

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Este exemplar cedido a
votação final do tese de
pós-graduação H. Innocentini Mei e
operado pelo comitê fulpodeve.

Nelson Durán

19/12/86.

"INTERAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE E ESPÉCIES
TRIPLETES, GERADOS EM SISTEMAS BIOENERGIZADOS
E FOTODINAMICO, COM O ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEI
CO (DNA)".

Lúcia Helena Innocentini Mei

Prof.Dr. Nelson Durán

Tese de Doutorado

Campinas

-1986-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A minha mãe, com imenso carinho.

Ao Prof.Dr. Nelson Durán, pela orientação e dedicação dispensadas durante o decorrer deste trabalho.

A Profa.Dra. Adelaide Faljoni-Alário (IQ-USP), pela valiosa colaboração na obtenção dos espectros de C D.

Ao Prof.Dr. Giuseppe Cilento (IQ-USP) e aos Profs.Dra.Maria Edwiges Hoffmann, Dr.Hiroshi Aoyama e Neuza Maria Barboza (IB-UNICAMP), por terem permitido prontamente o uso de seus laboratórios e materiais necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

A Profa.Dra.Nora Marcela Haun Quirós (IB-UNICAMP), pela ajuda nos ensaios com gradiente de sacarose.

Ao Pili, pelas correções do inglês.

A Maria Aparecida de Souza, pela pronta colaboração em todas as horas.

A Cristina, Héctor, Raúl, Jaime e Edgardo que, além da amizade, me auxiliaram na parte experimental e nas discussões acadêmicas transcorridas ao longo deste período.

Ao meu esposo Paulo, pelo apoio e incentivo nas horas difíceis.

A Eliete e Roseli, pela eficiência nos serviços de secretaria.

Ao Jorge, pela pronta colaboração na confecção dos desenhos.

Ao Laurindo, Ricardo e Paulo, pelos serviços de xerox.

A FAPESP, CNPq, FINEP, CAPES, OEA e UNESCO pelo apoio financeiro.

ABREVIACOES

AFo.....	Ácido fólico.
Bill.	Bilirrubina.
BSA.....	Albumina de soro bovino.
CD.....	Dicroísmo circular.
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico.
dA.....	desoxiadenosina
dC.....	desoxicitosina
dG.....	desoxiguanina
dT.....	desoxitimina
E.coli.....	Escherichia coli.
EDTA.....	Ácido etilenodiaminotetracético.
GSH.....	Glutathiona.
GMP.....	Guanosina monofosfato.
HRP.....	Horseradish peroxidase.
HSA.....	Albumina de soro humano.
HA.....	Albumina de soro de cavalo.
IAA.....	Ácido indol-3-acético.
IAA(2-C ¹⁴).....	Ácido indol-3-acético marcado com carbono 14.
IAL.....	Indol-3-aldeído.
³ IAL*	Indol-3-aldeído no estado excitado triplete.
IV.....	Infra vermelho.
MA.....	Malonaldeído.
MDVP.....	4'-metoxycarboniletal-4,3'-dimetil-3-vinil-2,2'- pirrometenona.
m-RNA.....	Ácido ribonucleico mensageiro.
MS.....	Espectroscopia de massa.
O ₂	Oxigênio molecular.

ABREVIACÖES

$^1\text{O}_2^*$	Oxigênio no estado excitado singleto.
PPO	2,5-difeniloxazolil
POPOP	(1,4-bis[2-(5-feniloxazolil)]benzeno
PA	Albumina de suíno
RNA	Ácido ribonucleico.
r-RNA	Ácido ribonucleico do ribossomo.
RMN	Ressonância magnética nuclear.
RBp	Polímero de rosa bengala.
RSA	Albumina de soro de coelho.
SOD	Superóxido dismutase.
Sens	Sensibilizador.
t-RNA	Ácido ribonucleico de transferência.
Tb(III)	Cátion térbio trivalente.
TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropano.
TLC	Cromatografia de camada delgada.
UV	Ultra violeta.

INDICE

CAPÍTULO I - Introdução	1
1.1 - SISTEMAS BIOLUMINESCENTES (ou BIOENERGISADOS).....	3
1.2 - FORMAÇÃO ENZIMÁTICA DE ESTADOS EXCITADOS.....	5
1.2.1 - Oxidação do isobutiraldeído, produzindo aceto na excitada e ácido fórmico.....	7
1.2.2 - Oxidação do ácido vanilpirúvico à vanilina excitada e oxalato.....	7
1.2.3 - Oxidação do ácido indol-3-acético (IAA).....	7
1.3 - FORMAÇÃO DIRETA DE $^1O_2^*$ EM SISTEMAS BIOENERGISADOS...	10
1.3.1 - Geração de $^1O_2^*$ na degradação de malonaldeído por HRP.....	10
1.3.2 - Geração de $^1O_2^*$ na degradação do ácido fólico por HRP.....	14
1.4 - ÁCIDOS NUCLEICOS.....	19
1.4.1 - Constituintes químicos dos ácidos nucleicos...	20
1.4.2 - Purinas e pirimidinas.....	20
1.4.3 - Nucleosídeos e nucleotídeos.....	22
1.5 - ESTRUTURAS DO DNA.....	24
1.5.1 - Estrutura primária.....	24
1.5.2 - Estrutura secundária.....	25
1.5.2 - Estrutura terciária.....	28
1.6 - OCORRÊNCIA.....	29
1.7 - FUNÇÃO GENÉTICA DO DNA.....	30
1.8 - IRRADIAÇÃO DO DNA.....	32
1.9 - AÇÃO FOTODINÂMICA.....	35
1.10- OXIGÊNIO SINGLETE.....	37
1.10.1- Importância biológica de $^1O_2^*$: Efeitos Gené ticos.....	39

OBJETIVOS DA TESE.....	41
Referências.....	44
CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	50
II.1 - DROGAS UTILIZADAS.....	50
II.2 - EQUIPAMENTOS.....	53
II.3 - PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES.....	54
II.3.1 - Tampões.....	54
II.3.2 - Ácido fólico.....	54
II.3.3 - Ácido indol-3-acético.....	54
II.3.4 - Bilirrubina.....	54
II.3.5 - MDVP.....	54
II.3.6 - Horseradish peroxidase (HRP).....	55
II.3.7 - Catalase.....	55
II.3.8 - Superóxido dismutase (SOD).....	55
II.3.9 - Ácido desoxirribonucleico (DNA).....	55
II.3.10- Incorporação isotópica do DNA.....	56
II.3.11- Cocktail PPO-POPOP.....	56
II.3.12- Incorporação isotópica de IAA(2-C ¹⁴).....	56
II.3.13- Estudos fotodinâmicos usando polímero de rosa bengala (RBP) como sensibilizador.....	57
II.3.14- Filtro para irradiação.....	57
II.3.15- Preparação do DNA para complexação com Tb(III).....	57
II.3.16- Cloreto de térbio hexahidratado.....	58
II.3.17- Citrato de sódio/Cloreto de sódio.....	58
II.3.18- Glutationala.....	58
II.3.19- Malonaldeído sódico.....	59
II.3.20- Hidrólise ácida do DNA.....	59
II.3.21- Reação de DNA com formaldeído.....	60
Referências.....	61

CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
III-1 - DEGRADAÇÃO AERÓBICA DE IAA, NA e Afo, CATALISADA POR HRP.....	62
III-2 - CALCULO DAS CONSTANTES DE ASSOCIAÇÃO-DISSOCIAÇÃO DE BILIRRUBINA-HRP.....	65
III-3 - ESTUDOS COM O ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO.....	88
III.3.A - Reação de DNA com formaldeído.....	97
III.3.B - Complexação e fluorescência do complexo DNA-Tb(III).....	102
III.3.C - Ligação DNA-IAL.....	107
III.3.D - Estudos fotodinâmicos com DNA.....	112
III.3.E - Dicroísmo circular.....	115
III.3.F - Fluorescência de guanina em hidrolisado de DNA.....	122
Conclusões.....	126
Referências.....	128
Apêndices.....	131
I - Cálculo das constantes de "Stern- Volmer".....	131
II - Método da constante de Associação- Dissociação HRP-Bil.....	136
III - Dicroísmo circular.....	138
IV - Detecção de estados excitados em sistemas biológicos : Identificação de $^1O_2^*$	142
V - Bilirrubina : Estruturas, Toxicidade e Fototerapia.....	146
VI - Complexação DNA-Tb(III).....	152

SUMARIO

Tem sido encontradas modificações estruturais no ácido desoxirribonucleico (DNA) após sua interação com o oxigênio singlete, o qual é gerado pelos sistemas enzimáticos oxidativos. Tais sistemas utilizam como substratos o ácido indol-3-acético, o ácido fólico e o malonaldeído. O oxigênio singlete gerado desta maneira, interage com guanina produzindo as modificações mencionadas, as quais foram medidas usando-se o complexo DNA-Tb(III) como sonda fluorescente e a fluorescência direta das bases do DNA após a hidrólise deste. Conclusões idênticas foram obtidas por técnicas de absorção e dicroísmo circular. Estudos fotobloquímicos mostraram que a eficiência de supressão da guanina (quando esta é parte da estrutura do DNA) sobre o oxigênio singlete é maior do que a da base livre, como constatada pelo valor da constante de Stern-Volmer (K_{sv}). Quando a bilirrubina está presente nestes sistemas, ela é capaz de interagir com o oxigênio singlete e dar origem, via formação de um intermediário dioxetânico, à um dos produtos carbonílicos no estado triplete. Isto foi comprovado pelo estudo da transferência de energia ao 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato. A alta constante de supressão de oxigênio singlete pela bilirrubina explica-se, em parte, pela não complexação dela com a peroxidase, como foi mostrado pelos estudos das constantes de associação-dissociação dela com a proteína, à diferentes pHs.

Este trabalho mostra dois aspectos que devem ser considerados para se analisar a relevância da ocorrência de estados excitados em processos biológicos. Um deles está relacionado com as

consequências que os estados excitados causam nas células, referente aos danos oxidativos. O outro está relacionado com o papel funcional destes estados excitados nos sistemas biológicos, para apoiar a existência de reações fotoquímicas no escuro ou iniciar mecanismos de amplificação, nos quais poderiam estar envolvidos alguns processos relacionados às mutações espontâneas, por exemplo.

Esta pesquisa é um passo a mais na compreensão da importância dos estados excitados, gerados enzimaticamente, nos sistemas biológicos mais complexos.

SUMMARY

Structural modifications in desoxyribonucleic acid (DNA) have been found due to its interaction with singlet oxygen generated by oxidative enzymatic systems which use indol-3-acetic acid, folic acid and malonaldehyde. Singlet oxygen produced, interacts with guanine giving rise to the above mentioned modifications which were measured with the DNA-Tb(III) complex as a fluorescent probe and the direct fluorescence of the hidrolised DNA's free bases. The same results were obtained with absorption techniques and circular dicroism. Photobiochemical studies have shown that the efficiency of singlet xygen supression by guanine (when it is part of DNA structure) is higher than for the free base itself, as shown by the values of the Stern-Volmer constant (K_{sv}).

In presence of bilirubin, a carbonylic product in the triplet excited state is formed (via a dioxetanic intermediate) due to interactions of bilirubin with singlet oxygen. This has been shown by the energy transfer studies with 9,10-dibromo anthracen-2-sulfonate. The high value of the singlet oxygen supression constant in presence of bilirubin can be partially explained by the absence of bilirubin's complexation with peroxidase as shown from the studies of bilirrubin's association-dissociation constants with protein, at different pH values.

This work shows two aspects that might be considered to analyse the relevance of excited states in biological processes: the consequences of excited states regarding oxidative damages at cellular levels and their role in biological systems supporting photochemical reactions in the dark or initiating amplification processes which could be related to some spontaneous processes.

This research is a step forward to understand the importance of enzymatically generated excited states in more complex biological systems.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

A emissão de luz por organismos vivos -Bioluminescência- tem atraído a atenção de muitos pesquisadores desde o século passado (1). Enquanto que na bioluminescência se estuda a emissão de fótons provenientes de uma reação química catalisada por uma enzima; na fotobiologia se estuda a absorção de fótons por aceitadores como a clorofila, as flavinas, os carotenóides, etc..., os quais se excitam e desencadeiam uma série de reações fotoquímicas (2).

Desde 1978 nosso grupo vem trabalhando com sistemas que geram espécies eletronicamente excitadas, onde a enzima horseradish peroxidase (HRP) atua como o catalisador. Nosso objetivo tem sido elucidar os mecanismos pelos quais tais espécies são formadas, na tentativa de compreender certas reações que ocorrem in vivo.

Em 1980, Cilento (3) colocou a possibilidade de que um dos papéis de peroxidases, quando atuando como oxidases, era o de catalisar a formação de um produto eletronicamente excitado, ou seja, carbonila triplete. É suposto que carbonilas tripletes podem ser formadas enzimaticamente com alto rendimento e que são capazes de transferir sua energia para diversos aceitadores, dentre eles os ácidos nucleicos. Também, a identificação de bandas de emissão ao redor de 1270 nm (emissão monomol) e ao redor de 634 e 703 nm (emissão dimol) fornece uma forte evidência para a formação de oxigênio singlete ($^1O_2^*$) em alguns sistemas enzimáticos (4).

