

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

APLICAÇÃO DE MÉTODOS FOTOQUÍMICOS E
BIOQUÍMICOS NA DETECÇÃO DO CÂNCER

GASTÃO CRUZ GISLER

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

TESE DE MESTRADO

JUNHO/1982

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Í N D I C E

Pág.

RESUMO

ABSTRACT

ABREVIACÕES E GLOSSÁRIO

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO	1
1.1 - CONCEITOS BÁSICOS	3
1.2 - ÁCIDO FÓLICO: GENERALIDADES	6
1.3 - CATABÓLITOS DE ÁCIDO FÓLICO EM URINA	10
1.4 - QUIMILUMINESCÊNCIA EM SISTEMAS BIOLÓGICOS	21
1.5 - GERAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE DURANTE A OXIDAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO CATALISADA POR PEROXIDASE	27
1.6 - QUIMILUMINESCÊNCIA ESPONTÂNEA DO PLASMA	28
1.7 - QUIMILUMINESCÊNCIA ESPONTÂNEA DA URINA	29
1.8 - OBJETIVOS DA TESE	30

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS	32
2.1 - DROGAS UTILIZADAS E SUA PROCEDÊNCIA	32
2.2 - INSTRUMENTOS UTILIZADOS	33
2.3 - AMOSTRAS	33
2.4 - MÉTODOS	34
2.4.1 - Soluções	34
2.4.1.1 - Solução de ácido fólico (26 mM)	34
2.4.1.2 - Solução de glutatona (0,68M)	34

	Pág.
2.4.1.3 - Solução tampão	34
2.4.1.4 - Solução isotônica de citrato (anticoagulante) (0,11M)	35
2.4.1.5 - Soluções de supressores e evidenciadores de espécies emissoras	35
2.4.2 - Método de extração da enzima de eritrócitos. Áci do fólico oxidase	36
2.4.3 - Teste para avaliar a concentração da enzima ...	38
2.4.4 - Teste de avaliação da atividade da enzima ácido fólico oxidase de eritrócitos	38
2.4.5 - Teste de avaliação da quimiluminescência espon- tânea da urina e plasma	39
2.4.6 - Sistema enzimático	43

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
3.1 - SISTEMA ÁCIDO FÓLICO/ÁCIDO FÓLICO OXIDASE	45
3.1.1 - Atividade da Enzima Ácido Fólico Oxidase obtido pelo método de Extração Empregado por Bragança e Col. (1957) ⁽⁶⁰⁾ usando as duas etapas de ex- tração	45
3.1.2 - Atividade da enzima na primeira etapa da extra- ção	53
3.1.3 - Discussão	60
3.2 - QUIMILUMINESCÊNCIA ESPONTÂNEA DA URINA	63
3.2.1 - Estudo comparativo	63
3.2.2 - Estudo das espécies eletronicamente excitadas na urina	73

3.2.3 - Fracionamento da Urina	77
3.2.4 - Discussão	79
3.3 - OBSERVAÇÕES DA QUIMILUMINESCÊNCIA ESPONTÂNEA DO PLASMA SANGUÍNEO HUMANO	81
3.3.1 - Fracionamento do Plasma	85
3.4 - DISCUSSÃO	85

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES GERAIS	88
SUGESTÕES	94
BIBLIOGRAFIA	95
MEMORIAL	102

R E S U M O

Os recentes desenvolvimentos no campo do estudo de espécies excitadas em sistemas biológicos, sugeriram a possibilidade de empregá-los na pesquisa clínica, no sentido de interpretar situações fisiológicas a nível inframolecular, eletrônico.

Uma enzima extraída de eritrócitos humanos, com propriedades de metabolizar o ácido fólico gerando oxigênio singlete, foi analisada. Sua atividade foi medida, pela emissão de oxigênio singlete, em diversos casos normais e patológicos. Concomitantemente foi estudada a emissão espontânea do plasma e urina, no sentido de verificar a existência de correlação entre esta emissão e a atividade da enzima em certos estados patológicos. Foi estudada a natureza das espécies excitadas que esses fluidos apresentam, mostrou-se que tanto oxigênio singlete como outras espécies ativadas de oxigênio (peróxido radical, $\cdot\text{OH}$, etc) são importantes na quimiluminescência desses fluidos. A alta atividade da ácido fólico oxidase e a baixa quimiluminescência na urina de indivíduos com câncer mostra que nestes estados patológicos eliminam-se concentrações significativas de antioxidantes na urina que produzem uma inibição da oxidação das lipoproteínas. Isto concorda com o efeito inibidor da vitamina C (inibidor de oxidação) na quimiluminescência in vivo da urina de indivíduos normais.

Tanto antecedentes da atividade da ácido fólico oxidase, quimiluminescência inibida na urina e quimiluminescência levemente aumentada no plasma, em câncer, permitem concluir que esta metodologia é relevante na detecção de situações patológicas.

ABSTRACT

Studies on the excited species of biological systems suggested the possibility of using the "photobiochemistry in the dark" to analyse physiological situations in clinical research.

The erythrocyte extracted enzyme, that metabolizes folic acid concomitantly with generation of singlet oxygen was analysed and its activity was calculated by measuring the emission of such species in several samples collected from normal individuals and cancerous patients.

Concomitantly, the spontaneous emission of plasm and urine has been studied to verify the correlation between this phenomena and the enzyme activity in some pathological diseases.

The nature of the excited species, present in urine and plasm have been investigated and it was shown that singlet oxygen and other activated species of oxygen (like $\text{OH}^\bullet$, $\text{O}_2^\bullet$ etc) were important in the chemiluminescence of these fluids.

The high activity of folic acid oxidase and the low chemiluminescence in the urine of cancerous patients suggest that in these pathological diseases a meaningful concentration of antioxidants would be eliminated through the urine. This inhibitory effect is similar to that observed in vivo with the ascorbic acid in the urine chemiluminescence from normal patients.

The activity of folic acid oxidase; the inhibited chemiluminescence in the urine and the slight increase of chemiluminescence in the plasm of cancerous patients, led us to conclude that our methodology is important in detecting pathological diseases as for example cancer.

A todas as pessoas que de alguma
forma se opuseram no meu caminho,
pois possuem a fantástica propriede
dade de me desviarem em direção
ao meu melhor destino.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Nelson Durán que não poupou dedicação, incentivo, orientação e principalmente entusiasmo por este trabalho.

Aos Profs. Hiroshi Aoyama, Marcela Haun e Neuza M. Barbosa, do Departamento de Bioquímica da UNICAMP, que tão gentilmente cederam e facilitaram o uso de seus equipamentos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

Aos meus colegas de equipe, e demais colegas e funcionários da UNICAMP, pelo apoio e colaboração, inclusive com amostras que tão pacientemente forneceram para alguns dos testes aqui apresentados.

Ao Dr. Juan Diaz da Maternidade da Santa Casa que não poupou esforços para fornecer amostras adequadas de pacientes para que este trabalho pudesse ser realizado.

A UFPEL(Universidade Federal de Pelotas) que tornou possível meus estudos de pós-graduação.

Finalmente desejo agradecer o apoio financeiro recebido do Plano Institucional de Capacitação de Docentes do Conselho Nacional de Pesquisa - PICD-CNPq.

ABREVIACÕES E GLOSSÁRIO

GLC	-	Cromatografia líquido-gás
DABCO	-	1,4-diazobiciclo(2,2,2)octano
DPAS	-	9,10-difenilantraceno-2-sulfonato
DBAS	-	9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato
EDTA	-	Ácido etilendiaminotetracético
HPLC	-	Cromatografia líquida de alta pressão
H ₂ O ₂	-	Peróxido de hidrogênio
NADPH	-	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP	-	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
SOD	-	Superóxido dismutase
TLC	-	Cromatografia de camada delgada
Coenzima	-	porção não proteica da enzima
Epiteliofibroblastos	-	Células geratrizes de fibras epiteliais
Mitocôndria	-	organela celular implicada na oxidação biológica
Microsossomos	-	organelas celulares com origem na membrana celular
Hialoplasma	-	líquido celular livre de organelas.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

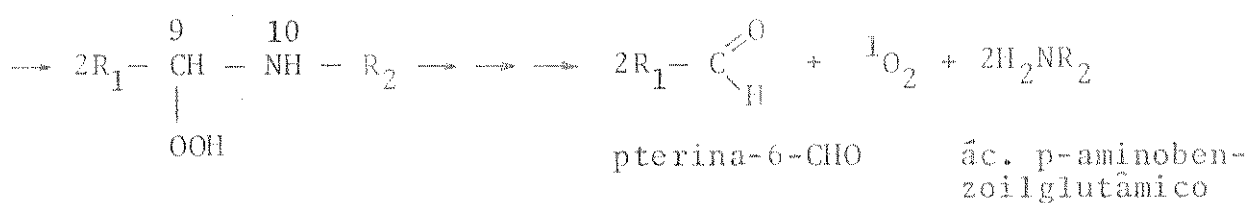
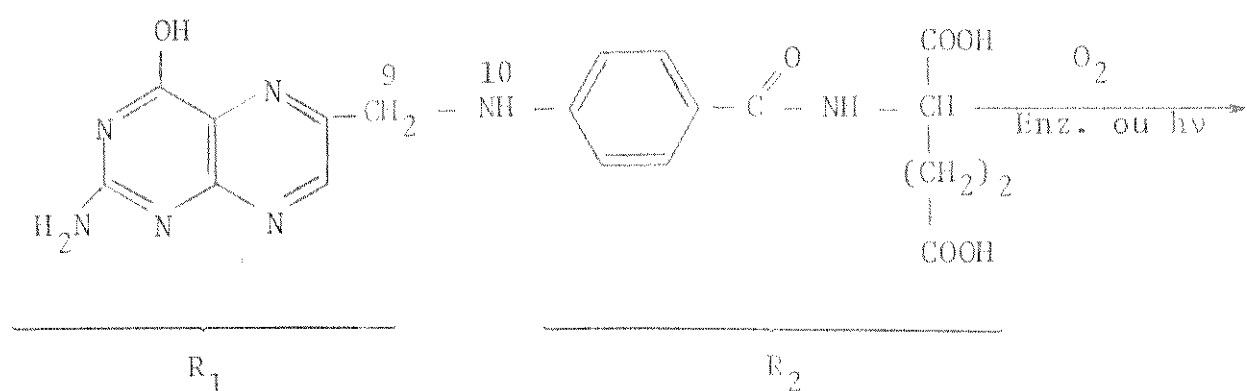
A importância metabólica do ácido fólico é bem conhecida, assim como seu emprego no tratamento de certas anemias⁽¹⁾.

Farber e col. (1947)⁽²⁾, observaram melhora em pacientes com diversos tipos de câncer quando tratados com ácido pteroiltriglutâmico intravenoso, um composto derivado de ácido fólico. Dessa época em diante diversos antagonistas metabólicos de ácido fólico tem sido propostos na quimioterapia do câncer. Vários desses quimioterápicos são inibidores de dihidrofolatorredutase, uma enzima chave na biossíntese de folatos. Esta inibição conduz a um decréscimo na síntese de bases pirimidínicas, purínicas e certos aminoácidos⁽³⁾.

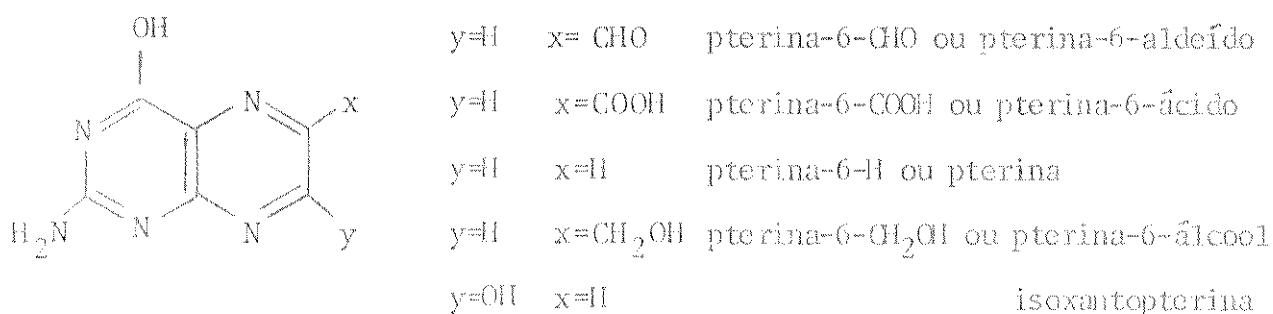
Nos últimos anos, tem surgido grande interesse sobre o estudo dos mecanismos reguladores da biossíntese e utilização dos derivados de ácido fólico⁽³⁾. No entanto, o mecanismo de degradação biológica deste ácido e o destino de seus catabólitos, principalmente em pessoas com câncer, são ainda muito controversos.

A deficiência de folato observada em casos de câncer, pode estar implicada numa maior demanda desse composto no metabolismo das células tumorais, o que pode explicar o sucesso dos antagonistas de ácido fólico, tais como metotrexato (MTX), no tratamento de certos carcinomas⁽¹⁾.

Halpern e col. (1977)⁽⁴⁾, estudando células malignas em cultura, observaram um composto de fluorescência azul identificado inicialmente como pterina-6-CHO, o produto inicial da degradação do ácido fólico e um potente inibidor da xantina-oxidase, uma enzima que se sabe estar menos ativa em casos de câncer⁽⁴⁾. Essa



A



B

Figura 1 - A- Degradação do ácido fólico, pode ocorrer por ação enzimática ou fotolítica formando o ácido p-aminobenzoilglutâmico e pterina-6-aldeído.

B- Os diversos produtos que podem ser formados in vivo da degradação do ácido fólico.

fluorescência azul não foi observada em cultura de tecidos embriônicos ou amnióticos normais. Posteriormente, os mesmos autores usando cromatografia de papel, TLC e GLC-espectrometria de massa identificaram definitivamente o composto como pterina-6-CH₂OH. Observaram também que, quando pterina-6-CHO era adicionado ao meio, sofria redução a pterina-6-CH₂OH, também um potente inibidor da xantina-oxidase⁽⁵⁾ (Fig. 1, pág. 2). Segundo os autores, essa redução se dá por meio de uma enzima redutase NADPH-específica, que apresenta maior atividade em casos de câncer⁽⁶⁾.

Parece haver uma aparente contradição no fato das células cancerosas degradarem um produto tão necessário a enzimas vitais para seu desenvolvimento. Logo, se faz necessário uma análise dos fatos apresentados na literatura de maneira a esclarecer este aparente desvio.

1.1 - CONCEITOS BÁSICOS

Devido a dualidade químico-biológica deste trabalho, se faz necessária uma apresentação dos conceitos envolvidos no seu conteúdo.

A cultura de células, de tecidos organizados in vitro se desenvolveu bastante nas últimas duas décadas⁽⁷⁾. Esta técnica envolve a remoção do tecido, do qual se fará a cultura, e exposição à enzima "tripsina", que digere a matriz intercelular. As células podem, então ser coletadas por centrifugação e colocadas em recipientes de vidro ou plástico com o meio de cultura apropriado e incubadas a 37°C. Células de epitélio-fibroblastos e pulmão, quando tratadas dessa forma, aderem rapidamente ao recipiente e cres-

cem, vegetativamente, de maneira abundante após 24 a 28 horas, cobrindo toda a superfície do recipiente em poucos dias. Essa cultura denomina-se primária, e o estágio é chamado de confluência. O período entre a fixação das células na cultura até a primeira confluência é chamado de fase I.

Para que as células continuem a se dividir de forma semelhante à fase I, é necessário trocar o meio de cultura, digerir com tripsina a nova matriz intercelular e transportar as células para dois novos recipientes. Este processo é chamado de sub-cultura 2:1, pois as células, nas sub-culturas irão dobrar em número. Este crescimento pode progredir por sucessivas passagens para novas culturas. As sub-culturas, em processo de crescimento, são chamadas de fase II. Dependendo, porém, do tipo de células, após um certo número de passagens estas perdem a capacidade de se dividir, entram então na fase III, envelhecem e morrem (Fig. 2), pág. 5.

Células de câncer permanecem na fase II, se dividem indefinidamente e são comparativamente imortais⁽⁸⁾. Organismos unicelulares in vitro, podem sofrer envelhecimento e morte sob dieta limitada, o que não ocorre em condições naturais⁽⁹⁾.

A fase III parece ocorrer sempre, após um certo número exato de divisões celulares, número esse que é característico do tipo de tecido, e proporcional à longevidade da espécie do animal doador⁽¹⁰⁾.

Quando as células atingem a fase III, muitas enzimas tem sua atividade modificada⁽¹⁰⁾. Se destaca neste quadro a perda de atividade de enzimas responsáveis pela síntese do DNA.

O que ocorre no ser vivo, altamente organizado, pode não ser exatamente o que se observa in vitro, porém o fundamento da quimioterapia com antagonistas de ácido fólico se sustenta no bloqueio da síntese do DNA, a fim de induzir a inibição de cresci

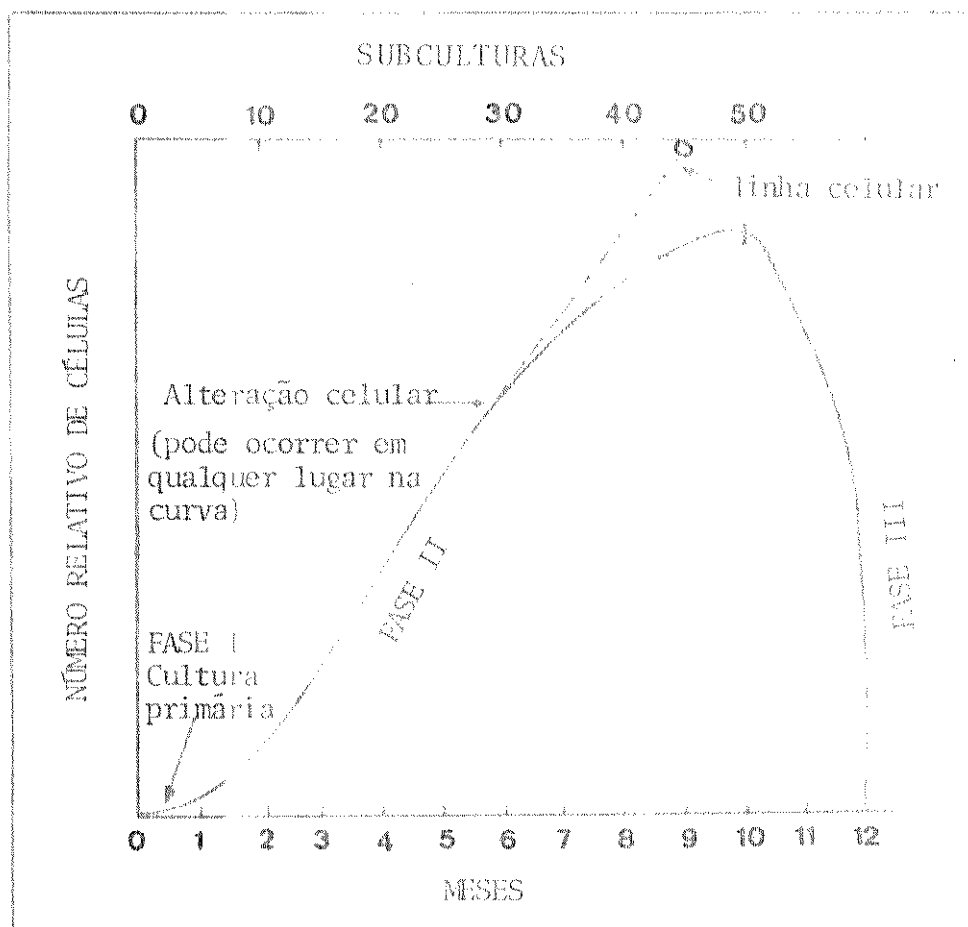


Figura 2 - Representação gráfica do cultivo de células *in vitro*, a linha pontilhada mostra a alteração, na qual, as células se multiplicam infinitamente.

A fase I termina com a primeira confluência.

A fase II se caracteriza por um crescimento vegetativo intenso. Alterações genéticas podem ocorrer nesta fase, provocando um crescimento potencialmente infinito. (câncer).

A fase III caracteriza-se por uma perda da capacidade de multiplicação num período finito de tempo⁽⁷⁾.

cimento das células tumorais⁽¹¹⁾. O tumor é constituído, geralmente, de uma superfície de células ativas (tipo fase II), e uma parte interna inativa quanto à divisão celular. A quimioterapia ataca as células ativas da superfície, que ao serem removidas, são substituídas por células mais internas, que se ativam, e o tratamento deverá continuar, se for necessário⁽¹¹⁾. Em virtude disso, torna-se muito importante o diagnóstico precoce do câncer, para evitar um tratamento prolongado com drogas que podem também prejudicar células normais.

Mostrou-se acima algumas diferenças metabólicas entre células normais e de câncer que evidenciam a importância de se encontrar, em cultura de tecidos, catabólitos que diferenciam células normais e cancerosas e que possam ser observadas in vivo.

Nos estudos de Halpern e col.⁽⁴⁾ citados anteriormente, foram encontrados catabólitos de ácido fólico em cultura de células, os quais se constituem em dados fisiológicos de grande importância. Clynes e col. (1980)⁽¹²⁾ discordam de que esses catabólitos sejam característicos de células malignas, pois eles os observaram também em cultura de células normais.

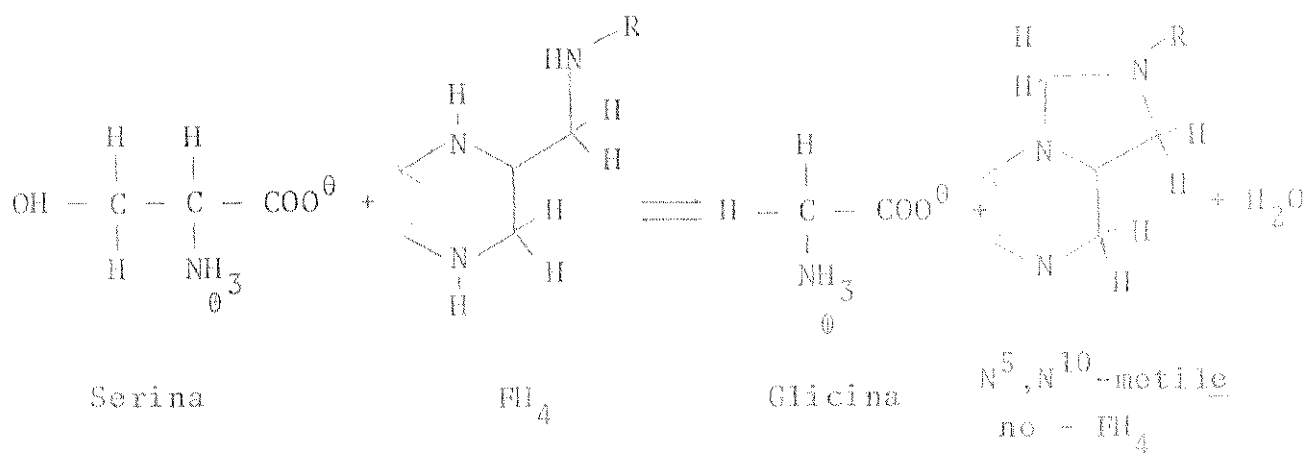
Se o ácido fólico é efetivamente degradado pelas células cancerosas⁽⁴⁾ e seus catabólitos são encontrados ou não nos fluidos biológicos, isto poderá ter um profundo significado fisiológico.

1.2 - ÁCIDO FÓLICO: GENERALIDADES

O ácido fólico ou ácido pteroilglutâmico é uma vitamina hidrossolúvel. Os folatos compreendem uma pterina,

um ácido p-amino-benzóico e um ácido glutâmico⁽¹³⁾ (Fig. 3, pág. 8). Suas porções poliglutâmicas são hidrossolúveis dentro do organismo, nas formas simples de mono e diglutamatos, graças a duas enzimas denominadas conjugases. Os folatos existem no organismo, sob a forma de coenzimas e cada uma delas participam de reações enzimáticas específicas⁽¹⁴⁾.

As reações metabólicas, dentro das quais os folatos ocupam um papel importante, compreendem: a formação de bases purínicas e pirimidínicas, a interconversão de serina em glicina (reação 1), a degradação da histidina em ácido glutâmico e a conversão da homocisteína em metionina. Esta última ocorre devido ao metiltetrahydrofolato, à vitamina B₁₂ e a uma enzima (homocisteína transferase). A formação da metionina é de grande importância no sistema nervoso central, sendo o principal agente das metilações do organismo, principalmente a da colina e a da adrenalina. Enfim, a principal reação metabólica é a conversão de uracil em timina, um processo que se destaca dentro da formação de DNA⁽¹⁴⁾.



