marcado no C-1
IAL*	indol-3-aldeído eletronicamente excitado
³ IAL*	indol-3-aldeído eletronicamente excitado em esta <u>do</u> do triplete
IBAL	2-metilpropanal
IV	infra vermelho
J	constante de acoplamento em hertz
Lys	lisina
m/e	razão massa/carga
¹ O ₂	oxigênio singlete
PAA	fenilacetaldeído
Phe	fenilalanina

Abreviação	Nome
PPA	fenil propanaldeído
RMN	ressonância magnética nuclear
t	sinal triplete (RMN)
TCA	ácido tricloroacético
Thr	treonina
tRNA	ácido ribonucleico de transferência
4-TU	4-tiouridina
Ur	uridina
UV	ultra violeta
Val	valina

SUMÁRIO

A oxidação aeróbica catalisada por peroxidase da auxina, o ácido indol-3-acético, gera indol-3-aldeído em estado eletrônico excitado, provavelmente triplete (π, π^*), com alto rendimento quântico. Esta espécie excitada é caracterizada usando aceptores emissivos apropriados. O indol-3-aldeído triplete é suprimido por oxigênio, com subsequente formação de oxigênio singlete que é responsável por parte da emissão fotônica observada a qual pode ser aniquilada por agentes adequados.

O tRNA aumenta a emissão do sistema ácido indol-3-acético/peroxidase/ O_2 como resultado da transferência de energia do indol-3-aldeído triplete para um grupo 4-tiouridina no ácido nucleico. O indol-3-aldeído triplete se liga covalentemente ao tRNA com uma eficiência que pode atingir 20% do valor teórico, baseando-se na concentração de substrato. A reação, que ocorre com um grupo uridina, é do tipo Paterno-Büchi, formando um aduto oxetânico. Esta ligação é observada tanto no método fotoquímico como no bioenergizado. Os íons Mg^{++} reduzem a ligação, mas aumentam a emissão sensibilizada pelo grupo 4-tiouridina.

Estes resultados apoiam a hipótese de que a formação de indol-3-aldeído triplete possa representar o mecanismo pelo qual o ácido indol-3-acético expressa suas funções biológicas.

ABSTRACT

The horseradish peroxidase catalysed aerobic oxidation of the auxin indole-3-acetic acid generates triplet (π, π^*) indole-3-aldehyde in high yield. This excited species is identified using proper acceptors. The triplet indole-3-aldehyde is quenched by oxygen with formation of singlete oxygen, which is responsible for the observed photon emission and it can be trapped by suitable agents.

tRNA dramatically enhances the emission of indole-3-acetic acid/peroxidase/ O_2 system as a result of energy transfer from triplet indole-3-aldehyde to a 4-thiouridine group in the nucleic acid. Triplet indole-3-aldehyde also covalently adds to tRNA with a efficiency which can reach 20% of the theoretical value based upon the substrate. A Paterno-Büchi, generating an oxetanic adduct. This binding is observed both by photochemical and bioenergized methods. Mg^{++} ions reduce the addition, but enhance the sensitized photon emission from 4-thiouridine group.

These results support the hypothesis that triplet indole-3-aldehyde formation represents a possible mechanism of the biological effects of indole-3-acetic acid.

Í N D I C E

Pág.

RESUMO

ABSTRACT

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
I - ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO	2
I.1 - Biossíntese do IAA	3
I.2 - Passos que Levam Triptofano ao IAA	3
I.2.1 - Ácido Indol-3-Pirúvico como Intermediário	4
I.2.2 - Triptamina como Intermediário	5
I.2.3 - Indol-3-acetaldoxima como Intermediário	5
I.2.4 - Triptofol como Intermediário	6
I.3 - IAA como Regulador do Crescimento de Plantas	7
I.4 - Ação na Parede Celular	8
I.5 - Auxinas e Ácidos Nucleicos	10
I.6 - Natureza do Sítio Receptor e Requisitos Moleculares Para Atividades de Auxina	12
I.7 - Ação do IAA em Animais	13
I.8 - Catabolismo do IAA	13
I.8.1 - Peroxidase de Rabanete (HRP)	15
I.8.2 - Estrutura das Peroxidasas Vegetais	16
a) A Glicoproteína	16
b) Grupo Prostético	17
I.8.3 - Intermediários de Peroxidase Envolvidos na Oxidação do IAA	18
I.8.4 - Produtos de Oxidação de IAA Catalisada por Peroxidasas (HRP).	21

	<u>Pág.</u>
I.8.5 - Mecanismo da Reação IAA/HRP	22
I.8.6 - Formação de Produto em Estado Eletrônico Excitado	24
I.9 - Produção de Oxigênio Singlete ($^1\text{O}_2$) em Sistemas Bio lógicos	30
II - ÁCIDO RIBONUCLEICO DE TRANSFERÊNCIA	32
II.1 - Estrutura	32
II.2 - Função	37
II.3 - Bases Modificadas	40
II.3.1 - Base Y	40
II.3.2 - 4-Tiouridina	41
II.4 - Efeito de Cátions na Conformação de tRNA	42
II.5 - Fotoquímica do tRNA	42
II.5.1 - Transferência de Energia	43
II.5.2 - Reação de Cicloadição	43
a) Dimerização	43
b) Formação de Adutos	44
II.6 - Ação Fotodinâmica	45
III - OBJETIVOS DA TESE	47
CAPÍTULO 2 - PARTE EXPERIMENTAL	48
I.1 - Reagentes	49
I.2 - Aparelhagem	50
II - PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES	53
II.1 - Condições Padrão da Reação IAA/HRP/ O_2	53
II.2 - Solução Tampão	53

	<u>Pág.</u>
II.3 - Solução de Peroxidase	53
II.4 - Soluções de DBAS, DPAS e AS	54
II.5 - Solução de tRNA de <u>E.coli</u>	54
II.6 - Solução de IAA	54
II.7 - Solução de IAl	55
II.8 - Solução de Corantes Xantênicos	55
II.9 - Solução de 4-TU	55
III - MÉTODOS	55
III.1 - Detecção de Produto de Reação	55
III.2 - Síntese de Fotoaduto	56
III.3 - Isolamento e Caracterização do Fotoaduto	56
III.4 - Incorporação Isotópica em tRNA	57
III.5 - Incorporação Isotópica das Bases	57
III.6 - Síntese do (1- ¹⁵ C)-IAL	58
III.7 - Detecção de Produtos de Fotooxigenação da Guano- sina	58
III.8 - Análise dos Nucleotídeos do tRNA	59
III.9 - Aminoacil-tRNA-Sintetase	59
III.10 - Aminoacilação do tRNA	60
IV - CÁLCULOS	60
IV.1 - Elipticidade Molar	60
IV.2 - Obtenção dos Espectros de Quimiluminescência no Contador de Fótons Hamamatsu TV-C-767	60
IV.3 - Rendimento Quântico	61

CAPÍTULO 3 - RESULTADOS	63
I - SISTEMA IAA/HRP/O ₂	64
I.1 - Consumo de Oxigênio	64
I.2 - Formação de Produto	65
I.3 - Emissão Fotônica	66
I.3.1 - Corantes Xantênicos e Compostos Antracênicos	67
I.3.2 - Efeito de Supressores	70
I.3.3 - Comparação com outros Sistemas - Transferência pa ra Hiperacina	70
I.3.3.1 - Sistema IAA/HRP/O ₂ [possível gerador de espécies (π, π^*) e (n, π^*)]	71
I.3.3.2 - Sistema 2-metilpropanal (IBAL/HRP/O ₂ [gerador de espécies (n, π^*)]	71
I.3.3.3 - Sistema Fenilacetaldeído (PAA/HRP/O ₂ [gerador de espécies (π, π^*) e (n, π^*)]	71
I.3.3.4 - Sistema 2-fenilpropanaldeído (PPA/HRP/O ₂) [gerador de espécies (n, π^*) e (π, π^*)]	76
I.2 - Espectro de Quimiluminescência	76
II - FORMAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE NO SISTEMA IAA/HRP/O ₂ .	82
II.1 - Efeito de Supressores Específicos	82
II.2 - Efeito de Aumentadores de Emissão	82
II.3 - Cinética de Estado Estacionário	88
II.4 - Degradação da Guanosina	88
III - SISTEMA IAA/tRNA/HRP/O ₂	94
III.1 - Controles	94

	<u>Pág.</u>
III.2 - Estudo Fotobioquímico	94
III.2.1 - Efeito de Supressão	94
III.2.1.1 - Supressão por tRNA	96
III.2.1.2 - Supressão por Citidina e Uridina	96
III.2.2 - Transferência de Energia	97
III.2.2.1 - Transferência para o tRNA	97
III.2.2.2 - Transferência para a 4-Tiouridina	97
III.2.2.3 - Efeito de íons Mg^{++}	97
III.2.3.- Efeito de Óxido de Deutério	103
III.2.4 - Efeito da Histidina	103
III.2.5 - Transferência de Energia Proveniente de Outros Sistemas	103
III.2.6 - Transferência para tRNA de Levedura	108
III.2.7 - Espectro de Quimiluminescência	108
III.2.8 - Estudos Fotofísicos	108
III.2.9 - Espectro de Dicroísmo Circular (CD) do tRNA ...	112
III.3 - Estudos de Ligação	112
III.3.1 - Ligação IAL-tRNA	112
III.3.2 - Tratamento com Endonucleases	118
III.3.3 - Ligação IAL-Uridina	121
III.4 - Teste de Aminoacilação	121
IV- PRODUTO DE ADIÇÃO FOTOQUÍMICA ENTRE IAL E URIDINA	124
 CAPÍTULO 4 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	 130
I - MECANISMO DE FORMAÇÃO DE IAL ELETRONICAMENTE EXCITADO	131
II - TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA PARA O tRNA E 4-TU	143
III - LIGAÇÃO IAL-tRNA	149

IV - PROJEÇÕES E TRABALHOS EM DESENVOLVIMENTO USANDO O SISTEMA IAA/HRP/O ₂	157
IV.1 - Importância Biológica	157
IV.2 - Transferência de Energia para Sistemas Biológicos Complexos	157
APÊNDICE I	160
APÊNDICE II	170
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

I - ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO

O crescimento de plantas é influenciado por vários fatores externos como força gravitacional (geotropismo) e luz (fototropismo) mas, além disso, na região sensível à luz, o topo do cotiledônio, encontra-se grandes quantidades de uma substância promotora de crescimento chamada auxina(1).

Por muitos anos a identidade química da auxina permaneceu em dúvida, mas por volta dos anos 40 tornou-se claro que a principal auxina na maioria dos tecidos de plantas era uma substância química muito simples, o ácido indol-3-acético (IAA) (fig. I.1).

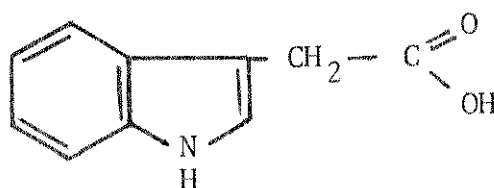


Figura I.1 - ácido indol-3-acético.

A presença de IAA em pequenas quantidades nos tecidos vegetais dificultou sua identificação química e sua quantificação por algum tempo. O IAA pode ser coletado nos tecidos tanto por difusão como por extração com solventes orgânicos como éter etílico ou clorofórmio. A quantidade de IAA no tecido pode ser calculada por medidas químicas ou físicas diretas. Por exemplo, o IAA mostra um máximo de absorção de 280 nm na região ultravioleta do espectro. Assim, um extrato adequadamente purificado de uma planta pode ser testado para verificar a presença de IAA somente determinando-se a altura do pico a 280 nm. IAA também desenvolve cor com vários reagentes, tais como cloreto férrico acidificado (reagente de Salkowski), ou p-dimetilaminobenzaldeído (reagente de Erlich). Estas propriedades podem ser usadas como medida qualitativa e quantitativa da auxina nos tecidos vegetais.

I.1 - Biossíntese do IAA

O triptofano (fig. I.2) devido a sua grande semelhança com o IAA, tem sido considerado o precursor mais provável da auxina, especialmente desde a época em que Thimann (2) demonstrou que cultura de Rhizopus suinus poderiam prontamente formar IAA quando supridos com triptofano. Este aminoácido parece ser de pouca ocorrência em plantas na sua forma livre, assim poucas determinações de seu nível em vegetais têm sido feitas.

Winter (3), Thimann e col. (4) encontraram que tecidos de Aveia não se alongavam quando supridos com triptofano; portanto, concluíram que este não era precursor do IAA neste tecido. Mais tarde, Black e col. (5) mostraram que isto era possível, embora o rendimento de IAA fosse baixo. Provavelmente, o argumento mais forte para a participação do triptofano neste processo tenha sido dado pelo trabalho de Erdmann e col. (6) que mostrou que quando ^{14}C -indol, ^3H -serina e $^{14}\text{C}, ^3\text{H}$ -triptofano ou somente o último foram adicionados a tecidos de ervilha, a razão relativa de marcação ($^3\text{H}/^{14}\text{C}$)-IAA: ($^3\text{H}/^{14}\text{C}$)-triptofano observada quando estes compostos foram extraídos das plantas era a mesma nos dois casos, mostrando que nenhum passo metabólico do indol para o IAA ocorreu.

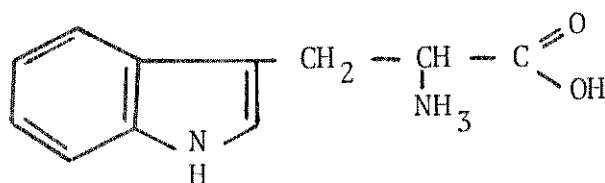


Figura I.2 - Triptofano

I.2 - Passos que Levam Triptofano ao IAA

Se aceitarmos que IAA ocorre em plantas e que seu precursor primário é o triptofano, como é a conversão de um aminoácido para uma auxina? Tem-se proposto 4 passos possíveis para

esta transformação. Os intermediários chave envolvidos nestes passos são: o ácido indol-3-pirúvico, a triptamina, o indol-3-acetaldoxima e o triptofol.

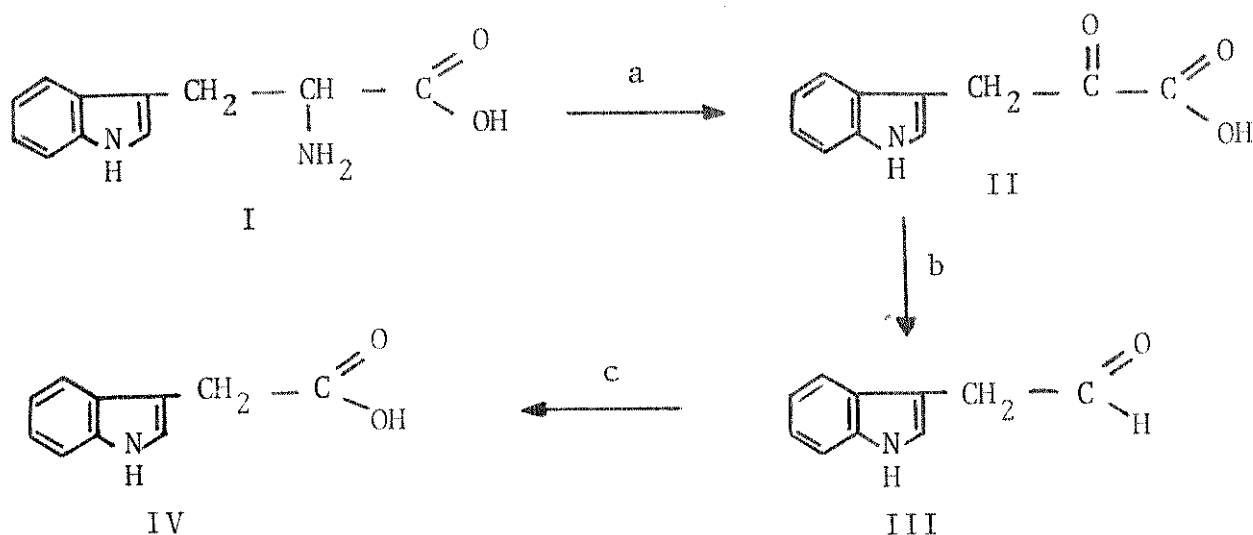
As principais evidências(7) de que cada passo esteja ocorrendo são:

- (a) presença dos intermediários como compostos nativos em plantas;
- (b) atividade biológica dos intermediários;
- (c) interconversão in vivo dos intermediários; e
- (d) isolamento das enzimas que catalisam as reações propostas.

1.2.1 - Ácido Indol-3-Pirúvico como Intermediário

A degradação do triptofano para formar IAA por esse caminho tem também como intermediário o indol-3-acetaldeído. Este último é que tem sido encontrado em tecidos vegetais(8-10), visto que o ácido indol-3-pirúvico é muito instável e não tem sido possível isolá-lo.

O IAA é formado espontaneamente quando o indol-3-acetaldeído é incubado em solução aquosa. A conversão do triptofano a IAA por esse caminho pode ser representada pelo esquema I.



I- Triptofano; II- Ácido indol-3-pirúvico; III- Indol-3-acetaldeído; IV- IAA.

a- Triptofano amino transferase(15)

b- Ácido indol-3-pirúvico descarboxilase(16)

c- Indol-3-acetaldeído desidrogenase ou oxidase(17)

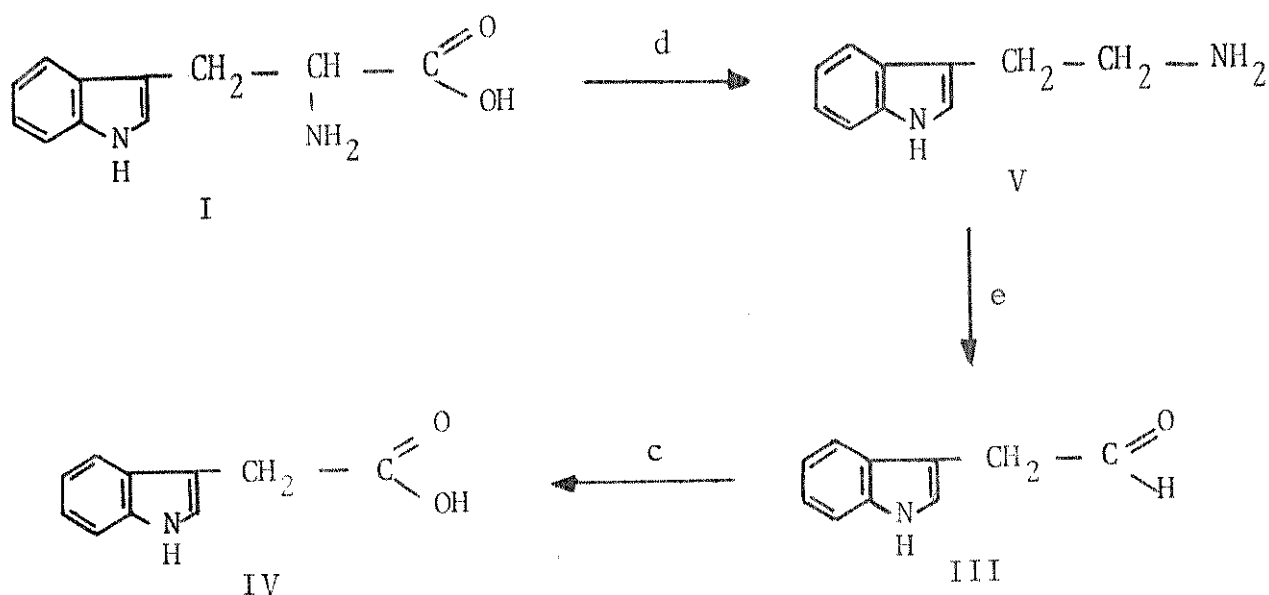
ESQUEMA I

Esta interconversão in vivo tem sido demonstrada em várias espécies como aveia, cevada e tomate(11,12).

1.2.2 - Triptamina como Intermediário

A triptamina foi isolada de Acácia por White(13) e tem sido encontrada em pelo menos 11 outras espécies(14).

Os passos que levam a formação de IAA por intermédio da triptamina são representados no Esquema II.



I, III, IV e c - veja esquema I

V - triptamina

d - triptofano descarboxilase(18)

e - triptamina oxidase(19)

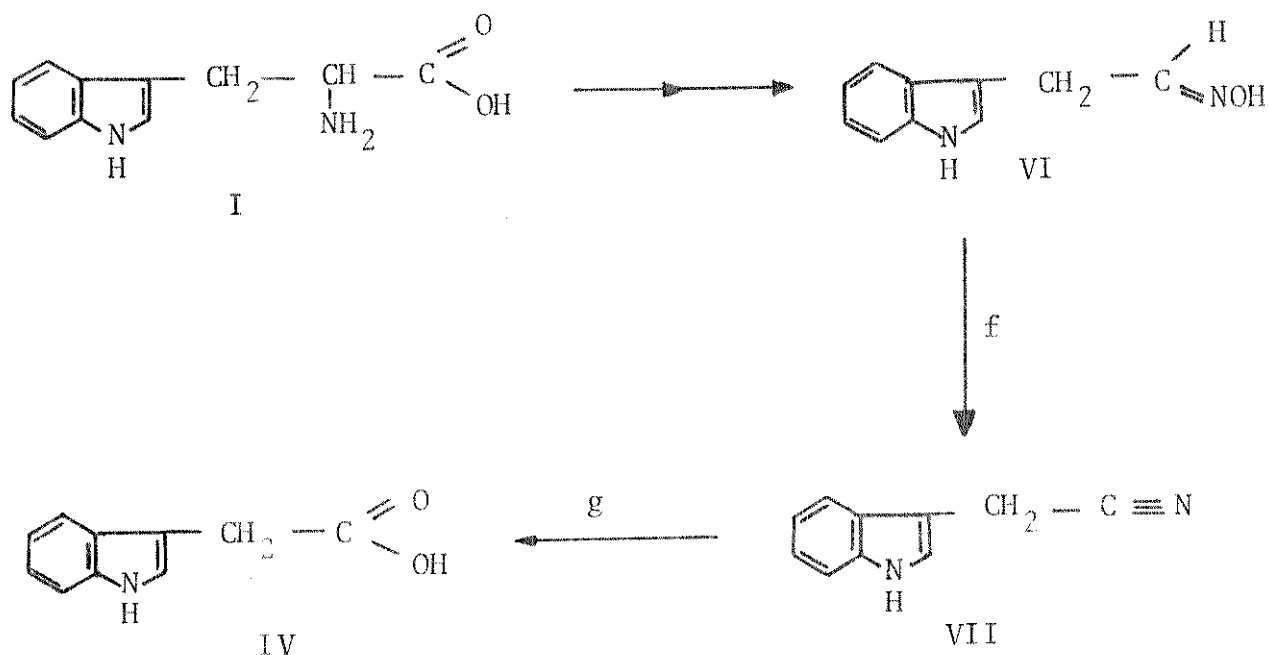
ESQUEMA II

1.2.3 - Indol-3-acetaldoxima como Intermediário

Tem-se encontrado indol-3-acetaldoxima como promotora de crescimento em trigo e ervilha(20). A indol-3-acetonitrila, outro intermediário neste caminho, é muito ativa para promover crescimento em aveia, trigo e milho(21,22). Entretanto, outras espécies mostram pouco crescimento em resposta a estes compostos. Es-

ta falta de atividade deve ser devida à inaptidão destas plantas em converter indol-3-acetonitrila a IAA(22).

O caminho que tem indol-3-acetaldoxima e indol-3-acetonitrila como intermediários está representado no Esquema III.



I e IV - veja esquema I

VI - indol-3-acetaldoxima; VII - indol-3-acetonitrila

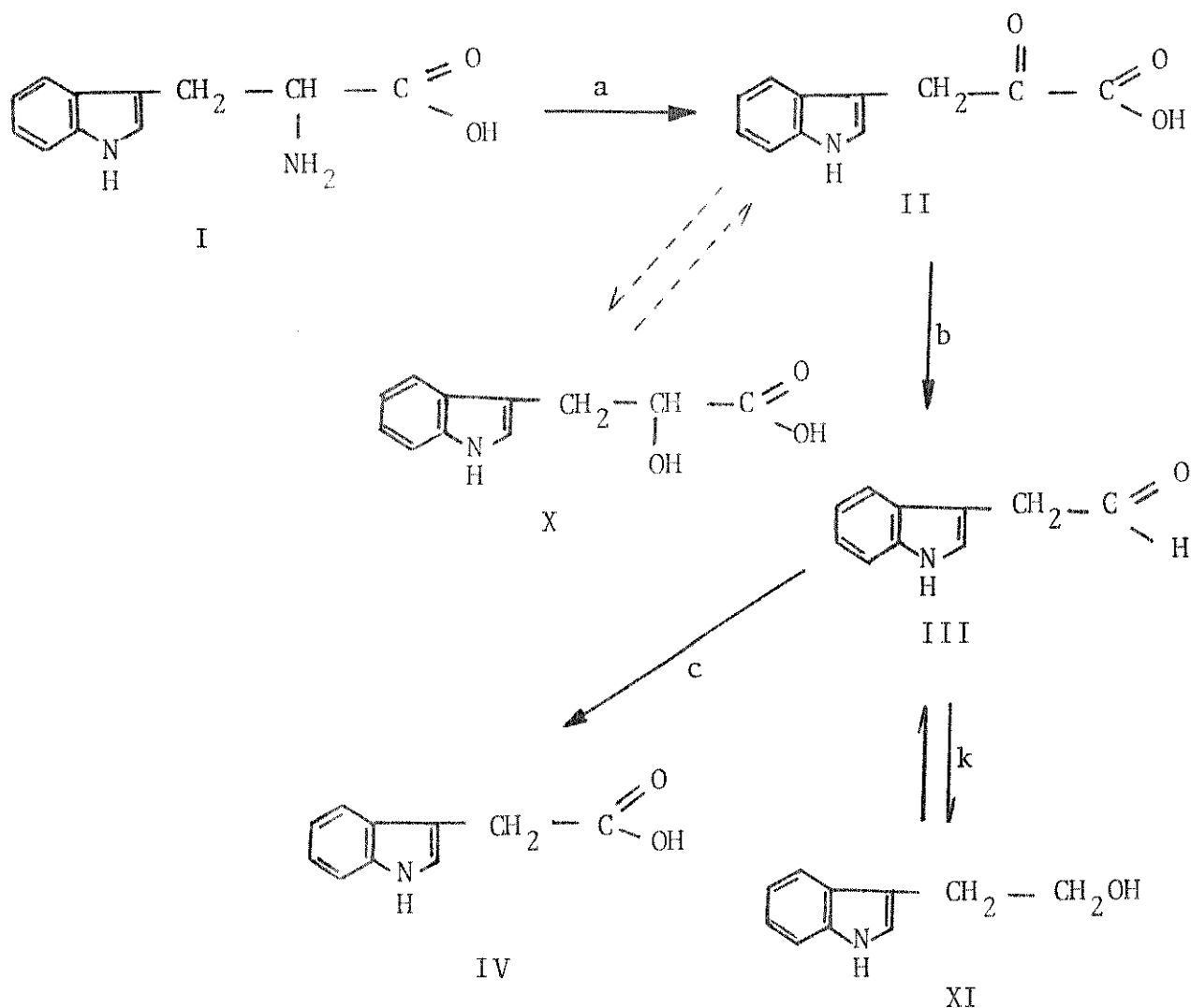
f - indol-3-acetaldoxima hidrolase(23)

g - nitrilase(24).

ESQUEMA III

I.2.4 - Triptofol como Intermediário

Rayle e col.(25) extraíram triptofol de brotos de pepino e obtiveram sua identidade por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. O ácido indol-3-lático, outro intermediário neste processo, tem sido encontrado como composto nativo somente em tomate(14). O esquema IV mostra a formação do IAA via triptofol e ácido indol-3-lático.



I, II, III, IV, a, b, e c - veja esquema I.

X = ácido indol-3-lático; XI - triptofol

k = triptofol desidrogenase ou oxidase(26,27).

ESQUEMA IV

I.3 - IAA como Regulador do Crescimento de Plantas

Uma vez identificado o IAA, um composto facilmente sintetizável, foi inevitável que vários fisiologistas pudessem aplicá-lo em plantas de várias maneiras numa tentativa de entender como ele atua. Tais experimentos têm levado a um número muito grande de efeitos induzidos por auxina e por compostos sintéticos, análogos à auxina em estrutura e função.

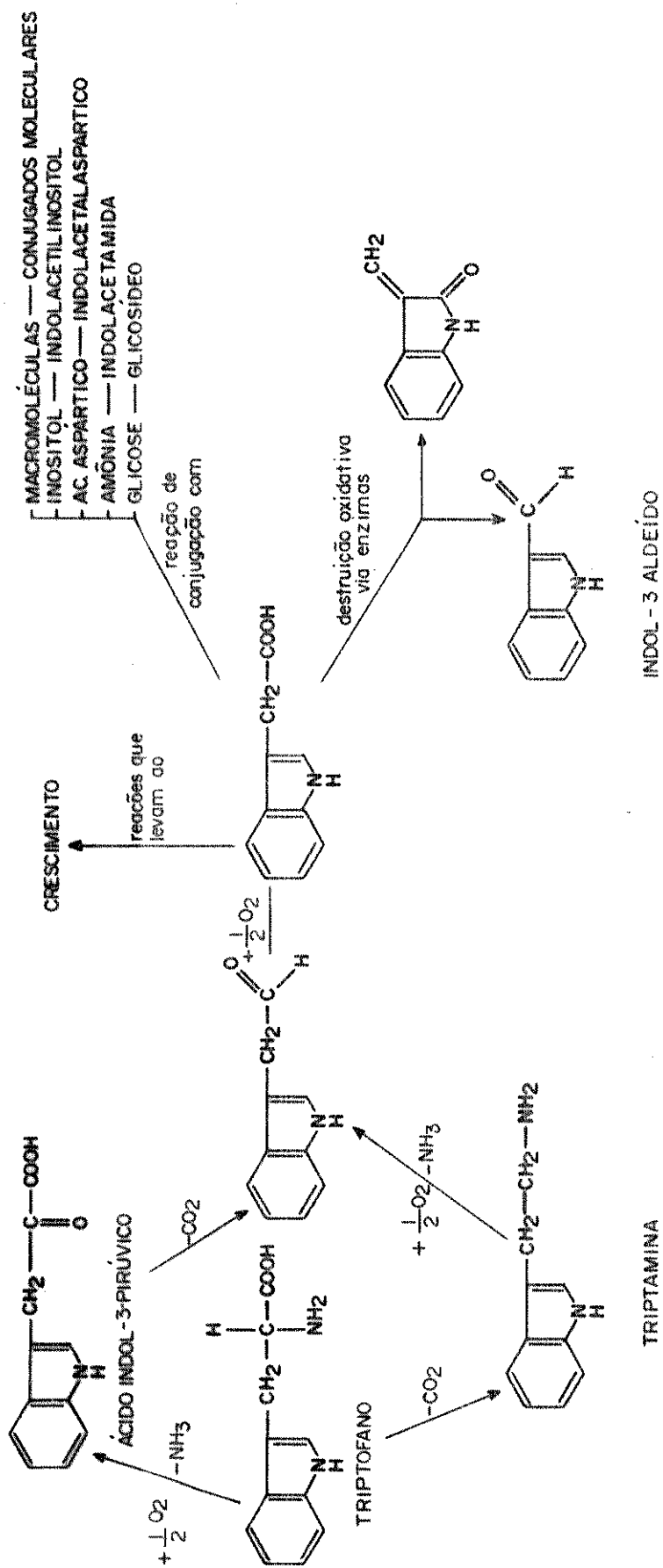
Como vimos anteriormente, o IAA parece derivar na planta do triptofano através de vários passos enzimáticos. Além disso, existem enzimas na planta, incluindo peroxidases e fenol oxidasas, que sob condições próprias produzem a partir do IAA compostos inativos(28). A interação do IAA com luz também pode ser um mecanismo que regula sua ação como auxina(29), pois é sabido que IAA pode ser destruído dando produtos inativos(30). Há também desintoxicação nas quais o IAA é conjugado com vários materiais, como ácido aspártico, inositol e D-glicose e, reações de sequestro envolvendo a união do IAA com várias macromoléculas (Esquema V).

Peróxido de hidrogênio parece mascarar as características químicas do IAA. O crescimento de plantas foi inibido como resultado da adição de H_2O_2 ao meio nutriente contendo IAA, entretanto, sob adição de catalase purificada, a maioria dos sintomas de inativação de IAA foram revertidos. Isto sugere que IAA in vivo possa ser regulado parcialmente por sua conjugação com H_2O_2 e, catalase pode ter um papel no processo de reativação de IAA. O acúmulo de H_2O_2 nas células como um resultado da inibição da catalase pode levar a uma inibição temporária de IAA, afetando assim o crescimento de plantas(31).

I.4 - Ação na Parede Celular

Se doses crescentes de auxina são aplicadas às células capazes de se alongarem, como aquelas de cotiledônio de aveia, epí cotiledônio de ervilha ou hipocotiledônio de girassol, os efeitos são aumentados até uma concentração ótima de auxina. Usualmente, efeitos de crescimento podem ser produzidos por concentrações tão baixas quanto 10^{-8} M de auxina(1).

Tem-se demonstrado que auxina produz muitas mudanças físicas, químicas e fisiológicas dentro das células, algumas delas



Formação e metabolismo de IAA

extremamente rápidas. Por exemplo, auxina é conhecida como promotora de mudanças citoplasmáticas dentro de poucos minutos após a sua aplicação(32). Este fato pode ser correlacionado com o transporte da auxina na célula(33) dando idéia do mecanismo envolvido neste processo. Além disso, esta resposta rápida pode ser a primeira manifestação da ação da auxina, relacionada diretamente ao alongamento celular, que deve em algum ponto envolver mudanças básicas na parede celular. Diferente das células animais, os protoplastos de célula vegetais estão dentro de uma parede semi-rígida. Não importa que mudanças ocorram dentro da célula, esta não pode crescer a menos que as paredes possam ser extendidas. Células vegetais não podem quebrar suas paredes e o único modo de crescerem em volume é através da extensão na parede celular externa, um processo no qual a auxina tem mostrado exercer grande influência(1). A parede consiste predominantemente de fibras de celulose as quais são substancialmente reticuladas em um esqueleto semi-rígido possivelmente através de outros açúcares. Uma possibilidade é que a auxina causa uma quebra das reticulações que seguram as fibras de celulose, permitindo a extensão da parede. A quebra das reticulações é, provavelmente, enzimática e as enzimas necessárias podem ser induzidas a se formarem por ação das auxinas.

1.5 - Auxinas e Ácidos Nucleicos

São poucos os estudos sobre a ação do IAA em DNAs, sabendo-se somente que IAA diminui o ponto de fusão (T_m) do DNA de epicotiledônio de ervilha(34). Este efeito não foi específico para este tipo de tecido, desde que DNA de esperma de salmon respondeu da mesma forma ao IAA adicionado(35).

O efeito de IAA sobre RNAs já é um pouco mais acentuado e por isso amplamente estudado. Siegel e Galston(37) encontraram

evidências da ligação de IAA a uma macromolécula semelhante ao RNA em tecidos de ervilha. Visto que o IAA atua a concentrações muito baixas ($\sim 10^{-8}$ M), nos anos 60 foi sugerido, como mecanismo de amplificação, que a auxina exerce suas funções via uma associação com RNA. Kefford e col.(36) observaram que o RNA isolado de ervilhas poderia formar complexo in vitro com um produto de oxidação do IAA e que este complexo só se formava em valores de pH abaixo de 4,8.

Bendaña e col.(38) suprimiram tecidos de ervilhas crescidos com luz com ^{14}C -IAA marcado na carbonila e encontrou radiatividade associada a uma fração do RNA semelhante ao t-RNA. Trabalho subsequente(39) mostrou que estes resultados não eram reproduzíveis.

Key e Ingle(40) encontraram que a radiatividade do ^{14}C -IAA era incorporada a todas as frações do RNA. Eles acharam que seus resultados poderiam ser melhor atribuídos à utilização dos produtos do catabolismo da auxina do que ligação direta da auxina ao RNA.

Meudt e Galston(41) dividiram o fenômeno de incorporação em dois componentes de reação:

- a) conversão do IAA em um derivado de estrutura desconhecida,
- b) ligação deste derivado a uma fração de macromolécula que se assemelha ao RNA.

Desde que a conjugação de IAA e a macromolécula era feita in vivo e in vitro durante a reação e não durante a extração sugeriu-se que deva ser de importância no metabolismo da auxina(39).

Mais recentemente Kobayashi e Yamaki(42,44) realizaram experimentos com ($2\text{-}^{14}\text{C}$)IAA e ($1\text{-}^{14}\text{C}$)IAA. Os resultados destes ensaios mostraram que tecidos de feijão só apresentaram formação de complexo radiativo entre IAA e tRNA quando o ácido indólico estava

marcado na posição 2.

O IAA tem influência também na síntese de RNA; pode ligar-se ao núcleo; ou interagir com lipídeos e proteínas(45).

I.6 - Natureza do Sítio Receptor e Requisitos Moleculares Para Atividades de Auxina

A primeira teoria sobre a relação atividade-estrutura das propriedades hormonais de auxina naturais e sintéticas, mais compreensível foi proposta recentemente(46). Tem-se tentado desenvolver novas correlações nesta área devido ao fato de ainda não terem sido enumerados os requisitos estruturais e estéricos necessários à atividade de auxina, os quais caracterizariam satisfatoriamente todas as moléculas que possuem propriedades promotoras de crescimento. A importância do desenvolvimento de uma teoria compreensível é indicada pelos trabalhos de vários pesquisadores(47-50) que têm demonstrado a presença de, pelo menos dois receptores específicos de auxinas diferentes e, conclusões sobre qual pode ser a natureza química destes receptores deve ser esclarecida no seu isolamento e caracterização.

As teorias tentam esclarecer a atividade de auxina em termos de três propriedades das moléculas sob consideração(51):

- a) capacidade química de formar ligações covalentes com o sítio receptor;
- b) propriedades eletrônicas que afetam sua habilidade de se ligar ao sítio receptor, se a ligação é de natureza covalente ou não; e
- c) propriedades estereoquímicas.

Alguns trabalhos sobre sítios receptores de auxina(47-50)

indicam que a ligação da molécula de IAA deve ser de natureza covalente. O grau de atividade dependerá da habilidade da auxina se ligar no receptor. Isto por sua vez, dependerá do tamanho e da disponibilidade eletrônica da molécula que interage. Sugere-se que a área que se liga ao anel indólico é de natureza eletrofílica e pode interagir com os elétrons π dos anéis aromáticos e outros átomos ricos em elétrons. Outros trabalhos, porém, dizem que a ligação pode ser de natureza não covalente(51).

I.7 - Ação do IAA em Animais

Apesar de ser uma auxina muito conhecida, o IAA pode ser encontrado em animais(52). Sua ocorrência em mamíferos tem sido atribuída tanto à ingestão através do alimento como à presença de IAA como produto metabólico da flora intestinal.

Yamaki e col.(53) estudaram o papel do IAA na divisão de células animais, bem como em câncer gástricos. Encontraram que a concentração de IAA em casos de câncer era cerca de 5 vezes maior que nos casos normais, o que acontece também em casos de câncer de plantas(54).

I.8 - Catabolismo do IAA

Sabe-se desde 1960(55,56) que IAA pode ser oxidado por peroxidases vegetais e que a peroxidase de rabanete (HRP) o faz sem adição de H_2O_2 e na ausência de cofatores como Mn^{++} e monofenóis(58). Estes fatos indicam a existência de um sítio ativo incomum na molécula de peroxidase. Sendo assim, tem havido contínuas discussões sobre o sítio molecular de atividade da IAA-oxidase.

Duas alternativas têm sido consideradas: primeira, que a atividade da IAA-oxidase e a atividade da peroxidase residem na mesma molécula; e segunda, que existem moléculas que têm atividade de IAA-oxidase, mas são isentas de atividade de peroxidase (59).

Assim, é claro que tanto a peroxidase como a IAA-oxidase podem existir em formas moleculares múltiplas, e parece que estas isoenzimas podem ser divididas em pelo menos 4 classes com base nas suas atividades de peroxidase e IAA-oxidase (60,61):

- (a) Peroxidases típicas que catalisam reações de peroxidação a uma velocidade muito alta, enquanto também oxidam IAA mais vagarosamente na ausência de H_2O_2 adicionada, por exemplo a peroxidase de rabanete;
- (b) Enzimas que têm atividades altas tanto de IAA-oxidase como de peroxidase, por exemplo peroxidase de nabo (60). Yamazaki, desenvolveu um estudo detalhado sobre estas enzimas (61).
- (c) Peroxidases que não mostram nenhuma atividade de IAA-oxidase (62, 63).
- (c) IAA oxidase que não tem nenhuma atividade de peroxidase (64).

Uma outra aproximação à questão dos sítios de peroxidase e IAA-oxidase foi feita por Siegel e Galston(65), que encontraram que quando o grupo heme da HRP era removido por tratamento com acetona acídica, a apoenzima ainda tinha atividade de IAA-oxidase, mas tinha perdido sua atividade frente a substratos de peroxidase. Atividade de peroxidase pode ser parcialmente restaurada pela recombinação do grupo heme a apoenzima. Este resultado foi confirmado por Hoyle(66), mas Ku e col.(67) encontraram que se o grupo prostético da HRP era removido por butanona acídica a apoenzima não tinha quase nenhuma atividade de IAA-oxidase.

Parece, então, que plantas contêm várias isoenzimas peroxidases, algumas das quais também são capazes de oxidar IAA em várias velocidades e que em um ou dois casos, elas têm atividade de IAA-oxidase, mas não de peroxidase.

I.8.1 - Peroxidase de Rabanete (HRP)

As peroxidases são hemoproteínas constituídas de uma glicoproteína associada a um grupo prostético: a ferroprotoporfirina IX (vide página 17). Como seu nome indica, estas enzimas reagem como peroxidases e são susceptíveis de catalisar a oxidação de várias substâncias. Tem-se constatado que diversas substâncias são oxidadas por peroxidases na ausência de peróxido adicionado no meio reacional. É o caso particular de certas hidro e naftoquinonas, do ácido dihidrofumárico e IAA. Durante as reações de peroxidação ou oxidação, diferentes compostos enzimáticos, caracterizados por diferentes números de oxidação, são formados: a ferriperoxidase, o composto I, o composto II, a ferroperoxidase e o composto III ou oxiperoxidase.

I.8.2 - Estrutura das Peroxidasas Vegetais

Descreveremos primeiramente a estrutura da glicoproteína (apoenzima) e do grupo prostético (protohematina IX).

a) A glicoproteína

As informações obtidas sobre as isoperoxidasas isoladas de vegetais dizem respeito em geral às isoperoxidasas isoladas a partir da fração solúvel do citoplasma. As peroxidasas são igualmente detectadas associadas às paredes celulares, as membranas, ao núcleo, às mitocôndrias e aos ribossomas. Assim, Darimont e col.(68) mostraram que dentro de raízes de lentilhas existem duas isoperoxidasas vindas da fração iônica e três vindas da fração covalente na parede celular. Estes autores constataram que não há hidroxiprolina na "peroxidase iônica", mas ela está presente na fração covalente, ou ela representa aproximadamente um quarto da hidroxiprolina total da parede.

Shanon e col.(69) mostraram que dentro de ao menos uma peroxidase solúvel de rabanete, a hidroxiprolina está ligada à arabinose dentro de uma ligação O-glicosídica, análoga àquela que caracteriza o complexo proteína-açúcar das paredes celulares. As isoperoxidasas vegetais encerram de 7 a 20% de açúcares. O modo de ligação açúcar-peptídeo é ainda pouco conhecido. Alguns autores dão evidências de que dentro de uma isoperoxidase de rábano (HRP-C) oito sítios de ligação glicosídicos donde sete são ligados à asparagina.

Shin e col.(70) mostraram que em duas isoperoxidasas de rábano (HRP-A₁ ácida e HRP-C neutra), a retirada do grupo prostético expõe três resíduos de histidina.

b) O Grupo Prostético

Todas as porfirinas são derivadas de anéis tetrapirrólicos cíclicos (fig. 1.3). O centro das porfirinas, por ser considerado como um anfótero, os dois átomos de nitrogênio dos centros pirrólicos e maleimídico (-NH-) são capazes de aceitar ou perder prótons, representando assim, tanto o papel de bases como o de ácidos.

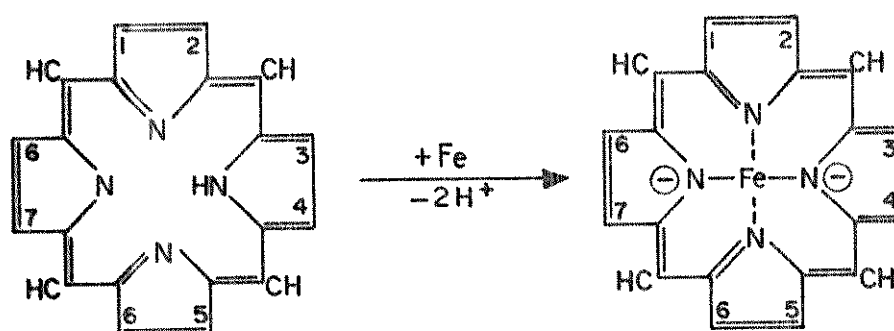


Figura 1.3 - Estrutura do grupo Heme.

Assim que um íon de ferro se liga à porfirina, forma-se um complexo tetracoordenado quadrado planar. Dois prótons se dissociam dos átomos de nitrogênio das pirroleínas, criando-se, então duas cargas negativas que são distribuídas uniformemente dentro de todo o sistema porfirínico. O ferro é, portanto, ligado por uma interação eletrostática às duas cargas negativas. Na peroxidase a quinta e sexta posição de coordenação do ferro são ocupadas, respectivamente, pela proteína e por uma molécula de água.

O grupo prostético confere às peroxidases uma absorbância na região visível do espectro. Dentre as três bandas observadas (designadas α , β , γ) a mais intensa (γ) se situa na região da Soret ao redor de 400 nm para as formas férricas e na região de

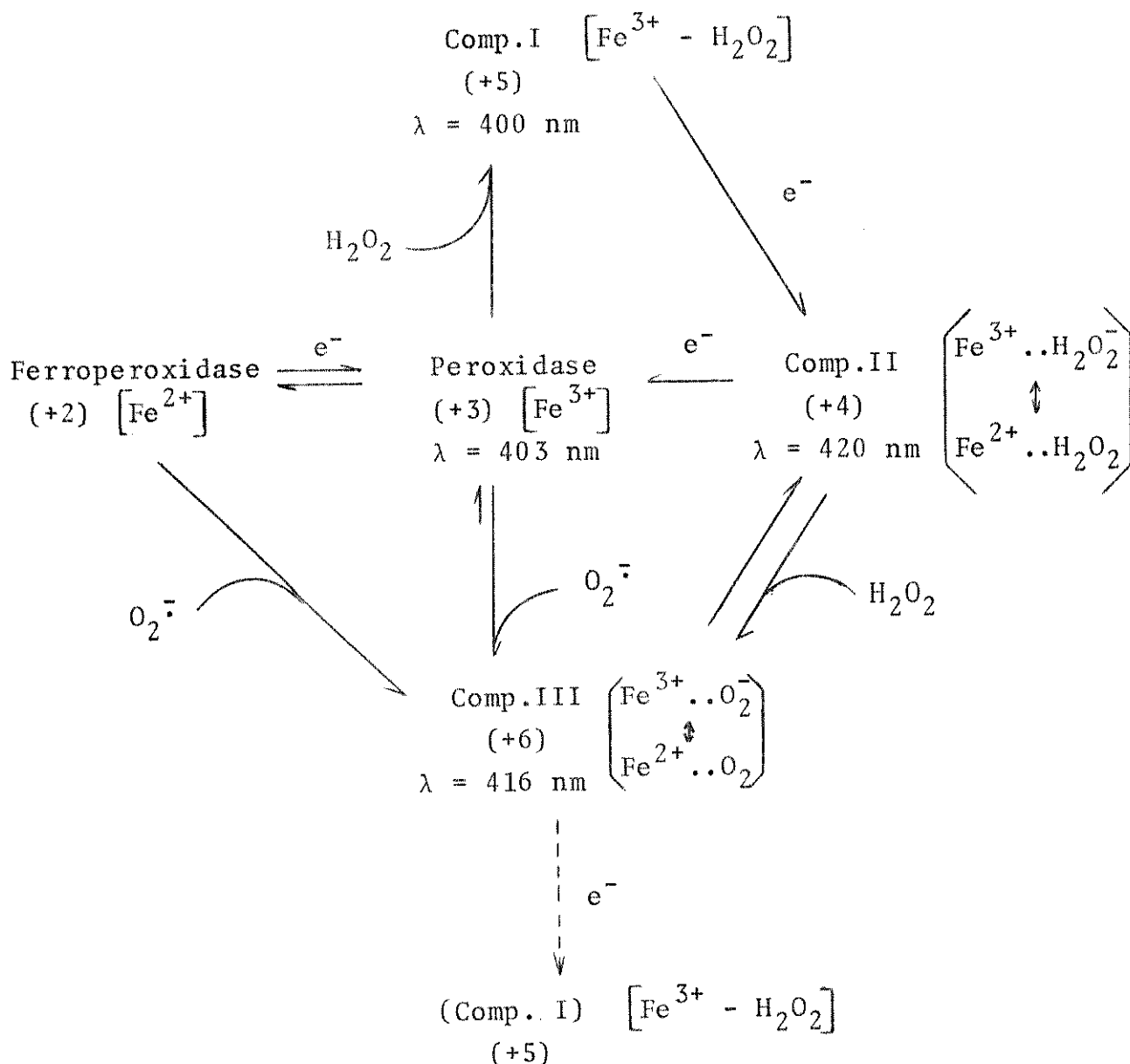
430 nm para as formas ferrosas. As bandas α (550-610 nm) e β (520-550 nm) correspondem a uma transferência de carga do metal (ferro) para o ligante (protoporfirina).

Um estudo da relação estrutura-função do sítio ativo de peroxidases, em termos da influência da vizinhança do grupo prostético na reatividade da HRP tem sido feito por Ishimaru(71).

I.8.3 - Intermediários de Peroxidase Envolvidos na Oxidação do IAA

Theorell(72) em 1942, mostrou que uma peroxidase neutra de rábano reagia com água oxigenada para dar um composto verde chamado composto I. Este composto utiliza um hidroperóxido para sua formação e seu número de oxidação é V e foi verificado, ainda, que participa de outras reações de oxidação catalisada por HRP, como a do IAA(73). Presume-se que o mecanismo de formação deste composto envolve um ataque eletrofílico do hidroperóxido cuja eletrofilicidade é aumentada formando uma ligação de hidrogênio com arranjo equatorial no grupo heme(71). O composto I, por ação redutora de doadores de elétrons reduz-se à ferriperoxidase passando por um intermediário chamado composto II e o nível de oxidação deste composto é IV. O esquema VI mostra as relações entre a peroxidase e seus diferentes compostos.

Com base no espectro de absorção destes compostos (fig. I.4) pode-se seguir a cinética de formação de cada um dos intermediários e, a de desaparecimento de peroxidase nativa, bem como verificar a influência que compostos adicionados na reação têm sobre os passos oxidativos. Como a formação de compostos I é essencialmente completa dentro do "tempo morto" da aparelhagem e a subsequente redução para peroxidase nativa é rápida, deve-se seguir a cinética com o monocromador fixo a 411 nm que é um ponto isobés



ESQUEMA VI

tico para HRP e HRP-II (74). Para se seguir a formação de composto II deve-se fixar o monocromador em 425 nm onde o composto em questão tem o máximo de absorção(74).

Além destes intermediários, existe outro que não participa no ciclo peroxidático normal, o composto III, mas pode ser formado por grande excesso de H_2O_2 , por redução da enzima nativa (ferri) para ferropoxidase seguida de adição de oxigênio, por reação do composto II com H_2O_2 ou por adição de íon superóxido (O_2^-) à ferriperoxidase. Contudo, estudos cinéticos da reação de

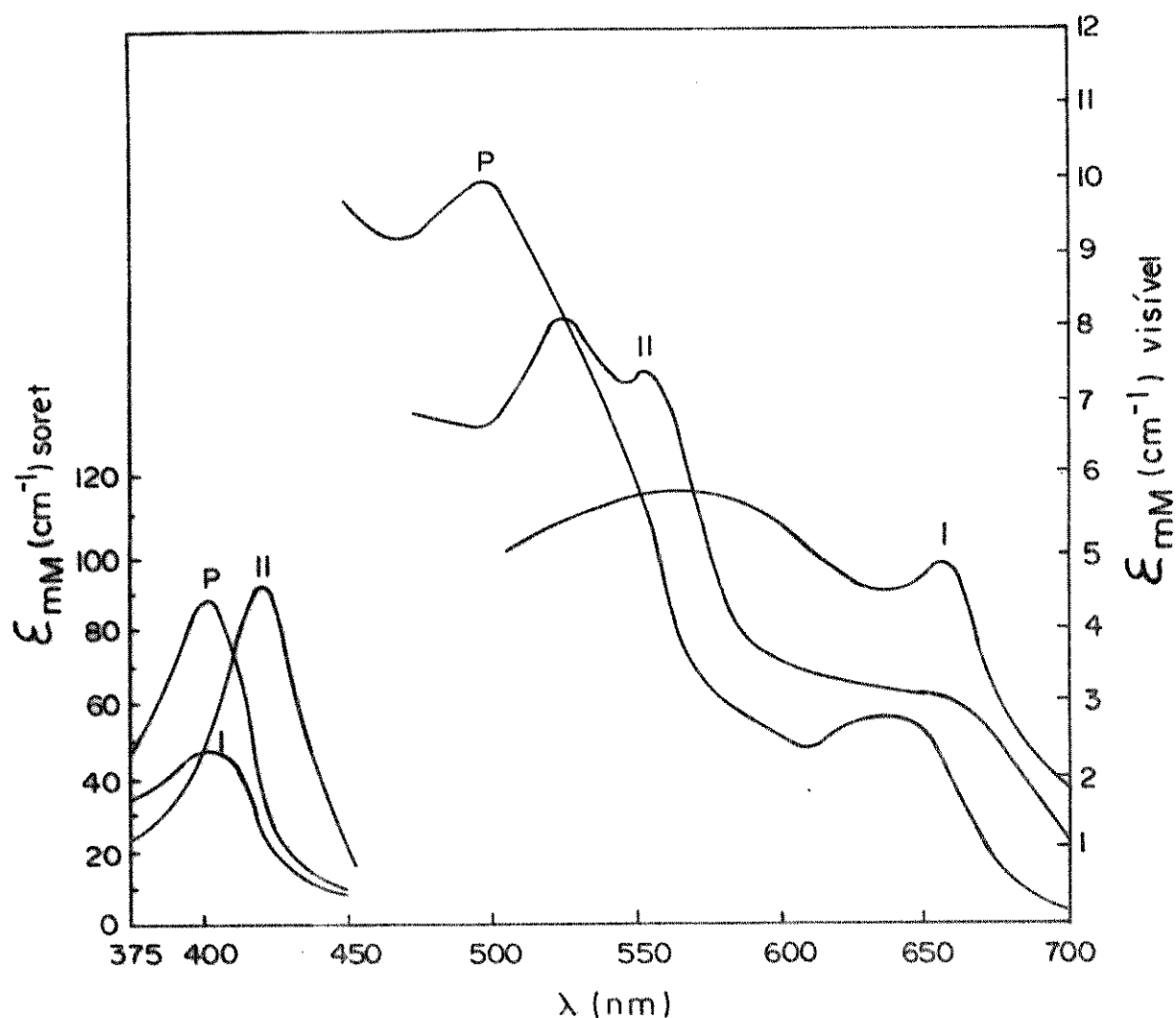


Figura I.4 - Espectro de Absorção da HRP e de seus compostos I e II. À esquerda, mostra-se a região da banda "Soret" e à direita, as absorções na região visível.

IAA com HRP não puderam detectar a presença deste composto na reação(75).

A estereoquímica da peroxidase durante sua ação catalítica sobre seus substratos foi relatada por Poulos e col. (76).

I.8.4 - Produtos de Oxidação de IAA catalisada por Peroxidases (HRP)

A existência de uma degradação do hormônio de plantas (IAA) por peroxidases puras, a qual consome oxigênio na ausência de peróxido de hidrogênio, tem sido estabelecida desde 1955(57) e este processo é certamente de grande importância para a regulação do crescimento de planta ao nível molecular(36).

A reação é estequiométrica e consome 1 mol de oxigênio, liberando 1 mol de CO_2 por mol de IAA oxidado(79).

A introdução da técnica de estudo da degradação de IAA utilizando ^{14}C -IAA, por Pilet(80) permitiu obterem-se maiores detalhes sobre a degradação do fitohormônio por processos enzimáticos e sobre seus produtos.

Os produtos principais da reação foram caracterizados por vários pesquisadores(79,81,82) como 3-metilenoxindol e indol-3-aldeído (IAL) (fig. I.5).

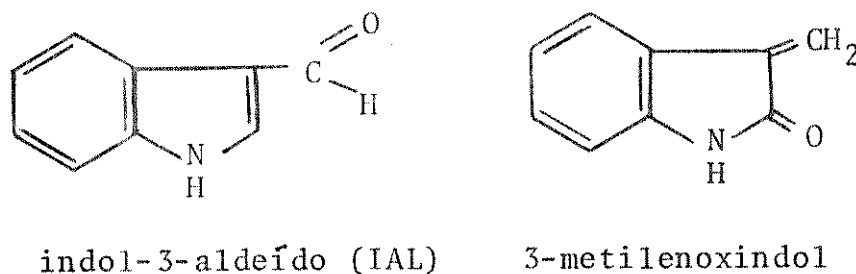


Figura I.5 - Estrutura dos principais produtos de degradação do IAA.

O curso da oxidação enzimática é altamente dependente da concentração de cada componente de reação, isto é, substrato, enzima, cofator e natureza do tampão, bem como do pH do meio. Por exemplo, quando a reação é feita a pHs maiores que 4,8 e em concentrações menores que 2×10^{-4} M de IAA e concentrações de peroxidase de 10^{-6} - 10^{-8} M o produto principal é o 3-metilenoxindol, mas

ainda um composto indólico neutro está presente(82), enquanto que quando se realiza em pH 3,8 o produto quase que exclusivo (80%) é o IAL(81).

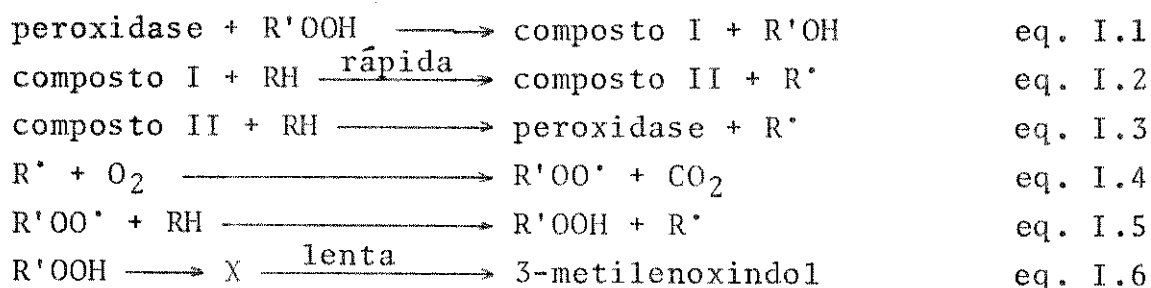
Além destes dois produtos, vários outros em menores rendimentos(84) puderam ser isolados da reação enzimática e, caracterizados. O esquema VII mostra os possíveis caminhos para a formação destes compostos.