A interação de espécies tripletes excitadas e oxigênio singlete com os ácidos nucleicos, já foi investigada anteriormente. Durante a degradação enzimática de malonaldeído por HRP, foi

verificado que o ácido desoxirribonucleico (DNA) sofria modificações, as quais foram detectadas por mudanças de absorção na região do UV e na intensidade de fluorescência do complexo DNA-Tb (III) (5). Em outro trabalho, Guillo (6) demonstrou que a incubação de DNA na reação de degradação enzimática de 2-metil propenal, por HRP, resultava em modificações estruturais da macromolécula, as quais foram causadas pela presença de acetona triplete gerada pelo sistema.

Finalmente, De Mello (7) evidenciou a formação de um aduto entre o indol-3-aldeído triplete (formado na degradação aeróbica de ácido indol-3-acético catalisada pela HRP) e o resíduo uridina que compõe o ácido ribonucleico de transferencia (tRNA).

Seguindo esta linha de pesquisa de nosso grupo, resolveu-se investigar mais detalhadamente a ação de espécies excitadas sobre o ácido desoxirribonucleico (DNA), visando detectar; mudanças conformacionais, reações químicas, formação de aduto e quebras da cadeia. Para isso foram empregadas várias técnicas como: dicroísmo circular, fluorescência direta e indireta, reação com formaldeído e reação de marcação isotópica. Foram pesquisados três sistemas enzimáticos conhecidos, os quais serão introduzidos brevemente. A seguir serão analisados a ação fotodinâmica, o oxigênio singlete e os ácidos nucleicos, com ênfase no DNA, que foi o objetivo central deste trabalho.

1.1 - SISTEMAS BIOLUMINESCENTES (ou BIOENERGISADOS)

A bioluminescência, ou a emissão de luz por seres vivos, resulta de uma reação quimioluminescente catalisada por uma enzima (A8). Ela consiste de uma reação oxidativa exergônica, onde parte da energia é canalizada para produção de um estado eletronicamente excitado, de um intermediário ou produto da reação, o qual emite um fóton e volta ao estado fundamental. O estado singlete e/ou as espécies tripletes podem ser formadas no meio celular com alto rendimento. Porém, devido à presença de supressores destas espécies, no próprio meio, elas, em geral, não são facilmente detectadas. Por exemplo, existem vários amino ácidos, proteínas, vitaminas e alguns componentes do mitocondria, os quais são supressores eficientes do oxigênio singlete (A9) e portanto dificultam a detecção desta espécie. Um dos caminhos utilizados para se estudar tais sistemas bioluminescentes consiste do emprego de sistemas enzimáticos, *in vitro*, que mimetizam as reações *in vivo*. Estes sistemas consistem de uma enzima que catalisa a degradação do substrato, em meio aquoso convenientemente tamponado, e com ajuda de cofatores (em alguns casos), cuja presença vai depender do tipo do substrato com o qual estamos trabalhando.

Dentre os sistemas mais prováveis de gerar estados excitados, estão as reações catalizadas por peroxidase de rabanete (HRP). No curso destas reações (A10), a peroxidase passa por etapas intermediárias, onde a variação no número de oxidação do íon Fe(III) , pertencente ao grupo prostético da enzima, dá origem a diferentes compostos, a saber: a ferriperoxidase, o composto I, o composto II, a ferroperoxidase e, o composto III ou oxiperoxidase (A11), como visto na figura 1.1.

O grupo prostético (A12,A13), formado pela ligação tipo

eletrostática de um íon ferro à porfirina, resulta num complexo tetracoordenado quadrado planar, cuja quinta e sexta posições são ocupadas respectivamente pela proteína e por uma molécula de H_2O , como se observa pela figura 1.2.

Este grupo permite que a HRP absorva na região visível, com uma banda intensa ao redor de 400 nm, denominada banda Soret, atribuída às formas férricas e outra banda na região de 430 nm atribuída às formas ferrosas.

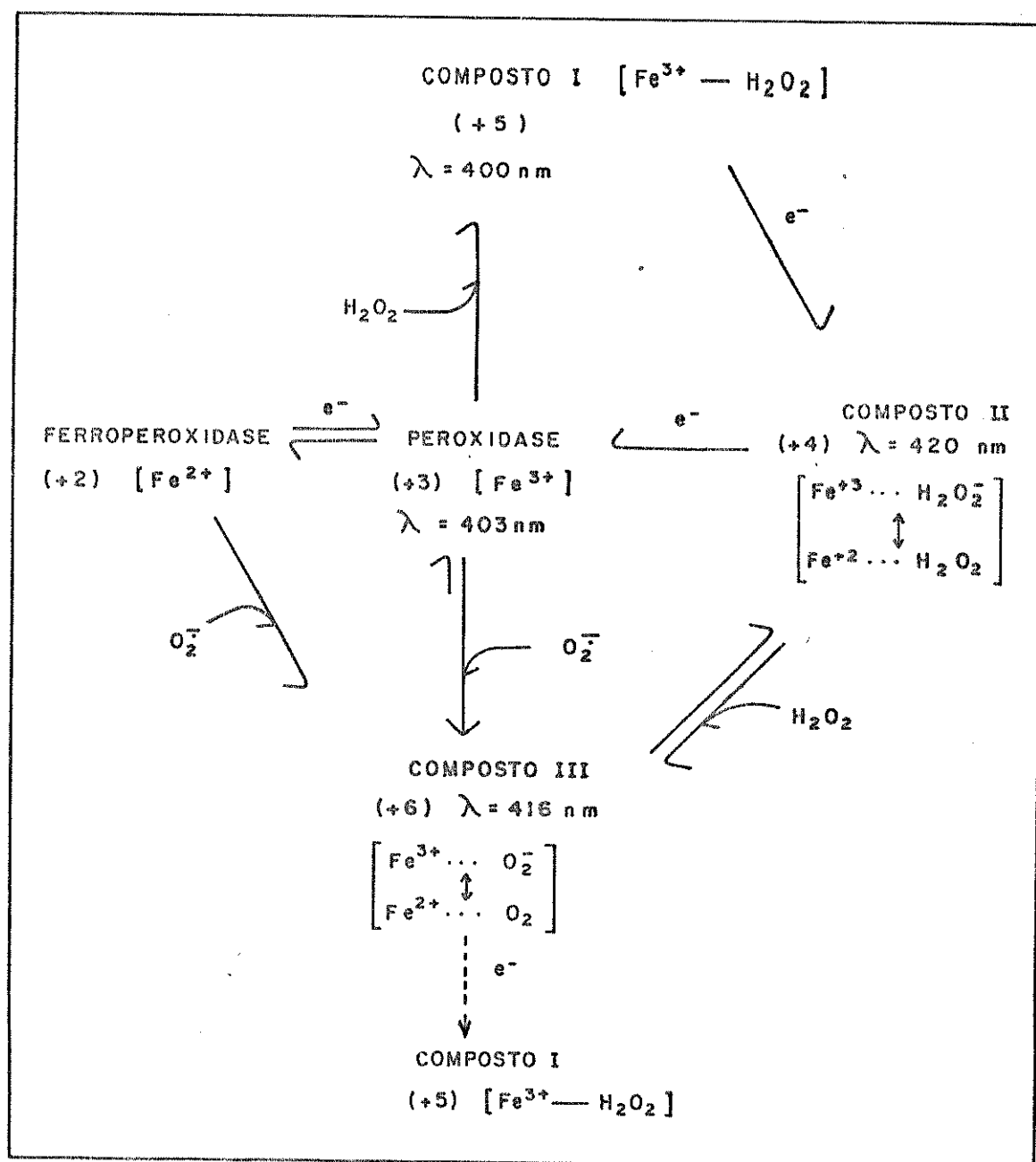


Figura 1.1 - Ciclo da peroxidase de rabanete (HRP), (A11).

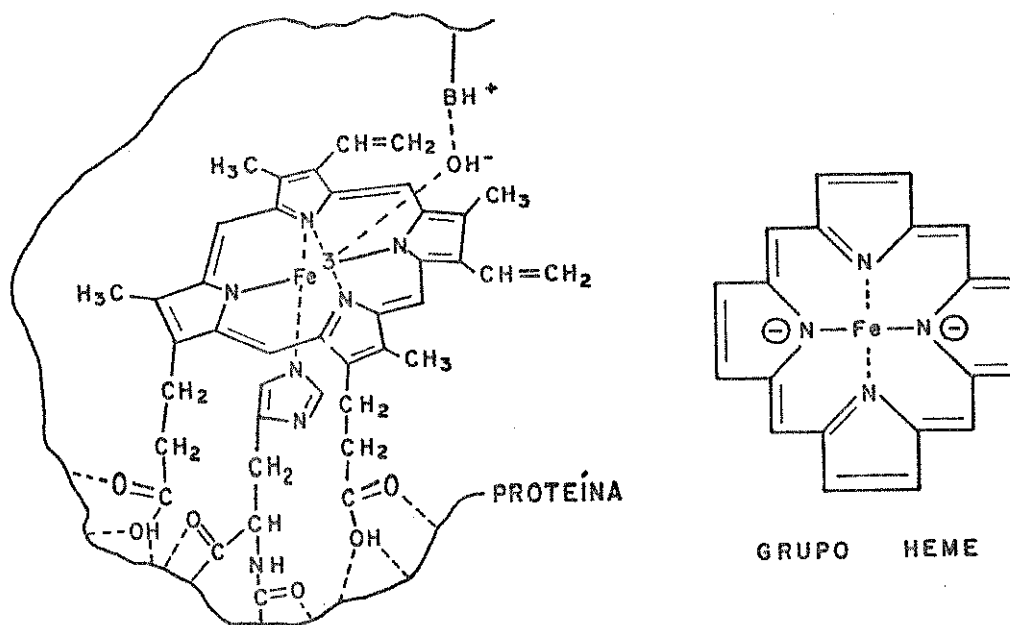
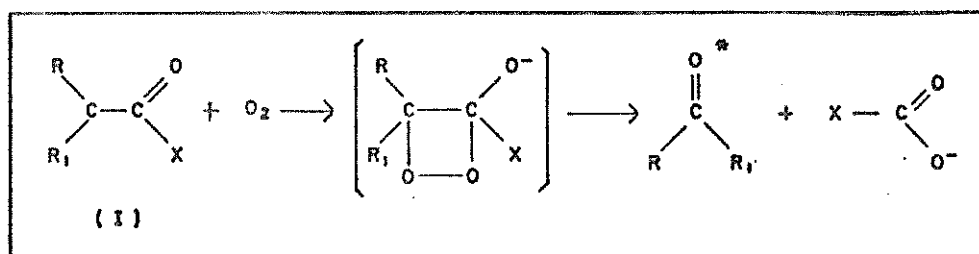


Figura 1.2 - Estruturas do grupo heme, (A12,A13).

1.2 - Formação Enzimática de Estados Excitados

Quando a HRP atua como uma monooxigenase interna, ela catalisa a oxidação de vários substratos de estrutura geral(I) de acordo com a reação 1.1.