Reação 1

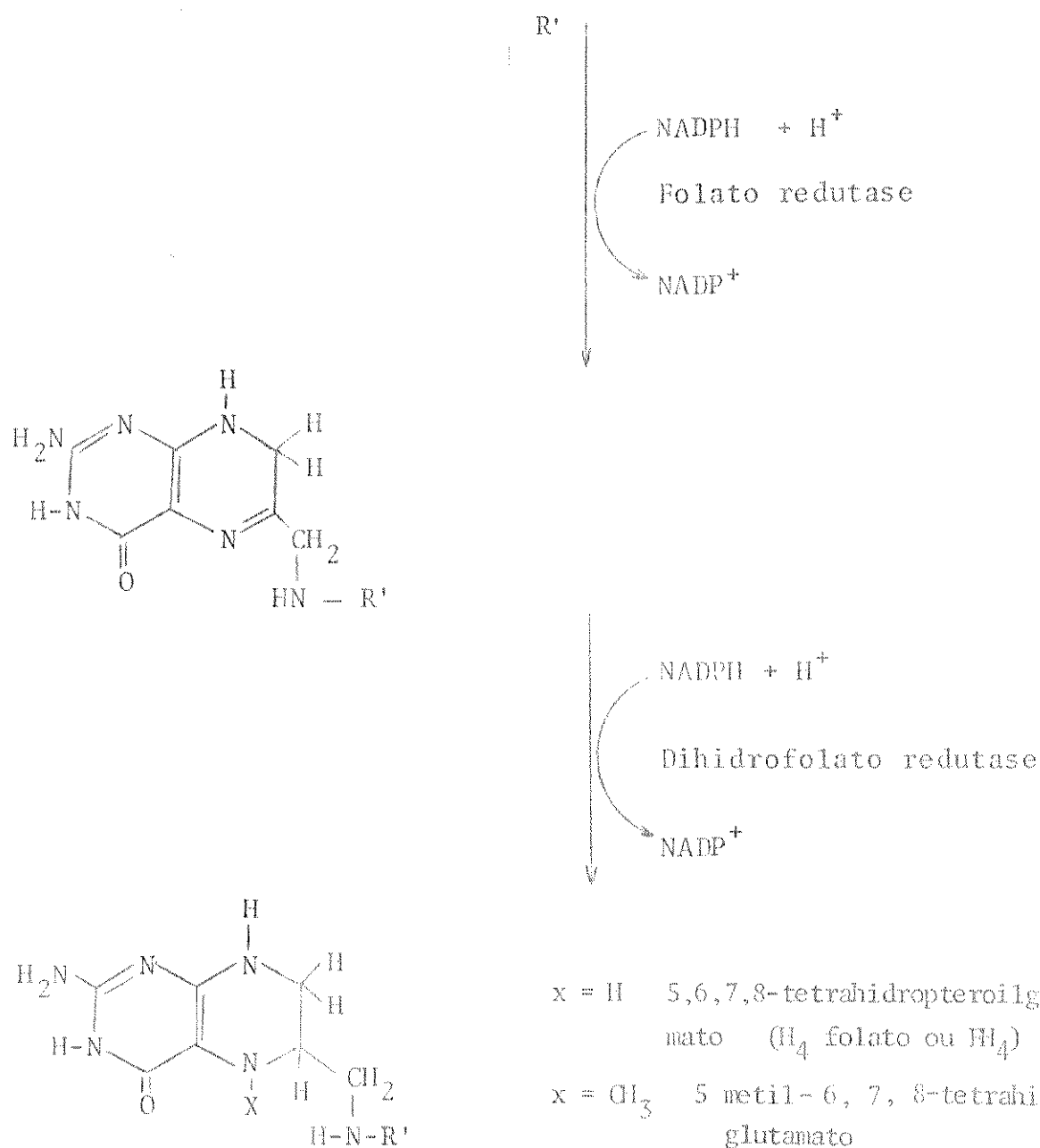
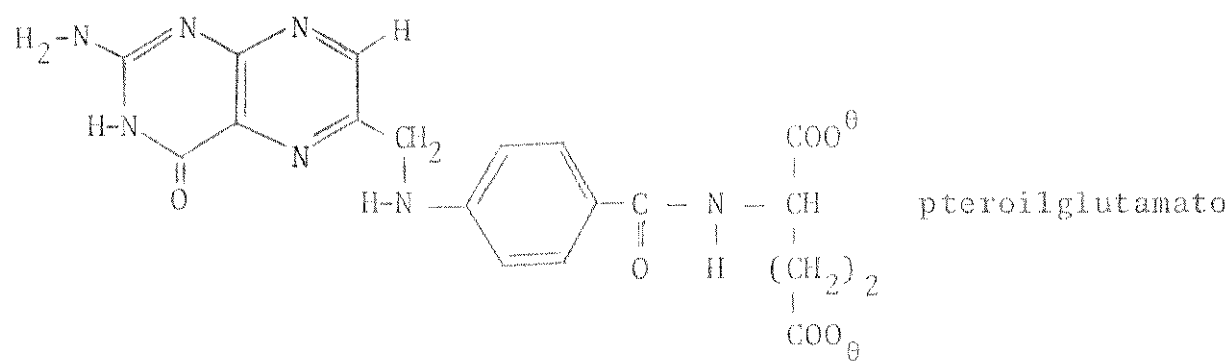


Figura 3 - Fórmula estrutural do folato, e principais derivados.

Os folatos são encontrados nos vegetais de folhas verdes (espinafre, brócole, aspargo, etc), em frutas (laranjas, abacates, abacaxis, etc), no fígado e nas leveduras. Existem nas plantas alguns derivados de ácido fólico, pteroilglutamatos, os quais não participam de reações enzimáticas dentro das células dos mamíferos e nem atravessam as membranas celulares. A forma monoglutamato é encontrada no soro sanguíneo e na urina. A forma ativa principal da coenzima que é encontrada dentro dos tecidos e no sangue do homem é o 5-metiltetrahydrofolato (Fig. 3, pág. 8) o qual é requerido para uma grande variedade de transferência de um carbono⁽¹⁴⁾.

Dentro do importante papel que o ácido fólico exerce no crescimento e na divisão celular, está sua participação na síntese do DNA, através das unidades purínicas, e pirimidínicas. Não é surpreendente constatar que uma interferência na divisão celular seja um dos primeiros sinais que acompanham a deficiência em ácido fólico. A administração de uma dieta deficiente em folato conduz a uma anemia macrocitária (abaixamento do teor normal de hemoglobina no sangue) e a leucopenia (diminuição dos glóbulos brancos no sangue), com aparecimento de megaloblastos⁽¹⁴⁾.

A absorção dos folatos, sob a forma de pteroilglutamatos, ocorre na primeira etapa do intestino grosso, onde se dá o mecanismo de desconjugação. Este processo permite o desligamento de resíduos glutâmicos ligados à parte benzóica da molécula, para dar origem aos compostos tipo mono, di e tri-glutamato, sendo a enzima γ glutamyl-carboxi-peptidase a responsável por esse evento. Os folatos poliglutamatos atravessam a parede intestinal e, em seguida são reduzidos e metilados no fígado. Uma parte substancial dos folatos monoglutamatos são reduzidos e metilados no interior das células intestinais e aparecem dentro da circulação sanguínea

sob a forma coenzimática ativa: 5-metiltetrahydrofolato⁽¹⁴⁾.

A quantidade mínima de ácido fólico necessária ao organismo não foi determinada com precisão, no entanto, é recomendável uma ingestão diária de 400 µg de folato livre para adultos, 50 µg para bebês, 100 a 300 µg para crianças, 800 µg durante a gestação e 600 µg durante a lactação⁽¹⁴⁾.

Quando um homem normal recebe uma dose de 1 µg/kg de ácido fólico marcado com trítio, 60% é retirado da circulação sanguínea em fração de segundos, em três minutos 95% desaparece, sugerindo que há uma grande afinidade dos tecidos para quantidades fisiológicas administradas. Menos de 2% de ácido fólico é excretado na urina em 3 horas. No entanto, para doses superiores ao padrão fisiológico, é possível detectar 60% dentro de um período de 12 horas, pois nesse caso já foi atingida a saturação⁽¹⁵⁾ no organismo.

Apesar de muitos estudos realizados nesta linha, não se sabe com certeza se o ácido fólico é degradado enzimaticamente no homem normal, embora se acredite que isto possa ocorrer de algum modo. Uma vez que a desconjugação oxidativa não enzimática de folato reduzido ocorra in vitro, produzindo pterina e ácido p-amino-benzoilglutâmico⁽¹⁵⁾, a degradação do folato evidenciada na urina normal pode resultar, provavelmente, de uma reação análoga in situ.

Analisaremos a seguir trabalhos recentes sobre pterinas encontradas na urina.

1.3 - CATABÓLITOS DE ÁCIDO FÓLICO EM URINA

Sob dieta normal, o ácido fólico, em pessoas normais, aparentemente, não sofre degradação ativa (enzimática), pois a ta

xa de 10 mg desse composto para uma pessoa de 70 kg é mantida pela ingestão diária de apenas 50 µg de folato. O ácido fólico degradado nessas condições deve ser atribuído à fotodecomposição e oxidação do modo como observada por Lowry e col. (1949)⁽¹⁵⁾ concluindo que a clivagem acontecia na posição C⁹-N¹⁰ (Fig. 1-A, pag. 2) formando primeiramente uma amina, o ácido p-aminobenzilglutâmico e pterina-6-CHO. Irradiações posteriores convertem o aldeído a pterina-6-COOH e finalmente a pterina-6-H (Fig. 1-E, pag. 2). A pterina-6-H é susceptível à oxidação enzimática a isoxantopterina pela xantina-oxidase, uma enzima existente nos tecidos. Esses derivados pterínicos são fluorescentes e o primeiro deles (Pterina-6-CHO) é um potente inibidor da xantina-oxidase (em quantidades inferiores a 2×10^{-4} µg/ml).

Pessoas normais quando submetidas a dieta rica em ácido fólico, apresentam pterina-6-aldeído e pterina-6-COOH na urina o que poderia demonstrar a existência de um sistema enzimático ativo na degradação de ácido fólico⁽¹⁶⁾.

Stea e col. (1979)⁽¹⁷⁾ descreveram um método extremamente sensível em HPLC para separação e quantificação de pterinas em fluidos biológicos. Os mesmos autores⁽¹⁸⁾ separaram e quantificaram por esse método, na urina de pessoas normais, sete pterinas cujos resultados são mostrados na tabela 1 (pag. 12)(Fig. 4 e 5 pág. 13 e 14). Nota-se não ter sido detectado pterina-6-CHO, o primeiro produto de degradação do ácido fólico, apesar de que, quando o mesmo método foi empregado na separação de pterinas do plasma, pequena quantidade desse metabólito tenha sido detectada. Porém, não foi quantificado nesse fluido os teores de pterinas. Aparentemente, a quantidade de pterina-6-CH₂OH também é maior no plasma. Os autores reconhecem que pode tratar-se de outros compostos fluorescentes com mesmo tempo de retenção (Fig. 5, pág. 15).

TABELA 1

Excreção diária de Pterinas na urina em indivíduos normais
num período de 10 dias

Amostra contendo 2 mg de Creatinina
Método descrito por Stea e col. (1980)⁽¹⁸⁾
As frações separadas por HPLC e os resultados expres-
sos em picomoles/mg de creatinina

Dias	Neopterina*	Biopterina	Pt-6-CH ₂ OH	Pterina	Xanto- pterina	Isoxan- topterina	Pt-6-COOH
1	5592	6558	264	969	6110	ND**	408
2	6370	11448	292	1156	9073	831	372
3	5963	7414	461	855	9258	719	520
4	4848	9424	177	994	5830	ND	349
5	6370	8241	306	1312	6234	744	563
6	6630	9655	373	1139	6025	837	596
7	5852	11138	293	1290	5376	575	562
8	8444	9828	458	1461	6357	462	612
9	5222	9690	299	1225	5796	494	510
10	4888	7448	269	956	5555	425	341

* Neopterina representa a soma dos isômeros D-eritro e L-treo

**ND = não determinado

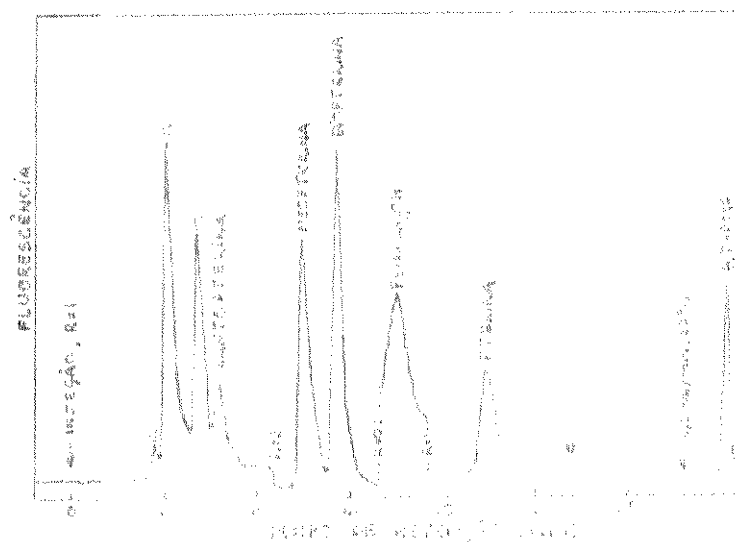


Figura 4 - Eluição de pterinas de uma amostra de urina de indivíduo sã. A amostra contendo 2 mg de creatinina foi oxidada e purificada de acordo com método descrito pelos autores. Foi cromatografada a fração ácido acético (100 µl) por HPLC em partesil SCX com fase estacionária e 1 mM de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ pH 2,8 - 7% de metanol - 5% de acetonitrila com solvente (fase móvel). Foi usado 6,5 DMP como padrão interno.
Condições: vazão 1 ml/min a 20°C nos primeiros 32 min.
vazão 2,5 ml/min a 55°C após os 32 min.

Pterina-6-COOH e isoxantopterina foram separadas em frações diferentes e cromatografadas à parte.

Detector: Farrand-A4 fluoremeter (Farrand Optical, Valhalla, N.Y. USA).

OBS.: Isoxantopterina e pterina-6-COOH são separadas em frações diferentes no método de purificação e, portanto não estão contidas nesse cromatograma. Deixamos de apresentar os cromatogramas desses dois compostos por ser irrelevante nessa apresentação.

Obtido de Stea e col. (1980)⁽¹⁸⁾.

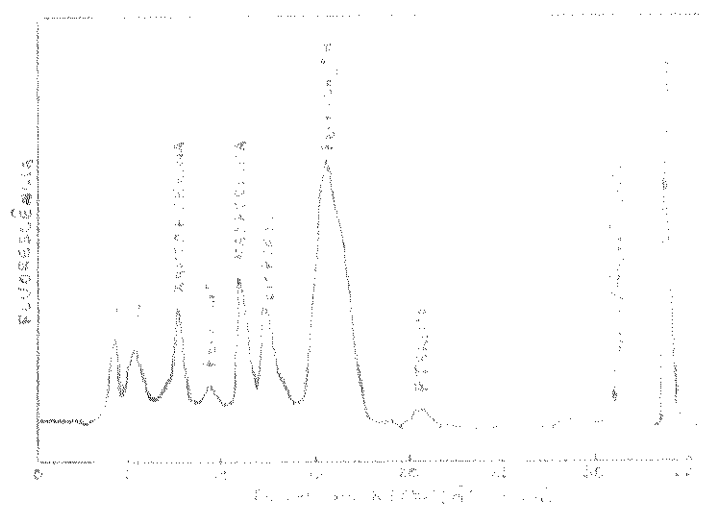


Figura 5 - Eluição de pterinas do plasma de pessoa saudável (60 anos). O plasma foi separado por centrifugação e tratado da mesma forma que a urina. HPLC mesmo procedimento que da urina. Stea e col. (1980)⁽¹⁸⁾.

Saleh e col. (1980)⁽¹⁹⁾ forneceram a indivíduos normais e cancerosos uma dieta com $[2-^{14}\text{C}]$ e $[3',5',7,9-^3\text{H}]$ pteroilglutamato, colheram fezes e urina para análise e observação do metabolismo desses compostos obtendo os seguintes resultados (Tab. 2) (pág. 16): pacientes com câncer absorviam ácido fólico em maior quantidade e a recuperação na urina, do composto intacto, era menor e inversamente proporcional ao tamanho do tumor; o aparecimento de p-acetamidobenzoilglutamato, na urina, era inicialmente elevado e decrescia com o tempo, enquanto p-acetamidobenzoato, ausente no início, ia aumentando com o tempo e aparecia primeiro na urina dos cancerosos; os casos de câncer em geral, mostraram menor taxa de recuperação de ^{14}C e ^3H independente do tamanho da dose. Concluiu-se que a administração oral de ácido fólico era incorporado na forma de folato monoglutamato e excretado após a cisão em $\text{C}^9\text{-N}^{10}$ (11,19). A doença maligna, aparentemente, aumenta a demanda de folato com um metabolismo maior na direção do 5-metiltetrahydropterilglutamato e, por sua vez, apresenta catabólitos de ácido fólico mais tardiamente.

Stea e col. (1980)⁽¹⁶⁾ continuando seus estudos em urina com HPLC compararam urina de pacientes normais e cancerosos relacionando as pterinas excretadas (Tabela 3) (pág. 17) (Fig. 6) (pág. 18). As diferenças, entre o grupo normal e canceroso, mais significativas foram xantopterina e neopterina, compostos que não derivam da decomposição de ácido fólico⁽¹⁵⁾. Pterina-6-H, pterina-6- CH_2OH e pterina-6- COOH são encontradas em taxas mais elevadas, porém, apenas o primeiro (pterina-6-H) é estatisticamente significativo. A isoxantopterina, produto de oxidação de pterina-6-H pela xantina-oxidase, está diminuída em relação às pessoas normais, o que concorda com a menor atividade dessa enzima nos casos de câncer.

TABELA 2

Metabólitos presentes em urina coletada entre 0-24 hs após a administração de $|2-^{14}\text{C}|-$ e $|3^1,5^1,7^1,9-^3\text{H}|-$ Pte Glu^a.

Paciente	Dose (mg de PteGlu)	Dose recuperada na urina em 24 hs		PteGlu		5-Me-H ₄ -PteGlu		p-AcBG ^{*b}	p-AcBA ^{*b}	
		³ H	¹⁴ C	³ H	¹⁴ C	³ H	¹⁴ C	³ H	³ H	
C.C.	5.0	39.2	31.8	26.3	20.2	5.0	4.2	6.0	-	N ^c
F.R.	5.0	37.3	33.7	26.2	23.2	3.3	3.3	n.d.	n.d.	N
S.R.	5.0	33.3	29.2	22.1	20.0	5.7	5.5	3.2	0.9	N
E.W.	5.0	26.0	18.8	18.2	14.1	3.6	2.7	2.2	1.4	N
N.C.	5.0	30.0	24.3	18.6	17.0	3.8	3.7	0.9	0.09	C
B.B.	5.0	22.3	18.3	11.6	9.6	5.5	6.0	3.8	-	C
K.M.	5.0	21.7	18.0	14.1	12.8	2.0	2.1	2.6	0.3	C
H.P.	5.0	19.2	16.8	13.5	12.2	2.2	1.9	1.0	0.3	C
J.H.	5.0	4.7	2.8	0.1	0.1	0.2	0.2	1.7	2.2	C
D.M.	5.0	2.4	2.3	0.7	0.6	1.4	1.3	-	-	C
E.D.	1.0	5.3	3.5	1.7	1.4	0.7	0.5	1.1	0.2	N
A.L.	1.0	2.5	1.7	0.05	0.05	0.1	0.1	0.3	0.75	C
J.H.	0.5	3.4	2.3	0.6	0.5	0.8	0.7	0.8	0.01	N
S.F.	0.5	3.1	2.1	0.3	0.3	0.7	0.6	0.7	0.03	C

a) Os resultados estão expressos em percentagem da dose de cada metabólito.

b) pAcBG: p-acetamidobenzoil-L-glutamato

pAcBA: p-acetamidobenzoato

5-Me-H₄-PteGlu: 5-metiltetrahydropteróilglutamato

n.d.: não determinado

Obtido de Saleh e col. (1980)⁽¹⁹⁾

c) N=Normal C=Câncer

TABELA 3

Excreção urinária de pterinas em pessoas saudáveis e pacientes de câncer

	Pessoas saudáveis (nmol/mg de creatinina)	Pacientes de câncer (nmol/mg de creatinina)	Níveis de significância
Xantopterina	6.89 (+0.43)	14.57 (+2.01)	^a p<0.001
Isoxantopterina	1.06 (+0.22)	0.62 (+0.043)	p<0.02
Neopterina	7.02 (+0.30)	12.92 (+1.22)	p<0.001
Biopterina	10.37 (+0.48)	11.86 (+0.84)	NS ^b
Pterin	1.09 (+0.066)	1.49 (+0.20)	p<0.05
Pt-6-CH ₂ OH	0.41 (+0.07)	0.50 (+0.065)	NS
Pt-6-COOH	0.24 (+0.03)	0.27 (+0.045)	NS

Obtido de Stea e col. (1981)⁽¹⁶⁾.

a) p = desvio padrão

b) NS = não significativo

Os pacientes estudados nesse trabalho em sua maioria, estavam sob quimioterapia intensiva ou eram casos remissivos, não eram portanto, apropriados para que fossem considerados casos fisiologicamente típicos, pois a medicação pode mascarar completamente o quadro.

A ausência de pterina-6-CHO na urina de pessoas normais e a pequena quantidade presente em cancerosos (não significativo estatisticamente) pode ser atribuída à oxidação a pterina-6-COOH ou redução a pterina-6-CH₂OH. Stea e col. (1979)⁽⁵⁾ com um último informe demonstraram ter isolado de cultura de tecidos uma redutase NADPH-específica, que converte pterina-6-CHO a pterina-6-CH₂OH e que a atividade dessa enzima é 2,5 vezes maior em cultura de células cancerosas. Essa enzima poderia ser responsável pela ausência ou quase ausência de pterina-6-CHO na urina, nos casos de câncer.

Na bibliografia consultada, foram observados outros estudos sobre a análise de pterinas em urina, comparando indivíduos normais e cancerosos, porém esses autores⁽²⁰⁻²²⁾ empregaram métodos menos sensíveis e menos resolutivos que Stea e col. (1981)⁽¹⁶⁾.

O maior metabolismo de ácido fólico nos casos de câncer⁽¹⁵⁾, aliado à evidência de maior degradação pela célula sem o correspondente aumento dos catabólitos na urina⁽¹⁶⁾, mas de aumento de outras pterinas não derivadas de ácido fólico⁽¹⁶⁾, pode estar implicado em algum sistema complexo ainda não elucidado. Provavelmente, o ácido fólico, além de ser cofator de certas enzimas, pode ser clivado enzimaticamente⁽²³⁾ (pela ácido fólico oxidase), nos casos de câncer, na posição C⁹-N¹⁰ formar pterina-6-CHO^(11-13,16), que por ação da redutase NADPH-específica⁽⁵⁾ ser reduzido a forma de pterina-6-CH₂OH, que por sua vez pode ser cofator necessário às células cancerosas, ou induzir por competição in vivo a excreção maior de xantopterina e neopterina, porém care

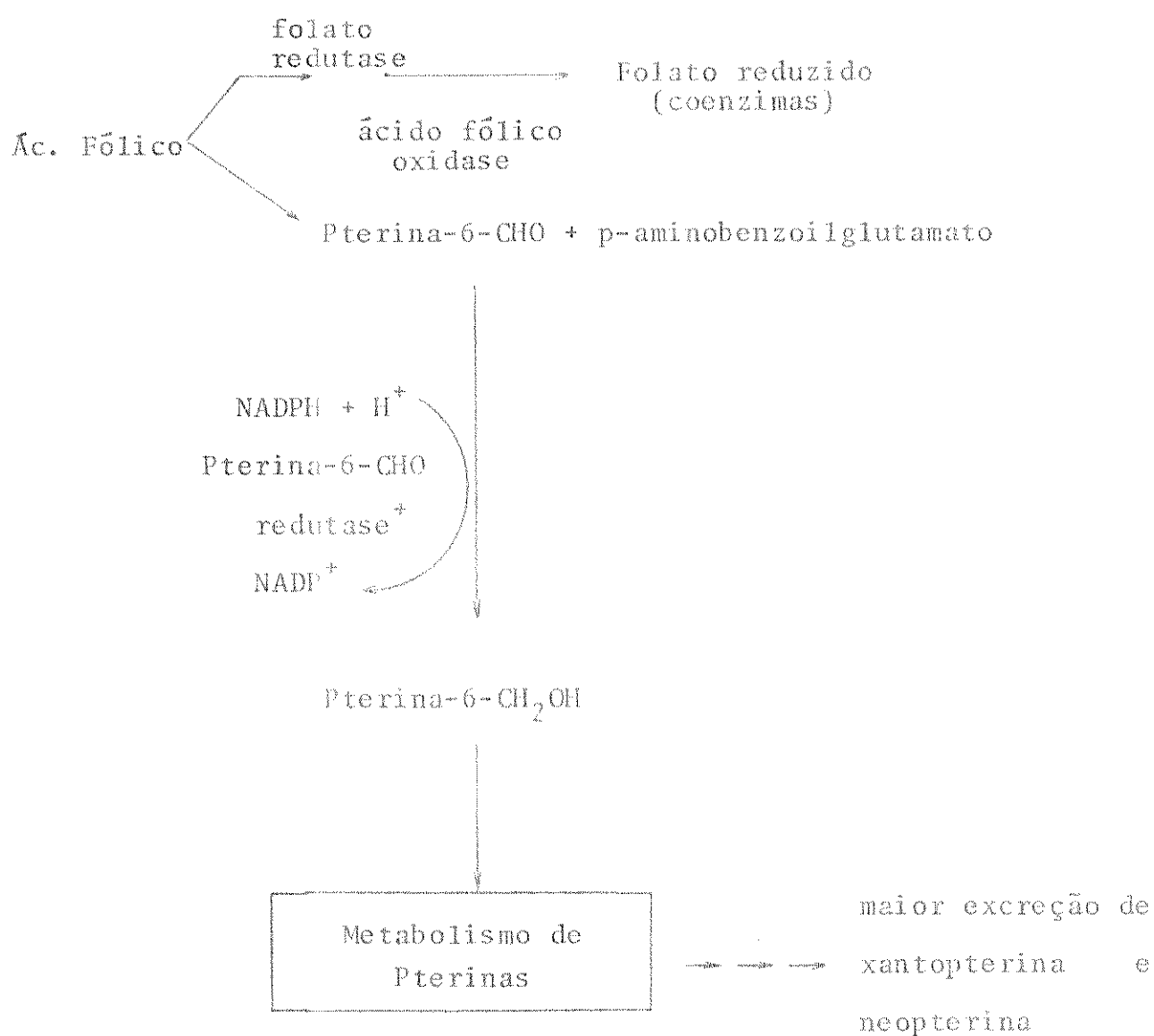


Figura 7 - Metabolismo provável das pterinas derivadas do folato, em certos tipos de câncer.

ce mos de dados recentes a respeito (Fig. 7, pág. 20).

Estudos mais recentes mostraram que, a degradação enzimática do ácido fólico in vitro, além de produzir pterina-6-CHO e o ácido p-aminobenzoilglutâmico, gera concomitantemente moléculas eletronicamente excitadas⁽¹³⁾.

Isso mostrou uma possibilidade interessante de estudar a degradação do ácido fólico in vitro, pela enzima ácido fólico oxidase extraída de eritrócitos, por técnicas quimiluminescentes⁽¹³⁾.