I.8.5 - Mecanismo da Reação IAA/HRP

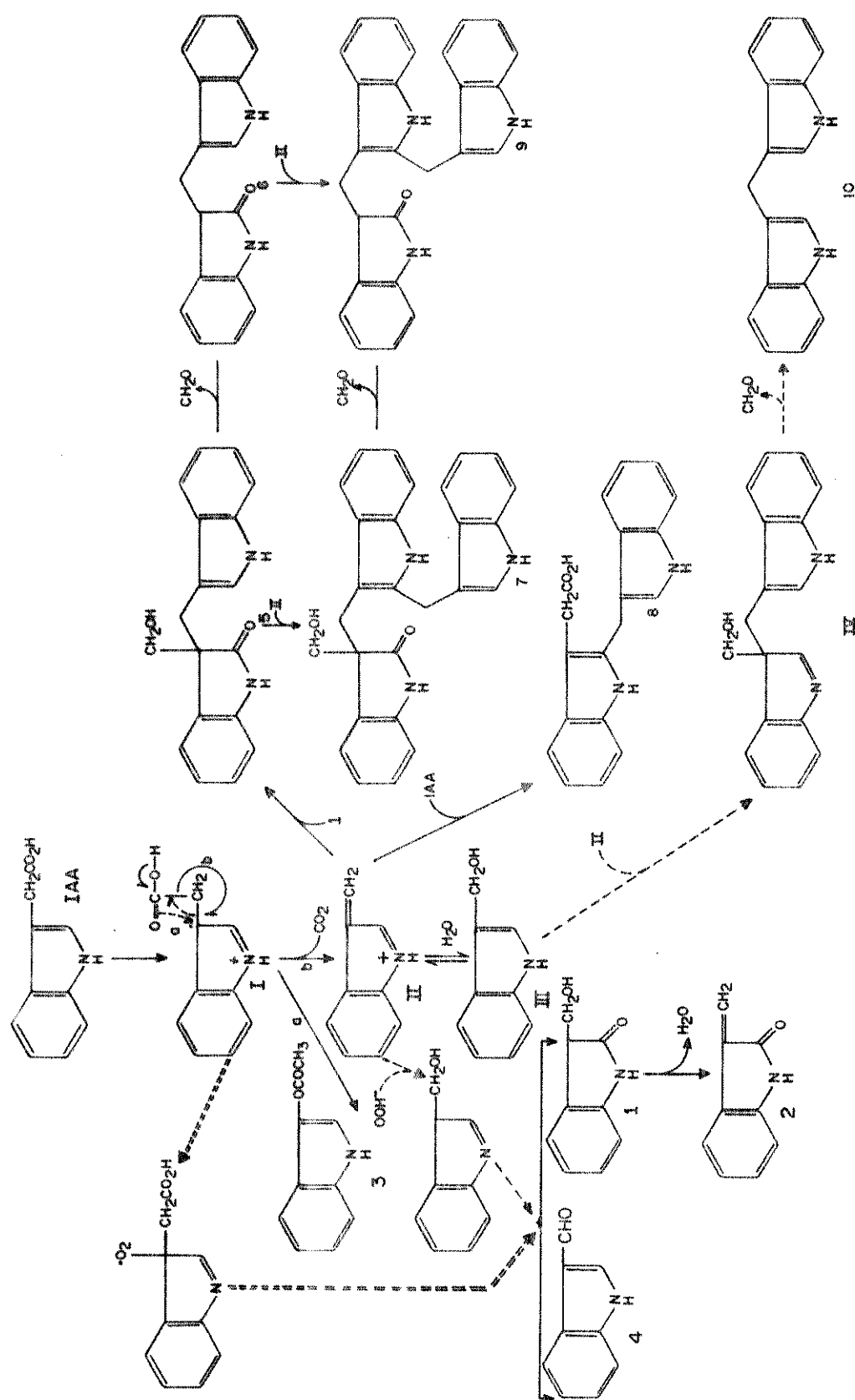
Para IAA reagir com HRP, radicais livres devem ser formados para darem início à reação em cadeia. Foi comprovado que a reação do IAA com HRP não é afetada por quantidades catalíticas de catalase (supressor de $\text{OH}^\bullet$) (77) nem por superóxido dismutase (dismuta $\text{O}_2^\bullet$) (78).

Assim, o mecanismo sugerido para esta reação envolve a formação de radical livre derivado do IAA como primeiro intermediário (85). Morita e col.(81) sugeriram que o composto intermediário era precursor comum tanto para a formação de IAL como para a de 3-metilenoxindol, o que é confirmado mostrando que o intermediário em questão apresenta espectro de absorção característico de um grupo indólico.

Nakajima e col.(86) propõem um mecanismo envolvendo o acúmulo de um hidroperóxido derivado do IAA na reação. As principais reações envolvidas na reação de oxidação do IAA por HRP são esquematizadas como segue:



onde RH e R'OOH denotam IAA e 3-metilindol na forma de hidroperóxido, respectivamente.



=====▶ ROTA PROPOSTA POR HINMAN (82)
 -----▶ ROTA PROPOSTA POR BEMILLER (83)

ESQUEMA VII

Este mecanismo implica que a função catalítica da peroxidase é formar o radical livre $R^{\bullet}$ e a enzima não está diretamente envolvida na ativação do oxigênio molecular.

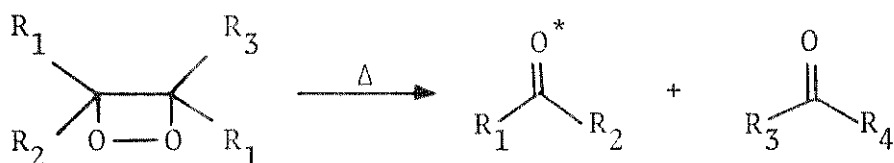
É necessário que traços de hidroperóxidos estejam presentes para iniciar a reação; e então, se formar o $R'OOH$ confirmando a reação auto-catalítica(67). Em seguida, a reação atinge o estado estacionário havendo o acúmulo de hidroperóxidos a uma certa concentração que, então, por um mecanismo não muito claro, chegam aos produtos.

I.8.6 - Formação de Produto em Estado Eletrônico Excitado

A geração e funcionalidade bioquímica de espécies eletronicamente excitadas têm sido amplamente estudadas(87-92).

Tem-se encontrado que a oxidação aeróbica do IAA catalisada por peroxidase produz espécies em estado eletrônico excitado, a saber o IAL(91).

Os anéis dioxetânicos têm sido propostos como intermediários em numerosas reações quimiluminescentes envolvendo olefinas, indóis, derivados de acridina, etc (93), principalmente com base no tipo de produto formado. O primeiro dioxetano foi sintetizado por Kopecky e Munford (94). A termólise do dioxetano libera energia suficiente para produzir carbonilas no estado excitado (esquema VIII) (95).



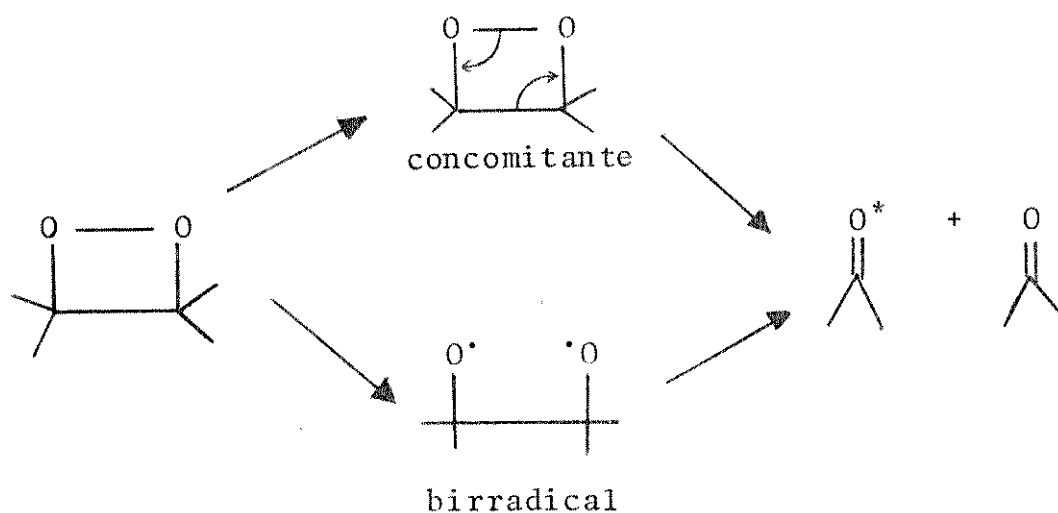
Exotermicidade de termólise ≈ -90 Kcal/mol

Energia do estado singlete ou triplete de aldeído e cetonas:
 < 85 Kcal/mol (100)

ESQUEMA VIII

A termólise de dioxetanos gera preferencialmente produto excitado no estado triplete não emissivo com uma razão $^3\phi/^1\phi$ variando na faixa de 10 a 10^3 , onde $^3\phi$ e $^1\phi$ são os rendimentos quânticos de espécies tripletes e singletes, respectivamente (95).

Dois mecanismos têm sido propostos (esquema IX) para a quebra do dioxetano. O mecanismo concomitante, onde as ligações O-O e C-C são quebradas e ligações C=O simultaneamente formadas, foi proposto por McCapra (93) baseado na correlação de simetria de orbitais (96). No mecanismo em duas etapas, a ligação O-O se rompe gerando um birradical (vida-média curta) e, subsequentemente, se quebra C-C dando os produtos. Este mecanismo foi proposto por Richardson e col. (97).

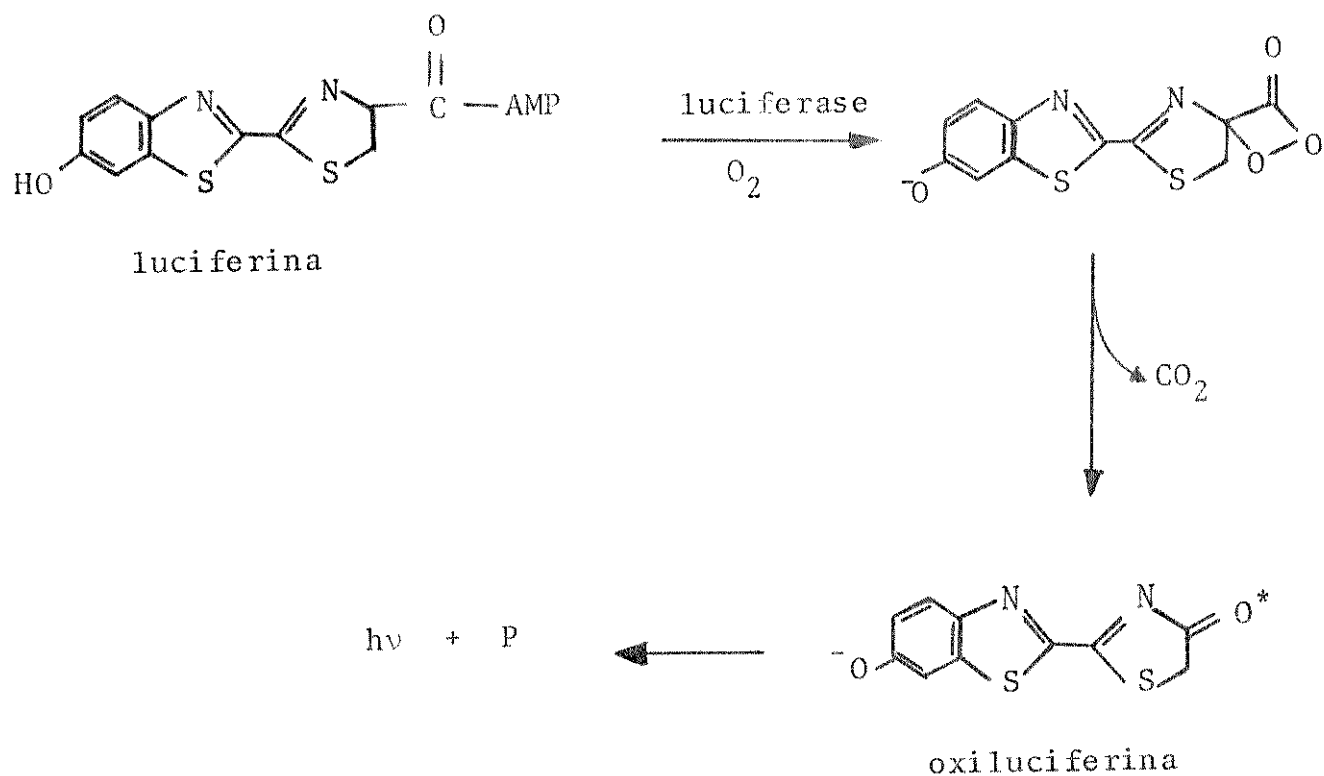


ESQUEMA IX

Dioxetanonas (α -peroxilactonas) tem sido propostas como intermediárias, principalmente em sistemas bioluminescentes (98), por exemplo, no sistema luciferina-luciferase de vagalume mostrado no esquema X.

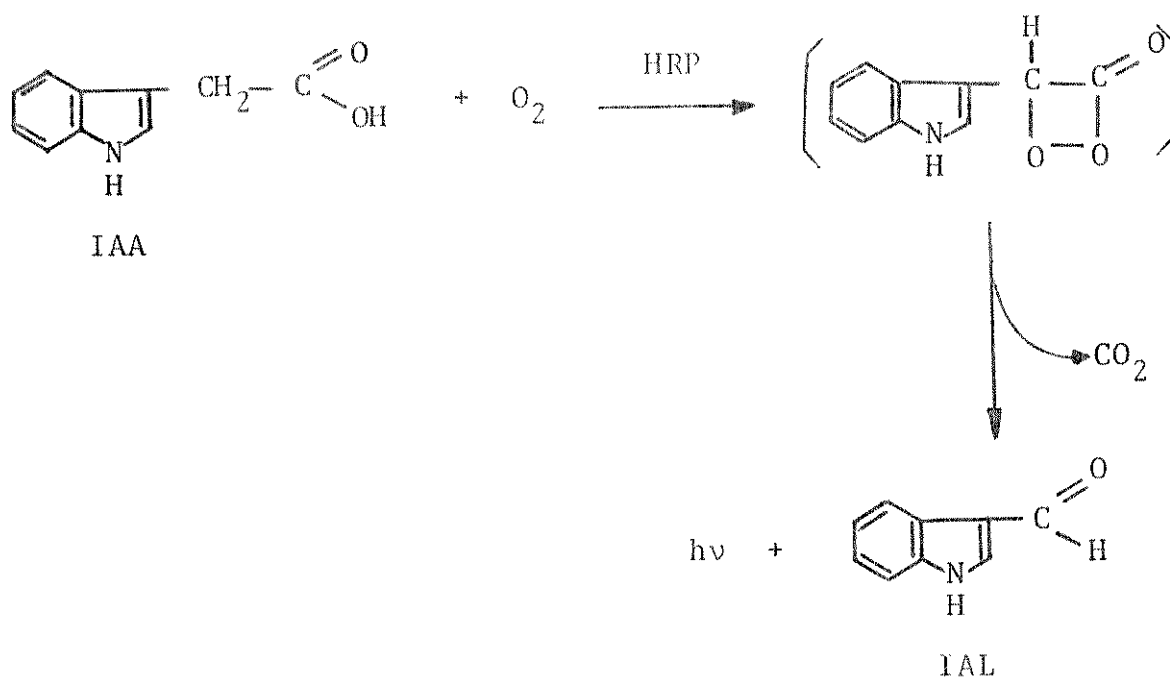
A eficiente fluorescência (100%) produzida nestes sistemas, isto é, a emissão proveniente 100% de estado singlete pode ser atribuída ao fato de sistemas bioluminescentes envolverem

moléculas que apresentam alto grau de conjugação.



ESQUEMA X

Os produtos obtidos na reação de IAA com HRP, em pH 3,8, IAL e CO_2 , são produtos esperados da quebra de uma dioxetanona (99) (esquema XI), e sendo assim, o IAL deve ser gerado em estado excitado.



ESQUEMA XI

As evidências preliminares de que IAL é gerado em estado eletrônico excitado são dadas por Vidigal e col.(91, 101).

Uma destas evidências é a mudança espectral causada na enzima HRP após a reação com IAA semelhante à causada por irradiação. As modificações eram mais acentuadas quando a reação era feita em pHs menores que 4.0 no qual o IAL é gerado com maior eficiência (81). A fig. I.6 mostra o espectro diferencial da HRP após o tratamento com o sistema IAA/O₂ e após irradiação a 290 nm, onde se pode verificar a ocorrência de tais mudanças. Testes controle indicaram que as modificações sofridas durante a reação não eram devidas ao IAA nem ao IAL e nem a outros possíveis radicais intermediários (OH[•] e O₂⁻), pois supressores destas espécies não protegeram a enzima.

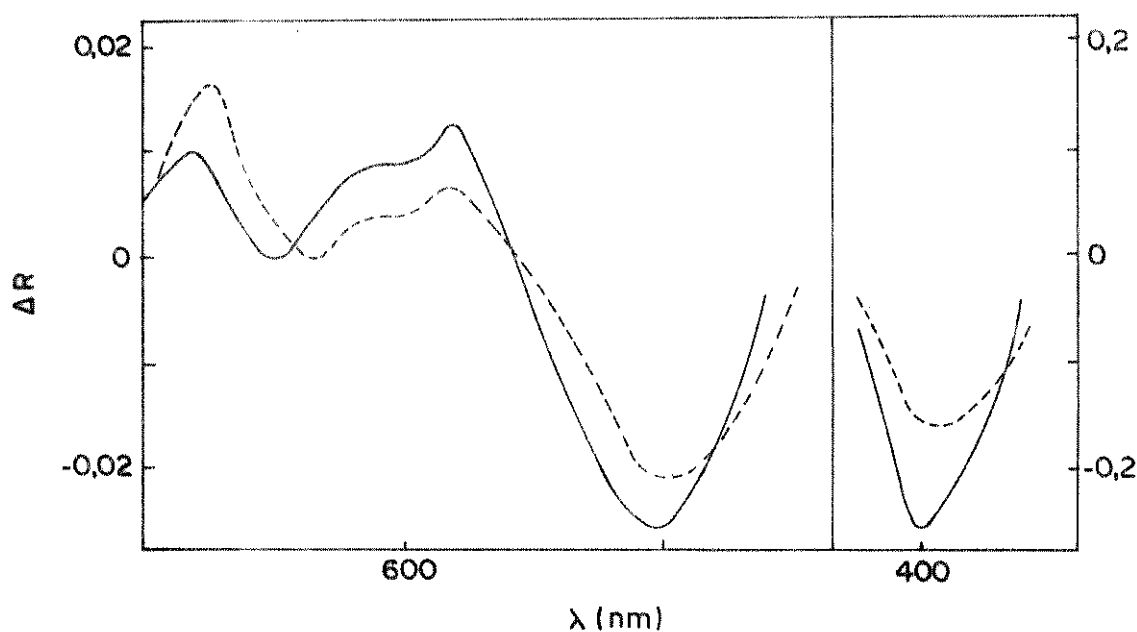


Figura I.6 - Espectro Diferencial da HRP em pH 4,0 em relação a uma solução sem tratamento: (—) após 2,0 horas de irradiação a 290 nm; (---) após a oxidação aeróbica do IAA (91).

Outras indicações de que o IAL pode estar sendo gerado

em estado excitado são a correlação da cinética de emissão fotônica com a de formação de produto e a transferência de energia para a eosina (101). Em pH 3,8 e 5,6 é observada uma total correlação da emissão de luz e a formação de indol-3-aldeído (fig. I.7).

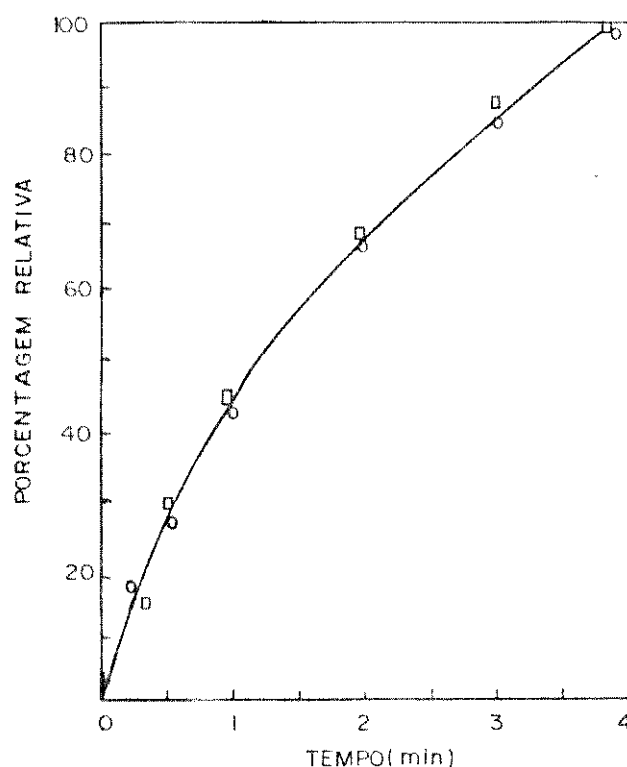
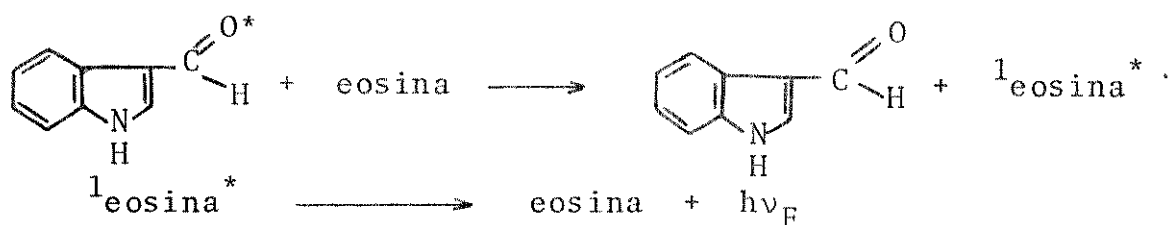


Figura I.7 - Correlação entre a emissão fotônica total de luz (-□-) e formação de IAL (-○-) no sistema IAA/HRP/O₂ em pH 5,6 (101).

A transferência de energia para a eosina pode ser verificada no espectro de quimiluminescência do sistema IAA/HRP/O₂/eosina. Neste espectro (fig. I.8) aparece somente o pico de emissão da eosina em c.a. 570 nm, o que indica que o IAL transfere sua energia para a eosina que por sua vez emite fluorescência (esquema XII).



ESQUEMA XII

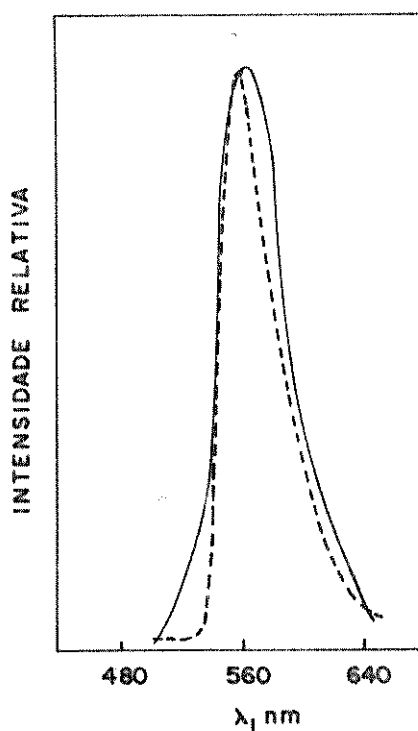
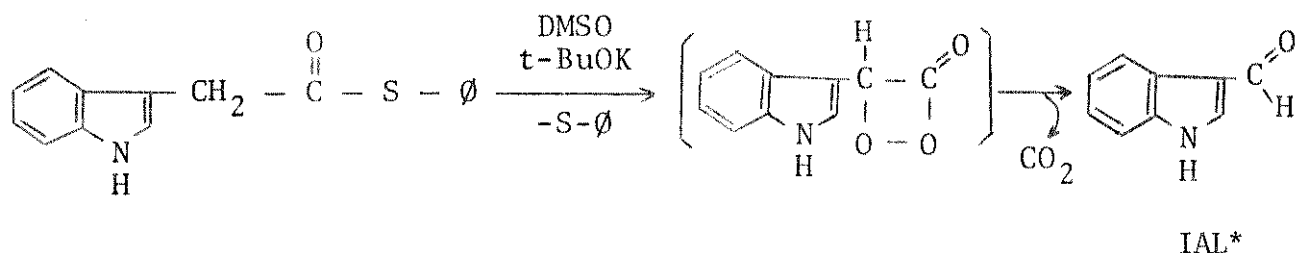


Figura I.8 - Espectros de fluorescência da eosina (---) e quimiluminescência do sistema IAA (1,5 mM)/HRP (2,2 μ M)/eosina (0,2 mM)/O₂ (—) em tampão acetato 0,05M pH 5,6, contendo 0,28 M de etanol. (101).

Durán e col. (102) demonstraram também a formação de IAL em estado excitado (IAL*), durante a oxidação aeróbica do IAA catalisada por HRP através de comparação com sistemas químicos usados como modelo. Como exemplo, pode-se citar a oxidação do feniltioester derivado do IAA em meio DMSO/tBuOK a qual emite luz (esquema XIII) como resultado da produção de IAL*.



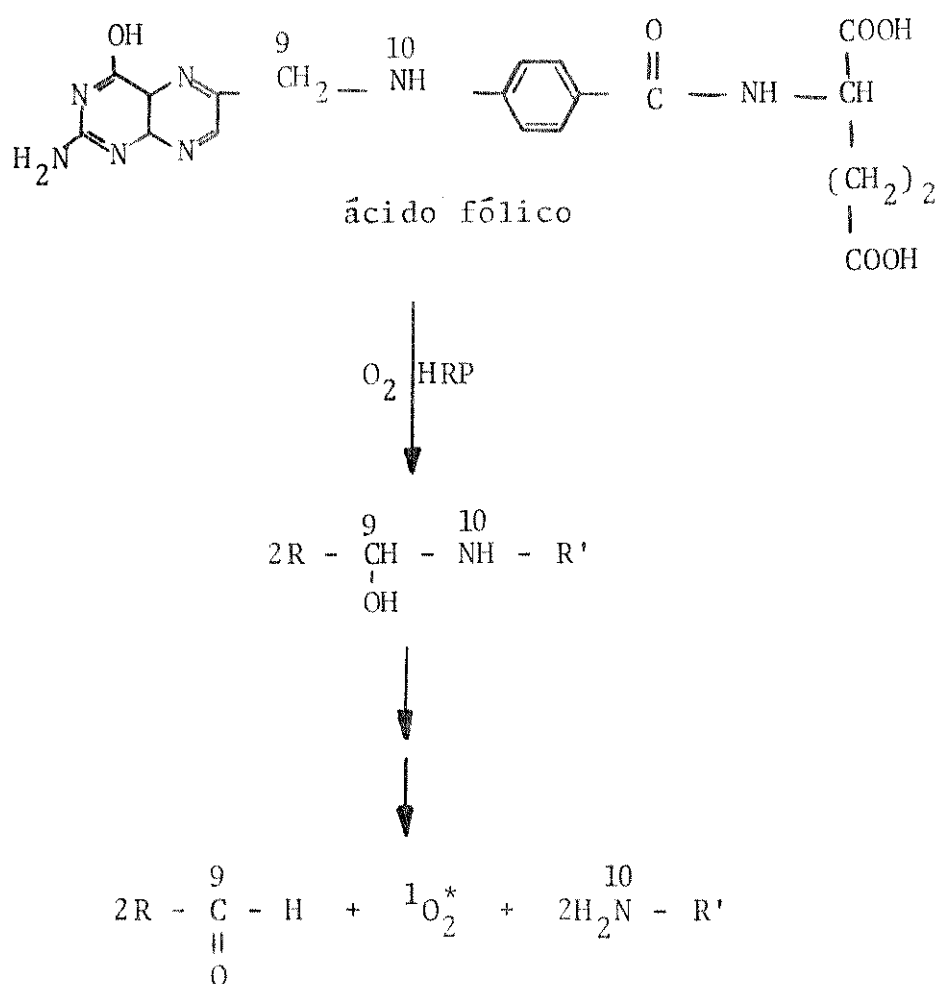
ESQUEMA XIII

O espectro de quimiluminescência desta reação e o de fluorescência obtidos após o tratamento com HRP mostram um pico em 435 nm onde o IAL fluoresce nestas condições (103).

I.9 - Produção de Oxigênio Singlete (1O_2) em Sistemas Biológicos

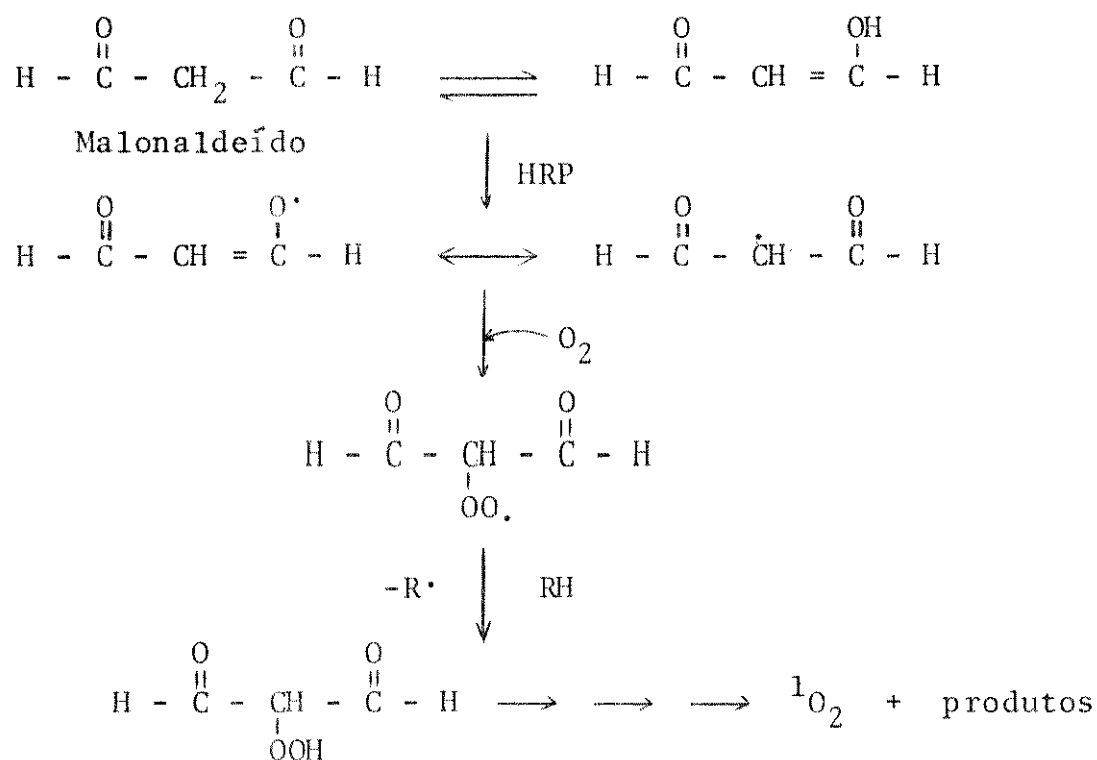
Este assunto tem sido amplamente revisado por Foote(104, 105), por Krinsky(106) e por Durán(107).

Sabe-se que sistemas de reação envolvendo oxidações aeróbicas catalisadas por HRP produzem espécies em estado eletrônico excitado provenientes de um intermediário dioxetano (dioxetanona) (88). Apesar disso, a reação de alguns substratos podem não envolver um intermediário dioxetano e ainda assim emitirem luz. É o caso, por exemplo da degradação do ácido fólico (108) mostrada no esquema XIV e do malonaldeído (109) mostrada no esquema XV.



ESQUEMA XIV

Estas reações envolvem intermediários hidroperóxidos, donde $^1\text{O}_2$ pode ser gerado provavelmente via mecanismo de Russell (110) ou de Benson (111).



ESQUEMA XV

Desde que as espécies geradas em reações com HRP estão no estado triplete, o oxigênio molecular sendo uma espécie triplete, pode suprimir esta energia por um mecanismo de transferência colisional (112) passando para o estado singlete. Sendo assim, a reação IAA/HRP/ O_2 pode estar gerando, além do IAL excitado, o $^1\text{O}_2$ como segunda espécie excitada, ou por transferência de energia ou por mecanismo de Russell (110).

II - ÁCIDO RIBONUCLEICO DE TRANSFERÊNCIA

II.1 - Estrutura

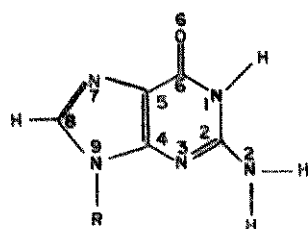
Ácido ribonucleico de transferência (tRNA) é o termo usado desde 1960 (113) para descrever um grupo de moléculas de RNA de baixo peso molecular, presentes na fração solúvel do citoplasma e que tomam parte na síntese proteica. Os tRNAs de diferentes células possuem estruturas e funções variadas (114), como por exemplo participação na síntese da parede celular, e atua como "primer" para a transcriptase reversa na síntese direta do DNA.

Os tRNAs são formados por nucleotídeos purínicos e pirimidínicos (fig. II.1), bem como por alguns nucleotídeos modificados cuja localização e função são descritas por Feldman (115)(fig. II.2). Cada célula viva contém mais de 60 tRNAs diferentes que são similares em tamanho (P.M. 25.000-30.000), mas diferem na sequência nucleotídica.

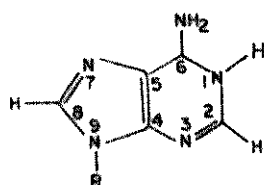
Os nucleotídeos ligam-se entre si através de uma molécula de fosfato formando um esqueleto de fosfatos alternados por uma molécula de ribose ficando a base fora deste esqueleto ligada no C-1' do açúcar (fig. II.3).

Holley e col. (116) propuseram a forma de "folha de trevo" (fig. II.5) como estrutura secundária para os tRNAs, baseando-se no emparelhamento de bases tipo Watson-Crick (fig. II.4); mais tarde, estudos com cristalografia e difração de raio-X (117, 118) mostraram a estrutura terciária como se vê na fig. II.6 que se mantém através de ligações de hidrogênio.

Nucleotídeos Purínicos

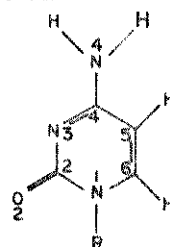


GUANOSINA

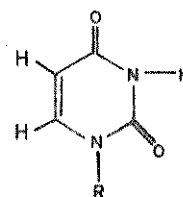


ADENOSINA

Nucleotídeos Pirimidínicos

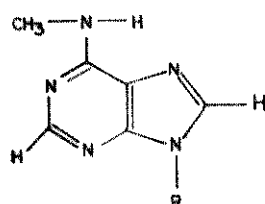


CITIDINA

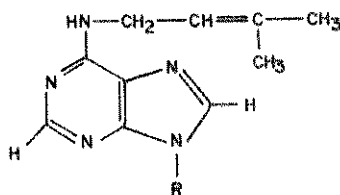


URIDINA

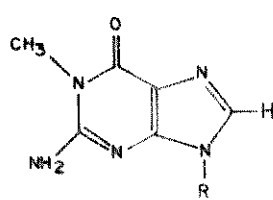
Figura II.1 - Nucleotídeos normais presentes no tRNA.



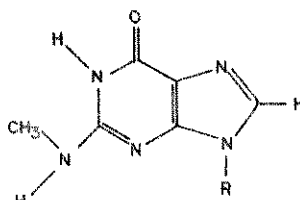
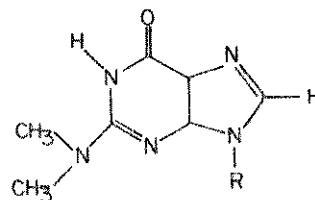
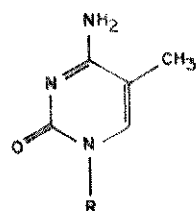
METILADENOSINA



ISOPENTENILADENOSINA



1- METILGUANOSINA

N²-METILGUANOSINAN¹,N³ - DIMETILGUANOSINA

5-METILATIDINA

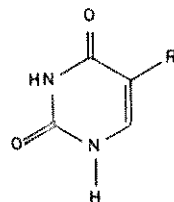
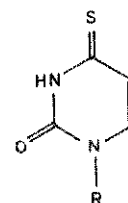
5-RIBOSILURACIL
(PSEUDO URIDINA Ψ)4-TIOURIDINA
(t-RNA DE E.COLI)

Figura II.2 - Nucleotídeos modificados presentes no tRNA.

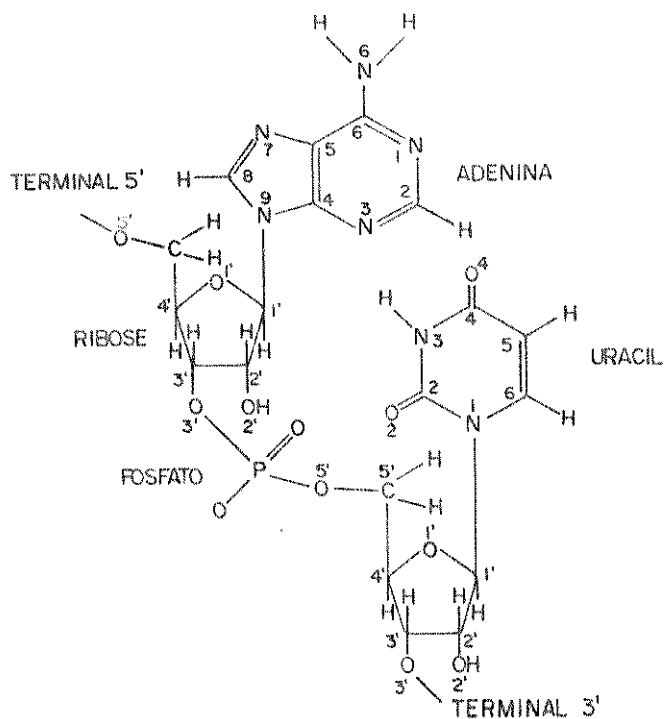


Figura II.3 - Esqueleto de ligações fostato que formam o tRNA. As bases estão sempre ligadas no C-1' da ribose e as riboses estão interligadas por uma molécula de fostato.

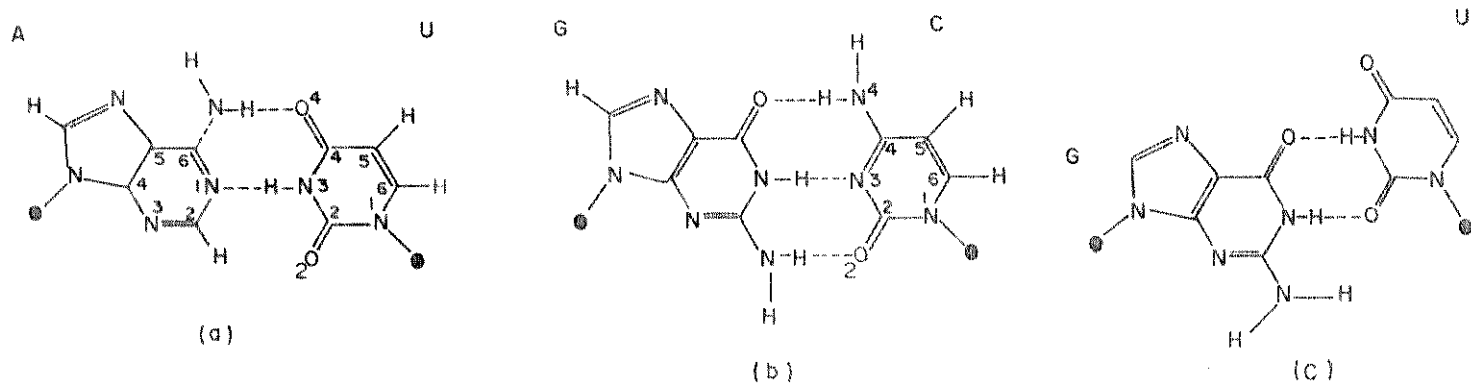


Figura II.4 - Emparelhamento de bases do tipo Watson-Crick observado nos pares: (a) adenina-uracil; (b) guanina-citosina e (c) guanina-uracil.

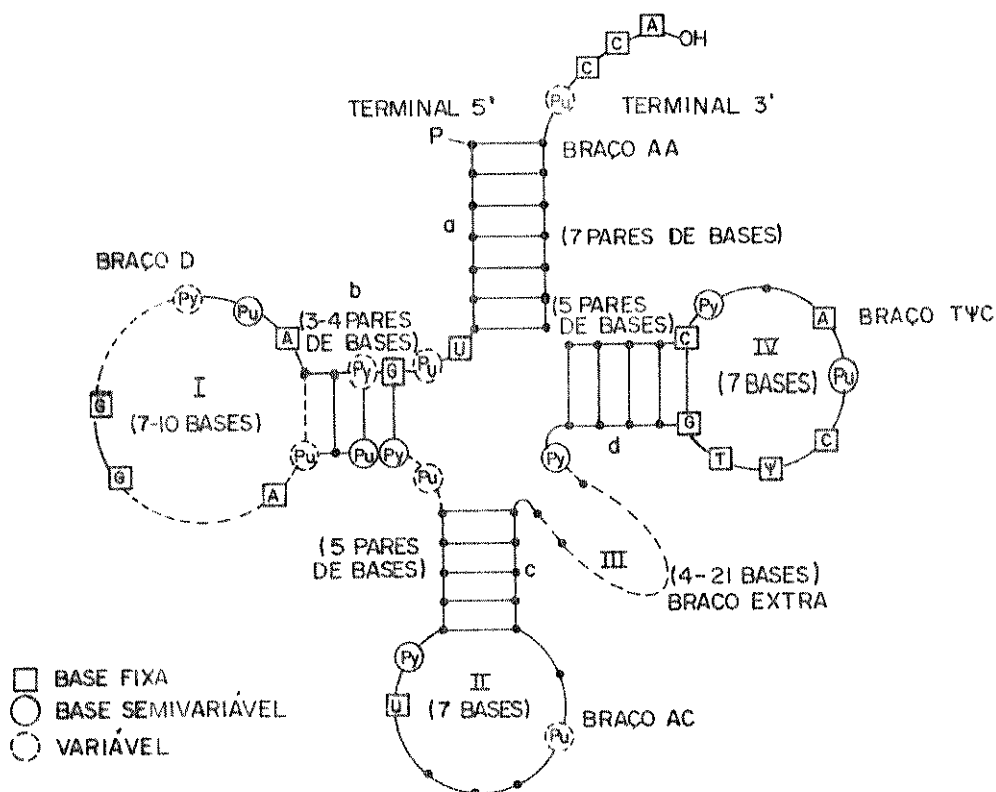


Figura II.5 - Representação geral do tRNA na forma "folha de trevo". As bases comuns a todos os tRNAs estão marcadas com quadrados. As que podem não se encontrar nesta posição em alguns tRNAs estão denotadas com um círculo cheio e os círculos pontilhados representam as que variam sempre de uma molécula para outra. As regiões pontilhadas correspondem àquelas nas quais o número de nucleotídeos varia de um tRNA para outro.

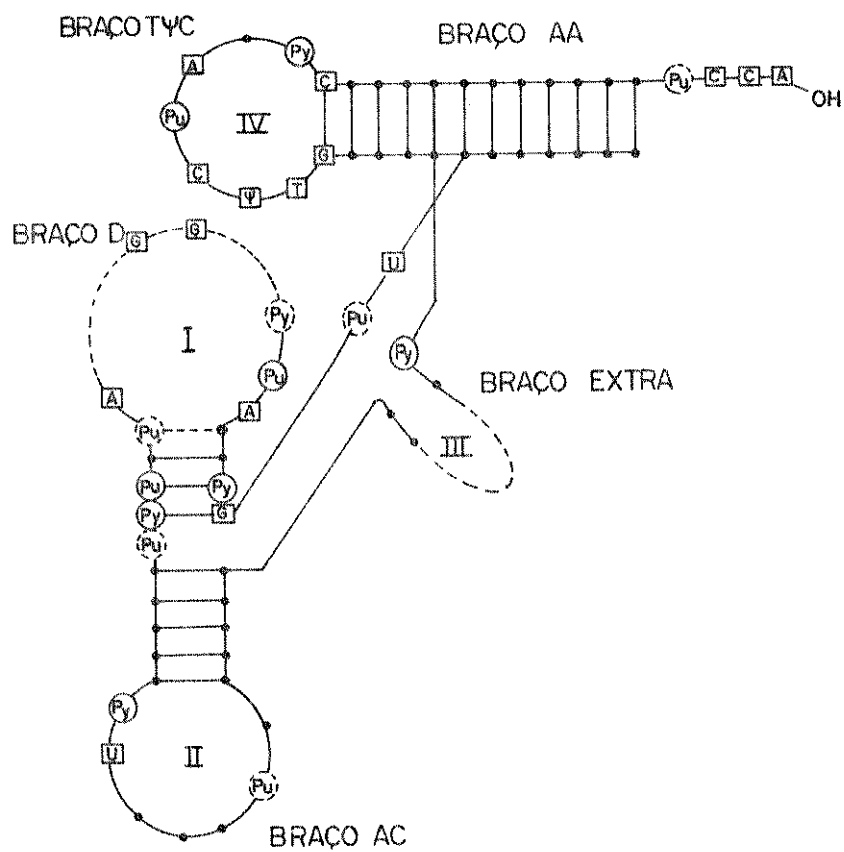


Figura II.6 - Estrutura em "L" do tRNA. Representa a estrutura terciária do polinucleotídeo.

Como mostra a fig. II.5, o emparelhamento de bases Watson-Crick dá origem a quatro regiões de dupla hélice a, b, c, e d, três das quais são fechadas por regiões de bases não emparelhadas I, II e IV (119). Um braço é formado por uma região de bases emparelhadas mais uma de bases não emparelhadas. A maioria das formas de "folha de trevo" do tRNA tem regiões marcadamente constantes. Há sempre um grupo fosfato no terminal 5', enquanto no terminal 3', onde o amino-ácido se liga, há uma sequência comum C-C-A (citidina-citidina-adenina). Além disso, as regiões a, c e d contêm 7,5 e 5 pares de bases, respectivamente, e as regiões II e IV contêm cada uma 7 nucleotídeos não emparelhados.

A região b pode conter 3 ou 4 pares de bases Watson-Crick. As regiões variáveis são as I, II. Os braços também podem ser chamados por nomes históricos triviais como mostra a fig. II.5. Por exemplo, região I + b é chamado de braço D, pois normalmente contém a dihidrouridina; região II + c é o braço anticódon (AC), desde que contém o anticódon; região III chama-se "dedo variável" ou "braço extra"; e a IV + d é o braço T ψ C. A região a também é chamada de braço do amino-ácido (AA), pois é lá que o amino-ácido se liga.

II.2 - Função

A natureza geral pela qual a informação genética em uma célula viva é expressa, tem sido estudada nos últimos anos; a informação genética que é usualmente estocada no DNA (ácido desoxirribonucleico), é transcrita no RNA mensageiro e, então traduzida em proteínas.



O papel central da tradução é executado pelos tRNAs que atuam como veículos da transferência de amino-ácidos do estado livre dentro da célula para a formação da proteína.

Esse processo tem sido amplamente estudado na tentativa de elucidar a importância das estruturas secundária e terciária dos diferentes tRNAs (120-122).

A tradução da sequência nucleotídica do mRNA em proteínas se processa em dois passos principais. Primeiro uma molécula de amino-ácido é ligada a uma molécula de um tRNA particular, uma reação catalisada por uma grande enzima chamada amino-acil-tRNA sintetase. Há muitos tipos de sintetases em células vivas, cada uma específica para um dos 20 amino-ácidos encontrados nas proteínas. Uma vez que o tRNA tem um amino-ácido ligado, está pronto a participar do segundo passo, a junção do amino-ácido à cadeia proteica, que se dá no do ribossoma. Este processo está esquematizado na figura II.7. A ligação do tRNA no ribossoma se processa através de três nucleotídeos específicos chamados de anticódon os quais interagem com três outros nucleotídeos complementares chamados de códon no mRNA.

Uma variação provocada química ou fotoquimicamente na estrutura do tRNA pode alterar um destes passos ou os dois simultaneamente, modificando a síntese proteica (121).

Além da aminoacilação e formação de proteína, o tRNA participa de outros processos celulares, como controle da biossíntese de amino-ácidos e controle do desenvolvimento e crescimento celulares (114).

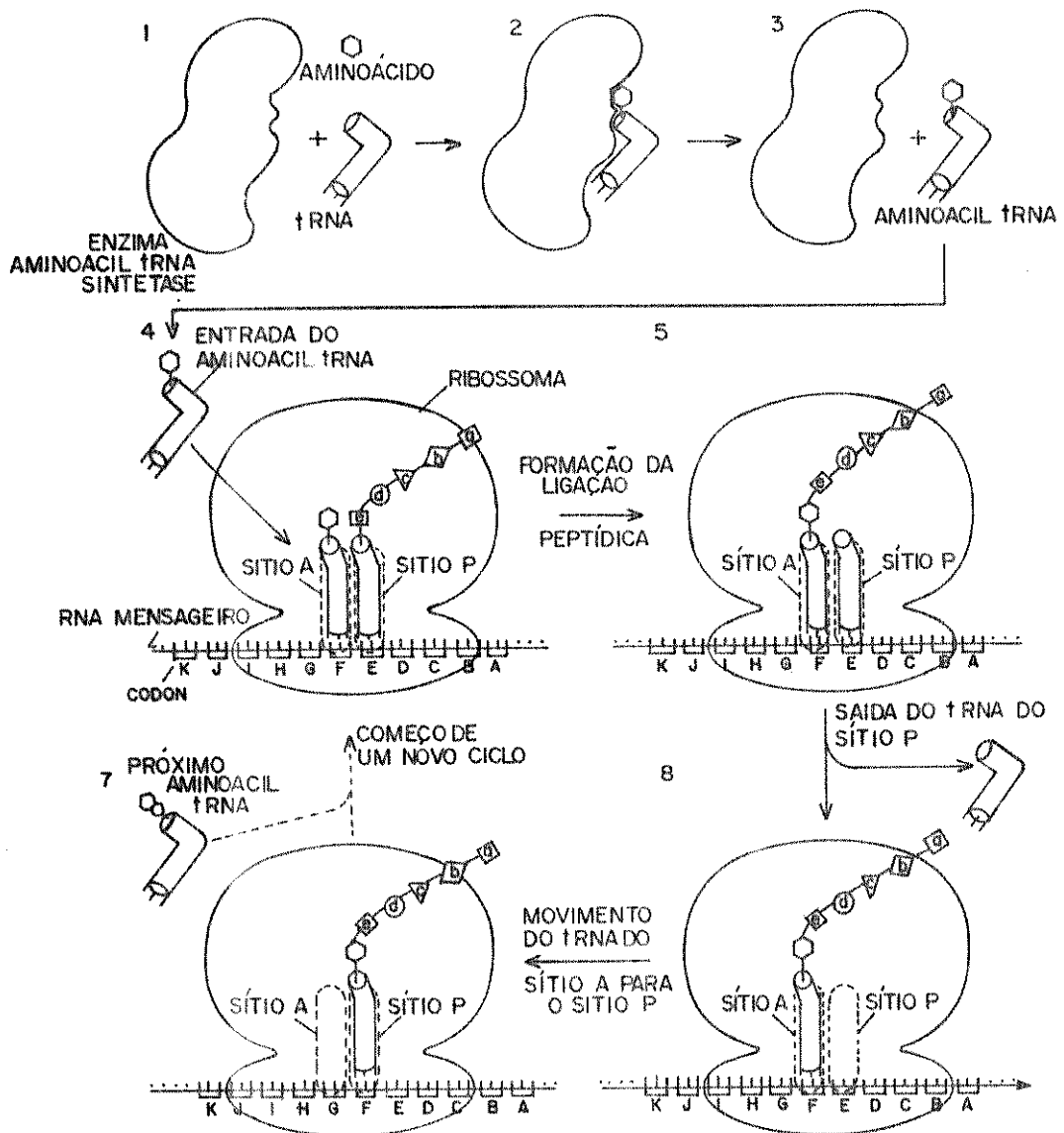


Figura II.7 - Função de tRNA na síntese proteica. Primeiro uma enzima chamada amino-acil-tRNA-sintetase liga um amino-ácido à molécula de tRNA específica. Em seguida este tRNA se liga ao ribossoma no sítio A onde o amino-ácido é ligado à cadeia polipeptídica da proteína.

II.3 - Bases Modificadas

Sabe-se pouco sobre a função específica das bases modificadas encontradas nos tRNAs. Existem bases como a 4-tiouridina (123) no tRNA de E. coli e a base Y (124) nos tRNAs de leveduras que são altamente fluorescentes (125,126) e que podem ser usadas no estudo conformacional dos tRNAs e, ainda, estão envolvidas em vários processos celulares (115),

II.3.1 - Base Y

A base Y tem sido encontrada próxima ao terminal 3' do anticódon dos tRNAs de leveduras (127) bem como em tRNAs de outras espécies (128-134). Foi isolada em três formas diferentes (fig. II.8) (135), as quais foram sintetizadas por Frihart e col. em 1978 (132).

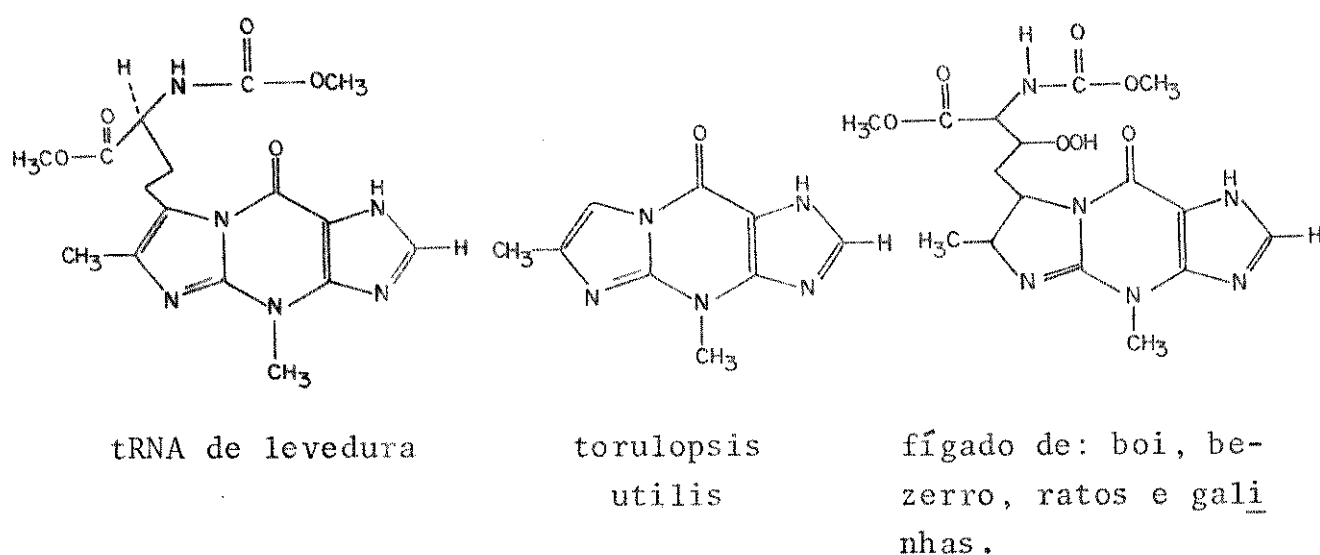


Figura II.8

Esta base ligada ao tRNA de levedura apresenta máximos de excitação em 320 nm e 280 nm com um ombro de 254 nm, enquanto que o máximo de emissão localiza-se em 430 nm (128) e tem

sido muito útil no estudo conformacional do anticódon dos tRNAs em que se encontra (133, 134).

II.3.2 - 4-Tiouridina

A 4-tiouridina (4-TU) (fig. II.2) é um nucleotídeo presente nos tRNAs de E. coli ocupando a oitava posição do terminal 5' (fig. II.5) na estrutura da macromolécula (136). Esta posição entre a dupla hélice do braço AA e do D é estrategicamente importante nas estruturas secundária e terciária da cadeia macromolecular (116), assim, mudanças estruturais do tRNA devem refletir alterações nas propriedades espectroscópicas da base (137).

A 4-TU é derivada da uridina, mas suas propriedades espectroscópicas diferem consideravelmente (138). A banda de absorção da 4-TU tem máximo em 335 nm, enquanto que a da uridina está em 260 nm. O fato mais discrepante é que a 4-TU livre mostra uma emissão (embora fraca em solução aquosa e temperatura ambiente) centrada em 550 nm ao passo que a uridina praticamente não fluoresce nestas condições ($\phi_F \sim 5 \times 10^{-5}$) (139). Em baixas temperaturas, aparece uma outra banda de emissão a 475 nm e a de 550 nm se desloca para um comprimento de onda mais baixo, 520 nm. Ligada ao tRNA, a 4-TU apresenta um espectro de emissão com máximo em 510 nm (140) cuja intensidade é grandemente afetada por íons Mg^{++} indicando que esta base pode ser usada como sonda para o estudo conformacional de tRNA (137).

II.4 - Efeito de cátions na conformação de tRNA

Devido às fracas interações envolvidas na estrutura terciária dos tRNAs, tanto no de levedura como no de E.coli, pode haver modificações da sua conformação por influência do pH do meio (141). Tais modificações podem ser evitadas ou diminuídas por adição de cátions divalentes como Mg^{++} , pois este cátion aumenta o grau de ordem da molécula do tRNA (142).

O estudo do efeito deste íon sobre o tRNA tem se desenvolvido ultimamente (143,144) indicando que existe na macromolécula um sítio especial para a ligação do Mg^{++} (145). Estas mudanças conformacionais são geralmente detectadas acompanhando-se modificações na fluorescência do tRNA (146) ou verificando-se o espectro de dicroísmo circular do tRNA na presença ou ausência do íon (147).

Outros cátions, trivalentes por exemplo, também podem interagir com o tRNA. Térbio III (148) e európio III (149) que são fluorescentes, se ligam ao ácido nucleico possibilitando o estudo conformacional através das modificações da luminescência do próprio íon ou por transferência de energia, sendo por isso chamados de sondas fluorescentes.

II.5 - Fotoquímica do tRNA

A fotoquímica de ácidos nucleicos é um campo importante da biologia molecular. Vários resultados baseados em reações fotoquímicas de ácidos nucleicos têm sido revisados em relação ao seu significado biológico (150-153).

Devido ao fato do tRNA possuir bases fluorescentes, a sua fotoquímica torna-se um pouco diferente da dos outros ácidos nucleicos. Citaremos aqui apenas alguns pontos que consideramos

bastante relacionados com o trabalho que descreveremos posteriormente.

II.5.1 - Transferência de Energia

A transferência de energia é uma técnica bastante útil para investigação da estrutura terciária do tRNA. Pode ser usada para medir a distância entre dois grupos fluorescentes ligados à macromolécula (154-156). O fato do tRNA de levedura possuir a base Y (fluorescente) adjacente ao anticódon sugere que esta técnica se aplique adequadamente aos estudos conformacionais e a única coisa que se deve fazer é ligar um aceptor de energia em algum sítio do tRNA (157,158). Pode ocorrer, ainda, a transferência de energia intramolecular (159).