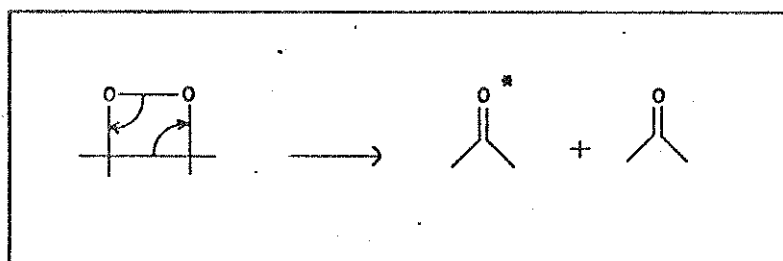


(reação 1.1) (A3)

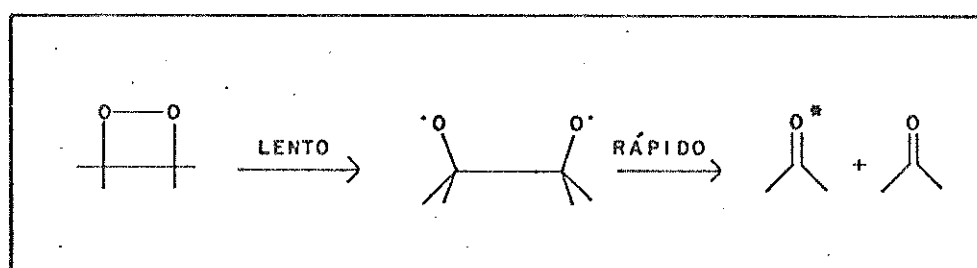
Presumivelmente os produtos gerados se originam da clivagem de um intermediário dioxetânico. Dois mecanismos são propostos para a clivagem deste intermediário. Um deles considera a clivagem simultânea das ligações O-O e C-C com a geração direta de produtos

eletronicamente excitados (A14,A15). O outro defende a clivagem do anel por etapas, onde um intermediário 1,4-birradical é formado pela quebra da ligação O-O (A16,A17):

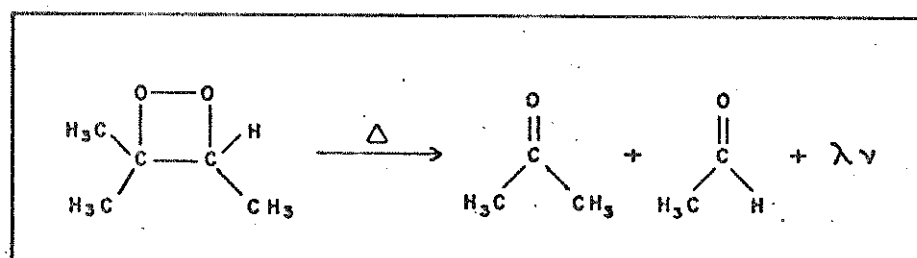
Mecanismo simultâneo (A14,A15)



Mecanismo de duas etapas (A16,A17)



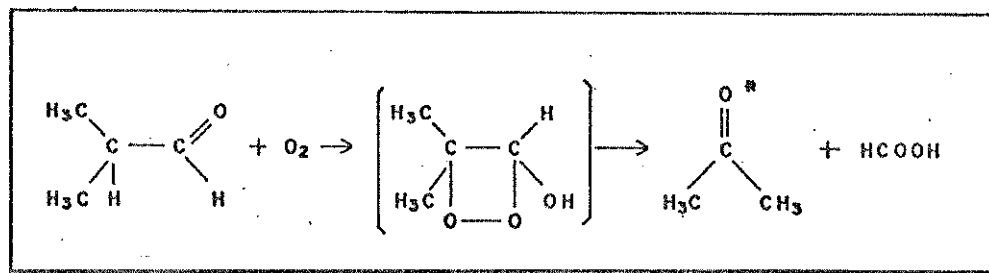
Em 1968, Kopecky e Munford (A18) sintetizaram o primeiro 1,2-dioxetano estável, de cuja termólise resultavam produtos carbonílicos, sendo um deles no estado eletrônico excitado, com uma banda de emissão na região de 430-440 nm:



(reação I.2) (A18)

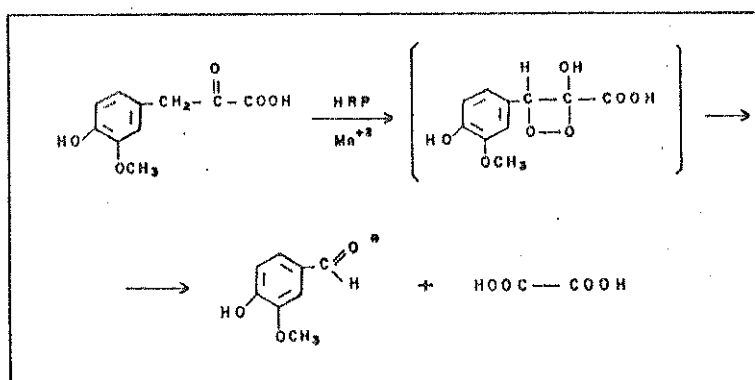
Dentre as várias reações enzimáticas biologicamente importantes, existem várias delas cujos produtos formados devem proceder da clivagem de um intermediário dioxetânico. Como exemplo temos:

1.2.1 - Oxidação do isobutiraldeído (A19), produzindo acetona excitada e ácido fórmico:



(reação 1.3) (A19)

1.2.2 - Oxidação do ácido vanilpirúvico à vanilina excitada e oxalato (A13):



(reação 1.4) (A13)

1.2.3 - Oxidação do ácido indol-3-acético (IAA)

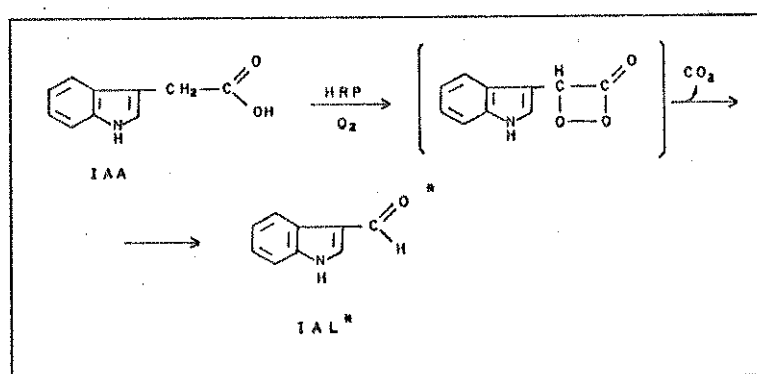
Esta reação é de particular interesse, visto que é uma das escolhidas para este trabalho.

O ácido indol-3-acético, ou IAA, é conhecido como a principal auxina encontrada na maioria dos tecidos de plantas, sendo o responsável pelo crescimento das mesmas (A20). Ele pode também ser encontrado em animais, cuja presença tem sido atribuída à ingestão diária de alimentos contendo esta substância ou à degradação de algum produto da flora intestinal (A21). Foi demonstrado

que a auxina produz mudanças físicas, químicas e fisiológicas dentro das células, promovendo inclusive mudanças citoplasmáticas, dentro de poucos minutos após sua aplicação (A22).

Pesquisas feitas por Galston e col. (A23) e por Goldacre (A24) revelaram que o IAA pode ser oxidado por peroxidases vegetais; e que HRP pode fazê-lo sem adição de H_2O_2 ou de outros cofatores, como o $Mn(2+)$ e os monofenóis (A25).

A oxidação de IAA por HRP já foi estudada extensivamente (A26-28). A aparente formação de indol-3-aldeído no estado excitado triplete, parece ocorrer, via um intermediário dioxetanona, segundo a reação 1.5.



(reação 1.5) (A26-A28)

Esta reação enzimática, se mostrou muito dependente da concentração de cada componente, da natureza do tampão e do pH do meio. Quando realizada em pH 3,8, obtém-se, aproximadamente, 80% de IAL (A29). A formação de IAL excitado, com um bom rendimento, em pH 3,8, pode ser visualizada através de uma adaptação do mecanismo proposto por Nakajima e col. (A30), o qual propõe as etapas descritas na figura 1.3.

Acredita-se na formação do IAL no estado triplete excitado, a qual é apoiada por dois fatores:

1. Os sistemas bioenergizados, principalmente os que envolvem in-

intermediários tipo dioxetano, produzem preferencialmente estados tripletes excitados (A31).

2. Os estados singletes excitados do IAL, de alta energia, sofrem cruzamento intersistema muito rápido, favorecendo a formação do estado triplete (A32).

Além do IAL excitado, formado na reação, foi demonstrado que $^1O_2^*$ também é gerado como uma consequência da transferência de energia da espécie triplete para o oxigênio molecular (A33, A34):



(reação 1.6) (A33, A34)

Em adição aos recursos habituais de que dispomos para detectarmos espécies emitentes num sistema enzimático (vide apêndice IV), podemos estudar também o espectro de emissão do sistema, o qual nos dá outras informações à respeito da espécie excitada. Foi assim que de Mello (A33) confirmou a presença de carbonilas em 450 nm, e de $^1O_2^*$, cuja emissão é esperada acima de 650 nm, figura 1.4. Essas informações, juntamente com os resultados de outras experiências, demonstraram que a degradação de IAA por HRP, levava à formação de duas espécies excitadas; o IAL triplete e o $^1O_2^*$. A primeira foi considerada como a espécie principal, devido ao pH do meio que favorece a sua formação (A35).

Recentemente tem sido aplicado este sistema para produzir mudanças no ácido urocânico, através da ativação da urocanase com $^3IAL^*$, gerado enzimaticamente (A36, A37).

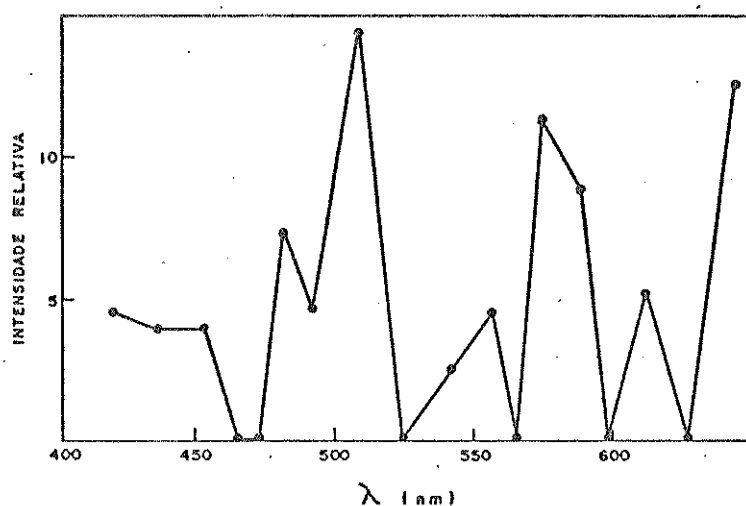


Figura 1.4 - Espectro de quimiluminescência do sistema IAA(0,1 mM)/EDTA(30 μM)/HRP(0,8 μM)/O₂ em tampão acetato de sódio (50 mM e 0,17 M de metanol) pH=3,8 e à 22 °C.

1.3 - Formação direta de $^1\text{O}_2^*$ em sistemas bioenergizados.

Além da formação de $^1\text{O}_2^*$ através da ação fotodinâmica e também por transferência de energia de tripletes para o O₂ molecular, como visto anteriormente, esta espécie pode ser formada diretamente em certos sistemas enzimáticos cujo intermediário não possui estrutura dioxetânica. Devido o interesse por dois sistemas deste tipo, os quais também fazem parte do trabalho experimental, tratar-se-á cada um, detalhadamente, a seguir.

1.3.1 - Geração de $^1\text{O}_2^*$ na degradação de malonaldeído por HRP.

Acredita-se que a peroxidação lipídica ocorra via formação de radicais livres em cadeia. Um intermediário potencial em tal processo é o malonaldeído (MA), produzido durante a decomposição oxidativa dos ácidos graxos poliinsaturados. O mesmo pode reagir com uma grande variedade de compostos, incluindo ácidos

nucleicos (A38). A reação de MA com DNA produz efeitos físicoquímicos indicativos de reticulação intercadeia, causando a perda de sua atividade biológica (A39). O DNA, assim ligado ao MA, pode interferir com a síntese de mRNAs e proteínas e prejudicar a função da célula, podendo induzir seu envelhecimento e morte precoce (A40). O produto formado, DNA-MA, apresenta um pico máximo de fluorescência em 460 nm quando excitado em 390 nm. Sua formação é atribuída à reação dos amino grupos das bases do DNA com o malonaldeído, para dar a estrutura amini-iminopreno conjugada;

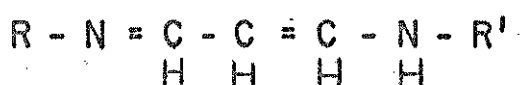


Figura 1.5 - Estrutura amini-iminopreno de DNA-MA (A41,A42).

onde R e R' são bases do DNA (A41,A42).

Dada a importância de malonaldeído em sistemas biológicos, desenvolvemos um estudo sistemático à procura de maiores informações sobre a degradação enzimática desta substância.

Quando a degradação oxidativa de MA foi catalisada por HRP na presença de íons Mn(II), os quais atuam como cofatores enzimáticos, observou-se que o sistema era emissivo. Após algumas pesquisas, Farias (A5) concluiu que a espécie excitada responsável pela emissão deste sistema, era o oxigênio singlete. O mecanismo de Russel (A43) foi então utilizado para explicar a procedência da espécie excitada, embora exista a possibilidade de que o mecanismo de Benson também pudesse ser aplicado para explicar os resultados (A44) obtidos (vide figura 1.6). A presença de $^{10}_2$ foi confirmada pelo espectro de emissão, figura 1.7, e por outros resultados com supressores e amplificadores (vide apêndice IV) (A45).

1.3.2 Geração de $^1O_2^*$ na degradação de ácido fólico por HRP

O ácido fólico ou ácido pteroilglutâmico é uma vitamina do complexo B, hidrossolúvel. As reações metabólicas de base, dentre as quais os folatos ocupam um papel importante, compreendem a formação de bases purínicas e pirimidínicas, a interconversão de serina em glicina, a degradação da histidina em ácido glutâmico e a conversão de homocisteína em metionina.

Dentro do papel importante que o ácido fólico ocupa no crescimento e na divisão celular, está a sua participação na síntese do DNA, onde atua na conversão de uracil em timina (A46).

Dada sua importância biológica, o ácido fólico tornou-se alvo de muitas pesquisas com a finalidade de se conhecer mais a respeito de seu mecanismo de ação, principalmente em pessoas portadoras de câncer, nas quais o nível de produtos de degradação desta vitamina é mais elevado que o normal.