A seguir serão dados alguns conceitos básicos de aplicação das técnicas de quimiluminescência a sistemas biológicos.

1.4 - QUIMILUMINESCÊNCIA EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

O interesse demonstrado na atualidade pelo estudo da quimiluminescência se deve à necessidade geral da moderna biofísica de estudar os fenômenos, não apenas a nível molecular, mas também a nível submolecular, eletrônico⁽²⁴⁾. O desenvolvimento de novos métodos e equipamentos tornou possível, por medidas de quimiluminescência, o esclarecimento da probabilidade de transições eletrônicas em moléculas e dos processos de transferência de energia entre elas; a presença de quimiluminescência indica que durante o curso da reação em questão, moléculas excitadas são formadas; e seus espectros e cinética de emissão tornam possível esclarecer o rol de estados excitados no processo ou em reações secundárias que a acompanham.

Assim, a quimiluminescência pode ser considerada um dos métodos de estudo da energética em reações bioquímicas⁽²⁵⁾.

Há três problemas básicos no estudo da quimiluminescência:

- I- A origem da energia na reação quimiluminescente.
- II- O processo intramolecular que conduz ao estado excitado.
- III- Qual a espécie que emite os fótons?

I- Em homogenado de tecidos pode se definir quatro fases no desenvolvimento da quimiluminescência as quais são causadas por uma sucessão de quatro etapas de reação⁽²⁴⁾: (Fig. 8, pág. 23).

Fase 1: Período de latência, causado provavelmente pela eluição das substâncias das células ou de seus fragmentos. A quimiluminescência nessa fase é pouca ou nula, dependendo da amostra.

Fase 2: Há uma intensificação gradual da quimiluminescência, a qual aparentemente indica o acúmulo de produto oxidado.



Na ausência de oxigênio, quando então se torna impossível a formação de produtos oxidados, o aumento de quimiluminescência não é observado, embora a primeira fase (eluição) tenha ocorrido. Quando a eluição é feita em condições anaeróbicas, a posterior passagem de oxigênio produz uma forte quimiluminescência sem período de latência. Pode-se deduzir que na primeira fase não apenas a eluição ocorra, mas também reações prévias que criam as condições para a oxidação do composto X pelo oxigênio molecular.

Fase 3: A quimiluminescência atinge um máximo, e após um certo tempo declina. A causa da quimiluminescência pode ser o

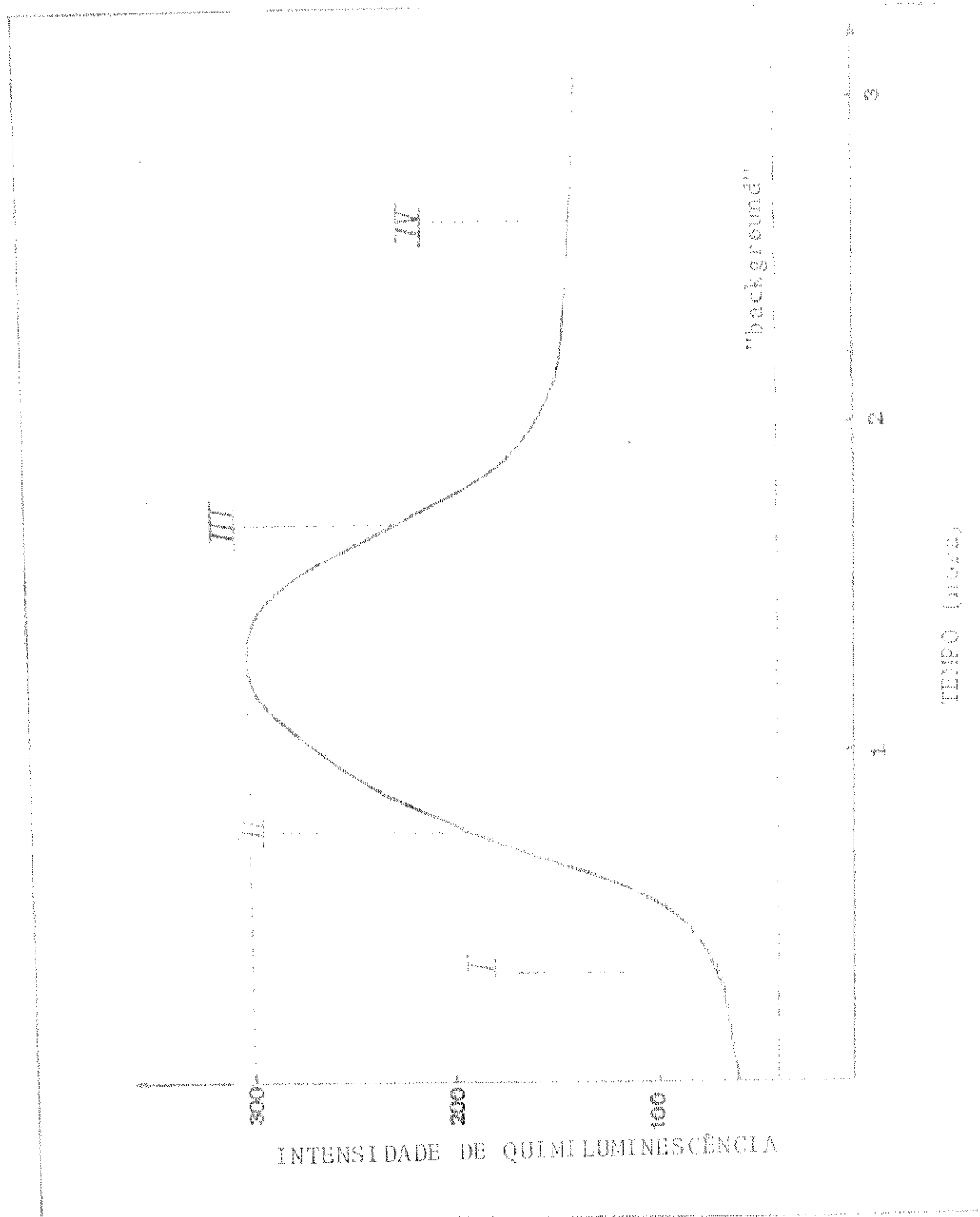


Figura 8 - As quatro fases do desenvolvimento da quimiluminescência ultra fraca em homogenados (1965)⁽²⁶⁾.

Fase 1: eluição.

Fase 2: acúmulo de produto oxidado (XO_2)

Fase 3: Consumo de produto oxidado provocando a quimiluminescência.

Fase 4: quimiluminescência residual.

consumo de "produto oxidado" como resultado de uma reação química a qual pode ser acompanhada por quimiluminescência.



Fase 4: É a da quimiluminescência residual, o decaimento diminui e atinge um platô causado por processos menos específicos do substrato. Esta fase costuma ser atingida 2 a 3 horas após a incubação a 37°C - 39°C.

O aumento de temperatura acelera o desenvolvimento de todas as fases, sem mudar essencialmente a quantidade total de luz emitida (não aumenta a eficiência quântica) nas fases de intensificação e declínio de quimiluminescência. Conclui-se portanto, que a quantidade de composto X, cuja transformação causou a quimiluminescência, é limitada. Quanto mais intensa a quimiluminescência, será menos persistente.

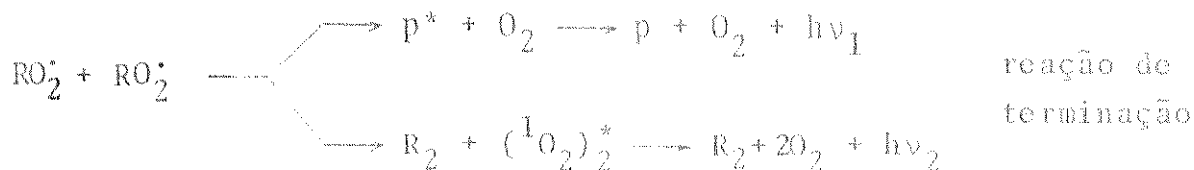
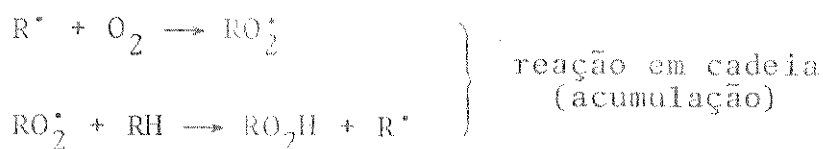
Vladimirov (1965)⁽²⁶⁾ estudando a dependência da temperatura sobre a segunda fase, e de acumulação de produto oxidado, o qual é sem dúvida o estágio básico de acúmulo de energia, determinou a energia de ativação medindo a curva de quimiluminescência em homogenados de fígado de rato a 37°C, 39°C e 41°C. Traçando tangentes à curva sobre o eixo dos x, pode-se calcular a razão de acúmulo do produto XO₂ a uma temperatura escolhida. Empregando a equação de Arrhenius $[K' = A \exp(\frac{-E_a}{RT})]$ pode-se calcular a energia de ativação na fase 2. Vladimirov (1966)⁽²⁷⁾ empregando esse método obteve uma energia de 57,6 Kcal/mol para a faixa de temperatura de 37°C a 39°C, e de 55,2 Kcal/mol para a faixa de 39°C a 41°C. Pode-se ver que a energia de ativação é consideravelmente mais alta do que a comum em processos biológicos (20 - 30 Kcal/mol)⁽²⁶⁾. Conclui-se que o caminho da reação apresenta uma alta barreira energética; a

molécula adquire uma grande reserva de energia para transpô-la e, posteriormente a libera na forma de fótons (quimiluminescência), daí a quimiluminescência em sistemas biológicos.

II - A quimiluminescência pode ser observada em quatro frações de centrifugado de células⁽²⁷⁾, a mais intensa por unidade de peso na mitocôndria e microssomos e a mais fraca em hialoplasma e núcleo.

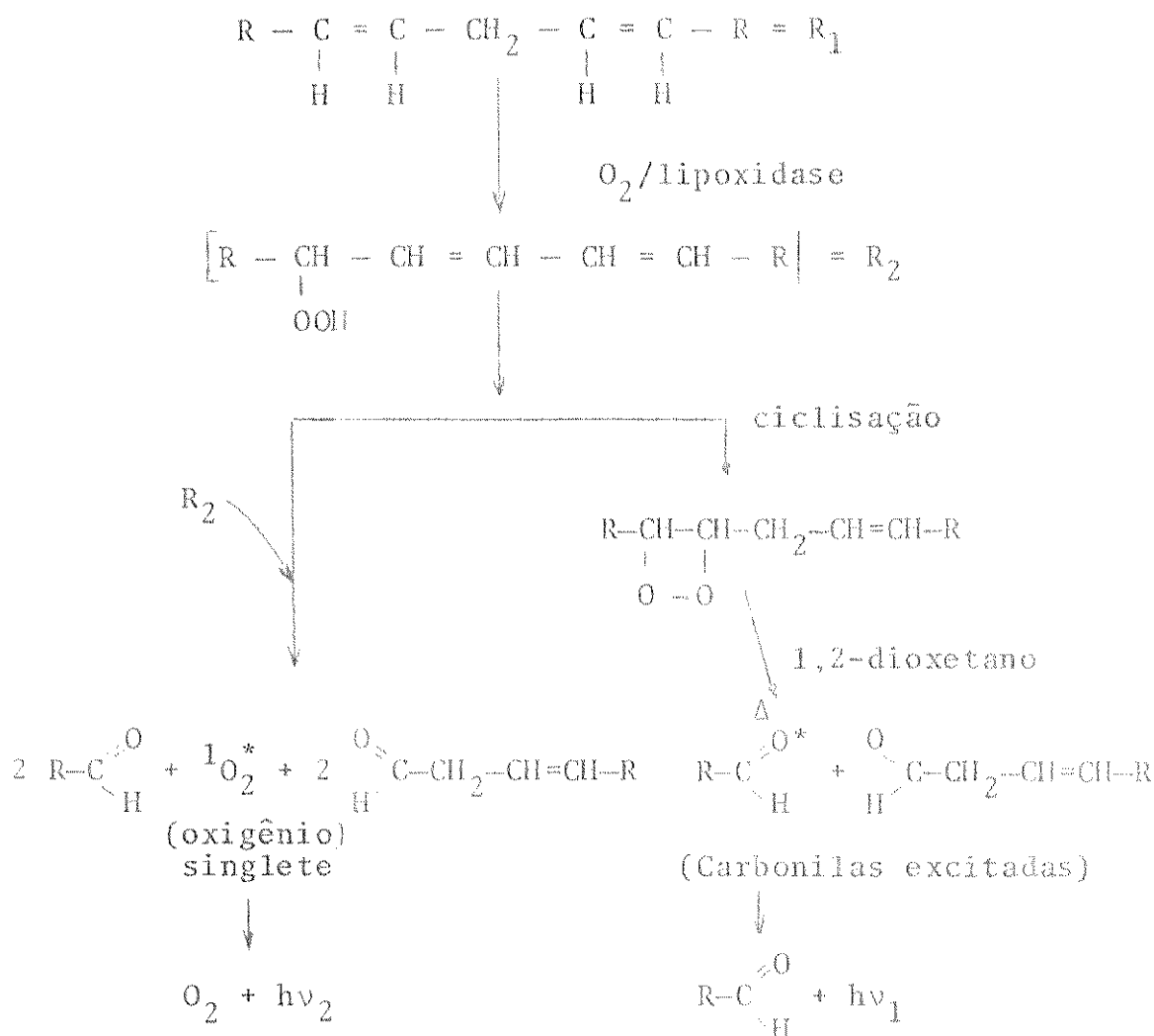
Terusov e col.(1961)⁽²⁸⁾ postularam que a quimiluminescência de sistemas biológicos está associada à oxidação não enzimática de lipídeos. Certos dados indicam que a quimiluminescência de suspensões de mitocôndrias esteja associada à formação de lipoperóxido⁽²⁹⁾. Na mitocôndria vinte e cinco por cento do peso seco é constituído de ácidos graxos em sua maior parte insaturados: linoleico, linolênico e araquidônico⁽²⁸⁾. Esses constituintes de membrana de mitocôndria e também das células podem facilmente auto-oxidar o que pode levar a formação de radicais peróxidos e, consequente à quimiluminescência.

III- Na lipoperoxidação a quimiluminescência está associada à formação de aldeídos e cetonas excitados por recombinação de radicais peróxidos da seguinte forma⁽²⁷⁾:

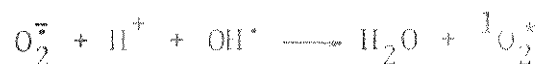
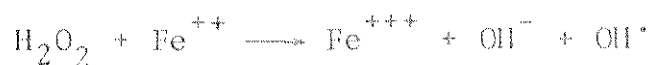


Onde $R^{\bullet}$ é o radical do ácido graxo; $RO_2^{\bullet}$ é o lipoperóxido; RH é o ácido graxo; e P é o produto da reação (cetona).

Segundo Vladimirov (1966)⁽²⁷⁾ o produto XO_2 postulado anteriormente pode ser formado como resultado da oxidação de ácidos graxos, mas não é o produto final da oxidação; assim como o radical peróxido é também um intermediário. No sistema biológico, fica o problema da natureza do produto Y (da fórmula $XO_2 + Y \rightarrow z + hv$). Entretanto, existem também evidências de que o sistema lipoxidase-lipídeos pode atingir os mesmos intermediários observados na auto-oxidação de lipídeos. É proposto nestes casos, intermediários $XOOH$ (lipoperóxidos) que por degradação segundo o mecanismo de Russell ou Benson podem gerar oxigênio singlete⁽³⁰⁾.



Outras possibilidades de geração dos estados excitados são a recombinação de espécies de oxigênio (radical hidroxila $\text{OH}^\bullet$, íon superóxido O_2^- , e peróxido de hidrogênio H_2O_2). Por exemplo, a formação de radical hidroxila permite a geração de outras espécies que poderiam levar a oxigênio singlete (31).



1.5 - GERAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE DURANTE A OXIDAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO CATALISADA POR PEROXIDASE

Uma enzima extraída de eritrócitos humanos metaboliza o ácido fólico in vitro para produzir a pterina-6-aldeído e o ácido p-aminobenzoilglutâmico.

Innocentini (1981)⁽¹³⁾ estudando a fotoemissão que acompanha a degradação do ácido fólico por esta enzima, evidenciou a presença de um produto no estado eletrônico excitado. A possibilidade de se formar algum produto no estado tripleto excitado foi eliminada perante a ineficácia dos aceptores de energia antracênicos em aceitar a energia proveniente deste sistema. Expe

riências utilizando supressores de oxigênio singlete (por ex.: bilirrubina), amplificadores de emissão para esta espécie (por ex.: 1,4-diazobiciclo(2.2.2)octano ou DABCO) e meio deuterado, no estudo da reação de oxidação e de fotoemissão, sugerem fortemente que oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$ $^1\Delta_g$) é o responsável pela emissão observada.

1.6 - QUIMILUMINESCÊNCIA ESPONTÂNEA DO PLASMA

Gurvich e col. (1948)^(24,32), observaram no sangue de pacientes com câncer, um agente supressor de quimiluminescência. Este processo tem sido motivo de diversas pesquisas no plasma (33-39), no soro⁽⁴⁰⁻⁴³⁾ e no sangue total⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾.

Acredita-se que a emissão do plasma se deve a reação de peroxidação de lipídeos, similar ao que ocorre em mitocôndria, em microssomos, homogenado de tecidos e suspensão de fosfolipídeos (48). Isso é sustentado pelo fato de que a adição de sais de Fe^{2+} provoca o mesmo desenvolvimento típico de quimiluminescência observada em sistemas de peroxidação de lipídeos.

Diversos autores observaram, previamente, aumento de quimiluminescência com o aumento de temperatura ao estudar o plasma, mitocôndria e homogenado de tecidos (26-28,34,33)

A temperatura pode influenciar de diversas formas os vários estágios do processo de peroxidação dos lipídeos como foi discutido anteriormente. Porém, de real importância é a questão de como as várias mudanças no estado fisiológico do corpo podem refletir-se na intensidade, ou no caráter da quimiluminescência do plasma sangüíneo. Vladimirov e col. (1973)⁽³⁸⁾ por exemplo, obser

varam no plasma de animais submetidos a hipoxia (atmosfera pobre em oxigênio), uma deflexão nos picos de quimiluminescência resultantes da adição de sais de Fe^{2+} . Essa mesma quimiluminescência do plasma aumentava inicialmente quando o animal era colocado em atmosfera de oxigênio puro. Após algumas horas, amostras de plasma, retirados do mesmo animal sob alta tensão de oxigênio mostrou valores de quimiluminescência menores que os encontrados no animal em condições normais de aeração. Pode-se concluir que o organismo possui um mecanismo de proteção contra a ação tóxica de espécies ativadas de oxigênio, que é ativado em condições extremas de oxigenação.

A respeito dessa quimiluminescência a literatura não apresenta estudos sistemáticos relacionando o estado fisiológico a este fenômeno espontâneo no sangue, e em particular no plasma sangüíneo. Os trabalhos anteriores^(32-36, 44-54) mostraram resultados de supressão da quimiluminescência de um dado sistema, provocado por componentes de sangue.

1.7 - QUIMILUMINESCÊNCIA ESPONTÂNEA DA URINA

Há alguns anos Schlegel e col. (1969)⁽⁵¹⁾ mostraram uma certa correlação entre a quimiluminescência da urina na presença de H_2O_2 e o carcinoma da bexiga. Amostras de urina de fumantes, quando submetida a interação com peróxido de hidrogênio, mostram uma quimiluminescência maior do que em não fumantes. Pacientes com câncer de bexiga apresentavam com maior intensidade este fenômeno na urina por esse método. Esses estudos foram confirmados por Schlegel e col. (1969)⁽⁵²⁾ e Rose e col. (1973)⁽⁵³⁾.

A quimiluminescência da urina pode ser levemente aumentada pela sulfatase, um pouco mais por glucuronidase, e muito mais fervendo a urina por uma hora a pH 1. Isso sugere que as espécies químicas envolvidas na quimiluminescência da urina estejam ligadas a precursores não quimiluminescentes através de sulfato, ácido glucurônico e outros, todos não quimiluminescentes⁽⁵⁴⁾.

Toda a bibliografia consultada apresenta estudos de quimiluminescência na urina feitos por indutores como peróxido de hidrogênio, sais de Fe^{2+} ⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾, e luminol⁽⁵⁸⁾, ou por outras determinações⁽⁵⁹⁾. Não encontramos dados a respeito da quimiluminescência espontânea da urina ou padronização de procedimentos.

1.8 - OBJETIVOS DA TESE

Pelo que relatamos anteriormente, a degradação enzimática do ácido fólico pode estar implicada no metabolismo de célula cancerosa, e nesse caso a atividade da enzima, com propriedades ácido fólico-oxidase, pode ser um importante indicador desse quadro patológico.

Durán e col. (1979)⁽²³⁾, descreveram um modelo biológico gerador de estados excitados com uma enzima isolada de eritrócitos⁽⁶⁰⁾. Esta enzima, uma hemoproteína, com características de peroxidase, degrada in vitro o ácido fólico gerando oxigênio singlete (Fig. 1A)⁽¹³⁾ (pag. 2).

Propõe-se verificar a atividade dessa enzima em eritrócitos de pessoas com diversos casos de câncer e outros estados patológicos assim como de gravidez para verificar a possível diferença de atividade em relação a pessoas normais.

A atividade da enzima será medida pela emissão provocada por oxigênio singlete gerado na oxidação do ácido fólico catalisada pela enzima extraída de eritrócitos.

Acreditamos que a enzima pode estar mais ativa em casos de câncer, e a comprovação dessa maior atividade pode abrir caminho para o estudo de uma importante via metabólica do câncer, com o desenvolvimento de novas drogas e com o diagnóstico precoce do câncer.

A presença dessa enzima, possivelmente mais ativa, em eritrócitos de pessoas portadoras de câncer, despertou a atenção sobre a quimiluminescência do plasma e da urina, a qual acredita-se ser devida a lipoperoxidação.

Até o momento não se fez nenhum estudo sistemático a respeito dessa quimiluminescência, que a relacione ao estado fisiológico do organismo.

A maior atividade da enzima dos casos de câncer e a maior degradação enzimática do ácido fólico, podem implicar mudanças na quimiluminescência dos fluidos biológicos.

Resumindo, nossos objetivos, visam a aplicação dos métodos de estudo de estados eletronicamente excitados à pesquisa clínica.

CAPÍTULO 2MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - DROGAS UTILIZADAS E SUA PROCEDÊNCIA

Substância	Procedência
Ácido Clorídrico	J.T.Baker Chemical Co.
Ácido Fólico	Merck
Ácido Cítrico	Queel Ind. Quím. S.A.
Acridina Laranja	Sigma Chem. Co.
Benzoato de sódio	Sigma Chem. Co.
Cloreto de sódio	Carlo Erba
Catalase	Sigma Chem. Co.
9,10-Dibromoantraceno-2-sulfonato de Sódio(DBAS)	Ref. 61
9,10-Difenilantraceno-2-sulfonato de Sódio(DPAS)	Ref. 61
1,4-Diazobiciclo(2.2.2)octano	Aldrich Chem. Co.
Etanol	Sigma Chem. Co.
Fosfato monobásico de sódio	Queel Ind. Quím. S.A.
Fosfato bibásico de sódio	Queel Ind. Quím. S.A.
Formiato de sódio	Sigma Chem. Co.
Fluoreceína	Sigma Chem. Co.
Glutaciona	Sigma Chem. Co.
Hidróxido de Sódio	Merck
L-histidina	Sigma Chem. Co.
Manitol	Sigma Chem. Co.
Sephadex G-25-40	Sigma Chem. Co.
Sulfato de Amônio	ECIBRA
Sulfato de Manganês	BDH Chem. Ltd.
Superóxido Dismutase (SOD)	Sigma Chem. Co.
Tiouréia	Sigma Chem. Co.
Tris(hidroximetil) aminometano	Merck

2.2 - INSTRUMENTOS UTILIZADOS

As pesagens foram feitas em uma balança Mettler (Mod. ME-22). O controle do pH foi feito num potenciômetro Metrohm Herisau (Modelo E-512).

Os espectros foram registrados num espectrofotômetro da Zeiss DMR-21. Os estudos de fotoemissão foram desenvolvidos num contador de cintilação líquida Backman, Modelo LS-100c, como descrito por De Toledo e col. (1980)⁽⁶²⁾.

Para a extração da enzima de eritrócitos, com propriedades de ácido fólico oxidase, obtenção de plasma, e centrifugação da urina, foi usada uma centrífuga de Sorvall Superspeed, Modelo RC-2B.

2.3 - AMOSTRAS

As amostras de sangue e urina, de pessoas normais, foram obtidas de voluntários do laboratório e visitantes, todos eles não apresentavam nenhuma moléstia aparente, nem estavam sob medicação, e declararam estar em jejum no ato da coleta.

As amostras de sangue e urina de pacientes portadores de câncer, ou apresentando outros males, como também de grávidas foram obtidos do Hospital Santa Casa de Campinas, com total consentimento dos pacientes.

Dois voluntários, um fumante e um não fumante forneceram amostras de urina antes e após receberem uma dose oral de 500 mg de ácido ascórbico.

As amostras de sangue foram colhidas em solução de citrato isotônica como anticoagulante, e centrifugadas (500xg) para separar o plasma e os eritrócitos.

As amostras de urina foram centrifugadas a 500xg por 10 min antes das medições.

2.4 - MÉTODOS

2.4.1 - Soluções

2.4.1.1 - Solução de ácido fólico (26 mM)

O ácido fólico (PM=441,41) foi dissolvido em solução aquosa, de NaOH 20% e estocado por uma semana no escuro, a 0°C, para evitar uma possível fotodecomposição.

2.4.1.2 - Solução de glutatona (0,68M)

Esta solução foi preparada na forma reduzida, (glutathiona reduzida) (PM=307,33) em tampão fosfato (0,5M; pH 5,5), e protegida da luz para evitar fotodecomposição.