No caso do tRNA de E. coli, por exemplo, a 4-TU na posição-8 pode sofrer fotorreação especificamente com a citidina na posição-13 (160) que pode ser seguida pela fluorescência da forma reduzida do produto formado (161).

II.5.2 - Reações de Cicloadição

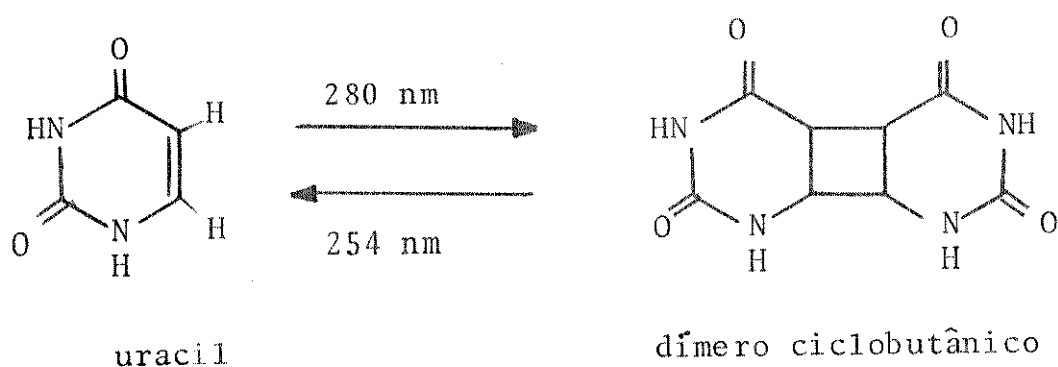
a) Dimerização

Tem-se descrito amplamente a fotoinativação da capacidade aminoaciladora de tRNA por meio de irradiação direta com luz ultravioleta (UV) (162,163) devido principalmente à formação de dímeros de uracil e de citosina (164).

Sabe-se que a dimerização de pirimidinas pode ser feita por sensibilização de acetona (165). Lamola e col. (166) aplicaram primeiramente esta técnica ao DNA, obtendo a formação de dímeros de timina. Os resultados de Chambers e col. (167) obtidos aplicando a mesma técnica ao tRNA, mostraram inibição da ati

vidade de aminoacilação causada por formação de dímeros pirimidínicos.

A formação de dímeros de bases pirimidínicas do tipo ciclobutano (esquema XVI) por ação de luz UV tem sido intensamente estudado tanto por irradiação direta (168-170) como por sensibilização por acetona (171).



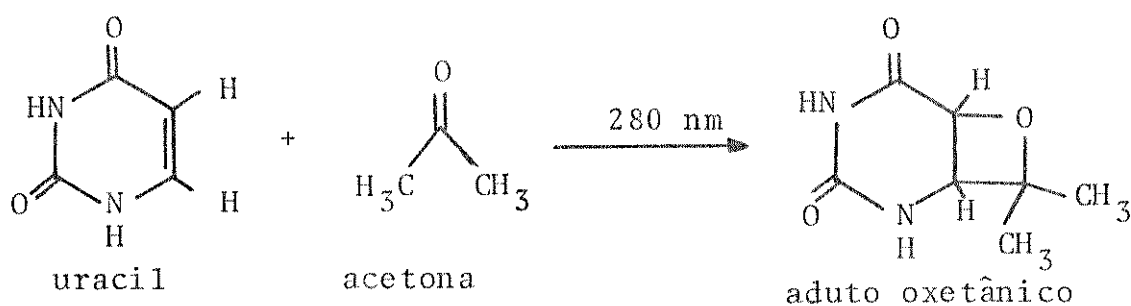
ESQUEMA XVI

Tem-se encontrado, ainda que há formação de heterodímeros (172) citosina-uracil em DNA.

b) Formação de Adutos

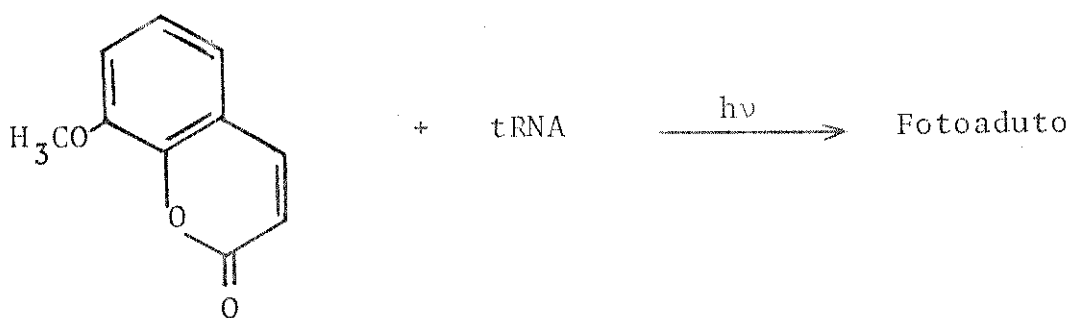
Sabe-se que compostos olefínicos ou acetilênicos sofrem fotoadição de aldeídos ou cetonas dando um produto do tipo oxetano (173). Esta reação é conhecida como reação Paterno-Büchi (174-176) e envolve a reação de aldeídos aromáticos polinucleares com olefinas dando oxetanos num rendimento quântico muito alto (~0,4-0,7).

Em 1975, Varghese (177) pode caracterizar o aduto oxetânico formado na irradiação de uracil e acetona (Esquema XVII).



ESQUEMA XVII

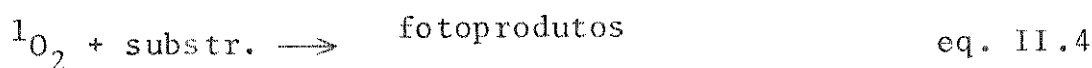
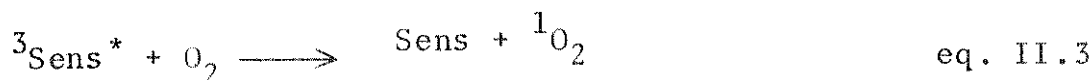
Outro produto deste tipo é descrito por Ou e col. (178) que está envolvido na incorporação de 8-metoxipsoraleno no tRNA de E. coli (Esquema XVIII).



ESQUEMA XVIII

II.6 - Ação Fotodinâmica

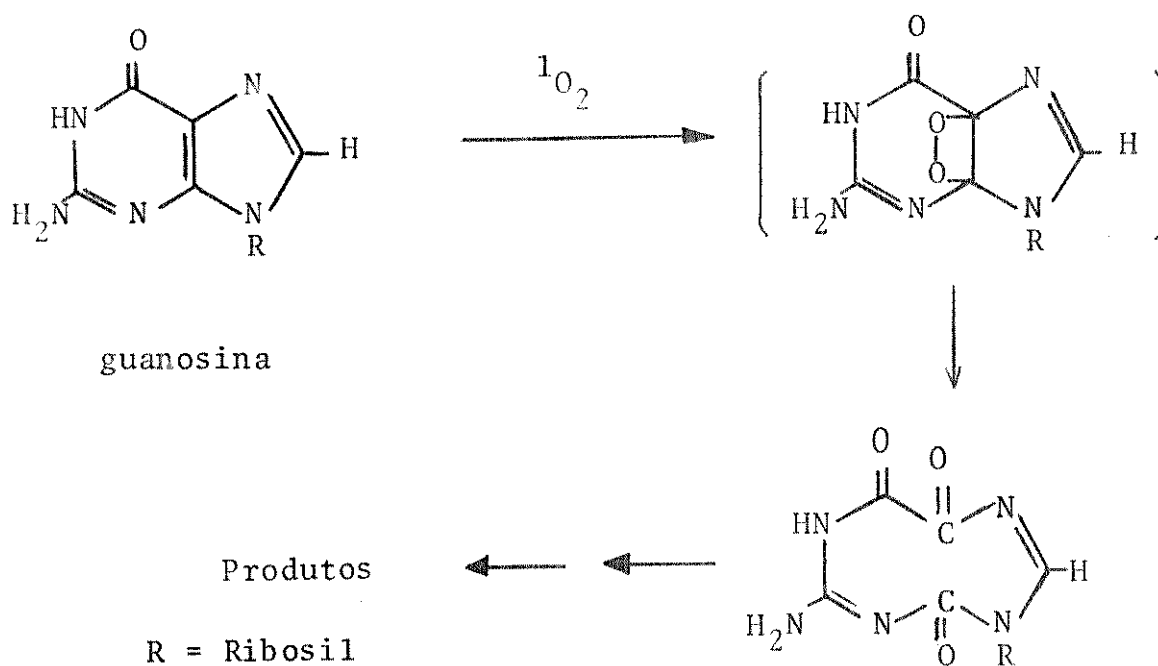
Entende-se por ação fotodinâmica aquela em que existe fotorreação sensibilizada por corante onde o oxigênio é consumido e o corante é regenerado, isto é, atua somente como catalisador (Equação II.1 a II.4).



A reação de oxigênio singlete sobre moléculas biológicas foi resumida por Kittler e col. (179).

Oxigênio singlete é capaz de atuar sobre o tRNA causando alterações na sua capacidade aminoaciladora ou mesmo inativando-o (180-183), mas aparentemente, Mg^{++} usado numa concentração ótima pode ser capaz de protegê-lo deste efeito (184).

Estudos detalhados sobre qual resíduo nucleotídico que é afetado por oxigênio singlete indicam que guanosina é o único que sofre fotooxigenação (185,186) (Esquema XIX).



ESQUEMA XIX

III - OBJETIVOS DA TESE

O fato de que a função da ligação do derivado do IAA com tRNA não era muito conhecida, tornou necessário um estudo sistemático do produto de adição entre IAL e outros possíveis produtos da oxidação IAA/HRP/O₂, com tRNA para apoiar a hipótese de que realmente este aduto tinha o poder da auxina.

Além disso, a demonstração de que compostos enzimenergizados podem transferir energia para DNA, flavinas e drogas fototóxicas (87), abriu novas perspectivas para o estudo das funções da energia gerada enzimaticamente no mecanismo de ligação ao tRNA, bem como o seu reflexo em crescimento de plantas.

Para se ter uma boa correlação entre processos bioenergizados e fotoquímicos, estudou-se os produtos dos dois. O estudo de métodos bioenergizados é de grande importância, pois pode mostrar a utilização de energia gerada através de produtos excitados em processos bioquímicos normais. E mais, poder-se-ia explicar numerosos fenômenos que até agora só foram comprovados mediante processos fotoquímicos. Entretanto, estes são pouco adequados, pois as reações biológicas são realizadas dentro da célula onde a possibilidade de penetração da luz é menor.

Tendo em mente estes propósitos, nos dispusemos a seguir a sistemática resumida abaixo:

(A) estudo do sistema enzimático nas condições em que o IAL eletronicamente excitado era produzido com maior eficiência;

(B) estudo de substratos similares ao IAA de maneira a diferenciar a produção de estados excitados (π, π^*) vs (n, π^*);

(C) identificação do aduto entre o metabólito de IAA e tRNA;

(D) função biológica deste aduto.

CAPÍTULO 2
PARTE EXPERIMENTAL

I - MATERIAL

I.1 - Reagentes

Os reagentes obtidos da Sigma Chemical Co. foram os seguintes: HRP (tipo VI), tRNA de E. coli strain W, IAL, uridina, uracil, citidina, adenosina, guanosina, bilirrubina, 4-tiouridina-5'-monofosfato, ATP, L-histidina, glutationa, N,N-bis(2-hidroxi-etil)glicina (bicina), lisozima (grau I), β -mercaptoetanol, ácido tricloroacético (TCA), sacarose, tris, albumina de soro bovino, ribonuclease T₁ (grau III), ribonuclease A (tipo 1A), L- β ,3,4 dihidroxifenilalanina (dopa).

Eosina, IAA, óxido de deutério (D₂O), acetato de magnésio, cloreto de magnésio e cloreto de potássio foram obtidos da Merck.

Acetato de sódio foi da Dyne Produtos Químicos e 1,4-diazobiciclo (2.2.2) octano (DABCO), fenilacetaldeído (PAA) e fenilpropanaldeído (PPA), foram da Aldrich.

Fosfodiesterase de veneno de cobra (código UPH) e fosfatase alcalina bacteriana (código BAPH) foram usadas as da Worthington Biochemical Corp..

Da New England Nuclear foram usados os seguintes: (2-¹⁴C)-IAA, (³H)-uridina, (³H)-citidina, (³H)-guanosina, (³H)-adenosina, (¹⁴C)-valina, (¹⁴C)-fenilalanina, (¹⁴C)-lisina, (¹⁴C)-arginina, (¹⁴C)-treonina.

Eritrosina B e acetato de etila foram da Fisher Scientific Co.; fluoresceína e rosa bengala da BDH Chemicals Ltd.; e ácido acético da J.T. Baker. Da Carlo Erba, usou-se os seguintes: álcool isopropílico, hidróxido de amônio, clorofórmio, tolueno (grau radioquímico), éter etílico, álcool etílico e álcool metílico.

Fostafo mono e bibásico de sódio foram da QEEL Indústrias Químicas S.A.

A hiperacina foi da ICN Pharmaceuticals Inc.

As membranas de nitrocelulose foram da Millipore Corporation.

Os compostos 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato sódico (DBAS) e antraceno-2-sulfonato sódico (AS) foram preparados de acordo com o método de Battegay e col. (187); e, 9,10-difenil-antraceno-2-sulfonato sódico (DPAS), segundo o método de Etienne e col. (188).

A tRNA de levedura foi isolado segundo o método de Rubine e col. (199).

I.2 - Aparelhagem

As medidas de consumo de oxigênio foram feitas em um monitor biológico de oxigênio da Yellow Springs Instruments, modelo 53, a temperatura ambiente.

Os espectros nas regiões ultra-violeta e visível, bem como as medidas cinéticas a $\lambda_{\text{constante}}$ foram obtidas num espectrofotômetro registrador Zeiss DMR-21.

Os espectros de dicroísmo circular foram realizados num espectropolarímetro Cary-60, equipado com acessório de dicroísmo circular modelo 6002 utilizando celas circulares de quartzo.

Para as medidas espectrofotométricas utilizou-se celas de quartzo de 1 cm de caminho ótico, volume de 3 ml.

As emissões de luz provenientes da reação enzimática e parte do estudo de transferência de energia foram medidos num contador de cintilação líquida de Beckman LS-100c, com o circuito de coincidência desligado.

Os espectros de quimiluminescência e também a transferência de energia para os corantes xantênicos e compostos antracênicos foram realizados num contador de fótons Hamamatsu TV-C-767 (189).

No estudo de incorporação isotópica utilizou-se, além do contador de cintilação líquida Beckman LS-100c, o cintilador LS-250 da Beckman.

As intensidades e distribuições espectrais de fluorescência foram medidas no espectrofluorímetro da Perkin-Elmer MPF-4.

Os espectros na região do infra-vermelho foram feitos num Espectrofotômetro Infra-Vermelho da Perkin-Elmer modelo 337 utilizando microcelas de NaCl para filmes líquidos; os espectros de massa foram obtidos num Espectrômetro de Massa da Finnigan 1015/SL acoplado a um cromatógrafo a gás e um sistema de computação modelo 6000; e, os espectros de Ressonância Magnética Nuclear, num Espectrômetro de RMN da Varian modelo XL-100A-15.

A síntese do fotoaduto uridina-IAL foi realizada num reator de fotólise de Pyrex (fig. I.1), utilizando uma lâmpada de vapor de mercúrio de média pressão, 125 watts conectada a um reator apropriado da Philips, sem filtros.

A evaporação do solvente foi realizada primeiramente em evaporador rotatório Buchler Instruments com bomba de vácuo anexa e posteriormente em um liofilizador Virtis.

Os valores de pH foram lidos num potenciômetro Metrohm-Herisau E512 e as pesagens realizadas em uma balança analítica Mettler H54AR.

Para as cromatografias foram utilizadas placas de camada delgada de Sílica Gel com marcação 254 nm da Merck, ou papel Whatman nº 1, conforme conveniente. A lâmpada UV usada para revelação cromatográfica era da Ultra-Violet Products Inc. modelo IVSL-25.

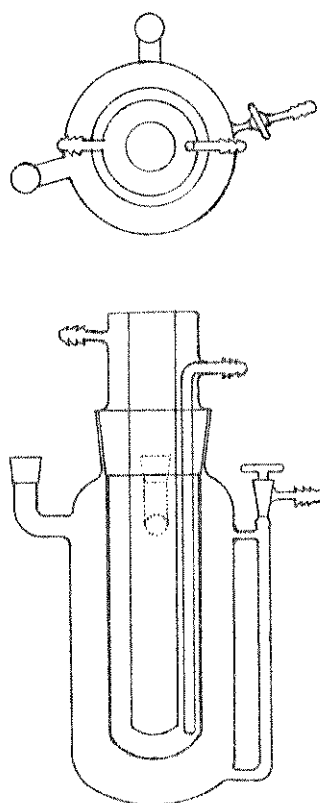


Figura I.1 - Aparelho para fotólise utilizado na síntese do aduto IAL-uridina (200).

II - PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

II.1 - Condições Padrão da Reação IAA/HRP/O₂

A mistura de reação continha 10^{-4} M de IAA, 30 μ M de EDTA, 0,25 μ M de HRP em tampão acetato 0,05 M pH 3,8, contendo 0,17 M de etanol. Estas condições foram mantidas em todos experimentos, exceto quando especificado.

II.2 - Solução Tampão

Na preparação das soluções tampão eram utilizadas as tabelas de Gomori (190).

A preparação de tampão em óxido de deutério (D₂O) foi feita levando em consideração que $pH = pD + 0,4$ (191,192).

II.3 - Solução de Peroxidase

As soluções estoques de HRP eram preparadas pela dissolução de 4 mg da enzima por ml de solução em água, para dar uma concentração aproximada de 10^{-4} M (PM=40.000). Depois de preparada a solução, lia-se a intensidade de absorção na região visível (λ_{403}) diluindo-se ~3 μ l da solução estoque em 2,5 ml de água. Calculava-se a concentração (c') da última solução por:

$$A = \epsilon l c'$$

onde ϵ é o coeficiente de extinção molar da HRP naquele comprimento de onda e vale $102.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (74), e l , o comprimento do caminho ótico (1 cm). Sabendo-se c' calculava-se a concentração real da solução estoque por:

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

II.4 - Soluções de DBAS, DPAS e AS

Devido à pouca solubilidade destes compostos, as soluções eram preparadas com 2% de etanol seguindo o procedimento abaixo:

Pesava-se aproximadamente 1 mg de cada composto e adicionava-se 0,1 ml de etanol e ~4,5 ml de H₂O. Agitava-se em agitador magnético por 3 horas, protegidos da luz. Se ainda houvesse alguma partícula não dissolvida, filtrava-se e completava-se o volume para 5 ml. Esta solução deveria dar aproximadamente $5 \times 10^{-4} \text{M}$. Sabendo-se que o $\epsilon(\lambda_{382})$ para o DBAS é $8940 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, o $\epsilon(\lambda_{375})$ para o DPAS é $5040 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e o $\epsilon(\lambda_{360})$ para o AS é $4558 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (193), calculava-se a concentração exata de cada solução estoque utilizando o mesmo procedimento que o usado para HRP, descrito anteriormente.

II.5 - Solução de tRNA de E.coli

Para se preparar 1 ml de uma solução estoque de $4 \times 10^{-4} \text{M}$, pesava-se 10 mg de tRNA e dissolvia-se em água bidestilada. Tomava-se uma alíquota de 1 μl desta solução, diluía-se em 2,5 ml de H₂O e lia-se a absorbância (D.O.) em λ_{260} . Sabe-se que 1 D.O. corresponde a uma concentração de 45 $\mu\text{g/ml}$. Assim achamos a concentração aparente c' . A concentração real em mg/ml era calculada como descrita para a HRP. Considerando peso molecular do tRNA como 25.000 g, achou-se a molaridade da solução.

II.6 - Solução de IAA

Preparava-se uma solução estoque de 10^{-2}M , dissolvendo-se 1,75 mg de IAA (PM=175,19g), por ml de solução em etanol, guardando-a a 0°C protegida da luz para evitar possível fotodecom

posição.

II.7 - Solução de IA1

O IA1 era preparado dissolvendo-se 1,47 mg de IA1 (PM=147 g) por ml de solução para uma concentração de $10^{-2}M$, usando etanol como solvente. Era, então estocado a $0^{\circ}C$ e protegido da luz.

II.8 - Solução de Corantes Xantênicos

Para uma concentração final de $2 \times 10^{-3}M$ dos corantes, eram dissolvidos 1,40 mg de eosina, 0,66 mg de fluoresceína, 1,95 mg de rosa bengala e 1,80 mg de eritrosina B por ml de solução em H_2O . As soluções eram rigidamente protegidas da luz e preparadas imediatamente antes do seu uso. Os pesos moleculares são 698g, 332g, 973,7g e 880g para eosina, fluoresceína, rosa bengala e eritrosina B, respectivamente.

II.9 - Solução de 4-TU

Para uma solução estoque de concentração 0,1M, dissolvia-se 38,42 mg de 4-tiouridina 5'-monofosfato (PM=384,2 g) por ml de solução em água.

III - MÉTODOS

III.1 - Deteccção do Produto de Reacção

O indol-3-aldeído (IAL) foi detectado por cromatografia em papel ou camada delgada usando o seguinte sistema de

solvente: isopropanol, NH_4OH , H_2O , numa proporção 13:1:1(194) ($R_f \approx 0,98$); e caracterizado por espectro ultra-violeta. Outra técnica empregada foi a cinética de formação de IAL seguida espectrofotometricamente em λ_{305} .

III.2 - Síntese do Fotoaduto

Um volume de 360 ml de uma solução aquosa de IAL(33 mM) e uracil ou uridina^(*) (1,94 mM) em 16% de etanol foi irradiado de maneira semelhante ao método de Varghese(177). A irradiação foi feita num reator (Figura I.1) com lâmpada de mercúrio sem filtros. A solução foi borvulhada com N_2 por 1 hora antes de iniciar a irradiação e durante a irradiação (15 horas) para se assegurar que estivesse livre de O_2 dissolvido. A solução foi homogeneizada por agitação magnética e refrigerada com água durante todo o tempo de irradiação. A solução irradiada foi evaporada até aproximadamente 25 ml em evaporador rotatório a 35-40°C e filtrada ou, numa segunda preparação, liofilizada.

III.3 - Isolamento e Caracterização do Fotoaduto

O filtrado obtido no item anterior foi cromatografado preparativamente em papel usando o sistema de solventes do item III.1. A fração correspondente ao R_f 0,25-0,30 foi recortada, extraída com éter e evaporada. Na segunda preparação o produto foi isolado por recristalização em etanol do liofilizado. Após o isolamento, procedeu-se a caracterização por métodos de espectroscopia ultra-violeta, infra-vermelho, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa.

(*) Numa primeira preparação usou-se, uracil, na segunda, este reagente foi submetido por uridina por problemas de solubilidade.

III.4 - Incorporação Isotópica em tRNA

A mistura de reação continha, num volume final de 200 μ l, 30 μ M de EDTA, 50 μ M de (2- 14 C)-IAA e 500 μ g/ml de tRNA em tampão acetato 0,05 M, pH 3,8 ou 5,6 ou em tampão fosfato 0,05 M pH 6,8; as reações iniciavam-se pela adição de 0,25 μ M de HRP e eram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. A reação era interrompida pela adição de igual volume de fenol saturado com tampão e centrifugada. A fração aquosa desproteinizada, adicionava-se uma solução 5% de ácido tricloroacético (TCA). O precipitado era filtrado em fibra de vidro sob vácuo. O filtro era deixado em estufa para secagem (~15 min.) e, então colocado em recipiente para cintilação líquida contendo PPO-POPOP tolueno como "cocktail". A quantidade de isótopo era determinada em contador de cintilação líquida.

Fêz-se também um experimento fotoquímico, irradiando-se uma mistura de tRNA (500 μ g/ml) com (1- 14 C)-IAL (~25 μ M) por 18 horas a 280 nm em fluorímetro. Após a irradiação procedia-se da mesma maneira para precipitar o tRNA e contar sua radioatividade.

III.5 - Incorporação Isotópica das Bases

A mistura de reação descrita no item anterior era cromatografada em papel Whatmann nº 1 e desenvolvida no sistema de solventes citados no item III.1. Ressalva-se aqui que ao invés de tRNA a reação continha 10^{-4} M das bases (uridina, citidina, guanosina, adenosina e 4-TU). Cortava-se então, frações de 0,5 cm que eram colocadas em frascos para cintilação contendo o mesmo "cocktail" do item anterior e, contadas a radioatividade.

O mesmo ensaio fotoquímico descrito para o tRNA foi realizado com cada uma das bases, aplicando a metodologia de

detecção descrita acima.

Realizou-se ainda, experimentos fotoquímicos e enzimáticos utilizando as bases como reagente radioativo. Neste caso, utilizou-se a técnica desenvolvida anteriormente (descrita acima) tendo como mistura de reação 10^{-4} M de IAA, 30 μ M de EDTA, (3 H)-B^(*) e 0,25 μ M de HRP em 200 μ l de tampão acetato 0,05, pH 3,8.

III.6 - Síntese do (1- 15 C)-IAL

O (1- 14 C)-IAL foi obtido por cromatografia preparativa em papel da reação enzimática usando 50 μ M de (2- 14 C)-IAA, 30 μ M de EDTA e 0,25 μ M de HRP em tampão acetato 0,05M, pH 3,8. A fração correspondente ao Rf 0,92 foi recortada e submetida à extração com éter etílico que em seguida foi evaporado.

III.7 - Detecção de Produtos de Fotooxigenação da Guanosina

Para este estudo utilizou-se o método descrito por Cadet e col., (186).

A mistura de reação, num volume final de 5 μ l, continha 2×10^{-4} M de IAA, 30 μ M de EDTA, 9,8 μ M de (8,5'- 3 H)-Gua e 0,25 μ M de HRP, foi incubada a temperatura ambiente por 15 min.. Em seguida era feita a cromatografia em placa delgada em duas dimensões usando como eluentes os seguintes solventes:

solvente I: clorofórmio, metanol, água (4:2:1)

fase inferior + 5% de metanol

solvente II: acetado de etila, isopropanol, água (75:16:9)

(*) B = uridina, citidina, guanosina ou adenosina.

Para revelação utilizou-se tanto a lâmpada UV bem como a técnica de fluorografia que consiste em embeber a placa com "cocktail" PPO-POPOP tolueno e expô-la a um filme radiográfico durante um mês ou mais.

III.8 - Análise dos Nucleotídeos do tRNA

Para tal experimento, o tRNA foi submetido à digestão com endonucleases seguindo o método de Randerath e col. (195) com algumas modificações. Assim, 24 µg de tRNA foram submetidos ao tratamento com 15 µl de uma solução contendo Ribonuclease T₁ (0,6 mg/ml de *Aspergillus eryzae*), adicionando-se em seguida 2 µl de uma mistura de ribonuclease A de pâncreas de boi (2 mg/ml), fosfodiesterase de veneno de cobra (2 mg/ml), fosfatase alcalina (2 mg/ml) e cloreto de magnésio 0,01 M e 1 µl de bicina 0,6M pH 8,0. A digestão foi feita a 37°C por 20 horas. Em seguida fez-se a cromatografia do tRNA hidrolisado. (Ítem III11).

III.9 - Aminoacil-tRNA-Sintetase

A enzima aminoacil-tRNA-sintetase foi preparada livre de tRNA a 0°C segundo o método de Nirenberg (196) com algumas modificações. Células de *E.coli* (HB 101) foram dispersas em 60 ml de tampão (Tris 50 mM, pH 8,0, contendo 25% de sacarose) e tratadas com lisoзима (2 mg/ml) por 15 min. a 0°C. As células foram coletadas e lavadas 5 vezes com o mesmo tampão-sacarose e centrifugadas. Foram, então, ressuspensas em tampão (Tris 10 mM pH 7,3, 14 mM de acetato de magnésio e 60 mM de KCl, contendo 16 mM de β-mercaptoetanol). Foram submetidas à sonicagem com pulsos sucessivos a cada 30 segundos até que D.O.₆₀₀ fosse 15% do valor original. Fez-se uma centrifugação por 10 min. a 10.000 g e o sobrenadante foi centrifugado a 105.000g por 60 min. Este sobrenadante foi estocado a -70°C.

III.10 - Aminoacilação do tRNA

Foi usado o método de Johnson e col.(197) modificado. Uma mistura de reação de 0,1 ml contendo 2 mM de glutatona, 25 mM de cloreto de potássio, 20 mM de cloreto de magnésio, 0,5 mM de ATP, 0,01 mM dos aminoácidos (marcados - ^{14}C), 180 μg de tRNA de E.coli e 65 μg de aminoacil tRNA sintetase em 300 mM de tampão Tris-HCl pH 8,0 foi incubada a 37°C por 15 min.; a reação foi interrompida pela adição de 5% de TCA. O precipitado foi coletado em membrana de nitrocelulose, secado e em seguida contada a radioatividade em cintilador líquido.

IV - CÁLCULOS

IV.1 - Elipticidade Molar

Para os cálculos da elipticidade molar ($|\theta|_\lambda$) usou-se a seguinte expressão simplificada:

$$|\theta|_\lambda = \frac{\theta^0}{10} \frac{M}{lc'} \text{ grau} \times \text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1}$$

onde,

θ^0 - é a elipticidade observada,

c' - concentração da amostra,

M - peso molecular da amostra, e

l - caminho ótico em cm.

IV.2 - Obtenção dos espectros de quimiluminescência no contador de fótons Hamamatsu TV-C-767

Os espectros de emissão de luz dos sistemas IAA/HRP/ O_2

e IAA/HRP/tRNA/O₂ foram obtidos como descrito por Nakano e col., (198).

IV.3 - Rendimento Quântico

Calculou-se o rendimento quântico observado da reação IAA/HRP/O₂. O cálculo foi feito em relação ao padrão, isto é, "cocktail" de cintilação líquida de Hastings e Weber.

A leitura do padrão no contador de cintilação líquida Beckman LS-100c foi de 4×10^6 contagens em 6s. Foram feitas correções para volume, porque o volume do padrão utilizado era de 3 ml enquanto que o da mistura de reação era de 4 ml, e, também, em relação ao tempo de contagem que para a reação foi de 3 min.

Portanto:

$$\begin{aligned} 4 \times 10^6 \text{ contagens} &- 6\text{s} - 3 \text{ ml} \\ 5,3 \times 10^6 \text{ contagens} &- 6\text{s} - 4 \text{ ml} \\ 15,0 \times 10^6 \text{ contagens} &- 180\text{s} - 4\text{ml} \end{aligned}$$

Logo, a leitura do padrão após as correções é $1,5 \times 10^7$ contagens/4ml/3 min. Sabe-se que o padrão emite $6,2 \times 10^6$ hv/s/ml, portanto o padrão emite, nas condições especificadas, $4,5 \times 10^9$ hv.

Com base nestes dados, isto é, no número de fótons emitidos pelo padrão e no seu número de contagens em 4 ml e em 3 minutos, podemos calcular o número de fótons emitidos pela reação, IAA/HRP/O₂, pois sua emissão integrada a 3 minutos em 4 ml de reação é $3,7 \times 10^7$ contagens.

$$\begin{array}{lll} \text{Padrão} & 4,5 \times 10^9 \text{ hv} & \text{—————} 1,6 \times 10^7 \text{ contagens} \\ \text{IAA/HRP/O}_2 & 2,8 \times 10^9 \text{ hv} & \text{—————} 1 \times 10^7 \text{ contagens} \end{array}$$

Para o cálculo do rendimento quântico observado, deve-se saber também o número de moléculas que reagiram, no caso O_2 , pois:

$$\phi_{\text{obs}} = \frac{h\nu}{\text{moléculas reagentes}} \quad (1)$$

Considerando que: (1) a formação de IAL é aproximadamente estequiométrica no consumo de O_2 ; (2) a solução é $2 \times 10^{-4} M$ em relação ao O_2 (saturação do ar); (3) a velocidade de reação não depende do consumo de oxigênio, ou seja, é constante durante o consumo deste; (4) a reação termina em aproximadamente 3 minutos e consome cerca de 30% do oxigênio do meio. Assim,

$$\begin{array}{lcl} 2 \times 10^{-4} M \text{ de } O_2 \text{ consumido} & \text{—————} & 100\% \\ 6 \times 10^{-5} M \text{ de } O_2 \text{ consumido} & \text{—————} & 30\% \end{array}$$

6×10^{-5} moles/l de O_2 em 4 ml (volume de reação).

Isto indica que 24×10^{-8} moles de O_2 são consumidos em 3 minutos. Então o número de moléculas de O_2 consumidas em 4 ml de reação, num tempo de 3 minutos é $24 \times 10^{-8} \times 6 \times 10^{23} = 14,4 \times 10^{16}$.

Substituindo-se os respectivos valores na expressão (1), tem-se:

$$\phi_{\text{obs}} = \frac{2,8 \times 10^9}{1,4 \times 10^{17}} = 2 \times 10^{-8} \text{ Einstein/mol}$$

que é o rendimento do sistema IAA/HRP/ O_2 na ausência de qualquer acceptor.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

I - SISTEMA IAA/HRP/O₂I.1 - Consumo de Oxigênio

O IAA é degradado aerobicamente por ação catalítica de HRP consumindo 30% do oxigênio dissolvido em 3 minutos de reação (Fig. I.1) nas condições padrão especificadas no ítem II.1 da Parte Experimental (pág. 53).

Sob outras condições, a saber IAA (12,5 μM)/HRP (2 μM), obteve-se o consumo de Oxigênio mostrado na Fig. I.2, que ao adicionar-se igual quantidade de IAA após 40 seg. de reação (fase em que a reação atinge o estado estacionário), consome novamente a mesma quantidade de oxigênio na mesma velocidade que o primeiro.

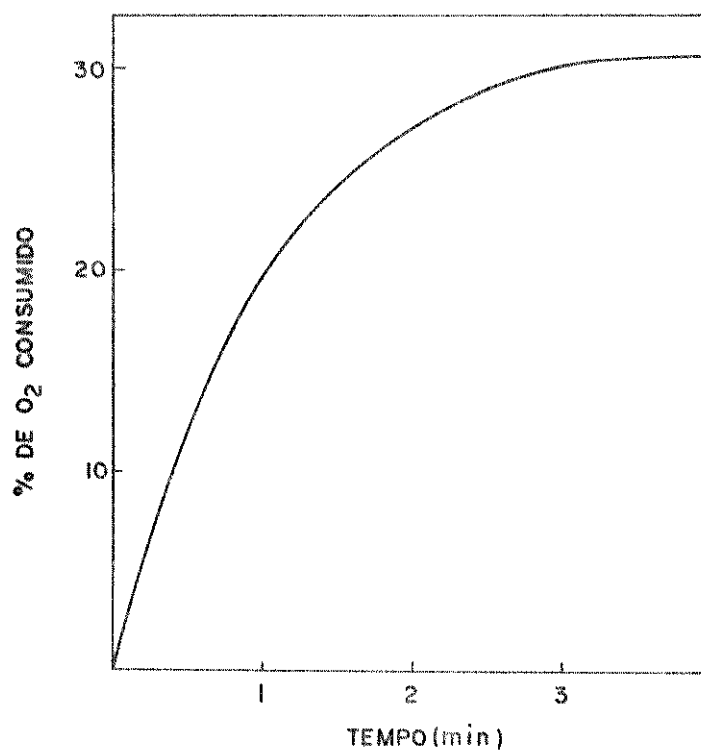


Figura I.1 - Gráfico da cinética de consumo de O₂ da reação contendo IAA (10^{-4}M), HRP (0,25 μM) EDTA (30 μM) e 0,17 M de etanol em tampão acetato 0,05 M pH 3,8; temperatura ambiente.

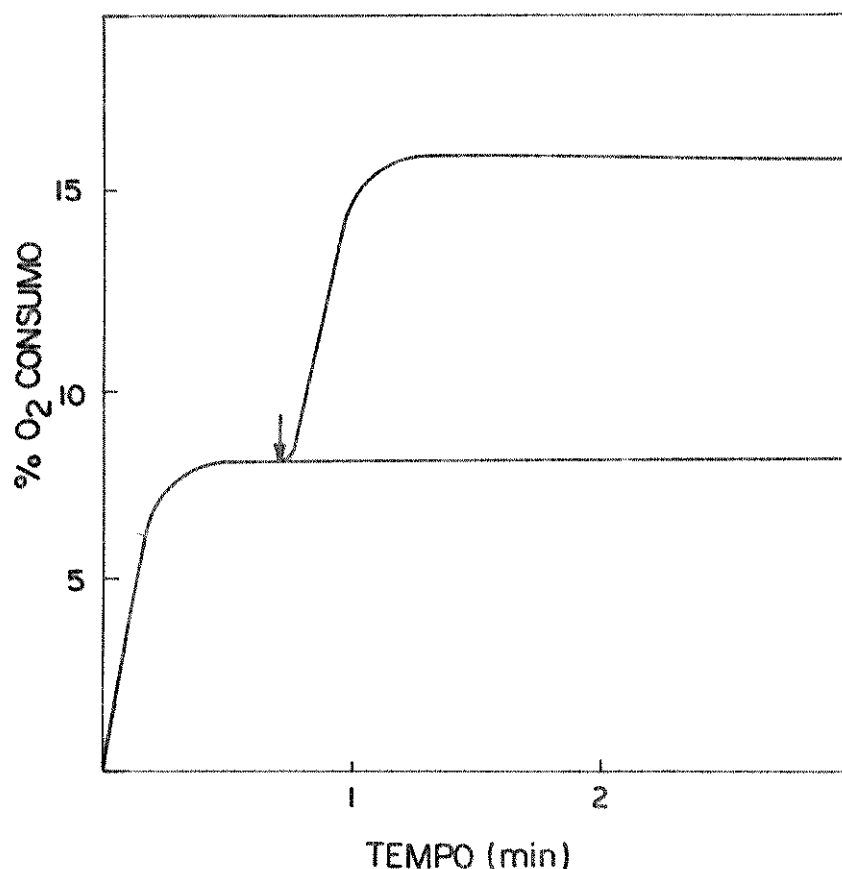


Figura I.2 - Gráfico da Cinética de consumo de oxigênio do sistema IAA ($12,5 \mu\text{M}$)/HRP ($2 \mu\text{M}$)/ O_2 ; e, segunda adição de IAA ($12,5 \mu\text{M}$) após 40 segundos de reação. Temperatura ambiente.

I.2 - Formação de Produto

Acompanhou-se a formação de IAL cromatograficamente como descrito no item III.1 da Parte Experimental (pág. 55). Com este método detectou-se IAL como único produto de reação nas condições padrão, apresentando um R_f de 0,98.

Outro método empregado foi o de cinética de formação de produto, acompanhada espectrofotometricamente (pág. 56) com $\lambda_{\text{constante}}$ a 305 nm onde o IAL absorve mas IAA não o faz (Fig.I.3).

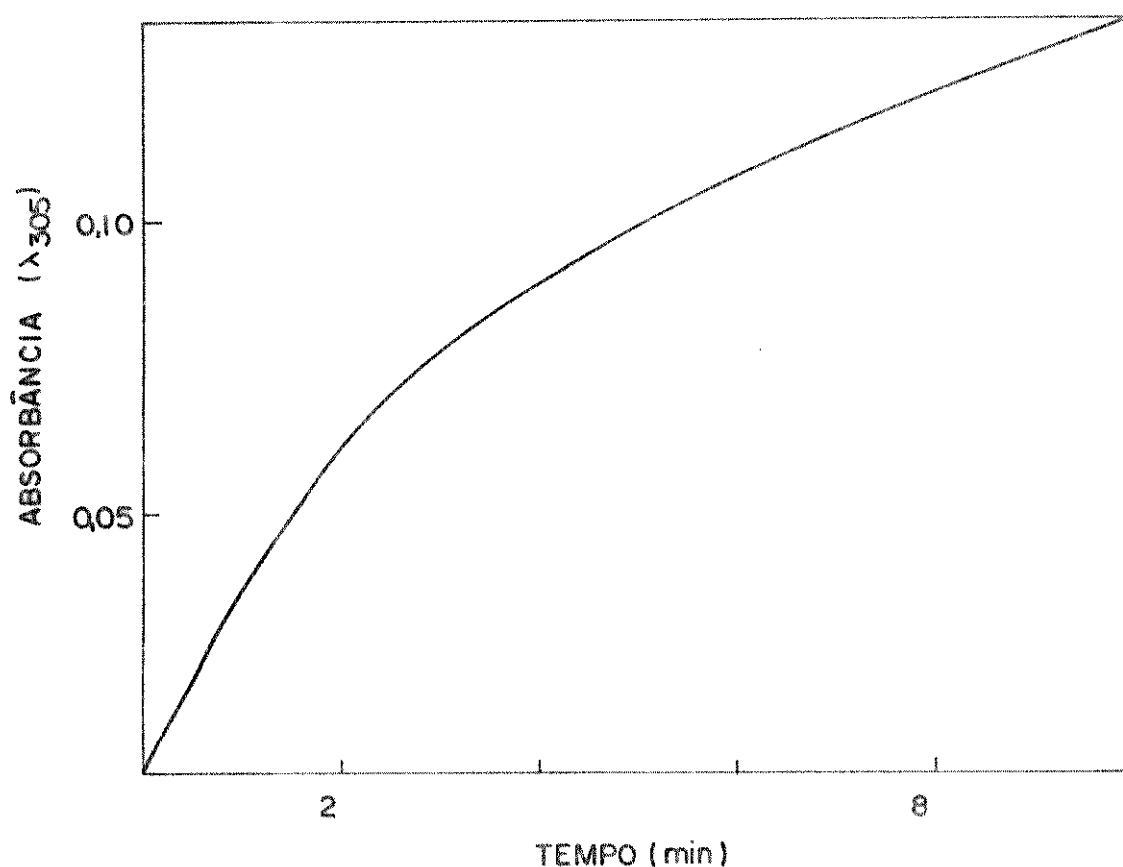


Figura I.3 - Cinética de formação de IAL na reação IAA (10^{-4} M) / HRP ($0,6 \mu\text{M}$) / O_2 , contendo $30 \mu\text{M}$ de EDTA e $0,17 \text{ M}$ de etanol. A reação foi acompanhada a 305 nm ; e, temperatura ambiente.

I.3 - Emissão Fotônica

O sistema IAA/HRP/ O_2 apresentou emissão fotônica com uma eficiência quântica de 2×10^{-8} Einstein/mol nas condições padrão de reação.

A cinética de emissão pode ser correlacionada com a deformação de produto, mas não com a de consumo de oxigênio como mostra a Fig. I.4.

Estudou-se, também, a transferência de energia para vários compostos, utilizando a metodologia descrita no Apêndice I (pág. 161).

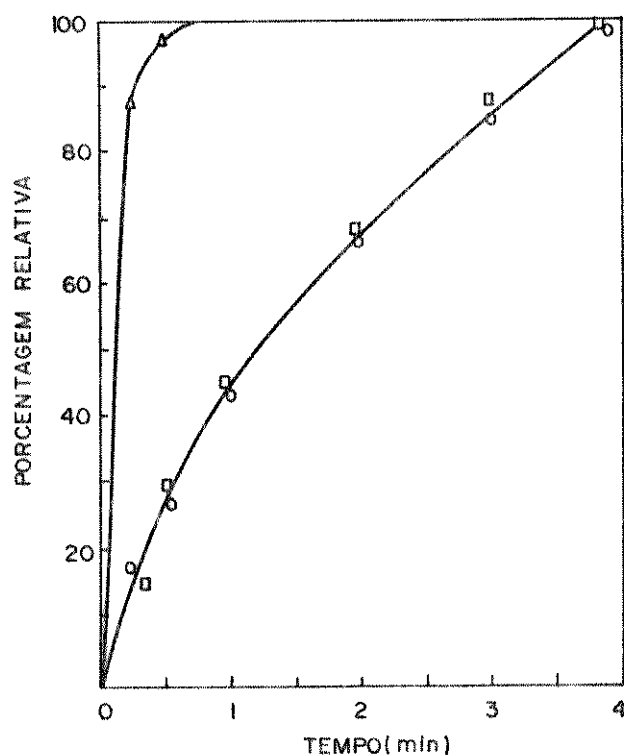


Figura I.4 - Gráfico comparativo entre consumo de oxigênio ($-\Delta-$), emissão fotônica ($-o-$) e formação de IAL ($-\square-$) da reação IAA ($2 \times 10^{-4} \text{ M}$)/HRP ($2 \text{ } \mu\text{M}$)/EDTA ($30 \text{ } \mu\text{M}$)/ O_2 em tampão acetato $0,05 \text{ M}$ pH 3,8, contendo 39 mM de etanol.

I.3.1. Corantes Xantênicos e Compostos Antracênicos

Antes de estudar a influência destes compostos na emissão fotônica do sistema de reação, testou-se em que faixa de concentração de corante se poderia trabalhar para que a cinética de consumo de oxigênio não fosse alterada. Este estudo foi realizado nas condições padrão de reação, mas em 3 meios diferentes: tampão acetato $0,05 \text{ M}$, pH 3,8, 5,6 e, tampão fosfato $0,05 \text{ M}$ pH 6,8. Os resultados mostrados na Fig. I.5 (a,b,c) indicam que a concentração máxima de corante que poder-se-ia utilizar sem alterar a cinética de consumo de oxigênio era $2,5 \times 10^{-7} \text{ M}$ para eosina e fluoresceína e $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ para rosa bengala e eritrosina B.

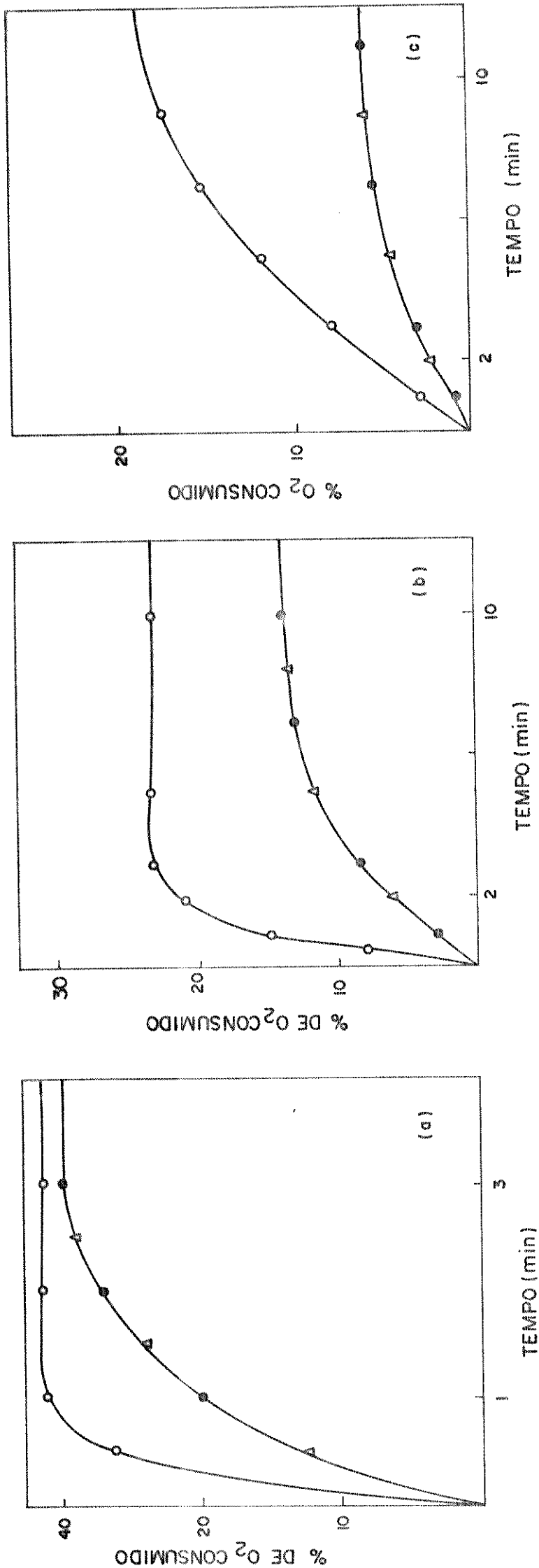


Figura I.5 - Gráficos de cinética de consumo de O_2 da reação IAA ($10^{-4}M$)/HRP ($0,25 \mu M$)/EDTA ($30 \mu M$)/ O_2 (—○—), na presença de $10^{-6}M$ (—○—) e $10^{-7}M$ (—Δ—) dos corantes xantênicos. As figuras a, b, e c correspondem à reação em meio acetato $0,05M$ pH 3,8, acetato $0,05M$ pH 5,6 e fosfato $0,05M$ pH 6,8, respectivamente. Todos a temperatura ambiente.

Com os compostos antracênicos, realizou-se um estudo semelhante, obtendo-se que a concentração máxima permitida era de $10^{-4}M$.

Os resultados de transferência de energia do sistema IAA/HRP/ O_2 para estes compostos estão relacionados na Tabela I.1.

Tabela I.1 - INFLUÊNCIA DE VÁRIOS ACEPTORES EMISSIVOS SOBRE A EMISSÃO INTEGRADA DA DECOMPOSIÇÃO DO IAA CATALISADA POR HRP.

ACEPTORES	EMISSÃO INTEGRADA ^a (contagens x 10^{-6})		
	pH 3,8	pH 5,6	pH 6,8
Controle	9,3	9,5	6,8
Fluoresceína	11,0	12,0	14,0
Eosina	12,0	13,0	11,0
Rosa Bengala	11,5	11,0	11,0
Eritrosina B	11,0	11,0	11,0
DBAS	9,0	-	-
AS	9,2	-	-
DPAS	9,3	-	-

a) A concentração do acceptor obtida do gráfico duplo-recíproco:

$1/\text{Intensidade vs } 1/[\text{Aceptor}]_{\infty}$

1.3.2 - Efeito de Supressores

Um controle de consumo de oxigênio semelhante ao item I.3.1 foi feito para todas as substâncias testadas.

O efeito dos supressores usados, empregando a metodologia também descrita no Apêndice I, (página 164) sobre a emissão do sistema IAA/HRP/O₂ é mostrado na Tabela I.2.

Tabela I.2 - INFLUÊNCIA DE VÁRIOS AGENTES SUPRESSORES SOBRE A EMISSÃO DA OXIDAÇÃO DE IAA CATALISADA POR HRP.

COMPOSTO		EMISSÃO INTEGRADA A 1 MINUTO (contagens) x 10 ⁻⁵
CONTROLE		5,3
Ácido Sôrbico	2 mM	5,2
Superóxido Dismutase	1740 unid.	5,0
Catalase	125 unid.	6,0
Benzoato	10 mM	6,2
Bicarbonato	10 mM	6,0

1.3.3 - Comparação com outros Sistemas - Transferência para Hiperacina

Para se ter mais informação a respeito da natureza do estado excitado gerado na reação IAA/HRP/O₂, estudou-se, com fins comparativos, a transferência de energia deste sistema para a hiperacina (aceptor emissivo citado no Apêndice I, ítem I pág. 164) e a de outros sistemas que geram diferentes pro

duto excitado.

I.3.3.1 - Sistema IAA/HRP/O₂ [possível gerador de espécies (π, π^*) e (n, π^*)]

Antes de estudar a emissão fotônica do sistema na presença de hiperacina, verificou-se que a concentração máxima de 'acceptor' que se poderia utilizar sem que alterasse o consumo de O₂ era $1 \times 10^{-5} \text{M}$. (Fig. 6).

A emissão fotônica do sistema nas condições padrão sofre aumento por ação da hiperacina (Fig. I.7). O gráfico duplo-recíproco (Apêndice I, item I, página 163) deste efeito (Fig. I.8) forneceu um $K_{ET} \tau^0 = 1,8 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ para esta transferência.

I.3.3.2 - Sistema 2-metilpropanal (IBAL)/HRP/O₂ [gerador de espécies (n, π^*)]

A degradação de 21 mM de 2-metilpropanal catalisada por 2 μM de HRP, consome oxigênio em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 gerando acetona em estado excitado triplete (87, 88).

Quando se testou a emissão deste sistema na presença de hiperacina, observou-se que havia uma supressão e não aumento como no caso do IAA (Fig. I.9).

I.3.3.3 - Sistema Fenilacetaldeído (PAA)/HRP/O₂ [gerador de espécies (π, π^*) e (n, π^*)]

Esta reação produz benzaldeído (201) em estado eletrônico excitado através da oxidação de 14 mM de PAA catalisada por 0,5 μM de HRP em tampão fosfato 0,05 M pH 7,4. Consome oxigênio de maneira semelhante ao 2-metilpropanal. (88).

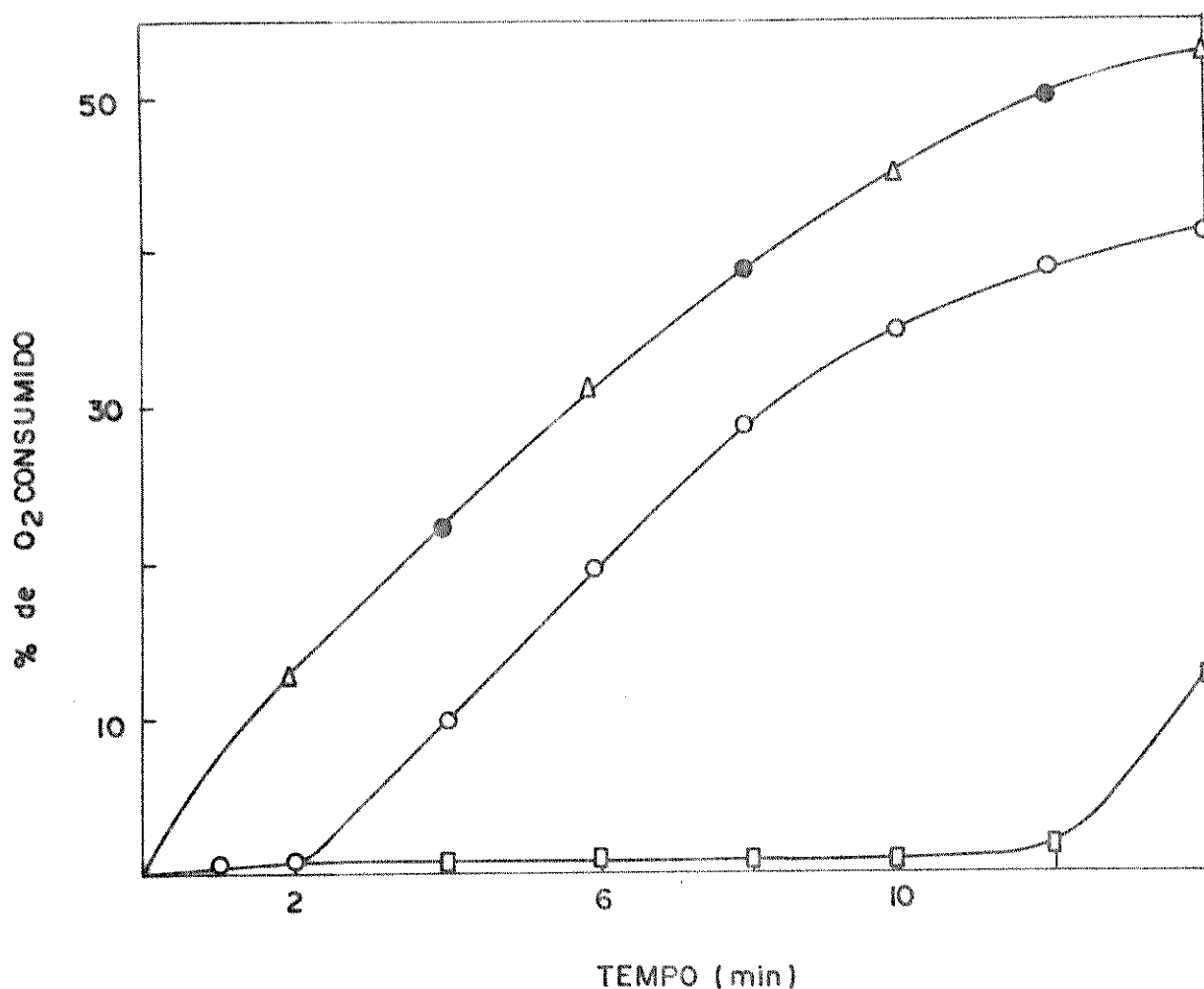


Figura I.6 - Gráfico da cinética de consumo de O_2 do sistema IAA ($10^{-4} M$)/HRP ($0,25 \mu M$)/EDTA ($30 \mu M$)/ O_2 contendo $0,17 M$ de etanol em tampão acetato $0,05 M$ pH 3,8, temperatura $\sim 14^\circ C$. A curva (—●—) representa a reação controle; (—Δ—) representa o controle na presença de $0,1 \times 10^{-4} M$ de hiperacina; (—○—) na presença de $0,25 \times 10^{-4} M$ hiperacina e (—□—) na presença de $1 \times 10^{-4} M$ de hiperacina.

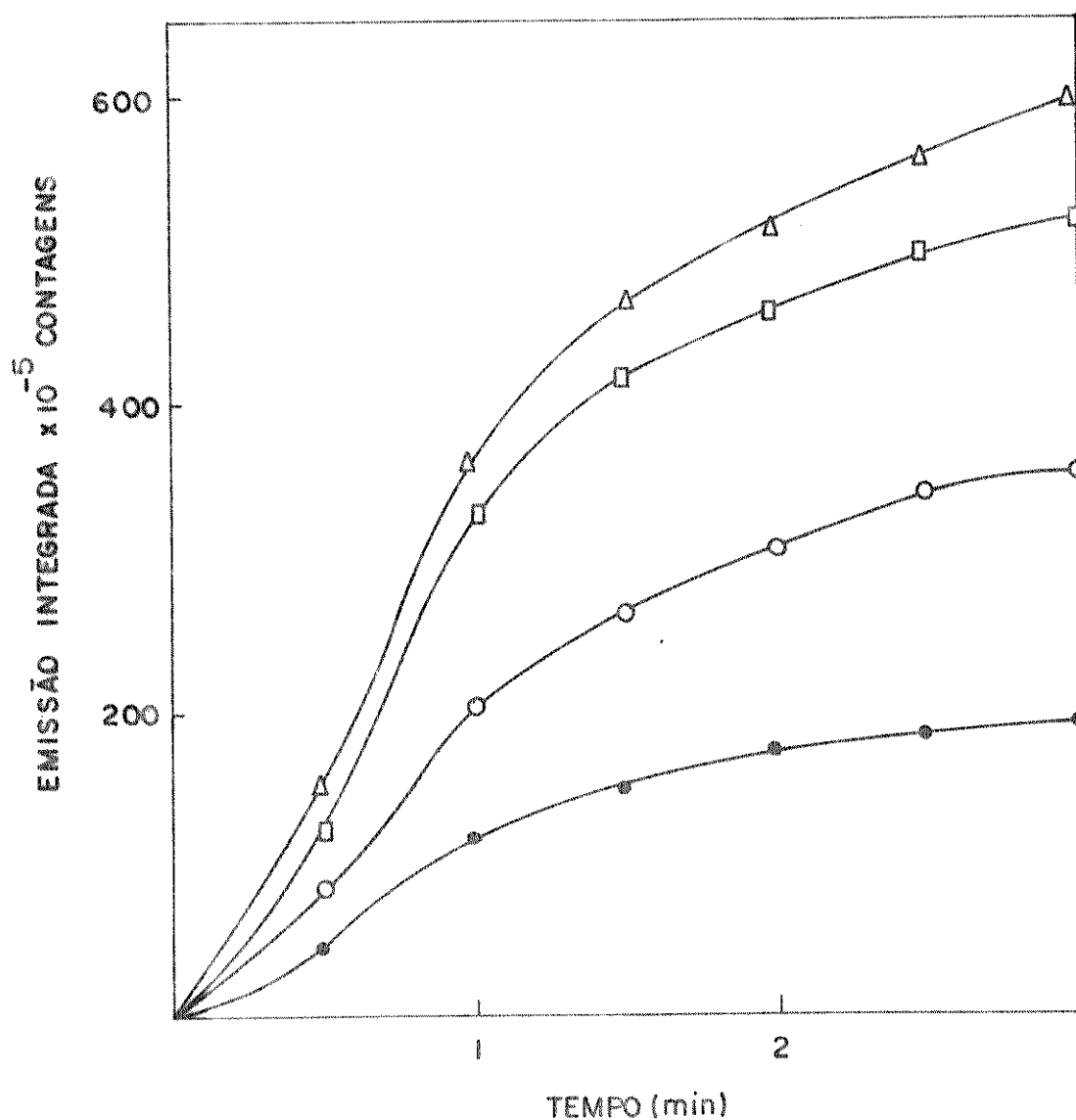


Figura I.7 - Gráfico da cinética de emissão integrada do sistema IAA (10^{-4} M)/HRP ($0,25 \text{ } \mu\text{M}$)/EDTA ($30 \text{ } \mu\text{M}$)/ O_2 contendo $0,17 \text{ M}$ de etanol, temperatura $\sim 14^\circ \text{C}$, na ausência (—●—) de aceptor e na presença de $0,3 \times 10^{-6} \text{ M}$ (—○—) $0,7 \times 10^{-6} \text{ M}$ (—◻—) e $1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ (—Δ—) de hiperacina.