Em 1955, Webb (A47) detectou a presença de ácido p-amino-benzoilglutâmico e uma mistura de pterinas livres, após o catabolismo de ácido fólico. Trabalhos de Stea e col. (A48), usando ácido fólico 2- ^{14}C em um meio de crescimento de células malignas, acusou o aparecimento de uma substância azul fluorescente que mais tarde foi identificada como 6-hidrometilpterin, ausente em meios de cultura sadios.

Em 1957, Braganca e col. (A49) isolaram uma enzima de eritrócitos humanos, a qual possuía a atividade de ácido fólico oxidase. Embora o mecanismo de degradação fosse desconhecido, eles verificaram que na presença desta enzima o ácido fólico era degradado segundo a reação da figura 1.8, cujos produtos foram identificados por cromatografia de papel.

Na tentativa de elucidar o mecanismo desta reação, reali-

zamos um trabalho detalhado, onde a degradação de ácido fólico foi estudada utilizando-se a enzima de eritrócitos, e posteriormente comparada com a degradação em presença de HRP (A50). Foram então estabelecidas as melhores condições para as quais a oxidação do ácido fólico por HRP se processa, de maneira semelhante à oxidação pela enzima de eritrócitos. Também verificamos que ambos os sistemas eram quimiluminescentes.

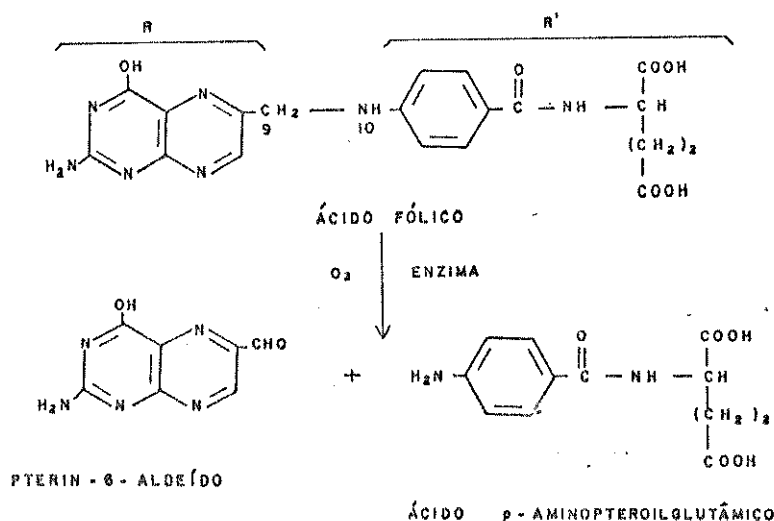


Figura 1.8 - Oxidação enzimática de ácido fólico. (A49)

Utilizando-se as técnicas para se detectar a espécie emittente nestes sistemas (apêndice IV), concluímos que o oxigênio singlete era o responsável pela emissão observada, como mostra o espectro de emissão na figura 1.9.

Para explicar a formação desta espécie no curso da degradação do ácido fólico, adotou-se o mecanismo de Benson (A44), vide figura 1.10.

Durante a investigação da natureza da espécie excitada gerada neste sistema, foi introduzido o uso de bilirrubina (Bil.), substância conhecida por reagir eficientemente com oxigênio singlete, via formação de um intermediário dioxetânico (A51), conforme o mostrado na figura 1.11.

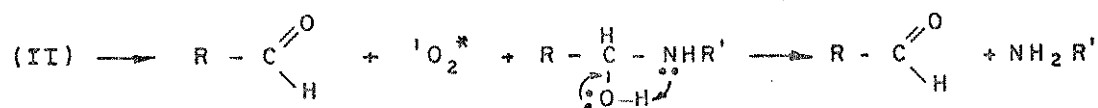
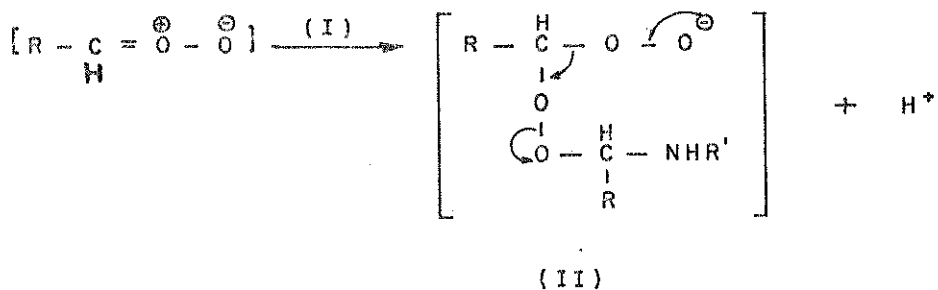
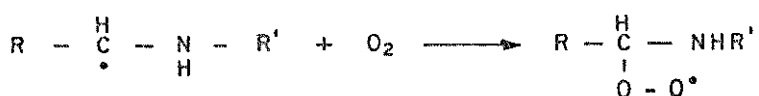


Figura 1.10 - Mecanismo de degradação de ácido fólico por HRP.

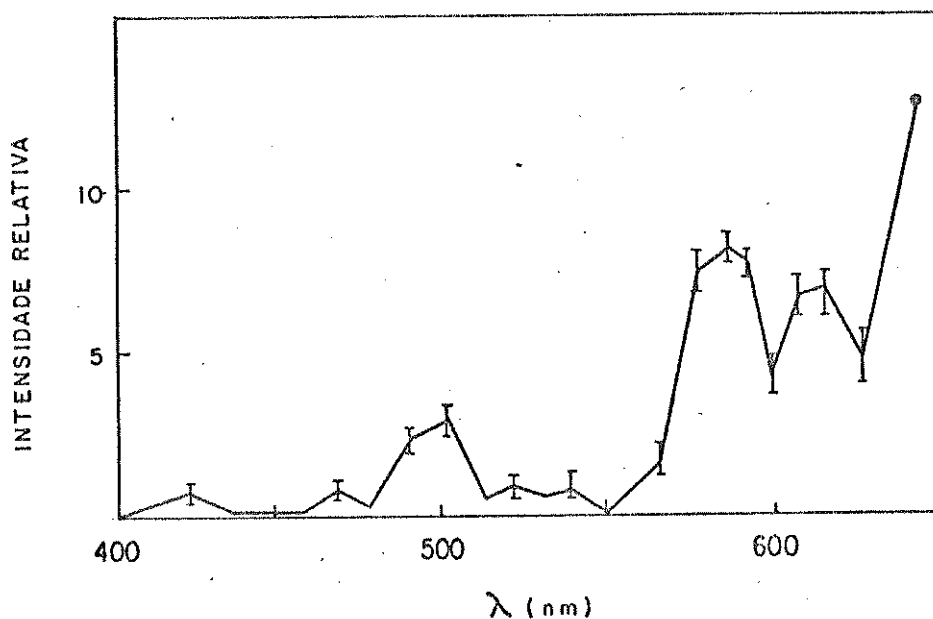


Figura 1.9 - Espectro de quimiluminescência do sistema AFO (1,2 mM)/GSH(0,3 mM)/Catalase(164 unidades/ml)/HRP(4,0 μ M)/Mn²⁺(80 μ M)/O₂ em tampão fosfato de sódio (0,5 M) pH 5,5 e à 22°C.

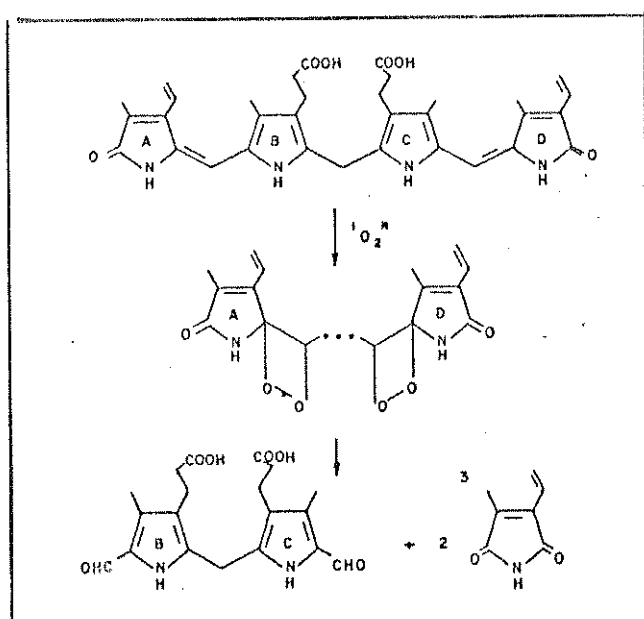


Figura 1.11 - Intermediário dioxetânico de bilirrubina (Bil).

A supressão da emissão do sistema enzimático de degradação de ácido fólico, no início da reação, e o aparecimento de uma emissão maior alguns minutos depois, na presença de Bil., não só sugeriu a formação de $^1O_2^*$ neste sistema como também o acúmulo de um intermediário dioxetânico, cuja quebra daria algum produto excitado, provavelmente metilvinilmaleimida triplete. Este último, supostamente gerado em bom rendimento, seria então o responsável pela posterior emissão observada no sistema, figura 1.12. Recentemente, Peak e col. (A52) colocaram a hipótese de que ligações cruzadas DNA-proteína podem ser induzidas via efeitos foto-dinâmicos, envolvendo estados reativos de oxigênio gerado por fotossensibilizadores excitados, dentre eles a Bil.. Tais fatos motivaram o estudo mais detalhado do efeito da Bil. nos sistemas enzimáticos, visto que esta substância tem sido o objeto de mui

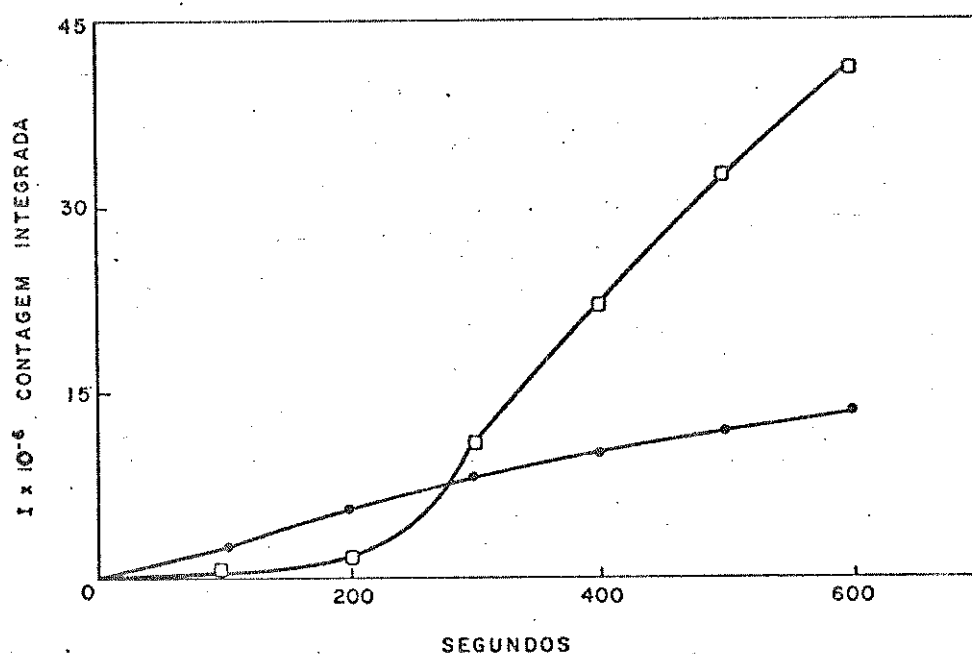


Figura 1.12 - Fotoemissão integrada do sistema de degradação de ácido fólico:

a. sem nenhuma outra substância adicionada |—●—●—|

b. na presença de 20 μ M de Bil. |—□—□—|.

tas pesquisas no campo da fototerapia, utilizada no controle da icterícia em recém-nascidos (A53,A54). Embora a fotodegradação da Bil. seja atualmente considerada um processo secundário na eliminação do excesso deste pigmento, ela não deixa de merecer atenção por parte de pesquisadores como Lighter e Park (A55), Bonnett e Steward (A56) e outros, os quais defendem a formação de um intermediário dioxetânico durante o processo (vide maiores detalhes sobre a Bil. no apêndice V).

Muitas reações fototóxicas, que ocorrem durante a fototerapia clínica, são produzidas pela degradação de vitaminas, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (A57). A Bil. fotoativada também altera o gráfico de transição térmica da hélice do DNA, causa polarização limitada e aumenta a sensibilidade à degradação alcalina de fitas simples da macromolécula *in vitro* (A58). Células humanas em cultura, sob iluminação com lâmpadas fototerápicas, e na ausência de sensibilizador exógeno, exibem uma diminuição no tamanho de seu DNA isolado, que é reparável durante um período sem luz (A59). Lembremos que existem enzimas que reparam o DNA, as quais são sujeitas a erro (A60); tal erro pode ocupar um papel em carcinogênese.