2.4.1.3 - Solução tampão

A preparação dos tampões foi feita segundo o método de Sorensen (1909)⁽⁶³⁾. O tampão tris/HCl foi preparado pelo método de Gomori (1965)⁽⁶⁴⁾.

A solução isotônica de cloreto de sódio foi feita segundo o método de Parpart e col. (1947)⁽⁶⁵⁾, e era constituída de:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	-	0,0088M
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	0,0010M
NaCl	-	0,1390M
pH	-	7,4

2.4.1.4 - Solução isotônica de citrato (anticoagulante) 0,11M

3.235g de ácido cítrico (PM=210,14) foi dissolvido em ~100 ml de água e ajustado a pH 7,0 com hidróxido de sódio 20% e, em seguida aferido para 1 ml, quantidade suficiente para 9 ml de sangue.

2.4.1.5 - Soluções de supressores e evidenciadores de espécies emissoras

Os supressores e evidenciadores foram preparados em solução aquosa e concentração 1M.

Para as soluções de DBAS e DPAS pesou-se 1 mg de cada composto e procedeu-se como segue:

Adicionou-se 0,1 ml de etanol e ~4,5 ml de H_2O . Agitou-se em agitador magnético por 3 horas, protegido de luz. Filtrou-se, caso houvesse necessidade e completou-se o volume para 5 ml. Concentração aproximada $5 \times 10^{-4} M$.

Procedeu-se a determinação exata da concentração das soluções lendo-se a intensidade de absorção sabendo-se que:

$$\text{Para DBAS, } \epsilon(\lambda_{382}) = 894 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{Para DPAS, } \epsilon(\lambda_{375}) = 5040 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

A concentração das soluções foi calculada por $c' = \frac{A}{\epsilon l}$ onde ϵ é o coeficiente de extinção molar, l é o comprimento da célula (1 cm).

Para a leitura, a solução estoque foi diluída 1:10 em água destilada, o resultado obtido c' , era então, multiplicado por 10.

2.4.2 - Método de extração da enzima de eritrócitos. Ácido fólico oxidase

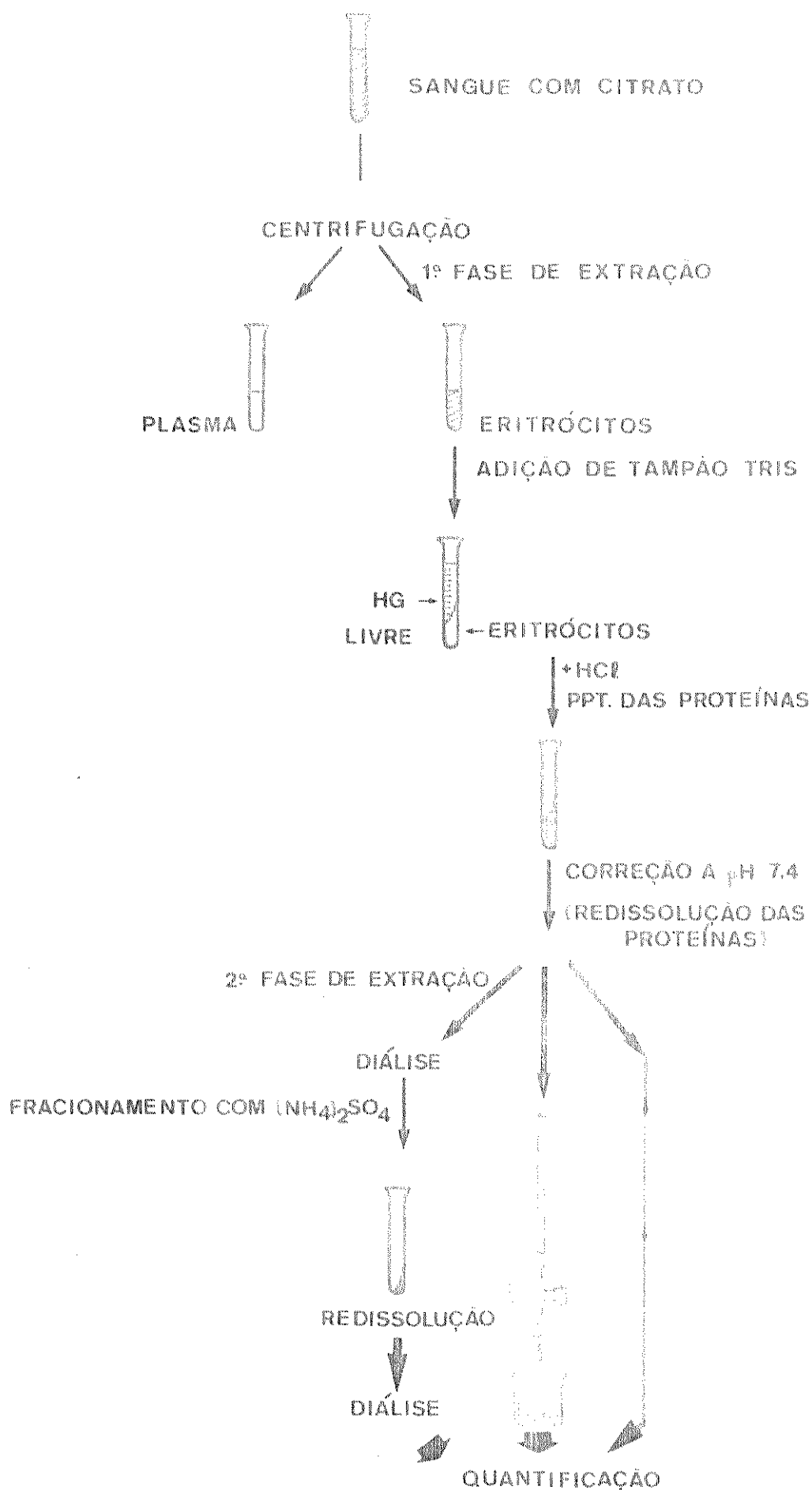
1ª Etapa

- 1 - 15 ml de sangue citratado, centrifugar a 500xg ($\pm$ 2500 rpm) por 10 min, decantar o plasma.
- 2 - Lavar os eritrócitos duas vezes com solução isotônica de NaCl (~10 ml) centrifugando a cada vez.
- 3 - Retirar o sobrenadante, e adicionar 20 vezes o volume dos eritrócitos, de tampão tris 10 mM. Deixar em repouso 40 min, centrifugando em seguida.
- 4 - Lavar 2 vezes com tris 10 mM usando 2 a 3 vezes o volume de sedimento. Deixar em repouso e centrifugar em seguida.
- 5 - Ressuspender o precipitado com água, agitando e, adicionando ácido clorídrico concentrado gota a gota até que o excesso cause um precipitado pardo. Centrifugar.
- 6 - Lavar o precipitado 2 vezes com HCl 2N centrifugando a cada vez.
- 7 - Suspender o precipitado num mínimo de água e levar a pH 5,5 com hidróxido de sódio 1N controlando, com papel indicador o pH.
- 8 - Adicionar tampão fosfato para obter pH 7,0 (~10 ml), e centrifugar.

OBS.: Nesta etapa todas as centrifugações são por 10 min e a 500xg (500 vezes a aceleração da gravidade).
Fazer todo o trabalho em gelo.

2ª Etapa

- 1 - Dialisar o sobrenadante por 18 horas com 2 litros de água destilada.



Esquema 1 - Extração da enzima de eritrócitos.

- 2 - Medir o volume do dialisado e adicionar vagarosamente 32,5g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para cada 100 ml sob constante agitação. Centrifugar a 11000xg por 20 min.
- 3 - Desprezar o precipitado, medir o volume, adicionar 9,3g/100ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como anteriormente e, centrifugar.
- 4 - O precipitado é suspenso em 15 ml de água e posto a dialisar em água destilada por 20 horas.

Com pequenas modificações, este é o mesmo método que foi empregado por Bragança e col. (1957)⁽⁶⁰⁾ e Innocentini (1981)⁽¹³⁾ para extrair a enzima de eritrócitos. No estudo da enzima, essa técnica foi empregada em 24 amostras. Em algumas amostras, substituiu-se a segunda etapa de extração, por filtração em sephadex G-25-40, e em outras amostras também se avaliou a atividade da enzima somente com o tratamento de primeira etapa de extração. (Ver Esquema 1, pág. 37).

2.4.3 - Teste para avaliar a concentração da enzima

Uma alíquota do extrato obtido na primeira ou na segunda etapa, é diluído em tampão fosfato (0,5M; pH 7,0).

Mede-se o espectro na região do ultravioleta. Obtido o espectro, aplica-se a fórmula⁽¹³⁾.

$$\frac{(1,45E_{280} - 0,74E_{260})}{\text{diluição do extrato}} = \text{mg proteína/ml}$$

A enzima pode ser identificada como hemoproteína pela presença de uma banda Soret em 403 nm.

2.4.4 - Teste de avaliação da atividade da enzima ácido fólico oxidase de eritrócitos

A avaliação se fundamenta na emissão de quimiluminescência provocada pelo oxigênio singleto gerado na oxidação enzimática do ácido fólico⁽¹³⁾, conforme a reação 2, pág. 40.

Innocentini (1981)⁽¹³⁾ observou um aumento de emissão no sistema enzimático do ácido fólico oxidase de eritrócitos quando se adicionava DABCO 10 mM, um evidenciador da emissão de oxigênio singleto.

O método relaciona o aumento da emissão provocado pela presença de DABCO, comparando com a emissão da reação sem DABCO, considerada como reação controle. O aumento da emissão, provocado pela presença de DABCO, demonstra maior eficiência na emissão de oxigênio singleto e, portanto maior sensibilidade na medição da atividade da enzima. Os resultados de emissão da reação controle e reação com DABCO foram computados em relação ao tempo e expressos na forma integrada: $\sum_{t=0}^n (\frac{x_1+x_2}{2}) \Delta t$. Nas figuras 9 e 10 (pág. 41 e 42) mostrado em gráfico em cpm e em contagens integradas, respectivamente, a emissão dessas reações.

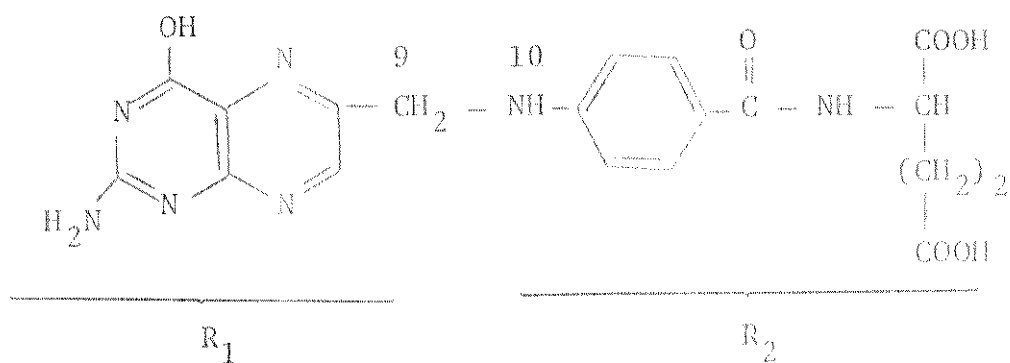
2.4.5 - Teste de avaliação da quimiluminescência espontânea da urina e plasma

A quimiluminescência espontânea desses fluidos foi medida em contador de cintilação líquida, a temperatura ambiente e a 58°C.

Usou-se 4 ml de urina a pH nativo, a pH 1 e pH 10.

A emissão do plasma foi medida em alíquotas de 1 ml apenas a pH nativo.

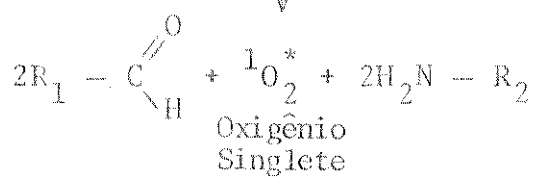
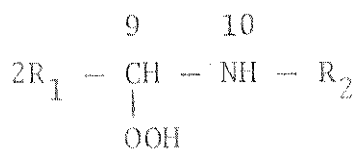
Os diversos supressores usados na verificação da natureza da espécie emissora também foram usados nessas quantidades de fluidos.



Ácido Fólico

 O_2

enzima ácido fólico oxidase



Pterin-6-CHO

Oxigênio Singlete
ácido p-aminobenzoilglutâmico

Reação 2 - Degradação enzimática do ácido fólico na qual é gerado oxigênio singlete.

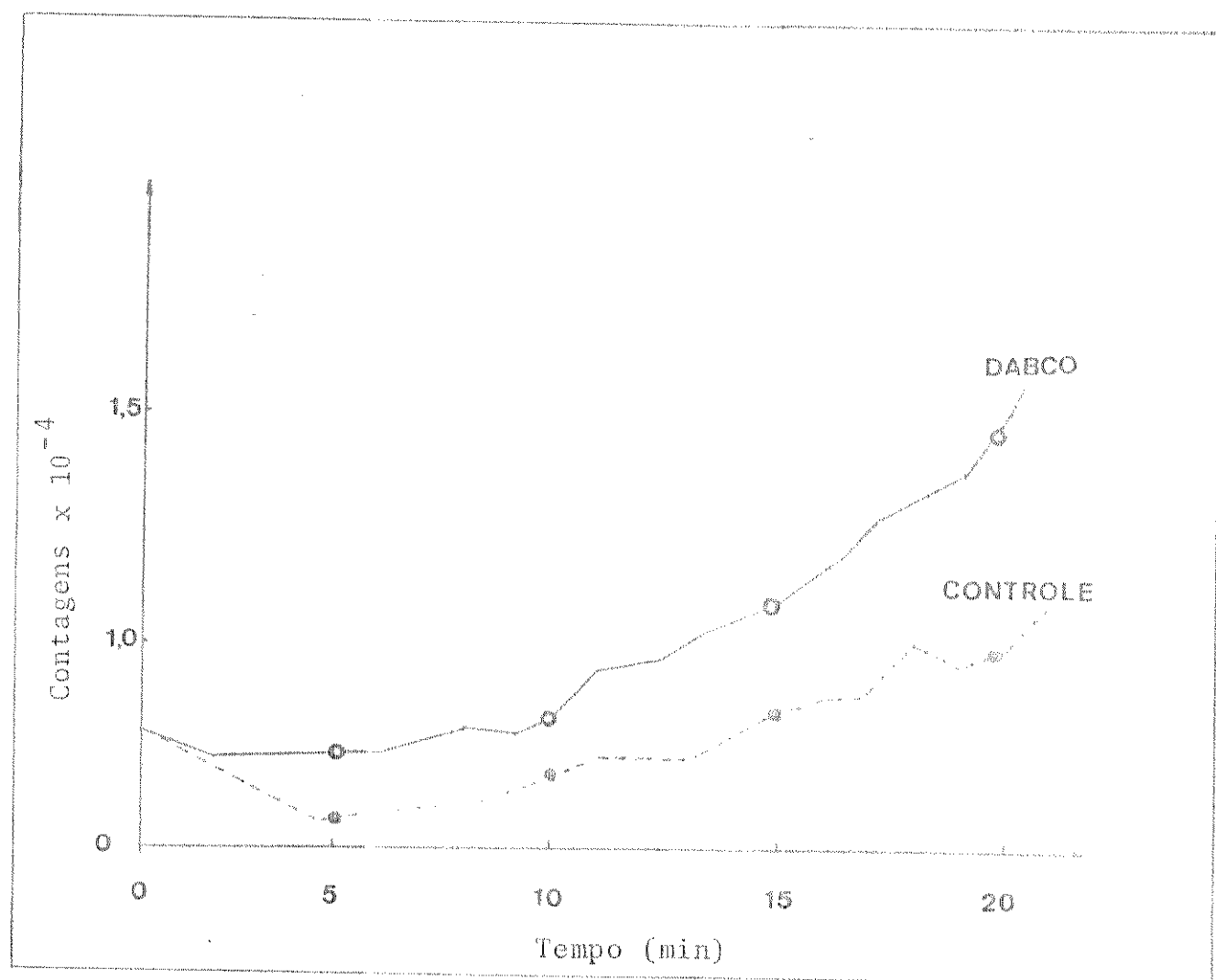


Figura 9 - Emissão do sistema Ácido fólico (1,2 mM)/Ácido fólico oxidase de eritrócitos (0,12 mg/ml)/glutathione (388 µM)/Mn⁺⁺ (77,5µM) em tampão fosfato 0,5M - pH 5,5.

—●— controle

—○— Controle + DABCO.

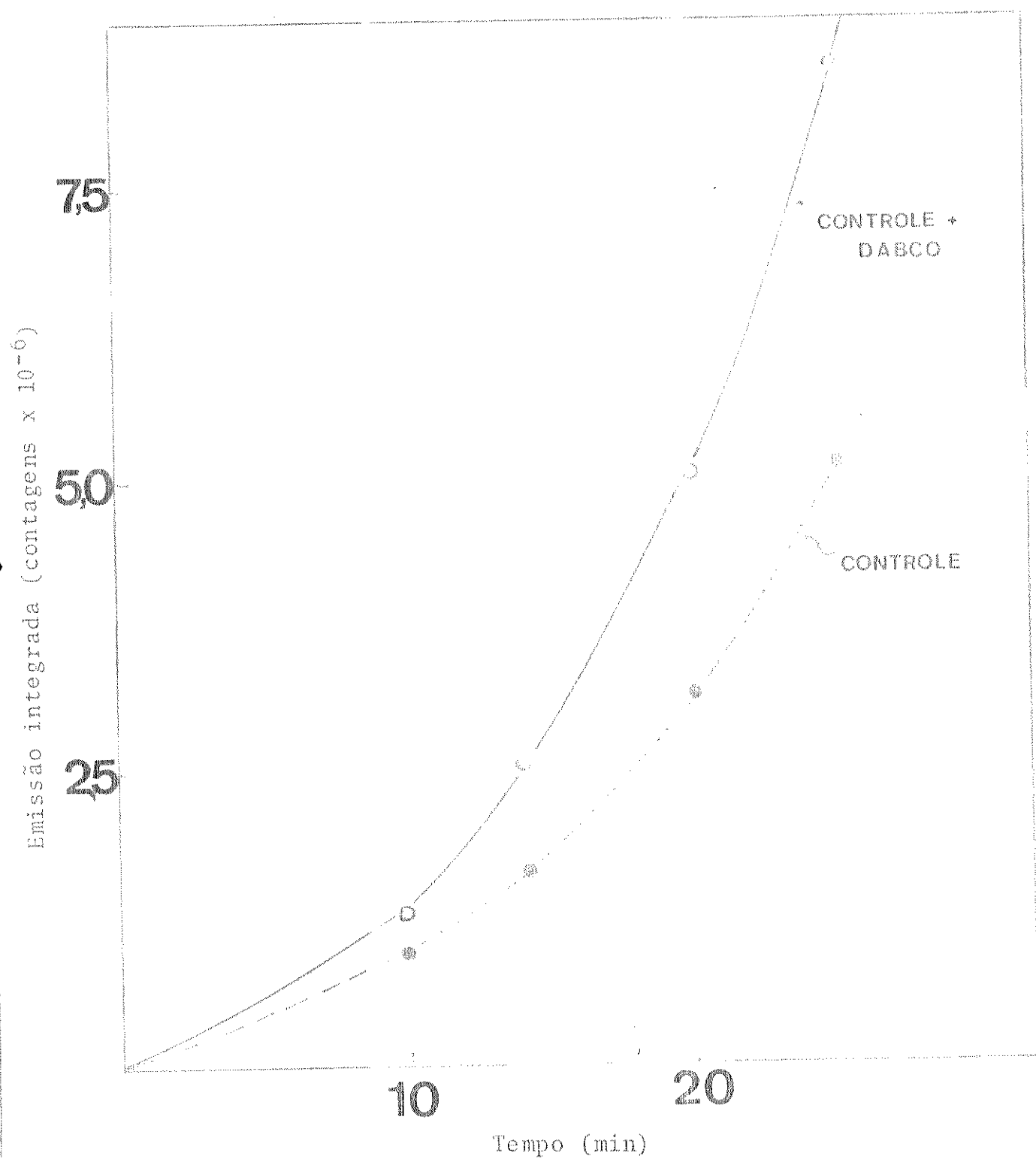


Figura 10 - Emissão integrada do sistema mostrado na figura anterior.

- Controle
- Controle + DABCO

Amostras de plasma e urina foram filtradas por coluna de sephadex G-25-40 a 54 ml/h, 40 mm de espessura, para separar as frações responsáveis pela emissão.

2.4.6 - Sistema enzimático

O sistema enzimático, do ácido fólico oxidase, empregado nestes estudos, foi o proposto por Innocentini (1981)⁽¹³⁾ constituído por:

- 1 - Substrato: Ácido fólico 1,2 mM
- 2 - Enzima: Ácido fólico oxidase de eritrócitos
0,12 mg/ml
- 3 - Cofatores: Glutathione 388 μ M
 Mn^{++} 77,5 μ M
- 4 - Tampão Fosfato 0,5 M pH=5,5
- 5 - Evidenciador de 1O_2 : DABCO 10 mM

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados de Innocentini (1981)⁽¹³⁾ na determinação da atividade enzimática da ácido fólico oxidase em eritrócitos, procurou-se obter resultados comparativos entre pessoas normais, grávidas e portadores de diversos tipos de câncer, verificando se, efetivamente, os métodos empregados delimitam pelo menos duas populações. A suposta presença desse sistema emissor ativo na membrana dos glóbulos vermelhos, nos levou a verificar as implicações que poderia ter na quimiluminescência espontânea do plasma e da urina.

A geração de 1O_2 no sangue ou nos tecidos, pode estimular a reação semelhante à lipoperoxidação que ocorre nos fluidos biológicos. Ao mesmo tempo, o organismo, devido a esse estímulo pode ativar seus mecanismos de proteção contra a lipoperoxidação, mecanismos esses provavelmente de origem proteica.

Esse quadro pode ser de grande importância para o estudo e compreensão de muitos estados fisiológicos de pessoas normais e portadoras de certas doenças, e para avaliação do sistema de defesa do organismo.

3.1 - SISTEMA ÁCIDO FÓLICO/ÁCIDO FÓLICO OXIDASE

3.1.1 - Atividade da Enzima Ácido Fólico Oxidase obtido pelo método de Extração Empregado por Braganca e col. (1957)⁽⁶⁰⁾ usando as duas etapas de extração

A atividade da enzima extraída pelo método descrito em 2.4.2. (pág. 36), foi medida em 24 casos, sendo:

10 casos de câncer Tab. 4

8 casos normais Tab. 5

6 casos de gravidez Tab. 6

As contagens obtidas no cintilador foram integradas em relação ao tempo. Para facilidade de apresentação, os resultados estão mostrados com integração a 5, 10 e 15 min apenas. Tabelas 4, 5 e 6 (págs. 47, 48 e 49), mostram as relações DABCO/controle e DABCO-controle. Estudos anteriores de cinética de reação indicam que os dados a 10 e 15 min de integração das intensidades medidas, são os mais significativos⁽¹³⁾. Por essa razão os resultados estão apresentados em gráfico de contagem integrada DABCO vs CONTROLE a dez e quinze minutos o que pode ser visto na Fig. 11 e 12 (pág. 51 e 52). A linha pontilhada assinala a região de efeito zero de DABCO.

Os casos normais 8, 9 e 21 na tabela 5 (pág. 48) são os únicos casos que apresentaram atividade elevada, sendo o 21, o mesmo caso 9 analisado três meses após o 1º exame, e mostra um aumento da relação DABCO/Controle.

Os casos de grávidas (tabela 6, pág 49), em geral, apresentaram atividade elevada, porém a emissão era suprimida na presença de DABCO, com exceção do caso nº 1, que ao ser repetido semanas após, apresentou menor atividade. Essa paciente, na época

do exame apresentava pneumonia.

Os casos de câncer, apresentaram atividade bem elevada, porém muito variável, o que dá um alto desvio padrão. Apenas um caso de câncer apresentou supressão de emissão na presença de DABCO.

Em várias amostras (Tab. 7, pág. 50), foi observado que, quando oxalato era usado como anticoagulante, a enzima perdia a atividade. Logo, este anticoagulante não foi mais usado.