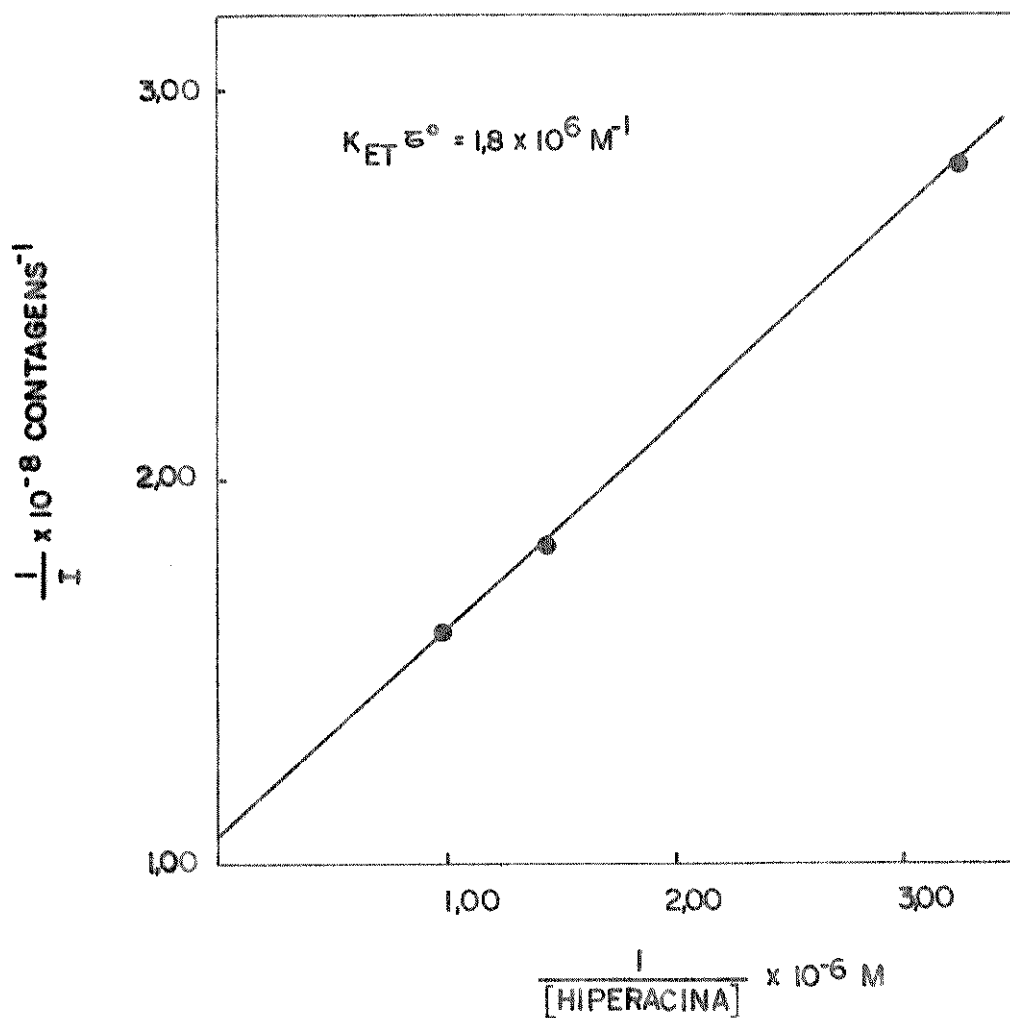


Figura I.8 - Gráfico Duplo-Recíproco para o efeito da concentração de hiperacina na intensidade de emissão do sistema IAA/HRP/O₂ nas condições da figura I.7. Neste caso a intensidade de emissão foi integrada a 3 minutos.

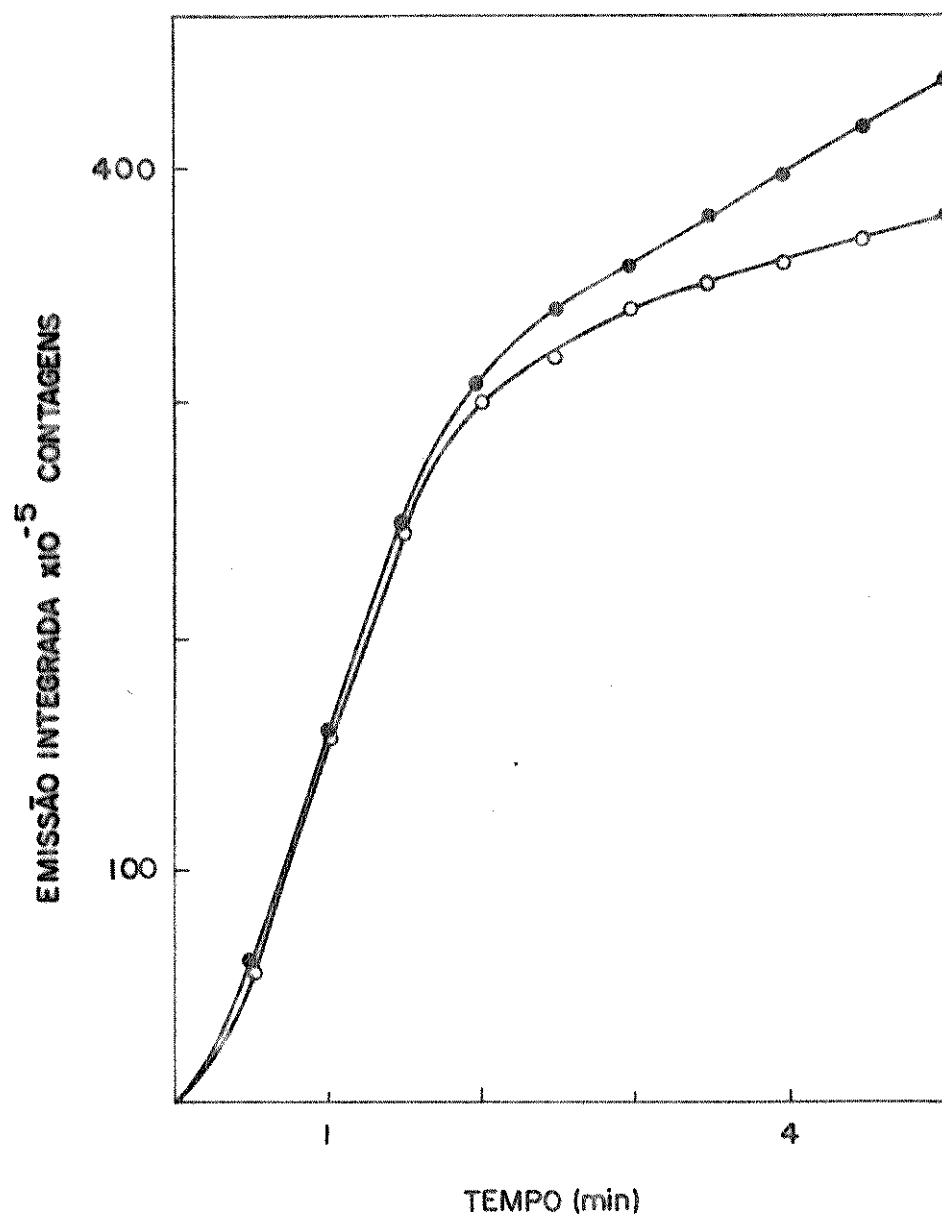


Figura I.9 - Gráfico da cinética de emissão do sistema IBAL (21 mM)/HRP (2 μ M)/O₂ em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 na ausência (—●—) e na presença (—○—) de 1×10^{-6} M de hiperacina (Temperatura $\sim 22^{\circ}\text{C}$).

A Fig. I.10 mostra o aumento da intensidade de emissão na presença de várias concentrações de hiperacina.

O gráfico duplo-recíproco (Fig. I.11) construído a partir dos dados da Fig. I.10, deu um valor de $K_{ET} \tau^0$ de $1 \times 10^6 M^{-1}$.

I.3.3.4 - Sistema 2-fenilpropanaldeído (PPA/HRP/O₂) [gerador de espécies (n, π^*) e (π , π^*)]

Esta reação produz acetofenona em estado eletrônico excitado através da degradação aeróbica de 14 mM de PPA catalisada por 0,5 μM de HRP em tampão fosfato 0,05 M pH 7,4. Consome oxigênio de maneira semelhante ao 2-metilpropanal.

Adicionando-se hiperacina ao sistema e observando-se a sua emissão, verificou-se que esta aumentava à medida que se aumentava a concentração de acceptor (Fig. I.12).

O valor de $K_{ET} \tau^0$ obtido do gráfico duplo-recíproco (Fig. I.13) foi de $3,3 \times 10^6 M^{-1}$.

I.2 - Espectro de Quimiluminescência

O espectro de quimiluminescência do sistema IAA/HRP/O₂ nas condições padrão foi obtido segundo o método citado no item IV.2 (pág. 60) da Parte Experimental. A Fig. I.14 mostra este espectro onde podemos verificar a presença de vários picos cuja atribuição se torna complexa.

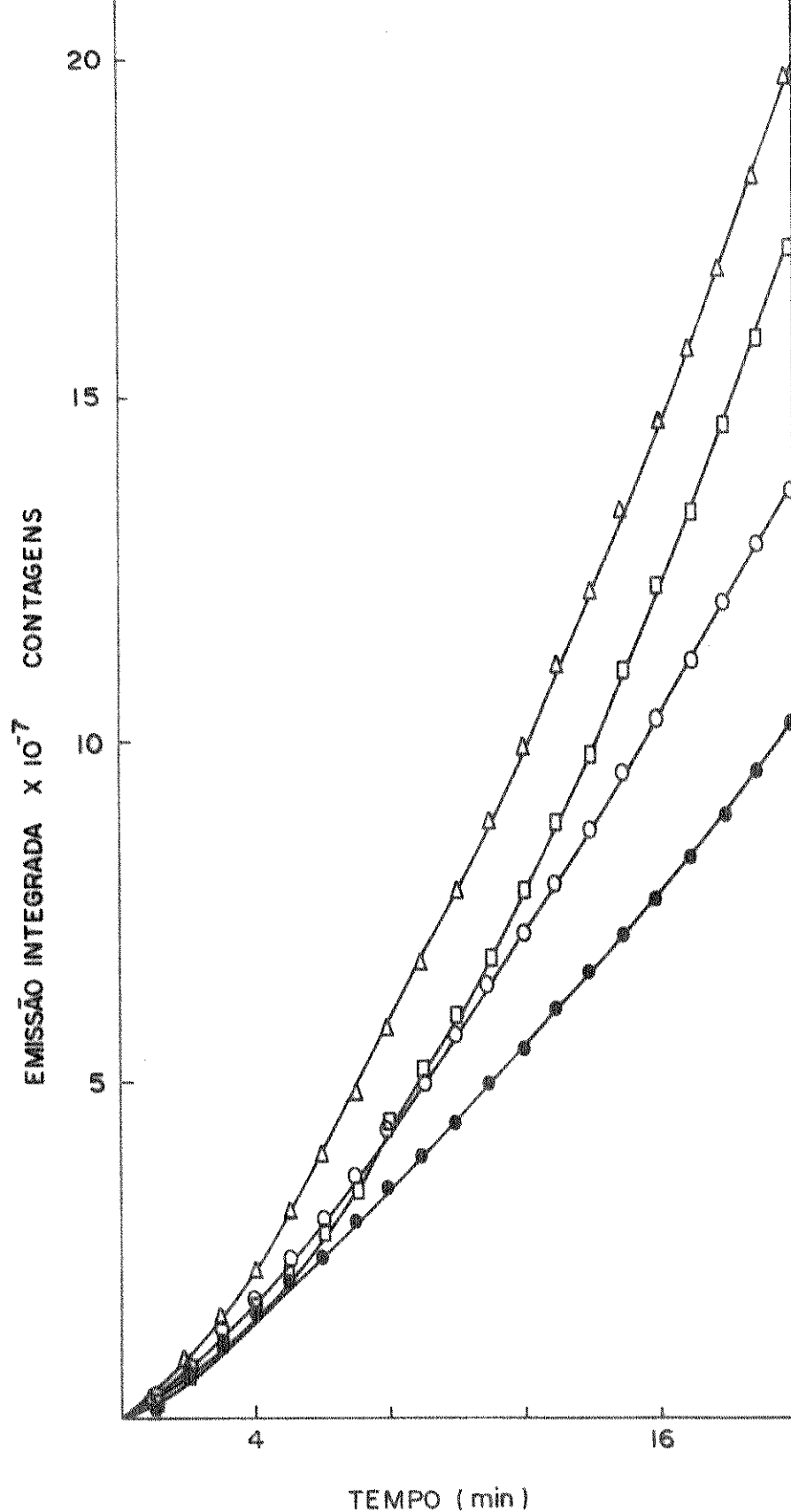


Figura I.10 - Gráfico da cinética de emissão do sistema PAA(14 mM)/HRP (0,5 μM)/O₂ contendo 0,12 M de etanol em tampão fosfato 0,05 M pH 7,4, temperatura ~22°C. São mostradas as curvas na ausência de acceptor (●) e na presença de 0,55x10⁻⁶ M (-○-), 0,7x10⁻⁶ M (-□-) e 1x10⁻⁶ M (-Δ-) de hiperacina.

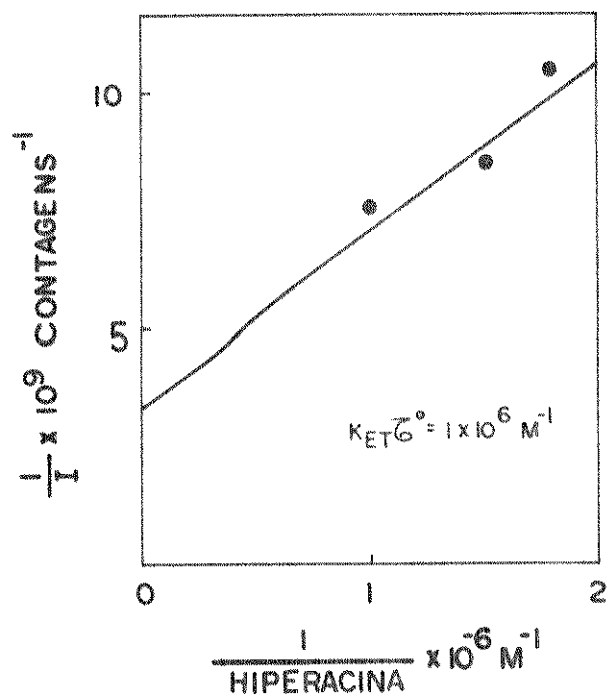


Figura I.11 - Gráfico Duplo-Recíproco para o efeito da concentração de hiperacina na intensidade da emissão do sistema PAA/HRP/O₂ nas condições da Fig. I.10. Neste caso a intensidade de emissão foi integrada a 20 minutos.

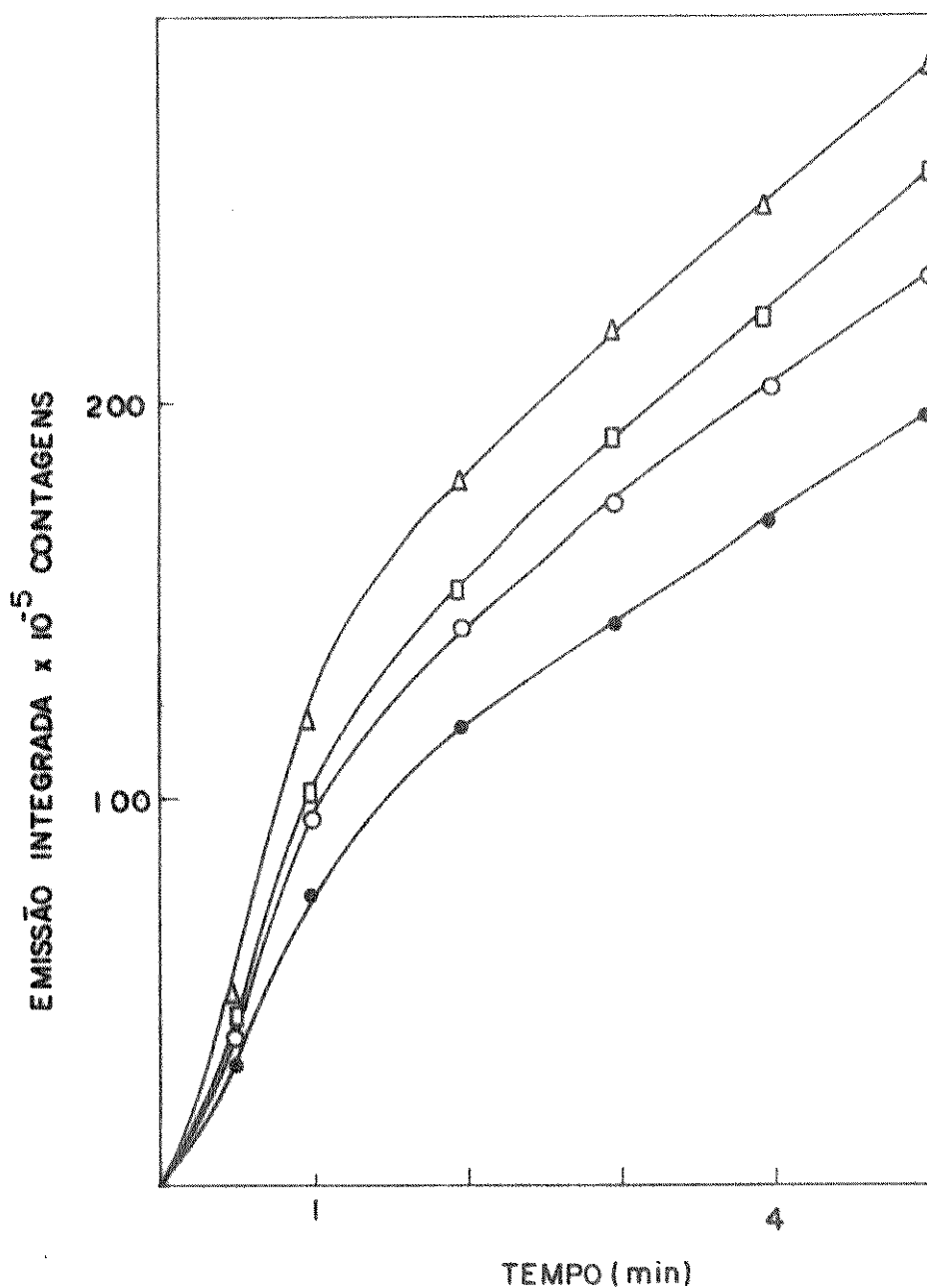


Figura I.12 - Gráfico da cinética de emissão do sistema PPA(14 mM)/HRP(0,5 μ M)/O₂ contendo 0,12 M de etanol em tampão fosfato 0,05 M pH 7,4 na ausência (—●—) e na presença de (—○—) 0,4x10⁻⁶M, (—□—) 0,6x10⁻⁶M e (—Δ—) 1x10⁻⁶M de hiperacina, a temperatura de ~22°C.

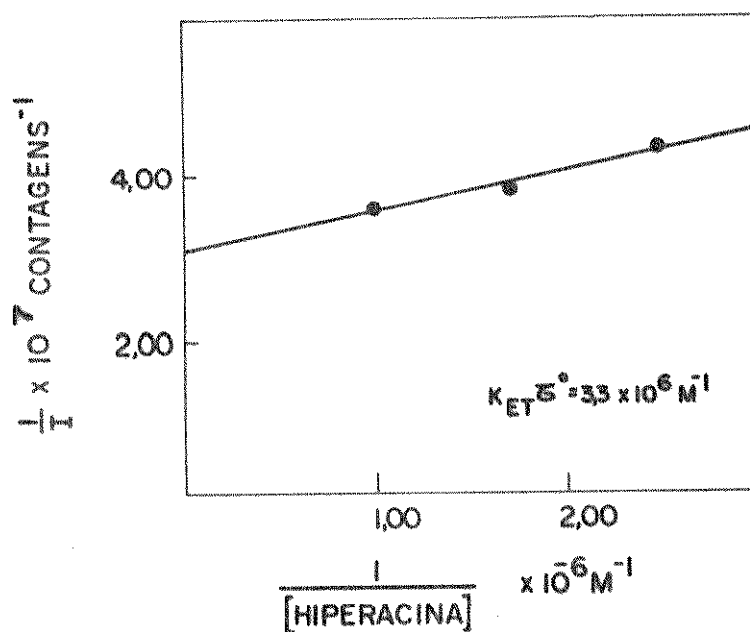


Figura I.13 - Gráfico duplo-recíproco para o efeito da concentração de hiperacina sobre a emissão do sistema PPA/HRP/O₂ nas condições da Fig. I.12. Neste caso a intensidade de emissão foi integrada a 5 minutos.

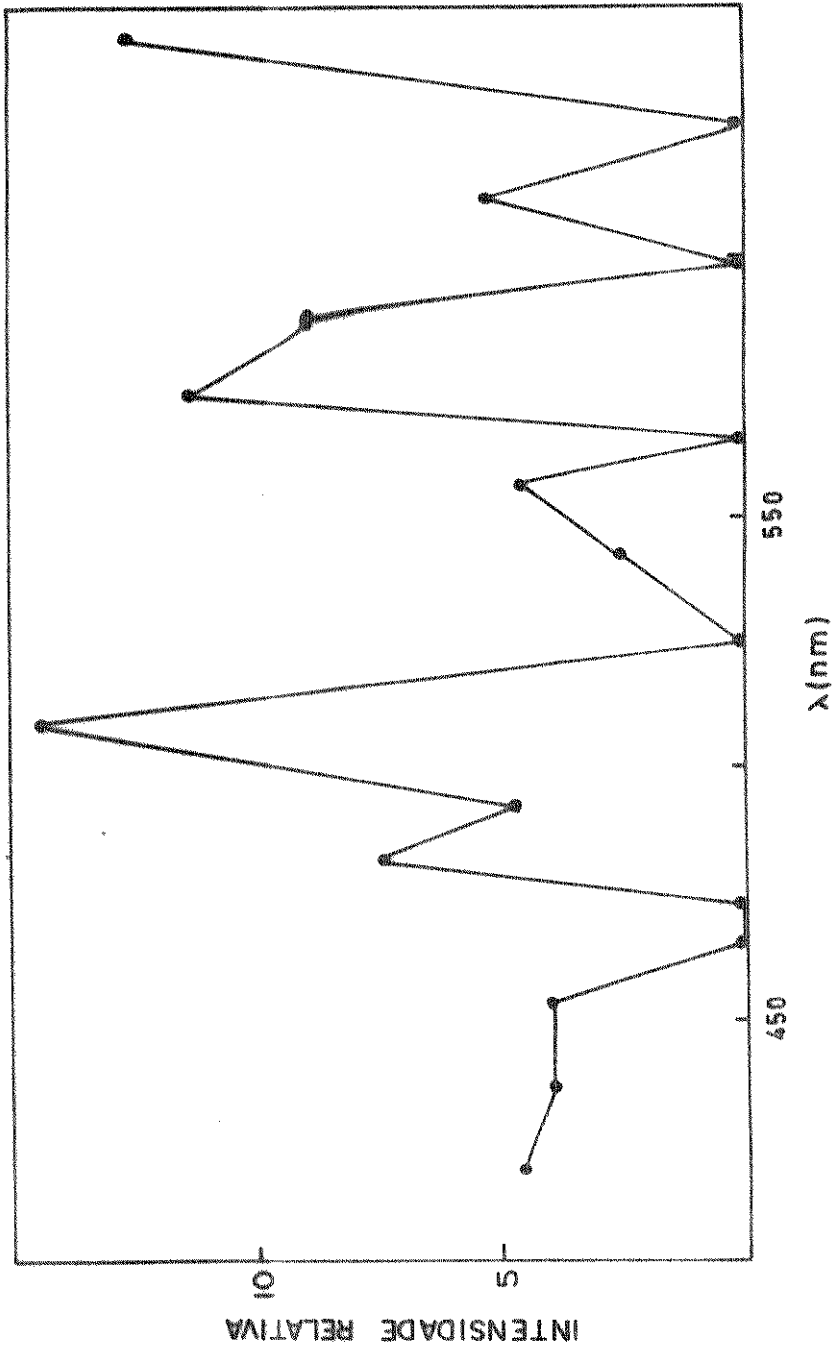


Figura I.14 - Espectro de Quimiluminescência do Sistema IAA (10^{-4} M)/HRP (0,25 μ M)/EDTA (30 μ M) / O_2 contendo 0,17 M de etanol em tampão acetato 0,05M pH 3,8, a temperatura $-22^{\circ}C$.

II - FORMAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE NO SISTEMA IAA/HRP/O₂

II.1 - Efeito de Supressores Específicos

Para se ter conhecimento da presença de oxigênio singlete na reação IAA/HRP/O₂, testou-se a influência de vários supressores característicos de ¹O₂ cuja participação e função em sistemas biológicos já foram discutidos nas páginas 30 e 45.

A histidina (Apêndice I, ítem II, página 166) suprimiu a emissão do sistema quando estava presente na faixa de concentração de 1 a 20 mM. Tomou-se cuidado de verificar se a máxima concentração usada não estava interferindo na cinética de consumo de oxigênio da reação. O efeito de supressão por histidina é mostrado na Fig. II.1 e na Fig. II.2, mostra-se o gráfico Stern-Volmer (Apêndice I, ítem II, página 165) para esta supressão, donde se calculou o valor de K_{SV} que é 276 M^{-1} . Sabendo que o valor recíproco de K_{SV} nos dá o valor de β (Apêndice I, ítem III, página 166), calculou-se o último, obtendo $3,6 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Um estudo com guanosina no lugar de histidina mostrou, também supressão da emissão (Fig. II.3), mas não foi possível obter-se um valor de K_{SV} que fosse reproduzível, por problemas técnicos.

Bilirrubina e DOPA (Apêndice I, ítem II, página 166) também suprimiram a emissão do sistema e este efeito é mostrado nas Fig. II.4 e II.5 para DOPA e bilirrubina, respectivamente.

II.2 - Efeito de Aumentadores da Emissão

A ação de DABCO e D₂O sobre ¹O₂ já foi discutida, mostrando a capacidade destes dois compostos de aumentarem a emissão

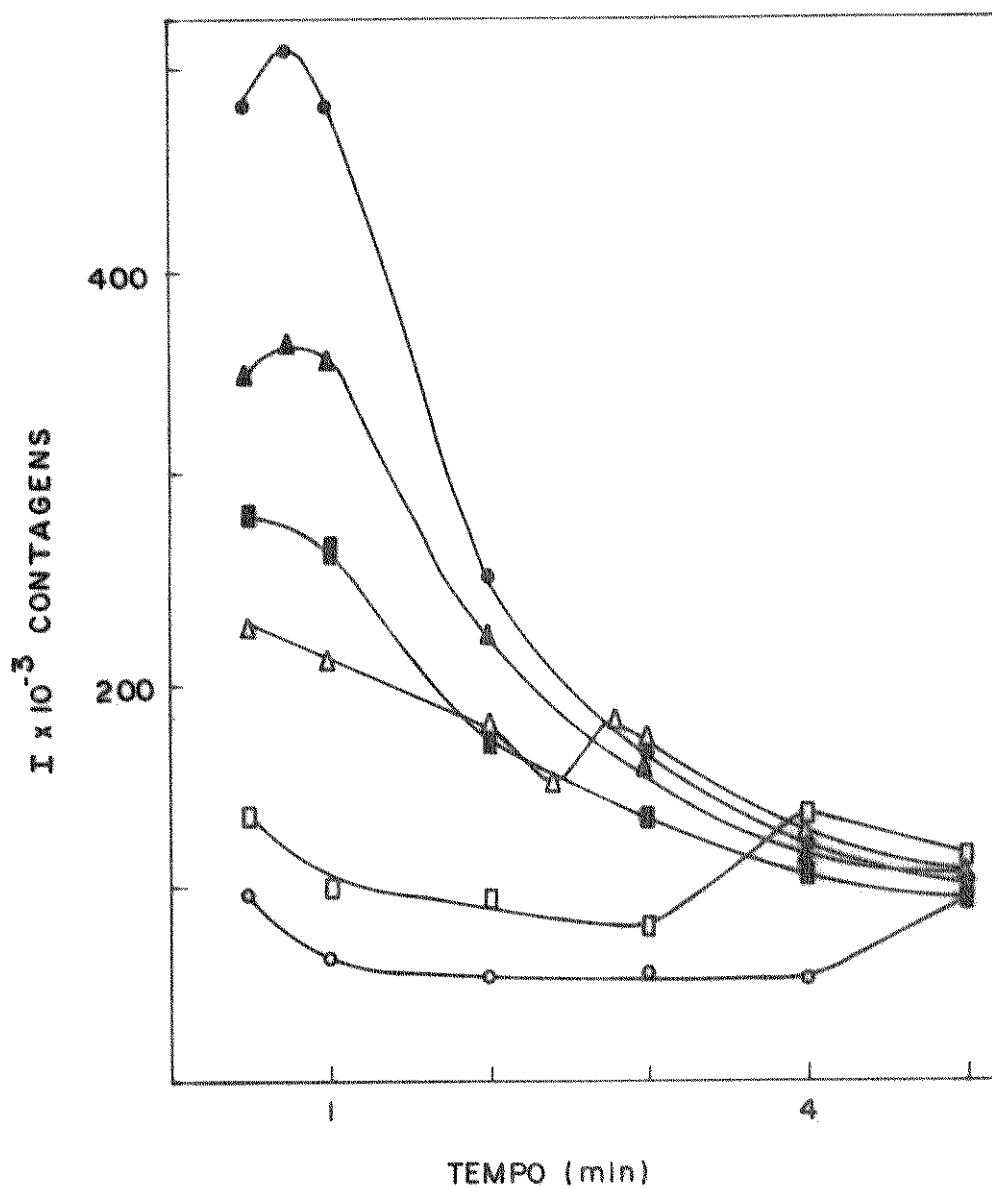


Figura II.1 - Gráfico do efeito de supressão por concentrações crescentes de histidina sobre a emissão do sistema IAA(10^{-4} M)/HRP ($0,25 \mu\text{M}$)/EDTA ($30 \mu\text{M}$)/ O_2 contendo $0,17 \text{ M}$ de etanol em tampão acetato $0,05 \text{ M}$, pH 3,8 e temperatura ambiente. De cima para baixo: controle sem histidina; $1,25 \text{ mM}$; $2,5 \text{ mM}$; 10 mM , 20 mM .

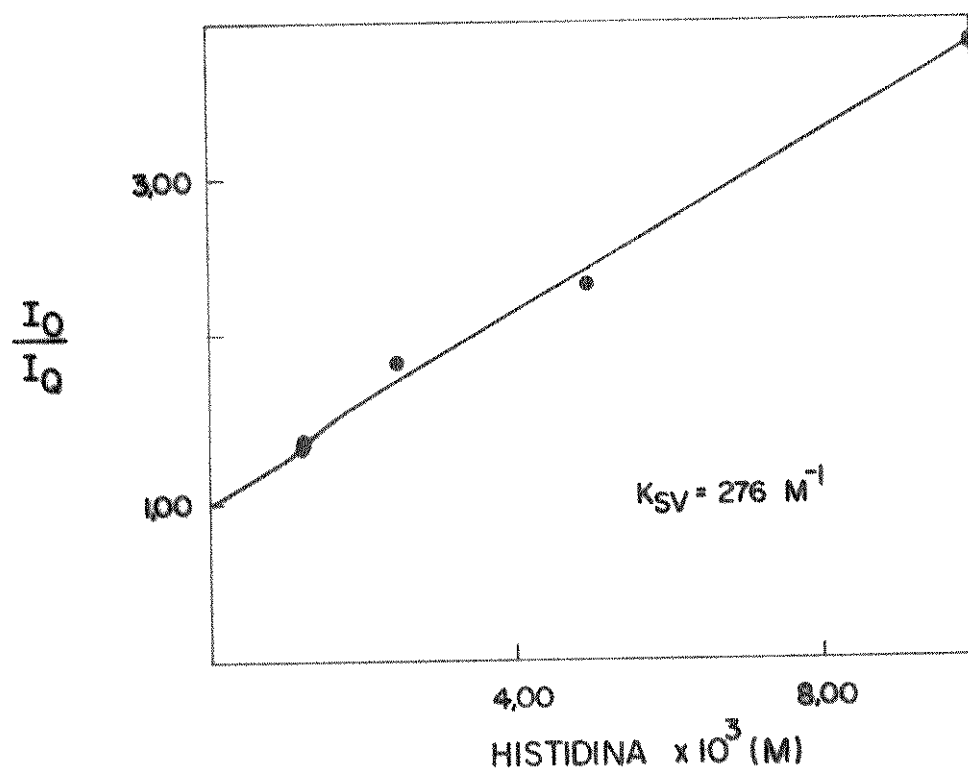


Figura II.2 - Gráfico Stern-Volmer para o efeito da concentração de histidina sobre a emissão do sistema IAA/HRP/O₂ nas condições da Fig. II.1.

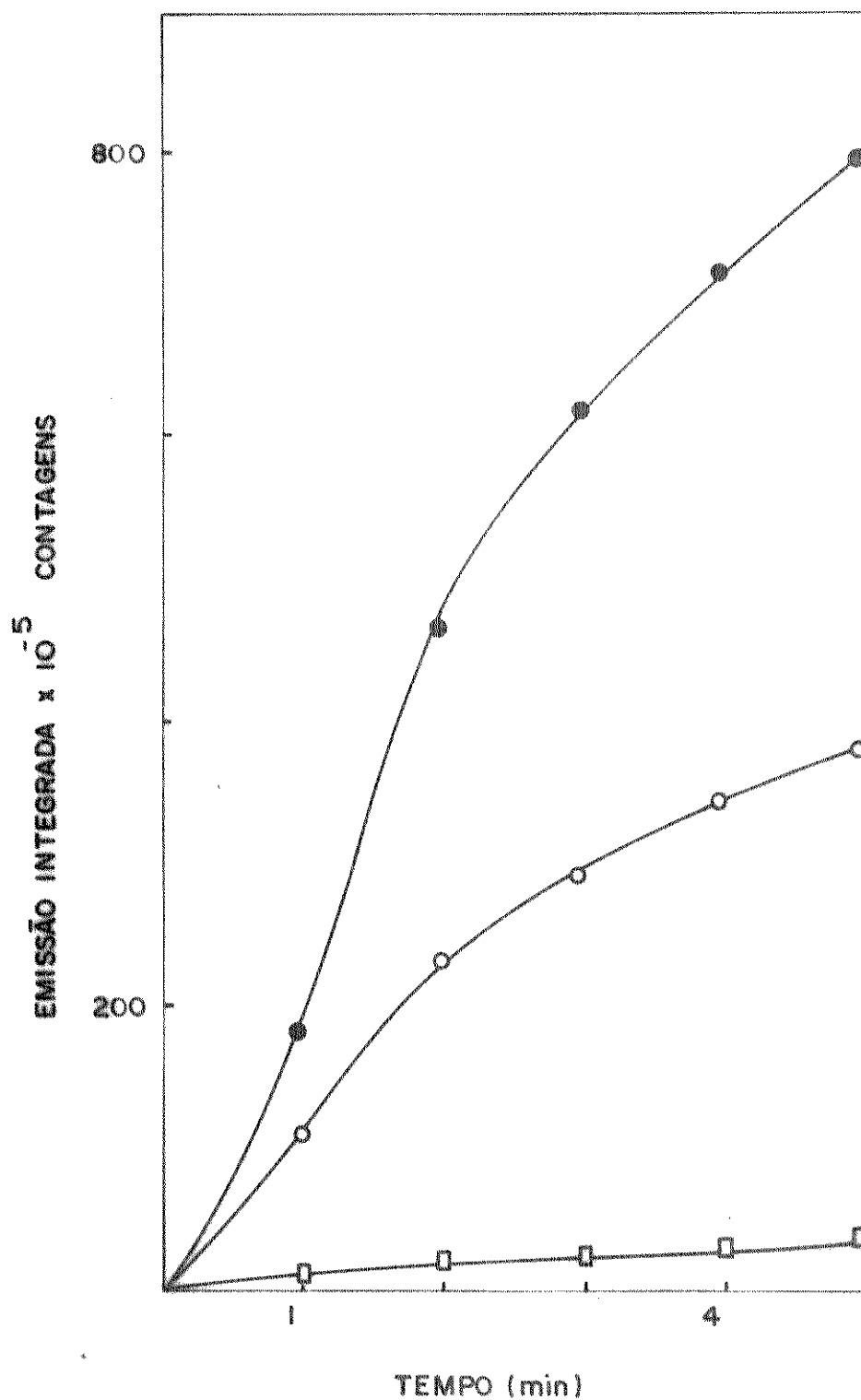


Figura II.3 - Gráfico do efeito de supressão por concentrações de guanossina sobre a emissão do sistema IAA (10^{-4} M) / HRP (0,25 μ M) / EDTA (30 μ M) / O_2 contendo 0,17 M de etanol em tampão acetato, pH 3,8 e temperatura ambiente. A curva (-●-) é o controle; (-○-) é 5 mM e, (-□-) é 10 mM de guanossina.

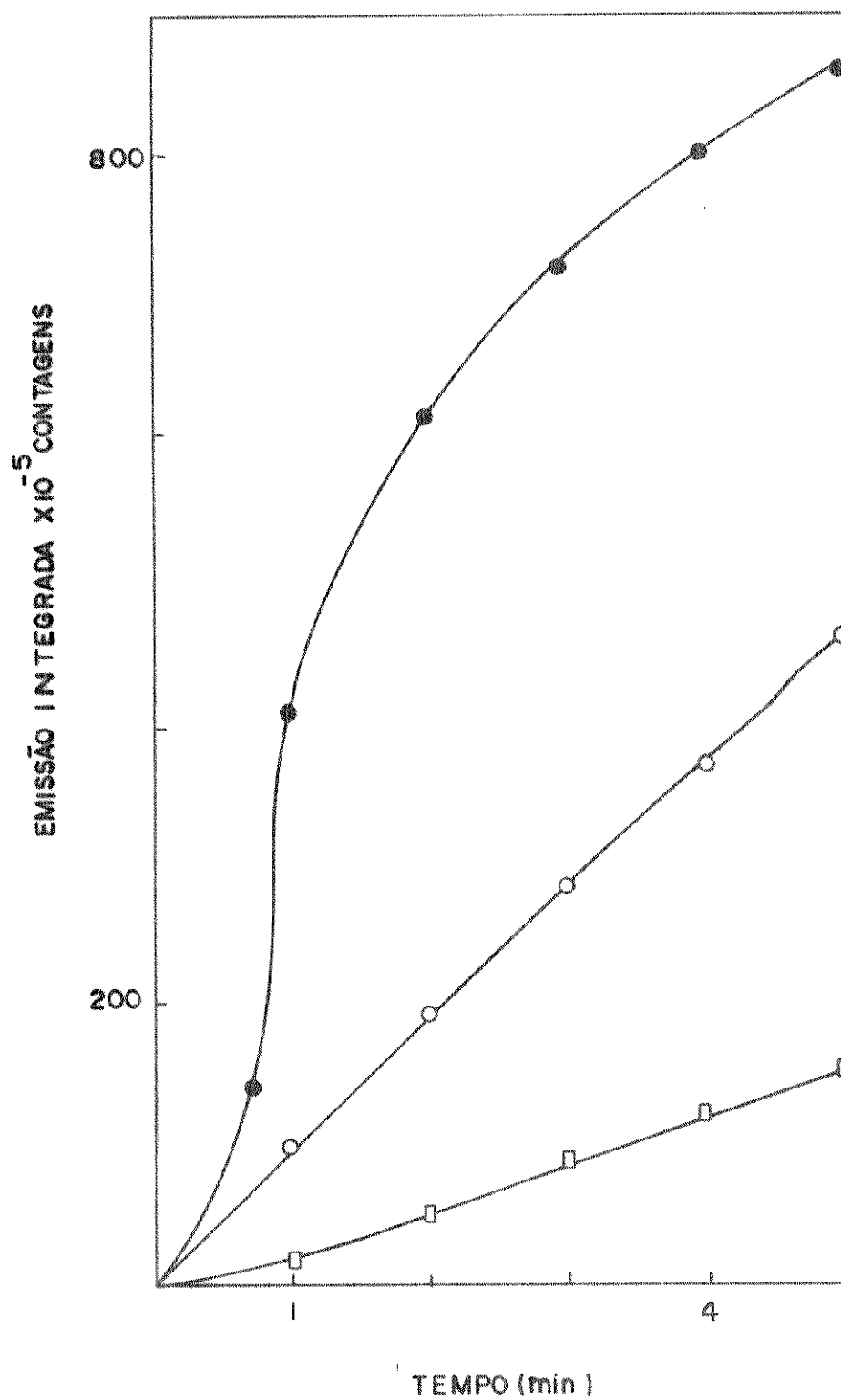


Figura II.4 - Gráfico do efeito de supressão por concentrações de DOPA sobre a emissão do sistema IAA/HRP/O₂ nas condições da Fig. II.1, sendo mostrado o controle (—●—), 1 μ M (—○—) e 3 μ M (—□—) de DOPA.

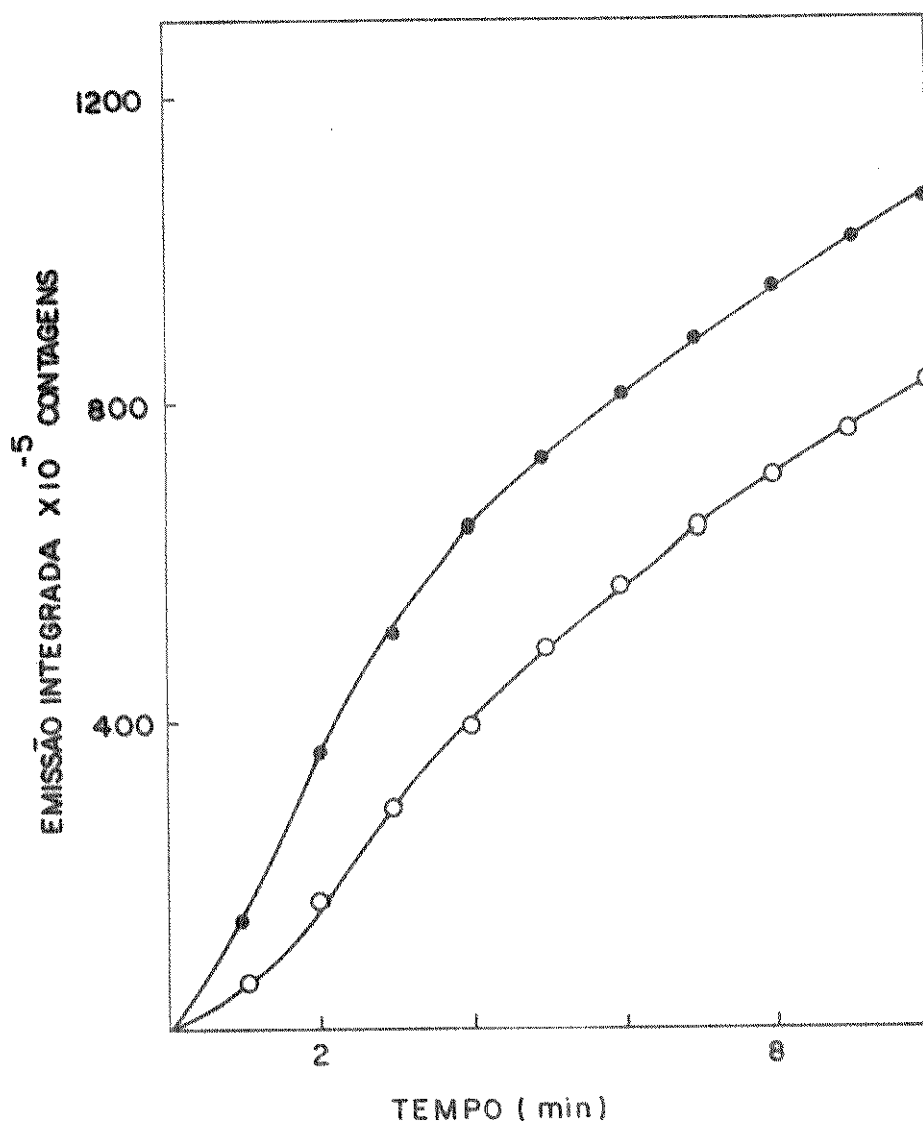


Figura II.5 - Gráfico do efeito de supressão por bilirrubina sobre a emissão do sistema IAA/HRP/O₂ nas condições da Fig. II.1. São mostrados o sistema na ausência de supressor (—●—) e na presença de 20 μ M de bilirrubina (—○—).

proveniente de $^1\text{O}_2$ (Apêndice I, ítem IV, página 166).

A introdução de DABCO no sistema IAA/HRP/ O_2 não alterou a cinética de consumo de oxigênio, mas a emissão fotônica foi aumentada (Fig. II.6).

A velocidade de consumo de oxigênio da reação em meio deuterado, bem como o consumo total, foram alterados, sendo que a reação se mostrou menos efetiva neste meio (Fig. II.7). Apesar disso, a emissão fotônica do sistema foi aumentada (Fig. II.8).

II.3 - Cinética de Estado Estacionário

Esta técnica está descrita no Apêndice I, ítem V (página 167).

Usou-se este tipo de estudo verificando o efeito combinado de guanosina e histidina sobre a emissão do sistema. Construindo-se um gráfico do tipo descrito na página 169), obteve-se retas convergendo para o mesmo ponto, o que indica o envolvimento de $^1\text{O}_2$ no processo de oxidação de IAA catalisado por HRP. A Fig. II.9 mostra o gráfico construído com os dados de supressão obtidos.

II.4 - Degradação da Guanosina

Como a guanosina sofre degradação por ação de $^1\text{O}_2$ gerado fotoquimicamente (186), achou-se conveniente verificar se submetida ao tratamento com o sistema bioenergizado (IAA/HRP/ O_2), onde possivelmente $^1\text{O}_2$ estaria sendo gerado, ela se comportaria da mesma maneira. Assim, realizou-se um experimento com ^3H -guanosina descrito na página 58, ítem III.7 da Parte Experimental.

O cromatograma revelado é mostrado na Fig. II.10.

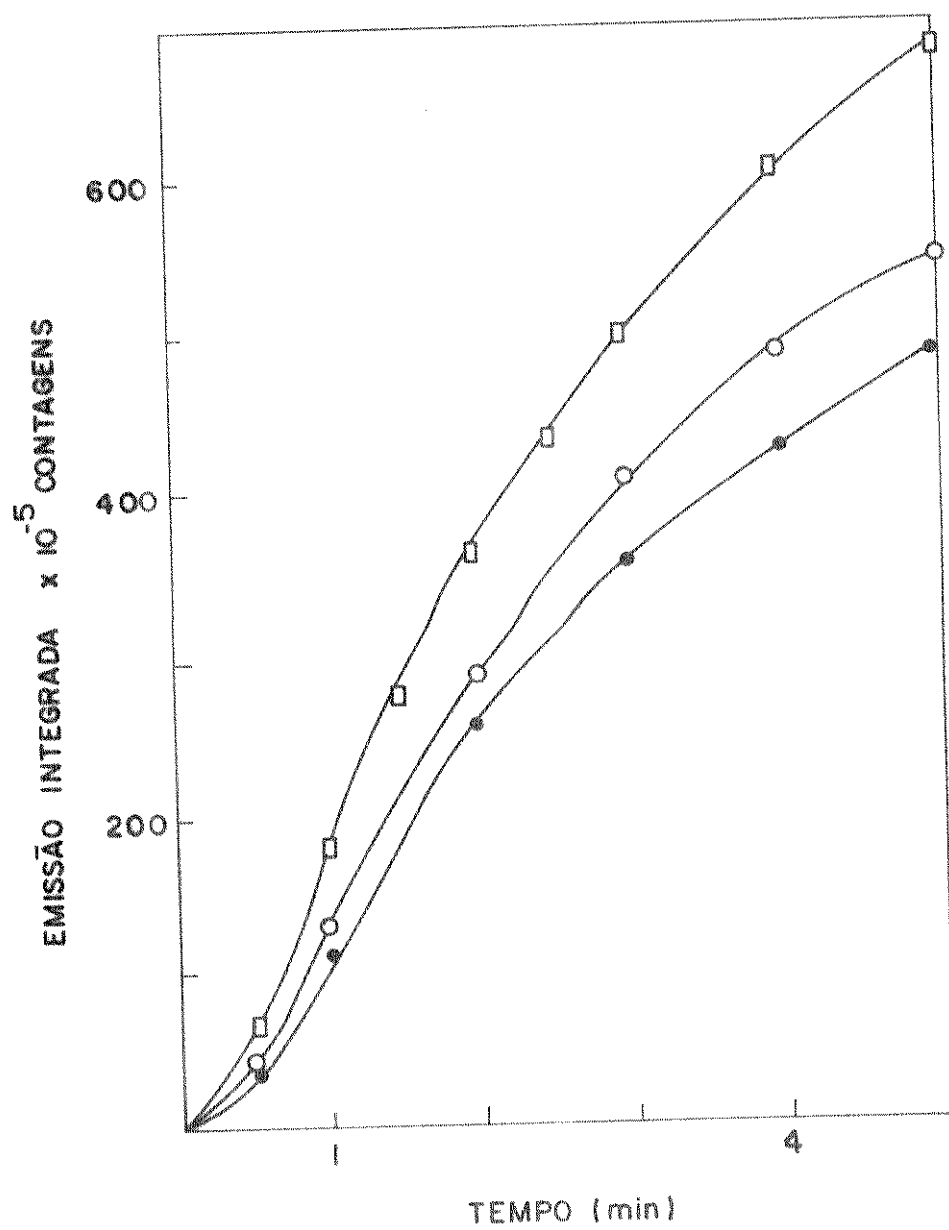


Figura II.6 - Gráfico do efeito de DABCO 10 mM (—○—) e (—□—) 20 mM sobre a emissão do sistema IAA/HRP/O₂ (—●—) nas condições da Fig. II.1.

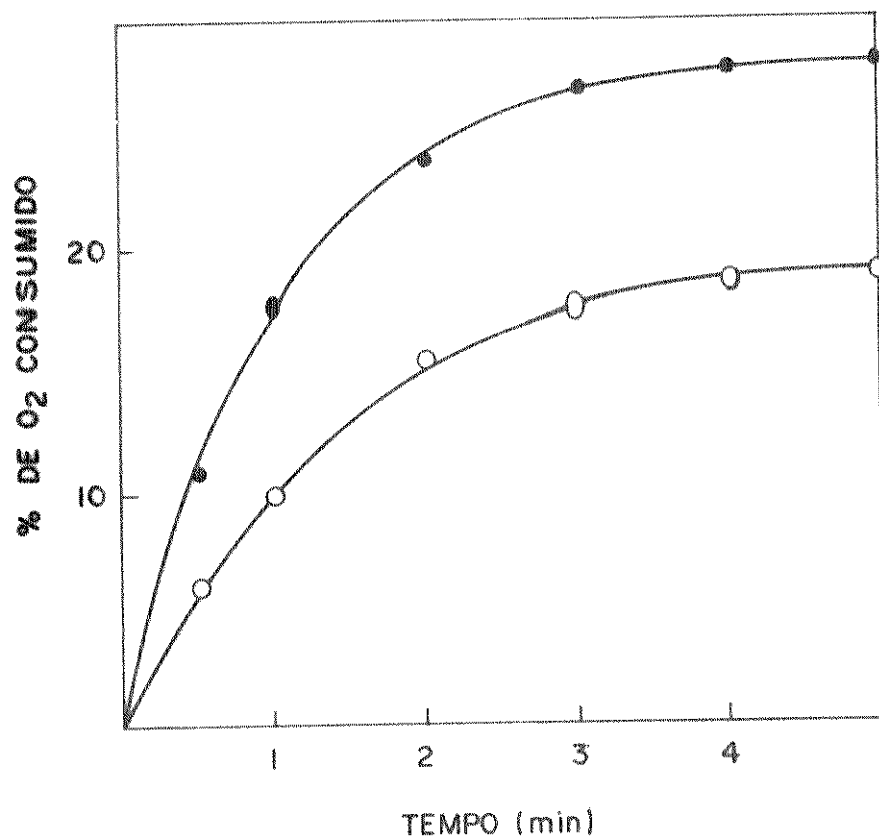


Figura II.7 - Gráfico da cinética de consumo de oxigênio da reação IAA (10^{-4} M)/HRP (0,25 μ M)/EDTA (30 μ M) O₂ contendo 0,17 M de etanol em tampão acetato 0,05 M aquoso pH 3,8 (—●—) e deuterado pD 3,4 (—○—) e, temperatura ambiente.

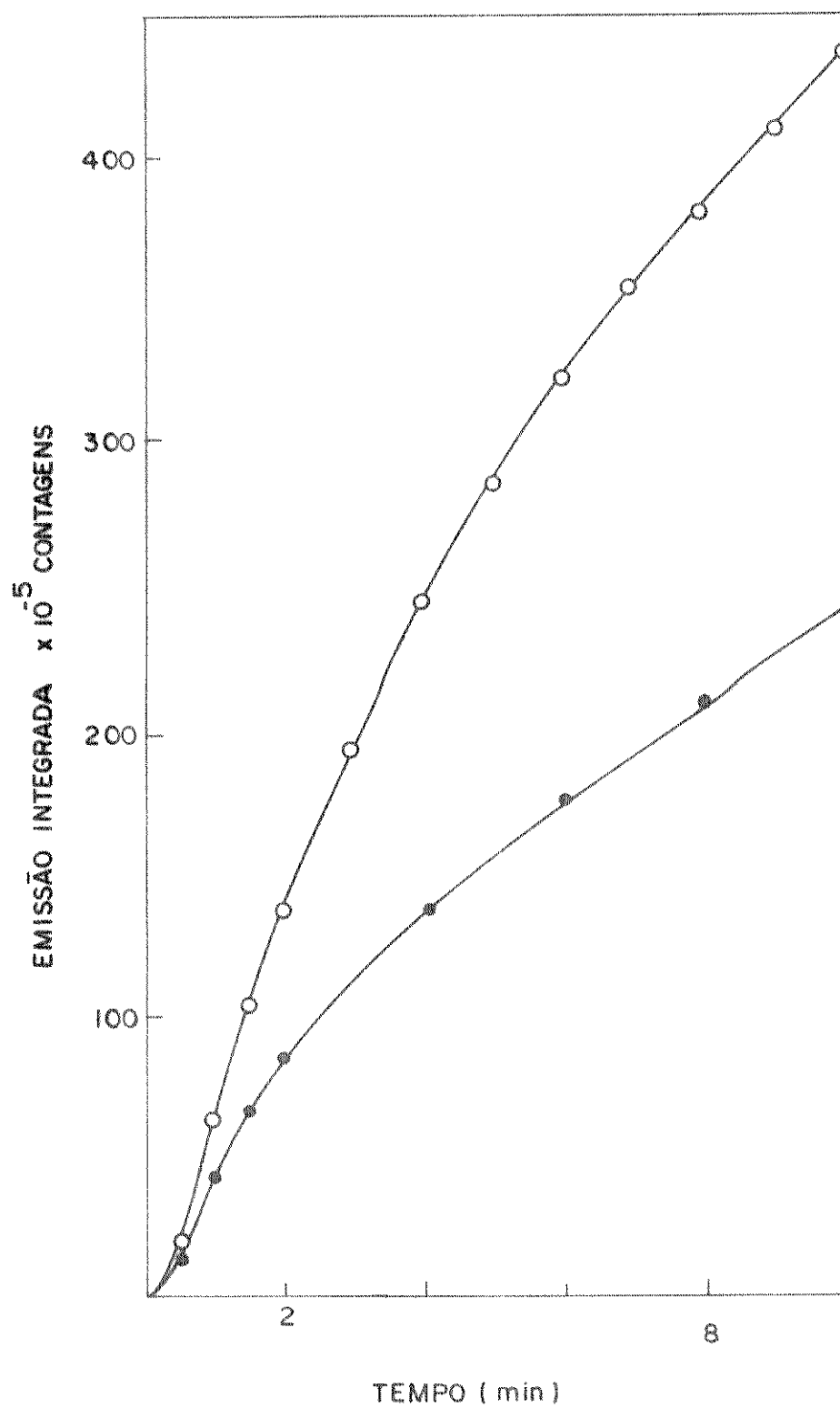


Figura II.8 - Gráfico da cinética de emissão do sistema IAA/HRP/ O_2 nas condições da Fig. II.7. A curva (-●-) é a reação em tampão aquoso e a (-o-) é um tampão deuterado.