Estes são alguns aspectos onde se acredita que o intermediário dioxetânico de Bil. possa ocupar um lugar de destaque. Desta maneira, decidimos estudar também o comportamento de DNA na presença da espécie excitada gerada por tal intermediário (seguramente um triplete ativado), o qual é supostamente formado nos sistemas onde oxigênio singleto é produzido.

1.4 - ÁCIDOS NUCLEICOS

1.4.1 - Constituintes Químicos dos Ácidos Nucleicos

Embora o ambiente possa influenciar na aparência e no comportamento de sistemas biológicos, é óbvio que existem mecanismos de informação que servem como modelo básico para tais sistemas, de geração para geração. Os compostos químicos que armazenam a mensagem são os ácidos nucleicos. Estes compostos são polímeros de nucleotídeos, cuja estrutura será descrita posteriormente.

Uma célula humana contém, em média, de 2 a 5% de seu peso seco como ácidos nucleicos e nucleotídeos (A61), os quais serão discutidos a seguir.

1.4.2 - Purinas e Pirimidinas (A62-64) = (*)

As estruturas das bases comuns que ocorrem naturalmente nos ácidos nucleicos são derivadas das pirimidinas e purinas.

a. Derivadas das pirimidinas (I):

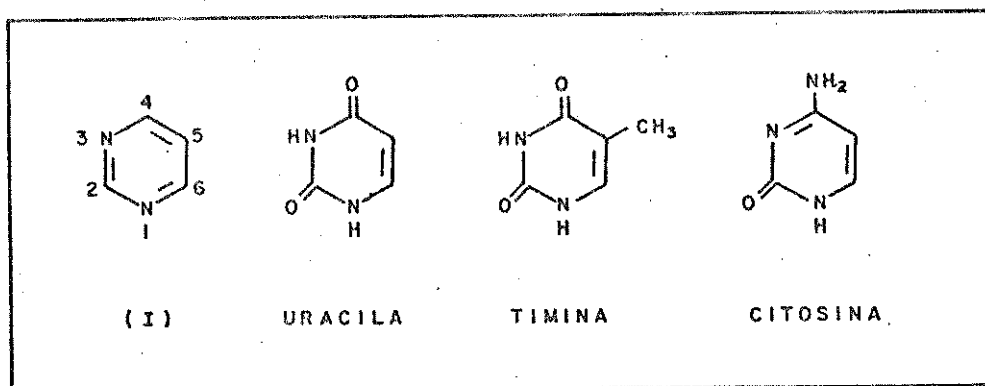


Figura 1.13 - Bases pirimidínicas. (*)

O anel pirimidina é aromático, mas os átomos de N na posição meta produzem uma distribuição eletrônica fortemente deficiente nas posições 2, 4 e 6. A posição 5, por outro lado, é relativamente rica em elétron, figura 1.14.

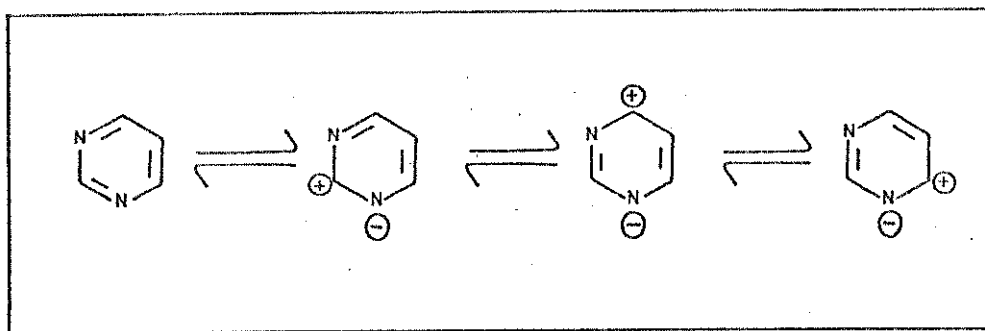


Figura 1.14 - Estruturas de ressonância do anel pirimidina. (*)

Portanto, o anel pirimidina está sujeito a uma substituição nucleofílica nas posições 2, 4 e 6 e à uma substituição eletrofílica na posição 5, quando grupos elétron-doadores estão presentes em outras posições do anel. As pirimidinas todas mostram tautomerismo lactama-lactima e podem ser escritas, por exemplo, da forma indicada na figura 1.15. Em pHs neutro e ácido, a forma lactama prevalece.

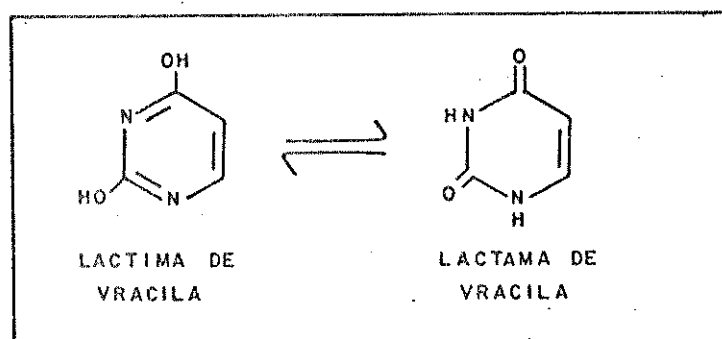


Figura 1.15 - Tautômeros de uracila. (*)

b. Derivadas das purinas (II):

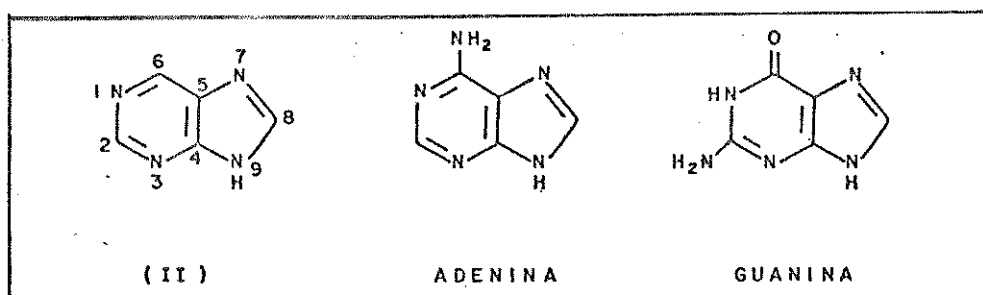


Figura 1.16 - Bases purínicas. (*)

Os átomos de nitrogênio do anel purínico são elétron-re-

tiradores, produzindo uma deficiência de elétrons nas posições 2 e 6 do anel pirimidínico e mais fracamente na posição 8 da porção imidazólica, como mostra a figura 1.17.

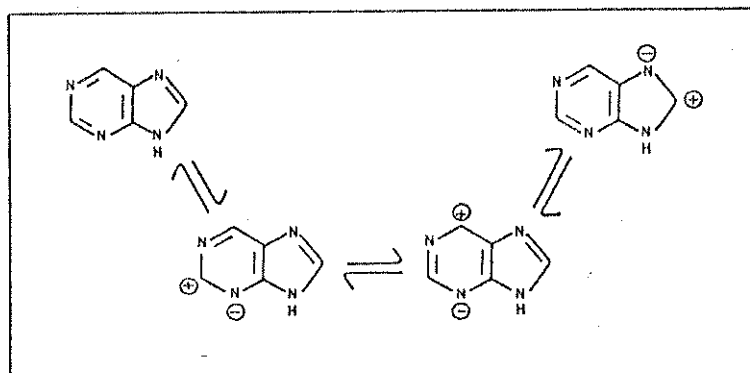


Figura 1.17 - Estruturas de ressonância do anel purínico. (*)

Como as pirimidinas, as purinas também exibem tautomerismo semelhante, como visto na figura 1.18.

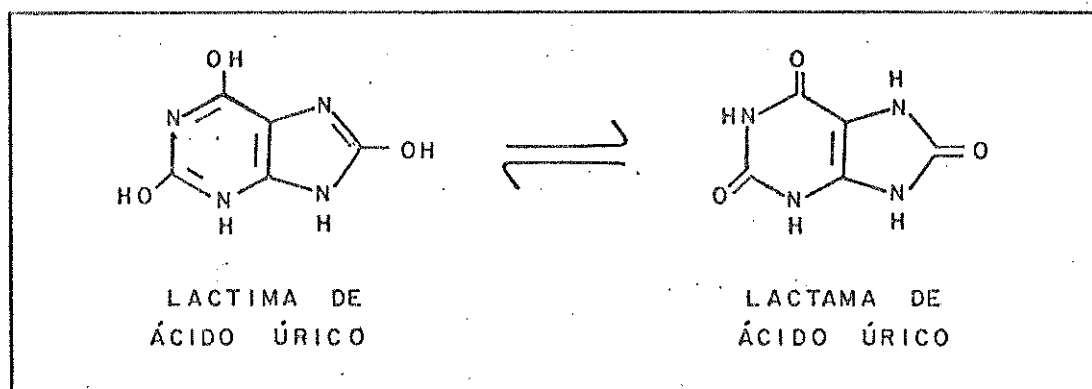


Figura 1.18 - Tautômeros de Ácido úrico. (*)

1.4.3 - Nucleosídeos e nucleotídeos (A62,A63) = (**)

Os nucleosídeos e os nucleotídeos mais abundantes são os N-glicosídeos das pentoses D-ribose e 2-desoxi-D-ribose (mais corretamente 2-desoxi-D-eritro-pentose). Exemplos típicos de dois nucleosídeos podem ser vistos na figura 1.19.

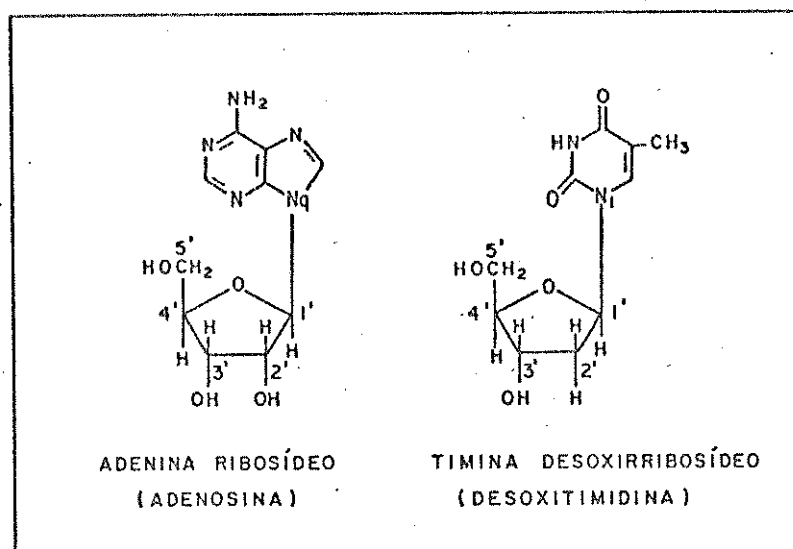


Figura 1.19 - Exemplos de nucleosídeos: Adenina e Desoxitimidina. (**)

A hidrólise parcial de ácidos nucleicos fornece compostos em que ribose ou desoxiribose são conjugadas à uma base purínica ou pirimidínica. A adenina ligada à ribose é chamada adenosina, a guanina nucleosídeo é denominada guanosina e por sua vez, os nucleosídeos pirimidínicos são conhecidos como citidina e uridina (RNA) ou timidina (DNA). Os nucleosídeos contendo desoxiribose possuem o mesmo tipo de ligação glicosídica e são o 9-B-D-2'-desoxirribofuranosídeos de guanina e adenina, e o 1-B-D-2'-desoxirribofuranosídeo de citosina e timina.

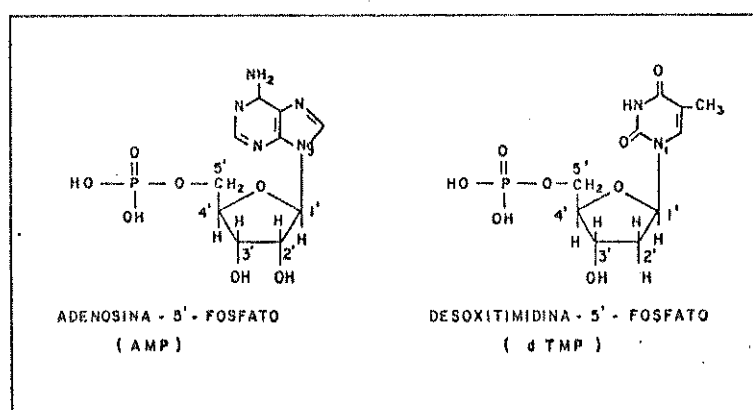


Figura 1.20 - Exemplos de nucleotídeos: Adenosina- e Desoxitimidina- 5'-fosfato. (**)

Os nucleotídeos, por sua vez, são os ésteres fosfóricos dos nucleosídeos e, são também, ácidos fortes. São denominados: Ácido adenílico, Ácido guanílico, Ácido timidílico, Ácido citidílico e Ácido uridílico. O fosfato é sempre esterificado à porção do açúcar, figura 1.20.