TABELA 4

Amostras de pacientes de câncer - Contagem Integrada

AMOS TRA	DABCO/CONTROLE				DABCO-CONTROLE				OBS
	5 min	10 min	15 min		5 min	10 min	15 min		
5	$\frac{1.041.690}{688.200} = 1,514$	$\frac{2.553.090}{2.302.500} = 1,109$	$\frac{4.470.690}{5.283.900} = 0,846$		353.490	250.590	813.210		C _F ^a
7	$\frac{602.700}{495.600} = 1,216$	$\frac{1.345.200}{808.500} = 1,664$	$\frac{2.668.500}{1.492.500} = 1,788$		107.100	536.700	1.176.000		C _F ^a
15	$\frac{3.944.700}{2.325.300} = 1,696$	$\frac{9.138.600}{5.125.200} = 1,783$	$\frac{13.978.800}{7.359.300} = 1,899$		1.619.400	4.013.400	6.614.500		C _M ^b
16	$\frac{6.385.800}{1.401.600} = 4,556$	$\frac{13.317.000}{3.684.900} = 3,614$	$\frac{19.653.000}{6.020.100} = 3,265$		4.984.200	9.632.100	13.632.900		C _F ^a
17	$\frac{2.325.300}{1.398.600} = 1,663$	$\frac{5.013.900}{2.966.700} = 1,690$	$\frac{6.422.400}{3.679.800} = 1,745$		926.700	2.047.200	2.742.600		C _M ^b
18	$\frac{4.680.600}{272.700} = 17,164$	$\frac{9.987.900}{574.700} = 26,656$	$\frac{15.278.100}{420.600} = 36,324$		4.407.900	9.613.200	14.857.500		C _M ^b
19	$\frac{1.651.500}{1.105.500} = 1,495$	$\frac{3.782.400}{2.111.400} = 1,791$	$\frac{6.088.800}{3.038.700} = 2,004$		546.000	1.671.000	3.050.100		C _M ^b
20	$\frac{1.037.700}{733.500} = 1,415$	$\frac{2.075.400}{1.425.600} = 1,456$	$\frac{3.049.800}{2.211.300} = 1,379$		304.200	649.800	838.500		C _F ^a
32	$\frac{852.900}{660.600} = 1,291$	$\frac{3.889.200}{5.478.600} = 0,710$	$\frac{7.417.800}{8.283.600} = 0,895$		192.300	-1.589.400	-865.800		C _F ^a
35	$\frac{5.767.200}{3.683.700} = 1,566$	$\frac{12.731.990}{9.532.200} = 1,336$			2.083.500	3.199.700			C _F ^a

(a) C_F = câncer feminino(b) C_M = câncer masculino

TABELA 5
Amostras de Pessoas Normais - Contagem Integrada

AMOS TRA	DABCO/CONTROLE			DABCO-CONTROLE			OBS
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	
8	$\frac{366.400}{2.450.100} = 0,114$	$\frac{7.210.500}{5.425.500} = 1,329$	$\frac{10.495.200}{8.357.400} = 1,256$	-2.083.700	1.785.000	2.357.400	N_M^C
9	$\frac{5.957.700}{3.123.000} = 1,908$	$\frac{12.205.800}{7.967.100} = 1,532$	$\frac{16.378.800}{11.847.600} = 1,382$	2.834.700	4.238.700	4.531.200	N_F^d
21 rep 9 3 meses	$\frac{1.730.400}{687.000} = 2,519$	$\frac{3.807.300}{1.388.100} = 2,743$	$\frac{5.863.500}{2.064.000} = 2,841$	1.043.400	2.419.200	3.799.500	N_F^d
22	$\frac{420.300}{329.700} = 1,275$	$\frac{751.200}{497.400} = 1,510$	$\frac{1.003.800}{607.200} = 1,653$	90.600	253.800	396.600	N_M^C
23	$\frac{451.800}{244.500} = 1,848$	$\frac{601.800}{401.700} = 1,499$	$\frac{733.800}{547.500} = 1,340$	207.300	200.100	186.300	N_F^d
24	$\frac{434.700}{257.100} = 1,691$	$\frac{777.000}{483.900} = 1,606$		177.600	293.100		N_F^d
25	$\frac{563.400}{522.300} = 1,079$	$\frac{981.300}{785.700} = 1,249$	$\frac{1.323.600}{947.700} = 1,397$	41.100	195.600	375.900	N_M^C
26	$\frac{377.400}{611.700} = 0,617$	$\frac{618.300}{821.100} = 0,753$	$\frac{1.351.300}{1.078.200} = 1,253$	-234.300	-202.800	273.100	N_M^C

(c) N_M = normal masculino Médias a 10 min.: Controle: $\bar{X} = 597960$ DABCO $\bar{X} = 745920$
 (d) N_F = normal feminino $\sigma = 191493$ $\sigma = 152852$

Razão DABCO/Controle: $1,25 \pm 0,80$

Obs.: Foram eliminados os 3 primeiros casos (8,9,21).

TABELA 6
Amostras de Pacientes grávidas - Contagem Integrada

AMOS		DABCO/CONTROLE			DABCO-CONTROLE			OBS
TRA	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min		
1	$\frac{6.002.100}{222.300} = 27,000$	$\frac{13.205.100}{584.400} = 19,294$	$\frac{20.520.600}{1.463.400} = 14,022$	5.779.800	12.520.700	19.057.200	F _G ^e	
2	$\frac{363.000}{987.300} = 0,368$	$\frac{980.400}{2.063.100} = 0,475$	$\frac{1.599.900}{3.184.800} = 0,502$	-624.300	-1.082.700	-1.584.900	F _G ^e	
3	$\frac{158.100}{3.687.000} = 0,043$	$\frac{417.300}{8.478.900} = 0,049$	$\frac{417.300}{13.209.900} = 0,032$	-3.528.900	-8.061.600	-12.792.600	F _G ^e	
4	$\frac{329.700}{4.187.100} = 0,079$	$\frac{831.000}{9.951.900} = 0,083$	$\frac{1.630.200}{16.244.100} = 0,100$	-3.857.400	-9.120.900	-14.613.900	F _G ^e	
6 rep. 1	$\frac{624.600}{401.100} = 1,557$	$\frac{1.727.100}{700.500} = 2,465$	$\frac{2.748.600}{941.400} = 2,920$	223.500	1.026.600	1.807.200	F _G ^e	
2A rep. 2	$\frac{747.600}{3.277.500} = 0,228$	$\frac{1.856.100}{7.518.900} = 0,247$	$\frac{2.932.800}{12.194.700} = 0,240$	-2.529.900	-5.662.800	-9.261.900	F _G ^e	

(e) F_G = feminino grávida

TABELA 7
Amostras inativas devido a oxalato como anticoagulante

AMOS TRA	DABCO/CONTROLE			DABCO-CONTROLE			OBS
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	
10	$\frac{777.300}{664.200} = 1,170$	$\frac{1.707.900}{1.530.900} = 1,116$	$\frac{2.757.900}{2.528.100} = 1,091$	113.100	177.000	229.800	C _F
11	$\frac{671.100}{1.271.400} = 0,528$	$\frac{1.481.700}{2.340.300} = 0,633$		-600.300	-858.600		C _F
12	$\frac{1.045.200}{1.342.200} = 0,779$	$\frac{2.444.400}{2.873.700} = 0,851$	$\frac{4.001.400}{4.697.700} = 0,852$	-297.000	-429.300	-696.300	C _F
13	$\frac{287.100}{174.300} = 1,647$	$\frac{686.300}{784.500} = 0,875$		112.800	-98.200		C _F

OBS.: C = câncer
F = feminino

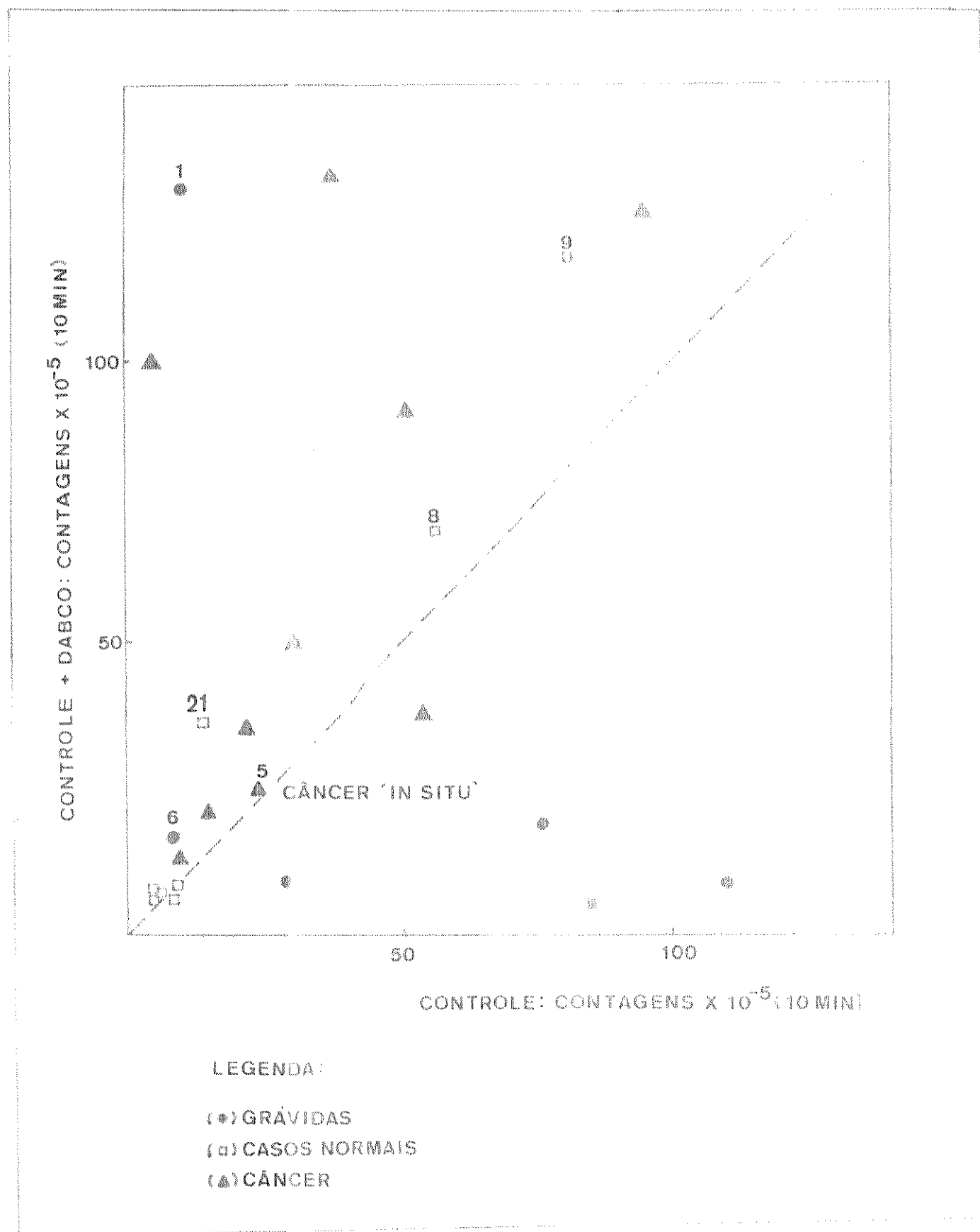


Figura 11 - Relação DABCO Vs CONTROLE dos diversos casos estudados. Integração a 10 min. A linha pontilhada mostra a região de efeito zero de DABCO.

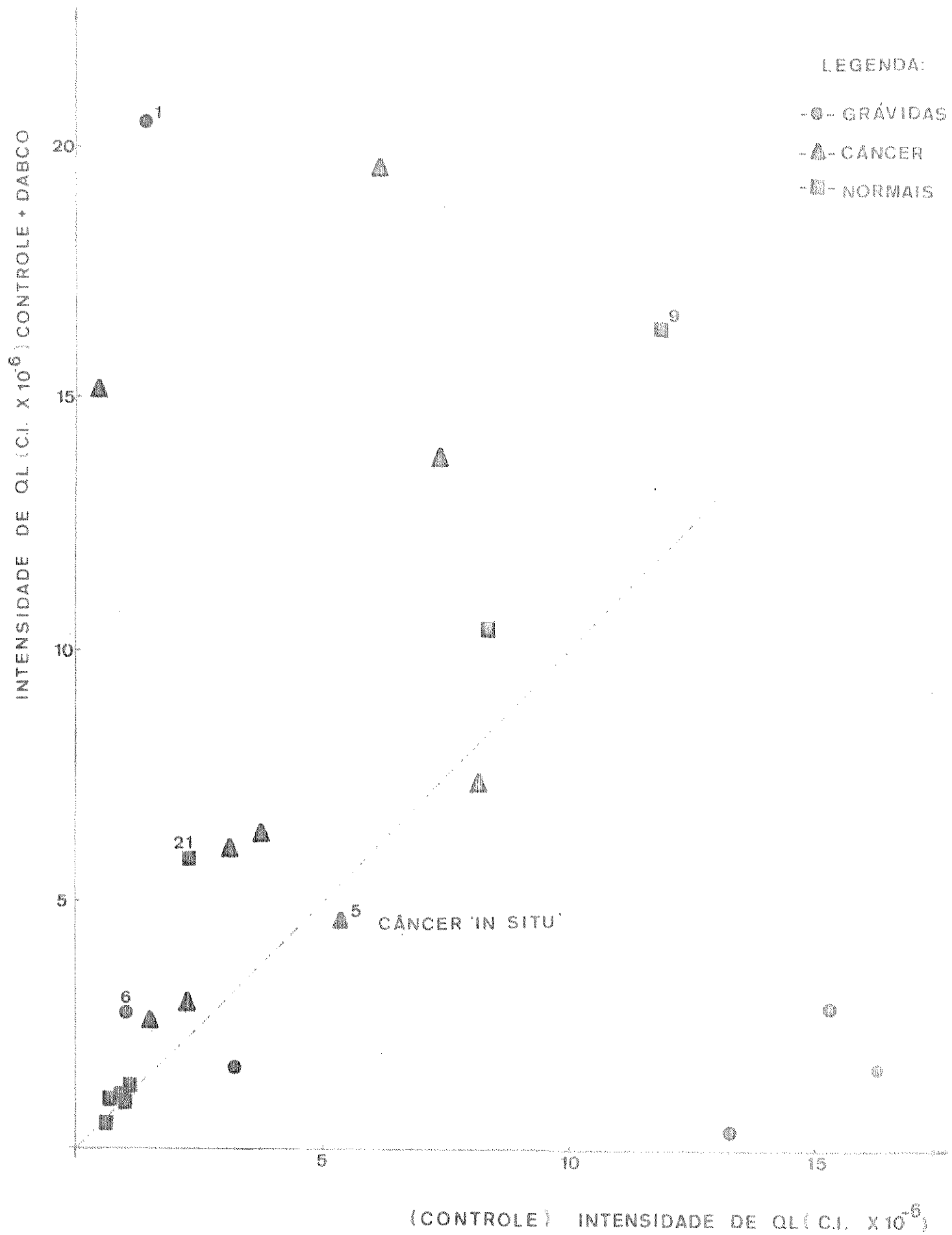


Figura 12 - Relação DABCO vs Controle dos diversos casos estudados. Integração a 15 min.

3.1.2 - Atividade da enzima na primeira etapa da extração

A extração da enzima de eritrócitos, além de relativamente trabalhosa, é também honerosa em tempo, devido as 38 hs de diálise necessárias para purificá-la.

Esse método de extração, foi descrito por Braganca e col. (1957)⁽⁶⁰⁾ e, de acordo com esses autores, a primeira fração da precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ é constituída de proteínas que interferem na atividade da enzima.

Foi tentada a separação dessa fração por coluna de sephadex G-25-40, em lugar da segunda etapa de extração, como descrito em 2.4.2 (pág. 36). (ver esquema 1, pag. 38).

Duas amostras, a 22 (normal, masculino) e 23 (normal, feminino), foram tratadas por esse método, comparando-se com o método de Braganca e col. (1957)⁽⁶⁰⁾, sendo que se separou duas frações de 10 ml da amostra 22 para teste (22 F₁ e 22 F₂) e da 23 uma fração única (23 Fu) de 20 ml. (Tab. 8, pág. 55).

Nota-se na tabela 8, que não há reprodutibilidade apreciável entre as frações obtidas por sephadex e o método descrito por Braganca e col. (1957)⁽⁶⁰⁾. Com exceção da fração 22 F₂, as demais apresentaram maior emissão do que as amostras que sofreram as duas etapas de extração.

Alternativamente, mediu-se a atividade de enzima dos casos normais 25 e 26 (masculino) e dos casos de câncer 32 e 33 (feminino), antes e após a segunda etapa de extração descrita na parte experimental (Tab. 9, pág. 56) (Fig. 12, pág. 58). Nota-se aos 10 min, que nos casos normais 25 e 26 a emissão é menor após efetuar a 2^a etapa, enquanto nos casos de câncer 33 e 34 a emissão é maior após essa etapa, porém, a relação DABCO vs CONTROLE aumenta nesses quatro casos.

A atividade da enzima foi testada só com a 1^a etapa

em mais 4 casos normais 30, 31, 34, 35 e 4 casos de câncer 36 a 39 e dois casos de gravidez 28 e 29 (Tab. 10, pág. 57), Fig. 13, pág. 59). Nota-se que a diferença de intensidades entre casos normais e câncer fica bem reduzida. Os casos de câncer apresentam uma razão DABCO/CONTROLE ligeiramente maior. As amostras de gravidez perdem a atividade. Considerando as (figuras 11, 13 e 14, págs. 51, 58 e 59) pode-se dizer que a fração proteica, que é desprezada no método proposto por Braganca e col. (1957)⁽⁶⁰⁾ na 2ª etapa, bloqueia aparentemente a reação de oxigênio com o radical formado pela ácido fólico oxidase, gerando talvez, outra espécie excitada diferente de oxigênio singlete, daí se observa produzindo um efeito de supressão de emissão provocada pela adição de DABCO, o que pode ser semelhante ao que ocorre com os casos de gravidez observados após o tratamento da segunda etapa.

TABELA 8
Amostras fracionadas por Sephadex comparadas c/Braganca

AMOS- TRA	DABCO/CONTROLE				DABCO-CONTROLE				OBS
	5 min	10 min	15 min		5 min	10 min	15 min		
22	$\frac{420.300}{329.700} = 1,275$	$\frac{751.200}{497.400} = 1,510$	$\frac{1.003.800}{607.200} = 1,653$		90.600	253.800	396.600	N_M^*	extração p/ Braganca e col.
22 F ₁ a	$\frac{603.600}{1.184.700} = 0,509$	$\frac{1.124.700}{2.824.500} = 0,398$	$\frac{1.562.400}{4.555.800} = 0,343$		-581.100	-1.699.800	-2.993.400	N_M	extração p/ Sephadex
22 F ₂ b	$\frac{235.800}{271.500} = 0,868$	$\frac{462.300}{414.900} = 1,114$	$\frac{620.700}{563.100} = 1,102$		-35.700	47.400	57.600	N_M	extração p/ Sephadex
23	$\frac{451.800}{244.500} = 1,848$	$\frac{601.800}{401.700} = 1,498$	$\frac{733.800}{547.500} = 1,340$		207.300	200.100	186.300	N_F	extração p/ Braganca e col.
23 F ₃ c u	$\frac{474.000}{719.740} = 0,659$	$\frac{915.300}{2.130.340} = 0,430$	$\frac{1.582.500}{3.754.840} = 0,421$		-245.740	-1.315.040	-2.172.340	N_F	extração p/ Sephadex

a) primeira fração extraída na filtração com sephadex G-25-40

b) Segunda fração extraída na filtração com sephadex G-25-40

c) fração única da amostra 23 na filtração com sephadex G-25-40

OBS.: N = normal M = masculino F = feminino

Tabela 9
Análise comparativa entre a atividade na 1ª e 2ª etapa da extração

ANOS	DABCO/CONTROLE				DABCO-CONTROLE				OBS.
	5 min		10 min		5 min		10 min		
TRA									
25	$\frac{563.400}{522.300} = 1,079$		$\frac{981.300}{785.700} = 1,249$		$\frac{1.323.600}{947.700} = 1,397$		$\frac{375.900}{195.600} = 1,920$		extração p/ Bragança 2a. etapa
25	$\frac{887.400}{813.600} = 1,091$		$\frac{4.088.400}{4.414.500} = 0,926$		$\frac{8.476.800}{9.456.900} = 0,896$		$\frac{-980.100}{-326.100} = 2,975$		1a. etapa
26	$\frac{377.400}{611.700} = 0,617$		$\frac{618.300}{821.100} = 0,763$		$\frac{1.351.300}{1.078.200} = 1,253$		$\frac{273.100}{-202.800} = -1,346$		extração p/ Bragança 2a. etapa
26	$\frac{406.500}{577.200} = 0,704$		$\frac{2.157.600}{3.089.700} = 0,698$		$\frac{4.961.100}{6.699.900} = 0,740$		$\frac{-1.738.800}{-932.100} = 1,864$		1ª. etapa
52	$\frac{852.900}{660.600} = 1,291$		$\frac{3.889.200}{5.478.600} = 0,710$		$\frac{7.417.800}{8.283.600} = 0,895$		$\frac{-965.800}{-1.589.400} = 0,608$		extração p/ Bragança 2a. etapa
52	$\frac{581.700}{883.800} = 0,658$		$\frac{2.406.000}{4.588.500} = 0,524$		$\frac{6.141.300}{7.227.600} = 0,850$		$\frac{-1.086.300}{-2.182.500} = 0,497$		1a. etapa
55	$\frac{5.767.200}{3.683.700} = 1,566$		$\frac{12.731.900}{9.532.200} = 1,336$		$\frac{2.083.500}{5.119.700} = 0,407$		$\frac{399.300}{-255.300} = -1,564$		extração p/ Bragança 2a. etapa
55	$\frac{710.400}{700.200} = 1,01$		$\frac{2.958.900}{3.214.200} = 0,921$		$\frac{7.429.500}{7.030.200} = 1,056$		$\frac{399.300}{-255.300} = -1,564$		1a. etapa

OBS.: N = normal
C = câncer
F = feminino
N = masculino

TABELA 10

Atividade da enzima ácido fólico oxidase na 1ª etapa da extração

AMOS- TRA	DABCO/CONTROLE				DABCO-CONTROLE				OBS
	5 min	10 min	15 min		5 min	10 min	15 min		
28	$\frac{102.300}{281.400} = 0,363$	$\frac{429.000}{876.900} = 0,489$	$\frac{1.262.400}{3.216.300} = 0,392$		-179.100	-447.900	-1.953.900		G
29	$\frac{145.800}{375.900} = 0,388$	$\frac{270.000}{761.700} = 0,354$	$\frac{371.100}{1.134.600} = 0,327$		-230.100	-491.700	-763.500		G
30	$\frac{406.500}{258.300} = 1,574$	$\frac{2.190.600}{3.403.800} = 0,644$	$\frac{6.663.600}{8.361.900} = 0,787$		148.200	1.213.200	-1.698.300		N _M
31	$\frac{441.300}{655.800} = 0,673$	$\frac{4.131.300}{4.980.600} = 0,829$	$\frac{8.022.300}{8.647.200} = 0,929$		-214.500	-849.300	-624.900		N _M
34	$\frac{919.200}{882.900} = 1,041$	$\frac{3.395.100}{3.906.900} = 0,869$	$\frac{6.739.200}{7.048.200} = 0,956$		36.300	-511.800	-309.000		N _M
35	$\frac{412.800}{594.900} = 0,694$	$\frac{1.044.600}{1.825.200} = 0,572$	$\frac{2.072.400}{3.172.800} = 0,653$		-182.100	-780.600	-1.100.400		N _F
32	$\frac{581.700}{883.800} = 0,658$	$\frac{2.406.000}{4.588.500} = 0,524$	$\frac{6.141.300}{7.227.600} = 0,850$		-302.100	-2.182.500	-1.086.300		C _F
33	$\frac{710.400}{700.200} = 1,01$	$\frac{2.958.900}{3.214.200} = 0,921$	$\frac{7.429.500}{7.030.200} = 1,056$		10.200	-255.300	399.300		C _F
36	$\frac{177.900}{426.000} = 0,418$	$\frac{575.400}{1.263.000} = 0,456$	$\frac{1.024.800}{2.532.000} = 0,405$		-248.100	-687.600	-1.507.200		C _F
37	$\frac{328.800}{324.900} = 1,012$	$\frac{1.255.800}{1.626.300} = 0,772$	$\frac{3.626.700}{5.351.000} = 0,680$		3.900	-370.500	-1.704.300		C _F
38	$\frac{1.152.000}{1.001.400} = 1,150$	$\frac{3.620.700}{3.483.600} = 1,039$	$\frac{6.929.400}{6.556.800} = 1,057$		150.600	137.100	372.600		C _F
39	$\frac{723.900}{315.900} = 2,292$	$\frac{1.926.600}{1.332.000} = 1,446$	$\frac{3.865.500}{3.630.600} = 1,065$		408.000	594.600	234.900		C _F

OBS.: G = grávida N = normal C = câncer N = masculino F = feminino

Casos normais a 10 min Média DABCO: 2.834.600 Controle 3.603.450 Razão $\frac{\text{DABCO}}{\text{Controle}} = 0,79 \pm 1,13$

σ 1.236.509 1.105.650

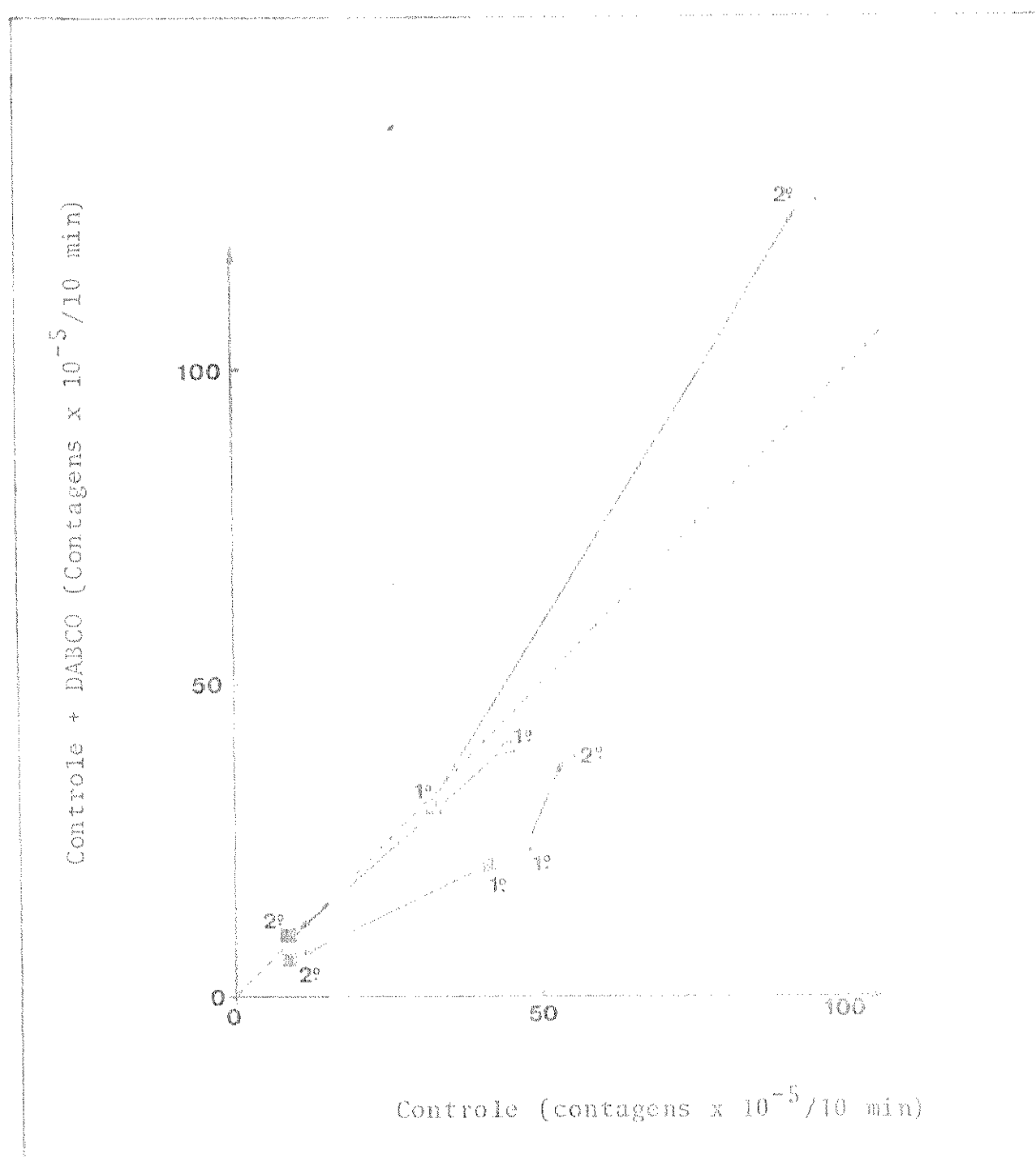


Figura 13 - Gráfico comparativo da atividade na 1ª etapa e 2ª etapa de extração. —■— normais, —▲— câncer

As setas apontam os resultados obtidos na segunda etapa.