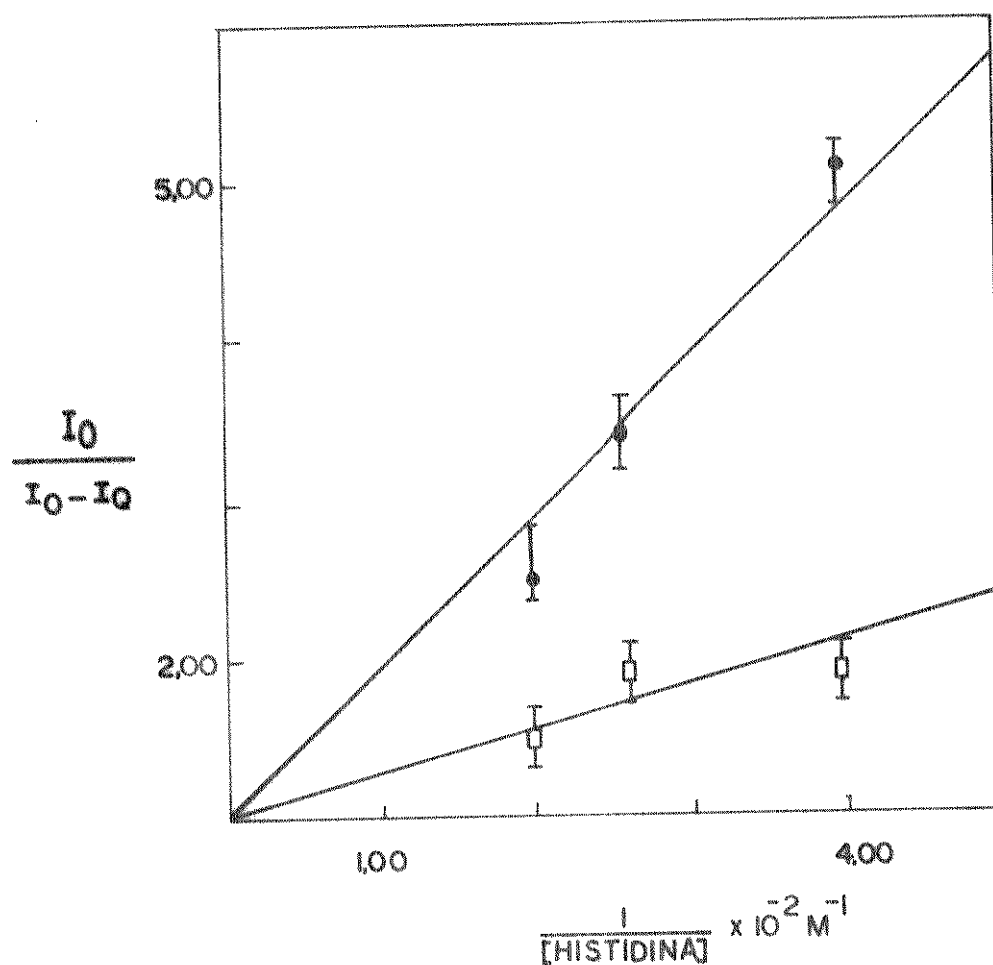


Figura II.9 - Gráfico da supressão da energia do sistema IAA (10^{-4} M)/HRP (0,25 μ M)/EDTA (30 μ M)/O₂ contendo 0,17 M de etanol em tampão acetato 0,05 M, pH 3,8. Na presença de guanósina: 0,0 M (—●—) e $2,5 \times 10^{-3}$ M (—□—).

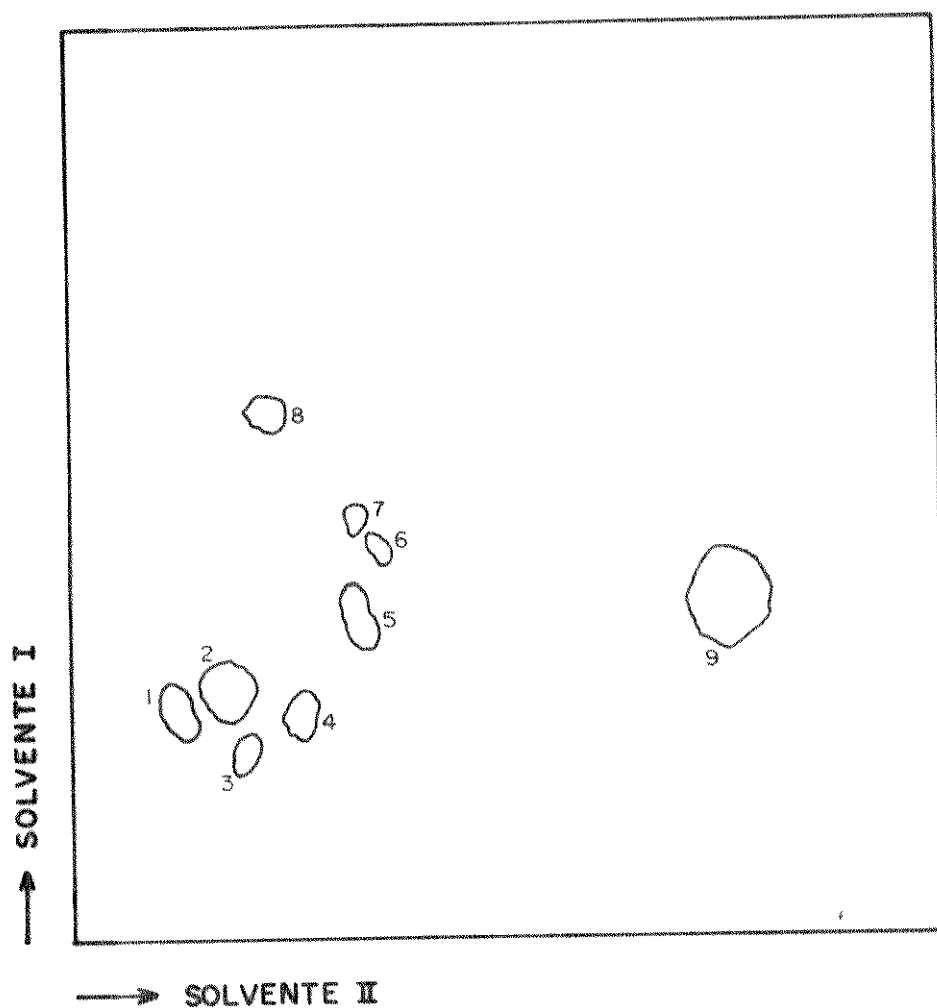


Figura II.10 - Cromatograma em camada delgada em duas dimensões dos produtos de degradação da ^3H -guanosina submetida ao tratamento com o sistema de reação IAA/ (10^{-4}M)/HRP ($0,25\ \mu\text{M}$)/EDTA ($30\ \mu\text{M}$)/ O_2 contendo $0,17\ \text{M}$ de etanol em tampão acetato $0,05\ \text{M}$, pH 3,8. Os produtos foram designados como sendo: (3):N-(eritropentosil)urêia; (5) N^1 (eritropentosil) N^2 -formilurêia; (6)-eritropentose; (9) ácido cianúrico; os compostos (1), (2), (4), (7) e (8) não foram identificados.

Obteve-se 2,7% de degradação e as manchas obtidas foram designadas como sendo:

- (a) N(eritropentosil)urêia
- (b) N¹(eritropentosil)N²-formilurêia
- (c) eritropentose
- (c) ácido cianúrico

Esta designação foi atribuída em comparação com os produtos obtidos por Cadet e Teoule (186).

III - SISTEMA IAA/tRNA/HRP/O₂

III.1 - Controles

Para os experimentos que serão descritos a seguir usou-se tRNA de E.coli.

Em primeiro lugar assegurou-se que a concentração máxima de tRNA utilizada (2 mg/ml) adicionada ao sistema IAA/HRP/O₂ nas condições padrão, não alterava nem a primeira etapa do consumo de oxigênio, nem a segunda (Fig. I.1 e I.2, páginas 64 e 65).

Outro experimento controle foi verificar a influência da adição de tRNA ao sistema, nas cinéticas de formação dos compostos intermediários de HRP, bem como a cinética de desaparecimento da HRP nativa. Os resultados deste estudo estão mostrados na Fig. III.1.

III.2 - Estudo Fotobioquímico

III.2.1 - Efeito de Supressão

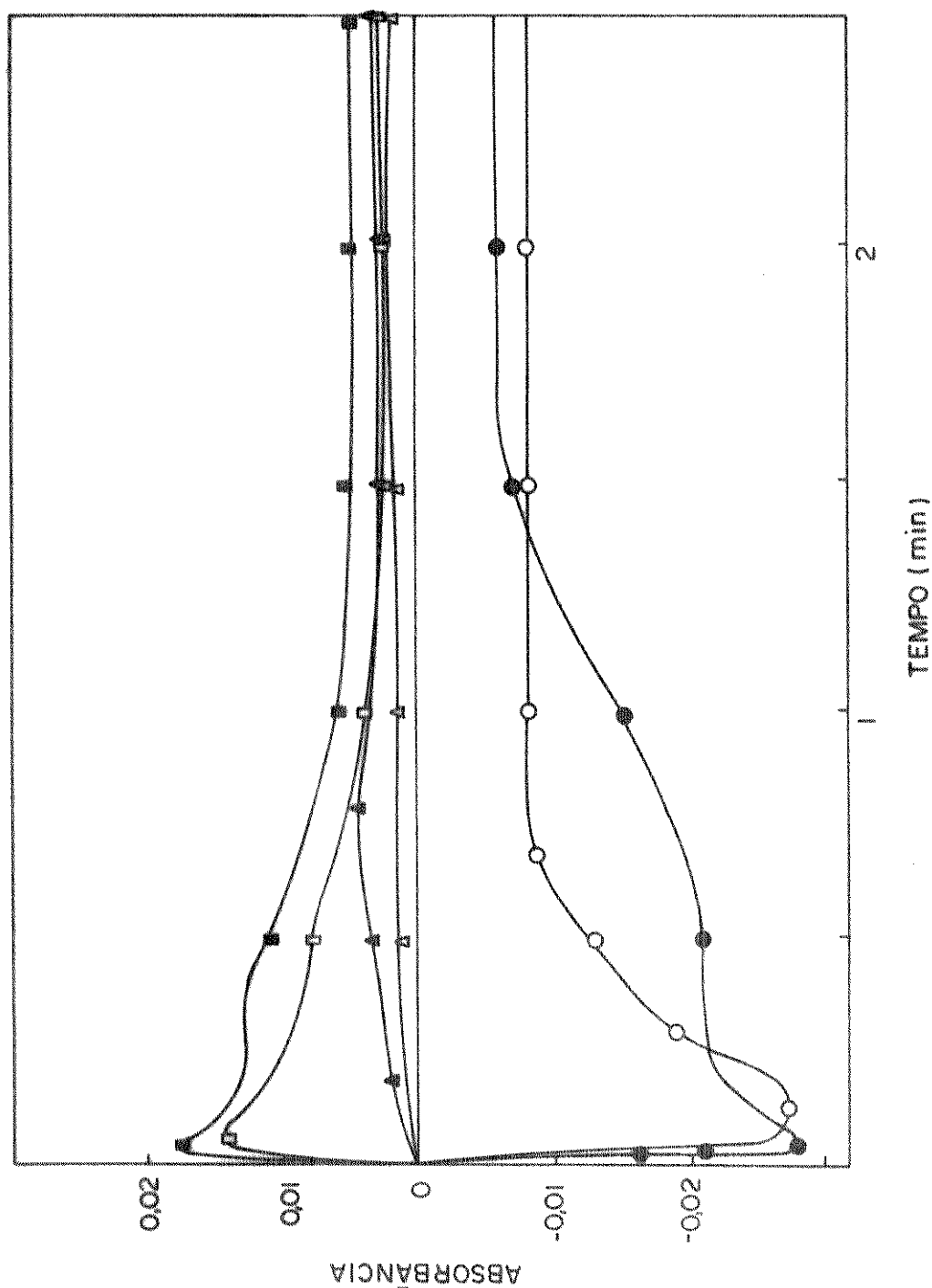


Figura III.1 - Cinética dos compostos de HRP. (---) é a cinética de desaparecimento da HRP nativa na reação IAA (12,5 μ M)/HRP (2 μ M)/EDTA (30 μ M)/O₂ acompanhada a λ 403 na ausência de tRNA, (-●-) é a curva na presença de 10 μ M de tRNA. (-□-) e (-Δ-) são as cinéticas da HRP acompanhada no ponto isobéstico λ 411 na presença e ausência de 10 μ M de tRNA, respectivamente. (-■-) e (-□-) são as cinéticas do composto II de HRP acompanhada em λ 420 na presença e ausência de 10 μ M de tRNA, respectivamente.

III.2.1.1 - Supressão por tRNA

Quando tRNA estava presente no sistema em concentrações muito baixas (0,4 μM a 1,6 μM) observou-se uma supressão da emissão do sistema. O gráfico Stern-Volmer obtido dos dados desta experiência, forneceu um valor de $k_q \tau^0$ (K_{SV}) de $6 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ (Fig. III.2).

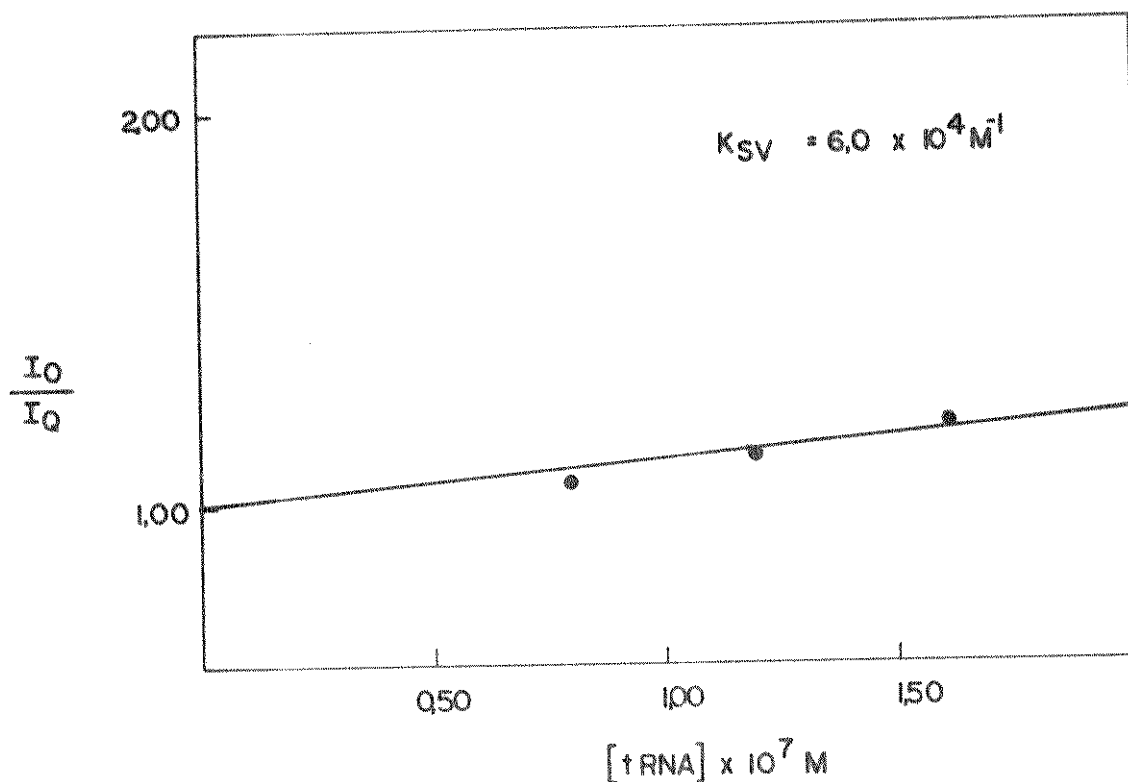


Figura III.2 - Gráfico Stern-Volmer para o efeito de supressão por tRNA sobre o sistema IAA (10^{-4}M)/HRP (0,25 μM)/EDTA (30 μM)/ O_2 contendo 0,17 M de etanol em tampão acetato 0,05 M, pH 3,8.

III.2.1.2 - Supressão por Citidina e Uridina

Antes de se realizar os experimentos de

emissão fotônica, observou-se se a concentração dos nucleotídeos usada não alterava o consumo de oxigênio da reação IAA/HRP/O₂, nas condições padrão. Adicionando-se citidina e uridina em concentrações variando na faixa de 5 mM a 20 mM, observou-se supressão da emissão do sistema. Dos gráficos Stern-Volmer mostrados nas Fig. III.3.a e 3.b para estes compostos, calculou-se as constantes de supressão K_{SV} para cada um deles, que são 25 M⁻¹ e 5 M⁻¹ para uridina e citidina, respectivamente.

III.2.2 - Transferência de Energia

III.2.2.1 - Transferência para o tRNA

Quando o tRNA estava presente em concentrações mais altas (3 a 10 µM) na reação IAA/HRP/O₂ nas condições padrão, observou-se um aumento sistemático da emissão (Fig. III.4), notando-se um maior aumento após 5 min. de reação. Assim, calculou-se a constante de transferência de energia $K_{ET}\tau^0$ através do gráfico duplo-recíproco (Fig. III.5), obtendo-se um valor de $4,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

III.2.2.2 - Transferência para a 4-Tiouridina

A 4-TU, quando presente em concentrações na faixa de 13 a 39 µM no sistema IAA/HRP/O₂ pode agir como agente sensibilizador, isto é, pode aumentar a emissão do sistema (Fig. III.6) após 3 minutos de reação. O valor de $K_{ET}\tau^0$ obtido pelo gráfico duplo-recíproco (Fig. III.7) foi de $5,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

III.2.2.3 - Efeito de íons Mg⁺⁺

Usou-se para as medidas cinéticas uma

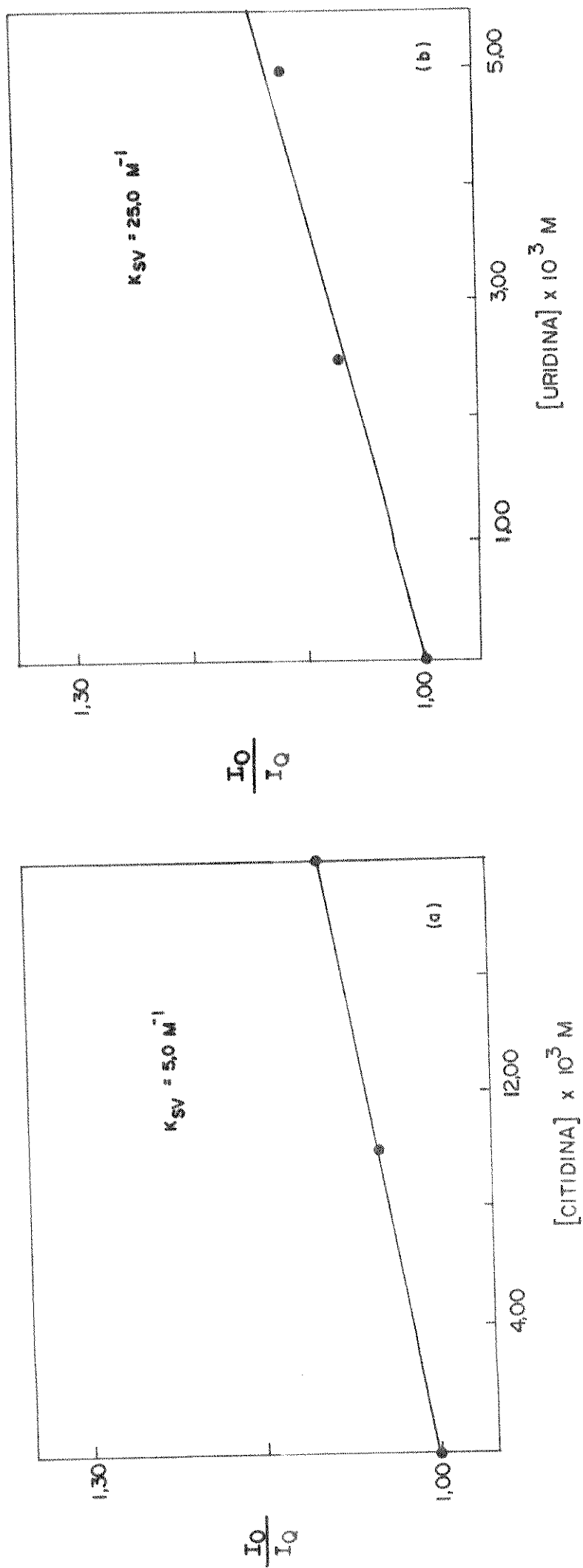


Figura III.3 - Gráficos Stern-Volmer para o efeito de supressão da emissão do sistema IAA/HRP/O₂ nas condições da Fig. III.2. (a) gráfico para citidina; (b) gráfico para uridina.

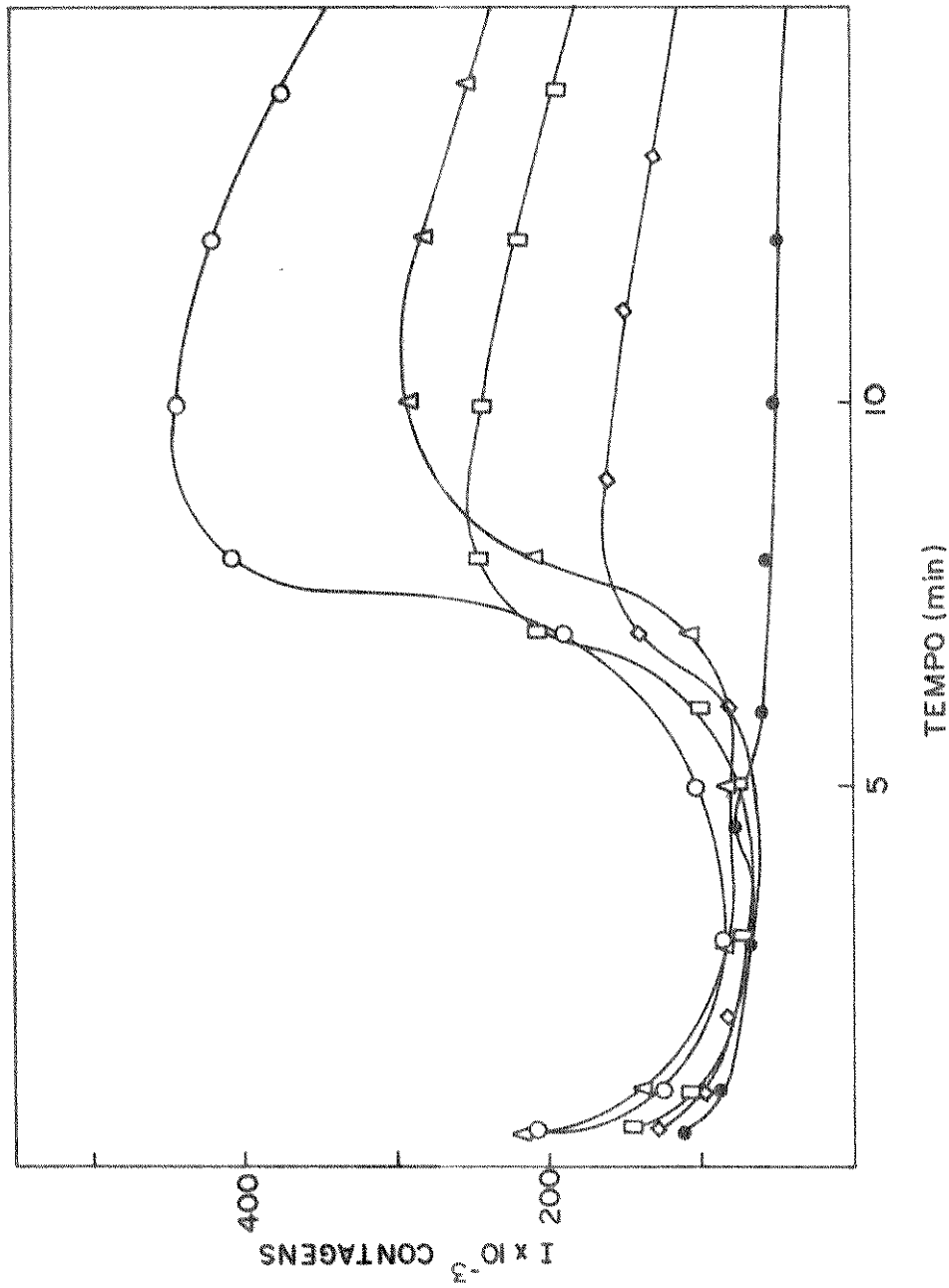


Figura III.4 - Gráfico da cinética de emissão do sistema IAA/HRP/O₂ nas condições da Fig. III.2 na ausência de tRNA ($-\bullet-$) e na presença de 2 μ M ($-\diamond-$), 4 μ M ($-\square-$), 8 μ M ($-\Delta-$) e 12 μ M ($-\circ-$) de tRNA de E. coli.

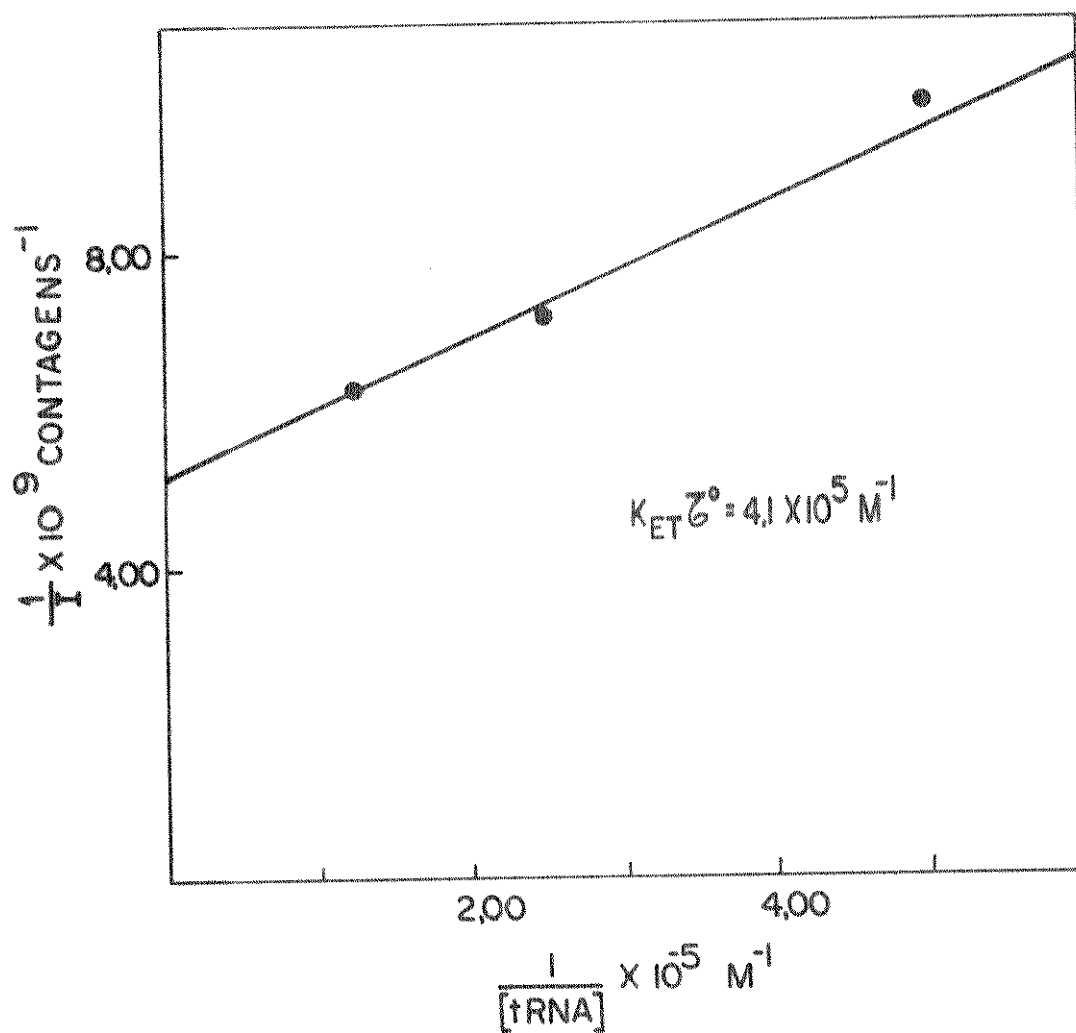


Figura III.5 - Gráfico duplo-recíproco para o efeito de concentração de tRNA sobre a emissão do sistema IAA/HRP/O₂ nas condições da Fig. III.2.

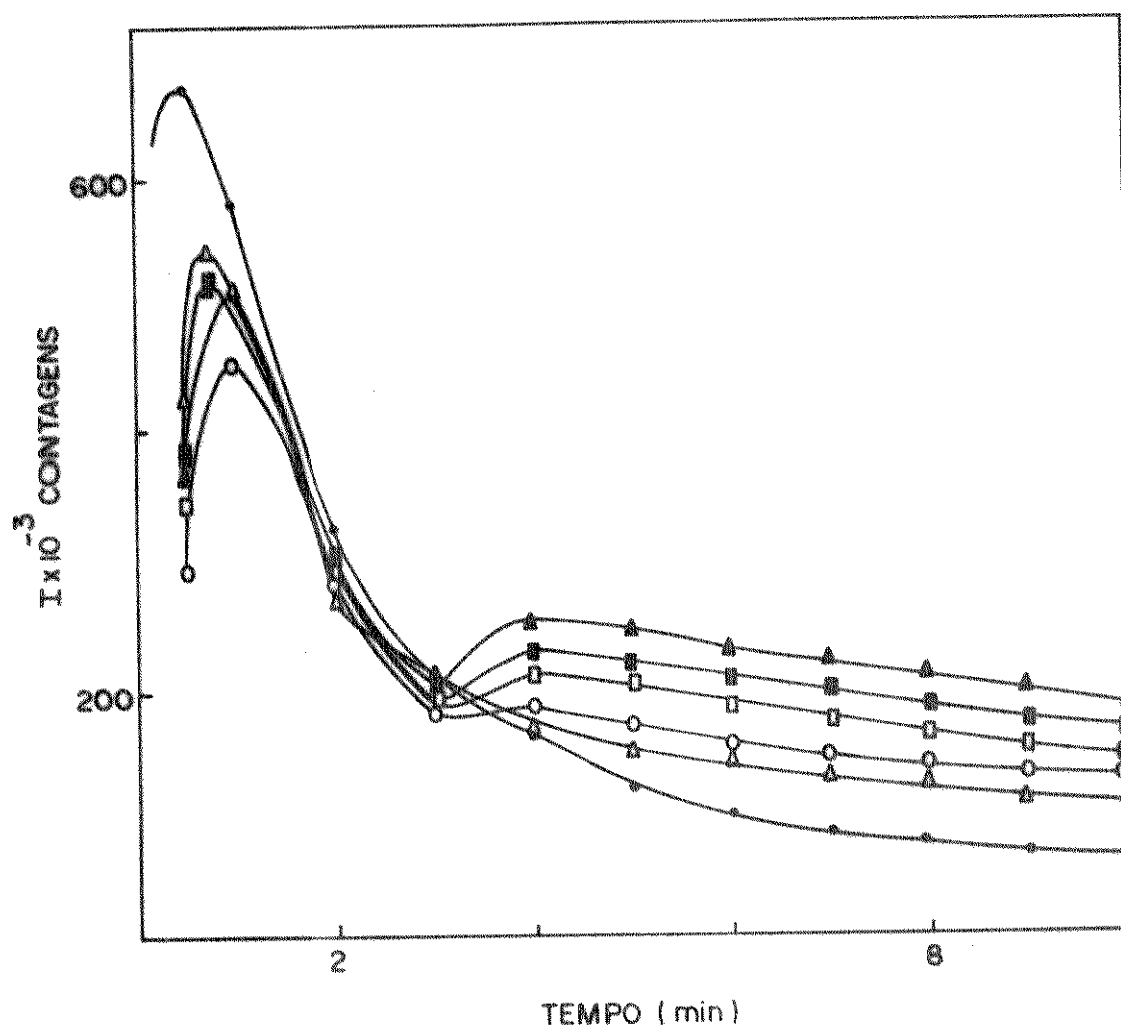


Figura III.6 - Gráfico da cinética de emissão do sistema IAA/HRP/O₂ nas condições da Fig. III.2 na ausência de acceptor (—●—) e na presença de 13 µM (—△—), 19,5 µM (—○—), 26 µM (—□—), 32,5 µM (—■—) e 39 µM (—▲—) de 4-TU.

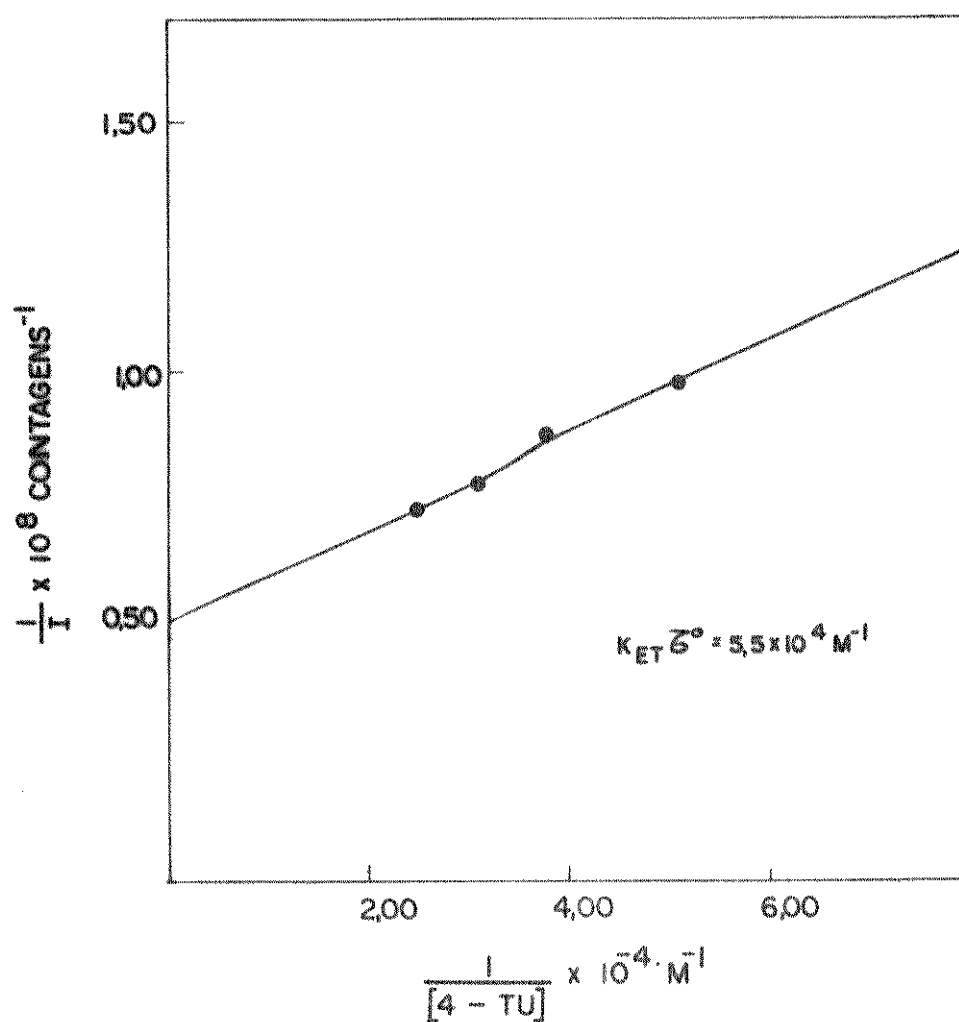


Figura III.7 - Gráfico duplo-recíproco para o efeito da concentração de 4-TU sobre a emissão do sistema IAA/HRP/O₂ nas condições da Fig. III.2.

concentração fixa de Mg^{++} de 1,4 mM, tomando-se cuidado de verificar se o consumo de oxigênio da reação não estava sendo alterado.

O aumento inicial da intensidade de emissão do sistema IAA/HRP/ O_2 por ação de tRNA não foi alterado significativamente por adição de Mg^{++} 1,4 mM, mas após 5 min. de reação o aumento da emissão tornou-se mais acentuado na presença do cátion bivalente (Fig. III.8). Apesar disso, obteve-se um valor K_{ET}^0 igual a $2,3 \times 10^5 M^{-1}$, (Fig. III.9), que é da mesma ordem de grandeza que o obtido sem o íon (Fig. III.5).

III.2.3 - Efeito de Óxido de Deutério

A reação IAA/HRP/ O_2 realizada em tampão deuterado 0,05M pD 3,4 tem sua emissão aumentada (ítem II.2, página 82). Na presença de tRNA, porém, foi incapaz de transferir a energia gerada para o ácido nucleico, ocorrendo inclusive uma supressão por parte deste último. Este efeito é mostrado na Fig. III.10.

III.2.4 - Efeito da Histidina

A histidina, agente supressor de 1O_2 , foi adicionada ao sistema tRNA/IAA/HRP/ O_2 para se verificar o efeito de competição entre o ácido nucleico e o aminoácido pela energia gerada na reação IAA/HRP/ O_2 . Um aumento da emissão após 3 min. de reação, bem mais acentuado foi verificado no caso em que a histidina foi adicionada conjuntamente com o tRNA. Isto é mostrado na Fig. III.11, onde não foi possível registrar a intensidade máxima de emissão devido às limitações da aparelhagem.

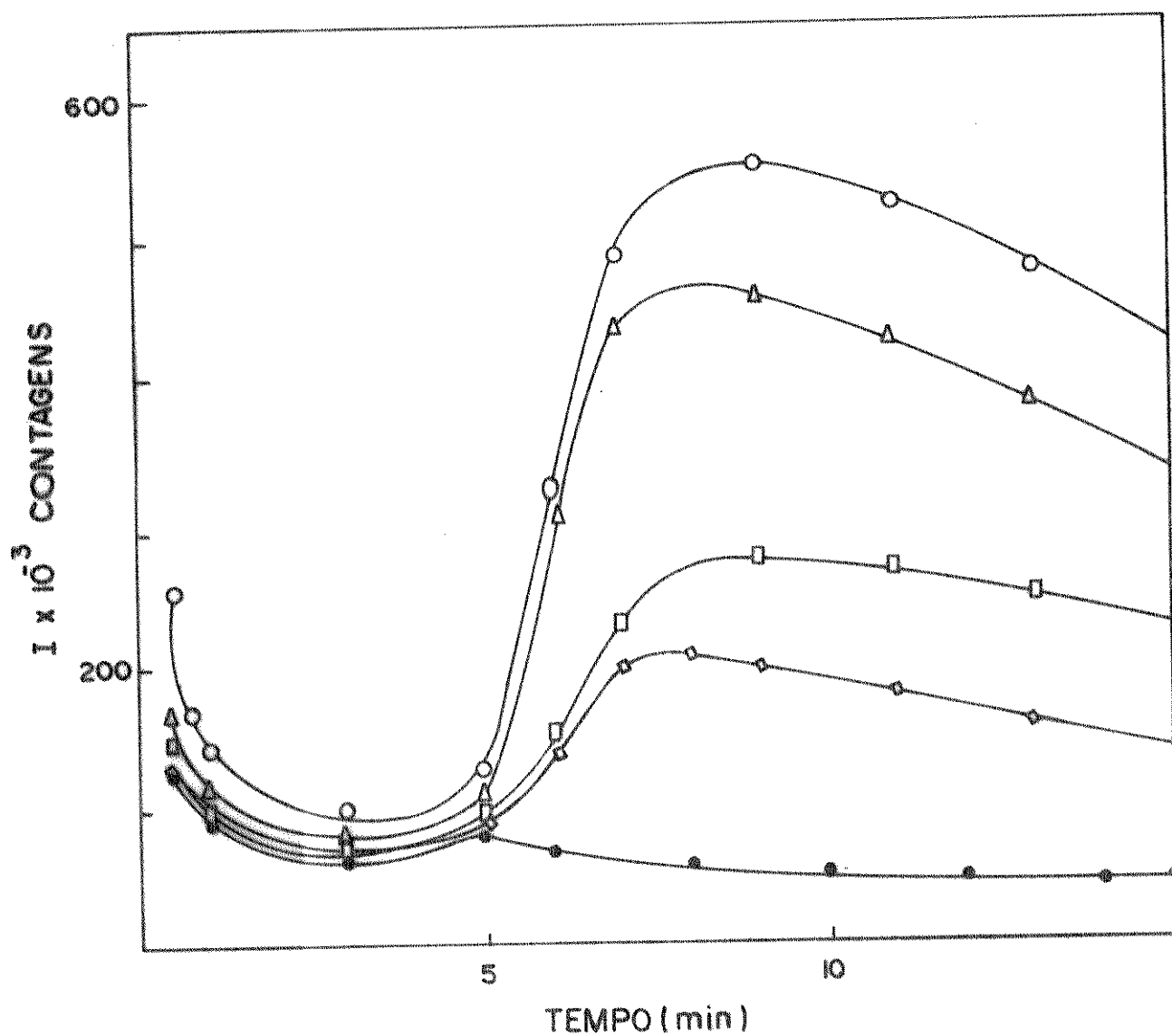


Figura III.8 - Gráfico da cinética da emissão do sistema IAA/HRP/O₂ nas condições da figura III.2, na presença de tRNA e Mg⁺⁺. A curva (—●—) corresponde ao controle, (—◇—) 2 µM, (—□—) 4 µM, (—△—) 8 µM e (—○—) 12 µM de tRNA, todos contendo 1,4 mM de Mg⁺⁺.

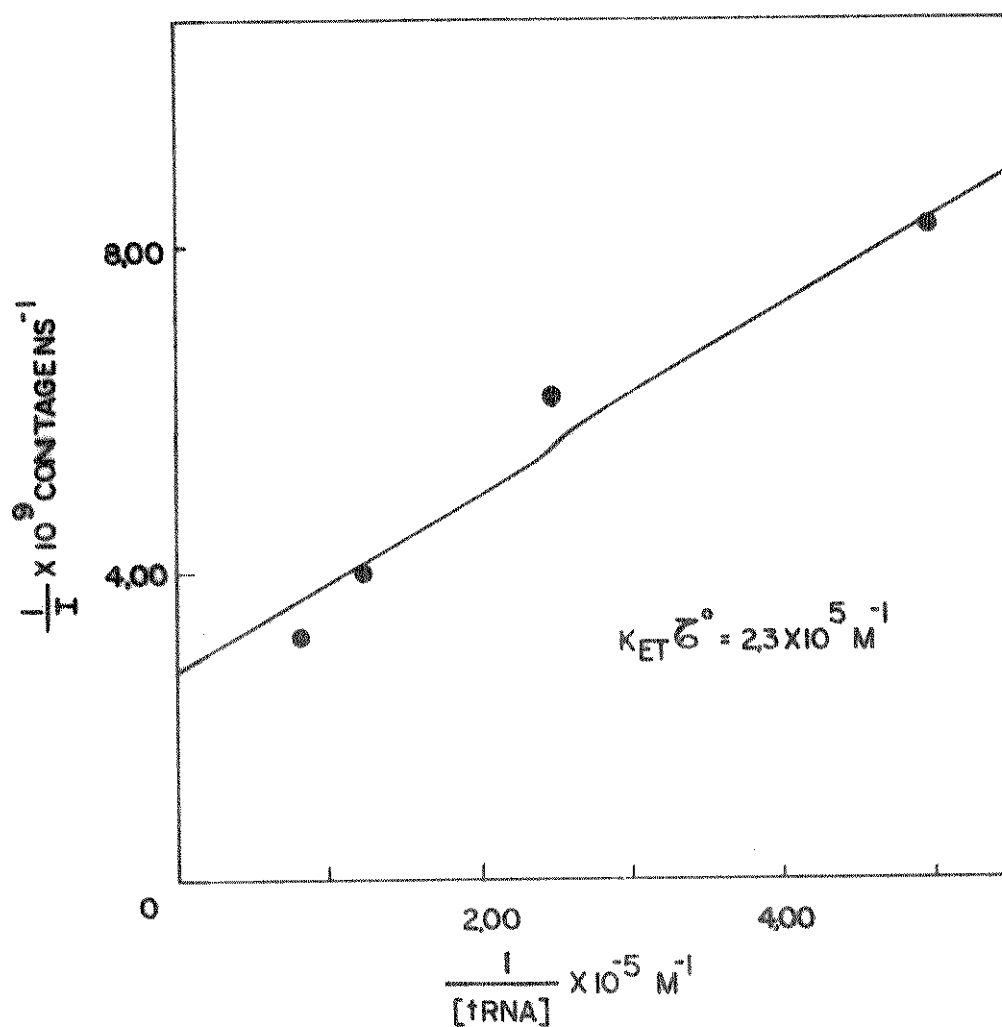


Figura III.9 - Gráfico duplo-recíproco para o efeito da concentração de tRNA sobre a emissão do sistema IAA/HRP/O₂ nas condições da Fig. III.2 na presença de 1,4 mM de Mg⁺⁺.

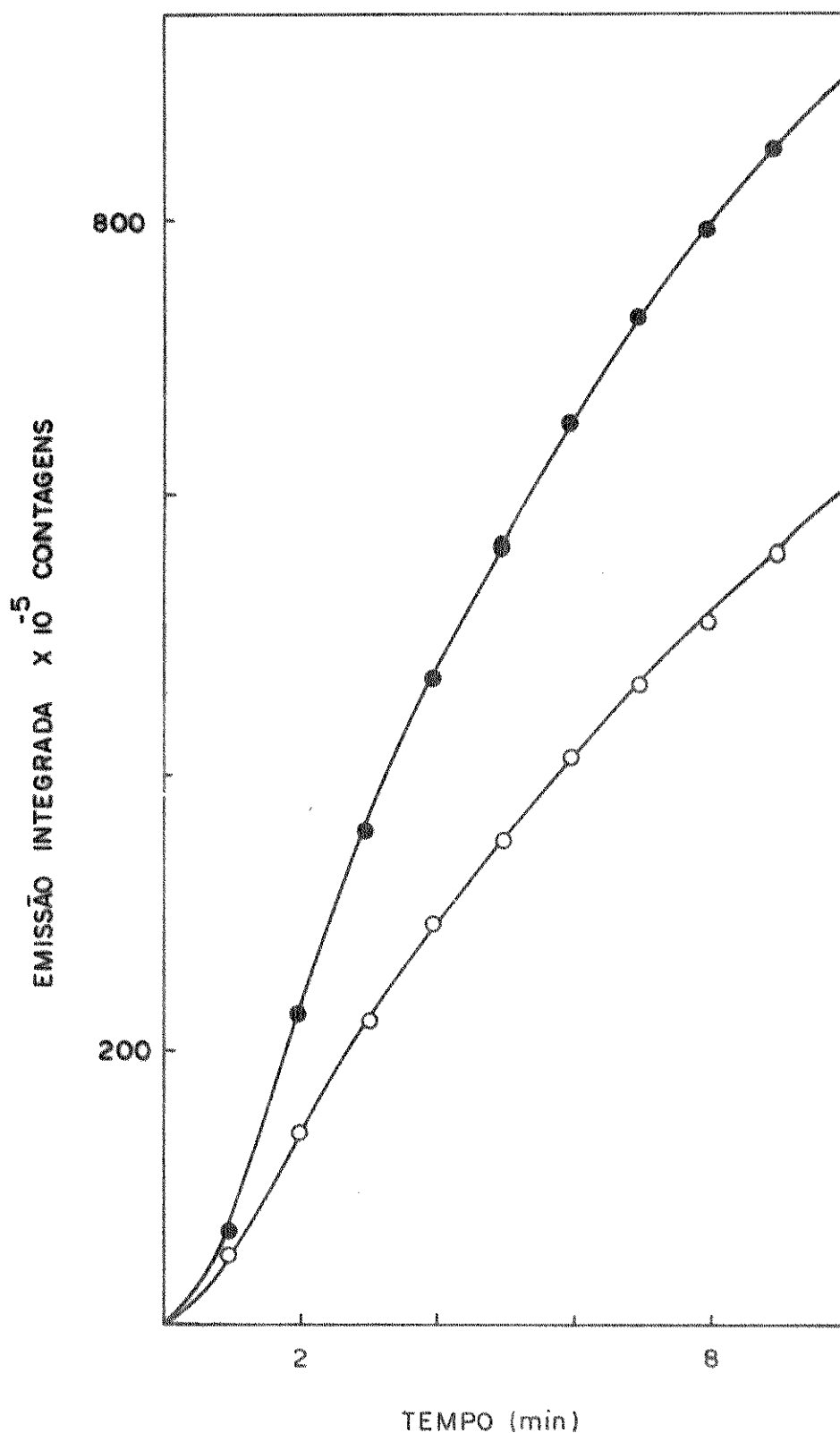


Figura III.10 - Gráfico da cinética de emissão do sistema IAA (10^{-4} M)/HRP (0,25 μ)/EDTA (30 μ M)/O₂ contendo (0,17 M de etanol em tampão acetato deuterado 0,05 M pD 3,4 na ausência (—●—) e na presença (—○—) de 8 μ M de tRNA.

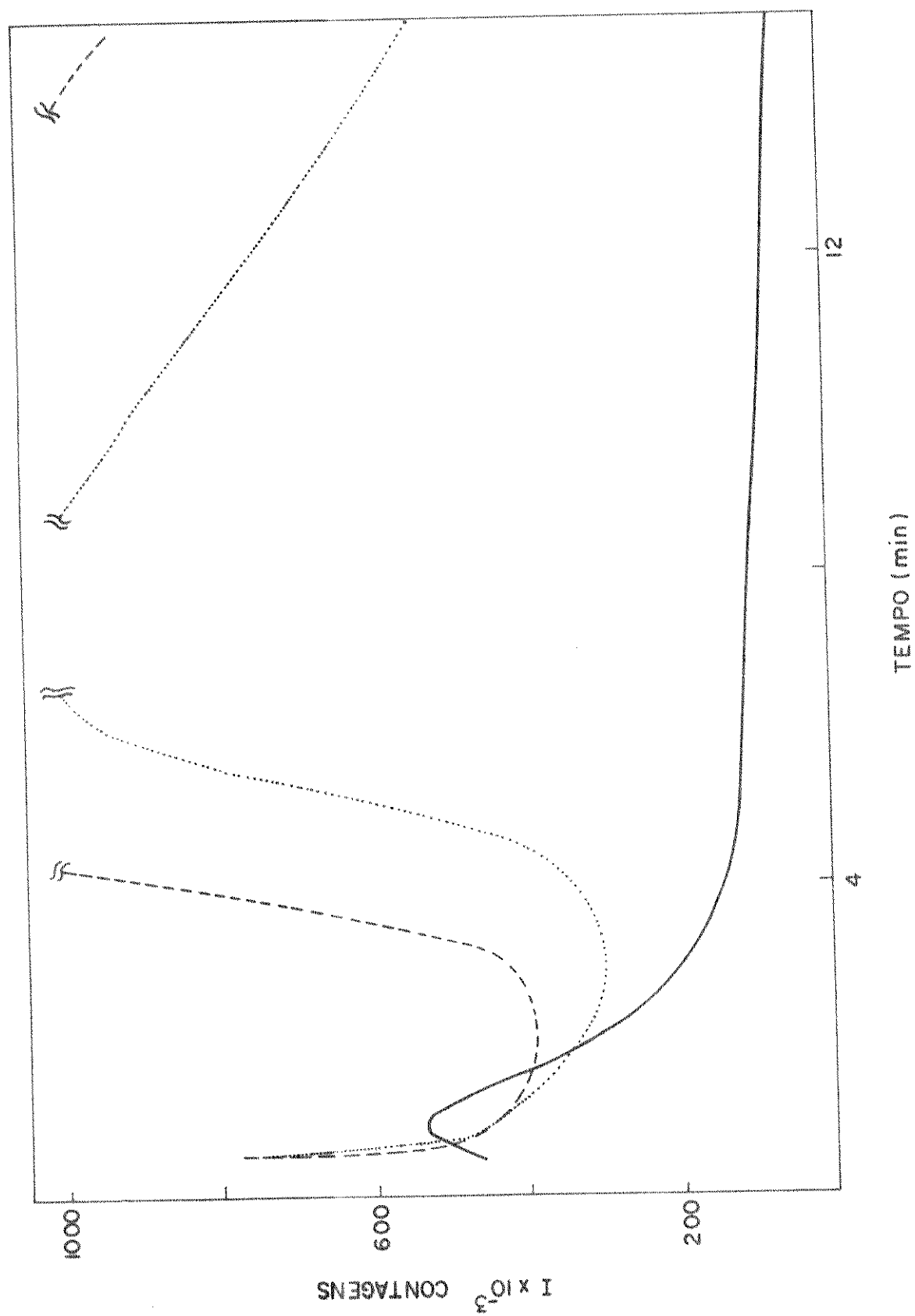


Figura III.11 - Cinética de emissão do sistema IAA/HRP/ O_2 nas condições da Fig. II.2 (—) representa a curva controle; (---) na presença de 40 μ M de tRNA e (-.-.-) na presença de 40 μ M de tRNA e 10 mM de histidina.

III.2.5 - Transferência de Energia Proveniente de Outros Sistemas

O tRNA foi capaz de aceitar energia provenientes de outros sistemas, como por exemplo, o PAA/HRP/O₂ e PPA/HRP/O₂ já citados anteriormente (ítems I.3.3.3 e I.3.3.4, páginas 71 e 76). O gráfico duplo-recíproco para o primeiro sistema forneceu um $K_{ET} \tau^0$ de $3,0 \times 10^5 M^{-1}$ (Fig. III.12) e, para o segundo sistema, $3,5 \times 10^5 M^{-1}$, (Fig. III.13).

III.2.6 - Transferência para tRNA de Levedura

O consumo de oxigênio do sistema IAA/HRP/O₂ nas condições padrão não foi alterado com a presença de 2 mg/ml de tRNA de levedura (extraído segundo método citado na Parte Experimental, página 50).

Este tipo de tRNA não exerceu influência alguma sobre a emissão do sistema controle, a não ser uma pequena supressão após 2 minutos de reação. Este fato foi verificado tanto na presença como na ausência de íons Mg^{++} (Fig. III.14).

III.2.7 - Espectro de Quimiluminescência

O espectro de quimiluminescência do sistema tRNA/IAA/HRP/O₂ foi obtido segundo método citado no ítem IV.2 (página 60) da Parte Experimental. A Fig. III.15 mostra o gráfico obtido onde pudemos verificar dois picos principais de emissão, um em 475 nm e outro de maior intensidade em 550 nm.

III.2.8 - Estudos Fotofísicos

A transferência de energia de IAL eletrônica

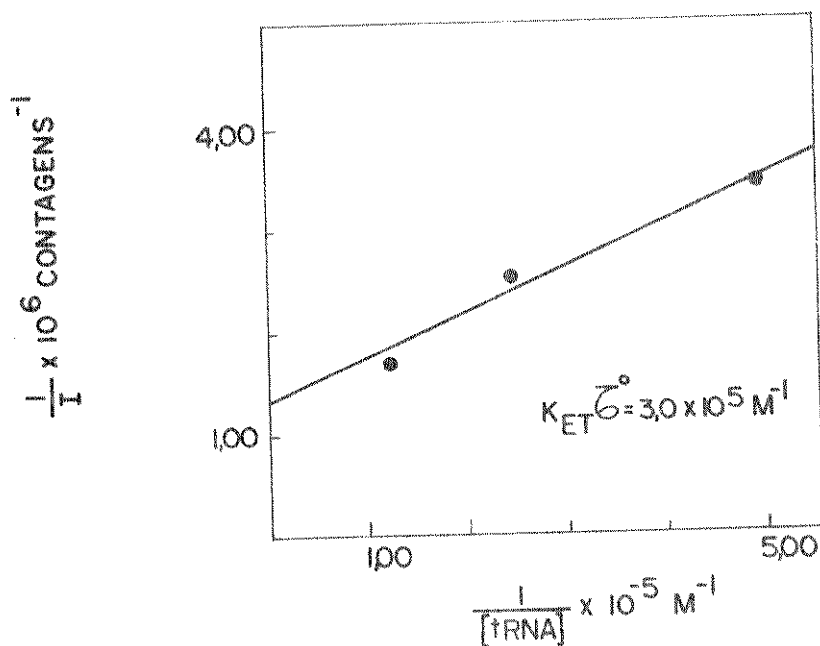


Figura III.12 - Gráfico duplo-recíproco para o efeito da concentração de tRNA sobre a emissão do sistema PAA (14 mM)/HRP (0,5 μM)/ O_2 contendo 0,12 M de etanol em tampão fosfato 0,05 M pH 7,4.

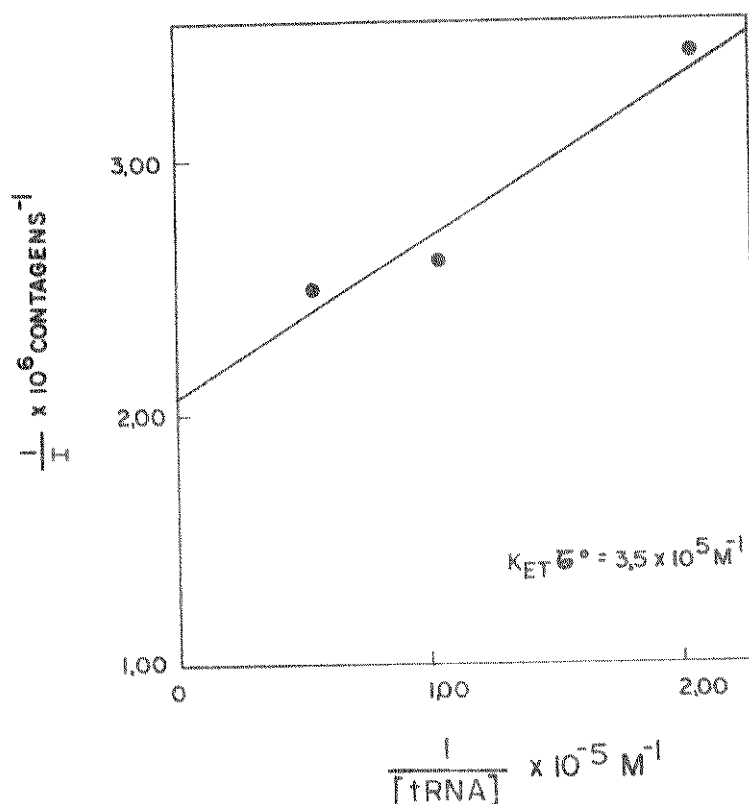


Figura III.13 - Gráfico duplo-recíproco para o efeito da concentração de tRNA sobre a emissão do sistema PPA (14 mM)/HRP (0,5 μM)/ O_2 contendo 0,12 M de etanol em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4.