1.5 - ESTRUTURAS DO DNA (A63, A65, A66 e A67) = (&)

1.5.1 - Estrutura Primária

A estrutura primária do DNA compreende apenas a sequência dos nucleotídeos, unidos entre si por ligações fosfodiéster. Tal ligação que une os nucleotídeos, ocorre no núcleo com a participação de uma enzima, a DNA polimerase. Esta catalisa um ataque nucleofílico do grupo 3'-OH do açúcar sobre um nucleotídeo trifosfato livre, como mostra a figura 1.21.

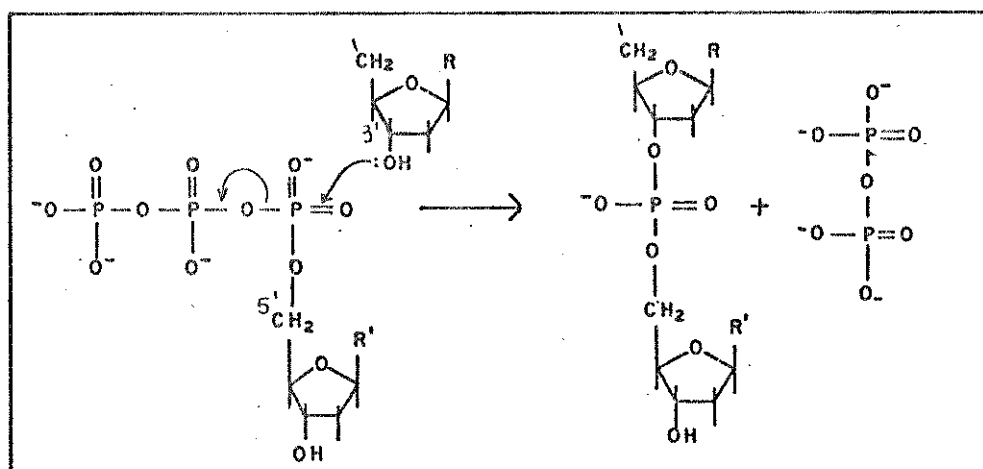


Figura 1.21 - Ataque nucleofílico do grupo 3'-OH do açúcar sobre um nucleotídeo trifosfato livre. (&)

Desde que o C-4' no açúcar é ocupado na formação do anel e o C-2 não possui o grupo hidroxila, apenas os grupos hidroxila nas po-

sições 3' e 5' estão disponíveis para a ligação internucleotídica. Observa-se na figura I.22, um segmento da cadeia do DNA, representado por dois nucleotídeos.

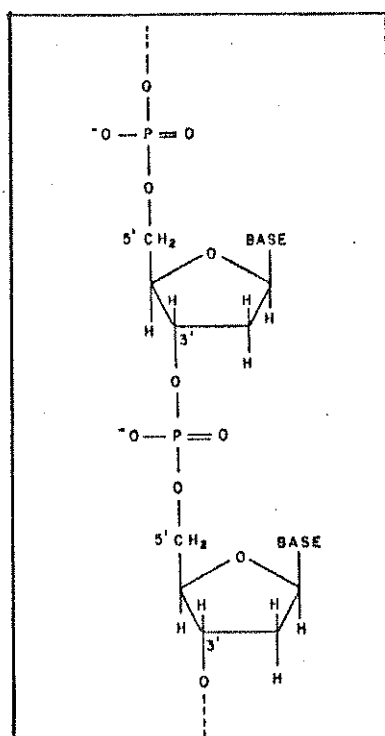


Figura I.22 - Segmento de uma fita simples de DNA, formado por dois nucleotídeos.(&)

1.5.2 - Estrutura Secundária

Através de observações químicas e difração de raios-X, Watson e Crick (A68) em 1953, elucidaram a estrutura secundária da molécula de DNA, a qual consiste de uma fita dupla arranjada na forma de uma dupla hélice para a direita, com as duas cadeias polinucleotídicas em torno do mesmo eixo e mantidas unidas por ligações de hidrogênio entre elas, figura I.23.

Por meio de modelos atômicos, foi mostrado que as bases são arranjadas aos pares, cada um formado por uma purina e uma pirimidina, onde a adenina forma par com a timina e a guanina com a citosina. Tal estrutura pode ser visualizada na figura I.24,

juntamente com uma ilustração do pareamento das bases no esqueleto da molécula, figura 1.25.

As bases hidrofóbicas, relativamente insolúveis, são

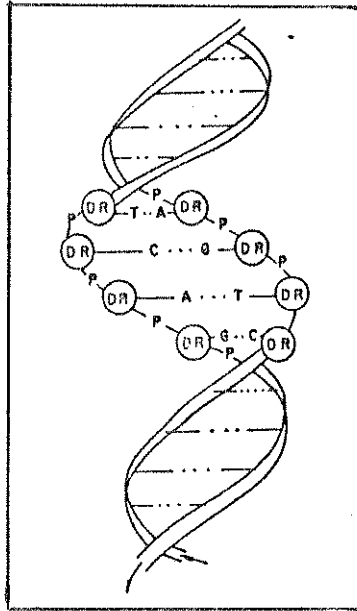


Figura 1.23 - Estrutura secundária do DNA proposta por Watson e Crick em 1953. (A68)

empilhadas dentro da dupla hélice, protegidas da água, enquanto que o resíduo hidrofílico dos açúcares e os grupos fosfato, carregados, são localizados na periferia, expostos à água. Trabalhos de Chargaff (A69) revelaram que a soma das purinas é igual à soma

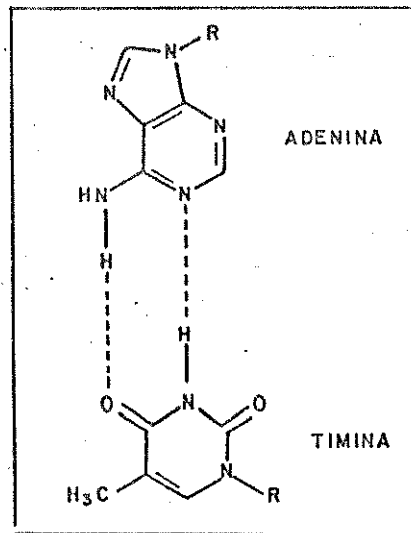
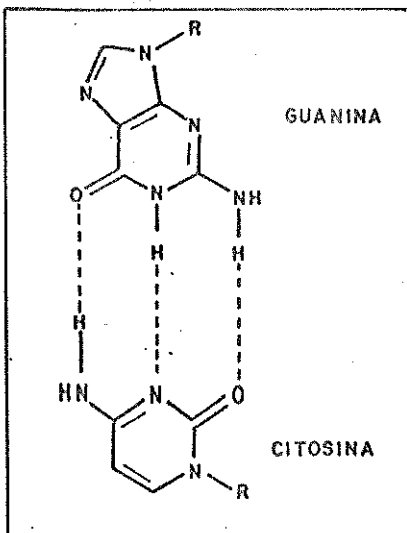


Figura 1.24 - Pareamento das bases no DNA, através de pontes de hidrogênio. (A68)

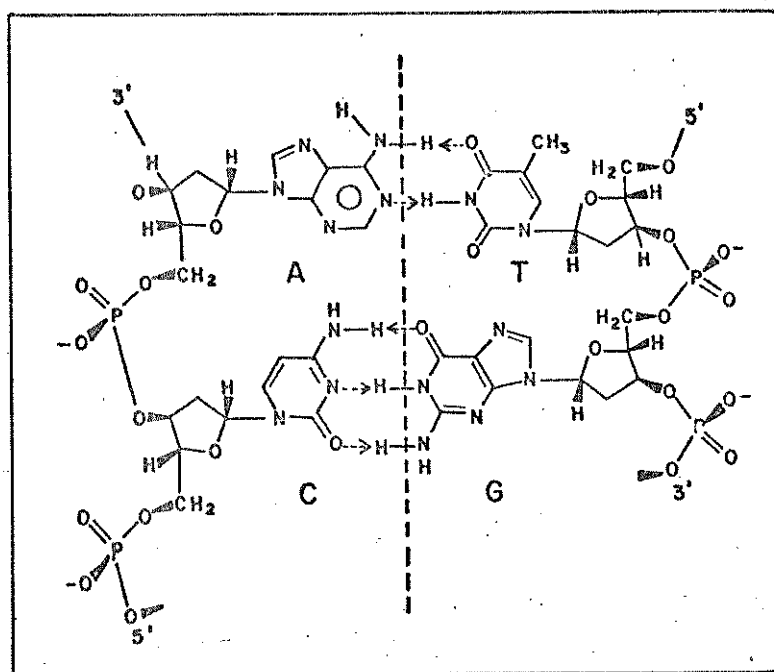


Figura 1.25 - Pareamento das bases do DNA no esqueleto da molécula. (A70)

das pirimidinas, ou seja, a soma das amino bases adenina e citosina é igual à soma das ceto bases guanina e timidina. As duas cadeias são de polaridade opostas no sentido de que as ligações internucleotídicas em uma fita vão na ordem C-3'-----C-5', enquanto que na outra fita oposta elas vão na ordem C-5'-----C-3'.

A idéia original de que as ligações de hidrogênio eram as únicas responsáveis pela estabilidade da hélice, tem cedido ao argumento de que a grande estabilidade da hélice do DNA é mantida por forças resultantes do empilhamento das bases, ou seja, ligações apolares entre elas, enquanto que as ligações de hidrogênio confeririam especificidade no mecanismo de pareamento das mesmas. Embora esta grande estabilidade da molécula de DNA lhe confira o papel de portador da informação genética, está claro que a dupla hélice não é uma estrutura fixa e rígida, mas uma estrutura dinâmica, que pode sofrer deformações internas de uma maneira contínua.

1.5.3 - Estrutura terciária

O DNA de muitas fontes, principalmente de cromossomos, não pode ser isolado tal como se encontra, devido ao seu grande tamanho e às deformações provocadas pelo seu manuseio. Entretanto, os DNAs de alguns virus; do mitocondria e dos cloroplastos, e de algumas bactérias, podem ser isolados sem sofrer degradação. Estudos com estes DNAs mostraram que a estrutura secundária pode ser compactada em alguns casos, dando origem à estruturas terciárias de diferentes tipos.

DNAs de fita simples, lineares ou circulares, podem ser obtidos de alguns virus ou da desnaturação de DNA de fita dupla. Outros virus ou DNAs cíclicos de fita dupla, abertas durante o isolamento, dão origem a DNAs lineares de fita dupla, enquanto que DNAs cíclicos de fita dupla são obtidos de mitocondria, de cloroplastos, de plasmídeos e também de certos virus.

A figura 1.26, ilustra algumas estruturas terciárias.

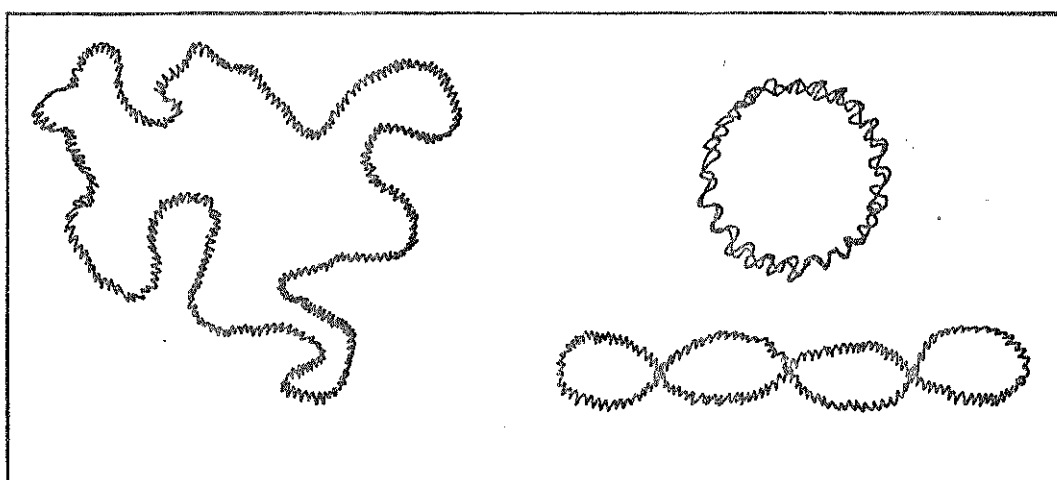


Figura 1.26 - Estruturas terciárias de DNA. (A71)

1.6 - OCORRENCIA (A66,A70).

Sabe-se que a maior quantidade de DNA está encerrada no núcleo da célula e compreende, em média, 30% de seu peso seco. Esta quantidade de DNA por núcleo se mantém aproximadamente constante para bactérias e células animais, embora o conteúdo de RNA ou outros constituintes variem com o tamanho da célula.