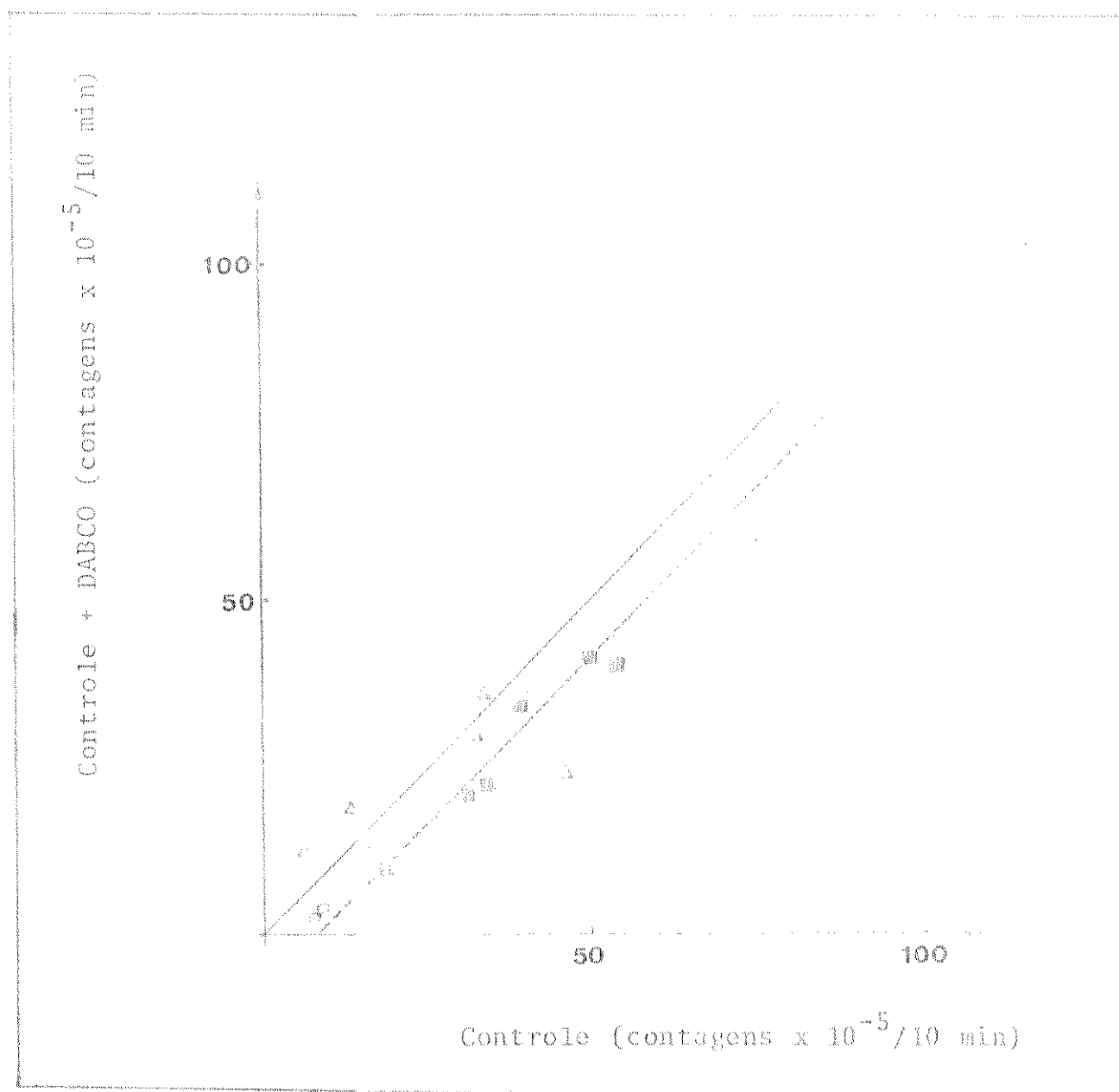


Fig. 14 - Gráfico mostrando os resultados obtidos na 1^a etapa a 10 min. de integração de diversas amostras
 -o- grávidas -□- normal -Δ- câncer

A linha pontilhada evidencia a região em que se situam os casos normais.

A linha cheia mostra a região de efeito zero de DABCO.

3.1.3 - Discussão

Pode-se deduzir dos resultados que, efetivamente, a enzima ácido fólico oxidase é mais ativa in vitro, quando extraída de pessoas portadoras de câncer (Fig. 11, pag. 51). Porém, essa atividade é muito variável, dando um desvio padrão mais alto do que a média de atividade. Além disso, pessoas normais podem apresentar atividade elevada, como foi notado nos casos 8 e 21 sem que isso possa significar que sejam portadores de câncer ou de outro distúrbio fisiológico.

Além disso, as experiências executadas com a enzima após a 1ª etapa de tratamento comparada com as efetuadas após a 2ª etapa, mostram que a enzima pode não ser específica, isto é, pode não estar verdadeiramente degradado in vivo só o ácido fólico, mas participando de um complexo enzima-substrato formador de radicais livres derivados do ácido fólico, que são aniquilados por uma proteína, gerando outra vez o ácido fólico e deixando a proteína como radical que, por sua vez, produz uma quimiluminescência inespecífica. Isso poderia explicar o aumento de emissão nos casos normais, quando medidos na 1ª etapa.

A questão é saber até que ponto o ácido fólico é importante para essa formação de radicais via enzimática. Sabendo-se que nos casos de câncer há uma deficiência de ácido fólico, as enzimas dependentes de ácido fólico devem mostrar uma atividade mais eficiente, o que pode explicar o quadro observado nos experimentos.

A proteína que reage com o ácido fólico radical pode acumular-se, nos casos de câncer, e gravidez, e daí, a queda de emissão na presença de DABCO quando a proteína não é eliminada. Conclui-se que a presença, a quantidade e a capacidade em suprimir $^1\text{O}_2$ (oxigênio singlete) dessas proteínas são tão importantes

quanto a atividade da enzima ácido fólico oxidase. (Fig. 15, pag.62).

É provável que este sistema possa mostrar importante valor para diagnóstico. Os melhores valores, e mais reprodutíveis, foram achados quando executadas as duas etapas da purificação da enzima, entretanto seria recomendável efetuar as medidas ao fim da 1^a etapa e após a 2^a etapa, porque se observou que nos casos de câncer há um aumento de emissão entre a 1^a e a 2^a etapa, enquanto que em casos normais houve o contrário. (Fig. 13, pag. 58).

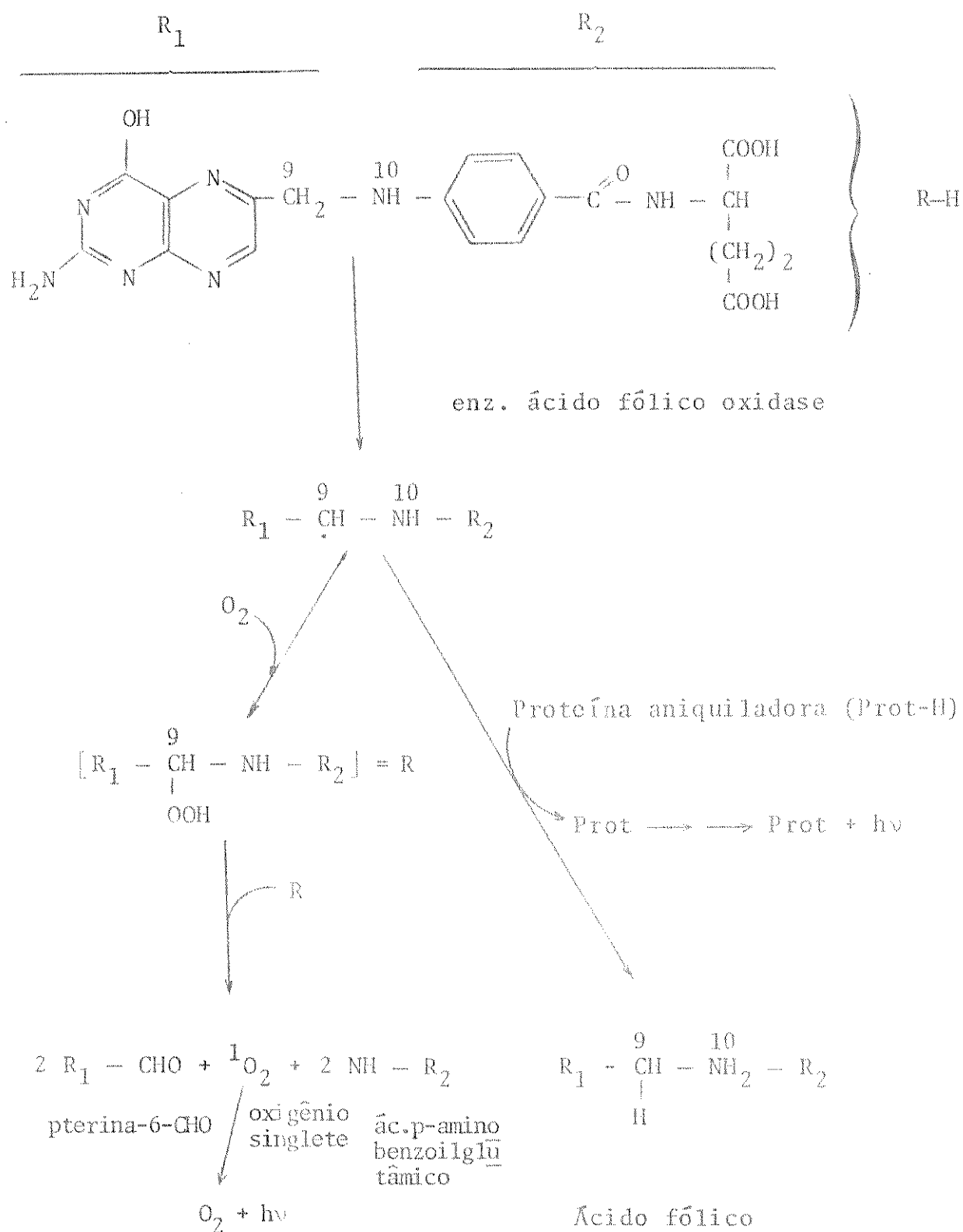


Figura 15 - Rea\c{c}\~ao da \acute{a}cido f\acute{o}lico oxidase com \acute{a}cido f\acute{o}lico, mostrando, \~a esquerda, a degrada\c{c}\~ao do \acute{a}cido f\acute{o}lico pela enzima, quando na 2^a etapa. \~a direita, mostra-se a hip\acute{o}tese do que acredita-se ocorrer com a intera\c{c}\~ao enzima-prote\acute{i}na na 1^a etapa.

3.2 - QUIMILUMINESCÊNCIA ESPONTÂNEA DA URINA

3.2.1 - Estudo comparativo

Tendo sido observada a presença de uma quimiluminescência espontânea na urina, atribuída a lipoperoxidação, procurou-se estabelecer de que modo certos estados patológicos podem interferir sobre essa reação espontânea. Fez-se um estudo do comportamento da quimiluminescência espontânea a várias temperaturas, com a finalidade de verificar a melhor eficiência para os estudos propostos. Notou-se maior eficiência a temperaturas altas. Com o intuito comparativo foi observada a quimiluminescência da urina de um voluntário fumante e outro não fumante. A maior intensidade foi apresentada pelo fumante. Para analisar o comportamento da quimiluminescência (QL) em outros casos foi estudado o decaimento de QL, após aquecer-se as amostras a 58°C (Fig. 16, pág. 65). Observou-se que fumante e não fumante seguem aproximadamente a mesma cinética. Isso se evidencia quando se alterna o esfriamento e aquecimento das amostras (Figs. 17 e 17a, pág. 66 e 67). A intensidade de emissão se eleva com temperaturas altas, e retorna ao valor inicial quando é atingida a temperatura de 16°C.

Para um estudo de comportamento, dezoito amostras sendo nove de casos normais e nove de diversos tipos de câncer, foram avaliadas em relação a quimiluminescência, a 16 e 58°C e a pH nativo, pH 1 e pH 10.

Os resultados estão apresentados nas tabelas 11, 12 e 13, pág. 68, 69 e 70) nota-se uma menor emissão a pH 1 (tabela 11) nos casos de câncer. Neste pH, encontra-se para os casos normais:

média: $11,39 \times 10^3 (\pm 5,25)$ contagens a 16°C

média: $24,14 \times 10^3 (\pm 10,90)$ contagens a 58°C

As médias, em temperaturas de 16°C e 58°C , para os casos de câncer, foram 61% e 57% mais baixas, respectivamente. Também notou-se nessa tabela 11 (pág. 68) que o valor do indivíduo fumante a 58°C , foi mais alto que todos os demais. Não foi observada diferença significativa na urina quanto ao sexo masculino ou feminino.

A pH nativo, a 58°C , a urina mostrou diferença significativa, se eliminarmos o caso U-16, entretanto, a 16°C há uma menor intensidade nos casos de câncer, porém o desvio padrão é alto.

A tabela 13 (pág. 70), mostra as intensidades da quimiluminescência espontânea a pH 10. A média dos valores da urina normal a 16°C foi $364,6 \times 10^3$ contagens com desvio padrão (σ) $44,5 \times 10^3$. Isto indicou -40% de redução na emissão da urina de canceroso. Aproximadamente a mesma redução foi observada a 58°C . Porém o desvio padrão foi relativamente alto, sendo difícil reproduzir os resultados na mesma amostra.

Na Figura 18, pág. 71, plotou-se a intensidade de emissão a pH 1 das urinas a 16°C vs 58°C . Este gráfico mostra que todos os casos de câncer foram localizados numa região restrita do gráfico, entretanto os casos normais tiveram um espalhamento maior. Um gráfico semelhante foi construído para os resultados a pH nativo, mostrado na figura 19, pág. 72.

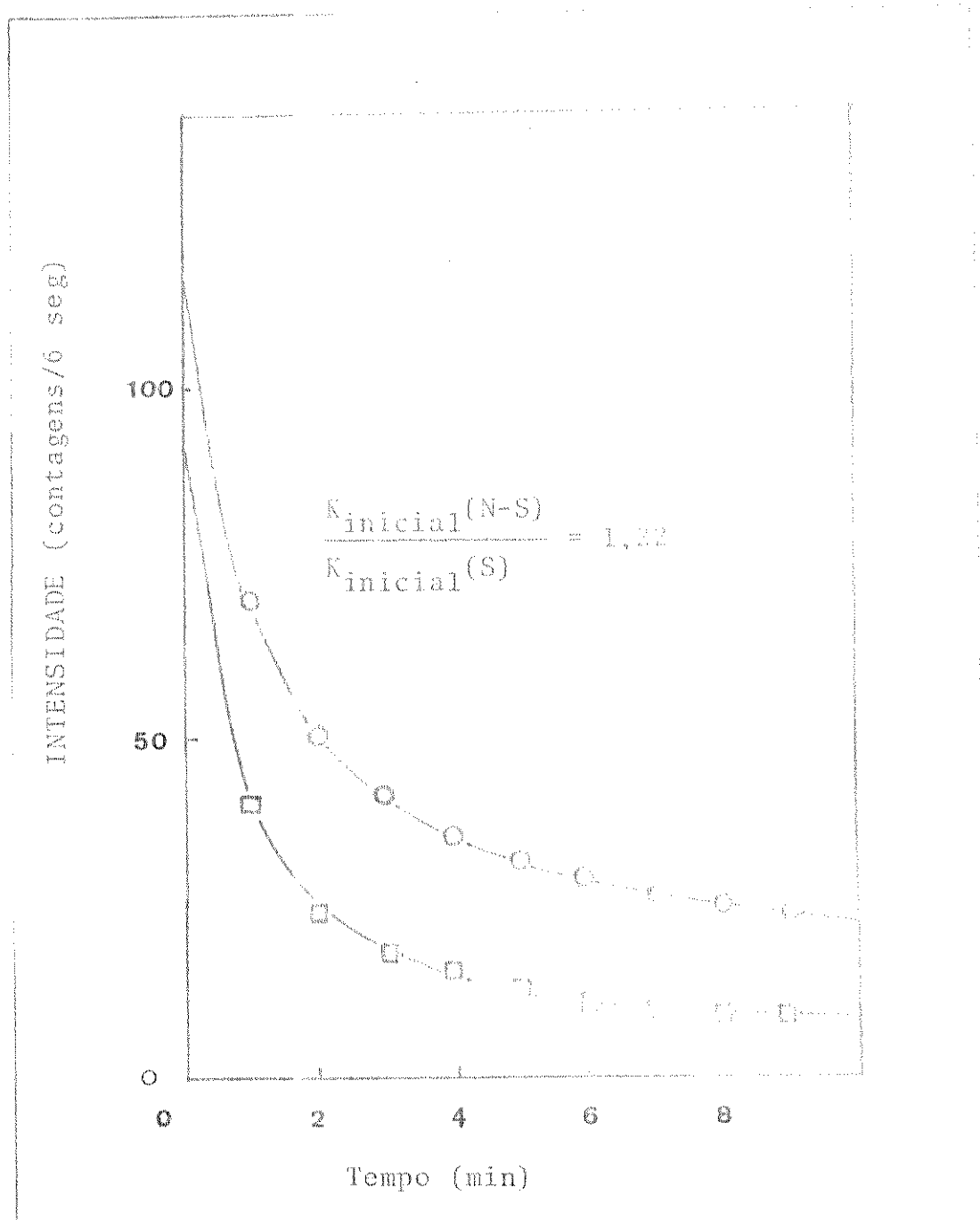


Figura 16 - Quimiluminescência da urina aquecida por 15 min a 58°C a pH nativo e depois deixada esfriar a temperatura ambiente.

-o- fumante, -□- não fumante.

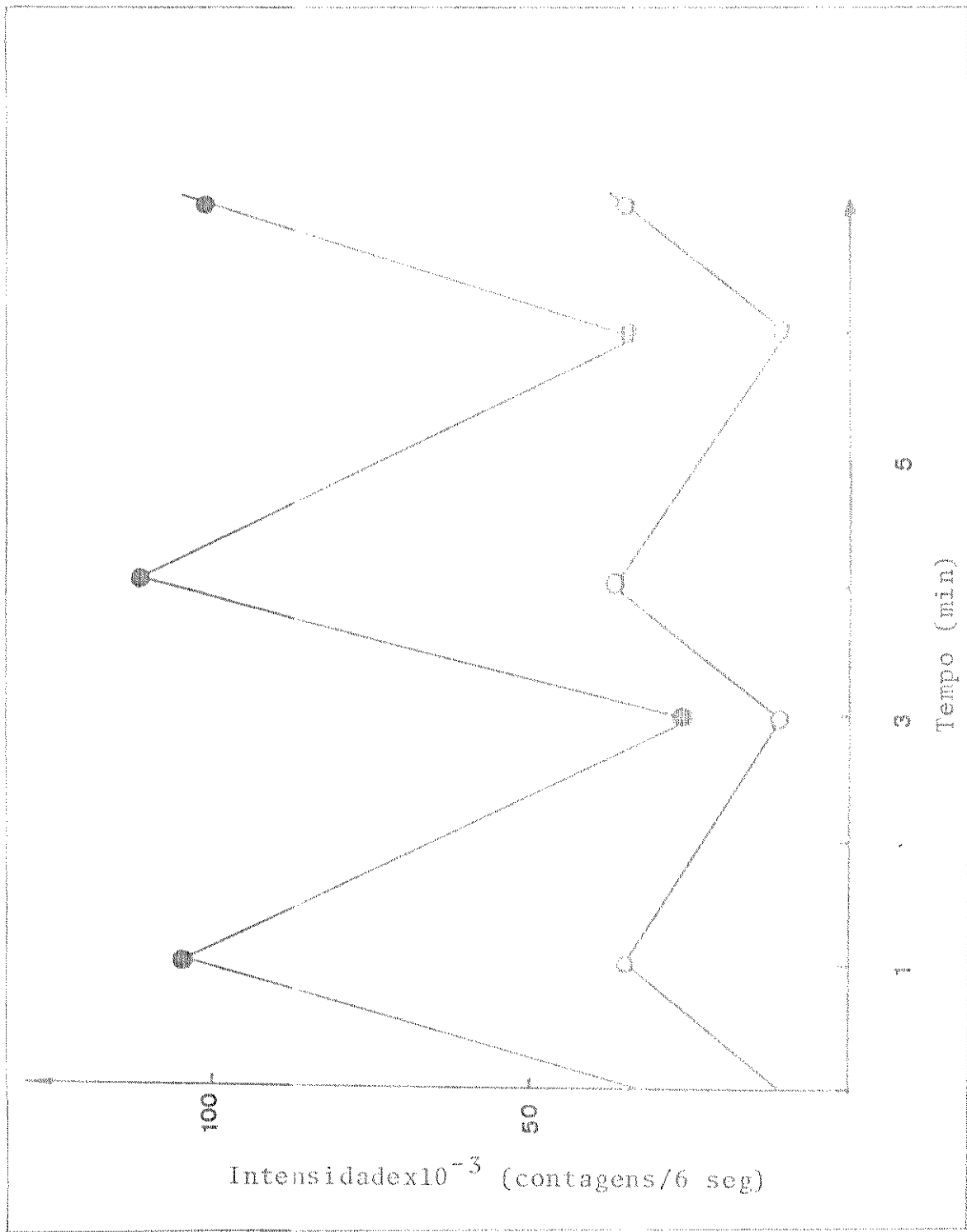


Figura 17 - Quimiluminescência de amostras de urina a pH 5,2. —●— fumante, —○— não fumante aquecidas e esfriadas sucessivamente a 48°C e 16°C.