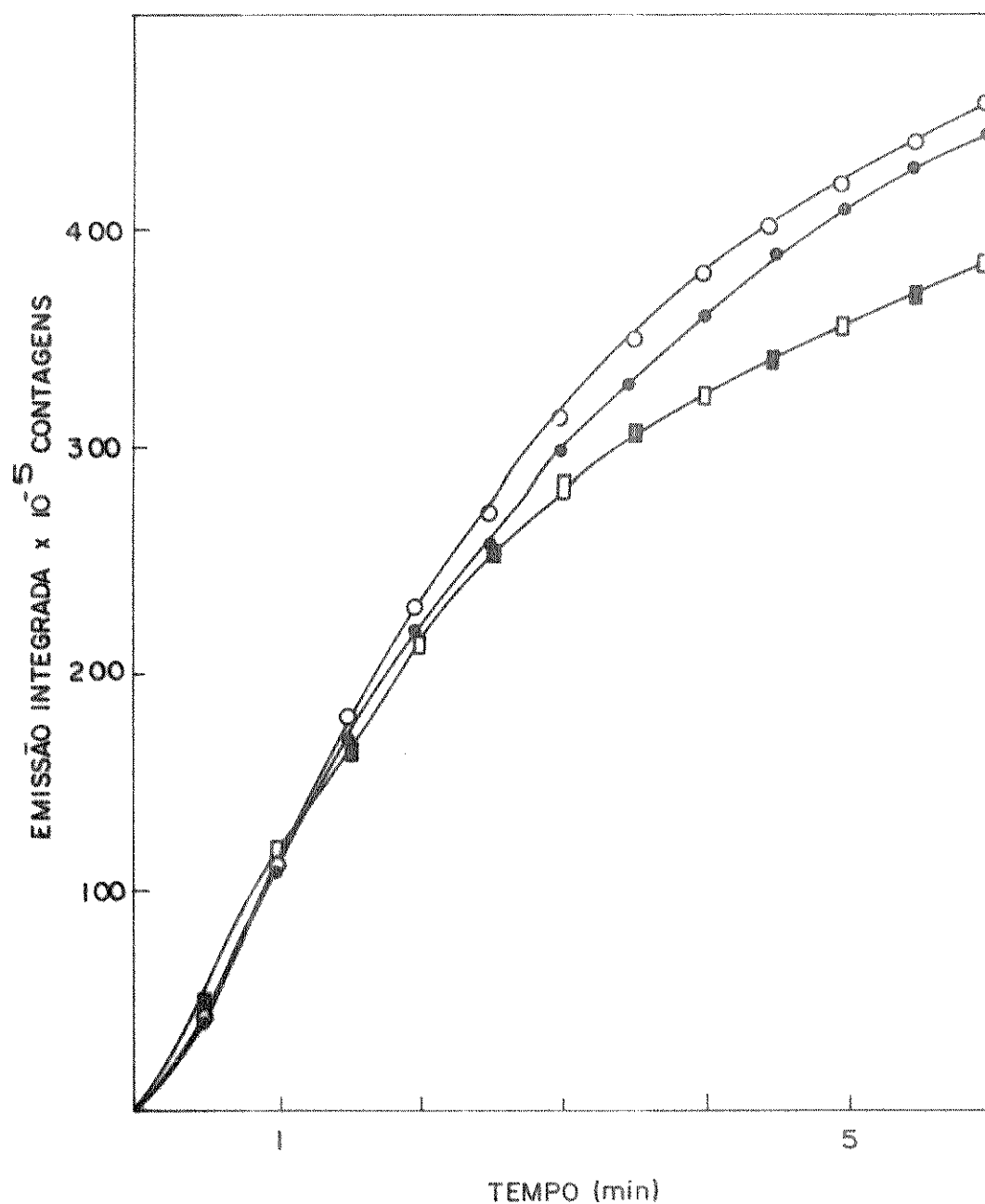


Figura III.14 - Gráfico da cinética de emissão do sistema IAA/(10⁻⁴M)/HRP (0,25 μM)/EDTA (30 μM)/O₂ contendo 0,17 M de etanol em tampão acetato 0,05M, pH 3,8. A figura mostra o controle (—●—), controle na presença de Mg⁺⁺ 1,4 mM (—○—) e na presença de 2 mg/ml de tRNA de levedura sem Mg⁺⁺ (—■—) e, com 1,4 mM de Mg⁺⁺ (—□—).

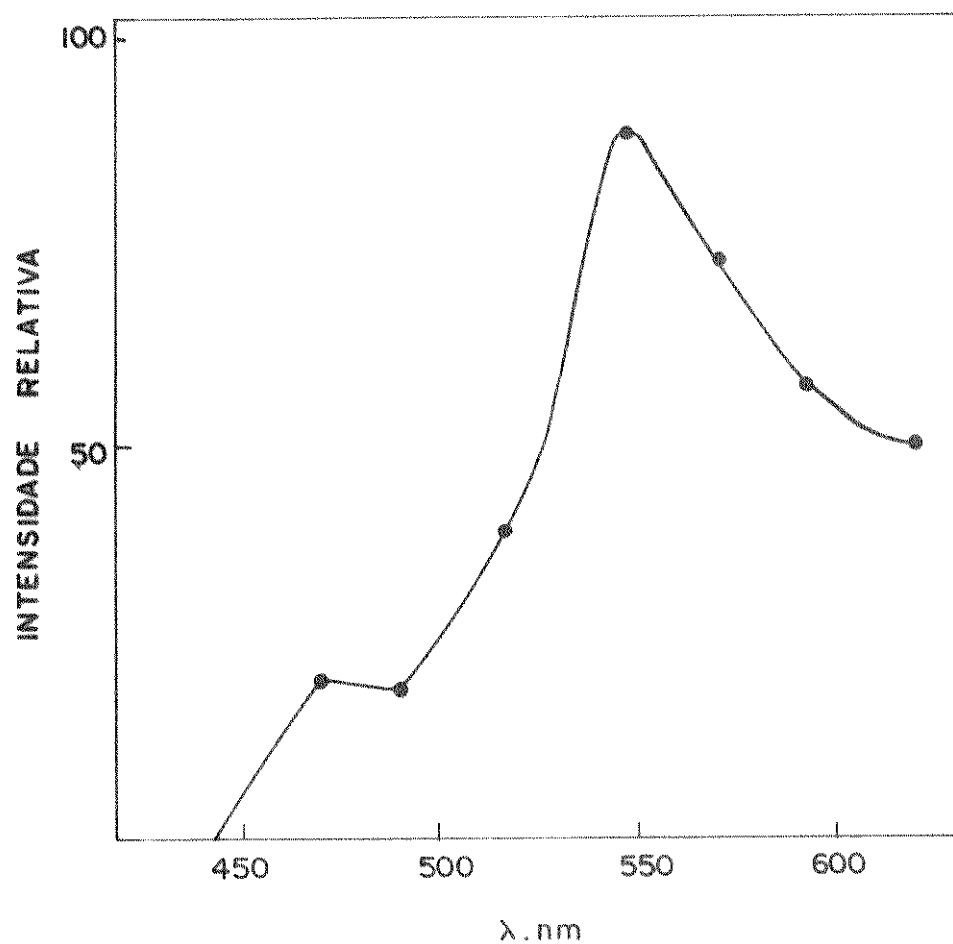


Figura III.15 - Distribuição espectral da emissão sensibilizada por 40 μM de tRNA do sistema IAA (10^{-4}M)/HRP ($0,25\ \mu\text{M}$)/ O_2 contendo 0,17 M de etanol em tampão acetato 0,05 M, pH 3,8.

camente excitado (IAL*), para o tRNA em pH 3,8 foi também, verificada fotofisicamente. O espectro de fluorescência do tRNA (Fig. III.16) é obtido na ausência de IAL com $\lambda_{ex}=335$ nm ou, na presença de IAL com $\lambda_{ex}=280$ nm. Neste último comprimento de onda, somente IAL absorve, sendo sua emissão observada em 345 nm. No primeiro caso, onde o tRNA foi excitado a 335 nm, observou-se emissões em 440 nm e ~520 nm; quando a mistura IAL + tRNA foi irradiada a 280 nm observou-se a emissão do IAL em 345 nm e outras duas em ~450 e 530 nm, correspondentes à emissão de tRNA.

III.2.9 - Espectro de Dicroísmo Circular (CD) do tRNA

O espectro CD do tRNA em pH 3,8 diferiu consideravelmente daquele em H₂O (Fig. III.17), mas com adição de Mg⁺⁺ ao primeiro, a forma do espectro torna-se mais semelhante ao segundo. Além disso, o espectro CD do tRNA em pH 3,8 é modificado tanto na presença como na ausência de Mg⁺⁺ após o tratamento com o sistema enzimático.

III.3 - Estudos de Ligação

III.3.1 - Ligação IAL-tRNA

Além de ocorrerem processos fotoquímicos, como o de transferência de energia, quando tRNA de E.coli está presente na reação IAA/HRP/O₂, uma ligação química entre IAL* gerado na reação e o tRNA pode ser detectada.

O tRNA foi submetido ao tratamento com o sistema de reação usando [2-¹⁴C]IAA e foi precipitado seguindo o método descrito na Parte Experimental (ítem III.4, página 57). Após este tratamento observou-se que havia incorporação isotópica

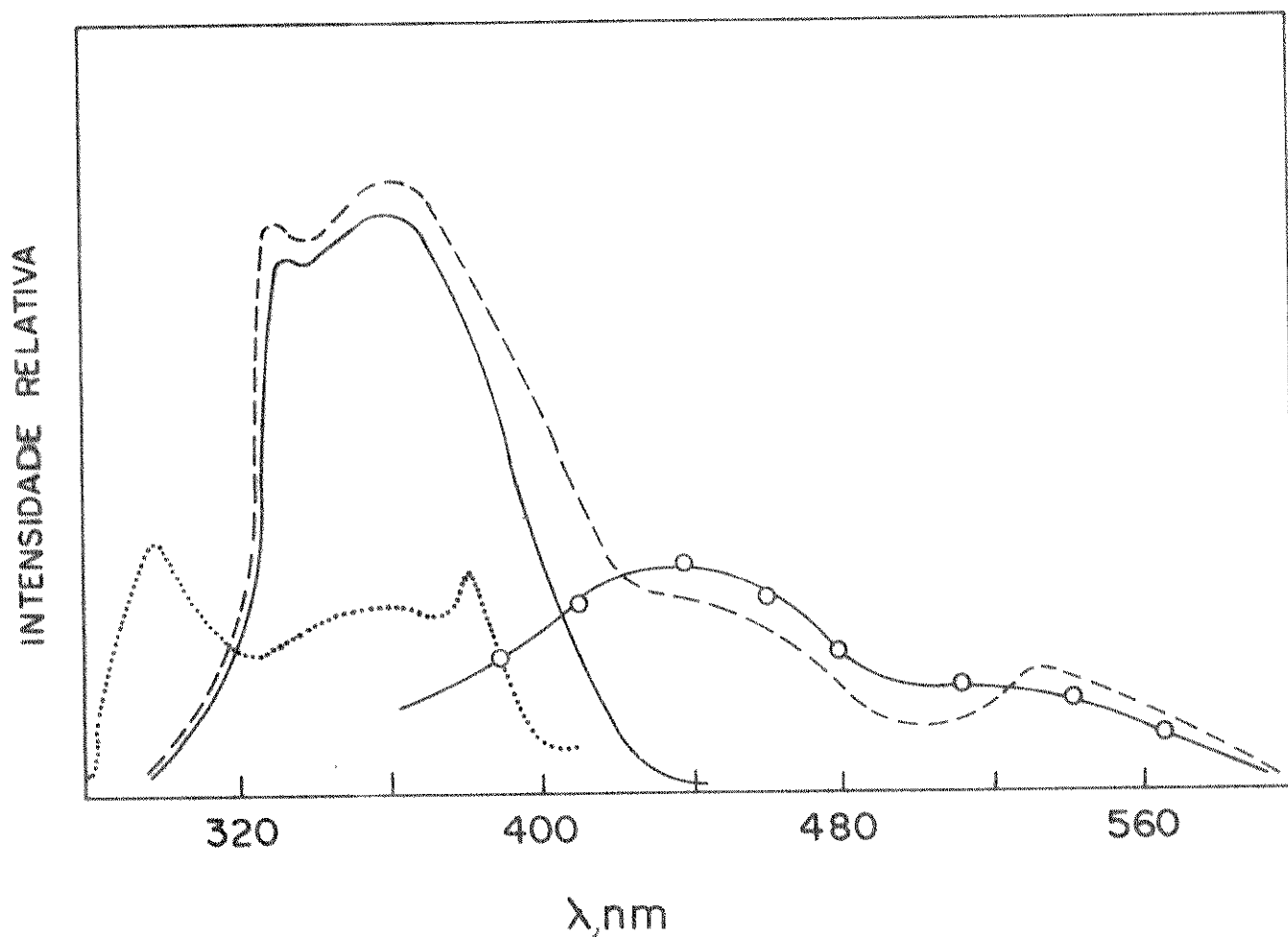


Figura III.16 - Transferência de energia do IAL excitado para o tRNA. A curva (---) mostra o espectro de emissão da mistura de 0,1 mM de IAL e 40 μ M de tRNA excitado a 280 nm; neste comprimento de onda o tRNA não absorve apreciavelmente. A curva (—) representa o espectro de emissão de 0,1 mM de IAL excitado a 280 nm, enquanto a curva (—o—) representa o espectro de emissão de 40 μ M de tRNA excitado em 335 nm. A curva (···) é o espectro de excitação do tRNA para emissão em 440 nm.

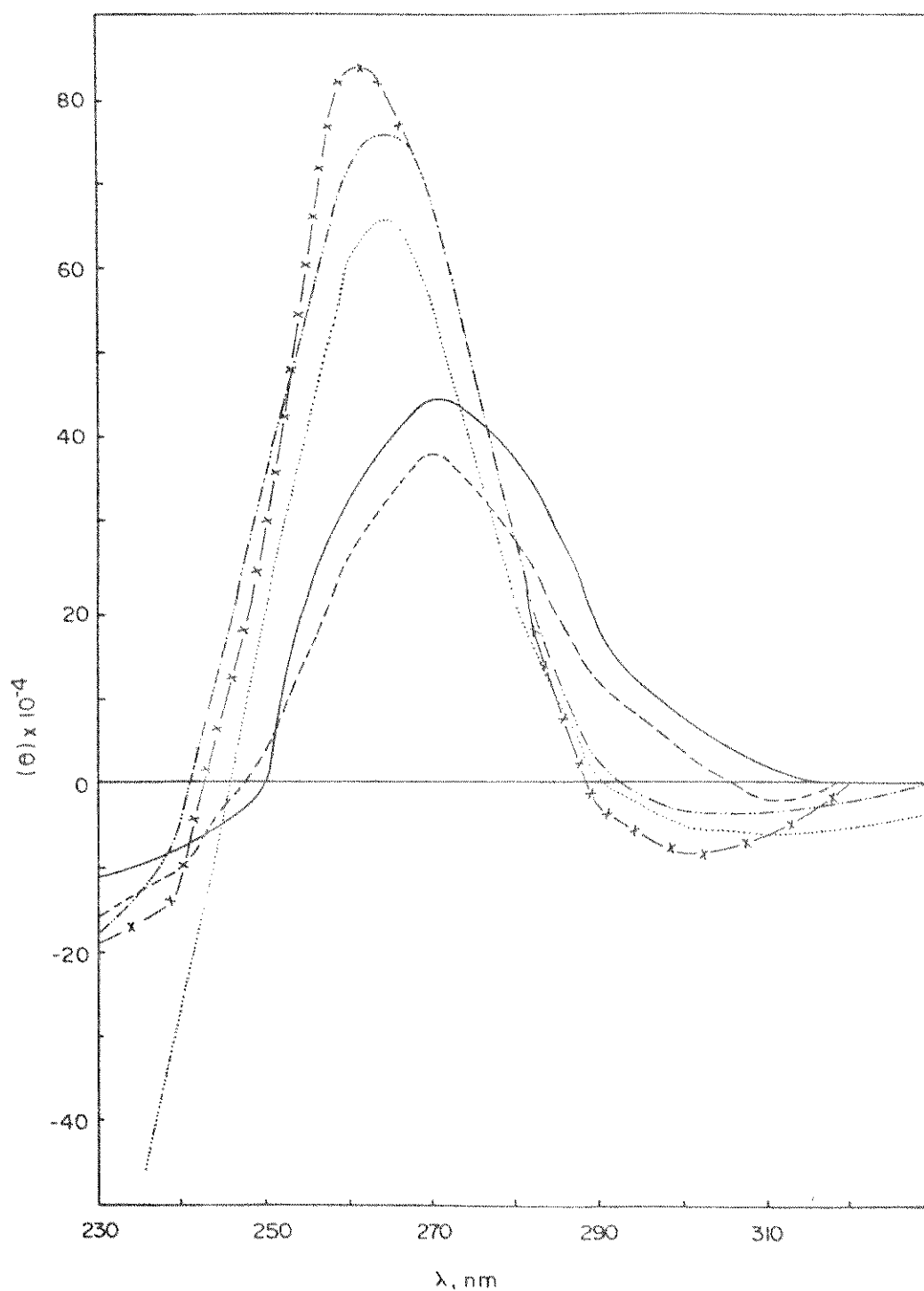
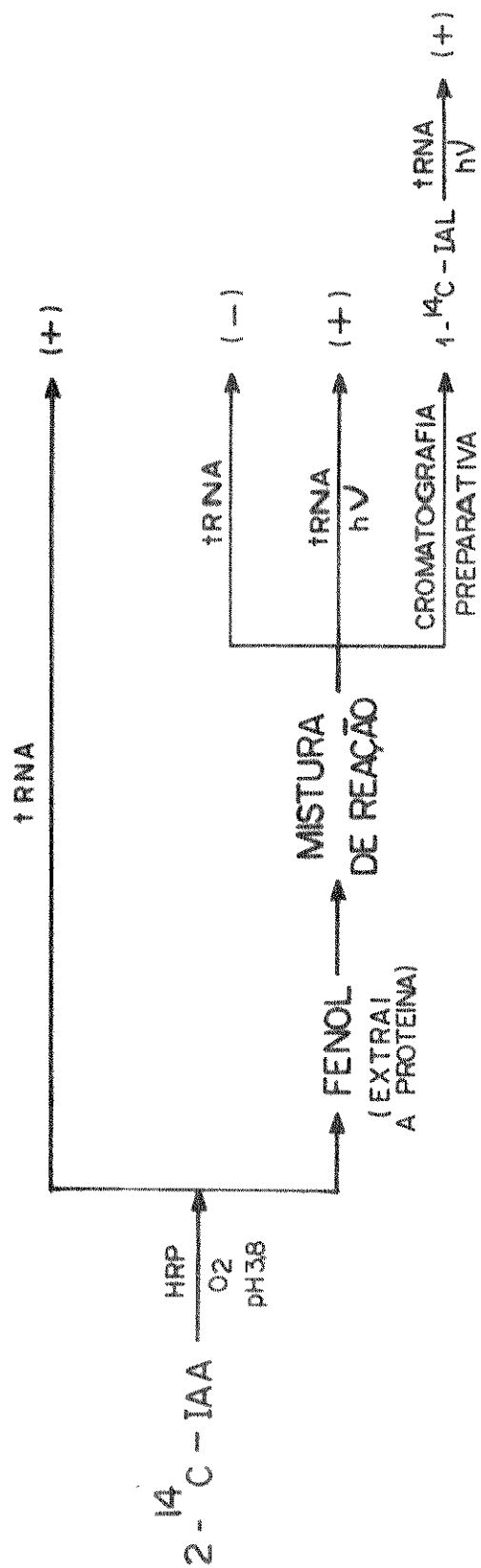


Figura III.17 - Espectro CD de 50 $\mu\text{g/ml}$ do tRNA de *E.coli*. A curva (—) mostra o ácido nucleico em tampão acetato pH 3,8. Após o tratamento com o sistema IAA (10^{-4}M)/HRP (0,25 μM)/EDTA (30 μM)/ O_2 o espectro é (---) e, na presença de Mg^{++} 1,4 mM é (···). Os espectros (-x-x-) e (- - -) correspondem ao tRNA em H_2O e em tampão acetato/ Mg^{++} , respectivamente.

no tRNA. Se o tRNA era adicionado após a oxidação do IAA, nenhuma incorporação era observada a menos que a mistura fosse irradiada a 280 nm por 12 horas induzindo aproximadamente 18% de incorporação. O mesmo resultado foi obtido por irradiação a 280 nm de uma mistura de $[1-^{14}\text{C}]\text{-IAL}$ e tRNA (Esquema XX). A tabela III.1 reúne estes resultados, os quais foram obtidos nas condições padrão de reação, ou seja, pH 3,8. Verificou-se, então o efeito da variação do pH do meio reacional sobre a ligação. O que se observou foi que em pH 3,8 esse processo era muito mais eficiente que nos 5,6 e 6,8, sendo que neste último era praticamente nula (tabela III.2).

A tabela III.1 mostra também a influência de competidores de energia, como eosina e histidina sobre a incorporação isotópica no tRNA. Pudemos verificar que a eosina diminuía a marcação cerca de 12% e histidina cerca de 25%.



ESQUEMA XX

Tabela III.1 - INCORPORAÇÃO DE IAL ELETRONICAMENTE EXCITADO DURANTE A OXIDAÇÃO DE $|2-^{14}\text{C}|-$ IAA CATALISADA POR PEROXIDASE.

A REAÇÃO CONTROLE ERA FEITA COM $50\ \mu\text{M}$ DE $|2-^{14}\text{C}|-$ IAA, $30\ \mu\text{M}$ DE EDTA, $0,5\ \text{mg/ml}$ DE tRNA E $0,25\ \mu\text{M}$ DE HRP CONTENDO $86\ \text{mM}$ DE ETANOL EM TAMPÃO ACETATO $0,05\ \text{M}$ pH 3,8.

	cpm	%
Branco ^a	404	0
Controle ^b	7390	100
Pré-Tratado ^c	450	6
Pré-Tratado(irrad) ^d	1350	18
Eosina ^e	6503	88
Histidina ^e	5540	75

- a) O branco consistia da mistura $(2-^{14}\text{C})-\text{IAA}/\text{tRNA}/\text{EDTA}$ sem HRP.
- b) O controle consistia do branco tratado com HRP por 15 min.
- c) O pré-tratado consistia em adicionar o tRNA após a reação IAA/HRP/ O_2 e incubar por 15 min.
- d) O pré-tratado (irrad) consistia em irradiar a 280 nm a mistura de c por 12 horas.
- e) eosina ($5 \times 10^{-5}\text{M}$) e histidina ($5 \times 10^{-3}\text{M}$) adicionadas ao controle para competição pela energia.

Tabela III.2 - INFLUÊNCIA DO pH DO MEIO SOBRE A LIGAÇÃO IAL ELETRONICAMENTE EXCITADO E tRNA.

	CPM		
	pH 3,8	pH 5,6	pH 6,8
Branco	750	230	180
Controle	11300	1030	180
Razão C/B	15,1	4,5	1

A variação da concentração de tRNA na reação mostrou que existia uma quantidade ótima de tRNA (3 mg/ml) onde a ligação era mais efetiva (~20%). A Fig. III.18 mostra este efeito, bem como o de diminuição de cerca de 40% de ligação por efeito de íons Mg^{++} .

III.3.2. Tratamento com Endonucleases

Desde que obtive a ligação do IAL ao tRNA, houve necessidade de se localizar esta ligação dentro da estrutura do tRNA. Um dos primeiros passos foi submeter o tRNA tratado com o sistema 2- ^{14}C -IAA/HRP/ O_2 à hidrólise com endonucleases seguindo o procedimento descrito no Ítem III.8 da Parte Experimental (página 59). Esta hidrólise provoca a quebra das ligações fosfato entre os nucleotídeos rompendo, assim, a estrutura do tRNA, obtendo-se como resultado uma mistura de nucleotídeos em solução. Uma parte desta mistura foi cromatografada como já descrito (Ítem III.1, página 55). Outra parte do tRNA hidrolisado foi irradiada a 254 nm (comprimento de onda onde adutos sofrem reversão aos seus compostos originais) por 4 horas e aí cromatografada como a anterior. O radiocromatograma (Fig. III. 19) revelou um

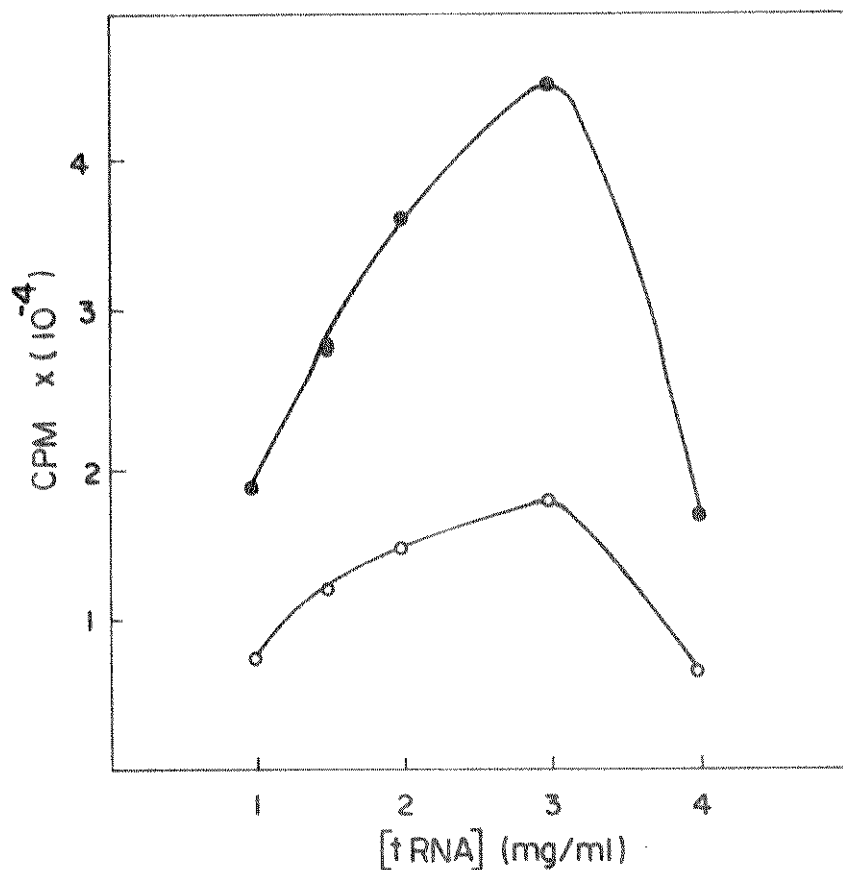


Figura III.18 - Proteção da ligação IAL-tRNA pelo Mg^{++} . A curva (—●—) representa a quantidade de radiatividade incorporada no tRNA durante a reação $2\text{-}^{14}\text{C-IAA/HRP/O}_2$ na ausência de Mg^{++} , a curva (—○—), na presença de 1,4 mM de Mg^{++} .

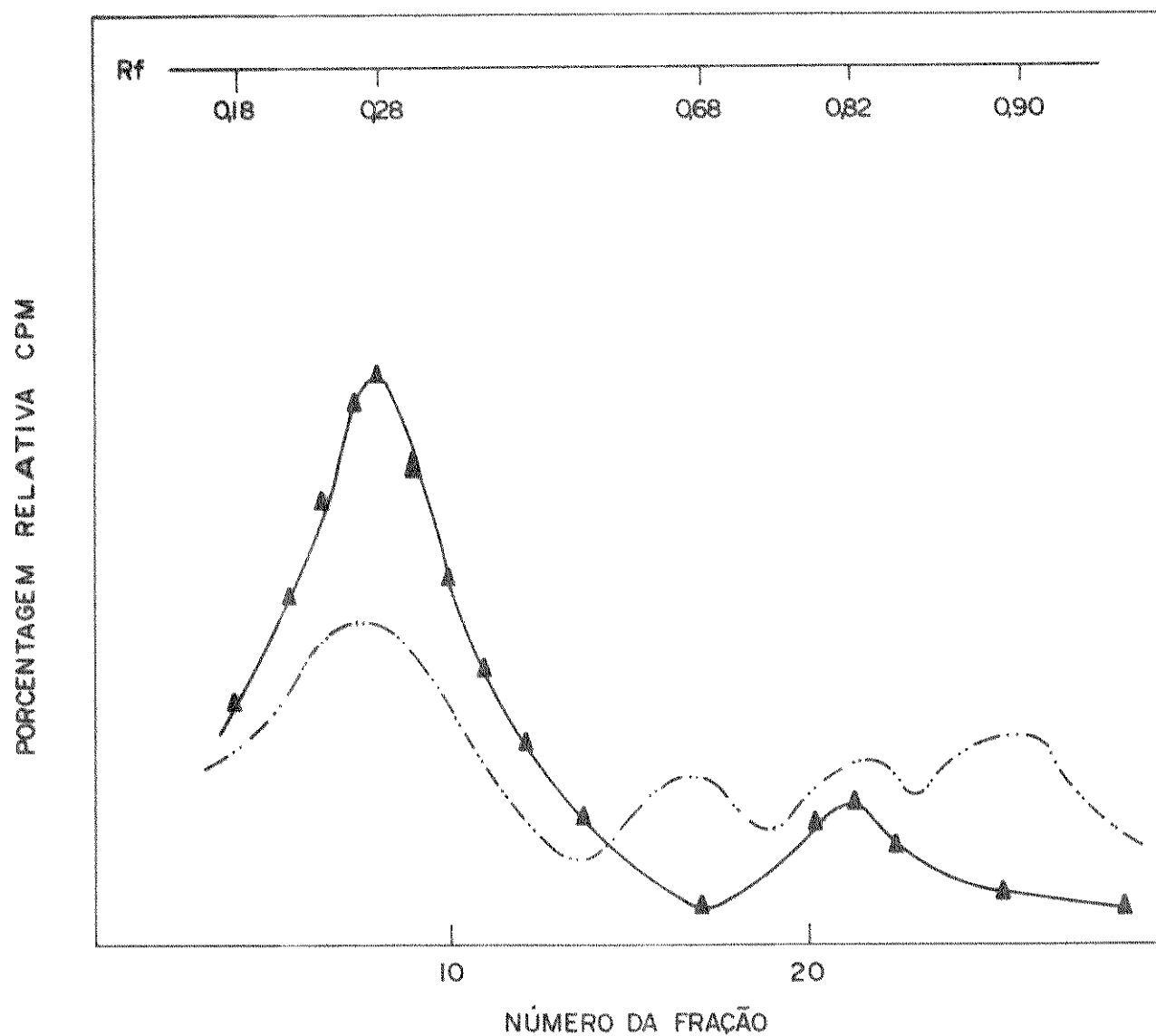


Figura III.19 - Perfil cromatográfico do tRNA tratado com endonucleases. (—▲—) é o tRNA após a hidrólise e (---) é o tRNA após a hidrólise e irradiado a 254 nm durante 4 horas.

pico com Rf 0,28 para o primeiro caso e para o segundo, dois picos, um com Rf 0,28, mas com menor intensidade que o anterior e, outro com Rf 0,98.

III.3.3 - Ligação IAL-Uridina

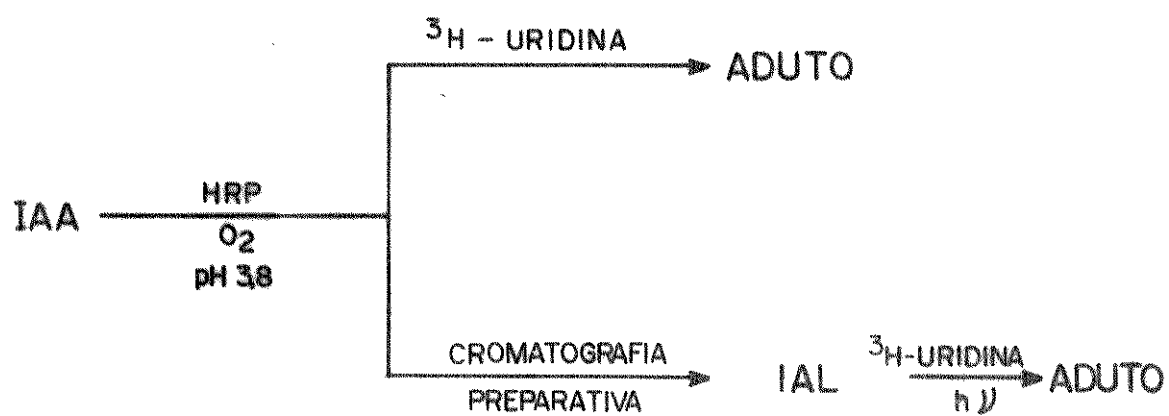
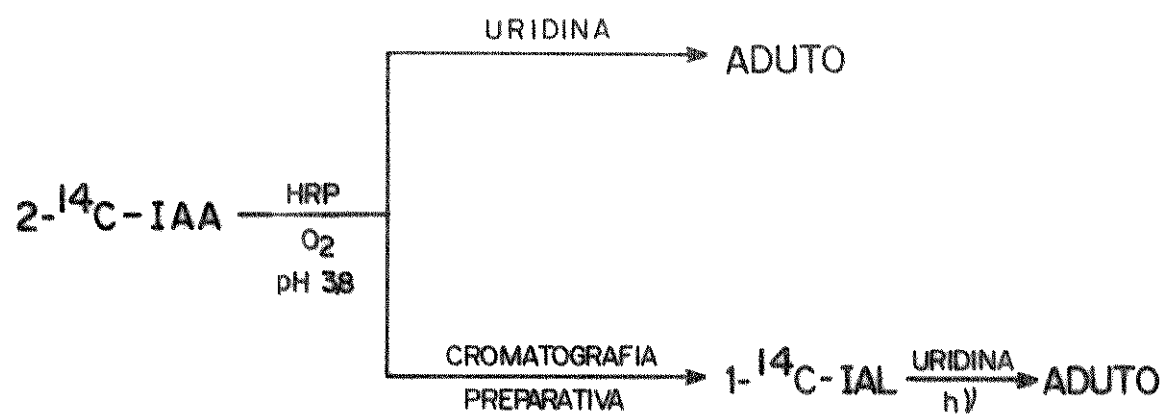
Foi de interesse investigar qual era o resíduo nucleotídico no tRNA que estava envolvido na ligação de IAL*. Como a uridina foi o que apresentou maior constante de supressão (ítem III.2.1.2, página 96), poderia ser o responsável. De fato, experimentos fotoquímicos e bioenergizados com 2-¹⁴C-IAA ou ³H-uridina descritos na Parte Experimental (ítem III.5, página 57) e esquematizados no esquema XXI, mostraram que este nucleotídeo era capaz de se ligar ao IAL* formando um produto que apresentou um Rf de 0,28 no sistema de solventes utilizado (ítem III.1 da Parte Experimental, página 55). Este produto apareceu em todos os casos de variação de marcação e/ou de processo. A Fig. III.20 mostra o perfil radiocromatográfico destes experimentos.

Quando guanosina, citidina, adenosina e 4-TU substituíram a uridina na reação ou na fotólise não se observou nenhum produto.

III.4 - Teste de aminoacilação

Além dos testes de ligação realizados, foi interessante verificar a influência desta ligação sobre a capacidade aminoaciladora do tRNA.

Assim, o tRNA submetido ao tratamento com o sistema de reação IAA/HRP/O₂ foi tratado com a enzima aminoacil-tRNA sin



ESQUEMA XXI

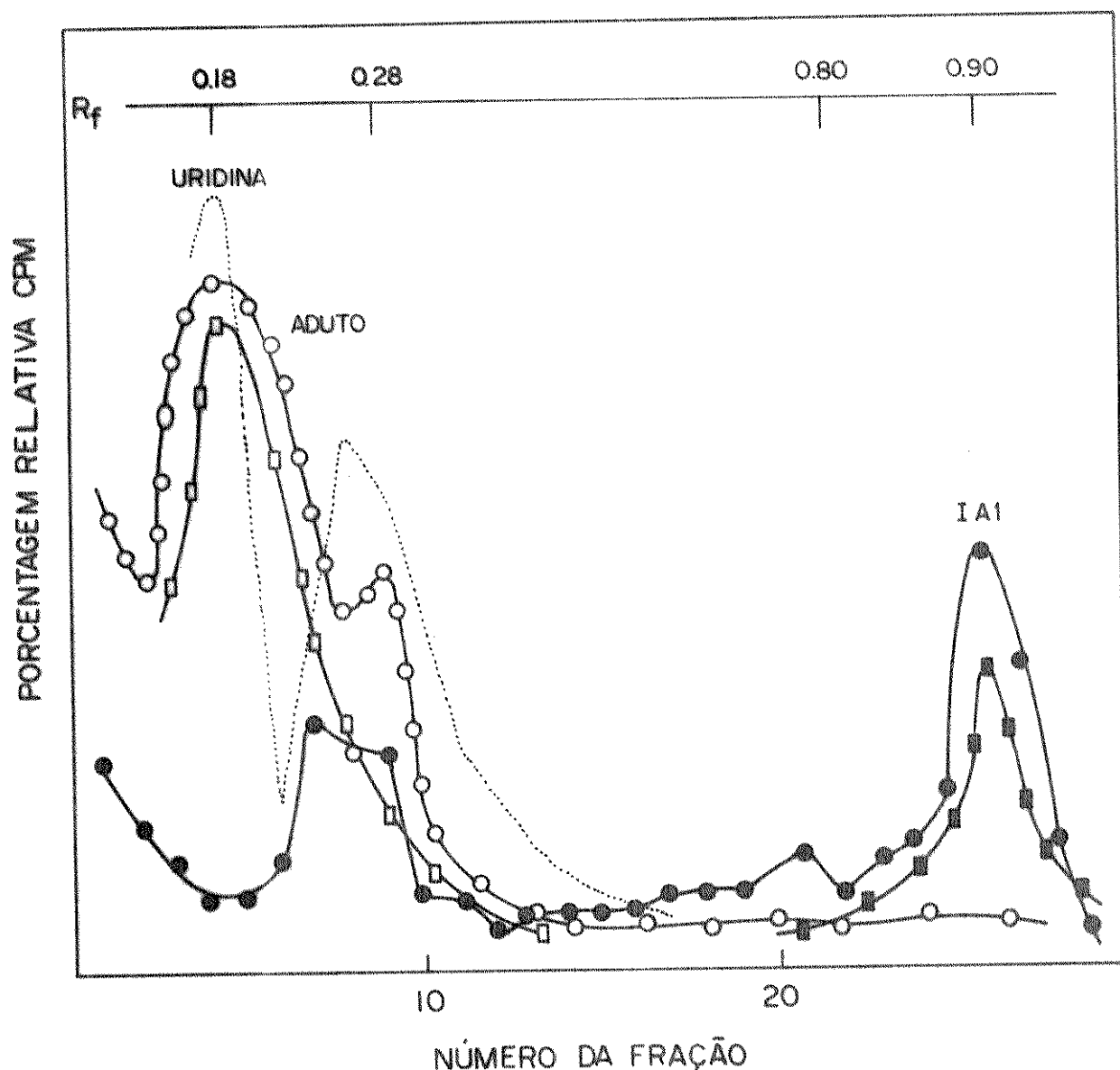


Figura III.20 - Formação de aduto entre IAL enzimática ou fotoquimicamente excitado e uridina. Uma mistura de 25 μM de ($1\text{-}^{14}\text{C}$)IAL e 10^{-4}M de uridina excitado a 280 nm ($-\bullet-$); uma mistura de 10^{-4}M de IAL e 1 nm (^3H)-Uridina excitado a 280 nm ($-o-$). Para o experimento enzimático, 1 nm (^3H)Uridina foi adicionado ao sistema IAA (10^{-4}M)/HRP (0,25 μM)/EDTA (30 μM)/ O_2 ($\cdots$). Dois experimentos controles foram feitos um com 1 nm (^3H)uridina ($-\square-$) e outro com a reação enzimática na ausência de uridina ($-\blacksquare-$).

tetase isolado como descrito no item III.9 da Parte Experimental (página 59). Foi testada a atividade frente a vários aminoácidos. A tabela III.3 mostra os resultados deste teste, bem como a porcentagem de inativação do tRNA com relação a cada aminoácido ensaiado.

Tabela III.3 - CAPACIDADE ACCEPTORA DE AMINOÁCIDO DO tRNA DE E. coli ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM O SISTEMA IAA (10^{-4} M)/HRP (0,25 μ M)/EDTA (30 μ M)/O₂.

	(¹⁴ C)-aa-tRNA formado (CPM)					
	L-aa ^a	L-Thr	L-Phe	L-Lys	L-Val	L-Arg
Controle	7260	2760	1734	3205	4312	1734
Após tratamento	6460	2640	1756	3080	4250	1718
% de inativação	11	4	0	3	1	1

(a) mistura dos aminoácidos.

IV - PRODUTO DE ADIÇÃO FOTOQUÍMICA ENTRE IAL E URIDINA

Com o intuito de se comparar processos fotoquímicos com bioenergizados, realizou-se a síntese do aduto IAL-uridina por irradiação, bem como sua caracterização por métodos convencionais.

O procedimento seguido está descrito nos itens III.2 e III.3 (página 56).

Na primeira preparação usou-se uracil e IAL, cujo produto de adição pode ser separado por cromatografia preparati-

va em papel (ítem III.1, página 55). Desta preparação pode-se obter um EM do produto de adição entre IAL e uridina, que é mostrado na Fig. IV.1, juntamente com os espectros da IAL e uracil, para fins comparativos. Os picos dos isótopos do íon molecular (M^+) aparecem em m/e 275 (P, 100), m/e 258 (P+1, 16, 2) e m/e 259 (P+2, muito pequeno), que comparados aos valores calculados m/e 257 (P, 100, m/e 258 (P+1, 15,4) e m/e 259 (P+2, 1,7) mostram a pureza do fotoaduto.

Apesar do baixo rendimento da reação (estimado entre 10 a 15%) pode-se obter o espectro U.V. do fotoaduto que é mostrado na Fig. IV.2. Verificou-se o desaparecimento da absorção correspondente ao grupo carbonílico do IAL, ficando somente a absorção característica do grupo indólico (~290 nm).

Na segunda preparação usou-se uridina no lugar de uracil, por problemas de solubilidade já citados, (página 56). Obteve-se então, um espectro de RMN do produto isolado cromatograficamente (Fig. IV.3). Obteve-se prótons oxetânicos com picos em 4,25 (d, $J=6,8$); 5,25 (d, $J=6,8$) e 5,20 (d, $J=6,8$).

Ainda, foi possível obter o espectro IV (Fig. IV.4) o qual mostrou uma banda em 1110 cm^{-1} (duplete), característica de estiramento C-O-C indicando uma estrutura oxetânica para o fotoaduto.

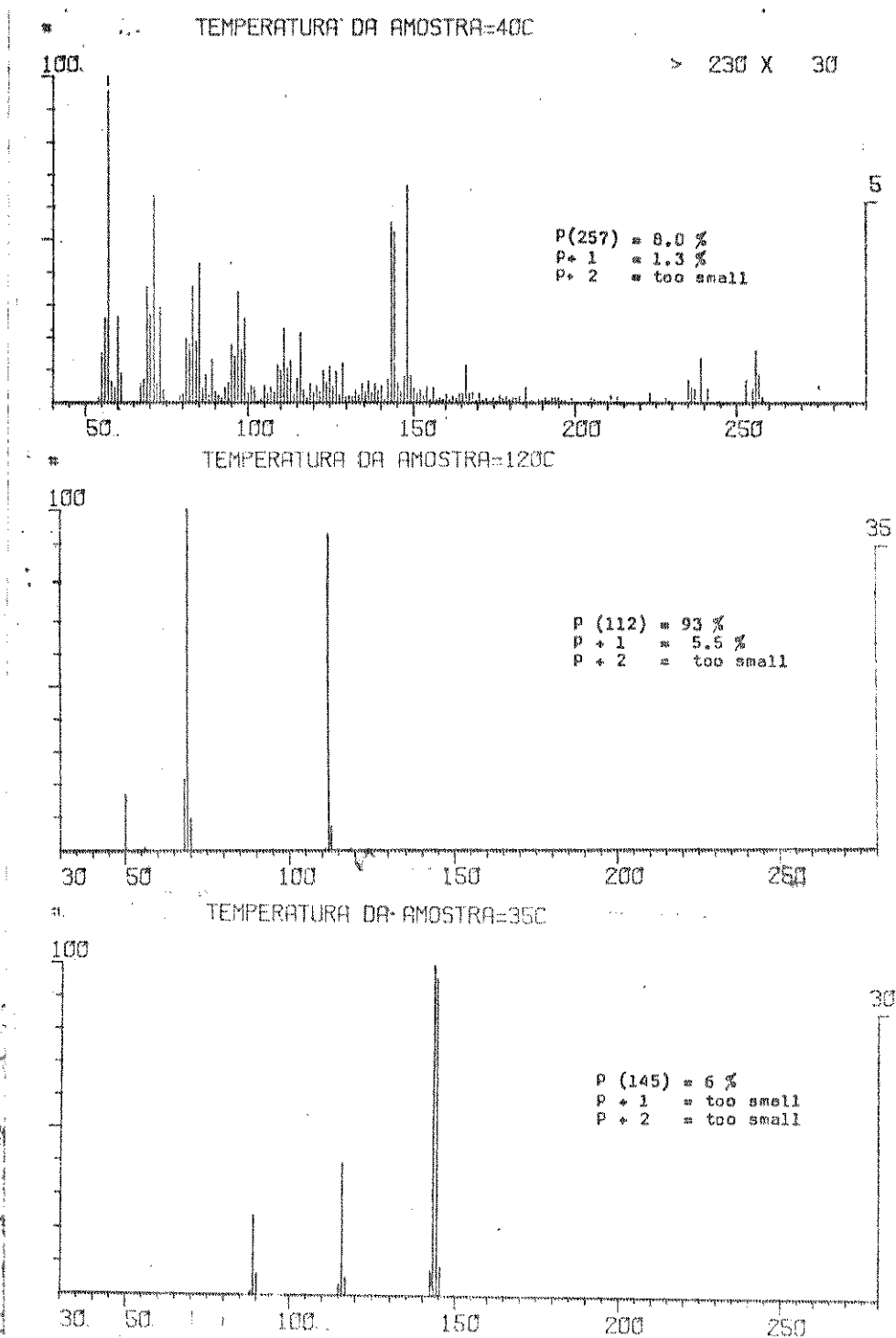


Figura IV.1 - Espectro de massa do fotoaduto (a); uracil (b) e, IAL (c).

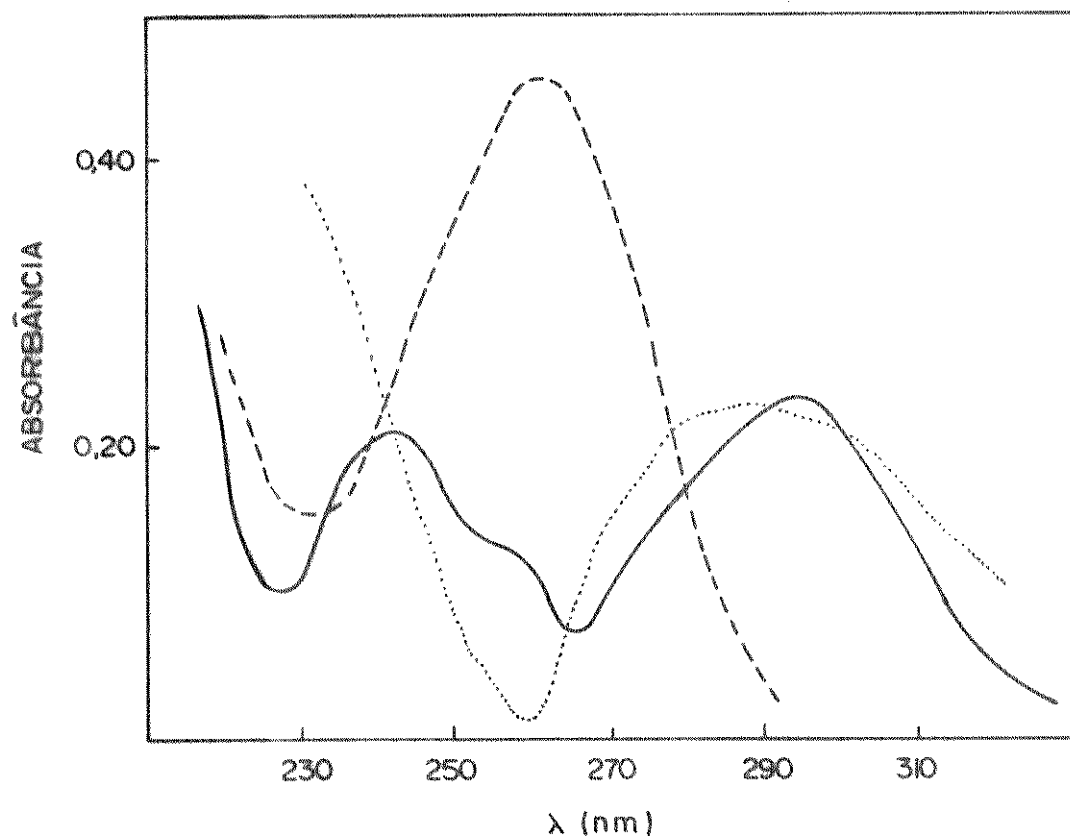


Figura IV.2 - Espectro de Absorção UV em etanol de $2 \times 10^{-5} \text{M}$ de IAL (—), $7 \times 10^{-5} \text{M}$ de Uridina (---) e solução diluída de concentração desconhecida do fotoaduto (...).

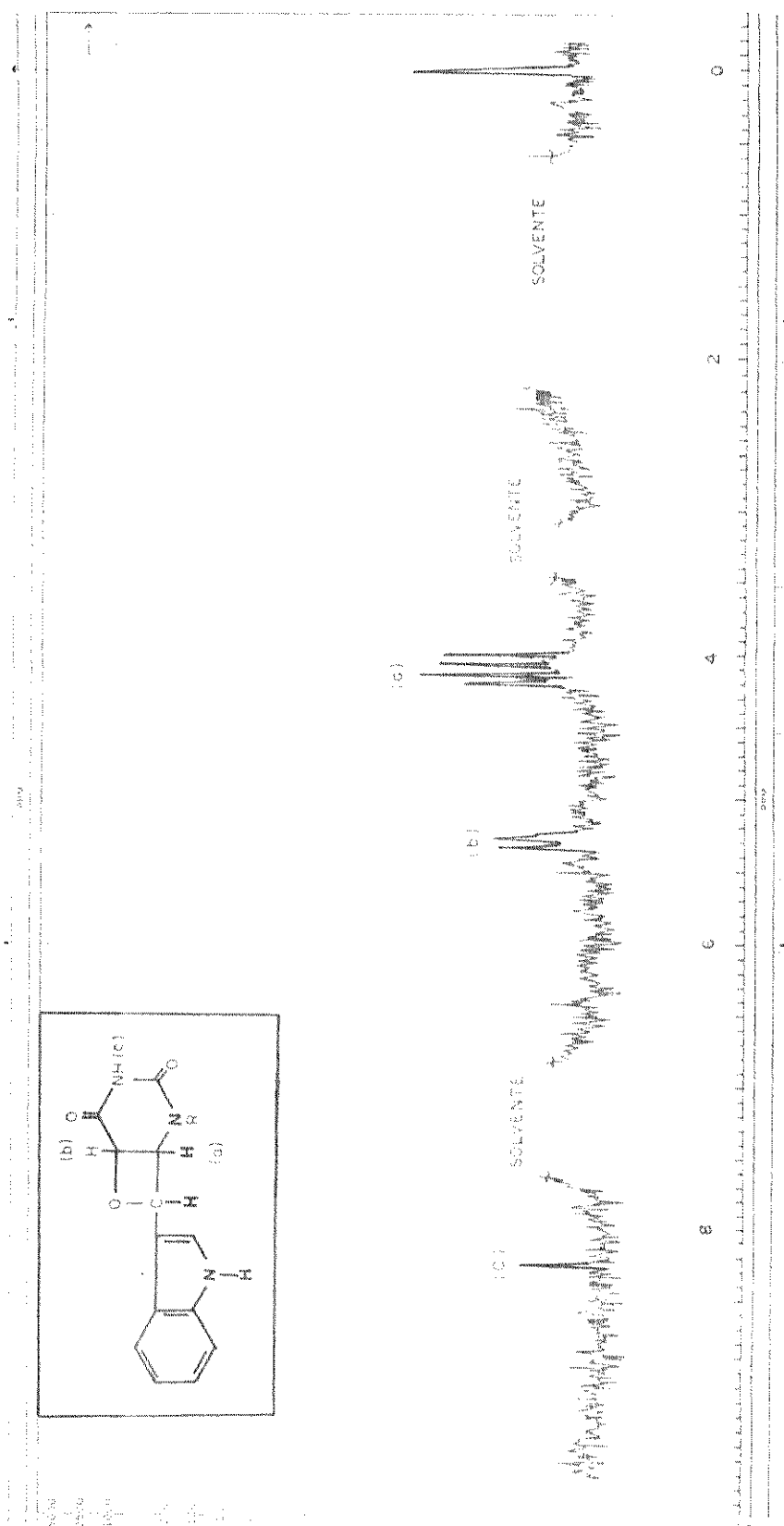


Figura IV.3 - Espectro RMN do fotoaduto IAL-Uridina em CDCl_3 .

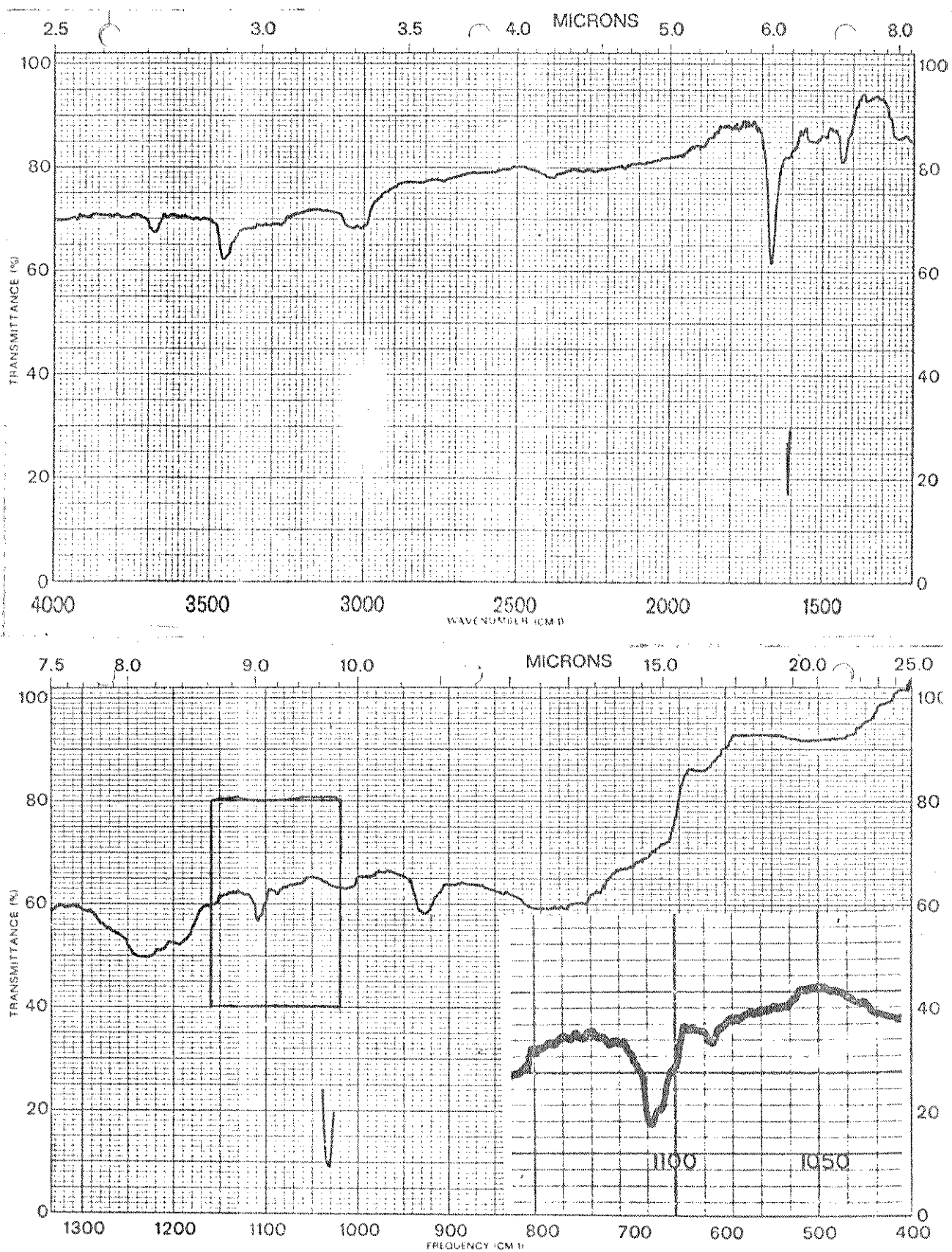


Figura IV.4 - Espectro IV do fotoaduto IAL-uridina obtido em microcela de NaCl para líquido e em solvente clorofórmio.

CAPÍTULO 4

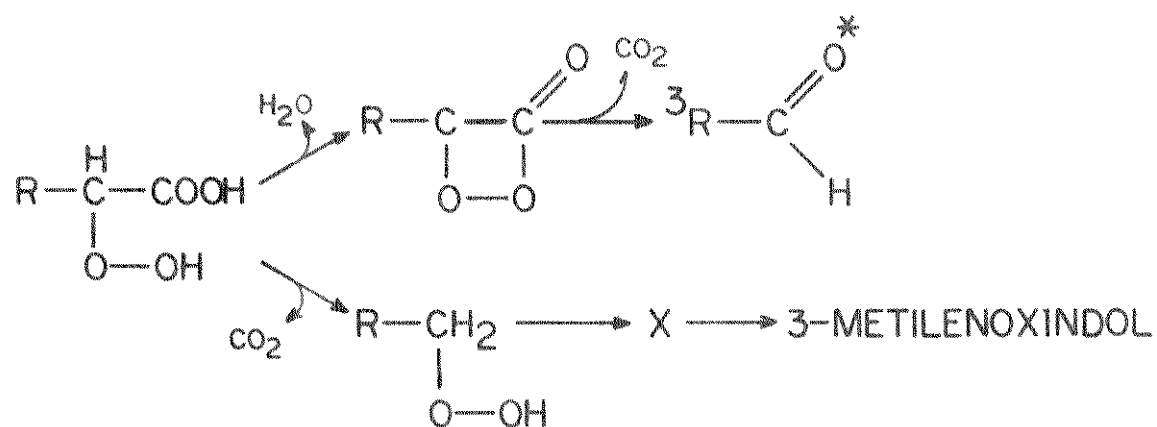
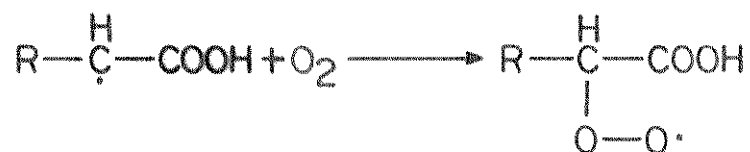
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

I - MECANISMO DE FORMAÇÃO DE IAL ELETRONICAMENTE EXCITADO

Resultados anteriores (91, 101) mostraram que a espécie excitada gerada no sistema de reação IAA/HRP/O₂ era o IAL. Isto foi demonstrado através de transferência de energia para aceptores emissivos adequados e, por danos causados na enzima, semelhantes aos provocados por luz U.V. (vide Fig. I.6 página 27).

Em pH 3,8, onde o IAL é produto principal de reação (81), o consumo de oxigênio foi mais rápido que a formação de produto e que a emissão fotônica (Fig. 1.4, página 67). Isto indica que existe um acúmulo de um intermediário, possivelmente um hidroperóxido. O fato de numa segunda adição de IAA, após a reação ter atingido o estado estacionário, o consumo de O₂ recomeçar com a mesma velocidade inicial (Fig. I.2, página 65), comprova que o intermediário que se acumula na fase estacionária é um hidroperóxido, como mostram Nakajima e col. (86).

A formação de IAL* com alto rendimento químico e um bom rendimento quântico (2×10^{-8} Einstein/mol) em pH 3,8, pode ser explicada através de uma ampliação do mecanismo proposto por Nakajima e col. (86) que é mostrado nas equações I.1 a I.6, página 22. Propõe-se, então, a sequência de reações apresentada no esquema XXII para o sistema IAA/HRP/O₂, onde há a participação de um intermediário hidroperóxido, que por sua vez geraria um outro, tipo dioxetanona, cuja termólise estaria produzindo IAL*. A formação de 3-metilenoxindol proveniente de um mesmo intermediário hidroperóxido (81) pode ser explicada, também, por este esquema de reações; e, dependendo das condições, um caminho pode ser mais favorecido que o outro.



O IAL* gerado na reação enzimática pode estar nos estados $^1(n,\pi^*)$, $^1(\pi,\pi^*)$, $^3(n,\pi^*)$ e $^3(\pi,\pi^*)$. Sabe-se que sistemas bioenergizados, principalmente os que envolvem intermediários dióxetanos, produzem, preferencialmente, estados excitados tripletes (95), como é o caso da acetona produzida no sistema IBAL/HRP/ O_2 . Os estados singletes do IAL são de alta energia e, além disso sofrem cruzamento intersistema muito rápido para o estado triplete (202). Portanto, considerando estes três fatores, pode-se dizer que é pouco provável ter-se o IAL singlete como produto da reação IAA/HRP/ O_2 . Outro fator que contribui para esta conclusão é que não foi observada a fluorescência do IAL (~345 nm) no espectro de quimiluminescência do sistema enzimático.