O cromossomo de células procarióticas consiste de uma única molécula grande de DNA, firmemente agrupada em uma zona nuclear (nucleóide). As células eucarióticas, por sua vez, contém muitas moléculas de DNA, geralmente muito maiores que as moléculas de DNA dos procariotos. Nos eucariotos, as moléculas de DNA são combinadas com proteínas e organizadas em fibras no núcleo, denominadas cromatina. Por sua vez, o núcleo é rodeado por um sistema complexo de duas membranas. A análise da cromatina, revelou que ela contém cerca de 60% de proteína, 35% de DNA e, talvez, 5% de RNA. O DNA na cromatina é firmemente associado com proteínas, denominadas histonas, as quais funcionam no sentido de ordenar o DNA em unidades estruturais chamadas nucleossomos.

Além do DNA encontrado no núcleo das células eucarióticas, pequenas quantidades de DNA, os quais diferem dos DNAs nucleares em sua composição de bases, estão presentes no citoplasma, mais especificamente no mitocôndria. O DNA mitocondrial (mDNA) é uma molécula muito pequena quando comparada com o cromossomo nuclear, e ocorre na forma de duplex circular. O DNA mitocondrial codifica a formação de t-RNAs e r-RNAs e algumas proteínas do próprio mitocôndria.

As figuras 1.27 e 1.28 nos dão uma idéia de uma célula eucariótica e procariótica.

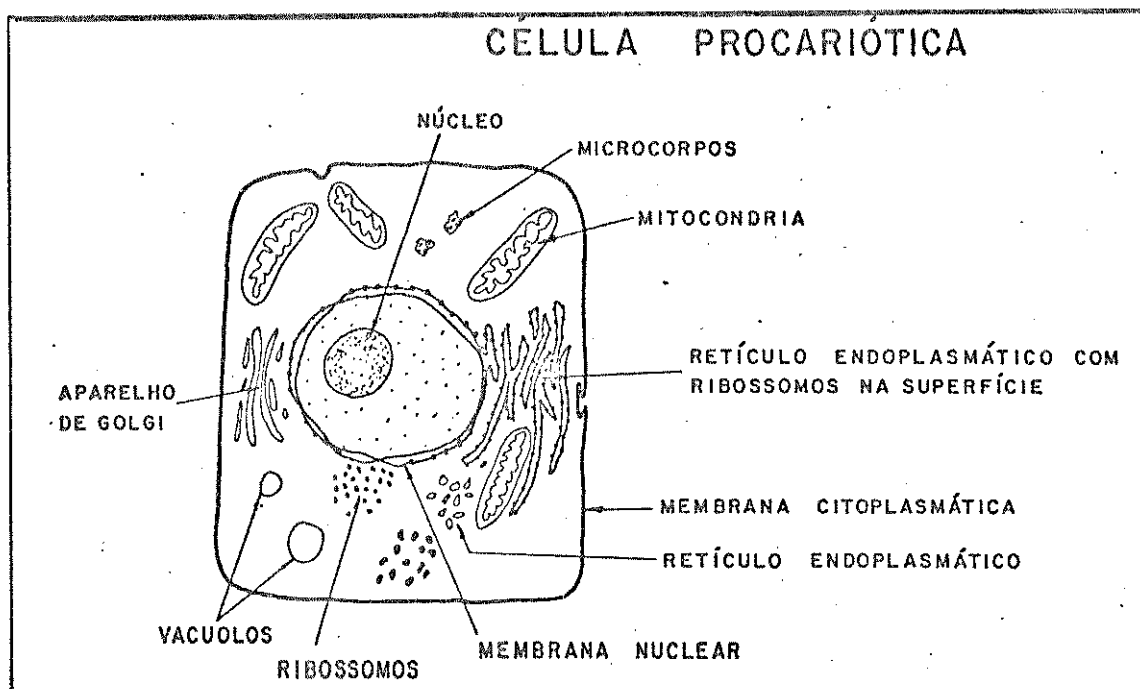


Figura 1.27 - Esquema simplificado de uma célula procariótica.

(A72)

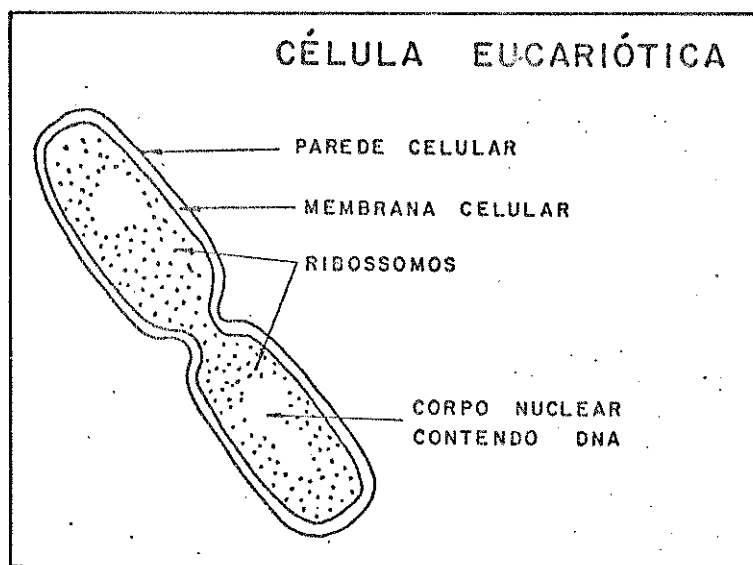


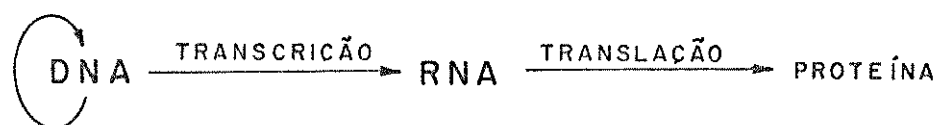
Figura 1.28- Esquema simplificado de uma célula eucariótica. (A72)

1.7 - FUNÇÃO GENÉTICA DO DNA (A71).

Como um portador de informação genética, o DNA cumpre duas funções básicas:

1. Fazer cópias exatas de si mesmo no processo de duplicação ou replicação, e
2. Passar sua informação codificada ao RNA mensageiro (mRNA) no

processo de transcrição, tal que o m-RNA, por sua vez, possa traduzir a linguagem de 4 letras (bases) dos ácidos nucleicos em uma linguagem de 20 letras (amino ácidos) que constituem as proteínas. Estes conceitos podem ser ilustrados simplifcadamente da seguinte maneira:



REPLICAÇÃO

Através da estrutura do DNA, descrita por Watson e Crick (A68), pode-se ter uma idéia simplificada de como a replicação ocorre (A72). Suponhamos que um pequeno segmento de um DNA em dupla hélice tenha uma certa sequência de nucleotídeos, como visto na figura 1.29. No momento da replicação as fitas se separam, rompendo-se as ligações de hidrogênio entre as bases complementares.

No próximo passo uma enzima, a DNA polimerase, promove a formação de novas fitas, inserindo unidades de nucleotídeos complementares, como mostrado na figura 1.30.

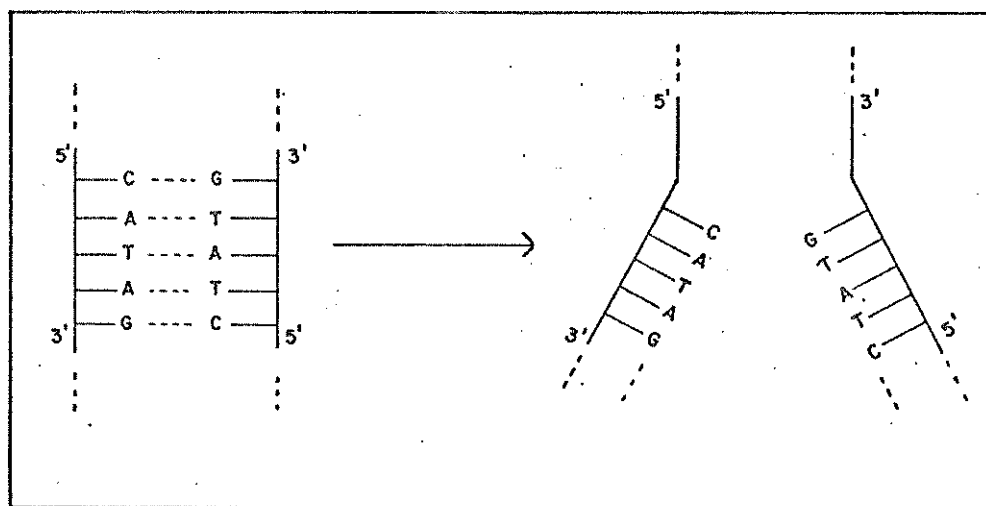


Figura 1.29 - Separação das fitas do DNA no início do processo de replicação. (A72)

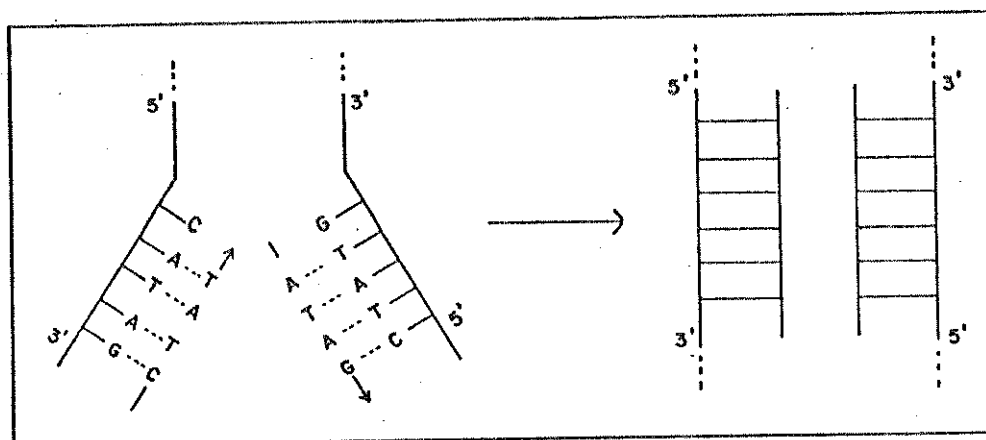


Figura 1.30- Formação de fitas complementares do DNA original.

(A72)

Uma vez terminada a biossíntese, dois novos DNAs são formados, cada um levando consigo uma fita do DNA original.

No processo de transcrição (A73), uma simples fita do DNA atua como matriz para a biossíntese do RNA mensageiro. A outra fita parece atuar com um papel estrutural no sentido de manter a estabilidade do DNA. A sequência de bases na fita do DNA rege a sequência de bases na fita simples do RNA; assim a informação genética contida no DNA é transmitida ao RNA. Cada cadeia de m-RNA é iniciada em um sítio específico no DNA matriz e existe um outro sítio, o qual atua como um sinal para o término da cadeia. O processo de transcrição é mediado pela enzima RNA-polimerase DNA-dependente. Uma vez concluída a cadeia de m-RNA, este é enviado aos ribossomos, onde ocorrerá a síntese de proteínas no processo chamado "transcrição".

1.8 - IRRADIAÇÃO DE DNA

É geralmente reconhecido que a irradiação exerce uma influência inibidora, muitas vezes pronunciada, no processo de divisão celular. Muitos efeitos biológicos da irradiação UV (ultra

violeta) podem ser explicados em termos de mudanças químicas e físicas específicas no DNA.

As bases purínicas são aproximadamente 10 vezes mais resistentes à alterações fotoquímicas que as bases pirimidínicas (A74). Altas doses de irradiação UV podem não só danificar as células viventes, causando a formação de ligações químicas entre os nucleotídeos pirimidínicos adjacentes no DNA, como também, em alguns casos, ser letal (A75). Duas bases pirimidínicas assim ligadas em uma fita do DNA, formam o que se conhece como um dímero. Dentre os 3 tipos de dímeros que podem ser formados, o dímero de timina é, sem dúvida, formado mais prontamente, figura 1.31.

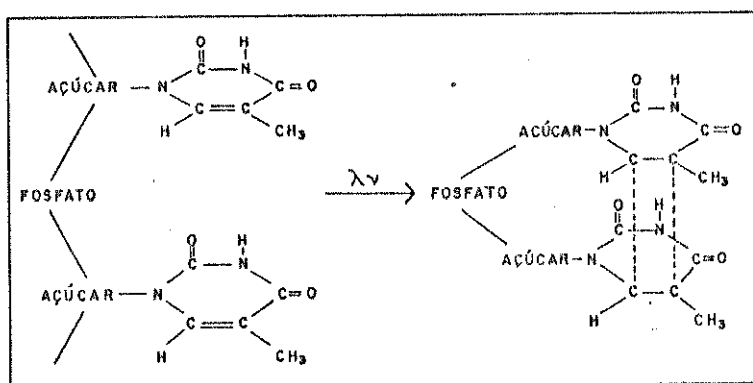


Figura 1.31 - Dímero de timina formado por irradiação UV. (A71)

A presença de tais dímeros pode bloquear a ação da DNA-polimerase e portanto impedir o processo de replicação (A76). As vezes, é possível para um certo organismo sobreviver com os danos em seu material genético sem reconhecer "conscientemente", que eles estão presentes. Por exemplo, quando a citosina é danificada por irradiação UV, ela pode se comportar no sistema de transcrição como se fosse uracila, podendo indiretamente resultar ou não em uma mudança de um amino ácido, em alguma proteína sintetizada no ribossomo (A77, A78).