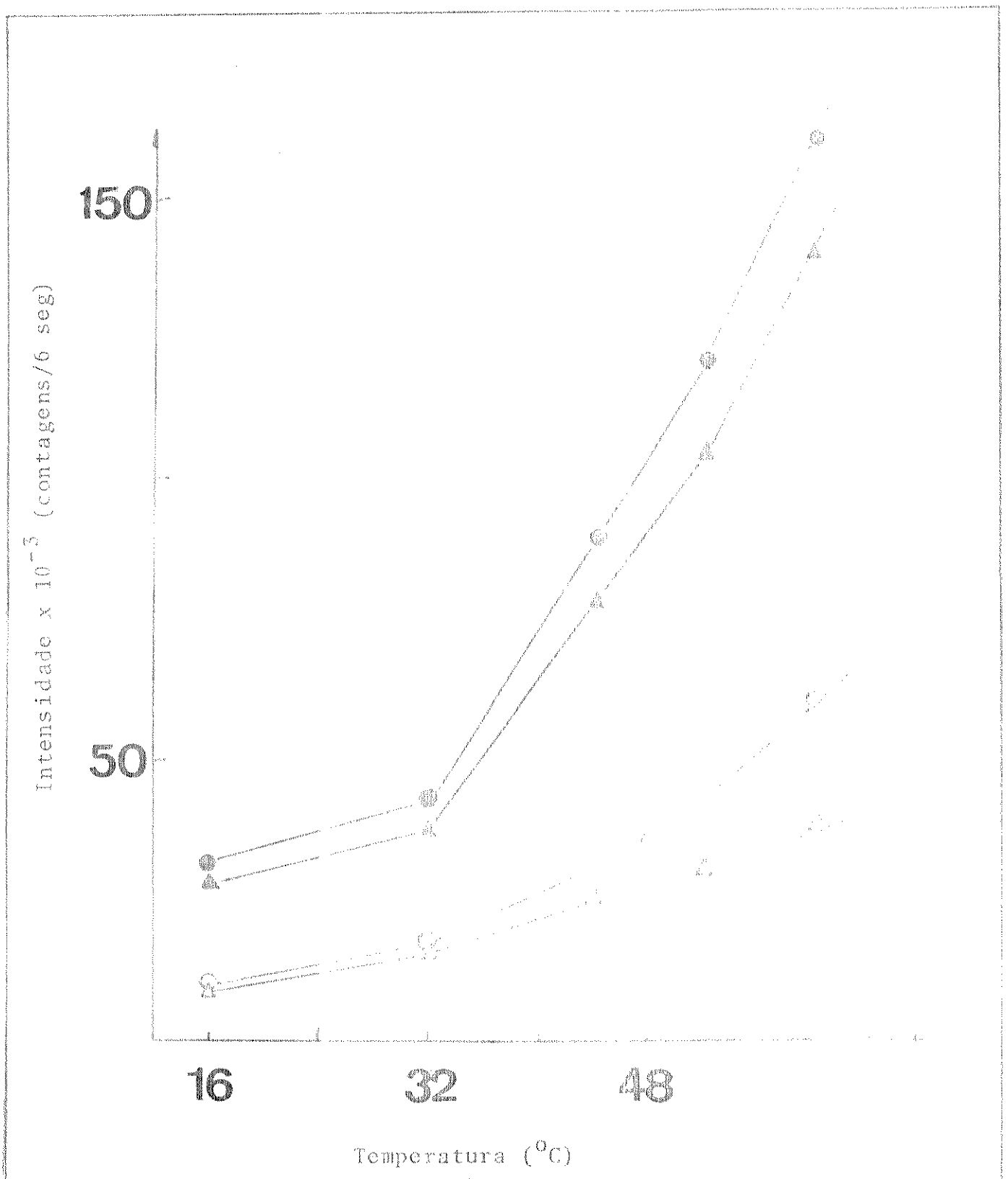


Figura 17a - Quimiluminescência da urina a diferentes pH's, com amostras mantidas por um minuto a diferentes temperaturas.

não	Δ	pH 1	$\circ$	fumante
fumante	$\triangle$	pH 5,2	$\circ$	

TABELA 11
Intensidade de Quimiluminescência a pH 1,0 a diferentes
temperaturas

Amostra	Caso	Sexo	Condição	Intensidade x 10 ⁻³ (CP/6 seg)		OBS
				16°C	58°C	
U-1	Normal	M	não Fum.	15,9	35,2	
U-2	"	"	" "	10,2	28,2	
U-3	"	"	Fum.	21,0	100,0	*
U-4	"	F	não Fum.	10,7	30,3	
U-5	"	"	" "	10,0	31,7	
U-6	"	"	" "	7,0	11,0	
U-7	"	"	" "	22,3	34,0	
U-8	"	"	" "	7,0	10,5	
U-9	"	"	" "	8,0	12,2	
U-10	Câncer	"	" "	5,4	3,5	
U-11	"	"	" "	3,2	4,8	
U-12	"	M	" "	1,8	18,5	
U-13	"	F	" "	4,8	6,5	
U-14	"	"	" "	3,7	7,0	
U-15	"	"	" "	9,3	14,4	
U-16	"	"	" "	5,2	8,1	
U-17	"	"	" "	4,2	6,3	
U-18	"	"	" "	2,5	3,1	

* Eliminamos da média o fumante caso U-3

		16°C	58°C
Normais:	$\bar{X}$	$11,39 \times 10^3$	$24,14 \times 10^3$
	σ	$5,25 \times 10^3$	$10,90 \times 10^3$
Câncer:	$\bar{X}$	$4,46 \times 10^3$	$8,02 \times 10^3$
	σ	$2,18 \times 10^3$	$5,15 \times 10^3$

TABELA 12
Intensidade de Qumiluminescência a pH nativo (5,2 a 7,1)
a diferentes temperaturas

Amostra	Caso	Sexo	Condição	Intensidade x 10 ⁻³ CP/6 seg		OBS
				16°C	58°C	
U-1	Normal	M	não Fum.	18,0	135,1	
U-2	"	"	" "	8,0	46,6	
U-3	"	"	Fum.	14,8	196,0	
U-4	"	F	não Fum.	9,1	70,0	
U-5	"	"	" "	10,1	85,0	
U-6	"	"	" "	9,0	54,6	
U-7	"	"	" "	33,0	105,0	
U-8	"	"	" "	6,4	100,7	
U-9	"	"	" "	13,4	228,0	
U-10	Câncer	"	" "	3,8	5,9	
U-11	"	"	" "	3,3	28,0	
U-12	"	M	" "	0,5	38,8	
U-13	"	F	" "	6,5	141,0	
U-14	"	"	" "	1,3	11,6	
U-15	"	"	" "	8,0	174,3	
U-16	"	"	" "	14,7	585,2	
U-17	"	"	" "	16,1	137,6	
U-18	"	"	" "	7,8	105,9	

	16°C	58°C
Normais: $\bar{X}$	13,5x10 ³	113,44x10 ³
σ	8,17x10 ³	62,52x10 ³
Câncer: $\bar{X}$	5,91x10 ³	80,39 x10 ³
σ	4,98 x10 ³	66,73 x10 ³

Foi eliminado da média a amostra U-16.

TABELA 13

Intensidade de Quimiluminescência a pH 10,0 a diferentes temperaturas

Amostra	Caso	Sexo	Condição	Intensidade x 10 ³ CP/6 seg	
				16 ^o C	58 ^o C
U-1	Normal	M	não Fum.	272,0	918,0
U-2	"	"	" "	431,5	985,0
U-3	"	"	Fum.	640,0	976,6
U-4	"	F	não Fum.	331,2	569,3
U-5	"	"	" "	357,4	756,7
U-6	"	"	" "	87,3	479,6
U-7	"	"	" "	186,0	281,5
U-8	"	"	" "	341,0	900,0
U-9	"	"	" "	358,0	930,0
U-10	Câncer	"	" "	190,0	398,0
U-11	"	"	" "	253,0	354,0
U-12	"	M	" "	147,7	326,7

	16 ^o C	58 ^o C
Normais: $\bar{X}$	364,64x10 ³	755,2x10 ³
σ	132,32x10 ³	253,7x10 ³
Câncer: $\bar{X}$	221,5x10 ³	359,6x10 ³
σ	44,5x10 ³	35,9x10 ³

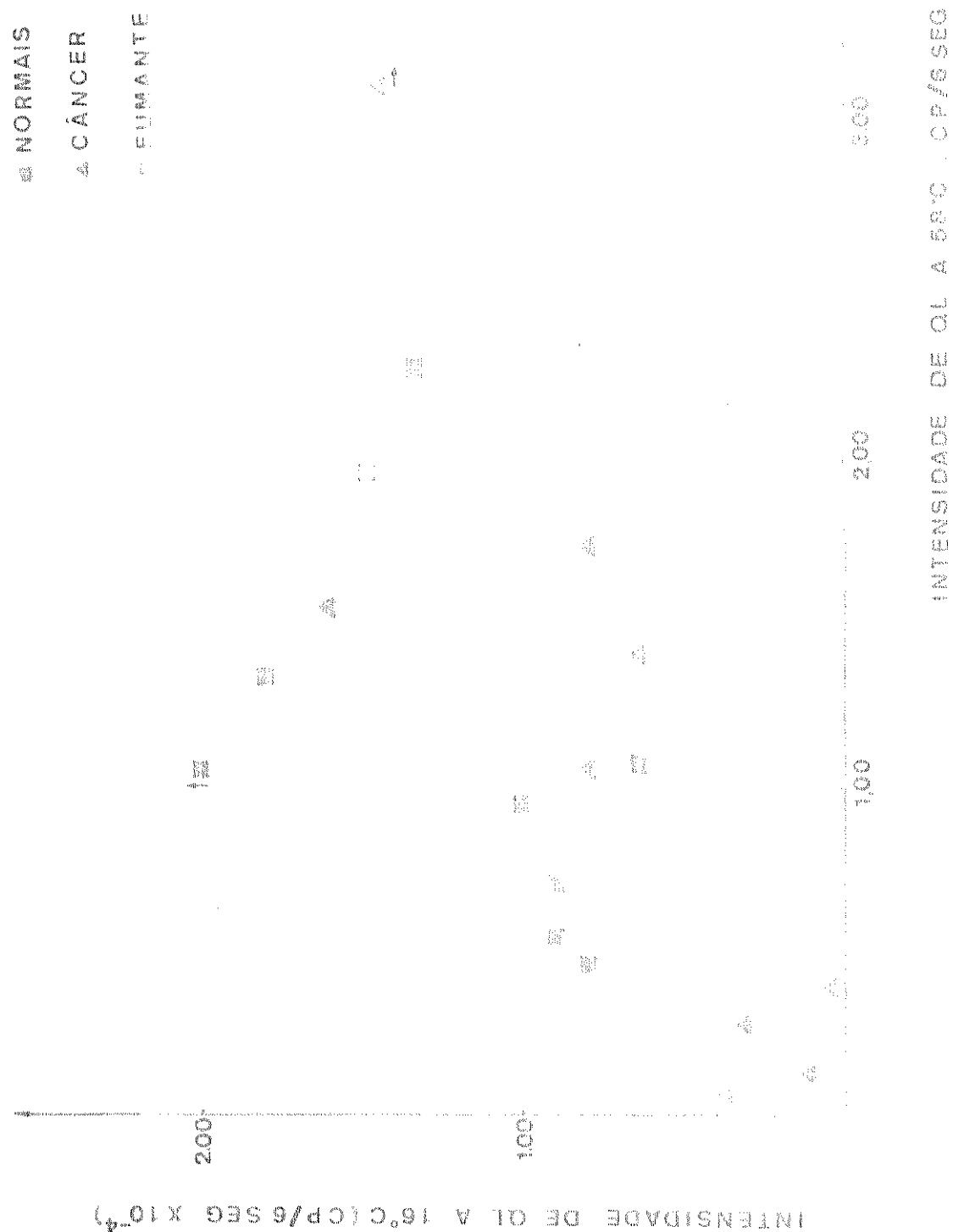


Figura 19 - Intensidade de Q.L. da Urina a pH nativo
16°C vs 58°C.

3.2.2 - Estudo das espécies eletronicamente excitadas na urina

A urina de dois voluntários, um fumante e um não fumante foi experimentada da seguinte forma:

1- Foram aquecidas a 58°C e medido o decaimento de quimiluminescência até atingir a temperatura ambiente (Fig. 16, pág. 65).

Não foi notada mudança significativa na velocidade de decaimento. A experiência foi reprodutível.

2- Quando os voluntários receberam uma dose oral de 500 mg de ácido ascórbico, notou-se um efeito de supressão da emissão espontânea. Esta supressão foi significativamente maior no não fumante comparado ao fumante. O estudo das amostras colhidas em tempos consecutivos, após a ingestão da droga, mostrou que a emissão retornava a intensidade original. (Fig. 20, pág. 75).

3- As urinas foram submetidas a ação de vários agentes químicos detectores de espécies ativadas de Oxigênio (Tabela 14, pág. 76).

Notou-se um aumento significativo de quimiluminescência na presença de sais de ferro (formadores de radicais), DABCO (evidenciador de emissão dimol de oxigênio singlete), e carbonato (CO_2 forma que emite quando na presença de $\text{OH}^{\bullet}$). (Tab. 15, pág. 82). Houve uma supressão de quimiluminescência na presença de: Catalase (reage com H_2O_2) a 60°C , benzoato, formiato, tiouréia e manitol (supressores de $\text{OH}^{\bullet}$), e histidina (supressor de $^1\text{O}_2^*$). (Tab. 15 pág. 82). Entretanto o efeito observado com catalase, a 20°C , aparentemente é devido a efeito de proteína, pois quando inativada apresentou valores semelhantes. Assim, a supressão da emissão por catalase só ocorreu a temperaturas altas. O mesmo foi notado com

SOD. Com EDTA, notou-se um pequeno efeito aumentador, próprio de complexação com metais, operando como catalisador para formação de radicais. É sabido que nestas oxidações os grupos carbonilos eletronicamente excitados tem um papel importante, mas na presença de DBAS (aumentador de emissão de carbonilos tripletes) e DPAS (aumentador de emissão de carbonilos singletes) não houve o resultado esperado.

Estes resultados indicam a presença de $\text{OH}^\bullet$, (radical hidroxilo), possivelmente O_2^- (superóxido ânion) e $^1\text{O}_2^*$ (oxigênio singlete) como espécies ativadas de oxigênio presentes na urina.

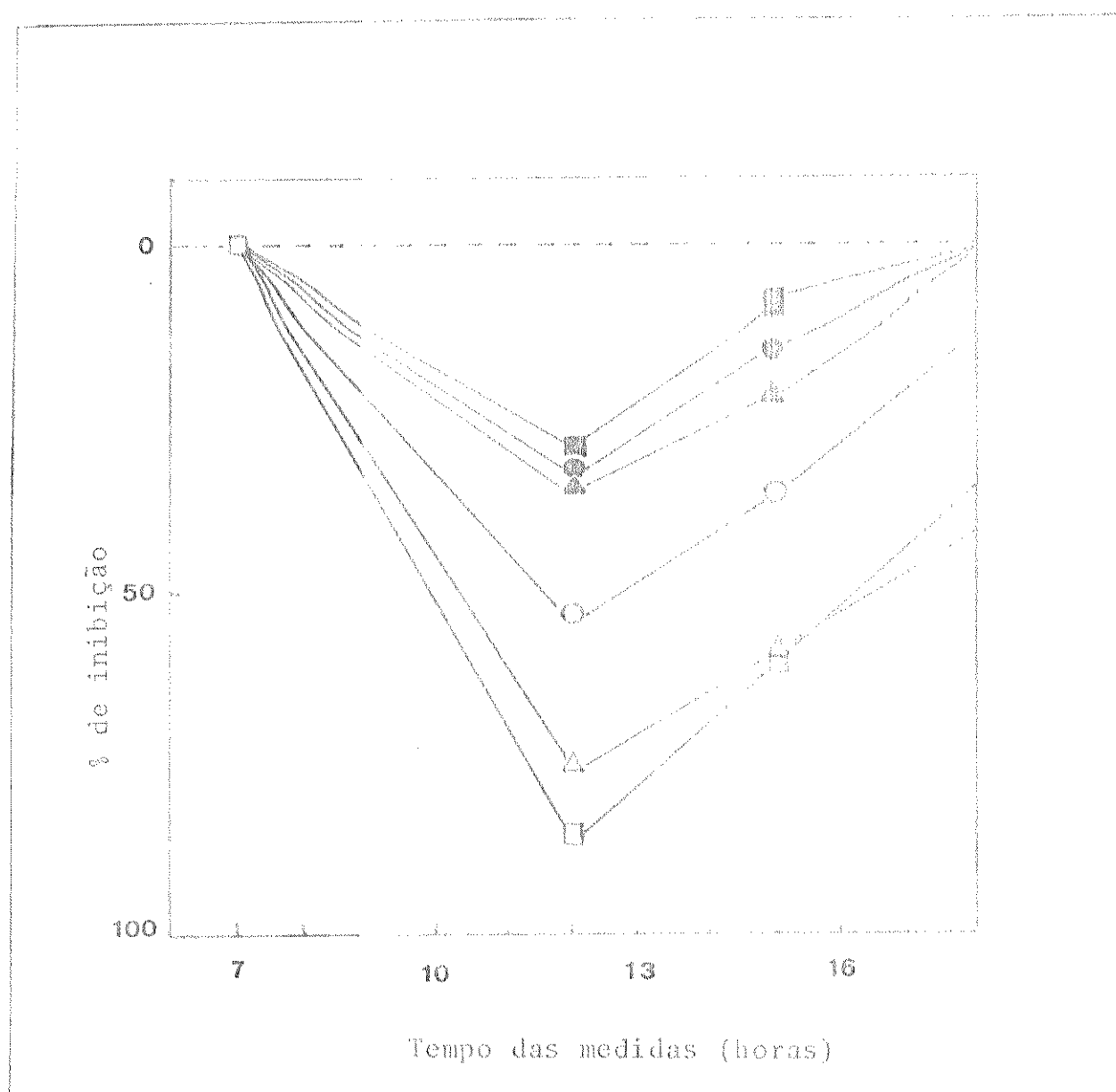


Figura 20 - Inibição de quimiluminescência provocada pela ingestão de 500 mg de ácido ascórbico às 7:00 A.M. —□— pH nativo, —Δ— pH 10,0, —○— pH 1,0. Em escuro: fumantes.

TABELA 14

Efeito de vários agentes na quimiluminescência espontânea da Urina

Compostos	Intensidade contagem/6 seg.				Ação
	Fumante		não Fumante		
	20 ⁰ C	60 ⁰ C	20 ⁰ C	60 ⁰ C	
Controle	1,00	1,00	1,00	1,00	sem agente
Catalase (150 unidades)	1,48	0,86	2,00	0,78	supressor de H ₂ O ₂
Catalase (360 unidades)	1,23	0,86	1,36	0,44	supressor de H ₂ O ₂
Catalase (300 unidades, Desnaturado)	1,12	1,12	1,39	1,06	-
SOD (150 unidades)	1,12	0,65	0,95	0,90	supressor de O ₂ ⁻
SOD (300 unidades, Des- naturado)	1,17	0,86	1,32	1,04	-
Benzoato (10 mM)	0,98	0,88	0,95	0,89	supressor de OH [•]
Manitol (10 mM)	0,96	0,86	0,76	0,85	supressor de OH [•]
Formiato (10 mM)	0,73	0,84	1,11	0,69	supressor de OH [•]
Bicarbonato (10 mM)	5,68	2,78	8,94	4,74	evidenciador de OH [•]
DABCO (10 mM)	1,27	0,98	1,38	1,52	evidenciador de ¹ O ₂
DABCO (20 mM)	3,35	2,42	2,26	1,29	evidenciador de ¹ O ₂
Histidina (10 mM)	0,99	0,77	-	-	supressor de ¹ O ₂
DPAS (50 μM)	0,96	0,64	5,36	0,76	evidenciador O^* Singlete
DBAS (50 μM)	0,98	0,75	0,98	1,00	evidenciador O^* triplete
FE ⁺⁺ (10 mM)	21,34	1,61	3,58	0,72	formador de Radicais
EDTA (10 mM)	1,62	1,70	1,63	2,15	formador de complexações de metais
Tiouréia (10 mM)	0,77	0,51	0,65	0,52	supressor de ¹ O ₂ e OH [•]

3.2.3 - Fracionamento da Urina

Uma amostra de 3 ml de urina normal e outra de câncer foram fracionadas numa coluna de 33x3 cm com ~5 cm de altura com sephadex G-25-40. Foram retiradas 15 frações de 3 ml, sendo o eluente água destilada. Foi medida em cada fração a emissão em contador de cintilação líquida e a absorção em espectrofotômetro a 280 nm.

Os resultados foram plotados em intensidades relativas no gráfico mostrado na Fig. 21 e 22 (pág. 78).

A emissão revela a quantidade relativa de quimiluminescência em cada fração, enquanto a absorção mostra a quantidade relativa de proteína.

O gráfico mostra quimiluminescência em certas frações da urina, em três picos característicos. Observação interessante é que há coincidência de todos os picos de quimiluminescência com alguns dos picos de proteína.

URINA

21

NORMAL

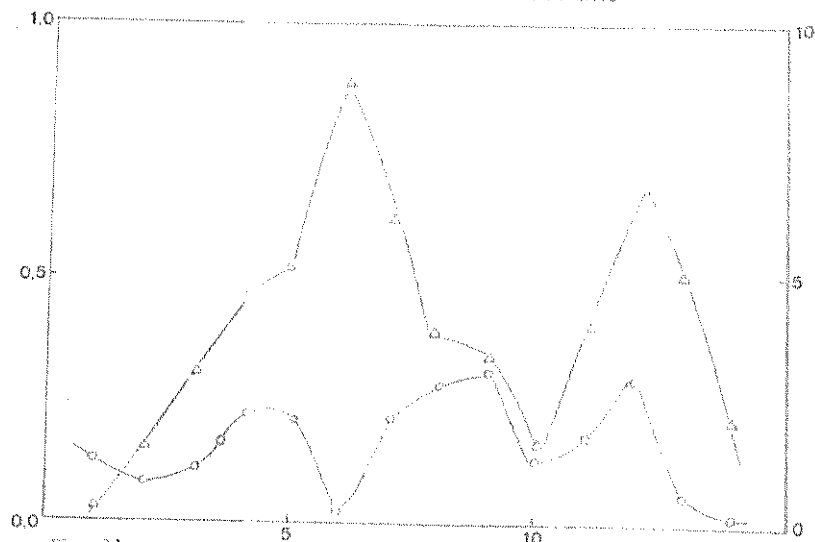


Fig. 21

CÂNCER

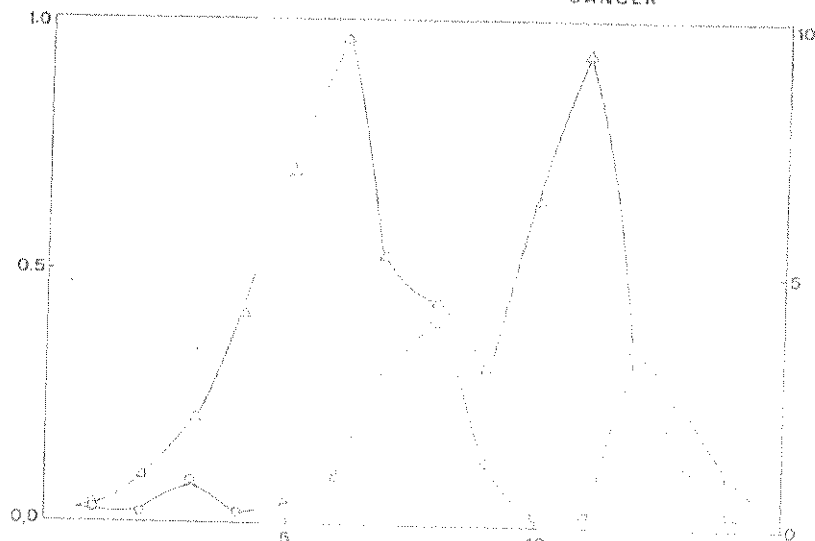


Fig. 22

Nº DE FRAÇÕES

Figuras 21, 22- Gráfico mostrando a coração quasi luminescente e a absorção a 280 mμ de amostras de urina normal e câncer, após o fracionamento em coluna de sephadex.

INTENSIDADE DE QUILUMINESCÊNCIA (CM X 10-5, 1-7)

ABSORÇÃO A 280 mμ

pelos dois métodos uma série de dados, a fim de examinar a tendência dos mesmos e quem sabe até propor alguma relação empírica. O que podemos a priori dizer é que, as entalpias de ligação cálcio-oxigênio obtidas por nós se aproxima do valor de entalpia de ligação níquel-nitrogênio (90). Notamos que o nosso valor é superior ao encontrado para $\bar{D}(\text{Ni-O})$ no aquo complexo.

Este tipo de Estudo sistemático iniciado, se levado a frente, apresentará sem dúvida bons resultados, ficando então, na dependência de se ter dados cristalográficos convenientes.

7. CONCLUSÕES GERAIS

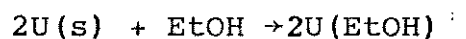
Os dados obtidos neste trabalho nos permitem chegar às seguintes conclusões:

- 1 - Foram isolados os adutos $\text{ZnX}_2 \cdot 2\text{U}$ ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br} \text{ e } \text{I}$), $\text{CdX}_2 \cdot \text{U}$ ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br} \text{ e } \text{I}$), $\text{CdX}_2 \cdot 2\text{U}$ ($\text{X} = \text{Br} \text{ e } \text{I}$) e $\text{HgX}_2 \cdot \text{U}$ ($\text{X} = \text{Cl} \text{ e } \text{Br}$), os quais após a caracterização foram estudados termoquimicamente.
- 2 - Os resultados das análises térmicas, indicam que os adutos decompõem-se ao aquecimento. Os espectros de massa não apresentam o íon molecular do aduto. Estes dados sugerem que os adutos não existem em fase gasosa.
- 3 - Os espectros infravermelho apresentam um deslocamento das bandas CO e CN para regiões de frequências mais baixa e mais alta respectivamente, indicando que o ligante coordena-se ao metal pelo átomo de oxigênio.
- 4 - Foram feitas as dissoluções dos adutos, haletos e ligantes, em solvente adequado, por via calorimétrica. Através de ciclos termoquímicos, foram calculadas as entalpias padrão da reação ácido base ($\Delta H_R^\ominus$), entalpia padrão de formação ($\Delta H_f^\ominus$), entalpia padrão de decomposição ($\Delta H_D^\ominus$) e entalpia padrão reticular ($\Delta H_M^\ominus$).
- 5 - Para os adutos de mesma estequiometria, os valores de $\Delta H_R^\ominus$ possibilitam a obtenção da acidez dos haletos. No nosso caso os valores indicam a sequência $\text{Zn} > \text{Cd} > \text{Hg}$.

- 6 - Usando-se a hipótese de que a entalpia de sublimação do aduto seja igual a entalpia de sublimação de um mol do ligante, foi possível estimar a entalpia da ligação metal-oxigênio $\bar{D}(M-O)$, obtendo-se a sequência: $\bar{D}(Zn-O) > \bar{D}(Cd-O) > \bar{D}(Hg-O)$.
- 7 - Comparando-se os resultados obtidos neste trabalho com aqueles dos derivados metilados da uréia a ordem de basicidade dos ligantes obedece a sequência: $TMU > DMU > U > MU$.
- 8 - Com base no parâmetro $\Delta H_F^\ominus$, a estabilidade termodinâmica reflete a sequência bisadutos $>$ monoadutos. Os dados de $\Delta H_M^\ominus$ e $\Delta H_D^\ominus$ também indicam a mesma sequência.
- 9 - O aduto $CaBr_2 \cdot 6U$ foi também estudado termoquimicamente, com a finalidade de se obter a entalpia de ligação cálcio-oxigênio, sendo para isto calculada a energia reticular a partir de dados cristalográficos. A entalpia de ligação cálcio-oxigênio difere pelos dois métodos empregados.