Sendo assim, a energia luminosa observada na reação poderia ser proveniente do estado eletrônico $^3(n,\pi^*)$ e/ou do $^3(\pi,\pi^*)$ do IAL.

Os corantes xantênicos, além de transferência de energia, podem sofrer reação de transferência de elétrons quando presentes no sistema enzimático (203). Entretanto, em concentrações muito baixas de corante, condições necessárias para não alterar o sistema enzimático, o processo de transferência de elétrons se torna um tanto improvável. Como as concentrações de corante utilizadas nos nossos experimentos foram da ordem de $10^{-7}M$, pode-se dizer que o pequeno aumento da emissão observado (tabela I.1, página 69) se deve, principalmente, à transferência de energia da espécie excitada ao corante.

O sistema IAA/HRP/ O_2 nas condições padrão de reação, não foi capaz de transferir sua energia para os compostos antracênicos (AS, DPAS e DBAS) como mostra a tabela I.1, página 69. O fato de não transferir para AS e DPAS é compreensível, pois estes aceptores são mais específicos para espécies singletes. A fim

de se conseguir mais dados sobre o estado emissivo do IAL, fez-se um estudo comparativo com vários sistemas bioenergizados. O sistema IBAL/HRP/O₂, produtor de acetona triplete, o PAA/HRP/O₂, produtor de benzaldeído excitado e, o PPA/HRP/O₂, produtor de acetofenona excitada, transferiram energia para o DBAS (201) que é bom acceptor para estados tripletes, pois os átomos pesados em sua estrutura facilitam o processo de cruzamento intersistema intramolecular, permitindo, então que haja uma fluorescência mais eficiente ($\phi_F(\text{DBAS}) \sim 0,03$ Einstein/mol) (206). Os dois últimos sistemas podem produzir espécies (n, π^*) e (π, π^*) como o sistema IAA, ao passo que o sistema do IBAL só produz espécies (n, π^*). Assim, observando estes resultados se supõe que DBAS aceita energia, preferencialmente, de estados tripletes (n, π^*), possivelmente, por problemas de simetria; e pode-se sugerir que o IAL* está sendo produzido no estado (π, π^*).

A hiperacina, composto cuja estrutura está dada no Apêndice II (página 172), tem se mostrado um bom acceptor emissivo, útil, principalmente, em transferências de energia provenientes de estados (π, π^*). Usou-se, então, este composto nos vários sistemas bioenergizados já citados, para ver seu comportamento perante as diferentes espécies excitadas. O sistema IBAL/HRP/O₂ não foi capaz de transferir sua energia para um estado excitado da hiperacina capaz de fluorescer, havendo somente a supressão da emissão (Fig. I.9, página 75). Os sistemas PAA/HRP/O₂ que geram os compostos carbonílicos aromáticos citados acima, transferiram sua energia para a hiperacina (Figs. I.10 e I.12, página 77 e 79) fornecendo valores de K_{ET}^0 mostrados na tabela I.1, página 135). Do mesmo modo, a hiperacina presente na reação IAA/HRP/O₂ aumentou a emissão (Fig. I.7, página 73) com eficiência aproximadamente igual (vide valor de K_{ET}^0 tabela I.1), indicando que o mecanismo de transferência de energia deva ser semelhante nos

TABELA I.1 - VALORES DE $K_{ET}\tau^0$ OBTIDOS PARA A TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA DE VÁRIOS SISTEMAS PARA HIPERACINA E tRNA.

Sistemas	$K_{ET}\tau^0 \text{ (M}^{-1}\text{)}$	
	HIPERACINA	tRNA
IBAL/HRP/O ₂	supressão	supressão ^(a)
IAA/HRP/O ₂	$1,8 \times 10^6$	$4,1 \times 10^5$
PAA/HRP/O ₂	$1,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$
PPA/HRP/O ₂	$3,3 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$

a) Ref. (204).

três casos.

Os dados de transferência para DBAS suplementados com estes para hiperacina indicam que o IAL* está sendo produzido com maior eficiência no estado $^3(\pi, \pi^*)$ que no estado $^3(n, \pi^*)$. Isto também pode ser visto, comparando-se os valores de energia de cada estado para cada um dos produtos gerados nos sistemas dados na tabela I.2 (página 137). Aí, podemos verificar que o estado $^3(\pi, \pi^*)$ do IAL é o de mais baixa energia, sendo, portanto aquele que se forma com preferência.

Além desses aceptores, verificou-se que o tRNA de E.coli quando presente em todos os sistemas, com exceção do sistema IBAL, aumentou a emissão, indicando que a 4-TU no tRNA tem preferência em aceitar energia de espécies (π, π^*) . A eficiência de transferência para o tRNA foi semelhante para os três sistemas estudados, o que é confirmado pelos valores de K_{ET}^0 listados na tabela I.1 (página 135).

Assim, pode-se estabelecer uma metodologia para estudo de espécie excitada, podendo-se, aparentemente, diferenciar os vários níveis eletrônicos nos quais o produto excitado pode ser formado, usando estes aceptores. Provavelmente, no caso de hiperacina, por exemplo, os estados (n, π^*) do doador reagem rapidamente com acceptor por fotorredução, observando-se uma supressão da emissão. Ao passo, que, o doador em estado (π, π^*) teria condições favoráveis para transferir a energia para um estado emissivo do acceptor. Um exemplo a ser considerado é a supressão de energia do sistema IBAL/HRP/O₂, onde temos somente estados (n, π^*) , por hiperacina e por tRNA (204).

Todos estes resultados nos induzem a concluir que a quebra da dioxetanona intermediária do processo de oxidação do IAA por HRP para produzir IAL* (vide Esquema XXII), leva à formação, preferencialmente de espécies (π, π^*) , o que é confirmado pe

TABELA I.2 - VALORES DE ENERGIA DOS NÍVEIS EXCITADOS DOS COMPOSTOS PRODUZIDOS NOS VÁRIOS SISTEMAS BIOENERGIZADOS.

COMPOSTOS	Energia dos Estados (Kcal/mol)			
	$^1(n, \pi^*)$	$^3(n, \pi^*)$	$^1(\pi, \pi^*)$	$^3(\pi, \pi^*)$
ACETONA ^a	80 ^b	78 ^b	-	-
BENZALDEÍDO ^c	76,9 ^d	72 ^d	98,6 ^d	73,9 ^d
ACETOFENONA ^e	78,8 ^d	73,9 ^d	98,6 ^d	74,3 ^d
IAL ^f	-	-	80,5 ^g	65 ^g

a) produzida na reação IBAL/HRP/O₂

b) Ref. (100).

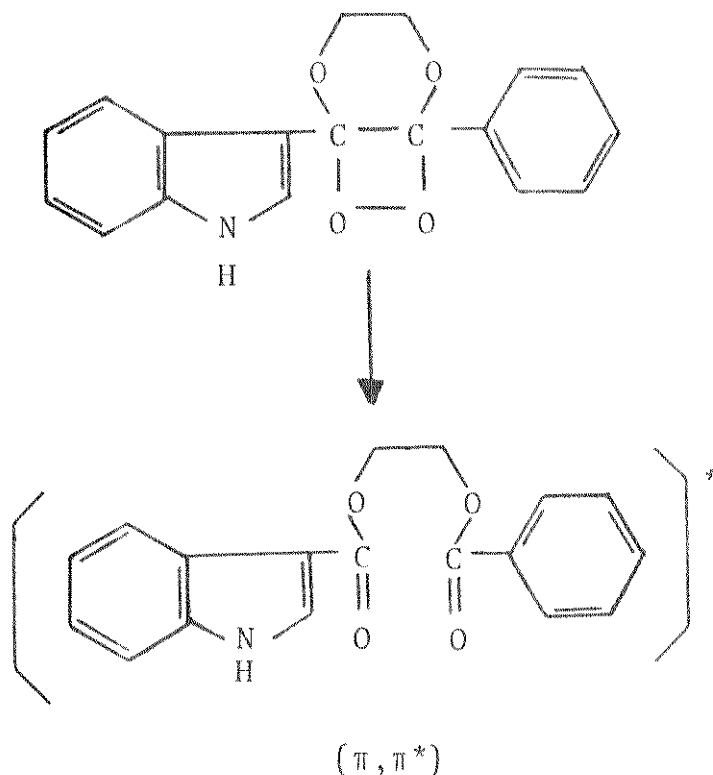
c) produzido na reação PAA/HRP/O₂

d) Ref. (207).

e) produzida na reação PPA/HRP/O₂

f) produzido na reação IAA/HRP/O₂

g) Reg. (202).



ESQUEMA XXIII

los resultados de Nakamura e Goto (205) que verificaram que a quebra do dioxetano (Esquema XXIII) pode produzir excitação do tipo (π, π^*) .

Estes resultados, bem como uma análise do espectro de emissão do sistema IAA/HRP/ O_2 permitem excluir a probabilidade de se formarem estados singletes, tanto o (n, π^*) como o (π, π^*) , porque não foi observada nenhuma emissão na região ultravioleta próxima ou longa do espectro, como citado anteriormente. Assim, tem-se a formação de espécies tripletes, das quais observa-se maior participação de estados (π, π^*) que os (n, π^*) .

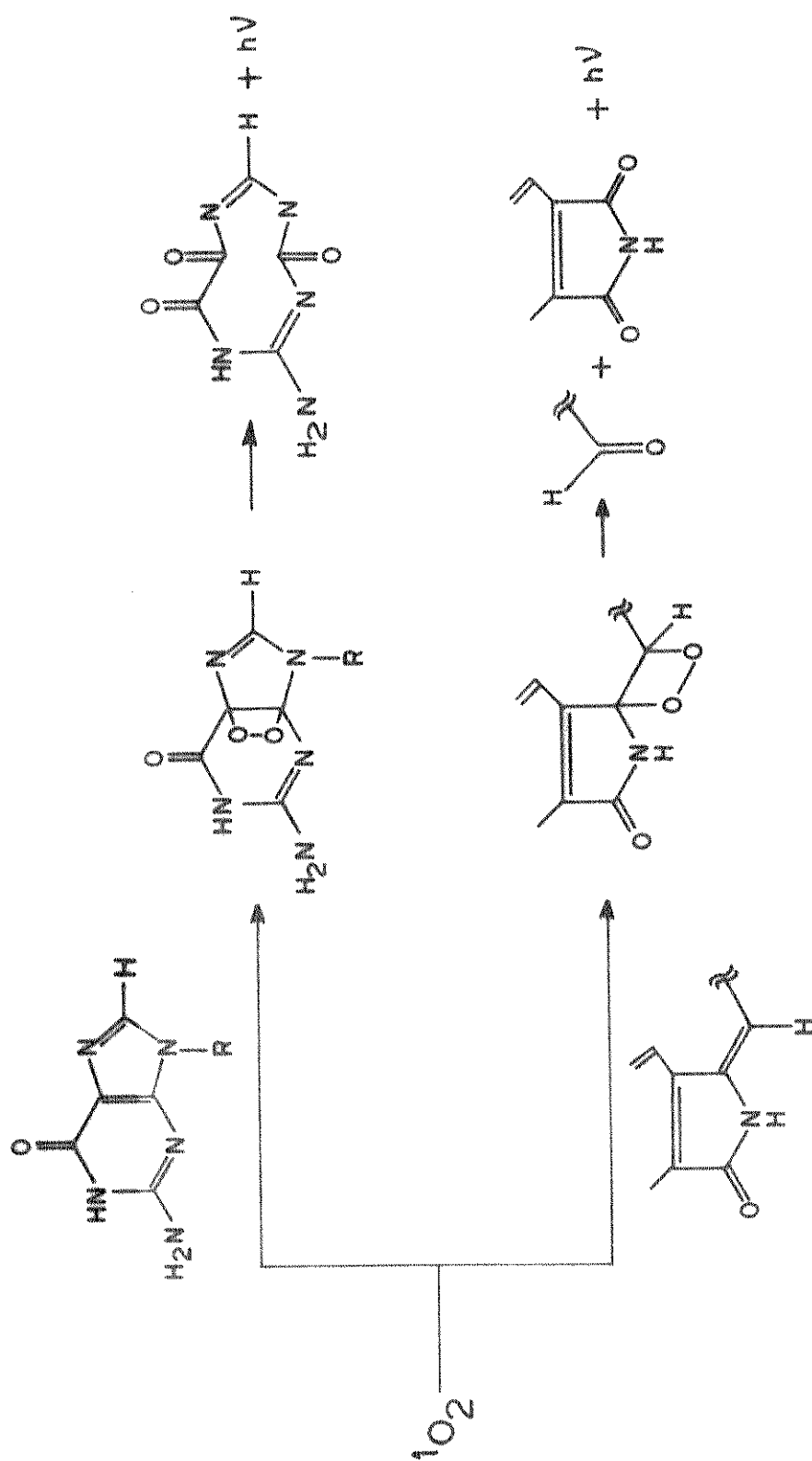
Como visto anteriormente (página 30), sistemas bioenergizados podem gerar 1O_2 em reações que envolvem intermediários hidroperóxidos, como é o caso do malonaldeído (109) e ácido fólico (108). Além disso, espécies tripletes podem ser suprimidas por oxigênio formando, conseqüentemente, 1O_2 . Tendo em mente que no sistema IAA/HRP/ O_2 tem-se um intermediário hidroperóxido e que tem-se a formação de IAL* em estado triplete, foi muito importante verificar a formação de 1O_2 neste sistema enzimático.

Como primeira aproximação, os efeitos de sequestradores e aumentadores da emissão de $^1\text{O}_2$ (vide Apêndice I, página 166) foram testados.

Os supressores típicos como histidina (Fig. II.1, página 83), guanosina (Fig. II.3, página 85), DOPA (Fig. II.4, página 86), bilirrubina (Fig. II.5, página 87), realmente, causaram um efeito bem acentuado sobre a emissão do sistema. Com excesso de histidina, não foi possível calcular os valores de $K_q\tau^0$ ou de β (vide Apêndice I, página 164) para os demais supressores, pois, aparentemente, após a reação com $^1\text{O}_2$ forma-se algum derivado emissivo cuja luminescência se soma à do $^1\text{O}_2$, mascarando o efeito supressor real da substância. Estes fenômenos podem ser explicados pelo esquema XXIV.

Sendo as espécies excitadas produzidas nestas reações com $^1\text{O}_2$, do tipo carbonílicas, o cálculo dos parâmetros de supressão com as substâncias citadas só teria sido possível mediante o uso de filtros adequados para carbonilas durante as medidas de emissão. No caso da histidina, pode-se construir um gráfico Stern-Volmer (Fig. II.2, página 84); o gráfico é linear e o coeficiente angular fornece o valor de K_{SV} (ou $K_q\tau^0$) que é 276 M^{-1} indicando um mecanismo de supressão colisional ($K_{SV} < 10^3\text{ M}^{-1}$). Se considerarmos o valor $K_q \sim 10^8\text{ M}^{-1}$ (valor observado para a reação do $^1\text{O}_2$ com histidina (208)), τ^0 é aproximadamente $2,8 \times 10^{-6}\text{ s}$; este último valor sugere que a espécie excitada é verdadeiramente o $^1\text{O}_2$ cujo valor de vida-média em água é $\sim 2 \times 10^{-6}\text{ s}$ (208). O valor recíproco da constante de Stern-Volmer, que corresponde ao valor β (vide Apêndice I, página 166), foi $3,6 \times 10^{-3}\text{ M}$, concordando muito bem com o valor registrado por Foote ($3,0 \times 10^{-3}\text{ M}$) (208) para supressão de $^1\text{O}_2$ por histidina.

DABCO, cujo papel sobre $^1\text{O}_2$ está descrito no Apêndice I (página 166), quando presente em concentração de 20 mM causou um



ESQUEMA XXIV

aumento bastante significativo sobre a emissão do sistema IAA/HRP/ O_2 (Fig. II.6, página 89).

A reação realizada em meio deuterado sofre uma pequena alteração cinética, sendo mais lenta e menos eficiente no consumo de oxigênio (Fig. II.7, página 90); isto se deve, provavelmente, às alterações conformacionais na enzima HRP. Apesar disso, pode-se observar um sensível aumento na emissão fotônica (Fig. II.8, página 91), o que vem confirmar a participação de 1O_2 na reação.

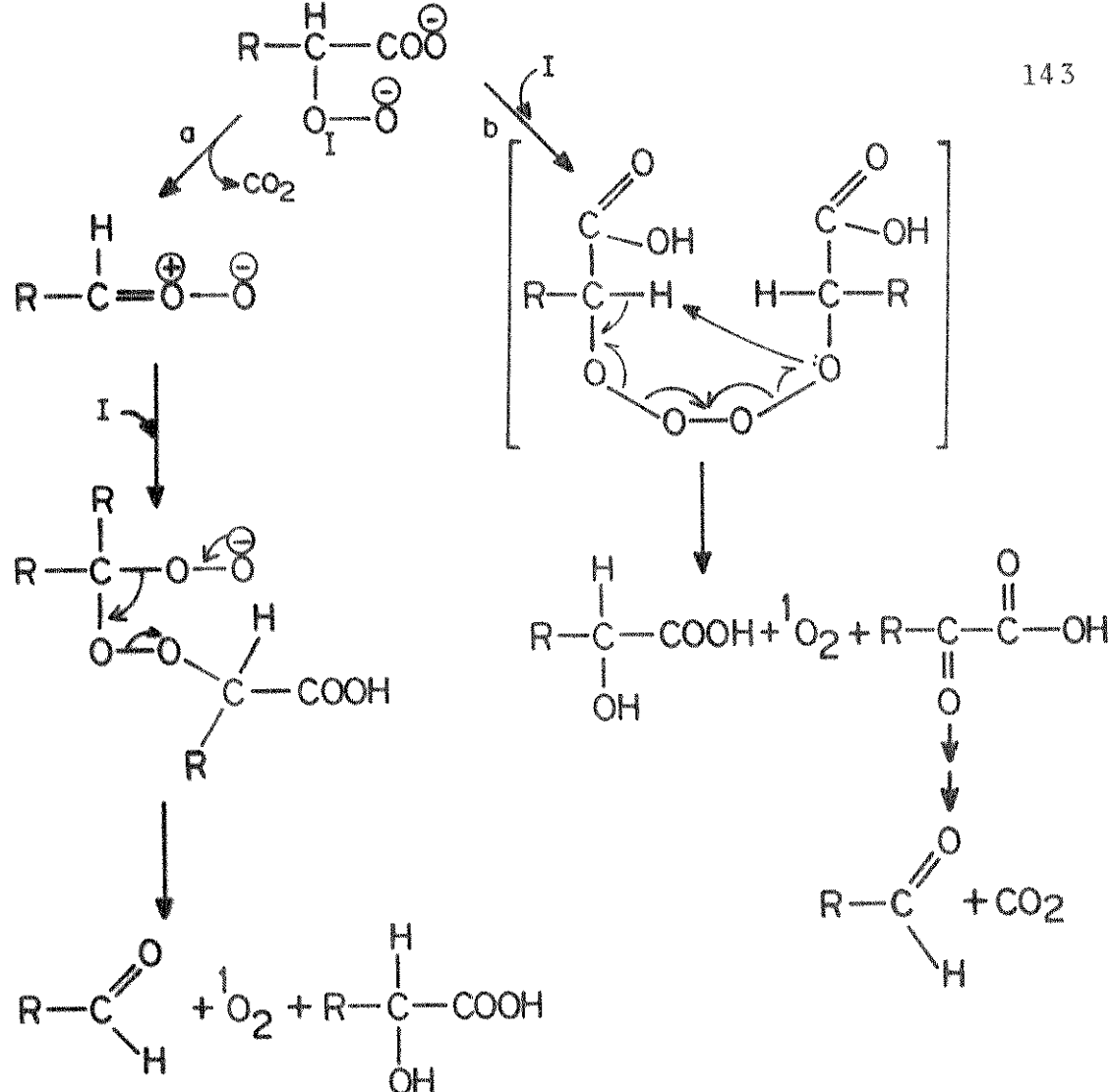
A guanosina não forneceu dados de supressão de energia muito consistentes, não sendo possível, portanto, o cálculo dos parâmetros característicos de 1O_2 . Porém, pode-se observar, através da técnica de estado estacionário (Fig. II.9, página 92) que este agente supressor atua competitivamente com a histidina disputando pela mesma espécie excitada gerada na reação IAA/HRP/ O_2 , pois se sabe que em experiências de cinética estacionária quando se tem um mesmo ponto de intersecção com diferentes quantidades de supressores (vide Apêndice I, página 168), isto indica a existência de 1O_2 , já que os dois supressores (histidina e guanosina) são específicos para esta espécie.

Tendo conhecimento, através de trabalhos de outros pesquisadores (184, 186), que a guanosina é fotodegradada por 1O_2 , fez-se o estudo dos produtos da fotodegradação sofrida por este nucleotídeo durante seu tratamento com a reação IAA/HRP/ O_2 . A análise cromatográfica da mistura de reação (Fig. II.10, página 93), revelou a presença de uréia, ácido cianúrico, formil-uréia e o açúcar como produtos de oxidação do nucleotídeo. Estes compostos foram identificados por comparação aos obtidos por Cadet e Teoule (186) após o tratamento da guanosina com 1O_2 gerado por descarga de microonda.

O espectro de emissão do $^1\text{O}_2$ (bimol) em sistemas biológicos é complexo (209). O espectro de emissão do sistema IAA/HRP/ O_2 em pH 3,8 (Fig. I.14, página 81) contém, além de outros picos, um proeminente na região de carbonilas em 610 nm e uma indicação de outro acima de 650 nm (limite do aparelho), o que é esperado para emissão de $^1\text{O}_2$.

Em resumo, os resultados nos levam a concluir que o sistema IAA/HRP/ O_2 produz dois tipos de espécies excitadas, o $\text{IAL}^* \ ^3(\pi, \pi^*)$ e o $^1\text{O}_2$, sendo que, aparentemente, o $^3\text{IAL}^*$ é a espécie principal.

Existem duas possibilidades de produção de $^1\text{O}_2$, já citadas anteriormente, que não podem ser eliminadas. Uma, supõe a colisão do $^3\text{O}_2$ (fundamental) com o $^3\text{IAL}^*$, havendo supressão de IAL^* e, conseqüentemente, formação de $^1\text{O}_2$. Embora a concentração de oxigênio no meio seja muito pequena para que as colisões tenham boa eficiência, este mecanismo não pode de maneira nenhuma ser negligenciado. Além do mais, a transferência de energia do $^3\text{IAL}^*$ para a 4-TU no tRNA, modifica completamente o espectro de quimiluminescência do sistema, apresentando somente os picos correspondentes à emissão da 4-TU (Fig. III.15, página 111), que será comentado posteriormente. Isto indica que quando o tRNA está presente no sistema enzimático há competição entre o ácido nucleico e o $^3\text{O}_2$ (fundamental) pela energia do $^3\text{IAL}^*$, apoiando, assim, o mecanismo de transferência de energia. Entretanto, um outro mecanismo pode estar operando, visto que para formar o IAL a reação passa por um intermediário hidroperóxido o qual pode gerar $^1\text{O}_2$ através do mecanismo de Russell (110) ou de Benson (111) (vide Esquema XXV).



a - MECANISMO DE BENSON

b - MECANISMO DE RUSSELL

ESQUEMA XXV

II - TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA PARA O tRNA E 4-TU

Sabe-se que espécies geradas em estado eletrônico excitado em processos enzimáticos são capazes de transferir energia para uma série de aceptores, incluindo macromoléculas como DNA (210, 211) e RNA (101).

Quando o tRNA estava presente no sistema enzimático IAA/HRP/O₂, não alterava o consumo de oxigênio nem na primeira adição de IAA (Fig. I.1, página 64) nem na segunda (Fig. I.2, página 65). Nesta última, não se verificou tempo de indução, que indica, segundo Nakajima e Yamazaki (86), que a macromolécula, nas

condições utilizadas, não interage com o hidropéroxido intermediário que é formado na fase estacionária. As cinéticas dos intermediários de HRP, também, não são modificadas significativamente (Fig. III.1, página 95) mas, a emissão fotônica é aumentada, principalmente, após 4 ou 5 minutos de reação quando o oxigênio já foi amplamente consumido (Fig. III.4, página 99). Este aumento se deve à existência de um cromóforo no tRNA que é capaz de aceitar energia do $^3\text{IAL}^*$ e emitir sua própria luminescência.

Utilizou-se para estes experimentos o tRNA de E. coli que, como visto antes (página 94), possui um nucleotídeo fluorescente, a 4-TU que absorve energia em 335 nm. Portanto, atribuiu-se à 4-TU a responsabilidade pelo aumento da emissão do sistema. O fato do aumento de emissão ser mais significativo após o oxigênio ter sido consumido, sugere que a 4-TU está emitindo fosforescência (emissão proveniente de estado triplete) que pode ser suprimida ou aniquilada pelo oxigênio fundamental do meio (112). Quando a 4-tiouridina-5'-monofosfato livre em solução estava presente na reação enzimática, apresentou um mesmo comportamento, isto é, aumento da emissão do sistema (Fig. III.6, página 101). Porém, ao contrário do tRNA, quando presente na mais alta concentração utilizada (39 μM) teve um efeito muito pequeno de aumento de energia, comparado ao efeito da macromolécula (Fig. II.1, abaixo). Isto demonstra mais uma vez que a base estaria emitindo de um estado triplete, pois quando ligada ao tRNA estaria mais protegida de desativação por oxigênio, tendo maior emissão, ao passo que livre em solução poderia sentir mais a ação supressora do $^3\text{O}_2$ (fundamental), tendo menor emissão.

O valor da constante de transferência de energia K_{ET}^0 , para a 4-TU livre em solução foi $5,5 \times 10^4 \text{M}^{-1}$, valor menor que para o tRNA que foi $4,1 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ (tabela I.1, página 135), mas, ainda,

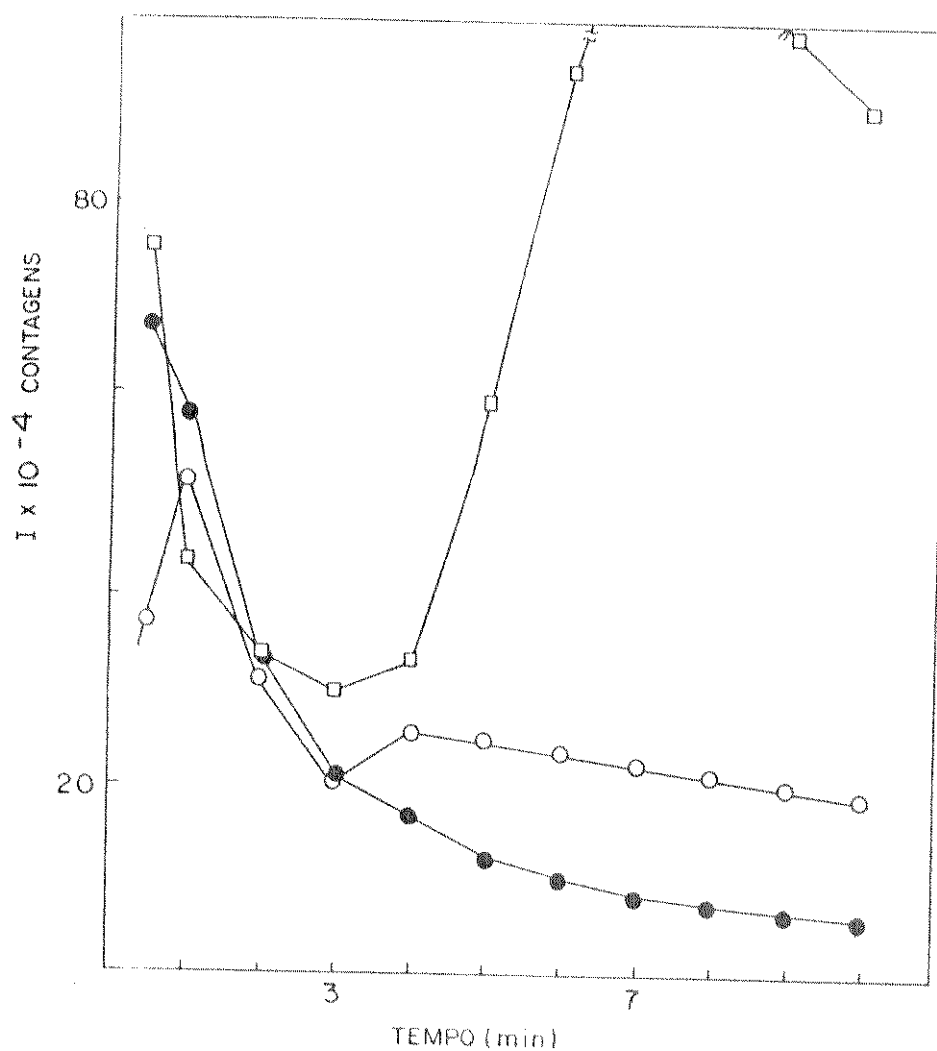


Figura II.1 - Comportamento sensibilizador da emissão do sistema IAA/HRP/O₂ de 40 μ M de tRNA (curva superior) e 39 μ M da 4-tiouridina-5'-monofosfato (curva mediana). A curva inferior representa a emissão na ausência de sensibilizador.

indicativo de uma eficiente transferência a longa distância ($K_{ET}\tau^0 > 10^3 M^{-1}$).

Surge aqui uma questão quanto ao mecanismo desta transferência de energia. Poderia ser uma transferência do tipo triplete-singlete seguida de cruzamento intersistema no acceptor, mas isto é pouco provável, porque o critério de Förster (212) não se aplica ao caso, ou seja, a banda de emissão do $^3IAL^*$ (435 nm) não tem superposição com a banda de absorção da 4-TU (335 nm) (Fig. II.2).

Por outro lado, se o grupo 4-TU excitado do tRNA é ligeiramente protegido de desativação por colisão com oxigênio, como sugerem os dados acima, o processo de transferência de energia triplete-triplete clássico (colisional) deve ser pouco eficiente, como pode ser visto pelos valores altos de $K_{ET}\tau^0$ obtidos. Pode-se dizer que, talvez, um processo de transferência de energia a longa distância do tipo excitônica triplete-triplete esteja operando como o propõe Kasha (213) para a transferência de acetona triplete para os aceptores.

O espectro C.D. do tRNA (Fig. III.17, página 114) mostrou que este é modificado após a reação com HRP e IAA em pH 3,8. Observou-se que os íons Mg^{++} tornam a estrutura do ácido nucleico em pH 3,8, mais próxima àquela em H_2O , mas as modificações após submetê-lo ao tratamento com o sistema enzimático persistem na presença do íon. Este efeito dos íons Mg^{++} sobre o tRNA pode ser o responsável pelo aumento da emissão observado (Fig. III.8, página 104) quando se compara a emissão do sistema IAA/HRP/tRNA/ O_2 na ausência do cátion (Fig. III.4, página 99). Apesar da emissão ser nitidamente maior, o valor de $K_{ET}\tau^0$ não muda significativamente, sendo $4,1 \times 10^5 M^{-1}$ sem Mg^{++} e $2,3 \times 10^5 M^{-1}$ com Mg^{++} . Pode ser que o cátion adicionado ao sistema de reação proteja a posição da 4-TU contra algum supressor (por exemplo, oxigênio) que, talvez, atua

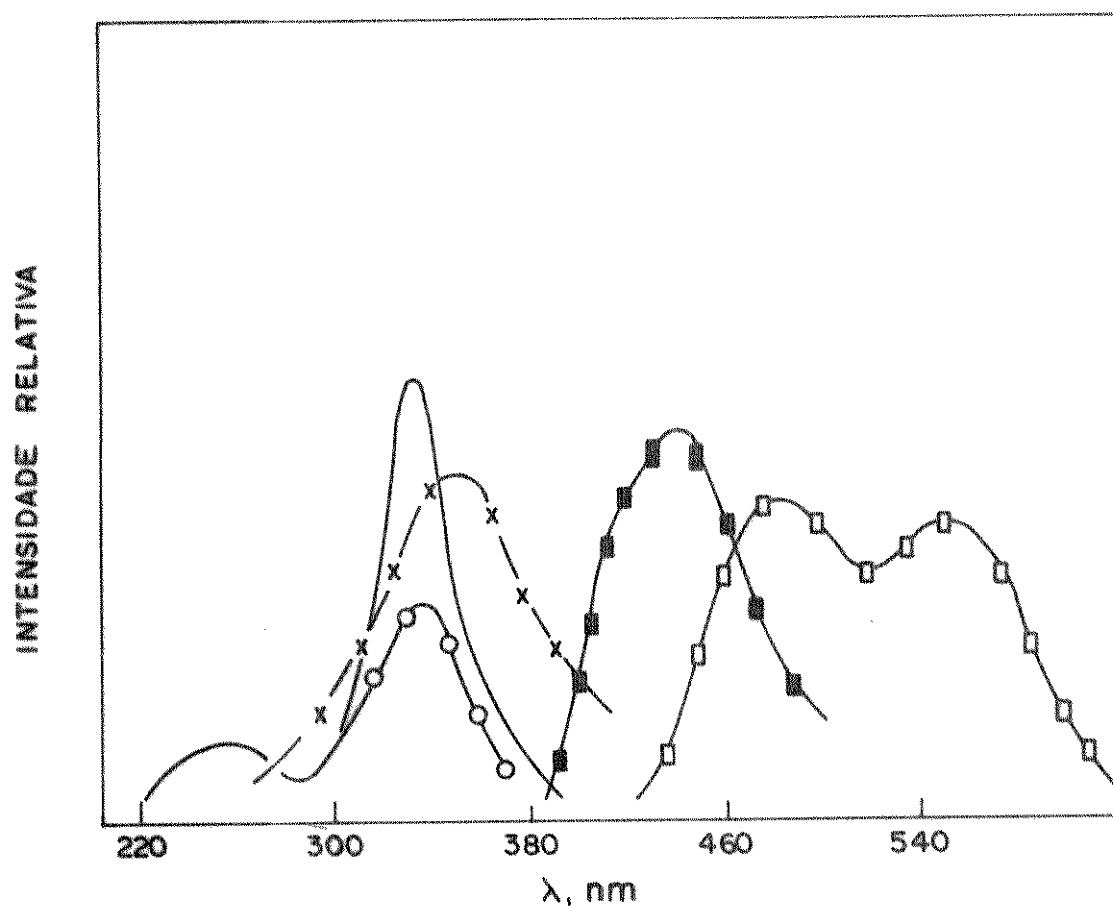


Figura II.2 - Dados ópticos para a 4-tiouridina-5'-monofosfato. A curva (—) é o espectro de absorção e a curva (—□—) é o espectro de emissão (fosforescência) para excitação a 335 nm a -130°C . A curva (—o—) é o espectro de excitação para emissão a 550 nm. Também são mostrados a fluorescência (—x—) e fosforescência (—■—) do IAL, excitação a 280 e 300 nm, respectivamente.

se sobre a emissão da 4-TU, sendo a luminescência observada na ausência do Mg^{++} somente uma fração da emissão real.

Quando o tRNA de levedura, que não contém a 4-TU, mas possui a base Y que também é luminescente, foi adicionado ao sistema enzimático, não se observou aumento da emissão (Fig. III.14, página 110), mas sim uma pequena supressão, tanto na presença como na ausência de íons Mg^{++} . Isto indica que a energia do IAL* é especificamente transferida para a 4-TU no tRNA de E.coli e não para outras bases que poderiam possuir condições espectrais favoráveis à transferência, como é o caso da base Y.

A transferência de energia do IAL* para o tRNA pode ser verificada, também por alguns experimentos fotofísicos. Observou-se na Fig. III.16 (página 113) que o tRNA, quando excitado em 335 nm (comprimento de onda de absorção da 4-TU) apresenta duas bandas de emissão, uma em ~440 nm e outra em ~525 nm. Quando, porém, uma mistura de tRNA e IAL foi excitada em 280 nm (comprimento de onda onde o IAL absorve), observa-se a emissão do IAL em 345 nm e duas outras em 440 nm e 530 nm correspondentes às emissões fosforescentes da 4-TU no tRNA (138). Estes resultados indicam, mais uma vez, que o IAL* pode transferir sua energia para o tRNA. De fato, esta transferência é comprovada novamente, quando se observa o espectro de quimiluminescência do sistema IAA/HRP/tRNA/O₂ (Fig. III.15, página 111). Como já foi citado anteriormente, quando analisamos este espectro podemos verificar a presença de apenas dois picos, um de pequena intensidade em 475 nm e outro de maior intensidade em 550 nm. Estas emissões são correspondentes às emissões fosforescentes da 4-TU. Em contraste, o espectro de quimiluminescência do sistema sozinho apresenta múltiplos picos, como mostrado na Fig. I.14 (página 110).

Todos estes resultados são concordantes entre si e to-

dos apoiam a hipótese de que a transferência de energia do IAL* ocorre, exclusivamente, no resíduo 4-TU no tRNA com alta eficiência.

A introdução de histidina (supressor de $^1\text{O}_2$, discutido antes) no sistema IAA/HRP/tRNA/ O_2 , causou um violento aumento na emissão correspondente à 4-TU (Fig. III.11, página 107) indicando que, possivelmente, o $^1\text{O}_2$ gerado na reação estaria de alguma forma prejudicando a emissão da 4-TU e a histidina exerceria, portanto, um papel de proteção contra a ação do $^1\text{O}_2$. Este fato é consistente com a diminuição da emissão observada para o sistema IAA/HRP/tRNA/ O_2 em D_2O (Fig. III.10, página 106), onde o $^1\text{O}_2$ tem vida-média maior, e portanto maior reatividade (vide Apêndice I, página 166). Isto indica que toda possível emissão da 4-TU é suprimida, ou prejudicada por mudanças conformacionais no tRNA causadas por $^1\text{O}_2$ ou por D_2O .

III. LIGAÇÃO IAL-tRNA

Apesar de observarmos o aumento da emissão do sistema enzimático na presença de tRNA, quando usava-se concentrações mais baixas do ácido nucleico (0,4-1,6 μM) verificou-se uma supressão da emissão com $K_{SV} \ 6 \times 10^4 \text{M}^{-1}$. Isto indica que quando o tRNA estava presente na reação ocorria dois processos de transferência de energia, um que transferia para a 4-TU aparecendo sua luminescência, já discutido, e, outro onde a transferência estaria ocorrendo para outro resíduo nucleotídico não emissivo.

Usando 2- ^{14}C -IAA pode-se observar que a oxidação aeróbica do IAA na presença de tRNA levava à incorporação isotópica no último (tabela III.1, página 117), confirmando, assim os resulta

dos de Bednar (214) que encontrou 13,6% de radiatividade incorporada ao tRNA após a reação de 2- ^{14}C -IAA com HRP na presença de H_2O_2 . Este resultado sugeriu que a energia suprimida era usada para efetuar a ligação do produto de metabolismo do IAA ao tRNA.

O esquema XX (página 116) mostra que quando o tRNA era adicionado após a oxidação do IAA, nenhuma radiatividade foi encontrada na macromolécula, a não ser que fosse irradiada a 280 nm por 12 horas. Este resultado se repetiu quando a mistura de 1- ^{14}C -IAL e tRNA foi irradiada no mesmo comprimento de onda. Estes resultados são apresentados na (tabela III.1, página 117).

Desde que o tRNA absorve muito menos a 280 nm do que o IAL o faz, pode-se dizer que a espécie que se liga ao tRNA é o IAL gerado em estado eletrônico excitado na reação enzimática, ou excitado fotoquimicamente. A reação enzimática realizada em pHs 5,6 ou 6,8 induziu menor ou nenhuma incorporação radioisotópica no tRNA (tabela III.2, página 118) o que está de acordo com o decréscimo de formação de IAL na reação em valores de pH mais altos (81).

A tabela III.1 (página 117), mostra também que quando eosina estava presente na reação enzimática IAA/HRP/tRNA/ O_2 , competiu com tRNA pela energia do IAL* diminuindo 12% da ligação IAL-tRNA. Quando histidina foi adicionada à reação, a ligação foi diminuída cerca de 25% indicando que, talvez, o $^1\text{O}_2$ gerado na reação exerça uma influência no tRNA permitindo que os sítios de ligação fiquem mais expostos neste processo.

O efeito da concentração de tRNA sobre a eficiência de marcação é mostrado na Fig. III.18 (página 119). A eficiência máxima ocorre com 3 mg/ml de tRNA e, baseando-se na concentração do substrato, corresponde a cerca de 20% do valor teórico. O abaixamento da curva em concentrações acima de 3 mg/ml de tRNA não deve ser atribuído à inibição da reação; pois não se observou nenhuma mudança na velocidade de consumo de oxigênio nestas condições em-

bora tenha sido descrito por Lee (215) que concentrações relativamente altas de tRNA têm efeito inibitório na reação de oxidação do IAA catalisada por HRP. Nesta mesma figura é mostrado também, que a adição de ~2mM de Mg^{++} reduz cerca de 40% da marcação. Isto indica que as modificações conformacionais sofridas pelo tRNA por ação de Mg^{++} , protege o sítio de ligação dificultando a adição do IAL*.

Se o IAL* está se ligando ao tRNA, em que resíduo nucleotídico ele o faz?

O fato da uridina ser a base que apresentou maior K_{SV} (Fig. III.3, página 98) sugeriu que a ligação estaria envolvendo este nucleotídeo. Esta suspeita foi confirmada quando se submeteu a uridina ao tratamento com o sistema enzimático ou à irradiação a 280 nm na presença de IAL. O esquema XXI apresenta as experiências realizadas com dois tipos de marcação, usando ora a 3H -uridina, ora o $2-^{14}C$ -IAA. Nos dois casos detectou-se a formação de um produto que parece ser o mesmo, por terem Rfs iguais (Fig. III.20, página 123).

Um composto com mesmo Rf (0,28) foi obtido quando se submeteu o tRNA tratado com o sistema $2-^{14}C$ -IAA/HRP/ O_2 , à hidrólise com endonucleases (Fig. III.19, página 120) o que indica que a ligação estava ocorrendo, realmente, no resíduo uridina. Além disso, quando a mistura hidrolisada foi irradiada em 254 nm, o radiocromatograma (Fig. III.19, página 120) mostrou um abaixamento do pico Rf 0,28 e apareceu um pico em Rf 0,98 correspondente ao IAL. Isto indica que houve rompimento da ligação entre o nucleotídeo e o IAL, regenerando o último livre na mistura. Este resultado é indicativo de que o fotodímero formado pode ser resultado de fotocicloadição do tipo Paterno - Büchi (176). Nesta há a formação de adutos oxetânicos os quais sofrem reação de retrocicloadição quan

do irradiados em 254 nm (177).

Verificou-se que a ligação do IAL* era específica para o resíduo uridina. Quando os outros nucleotídeos, inclusive 4-TU foram submetidos ao mesmo tratamento, não se observou a formação de nenhum produto de adição.

Esta ligação pode, assim, ser responsável pelas mudanças observadas no espectro C.D. do tRNA após o tratamento com a reação enzimática (Fig. III.17, página 114) que, embora pequenas, são reproduzíveis e se assemelham às observadas por Ou e Song (178) para a fotoligação de psoraleno ao tRNA.

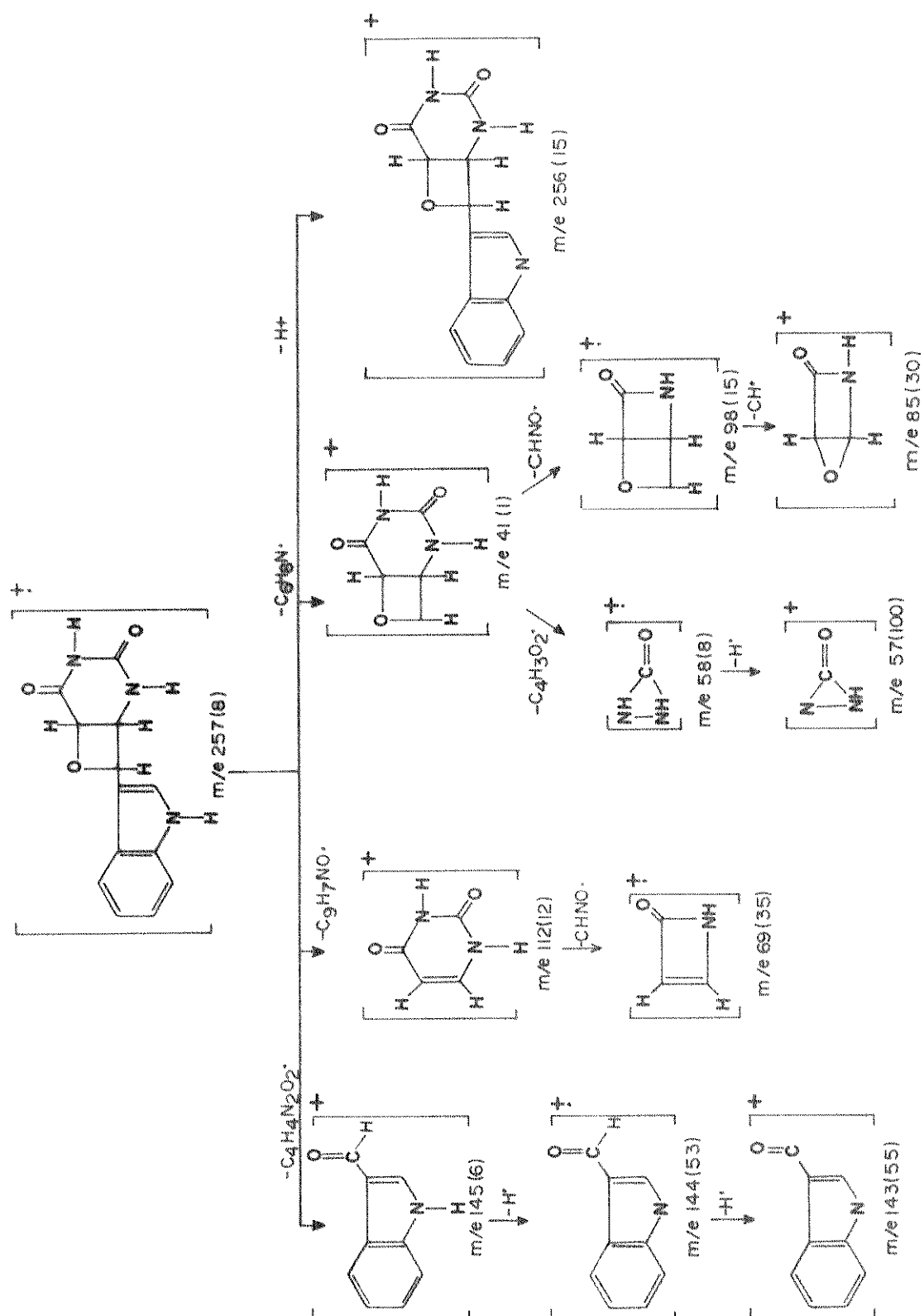
A ligação do IAL* à uridina mostrou-se efetiva, também, numa preparação fotolítica. O aduto obtido foi analisado por métodos convencionais de identificação, demonstrando, assim, que se formava um aduto ligado covalentemente.

O espectro de massa do aduto (Fig. IV.1, página 126) mostrou um pico em m/e 257 que corresponde ao íon molecular M^+ do aduto IAL-uracil. Fazendo-se uma análise dos picos de maior intensidade deste espectro pode-se propor uma fragmentação do produto como mostra o esquema XXVI.

A pureza do fotoaduto foi demonstrada pela comparação da distribuição isotópica calculada e experimental (vide item IV dos resultados, página 124). Os resultados experimentais concordam muito bem com os calculados pelas fórmulas (216) dadas abaixo:

$$\frac{|(A+1)^+|}{|A^+|} = \text{aprox. } 1,1\% \times n^\circ \text{ de átomos de C} + 0,36\% \times n^\circ \text{ de átomos de N}$$

$$\frac{|(A+2)^+|}{|A^+|} = \text{aprox. } \frac{(1,1 \times n^\circ \text{ de átomos de C})^2}{200} + 0,20\% \times n^\circ \text{ de átomos de O}$$

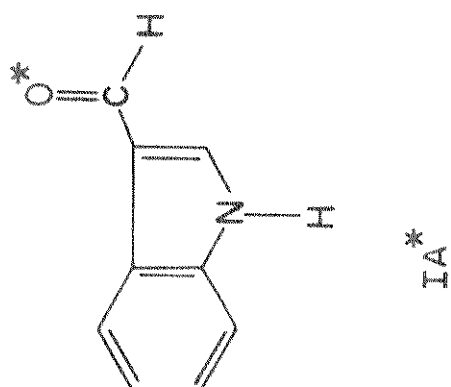
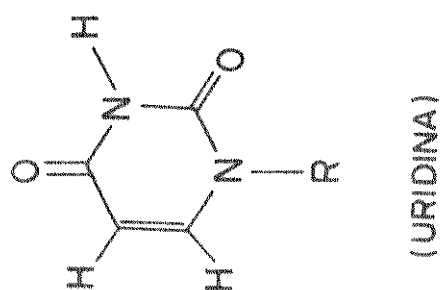
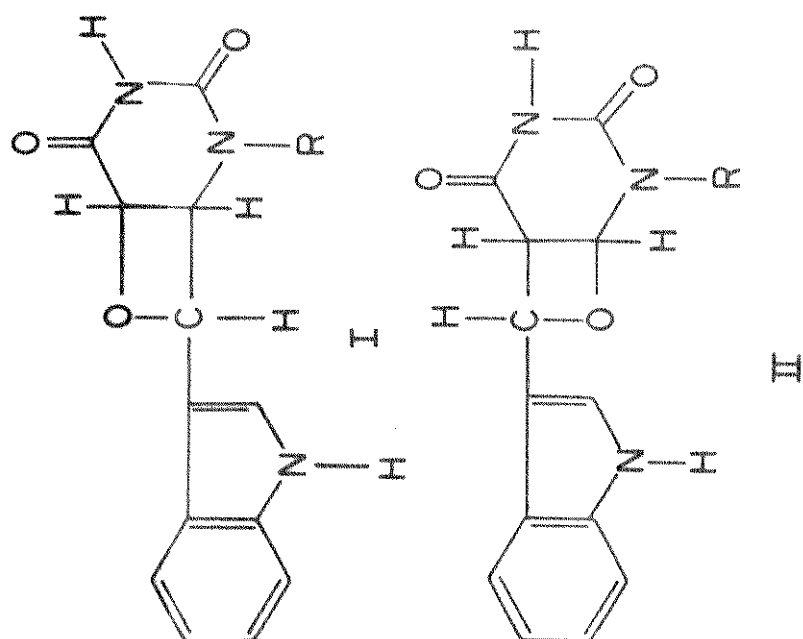


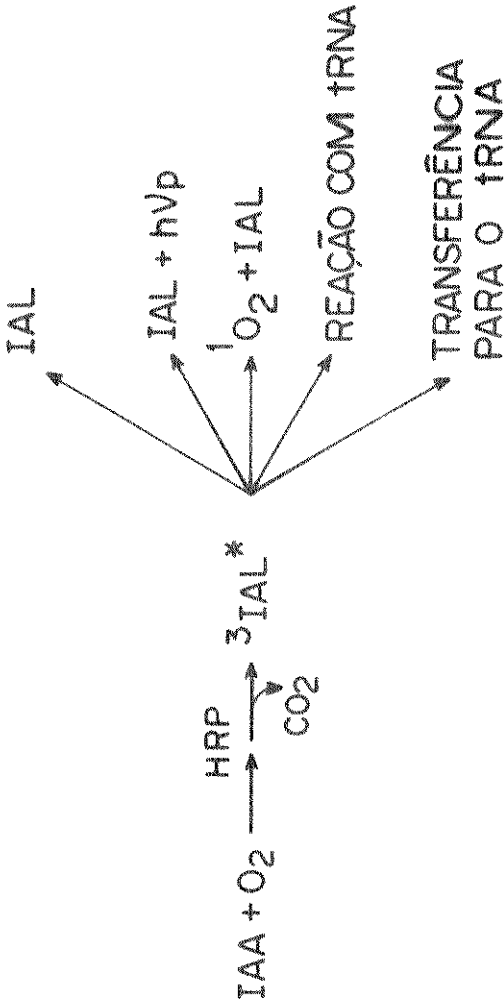
O espectro U.V. (Fig. IV.2, página 127) mostrou o desaparecimento da absorção característica da carbonila do IAL (202) em ~250 nm mostrando apenas a absorção correspondente à do grupo indólico em ~295 nm. Os picos mostrados no espectro de RMN (Fig. IV.3, página 128), quando comparados aos resultados de Varghese (177) indicam que o fotoaduto tem estrutura oxentânica. Esta indicação é confirmada pelo aparecimento da banda em 1110 cm^{-1} no espectro I.V. (Fig. IV.4, página 129).

Estes resultados indicam que a reação é de fotocicloadição do tipo Paterno-Büchi (176) semelhante àquela de uracil e acetona realizada por Varghese (177). Portanto, o fotoaduto entre IAL* e uracil (ou uridina, ou tRNA) tem as estruturas I e/ou II mostradas no esquema XXVII.

Estes processos, como o de transferência de energia do IAL para a 4TU e o de fotocicloadição do IAL à uridina no tRNA, modificam a conformação da macromolécula, como mostra o espectro CD. Sendo assim, as funções aminoaciladoras do ácido nucleico poderiam estar sendo alteradas. O teste para capacidade aminoaciladora do tRNA após ter sido submetido ao tratamento com o sistema IAA/HRP/O₂ revelou que esta função não é alterada significativamente (tabela III.3, página 124) com respeito aos aminoácidos testados, apresentando apenas uma inativação maior (11%) com a mistura dos aminoácidos. Isto pode ser considerado como indicação de que o terminal 3' do tRNA, onde o aminoácido se liga, não é afetado, significativamente, pela ligação do IAL* à macromolécula.

Para finalizar, reunimos os processos que ocorrem com IAL* gerado na reação IAA/HRP/O₂ no esquema XXVIII.





ESQUEMA XXVIII

IV - PROJEÇÕES E TRABALHOS EM DESENVOLVIMENTO USANDO O SISTEMA IAA/HRP/O₂

IV.1 - Importância Biológica

O controle da velocidade de crescimento de plantas e a diferenciação de tipos específicos de células parecem estar relacionados com a quantidade de IAA e de peroxidase presentes (36, 217). Assim, a oxidação aeróbica de IAA por HRP deve ter grande importância nesses processos.

O tRNA participa de outros processos importantes como o controle da expressão genética além do seu papel na síntese proteica (122). Em alguns sistemas, a função de controle exercida pelo ácido nucleico parece estar associada com um nucleotídeo modificado na molécula do tRNA. Na verdade, uma possibilidade para os reguladores em plantas é que eles modifiquem um sítio específico no tRNA necessário para iniciar a síntese da enzima própria do processo (218, 219). Especula-se, então, tentativamente, que a reação do tRNA com o IAL* gerado enzimaticamente possa ser um exemplo desta modificação. Uma outra mudança do tRNA pode ser provocada pela reação entre o grupo 4-TU excitado por transferência de energia do IAL triplete, com um grupo vizinho, semelhante à interação de 4-TU com citidina na posição 13, que ocorre por irradiação do tRNA (125).

Concluindo, os resultados discutidos nesta tese podem fornecer um possível mecanismo para a interação IAA-tRNA in vivo.

IV.2 - Transferência de energia para sistemas biológicos complexos.

(a) Cloroplastos (L. Nasse e G. Cilento, resultados não

publicados). Os cloroplastos suprimem a emissão do sistema enzimático, mas aparece uma emissão na região vermelha do espectro visível, quando a concentração de oxigênio é pequena. Provas com supressores adequados mostraram que a transferência vem do $^3\text{IAL}^*$ para a clorofila no cloroplasto.

(b) Clorofila (L. Nassi e G. Cilento, resultados não publicados). Quando estuda-se a transferência para a clorofila em solução o processo não é eficiente, entretanto, quando coloca-se um detergente como Triton-X-100 ou CTAB (brometo de hexadecil dimetil amônio), a transferência de energia se faz tão eficiente quanto no cloroplasto. Isto indica que, provavelmente, a clorofila esteja protegida para que possa emitir sua luminescência. Esta transferência para a clorofila no cloroplasto se mostra semelhante àquela para 4-TU no tRNA.

(c) Microsossomos (A. Campa e G. Cilento, resultados não publicados). Neste caso, os estudos estão sendo feitos em pHs 5,6 e 7,4 e, encontra-se um aumento de emissão do sistema enzimático na presença de microsossomos. Por estudos do espectro da emissão na presença de microsossomos, aparentemente, a emissão provém de flavinas existentes nestes componentes celulares.

(d) Ribossomos (S. M. de Toledo, H. Sing e N. Durán, resultados não publicados). A interação do sistema enzimático com ribossomos mostrou uma eficiente inativação, provavelmente por ação do $^3\text{IAL}^*$, já que com protetores e aceleradores de efeitos produzidos por $^1\text{O}_2$ a inibição permaneceu inalterada.

(d) DNA de Plasmídeos (S. M. de Toledo, A. Zaha, L.C. L. da Cruz e N. Durán, resultados não publicados). Estes ácidos nucleicos são afetados pelo sistema enzimático produzindo quebras no DNA, provavelmente através das duas espécies eletronicamente excitadas, o $^1\text{O}_2$ e o $^3\text{IAL}^*$. Estes resultados mostram a possibilidade

de mutagênese espontânea ser produzida por moléculas eletronicamente excitadas em sistemas biológicos.

(f) E.coli (S. M. de Toledo, A. Zaha, L.C.L. da Cruz e N. Durán, resultados não publicados). A interação do sistema enzimático com E. coli mostra que, embora seja um sistema celular completo, após o tratamento enzimático aparece com as mesmas características que os plasmídeos tratados diretamente.

(g) E.coli deficiente em reparo de danos causados por U.V. (S. M. de Toledo e K. Smith, resultados não publicados). Neste caso, notou-se uma maior sensibilidade da cepa mutante em relação à selvagem, quando as células foram tratadas com o sistema enzimático. Aparentemente, este sistema sozinho é capaz de produzir lesões semelhantes às produzidas por luz U.V..

APÊNDICE I

METODOLOGIA PARA O ESTUDO DE TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA EM SISTEMAS BIOENERGIZADOS

Sistemas bioenergizados são aqueles formados por reações enzimáticas nas quais há a formação de produtos em estado eletrônico excitado. Essa energia pode sofrer vários processos de desativação, como emissão de luz (fluorescência ou fosforescência), reação e/ou transferência de energia.

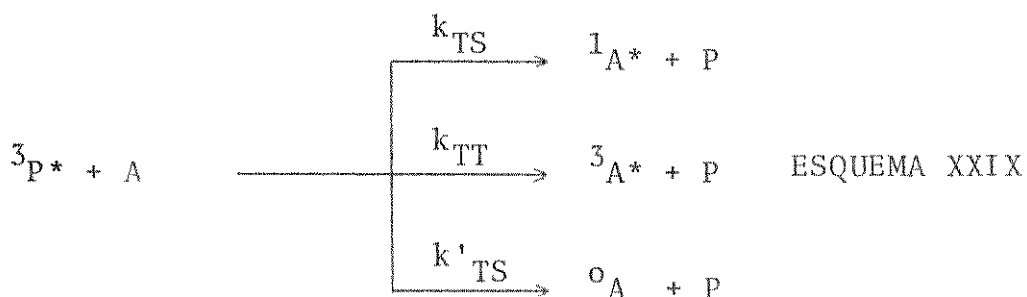
A transferência de energia tem se tornado a ferramenta mais útil para elucidar mecanismos de reações bioenergizadas e para obterem-se informações de estados excitados moleculares que não podem ser obtidas por métodos espectroscópicos comuns.