8. APÊNDICE

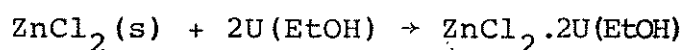
Tabela 13. Efeito térmico do processo:



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
5,37	8,94	1,268
11,06	18,41	2,573
15,81	26,32	3,653
16,91	28,16	3,733
18,99	31,62	4,407

$$\Delta H^{\ominus} = (13,78 \pm 0,17) \text{ kJ.mol}^{-1}$$

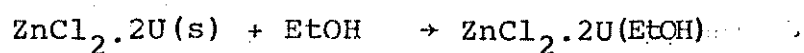
Tabela 14. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
17,94	13,16	-5,965
19,19	14,08	-6,278
21,54	15,81	-7,118
29,89	21,93	-9,785

$$\Delta H^{\ominus} = -(45,04 \pm 0,21) \text{ kJ.mol}^{-1}$$

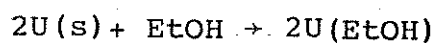
Tabela 15. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
4,34	1,69	0,484
14,29	5,57	1,584
16,30	6,36	1,780
18,46	7,20	1,987
26,29	10,26	2,936
41,68	16,27	4,639

$$\Delta H^\ominus = (28,46 \pm 0,14) \text{ kJmol}^{-1}$$

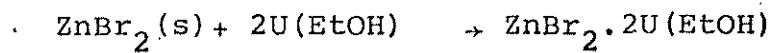
Tabela 16. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
9,36	15,58	2,120
9,47	15,77	2,193
18,60	30,97	4,130
24,41	40,64	5,271
34,05	56,69	8,080

$$\Delta H^\ominus = (13,74 \pm 0,28) \text{ kJmol}^{-1}$$

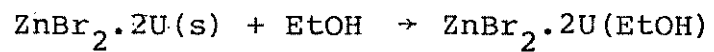
Tabela 17. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
17,75	7,88	-4,501
31,87	14,15	-8,485
45,76	20,32	-12,060
63,84	28,35	-16,017

$$\Delta H^\ominus = -(57,89 \pm 0,87) \text{kJmol}^{-1}$$

Tabela 18. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
13,47	3,90	0,612
18,70	5,41	0,851
21,94	6,35	0,979
23,04	6,67	1,028
33,99	9,84	1,497

$$\Delta H^\ominus = (15,39 \pm 0,09) \text{kJmol}^{-1}$$

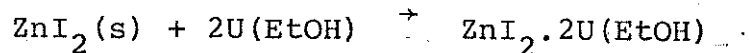
Tabela 19. Efeito térmico do processo



m/mg	$10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
11,82	19,68	2,735
16,48	27,44	3,724
18,39	30,62	4,290
19,73	32,85	4,645
20,06	33,40	4,653

$$\Delta H^\ominus = (13,93 \pm 0,09) \text{ kJmol}^{-1}$$

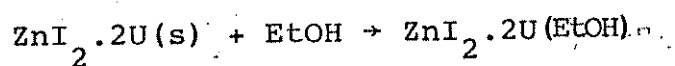
Tabela 20. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
31,41	9,84	-5,587
43,79	13,72	-7,853
48,86	15,31	-8,986
52,42	16,42	-9,436
55,20	17,29	-9,923

$$\Delta H^\ominus = -(57,61 \pm 0,30) \text{ kJmol}^{-1}$$

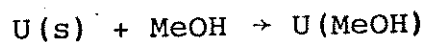
Tabela 21. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
16,55	3,77	1,500
18,30	4,17	1,622
19,28	4,39	1,664
21,20	4,83	1,740

$$\Delta H^\ominus = (37,91 \pm 0,82) \text{kJmol}^{-1}$$

Tabela 22. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
8,45	14,07	1,710
9,81	16,33	1,991
11,71	19,50	2,500
12,19	20,30	2,480
17,53	29,19	3,621
20,03	33,35	4,120

$$\Delta H^\ominus = (12,38 \pm 0,08) \text{kJmol}^{-1}$$

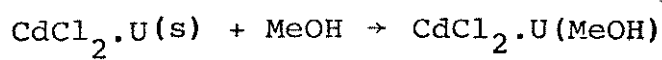
Tabela 23. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
35,76	19,51	-6,003
47,59	25,96	-8,070
53,51	29,19	-9,031
61,16	33,36	-10,389

$$\Delta H^\ominus = -(31,02 \pm 0,07) \text{ kJmol}^{-1}$$

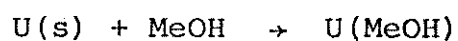
Tabela 24. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
75,31	30,94	0,751
84,04	34,53	0,865
100,10	41,13	1,320
114,70	47,13	1,354
118,23	48,58	1,501

$$\Delta H^\ominus = (2,90 \pm 0,15) \text{ kJmol}^{-1}$$

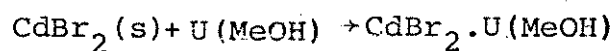
Tabela 25. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
8,05	13,40	1,589
11,86	19,75	2,109
12,11	20,16	2,503
15,48	25,77	3,219
17,30	28,80	3,597
18,35	30,55	3,689

$$\Delta H^\ominus = (12,30 \pm 0,09) \text{ kJmol}^{-1}$$

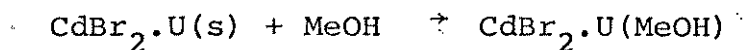
Tabela 26. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
53,76	19,75	-4,950
54,91	20,17	-4,897
70,16	25,77	-6,167
78,41	28,80	-6,938
83,18	30,56	-7,220

$$\Delta H^\ominus = -(24,06 \pm 0,22) \text{ kJmol}^{-1}$$

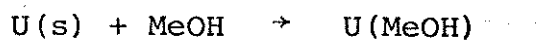
Tabela 27. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
28,22	8,49	0,219
28,35	8,53	0,192
34,38	10,35	0,225
47,18	14,20	0,327

$$\Delta H^\ominus = (2,20 \pm 0,15) \text{ kJmol}^{-1}$$

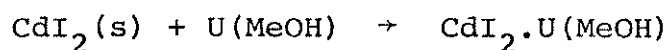
Tabela 28. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
4,83	8,04	1,101
5,31	8,84	1,155
7,35	12,24	1,588
8,44	14,05	1,832

$$\Delta H^\ominus = (13,11 \pm 0,13) \text{ kJmol}^{-1}$$

Tabela 29. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
20,55	5,61	-1,333
29,46	8,04	-1,992
32,38	8,84	-2,161
44,82	12,24	-3,055
51,46	14,05	-3,606

$$\Delta H^\ominus = - (25,04 \pm 0,28) \text{ kJmol}^{-1}$$

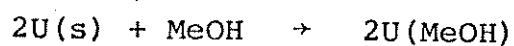
Tabela 30. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
23,34	5,48	-0,960
33,21	7,79	-1,368
35,69	8,37	-1,749
57,95	13,59	-2,444

$$\Delta H^\ominus = - (18,09 \pm 0,22) \text{ kJmol}^{-1}$$

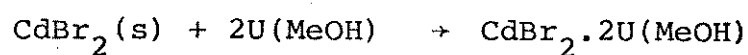
Tabela 31. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
5,98	9,96	1,292
8,58	14,29	1,817
10,48	17,45	2,231
11,99	19,96	2,491

$$\Delta H^\ominus = (12,64 \pm 0,10) \text{ kJmol}^{-1}$$

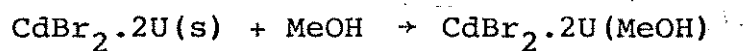
Tabela 32. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
13,55	4,98	-1,177
19,45	7,15	-1,670
23,76	8,73	-2,072
27,18	9,98	-2,372

$$\Delta H^\ominus = -(23,64 \pm 0,11) \text{ kJmol}^{-1}$$

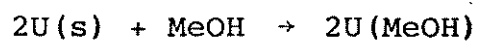
Tabela 33. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
33,83	8,62	1,101
38,85	9,90	1,283
48,39	12,33	1,660
57,95	14,77	1,890
59,96	15,28	2,052

$$\Delta H^\ominus = (13,14 \pm 0,16) \text{ kJmol}^{-1}$$

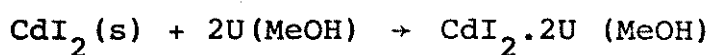
Tabela 34. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
8,74	14,55	1,833
9,60	15,98	1,958
14,74	24,54	2,844
16,12	26,84	3,355
17,35	28,89	3,538

$$\Delta H^\ominus = (12,20 \pm 0,18) \text{ kJmol}^{-1}$$

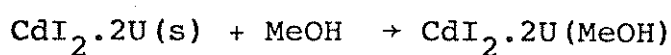
Tabela 35. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
26,65	7,28	-1,818
29,27	7,99	-2,028
44,12	12,05	-3,003
49,15	13,42	-3,422
52,89	14,44	-3,686

$$\Delta H^\ominus = -(25,33 \pm 0,13) \text{kJmol}^{-1}$$

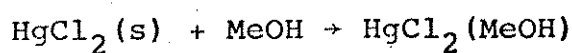
Tabela 36. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
25,52	5,25	0,345
29,34	6,03	0,397
30,69	6,31	0,431
31,33	6,44	0,444

$$\Delta H^\ominus = (6,74 \pm 0,08) \text{kJmol}^{-1}$$

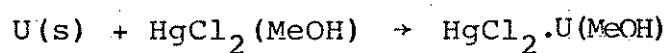
Tabela 37. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
53,25	19,61	-0,603
61,75	22,74	-0,687
65,55	24,14	-0,640
79,10	29,13	-0,883
94,96	34,98	-0,953
100,95	37,18	-1,139

$$\Delta H^\ominus = -(2,92 \pm 0,08) \text{ kJmol}^{-1}$$

Tabela 38. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
11,78	19,61	2,300
13,66	22,74	2,703
14,50	24,14	2,847
15,82	26,34	3,085
16,25	27,06	3,161
17,50	29,14	3,460

$$\Delta H^\ominus = (11,78 \pm 0,04) \text{ kJmol}^{-1}$$

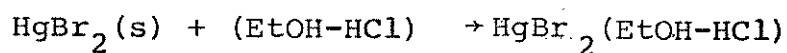
Tabela 39. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
25,85	7,80	1,443
30,43	9,20	1,702
35,33	10,65	1,962
42,12	12,70	2,357
46,38	13,99	2,517
58,14	17,53	3,168

$$\Delta H^\ominus = (18,25 \pm 0,10) \text{ kJmol}^{-1}$$

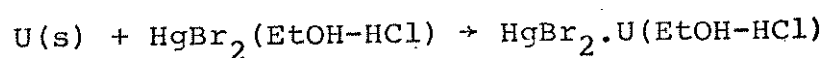
Tabela 40. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
35,47	9,84	3,070
45,63	12,66	4,076
51,81	14,38	4,606
64,73	17,96	5,570
70,30	19,51	6,086

$$\Delta H^\ominus = (31,13 \pm 0,22) \text{ kJmol}^{-1}$$

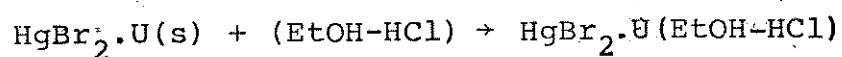
Tabela 41. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
5,91	9,84	1,241
7,60	12,65	1,530
9,36	15,58	1,887
10,79	17,97	2,102
11,72	19,51	2,296

$$\Delta H^\ominus = (11,93 \pm 0,13) \text{ kJmol}^{-1}$$

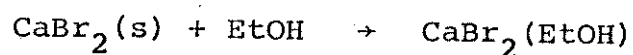
Tabela 42. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
14,27	3,39	1,354
23,89	5,68	2,360
29,38	6,99	2,793
43,68	10,39	4,140
29,83	14,23	5,720

$$\Delta H^\ominus = (40,16 \pm 0,22) \text{ kJmol}^{-1}$$

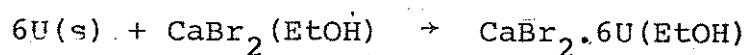
Tabela 43. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
10,68	5,34	-6,544
12,83	6,42	-7,871
15,50	7,75	-9,465
26,78	13,40	-16,401

$$\Delta H^\ominus = - (122,38 \pm 0,08) \text{ kJmol}^{-1}$$

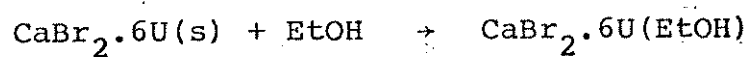
Tabela 44. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
19,25	32,05	3,643
23,13	38,51	4,533
27,94	46,52	5,411
48,28	80,39	9,154

$$\Delta H^\ominus = (11,48 \pm 0,09) \text{ kJmol}^{-1}$$

Tabela 45. Efeito térmico do processo



m/mg	$n \times 10^5/\text{mol}$	Q_{obs}/J
17,48	3,12	1,193
20,44	3,65	1,384
23,87	4,26	1,594
25,32	4,52	1,687

$$\Delta H^\ominus = (37,63 \pm 0,20) \text{ kJmol}^{-1}$$

9. BIBLIOGRAFIA

1. F.A. Cotton and G. Wilkinson, "Advanced Inorganic Chemistry" 4th ed. Interscience Publication, London (1980).
2. B.J. Aylett, "The Chemistry of Zinc, Cadmium and Mercury" , Pergamon, Oxford (1973).
3. A.F. Wells, "Structural Inorganic Chemistry" 4th ed., Clarendon, Oxford (1973).
4. R.G. Pearson, J.Chem.Ed., 45, 581 (1968).
5. J.E. Huheey, "Inorganic Chemistry, Principles of Structure and Reactivity", Harper & Row Publishers, London (1972).
6. I. Lindqvist, "Inorganic Adduct Molecules of Oxo-Compounds", Springer Verlag (1963).
7. D. Nicholls, "Complexes and First-Row Transition Elements", American Elsevier Publishing, Liverpool (1974).
8. W.B. Jensen, "The Lewis Acid-Base Concepts", Wiley Interscience Publication, New York (1980).
9. V. Gutmann, "The Donor-Acceptor Approach to Molecular Interactions", Plenum, London (1978).
10. E.C. Constable, Coord.Chem.Rev., 85, 5 (1982).
11. R.J. Berni, R.R. Benerito, W.M. Ayres and H.B. Jonassen, J . Inorg.Nucl.Chem., 25, 807 (1963).
12. D.P. Graddon, K.B. Heng and E.C. Watton, Aust.J.Chem., 19, 1801(1966).
13. C.W. Frank and L.B. Rogers, Inorg.Chem., 5, 615 (1966).

14. M. Nardelli, L. Cavalca e G. Fava, *Gazz.Chim.Ital.*, 87, 1232 (1957).
15. M. Nardelli, L. Coghi and G. Azzoni, *Gazz.Chim. Ital.*, 88, 235 (1958).
16. J. Zabicky, "The Chemistry of Amides", p. 2, Interscience Publishers, London (1970).
17. J.J. Lagowski, "The Chemistry of Nonaqueous Solvents", Academic, vol. IV (1976).
18. H.M. Huffman, *J.Am.Chem.Soc.*, 62, 1009 (1940).
19. Bergmann and Weizmann, *Trans. Faraday Soc.*, 34, 783 (1938).
20. W.D. Kumler and G.M. Fohlen, *J.Am.Chem.Soc.*, 64, 1944 (1942).
21. P. Vaughan and J. Donohue, *Acta Cryst.*, 5, 530 (1952).
22. W.E. Keller, *J.Chem.Phys.*, 16, 1003 (1948).
23. R.D. Waldron and R.M. Badger, *J.Chem.Phys.*, 18, 566 (1950).
24. E.R. Andrew and D. Hyndman, *Discussions Faraday Soc.*, 19, 195 (1955).
25. N. Sklar, M.E. Senko and B. Post, *Acta Cryst.*, 14, 716 (1961).
26. A. Caron and J. Donohue, *Acta Cryst.*, B25, 404 (1969).
27. D. Cook, *J.Am.Chem.Soc.*, 80, 49 (1958).
28. J.E. Stewart, *J.Chem.Phys.*, 26, 248 (1957).
29. R.M. Badger and R.D. Waldron, *J.Chem.Phys.*, 26, 255 (1957).
30. C. Airoidi, A.P. Chegas and F.P. Assunção, *Can.J.Chem.*, 60, 2132 (1982).
31. T.A. Zordan, D.G. Hurkot, M. Peterson and L.G. Hepler, *Thermo*

- chim. Acta, 5, 21 (1972).
32. C. Neubauer and G. Kerner, Liebigs Ann.Chem., 101, 340 (1957).
 33. G. Ruspaggiari, Gazz.Chim.Ital., 27, 6 (1897).
 34. L. Belladen and A. Ciampa. Gazz.Chim.Ital., 54, 568 (1924).
 35. M. Nardelli, A. Braibanti and I. Chierici, Gazz.Chim.Ital., 87, 1226 (1957).
 36. R.B. Penland, S. Mizushima, C. Curran and J.V. Quagliano, J. Am.Chem.Soc., 79, 1575 (1957).
 37. P.M. Burkinshaw and C.T. Mortimer, Coord.Chem.Rev., 48, 101 (1983).
 38. H.A.O. Hill, Chem.Brit., 12, 119 (1976).
 39. R.J.P. Williams, Chem.Brit., 19 1009 (1983).
 40. L. Lebioda, Acta Cryst., B36, 271 (1980).
 41. N.S. Antonenko and Ya. A. Nuger, Russ.J.Inorg.Chem., 11, 578 (1966).
 42. K. Lewinski, J. Sliwinski and L. Lebioda, Inorg.Chem., 22, 2339 (1983).
 43. R.A. Jorge, Termoquímica dos Adutos entre Trifenilfosfinóxido e Cloreto de Zinco e Cádmio e Mercúrio", Tese de Mestrado, IQ-UNICAMP (1976).
 44. A.S. Gonçalves, "Síntese e Caracterização de Compostos de Adição de Zn(II), Cd(II) e Hg(II) com N-(2-piridil)acetamida, e Estudo Termodinâmico dos Respectivos Haletos", Tese de Mestrado, IQ-UNICAMP (1976).
 45. J.C. Queiroz, "Termoquímica de Adutos entre Tribenzil e Trie

- tilfosfinóxidos com Cloretos de Zinco, Cádmio e Mercúrio(II)", Tese de Mestrado, IQ-UNICAMP (1979).
46. C. Airoidi, A.P. Chagas and M. Namora Filho, J.Inorg.Nucl. Chem., 43, 89 (1981).
 47. J.A. Simoni, "Termoquímica dos Adutos entre N.N-dimetilacetamida e Haletos de Zinco, Cádmio e Mercúrio-II", Tese de Mestrado, IQ-UNICAMP (1978).
 48. F.P. Assunção, "Síntese, Caracterização e Termoquímica de Adutos entre Metil, N,N-dimetil e Tetrametiluréia com Haletos de Zinco, Cádmio e Mercúrio-II", Tese de Doutorado, IQ-UNICAMP (1980).
 49. O.A. Oliveira, "Preparação, Caracterização e Termoquímica de Adutos entre N,N-Dimetilformamida com Haletos de Zinco(II) , Cádmio(II) e Mercúrio(II)", Tese de Doutorado, IQ-UNICAMP (1981)
 50. C. Airoidi, Inorg.Chem., 20, 998 (1981).
 51. J.M.M.M. Lira, "Interação de Haletos de Antimônio(III) com Amidas em Solução de 1,2-Dicloroetano", Tese de Mestrado, IQ - UNICAMP, (1981).
 52. J.C. Queiroz, "Adutos entre Haletos da Família do Zinco com Hexametilfosforamida e Trifenilfosfinóxido: Um Estudo Termo - químico", Tese de Doutorado, IQ-UNICAMP (1983).
 53. A.I. Vogel, "Análise Orgânica Qualitativa", tradução da 3.ed. Ao Livro Técnico S.A., vol. 1, Rio de Janeiro (1977).
 54. R.T. Hamilton, J.A.V. Butler, J.Chem.Soc., 2283 (1932).
 55. D. Christov, Campt.Rend.Acad.Bulgare Sci., 16, 177 (1963) - Chem.Abst., 60, 1310g (1964).

56. H.A. Flaschka, "EDTA Titration, An Introduction to Theory and Practice", Pergamon, 2th ed. (1967).
57. D. Zugmunt, Roczn. Chem., 44, 687 (1970).
Chem. Abstr., 73, 60015a (1970).
58. G. Schwarzenbach and H.A. Flaschka, "Complexiometric Titration", Methuen & Co. Ltd., London, (1969).
59. W.W.M. Wendlandt "Thermal Methods of Analysis", John Wiley & Sons, p. 179 (1974).
60. Manual de Termobalança TGS-1, Perkin-Elmer Co., Norwalk, Connecticut, U.S.A.
61. I. Wadsö, "Science Tools", 13, 33 (1966).
62. M.L.C.P. Silva, "Termoquímica de Adutos de Ligantes Heterocíclicos com Cloreto de Zinco, Cádmio e Mercúrio", Tese de Doutorado, IQ-UNICAMP (1985).
63. International Union of Pure and Applied Chemistry, Commission of Physicochemical Measurements and Standards Sub-Commission on Calibration and Test Materials. E.F.G. Henrington, Pure Appl. Chem., 40, 392 (1974).
64. J. Irving and I. Wadsö, Acta Chem. Scand., 18, 195 (1964).
65. S. Sunner and I. Wadsö, Science Tools, 13, 1 (1964).
66. G. Ojelund and I. Wadsö, Acta Chem. Scand., 21, 1838 (1967).
67. J.D. Hill, G. Ojelund and I. Wadsö, J. Chem. Thermodynamics, 1, 111 (1969).
68. C.E. Wanderzee and D.L. King, J. Chem. Thermodynamics, 4, 675 (1972).

69. J.L. Curnutt, Ph.D. Thesis University of Nebraska (1968), citada na referência 68.
70. S.R. Gunn, J.Chem. Thermodynamics, 2, 535 (1970).
71. S.R. Gunn, J.Chem. Thermodynamics, 3, 19 (1971).
72. G.L. Squares, "Practical Physics", McGraw-Hill, London (1968).
73. M.A. Baldwin, A.M. Kirkien-Konasiewicz, A.G. Loudon, A. Maccoll and D. Smith, J.Chem.Soc. B, 34 (1968).
74. R.A. Bailey and W.J. Tangredi, J.Inorg.Nucl.Chem., 38, 2221 (1976).
75. A. Yamaguchi, T. Miyazawa, T. Shimanouchi and S. Mizushima. Spectrochim. Acta, 10, 170 (1957).
76. K. Nakamoto, "Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds", John Wiley and Sons, Inc., New York 3th ed., p. 342 (1977).
77. D.D. Wagman, W.H. Evans, S.V.B. Parker, R. Schumm, I. Halow, S.M. Bailey, K.L. Churney and R.L. Nuttall, "The NBS Tables of Chemical Thermodynamic Properties", J.Phys.Chem. Reference Data (1982), 11, Supplement nº 2.
78. O. Kubachewski, E.L. Evans and C.B. Alcock, "Metallurgical Thermochemistry", Pergamon (1967).
79. F.J. Keneshea and Cubicciotti, J.Chem.Phys., 40, 1778 (1964).
80. K. Suzuki, S. Ōnishi, T. Koide and S. Seki, Bull.Chem.Soc. Jpn., 29, 127 (1956).
81. S.J. Ashcroft, J.Chem.Soc., A, 1020 (1970).
82. R.A. Jorge, C. Airolidi and A.P. Chagas, J.Chem.Soc. Dalton

Trans., 1102 (1978).

83. C. Airoidi, A.P. Chagas and A.S. Gonçalves, *Thermochim.Acta*, 33, 371 (1979).

84. J.A. Simoni, C. Airoidi and A.P. Chagas, *J.Chem.Soc. Dalton Trans.*, 156 (1980).

85. J.C. Queiroz, C. Airoidi and A.P. Chagas, *J.Inorg.Nucl.Chem.*, 43, 1207 (1981).

86. F.P. Assunção, A.P. Chagas and C. Airoidi, *J.Chim.Phys.*, 79, 253 (1982).

87. C. Airoidi, A.P. Chagas and F.P. Assunção, *J.Chem.Soc.Dalton Trans.*, 1823 (1980).

88. O.A. Oliveira, A.P. Chagas and C. Airoidi, *Inorg.Chem.*, 22, 136 (1983).

89. P.M. Burkinshaw and C.T. Mortimer, *J.Chem.Soc. Dalton Trans.*, 75 (1984).

90. S.J. Ashcroft, *J.Inorg.Nucl.Chem.*, 33, 603 (1971).

91. K.B. Yatsimirskii, *Russ.J.Inorg.Chem.*, 6, 265 (1961).

92. L. Lebioda and K. Stadnicka, *Acta Cryst.*, B33, 2905 (1977).

93. D.E. Sands, "Introducion A La Cristalografia," Editorial Re - verté, S.A., Barcelona, 1974.

5. G.C. Gisler, N. Durán e J. Diaz.

"Ácido fólico oxidase em casos normais e em câncer. Valor como marcador proteico".

XI Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Abril de 1982, Caxambu, M.G. - Brasil.

6. G.C. Gisler, J. Diaz e N. Durán.

"Espécies eletronicamente excitadas em fluidos biológicos e seu uso na detecção de condições fisiológicas e patológicas".

XI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Abril de 1982, Caxambu, M.G. - Brasil.

7. N. Durán, G.C. Gisler e J. Diaz.

"Singlet Oxygen Emission as Marker for Cancer. A Simple Chemiluminescent method".

Fifth International Symposium Prevention and Detection of Cancer, Maio de 1982, S.P. - Brasil.

B - PUBLICAÇÕES

1. G.C. Gisler, L.H. Innocentini e N. Durán

"Inativação da Xantino-oxidase pelos catabólitos do ácido fólico em células de câncer" (Resumo).

Química Nova, 4, 22 (1981).

2. G.C. Gisler e N. Durán

"Estudos em fotobioquímica: Proteína e eritrócitos catalisa a formação de oxigênio singlete em casos de câncer" (Resumo)

Arq. Biol. Tecnol. 24, 85 (1981).

3. G.C. Gisler, J. Diaz e N. Durán.
"Especies eletronicamente excitadas em fluidos biológicos e seu uso na detecção de condições fisiológicas e patológicas" (Resumo).
Arq. Biol. Tecnol. 25, 152 (1982).
4. G.C. Gisler, J. Diaz e N. Durán.
"Ácido fólico oxidase em casos normais e em câncer. Valor como marcador proteico" (Resumo).
Arq. Biol. Tecnol. 25, 168 (1982).
5. N. Durán, G.C. Gisler e J. Diaz.
"Singlet oxygen emission as marker for cancer. A simple chemiluminescent method" (Resumo).
Cancer Detect. Prevent. 5, 91 (1982).
6. G.C. Gisler, J. Diaz e N. Durán.
"Electronically Exited species in the spontaneous chemiluminescence of urine and its use in the detection of pathological conditions"
Physiol. Chem. Phys. (Submetido).
7. G.C. Gisler, J. Diaz e N. Durán.
"Observations on blood plasma chemiluminescence in normal subjects and cancer patients".
Clin. Biochem. (Submetido).
8. N. Durán, G.C. Gisler e J. Diaz.
"Singlet oxygen emission as marker for cancer: Folic acid metabolism"
Cancer Res (Submetido).

- SEMINÁRIOS

1. Atividade da ácido fólico oxidase em eritrócitos de casos normais e câncer.

Apresentado em 9-6-1981. UNICAMP

2. Detecção de câncer.

Apresentado em 14-4-1982. UNICAMP

3. Aplicação de métodos fotoquímicos e bioquímicos na detecção do câncer.

Apresentado em 17-6-1982. UNICAMP