Assim, descreveremos a seguir o método utilizado por nós no estudo sistemático de transferência de energia em sistemas bioenergizados.

I - CÁLCULO DO K_{ET}^T

Neste estudo são empregadas substâncias chamadas "aceptores" (*) emissivos que cumprem o papel de receber a energia do doador e emitir sua própria fluorescência com maior eficiência.

Assim podemos representar este processo no esquema XXIX.



(*) Esta palavra é originária da língua inglesa, mas foi usada na forma aportuguesada por ser empregada corriqueiramente no meio científico.

onde k_{TS} é a constante de velocidade da transferência de energia do estado triplete do doador para o singlete do acceptor; k_{TT} é a constante para a transferência do estado triplete do doador para o triplete do acceptor; e k'_{TS} é aquela para a transferência do triplete do doador para o singlete fundamental do acceptor.

Da equação de estado estacionário para este processo temos,

$$\frac{1}{I_A} = \frac{k_d}{\phi_F^A k_1 k_{TS} [D]} \cdot \frac{1}{[A]} + \frac{k_{TS} + k_{TT} + k'_{TS}}{\phi_F^A k_1 k_{TS} [D]} \quad \text{Eq. 1}$$

onde k_d é a constante de decaimento da espécie excitada; k_1 é a constante de formação do estado excitado do doador; e ϕ_F^A é o rendimento quântico de fluorescência do acceptor.

Se fizermos um estudo da cinética de emissão do sistema adicionando concentrações crescentes de acceptor obteremos um gráfico do tipo mostrado na Fig. I.1.

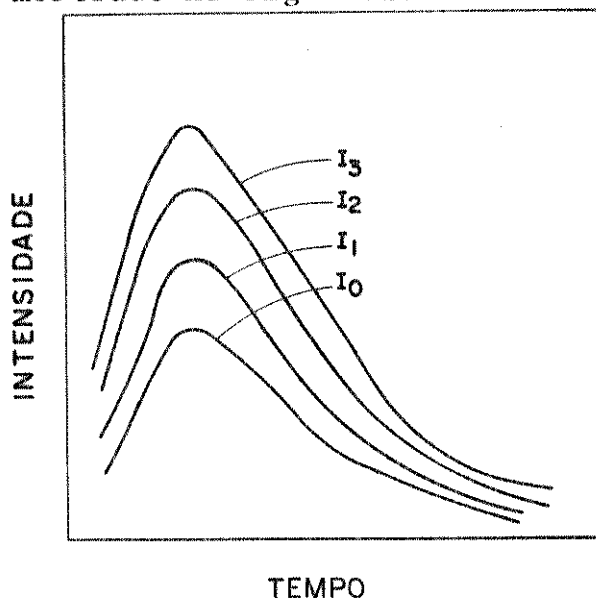


Figura I.1 - Gráfico da cinética de emissão na presença de aceptores emissivos.

onde I_0 é a intensidade máxima de emissão do sistema sem acceptor e I_1 , I_2 e I_3 são as intensidades máximas de emissão do sistema

na presença de quantidades crescentes de A_1 , A_2 e A_3 de acceptor, respectivamente. Nestas medidas temos sempre um erro de 3-5%.

Tendo estes dados, podemos fazer, segundo a equação 1, um gráfico duplo-recíproco de $1/I^{(*)}$ em função de $1/[A]$, mostrado na Fig. I.2,

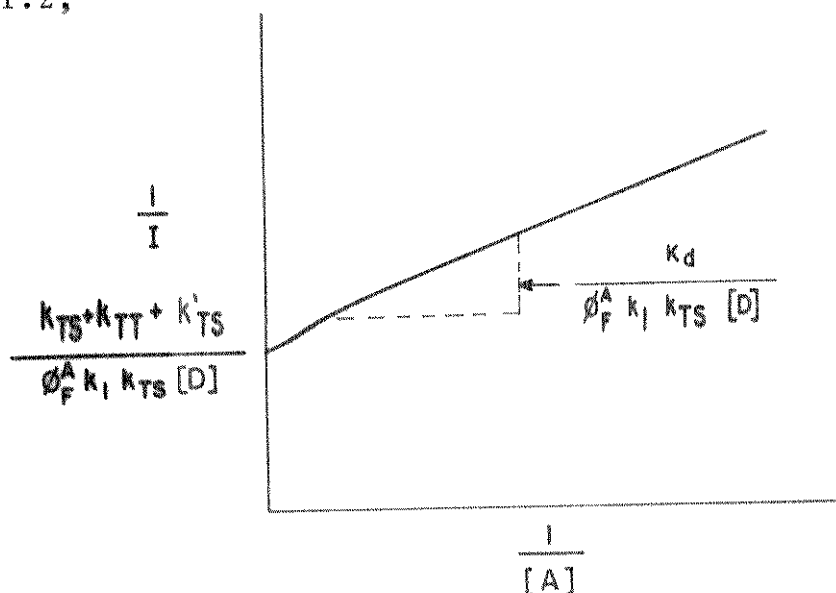


Figura I.2 - Gráfico duplo-recíproco para o efeito de aumento da emissão por ação de aceptores emissivos.

onde o coeficiente angular é $k_d / \phi_F^A k_I k_{TS} [D]$ e o coeficiente linear, $[k_{TS} + k_{TT} + k'_{TS}] / \phi_F^A k_I k_{TS} [D]$. Da relação coeficiente linear/coeficiente angular podemos obter $[k_{TS} + k_{TT} + k'_{TS}] / k_d$. Sabendo que a vida média da espécie excitada (τ^0) é $1/k_d$ e, chamando de K_{ET} a soma das constantes k_{TS} , k_{TT} e k'_{TS} , temos que o quociente coeficiente linear/coeficiente angular dá o valor $K_{ET}\tau^0$, o qual serve de parâmetro comparativo entre os vários sistemas. Além disso, considera-se que para valores de $K_{ET}\tau^0$ menores que $10^3 M^{-1}$, o mecanismo envolvido na transferência é colisional, e valores maiores que $10^3 M^{-1}$ indica um processo a longa distância.

(*) Quando o gráfico da cinética é simétrico podemos usar a intensidade máxima, caso contrário usamos a intensidade integrada a um determinado tempo.

Os aceptores mais usados em nossos estudos são:

- (1) corantes xantênicos (eosina, fluoresceína, rosa bengala e eritrosina B) que são inespecíficos, isto é, podem aceitar energia de qualquer espécie excitada, como por exemplo, carbonílos tripletes ou singletes e oxigênio singlete (220).
- (2) DBAS que é específico para carbonílos em estado triplete (91, 95).
- (3) DPAS e AS que são específicos para carbonílos em estado singlete (221).
- (4) Hiperacina que é um composto isolado de plantas e sintetizado por Brockmann e col. (222) e, aparentemente, apresenta propriedades de aceptor emissivo frente a estados excitados (π, π^*), preferencialmente (224).
- (5) Riboflavina (223) e Rodamina B (225).

II - CÁLCULO DE K_{SV} OU $k_q \tau^0$

Para este estudo são empregadas substâncias chamadas supressores, que recebem energia do doador e consomem-na através de processos não emissivos.

Assim, ao fazermos a cinética de emissão de um sistema e, adicionarmos a cada medida, uma concentração maior de supressor, obtemos um gráfico do tipo daquele mostrado na Fig. II.1,

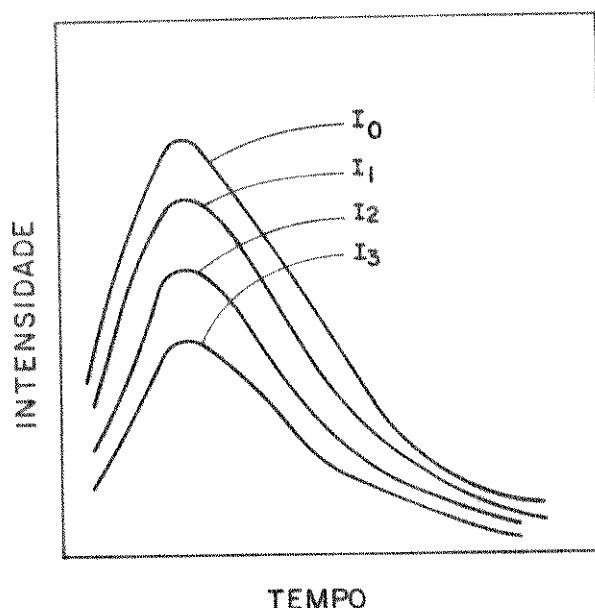


Figura II.1 - Gráfico da cinética de emissão na presença de supressores.

onde I_0 , I_1 , I_2 e I_3 são as intensidades máximas de emissão sem supressor e com quantidades Q_1 , Q_2 e Q_3 , respectivamente, sendo $Q_1 < Q_2 < Q_3$.

Conhecendo a equação de Stern-Volmer para um supressor:

$$\frac{I_0}{I_Q} = 1 + k_q \tau^0 [Q] \quad \text{Eq. 2}$$

onde k_q é a constante de supressão e τ^0 é a vida média da espécie emissora; podemos fazer um gráfico chamado de Gráfico Stern-Volmer de I_0/I_Q em função de $[Q]$ (Fig. II.2).

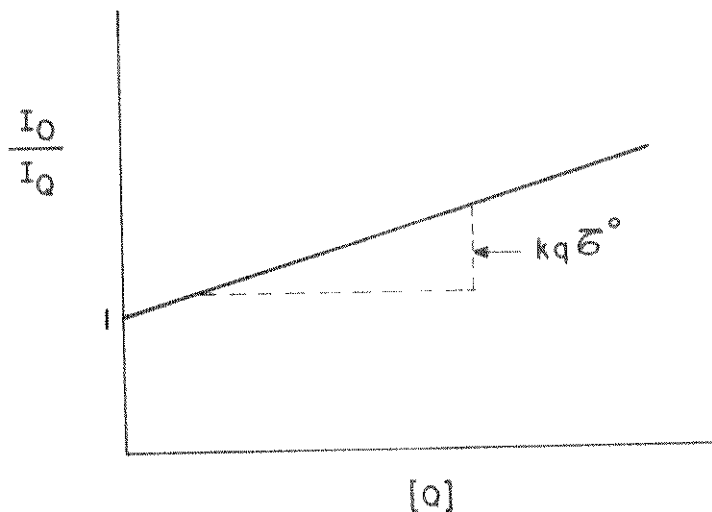


Figura II.2 - Gráfico Stern-Volmer para efeito de supressão da emissão.

Neste gráfico o coeficiente linear é 1 e o coeficiente angular é $k_q \tau^0$ ou K_{SV} o qual serve também como parâmetro de comparação entre os vários sistemas estudados.

Os supressores comumente usados em nossos sistemas são:

- (1) ácido ascórbico, sorbato (226).
- (2) uridina e citidina.
- (3) guanosina (186), bilirrubina (227), triptofano (228), DOPA (229), histidina (208) e β -caroteno (230) que são supressores específicos para 1O_2 .
- (4) superóxido dismutase que dismuta superóxido ânion ($O_2^{\cdot-}$) (201); catalase que captura H_2O_2 (231); e, benzoato que é específico para $OH^{\cdot}$ (232).

III - CÁLCULO DE β

Nos sistemas onde há efeito dos supressores de oxigênio singlete, pode-se calcular o valor β que é a concentração de supressor necessária para aniquilar 50% do 1O_2 formado (104).

Considerando a equação 2 e fazendo $I_Q = I_0/2$ e $[Q] = \beta$, temos que β é igual ao valor recíproco da constante de Stern-Volmer ($1/k_q \tau^0$).

IV - EFEITO DO D_2O E DABCO

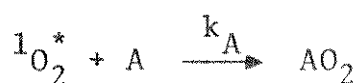
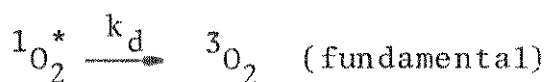
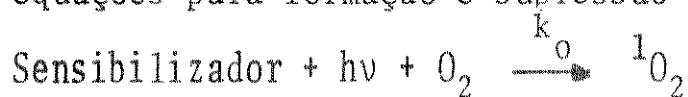
Quando existe a formação de 1O_2 no sistema enzimático, a emissão fotônica e a reatividade do 1O_2 são aumentadas na presença de D_2O (233). Isto acontece porque neste meio a vida média do 1O_2 aumenta aproximadamente 10 vezes.

O efeito observado quando DABCO é adicionado à reação é o mesmo, isto é, aumento da emissão, mas a causa não é a mesma.

Esta substância atua como supressora sobre $^1\text{O}_2$, pois diminui sua reatividade, mas aumenta sua emissão fotônica por mecanismos ainda pouco esclarecidos (234).

V - TÉCNICA DE ESTADO ESTACIONÁRIO

Esta técnica é muito útil para o estudo de supressão de $^1\text{O}_2$ por competição entre dois supressores (235). O esquema XXX mostra as equações para formação e supressão do $^1\text{O}_2$.



ESQUEMA XXX

A equação de estado estacionário para este processo nos dá a seguinte expressão:

$$\frac{1}{[\text{AO}_2]} = \frac{1}{[^1\text{O}_2]} + \frac{(k_q + k_r) [\text{Q}] + k_d}{k_A} \frac{1}{[\text{A}]} \frac{1}{[^1\text{O}_2]} \quad \text{eq. 3}$$

onde $[^1\text{O}_2]$ é a quantidade total de $^1\text{O}_2$ gerado; $[\text{A}]$ é a concentração de aceptor e $[\text{Q}]$ a concentração de supressor. k_q , k_r e k_A são as constantes de velocidade para supressão, reação com Q e reação com A, respectivamente e, k_d é a constante de desativação não radiativa do $^1\text{O}_2$. $[\text{AO}_2]$ é a quantidade de produto que pode ser

representada para o caso do método bioenergizado por $I_o - I_{A,Q}$, onde I_o é a emissão fotônica na ausência de A e Q. Se mantivermos $[Q]$ constante, o gráfico (fig. V.1) de $1/[AO_2]$ ou $1/I_o - I_{A,Q}$ vs $1/[A]$ dá uma linha reta, cujo coeficiente linear é $1/[O_2]$ e coeficiente angular é $[^1O_2]^{-1} \left(\frac{k_d + (k_q + k_r) [Q]}{k_A} \right)$. Assim, uma família de curvas para várias concentrações de $[Q]$ permite distinguir entre uma supressão física verdadeira e outras alternativas. Se os supressores utilizados forem específicos para 1O_2 e os coeficientes lineares destas curvas forem idênticos, pode-se dizer que a espécie excitada envolvida é o oxigênio singlete e, implica que A e Q competem por um mesmo intermediário.

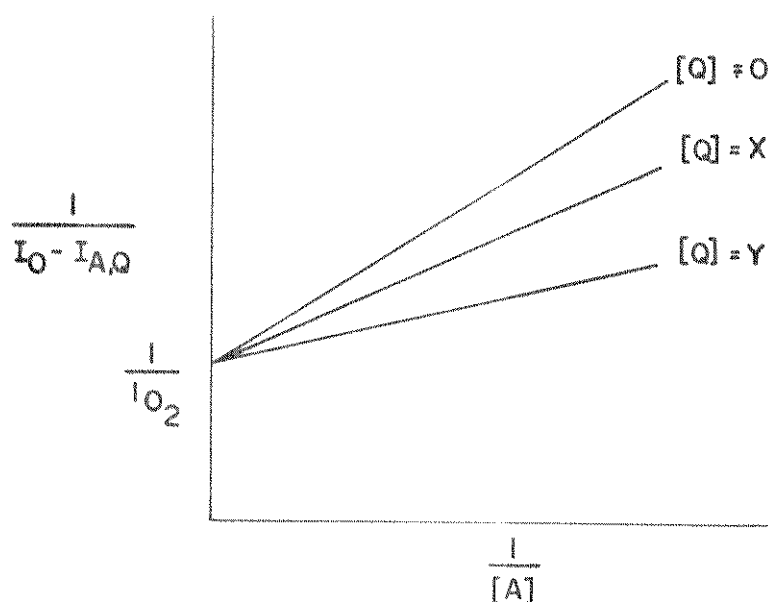


Figura V.1 - Gráfico duplo-recíproco para o efeito competitivo de 2 supressores.

Multiplicando a equação 3 por $[^1O_2]$, temos

$$\frac{[^1O_2]}{[AO_2]} = 1 + \left(\frac{(k_q + k_r) [Q] + k_d}{k_A} \right) \frac{1}{[A]} \quad \text{eq. 4}$$

Considerando-se $[^1O_2] = I_o$ e $[AO_2] = I_o - I_{A,Q}$ e fazendo um gráfico

$I_o/I_o - I_{A,Q}$ vs $1/[A]$, obtêm-se uma reta cujo coeficiente linear é 1 e o coeficiente angular é $(k_q + k_r) [Q] + k_d / k_A$. Assim, somente o coeficiente angular variará com concentrações de Q diferentes (Fig. V.2).

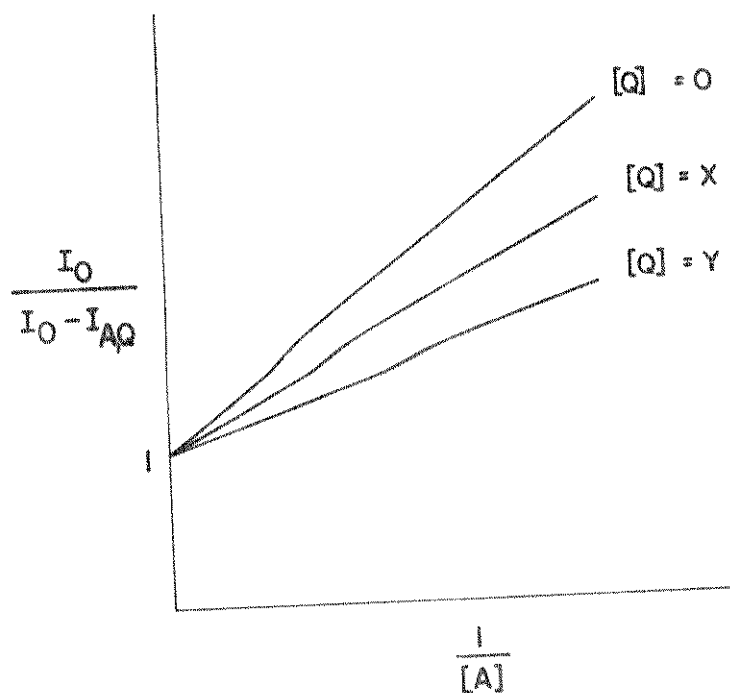
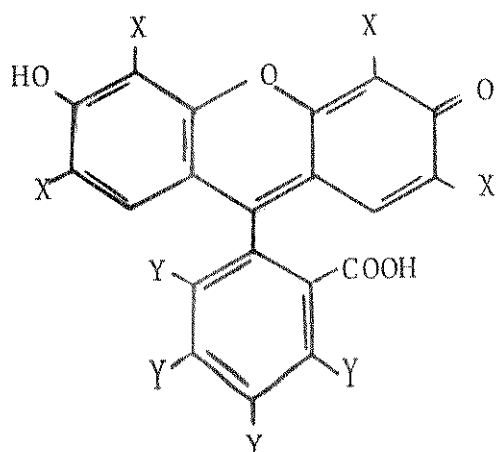


Figura V.2 - Gráfico de cinética de estado estacionário para o efeito de competição entre dois supressores.

ESTRUTURA DE ALGUNS COMPOSTOS UTILIZADOS NA TESE

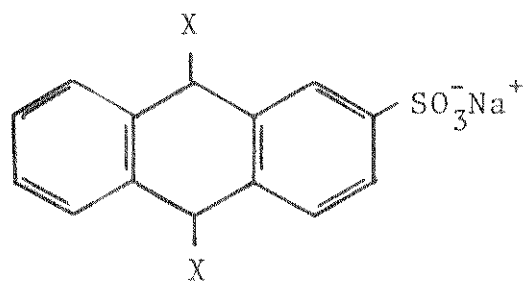
Corantes Xantênicos

X = Y = H fluoresceína

X = Br Y = H eosina

X = I Y = H eritrosina B

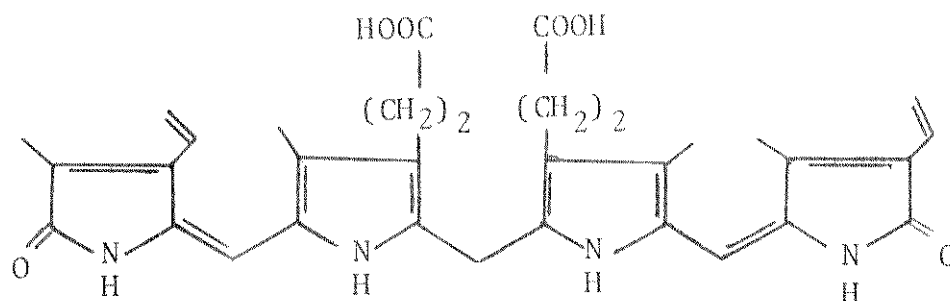
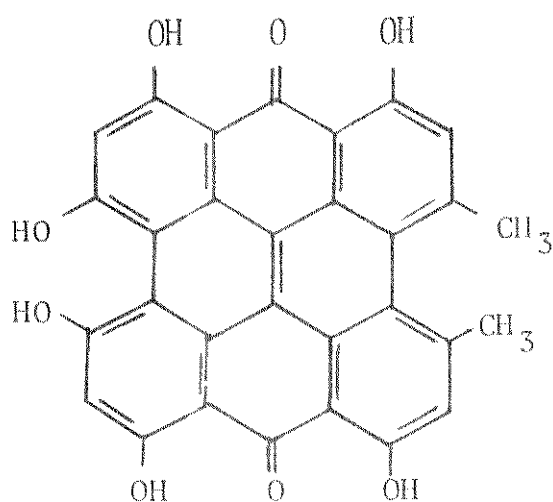
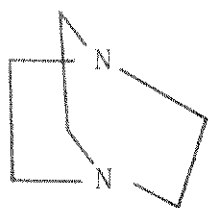
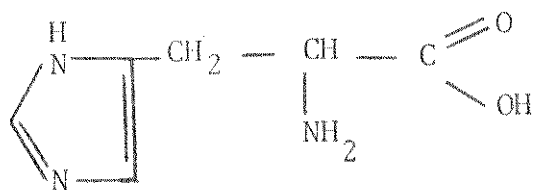
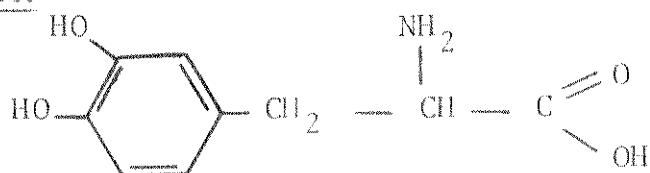
X = I Y = Cl rosa bengala

Compostos Antracênicos

X = H AS

X = Br DBAS

X = $\emptyset$ DPAS

BilirrubinaHiperacinaDABCOHistidinaDOPA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - J. L. Key, Ann. Rev. Plant Physiol. 20, 449 (1969).
- 2 - K. V. Thimann, J. Biol. Chem. 109, 279 (1935).
- 3 - A. Winter, Planta 71, 229 (1966).
- 4 - K. V. Thimann e M. Grochwska, em "Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances", (F. Wightman e G. Stterfield, Eds.), Runge, Ottawa, pp. 231 (1968).
- 5 - R. C. Black e R. H. Hamilton, Plant Physiol. 45, 461 (1971).
- 6 - N. Erdmann e U. Schiewer, Planta 97, 135 (1971).
- 7 - E. A. Schneider e F. Wightman, Ann. Rev. Plant Physiol. 25, 487 (1974).
- 8 - P. Larsen e T. Aashein, em "Plant Growth Regulation", (R. Klein, Ed.), Ames: Iowa State Univ. Press, pp. 43 (1961).
- 9 - R. Rajagopal, Physiol. Plant. 20, 655 (1967).
- 10 - R. Rajagopal, Physiol. Plant. 21, 378 (1968).
- 11 - R. A. Khalifah, Physiol. Plant. 20, 355 (1967).
- 12 - R. A. Gibson, E.A. Schneider e F. Wightman, J. Exp. Bot. 23, 775 (1972).
- 13 - E. P. White, N.Z. J. Sci. Technol. B25, 137 (1944).
- 14 - E. Schneider, R. A. Gibson e F. Wightman, J. Exp. Bot. 23, 152 (1972).
- 15 - O. L. Gamborg, Can. J. Biochem. 43, 723 (1965).

- 16 - N. K. Sukanya, C. S. Vaidyanathan e S. Mahadevan, Indian J. Biochem. Biophys. 8, 235 (1971).
- 17 - R. Rajagopal, Physiol. Plant. 24, 272 (1971).
- 18 - R. A. Gibson, G. Barrett e F. Hightman, J. Exp. Bot. 23, 381 (1972).
- 19 - J. M. Hill, P. J. G. Mann, Biochem. J. 91, 171 (1964).
- 20 - C. H. Fawcett, Nature 204, 1200 (1964).
- 21 - J. A. Bentley e S. Hausley, J. Exp. Bot. 3, 393 (1952).
- 22 - R. C. Seeley, C. H. Fawcett, R. L. Wain e F. Wightman, em "The Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances" (R. L. Wain e F. Wightman, Eds.), London: Butherworths, pp. 234 (1956).
- 23 - P.S. Shuka e S. Mahadevan, Arch. Biochem. Biophys. 137, 166 (1970).
- 24 - S. Mahadevan e K. V. Thimann, Arch. Biochem. Biophys. 107, 62 (1964).
- 25 - D. L. Rayle e W. K. Purves, Plant Physiol. 42, 520 (1967).
- 26 - F. Wightman e D. Cohen, em "Biochemistry and Physiology of Plant Substances", (F. Wightman e G. Setterfield, Eds), Ottawa: Runge, pp. 273 (1968).
- 27 - L. E. Vickery e W. K. Purves, Plant Physiol. 49, 716 (1972).
- 28 - T. T. Fukuyama, H. S. Moyed, J. Biol. Chem. 239, 2392 (1964).
- 29 - L. Eliasson, Physiol. Plant. 48, 78 (1980).
- 30 - P. M. Ray e G. M. Curry, Nature 181, 895 (1958).
- 31 - R. G. Omran , Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 970 (1977).

- 32 - K. V. Thimann e B. M. Sweeney, J. Gen. Physiol. 21, 123 (1937).
- 33 - J. Eliezer e D. A. Morris, Planta 149, 327 (1980).
- 34 - G. Fellenberg, Planta 84, 324 (1969).
- 35 - G. Fellenberg, Z. Naturforsch 266, 607 (1971).
- 36 - N. P. Kefford, R. Kaur-Sawhney e A. W. Galston, Acta Chem. Scand. 17, s313 (1963).
- 37 - S. M. Siegel e A. W. Galston, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 39, 1111 (1953).
- 38 - F. E. Bendaña, A. W. Galston, R. Kaur - Sawhney e P. J. Penny, Plant Physiol. 40, 977 (1965).
- 39 - P. J. Davies e A. W. Galston, Plant Physiol. 47, 435 (1971).
- 40 - J. L. Key e J. Ingle, em "Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances", (F. Wightman e G. Stterfield, Eds) Ottawa: Runge, pp. 711 (1968).
- 41 - W. J. Meudt e A. W. Galston, Plant Physiol. Suppl. 37, 14 (1962).
- 42 - K. Kobayashi, em "Plant Growth Substances", (D. J. Can, Ed.) Tokyo: Hirokawa, pp. 573 (1974).
- 43 - K. Kobayashi e T. Yamaki, Plant Cell. Physiol. 13, 49 (1972).
- 44 - T. Yamaki e K. Kobayashi, em "Plant Growth Substances", (D. J. Can, Ed.), Berlin: Springer, pp. 196 (1972).
- 45 - H. Kende e G. Gardner, Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 267 (1976).
- 46 - T. M. Kacethner, Nature 267, 19 (1977).
- 47 - R. Hertel, K. Thompson e V. E. A. Russo, Planta 107, 325 (1972).

- 48 - S. Batt, M. B. Wilkins e M. A. Venis, *Planta* 130, 7 (1976).
- 49 - S. Batt e M. A. Venis, *Planta* 130, 15 (1976).
- 50 - M. A. Venis, *Planta* 134, 145 (1977).
- 51 - G. F. Katekar, *Phytochemistry* 18, 223 (1979).
- 52 - S. A. Gordon, R. J. M. Fry e S. Barr, *Am. J. Physiol.* 222, 399 (1972).
- 53 - T. Yamaki, E. Shimojo, H. Ichimura, N. Nichinari, K. Namekawa e K. Yoshizawa, *J. UOEH* 1, 471 (1979).
- 54 - J. Duchesne, *J. Theor. Biol.* 66, 137 (1977).
- 55 - A. W. Galston, J. Bonner e R. S. Baker, *Arch. Biochem. Biophys.* 42, 456 (1953).
- 56 - P. L. Goldacre, *Aust. J. Sci. Res.* B-4, 293 (1951).
- 57 - R. H. Kenten, *Biochem. J.* 59, 110 (1955).
- 58 - O. P. Srivastava e R. B. Van Huystee, *Can. J. Bot.* 51, 2207 (1973).
- 59 - E. A. Schneider e F. Wightman, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 487 (1974).
- 60 - J. Ricard, G. Mazza e R. J. Williams, *Eur. J. Biochem.* 28, 566 (1972).
- 61 - I. Yamazaki, R. Nakajima, H. Honna e M. Tamura, em "Structure and Function of the Cytochromes", (K. Okunuki, M. D. Kamen e I. Schuzu, Eds.) Univ. Tokyo Press, pp. 552 (1968).
- 62 - T. Endo, *Plant Cell. Physiol.* 43, 1037 (1968).
- 63 - J. Sahulka, *Biol. Plant* 12, 191 (1970).

- 64 - L. Sequeira e L. Mineo, *Plant Physiol.* 41, 1200 (1966).
- 65 - B. Z. Siegel e A. W. Galston, *Science* 157, 1557 (1967).
- 66 - M. C. Hoyle, *Plant Physiol.* 50, 15 (1972).
- 67 - H. S. Ku, S. F. Yang e H. K. Pratt, *Plant Physiol.* 45, 358 (1970).
- 68 - E. Darimont, K. Schwachofer e Th. Gaspar, *Biochim. Biophys. Acta* 321, 461 (1973).
- 69 - L. M. Shannon, F. Kay e J. Y. Lew, *J. Biol. Chem.* 241, 2166 (1966).
- 70 - J. H. Shin, L. M. Shannon, F. Kay e J. Y. Lew, *J. Biol. Chem.* 246, 4546 (1971).
- 71 - A. Ischmaru, *Biorg. Chem.* 9, 472 (1980).
- 72 - H. Theorell, *Enzymologia* 10, 250 (1942).
- 73 - I. Yamazaki e H. Souzu, *Arch. Biochem. Biophys.* 86, 294 (1960).
- 74 - H. B. Dunford e J. S. Stillman, *Coord. Chem. Rev.* 19, 187 (1976).
- 75 - H. Degn, *Biochim. Biophys. Acta* 180, 264 (1969).
- 76 - T. L. Poulos e J. Krant, *J. Biol. Chem.* 255, 8199 (1980).
- 77 - L. R. Fox, W. K. Purves e H. I. Nakada, *Biochemistry* 4, 2754 (1965).
- 78 - H. Yamazaki e I. Yamazaki, *Arch. Biochem. Biophys.* 154, 147 (1973).
- 79 - P. M. Ray e K. V. Thimann, *Arch. Biochem. Biophys.* 64, 175 (1956).

- 80 - P.-E. Pilet, *Physiol. Plant.* 13, 766 (1960).
- 81 - Y. Morita, Y. Kominato e K. Schimizu, *Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.* 28, 1 (1967).
- 82 - R. L. Hinman e J. Lang, *Biochemistry* 4, 144 (1965).
- 83 - J. N. BeMiller e W. Colilla, *Phytochemistry* 11, 3393 (1972).
- 84 - Y. Suzuki e A. Kawarada, *Agric. Biol. Chem.* 42, 1315 (1978).
- 85 - I. Yamazaki e L. H. Piette, *Biochim. Biophys. Acta* 77, 47, (1963).
- 86 - R. Nakajima e I. Yamazaki, *J. Biol. Chem.* 254, 872 (1972).
- 87 - G. Cilento, *Photochem. Photobiol. Rev.* 5, 199 (1980).
- 88 - G. Cilento, *Acc. Chem. Res.* 13, 225 (1980).
- 89 - N. Durán, A. Faljoni e M. Haun, *Rev. Latinoamer. de Quim.* 11, 119 (1980).
- 90 - N. Durán, M. Haun e J. E. Brunet, *Rev. Latinoamer. de Quim.* 12, 1 (1981).
- 91 - C. C.C. Vidigal, K. Zinner, N. Durán, E. J. H. Bechara e G. Cilento, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 65, 138 (1975).
- 92 - C. C. C. Vidigal - Martinelli, K. Zinner, B. Kachar, N. Durán e G. Cilento, *FEBS Lett.* 108, 266 (1979).
- 93 - F. McCapra, *Pure Appl. Chem.* 24, 611 (1970).
- 94 - K. R. Kopecky e C. Munford, *Can. J. Chem.* 47, 709 (1969).
- 95 - T. Wilson, M. T. P. In. *Rev. Sci. Chem. Kinet.*, ser. II, 265 (1976).
- 96 - R. B. Woodward e R. Hoffmann, *Ang. Chem. Int. Ed.* 8, 781 (1969).

- 97 - W. H. Richardson, M. B. Yalvington e H. F. O'Neal, J. Am. Chem. Soc. 94, 1619 (1972).
- 98 - T. Goto e Y. Kishi, Ang. Chem. Int. Ed. 7, 407 (1968).
- 99 - G. Cilento, J. Theor. Biol. 55, 471 (1975).
- 100 - N. J. Turro, em "Technique of Organic Chemistry XIV. Energy Transfer and Organic Photochemistry", (P. A. Leermakers e A. Weissberger, Eds.), Wiley - Interscience, N. York, pp. 133 (1969).
- 101 - C. C. C. Vidigal, A. Faljoni - Alário, N. Durán, K. Zinner, Y. Shimizu e G. Cilento, Photochem. Photobiol. 30, 195 (1979).
- 102 - N. Durán, K. Zinner, R. C. de Baptista, C. C. C. Vidigal e G. Cilento, Photochem. Photobiol. 24, 383 (1976).
- 103 - K. Zinner, R. C. de Baptista e G. Cilento, Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 889 (1974).
- 104 - C. S. Foote, em "Singlet Oxygen, Reactions with Organic Compounds and Polymers", (B. Ramby e J. F. Rabek, Eds.), John Wiley and Sons, N. York, pp. 135 (1978).
- 105 - C. S. Foote, em "Singlete Oxygen", (H. H. Wasserman e R. W. Murray, Eds.), Academic Press Inc., N. York, pp. 139 (1979).
- 106 - N. Y. Krinsky, em "Singlet Oxygen", (H. H. Wasserman e R. W. Murray Eds.), Academic Press Inc., N. York, pp. 597 (1979).
- 107 - N. Durán, em "Excited State Generation in Chemical and Biological System", (W. Adam e G. Cilento, Eds.). Academic Press, N. York, pp. 345 (1982).
- 108 - L. H. Innocentini, Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 1981.

- 109 - S. T. de Farias-Furtado, Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 1982.
- 110 - G. A. Russell, J. Am. Chem. Soc. 79, 3871 (1957).
- 111 - D. F. Bowman, T. Gillan e K. U. Ingold, J. Am. Chem. Soc. 93, 6555 (1971).
- 112 - K. C. Wu e A. M. Trozzolo, J. Photochem. 10, 407 (1979).
- 113 - E. H. Allen e R. S. Schweet, Biochim. Biophys. Acta 39, 185 (1960).
- 114 - J. P. Goddard, Prog. Biophys. Molec. Biol. 32, 83 (1977).
- 115 - M. Ya. Feldman, Prog. Biophys. Molec. Biol. 32, 83 (1977).
- 116 - R. W. Holley, J. Apgar, G. A. Everett, J. T. Madison M. Marquisee, S. H. Merrill, J. R. Penswick e A. Zamir, Science 147, 1462 (1965).
- 117 - J. D. Robertus, J. E. Ladner, J. T. Finch, D. Rhodes, R. S. Brown, B. F. C. Clark e A. Klug, Nature 250, 546 (1974).
- 118 - S. H. Kim, F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, J. L. Sussman, A. H. J. Wang, N. C. Seeman e A. Rich, Science 185, 435 (1974).
- 119 - B. F. C. Clark, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 20, 1 (1977).
- 120 - S. -H. Kim e J. L. Sussman, Horizons. Biochem. Biophys. 4, 159 (1977).
- 121 - S. -H. Kim, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 17, 281 (1976).
- 122 - A. Rich e S. -H. Kim, Sci. Am. 238, 52 (1978).
- 123 - M. N. Lipsett, J. Biol. Chem. 240, 3975 (1965).

- 124 - D. Yoshikami, G. Katz, E. B. Keller e B. S. Dudock, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 166, 714 (1968).
- 125 - A. Favre, A. M. Michelson e M. Yamiv, *J. Mol. Biol.* 58, 367 (1971).
- 126 - K. Beadsley, T. Tao e C. R. Cantor, *Biochemistry* 18, 3254 (1979).
- 127 - U. L. RayBhandary, R. D. Falkner e A. Stuart, *J. Biol. Chem.* 243, 575 (1968).
- 128 - S. H. Blobstein, D. Grumberg, I. B. Weinstein e K. Nakanishi, *Biochemistry* 12, 188 (1973).
- 129 - A. M. Fleinberg, K. Nakanishi, J. Baruszewski, A. Rafalski, H. Augustyniak e M. Wiewiowski, *J. Am. Chem. Soc.* 96, 7797 (1974).
- 130 - L. M. Fink, L. W. Lanks, T. Goto e I. B. Weinstein, *Biochemistry* 10, 1873 (1971).
- 131 - H. Kasai, M. Goto, S. Takemura, T. Goto e S. Matsuura, *Tetrahedron Lett.* 29, 2725 (1971).
- 132 - C. R. Frihart, A. M. Feinberg e K. Nakanishi, *J. Org. Chem.* 43, 1644 (1978).
- 133 - A. Maelicke, P. v. d. Haar, M. Sprinzl e F. Cramer, *Biopolymers* 14, 155 (1975).
- 134 - P. Davanloo, M. Sprinzl e F. Cramer, *Biochemistry* 15, 3189 (1979).
- 135 - S. H. Blobstein, R. Gebert, D. Grunberger, K. Nakanishi e B. Weinstein, *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 668 (1975).
- 136 - M. Yaniv e B. G. Barrell, *Nature* 222, 278 (1969).
- 137 - N. Shalitin e J. Feitelson, *Biochemistry* 15, 2092 (1976).

- 138 - N. Shalitin e J. Feitelson, J. Chem. Phys. 59, 1045 (1973).
- 139 - M. Daniels e W. Hauswirth, Science 171, 675 (1971).
- 140 - F. Pochon, C. Balny, K. H. Scheit e A. M. Michelson, Biochim. Biophys. Acta 228, 49 (1971).
- 141 - P. Sarkar e J. T. Yang, Arch. Biochem. Biophys. 112, 512 (1965).
- 142 - J. T. Penniston e P. Doty, Biopolymers 1, 145 (1963).
- 143 - M. Cohn, A. Danchin e M. Grunberg - Manago, J. Mol. Biol. 39, 199 (1968).
- 144 - A. Danchin e M. Guéron, Eur. J. Biochem. 16, 532 (1970).
- 145 - G. Rialdi, J. Levy e R. Biltonen, Biochemistry 11, 2472 (1972).
- 146 - R. Romer e R. Hach, Eur. J. Biochem. 55, 271 (1975).
- 147 - R. H. Reeves, C. R. Cantor e R. W. Chambers, Biochemistry 9, 3993 (1970).
- 148 - D. P. Ringer, B. A. Howell e D. E. Kizer, Anal. Biochem. 103, 337 (1980).
- 149 - J. M. Wolfson e D. R. Kearns, Biochemistry 14, 1436 (1975).
- 150 - L. Musajo e G. Rodighiero, Photochem. Photobiol. 11, 27 (1970).
- 151 - G. Lober e L. Kittler, Studia Biophys. 41, 81 (1973).
- 152 - A. J. Varghese, em "Photophysiology", (A. C. Giese, Ed.) Academic Press, N. York, Vol. III, pp. 207 (1972).
- 153 - A. J. Lomant e J. R. Fresco, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 12, 1(1972).

- 154 - L. Stryer e R.P. Haugland, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 719 (1967).
- 155 - R.P. Haugland, J. Yguerabide e L. Stryer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 23 (1969).
- 156 - S.A. Latt, H.T. Cheung e E.R. Blout, J. Am. Chem. Soc. 87, 995 (1965).
- 157 - K. Beardsley e C.R. Cantor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65, 39 (1970).
- 158 - C. -H. Yang e D. Soll, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2878 (1974).
- 159 - P. -J. Ballini, P. Vigny, G. Thomas e A. Favre, Photochem. Photobiol. 24, 321 (1976).
- 160 - A. Favre, M. Yaniv e A. M. Michelson, Biochem. Biophys. Res. Commun 37 266 (1969).
- 161 - A. Favre e M. Yaniv, FEBS Letters 17, 236 (1971).
- 162 - P. A. Swenson e S. Nishimura, Photochem. Photobiol. 3, 85 (1964).
- 163 - M. H. Buc e J. F. Scott, Biochem. Biophys. Res. Commun 22, 459 (1966).
- 164 - H. G. Zachau, Physiol. Chem. 336, 176 (1964).
- 165 - C. L. Greenstock e H.E. Johns, Biochem. Biophys. Res. Commun 30, 21 (1968).
- 166 - A.A. Lamola e T. Yamane, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 443 (1967).
- 167 - R. W. Chambers, H.P. Waits, K.A. Freude, J. Am. Chem. Soc. 91, 7203 (1969).

- 168 - K. C. Smith, Photochem. Photobiol. 2, 503 (1963).
- 169 - J. K. Setlow, em "Current Topics in Radiation Research, (M. Ebert e A. Howard, Eds.), North Holland Amsterdam, vol. II, pp. 195 (1966).
- 170 - A. J. Varghese, Biochemistry 12, 2725 (1973).
- 171 - M. Charlier e C. Hélène, Photochem. Photobiol. 6, 501(1962).
- 172 - A. J. Varghese, Biochemistry 10, 4283 (1971).
- 173 - J. Saltiel, R. M. Coates e W. G. Dauben, J. Am. Chem. Soc. 88, 2745 (1966).
- 174 - N. C. Yang, Pure and Applied Chemistry 9, 591 (1964).
- 175 - N. C. Yang, D. S. McClure, S. L. Murov, J. J. Houser e R. Dusenbery, J. Am. Chem. Soc. 89, 5465 (1967).
- 176 - N. C. Yang e R. Loeschen, Tetrahedron Lett. 21, 2571 (1968).
- 177 - A. J. Varghese, Photochem. Photobiol. 21, 147 (1975).
- 178 - C. -N. Ou e P. -S. Song, Biochemistry 17, 1054 (1978).
- 179 - L. Kittler e G. Lober, em "Photochemical and Photobiological Reviews", (K. C. Smith, Ed.) Plenum Press, vol. II, pp. 39 (1974).
- 180 - M. Kuwano, Y. Hayashi e M. Miura, J. Mol. Biol. 32, 659 (1968).
- 181 - A. Tsugita, Y. Okada, K. Uehara, Biochim. Biophys. Acta 103, 360 (1965).
- 182 - G. B. Orlob, Virology 31, 402 (1967).
- 183 - K. Sivarama e M. P. Gordon, Biochim. Biophys. Acta 129, 32 (1966).

- 184 - J. Amagasa e T. Ito, Radiation Res. 43, 45 (1970).
- 185 - A. Kornhauser, N. J. Krinsky, P. -K. C. Huang e D. C. Clagett, Photochem. Photobiol. 18, 63 (1973).
- 186 - J. Cadet e R. Teoule, Photochem. Photobiol. 28, 661 (1978).
- 187 - M. Battegay e Ph. Prandt, Bull Soc. Chim. Fr. 33, 1667 (1923).
- 188 - A. Étienne, J.-E. Lepeley e R. Heymès, Bull. Soc. Chim. Fr. 16, 835 (1949).
- 189 - H. Inaba, Y. Shimizu e Y. Tsuji, Jpn. J. Appl. Phys. 14 23 (1975).
- 190 - G. Gomori, Methods Enzimology 1, 138 (1955).
- 191 - P. K. Glasoe e F. A. Long, J. Phys. Chem. 64, 188 (1960).
- 192 - P. A. Srere, G. N. Kosicki e R. Lumry, Biochim. Biophys. Acta 50, 184 (1961).
- 193 - O. M. M. F. de Oliveira, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 1978.
- 194 - B. B. Stowe e K. Thimann, Arch. Biochem. Biophys. 51, 499 (1954).
- 195 - E. Randerath, C. T. Yu e K. Randerath, Anal. Biochem. 48, 172 (1972).
- 196 - M. W. Nirenberg, Methods Enzymology 6, 17 (1963).
- 197 - J. L. Johnson, K. R. Yamamoto, P. O. Weislogel e J. Horowitz, Biochemistry 8, 1901 (1969).
- 198 - M. Nakano, T. Noguchi, K. Sugioaka, H. Fukuyama, M. Sato, Y. Snimizu, Y. Tsuji e H. Inaba, J. Biol. Chem. 250, 2404 (1975).

- 199 - G.M. Rubin, em "Methods in Cell Biology", (D.M. Prescott, Ed.), Academic Press N. York, pp. 45 (1975).
- 200 - M.A. de Paoli e C.F. Rodrigues, Química Nova 1, 16 (1978).
- 201 - N. Durán, K. Zinner, C.C.C. Vidigal e G. Cilento, Biochem. Biophys. Res. Commun 74, 1146 (1977).
- 202 - P. -S. Song e W. E. Kurtin, J. Am. Chem. Soc. 91, 4892 (1969).
- 203 - B. Kachar, K. Zinner, C.C.C. Vidigal, Y. Shimizu e G. Cilento, Arch. Biochem. Biophys. 195, 245 (1979).
- 204 - M.C. Marcucci e N. Durán, resultados não publicados.
- 205 - H. Nakamura e T. Goto, Photochem. Photobiol. 30, 27 (1979).
- 206 - V.A. Belyakov e R.F. Vassil'ev, Photochem. Photobiol. 11, 179 (1970).
- 207 - L. Goodman e M. Koyanagi, Mol. Photochem. 4, 369 (1972).
- 208 - C.S. Foote, em "Free Radicals in Biology", (W. A. Pryor, Ed.) Academic Press, N. York, vol. II, pp. 85 (1976).
- 209 - B.R. Andersen, T.F. Lint e A.M. Brendzel, Biochim. Biophys. Acta 542, 527 (1978).
- 210 - A. Faljoni, M. Haun, M.E. Hofmann, R. Meneghini, N. Durán e G. Cilento, Biochim. Biophys. Res. Commun 80, 490 (1968).
- 211 - R. Meneghini, M.E. Hofmann, N. Durán, A. Faljoni e G. Cilento, Biochim. Biophys Acta 518, 1977 (1978).
- 212 - T.H. Förster, Comprehensive Biochemistry 22, 61 (1967).
- 213 - M. Kasha, Photochem. Photobiol. 30, 185 (1979).
- 214 - T.W. Bednar, E.M. Linsmaier-Bednar e C.M. King, Biochim. Biophys. Res. Commun. 72, 761 (1976).

- 215 - T.T. Lee, Plant Physiol. 66, 1012 (1930).
- 216 - F.W. McLafferty, em "Interpretacion de Los Espectros de Massas", (W.A. Benjamin, Ed.), Editorial Reverté S.A., (1969).
- 217 - K.E. Wolter e J.C. Gordon, Physiol. Plant. 33, 219 (1975).
- 218 - D.J. Armstrong, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65, 39 (1966).
- 219 - M- Szabo, P.V. Scarpino e C. Rogers, J. Agric. Food Chem. 23, 212 (1975).
- 220 - N. Durán e G. Cilento, Photochem. Photobiol. 32, 113 (1980).
- 221 - T. Wilson e A.P. Schaap, J. Am. Chem. Soc. 93 4126 (1971).
- 222 - H.F.K. Brockmann e H. Nuxfeld, Chem. Ber. 90, 2302 (1957).
- 223 - M. Haun, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, (1979).
- 224 - N. Durán, E.B. Walker e P. -S. Song, Arq. Biol. Technol. 24, 83 (1981).
- 225 - N. Durán e A. Faljoni, Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 287 (1978).
- 226 - J. Cornelisse e E. Havinga, Chem. Rev. 75, 353 (1975).
- 227 - E. J. Land, Photochem. Photobiol. 24, 475 (1976).
- 228 - H.H. Wasserman e B. H. Lipshuts, em "Singlet Oxygen", (H.H. Wasserman e R.H. Murray, Eds.), Academic Press, N. York, pp. 429 (1979).
- 229 - N.J. Mol e G.M.J. Beyersberger Van Hennergouwen, Photochem. Photobiol. 30, 331 (1979).

- 230 - R. Nilsson, P. B. Merkel e D. R. Kearns, Photochem. Photobiol. 16, 117 (1972).
- 231 - D. Keilin e E. F. Hartree, Biochem. J. 39, 293 (1945).
- 232 - L. Beaucamp e I. Fridovich, J. Biol. Chem. 245, 4641 (1970).
- 233 - P. B. Merkel e D. R. Kearns, J. Am. Chem. Soc. 94, 1029 (1972).
- 234 - C. F. Deneke e N. I. Kinsky, J. Am. Chem. Soc. 98, 3041 (1976).
- 235 - A. Zweig e N. A. Henderson, J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 13, 717 (1975).

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O TRABALHO DE TESE

I - SEMINÁRIOS

- 1 - "Formação de Adutos entre Bases de tRNA e Auxinas ou Psoralenos", UNICAMP, 1978.
- 2 - "Ligação Fotolítica e Bioenergética de Indol-3-aldeído ao RNA de Transferência", UNICAMP, 1979.
- 3 - "Métodos para Determinação de Mudanças Conformacionais em Ácidos Nucleicos", UNICAMP, 1979.
- 4 - "Fluorescência de Ácidos Nucleicos usando Têrbio (III) e Európio (III) como Sondas Fluorimétricas", UNICAMP, 1979.
- 5 - "Marcação Isotópica do tRNA após Tratamento com o Sistema 2- ^{14}C -IAA/HRP/ O_2 ", UNICAMP, 1979.
- 6 - "Espectroscopia de Tiouridina, Dependência da Temperatura e Decaimento Cinético na Desativação de Estados Excitados", UNICAMP, 1980.
- 7 - "Estudo Comparativo da Oxidação de Componentes de Ácidos Nucleicos por Radicais Hidroxilas, Oxigênio Single e Radicais Superóxido Anion", UNICAMP, 1980.
- 8 - "Detecção de Estados Excitados em Sistemas Biológicos - Transferência para Biomoléculas", UNICAMP, 1980.
- 9 - "Energia de Amino Peróxidos como Fonte Potencial de Carbonilas em Estado Excitado", UNICAMP, 1980.
- 10 - "Fotorreatividade da Bilirrubina e sua Eliminação por Luz Azul", UNICAMP, 1980.
- 11 - "Alterações Fotoquímicas de Bases Pirimidínicas", UNICAMP, 1980.

- 12 - "Uso da 4-Tiouridina como Sonda para Estudo de Mudanças Conformationais em tRNA", UNICAMP, 1980.
- 13 - "Modificação de tRNA e sua Relação com Crescimento de Plantas Normal e Tumoral", UNICAMP, 1981.

II - PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

- 1 - C.C.C. Vidigal, A. Faljoni, M.P. de Mello e N. Durán, "Modificação Fotoquímica e Fotobioquímica de Ácidos Nucleicos pela Acetona e Indol-3-carboxialdeído", III Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Biofísica, 1978, Ouro Preto, MG, Brasil.
- 2 - M.P. de Mello e N. Durán, "Estudos em Fotobioquímica : Modificação de tRNA pelo Indol-3-Carboxialdeído, VIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, abril de 1979, Caxambu, MG, Brasil.
- 3 - N. Durán, M.P. de Mello, S.M. de Toledo, M. Haun, A. Faljoni e G. Cilento "Fotobioquímica: Estudos Mecanísticos de Transferência de Energia de Compostos Carbonílicos Bioenergizados a tRNA", II Reunião Regional do PAABS - Cono Sur (Associação Panamericana de Sociedades de Bioquímica), outubro 1979, Viña del Mar, Chile.
- 4 - M. Haun, M.P. de Mello, S.M. de Toledo, G. Cilento e N. Durán "Dark Photobinding of Indole-3-Aldehyde to Transfer Ribonucleic Acid", VIII Reunião Anual da American Society for Photobiology, janeiro de 1980, Colorado Springs, USA.
- 5 - M.P. de Mello e N. Durán, "Estudos de Fotobioquímica: Ligação Foto e Bioenergizada de Indol-3-aldeído a RNA de Transferência", IX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, abril 1980, Caxambu, MG, Brasil.
- 6 - M.P. de Mello, S.M. de Toledo e N. Durán, "Ligação Fotolítica de Indol-3-aldeído ao tRNA", II Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Química, novembro 1980, Araraquara, SP, Brasil.

- 7 - M.P. de Mello, S.M. de Toledo e N. Durán, "Estudos em Fotobioquímica: Transferência de Energia e Ligação de Indol-3-aldeído ao tRNA na Presença de Mg^{2+} ", V Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Biofísica, dezembro 1980, São Paulo, SP, Brasil.
- 8 - M.P. de Mello, S.M. de Toledo e N. Durán, "Formação de Fotoaduto de Indol-3-aldeído e Uridina no tRNA: Possível Função Biológica", XIV Congresso Latino Americano de Química, fevereiro 1981, San José, Costa Rica.
- 9 - M.P. de Mello, S.M. de Toledo, H. Aoyama e N. Durán, "Efeitos de Mg^{++} sobre o Fotoaduto de Indol-3-aldeído-tRNA e sua Capacidade de Aminoacilação". X Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, abril 1981, Caxambu, MG, Brasil.
- 10 - M.P. de Mello, S.M. de Toledo e N. Durán, "Efeito Conformational sobre a Ligação e Transferência de Energia entre tRNA e Indol-3-aldeído Eletronicamente Excitado", XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, julho 1981, Salvador, Bahia, Brasil.
- 11 - N. Durán, S.T. Farias-Furtado, M.P. de Mello, L.H. Innocentini, S.M. de Toledo e J.E. Brunet, "Feração de Oxigênio Singlete de Oxidação Aeróbica de Substrato Ativado por Peroxidase", XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, julho 1981, Salvador, Bahia, Brasil.
- 12 - M.P. de Mello, S.M. de Toledo e N. Durán, "Transferência de Energia de Indol-3-aldeído a 4-Tiouridina no tRNA". VII Congresso Internacional de Biofísica e III Congresso Panamericano de Bioquímica, Agosto 1981, Cidade do México, México.
- 13 - M.P. de Mello e N. Durán, "Estudos Espectroscópicos da Interação IAA/HRP/ O_2 /tRNA", III Encontro Regional de Química, outubro 1981, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

- 14 - M.P. de Mello e N. Durán, "Bioenergized Method for Differentiation of $^3(n,\pi)^*$ and $^3(\pi,\pi)^*$ in Energy Transfer Process", VI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Biofísica, dezembro 1981, São Paulo, SP, Brasil.
- 15 - M.P. de Mello e N. Durán, "Mudanças de 4-Tiouridina por oxigênio Singlete Gerado Enzimaticamente", XI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Abril 1982, Caxambu, MG, Brasil.
- 16 - N. Durán e M.P. de Mello, "Transferência de Energia para Hiperacina em Processos Oxidativos Catalisados por Peroxidase", XI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Abril 1982, MG, Brasil.

III - PUBLICAÇÕES

- 1 - N. Durán, M.P. de Mello, S.M. de Toledo, M. Haun, A. Faljoni e G. Cilento, "Fotobioquímica: Estudos Mecanísticos de Transferência de Energia de Compostos Carbonílicos Bioenergizados a tRNA" (resumo), Arch. Biol. Med. Exp. (Chile), 12, 266(1979).
- 2 - M.P. de Mello, S.M. de Toledo, M. Haun, G. Cilento e N. Durán, "Excited Indole-3-aldehyde from the Peroxidase Catalyzed Aerobic Oxidation of Indole-3-Acetic Acid. Reaction with and Energy Transfer to tRNA", Biochemistry, 19, 5270 (1980).
- 3 - M.P. de Mello e N. Durán, "Estudos em Fotobioquímica: Ligação Foto e Bioenergizada de Indol-3-aldeído ao RNA de Transferência" (resumo), Arq. Biol. Tecnol. (Brasil), 23, 166 (1980).
- 4 - M.P. de Mello, S.M. de Toledo e N. Durán, "Efeitos de Ions Mg^{++} sobre o Fotoaduto de Indol-3-aldeído-tRNA e sua Capacidade de Aminoacilação" (resumo), Arq. Biol. Tecnol. (Brasil), 24, 83 (1981).

- 5 - M.P. de Mello, S.M. de Toledo e N. Durán, "Adição Fotolítica de Indol-3-aldeído em Estado Eletronicamente Excitado a Uridina" (resumo), Química Nova, 4, (1), 20 (1981).
- 6 - M.P. de Mello, S.M. de Toledo, H. Aoyama, H.K. Sarckar, G. Cilento e N. Durán, "Peroxidase - Generated Triplet Indol-3-aldehyde Adds to A Uridine Group and Excites the 4-Thiouridine Group in tRNA^{Phe}", Photochem. Photobiol. no prelo.
- 7 - N. Durán, S.T. Farias-Furtado, M.P. de Mello, L.H. Innocentini, S.M. de Toledo, A.Campa e J.E. Brunet, "Singlet Oxygen Generation from Peroxidase Catalysed Aerobic Oxidation of Activated-CH₂-Substrates", Photochem. Photobiol. submetido.
- 8 - M.P. de Mello, S.M. de Toledo e N. Durán, "Photo and Bioenergized Cycloaddition of Indole-3-Aldehyde to Uridine", Acta Sud-Amer. Quim. no prelo.
- 9 - M.P. de Mello, S.M. de Toledo e N. Durán, "Photobiochemical Studies: Energy Transfer and Binding of Indole-3-aldehyde to tRNA in the Presence of Mg²⁺ ions" (resumo) Brazilian J. Med. Biol. Res. 14, 219 (1981).
- 10 - M.P. de Mello, S.M. de Toledo e N. Durán, "Efeito Conformational Sobre Ligação e Transferência de Energia entre tRNA e Indol-3-aldeído Eletronicamente Excitado" (resumo) Ciência Cultura, 33, 785 (1981).
- 11 - N. Durán, S.T. Farias-Furtado, M.P. de Mello, L.H. Innocentini, S.M. de Toledo e J.E. Brunet, "Geração de Oxigênio Singlete em Oxidações Aeróbicas Catalizadas pela Peroxidase" (resumo) Ciência e Cultura, 33, 797 (1981).