Dentre os muitos efeitos produzidos pela radiação iônica

zante, pode-se citar a formação de ligações cruzadas DNA-proteínas, através da união de radicais livres, formados tanto no DNA como na proteína (A74). Recentemente, Simic e Dizdaroglu (A79) demonstraram a formação de dímeros timina-tirosina induzidos por radiação γ .

A radiação X, destacada pela sua ação mutagênica, resulta na produção de intermediários ativos como peróxidos e radicais $H^{\bullet}$ e $OH^{\bullet}$; bem como induz quebra de fita dupla no DNA para a qual não existe mecanismo de reparo. Alguns autores, dentre eles Kaplan e Zavarine (A80) acreditam que a letalidade dos raios-X seja uma função linear do conteúdo de pares GC no DNA, baseados em observações experimentais. O DNA isolado de timo de bezerro, fica progressivamente menos viscoso (gradualmente despolimerizado) após irradiação X (A81) ou tratamento com peróxidos ou radicais $OH^{\bullet}$ (A82). Entretanto, nem todas formas de DNA investigados tem sido degradadas após irradiação X, possivelmente por causa da efetividade de formação do radical ativo ser dependente de oxigênio e da água. Um dos sistemas bioquímicos mais sensíveis aos raios X em tecidos, parece ser o de síntese de DNA (A83-85). É bem conhecido o fato de que a exposição de tecidos, em rápido crescimento, à irradiação provoca uma inibição do processo. É porém útil lembrarmos que o material genético não se encontra livre no núcleo. Como sabemos, existem nucleoproteínas associadas ao DNA, as quais também funcionam possivelmente como barreiras, impedindo um eventual efeito direto da irradiação. Da mesma maneira existem os sequestradores naturais de radicais, que funcionam como protetores químicos contra efeitos indiretos da radiação ionizante; dentre eles podemos citar a cisteína e a cisteamina.

De estudos já realizados, sabe-se que os ácidos nucleicos e seus constituintes não absorvem luz visível. Entretanto, em

muitas experiências citadas na literatura, como as de Peak (A86) e de Webb e Lorenz (A87), a luz visível inativou o DNA purificado e matou diversas bactérias em culturas. Quando organismos de *E. coli* são irradiados com luz azul, resulta numa produção de células mutantes. Experiências com *Streptococcus pyogenes*, na região espectral entre 400 e 500 nm, mostraram que as paredes celulares dessas bactérias eram lesadas e a multiplicação destes organismos era diminuída. Até este ponto já sabemos que a multiplicação desses organismos está relacionada diretamente ao DNA, o qual contém as informações necessárias para garantir às novas espécies, as mesmas características das anteriores. Sendo assim, como então estaria o DNA sendo afetado pela irradiação visível, uma vez que ele não absorve luz nesta faixa? Isto pode bem ser esclarecido quando se relaciona tais fatos com o que entendemos por Ação Fotodinâmica e Oxigênio Singlete (A88).

1.9 - Ação Fotodinâmica

A ação fotodinâmica é a oxidação de moléculas biológicas importantes, na presença de luz, oxigênio e um corante que funciona como fotossensibilizador (Sens).

Os fotossensibilizadores tem dois sistemas de estados eletronicamente excitados, o singlete ($^1\text{Sens}$) e o triplete ($^3\text{Sens}$). Muitos corantes (azul de metileno, rosa de bengala, acridina laranja, etc.), pigmentos (bilirrubina, clorofila, flavinas, etc.) e hidrocarbonetos aromáticos (antracenos, rubrenos, etc.) são sensibilizadores efetivos (A89).

Para se compreender o mecanismo da ação fotodinâmica, é preciso conhecer os processos de excitação e relaxação dos corantes ou sensibilizadores. Os eventos fotoquímicos que ocorrem

quando um sensibilizador é exposto à luz visível são ilustrados na figura I.32.

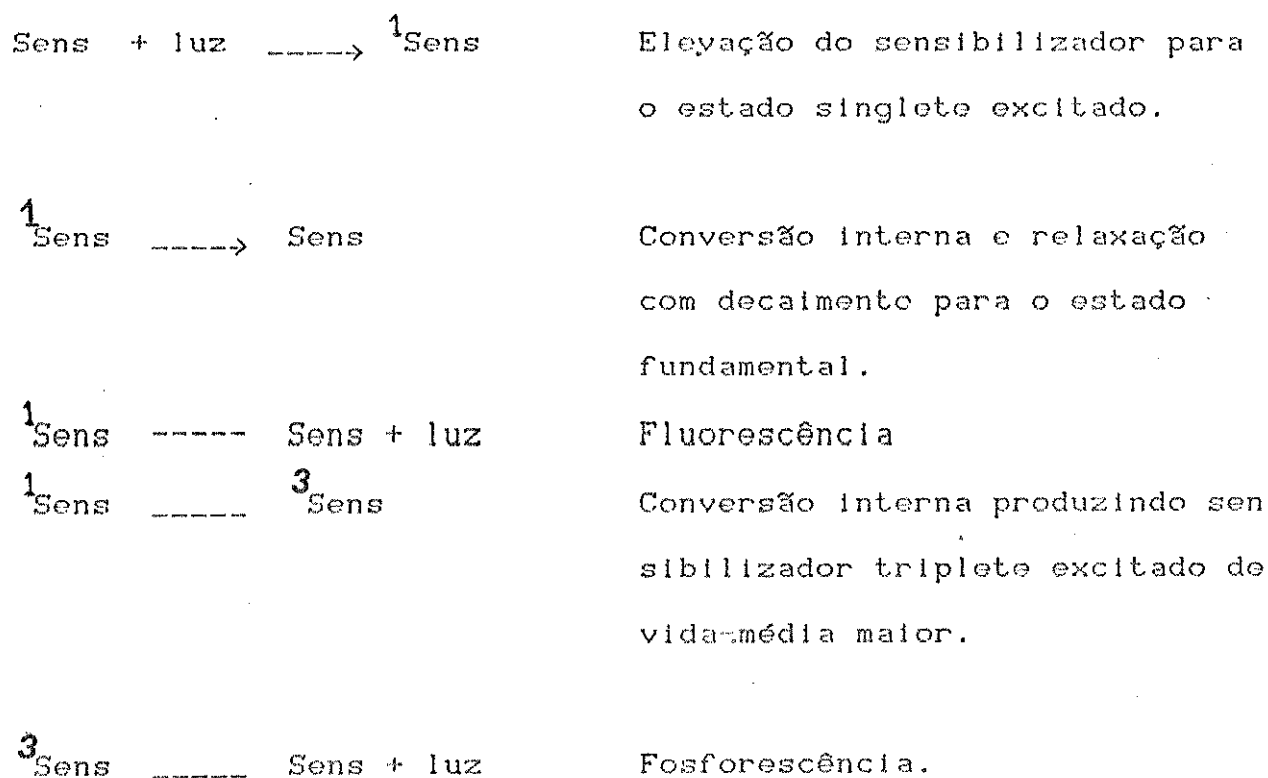


Figura I.32 - Excitação e Relaxação dos Sensibilizadores.(A89)

Na presença de oxigênio molecular, o mecanismo que mais tem merecido destaque no estudo da ação fotodinâmica (A90) , é representado pela figura I.33.

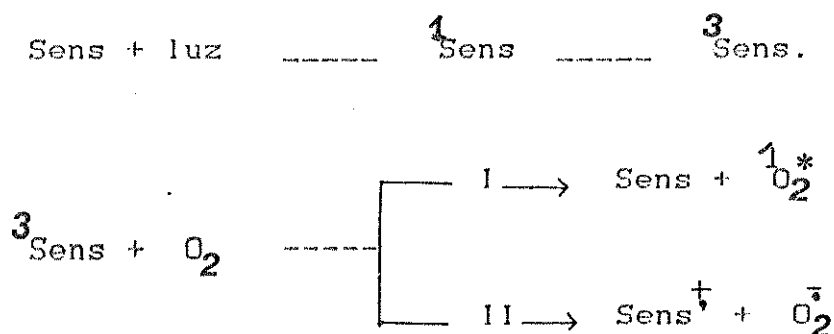


Figura I.33 - Mecanismo de Interação entre Sensibilizador triplete e oxigênio molecular.(A90)

Devido à velocidade do processo I ser aproximadamente 100 vezes maior que a do processo II, a produção de oxigênio singlete assume o papel principal deste mecanismo.

1.10 - OXIGÊNIO SINGLETE

A molécula de oxigênio tem 3 estados eletronicamente possíveis de mais baixa energia, os quais diferem, em população, de seus orbitais moleculares de energia mais alta (A91). Na tabela 1.1 são exemplificados tais estados de uma maneira mais simples.

O oxigênio singlete, comumente escrito na forma $^1\text{O}_2^*$, no estado $^1\Delta_g$, é extremamente reativo e possui uma vida média em solução de aproximadamente 10^{-6} s. A molécula de oxigênio singlete no estado $^1\Delta_g$ pode ser representada por $\text{O}=\text{O}$, ou seja, em sua estrutura eletrônica ela se assemelha ao etileno e se comporta nas

Molécula de O_2	Símbolo	Alojamento dos elétrons e vida média		Energia (Kcal/mol)
segundo estado excitado	$^1\Sigma$	$\text{---}\uparrow\text{---}$	$\text{---}\downarrow\text{---}$	10^{-11} s 37
primeiro estado excitado	$^1\Delta_g$	$\text{---}\uparrow\text{---}$	$\text{---}\text{---}$	10^{-6} s 22
fundamental	$^3\Sigma_g$	$\text{---}\uparrow\text{---}$	$\text{---}\uparrow\text{---}$	

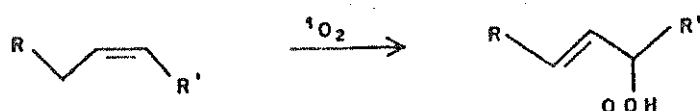
Tabela 1.1 - Estados eletrônicos de oxigênio. (A91)

nas reações como um dienófilo (A92). Assim, as propriedades quí-

micas de oxigênio singlete no estado $^1\Delta_g$ são completamente diferentes das suas propriedades no estado fundamental.

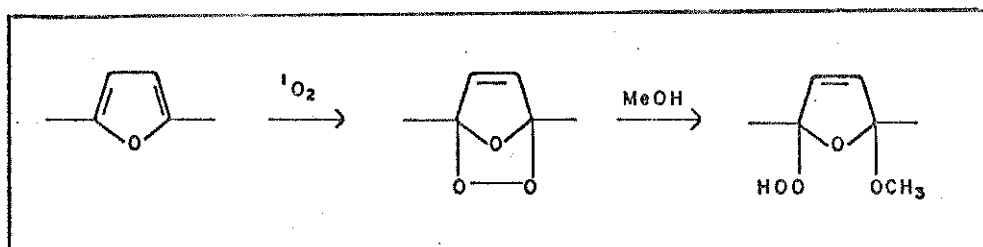
Existem vários tipos de reação de $^1O_2^*$ com vários substratos, as quais podem ser importantes em sistemas biológicos (A93-96). São elas:

a. reação tipo-eno ; ocorre com olefinas contendo dois ou mais substituintes alquila, resultando na formação de hidroperóxidos alílicos. O exemplo mais comum desta reação em sistemas biológicos é a formação de lipoperóxidos quando $^1O_2^*$ reage com ácidos graxos insaturados (A97), reação 1.7.



Reação 1.7 - Interação de ácidos graxos com $^1O_2^*$, produzindo lipoperóxidos. (A97)

b. reação Diels-Alder (adição 1,4); resulta frequentemente na formação de endoperóxidos de estabilidade variável. Um exemplo disto pode ser dado pela reação de 1,4-dimetilfurano (A98), reação 1.8.



Reação 1.8- Adição de 1,4-dimetilfurano e oxigênio singlete. (A98)

c. reação via formação de dioxetanos; ocorre quando olefinas e enaminas reagem com $^1O_2^*$ (A99). Os dioxetanos, que serão vistos posteriormente, são geralmente instáveis e altamente energéticos, sofrendo facilmente uma clivagem, a qual resulta na formação de carbonilas eletronicamente excitadas, responsáveis pela quimiluminescência observada (A100,A101).

1.10.1 - Importância Biológica de $^1\text{O}_2^*$: Efeitos Genéticos

O efeito fotodinâmico pode produzir danos em vírus, fungos, algas e outros organismos unicelulares mais simples, causando mutações, defeitos em membranas, distúrbio de metabolismos, etc., (A101A102). Em sistemas biológicos, o oxigênio singlete gerado neste processo, reage com substratos, tais como: resíduos de amino ácidos das proteínas, bases dos ácidos nucleicos e lipídeos das membranas.

A decomposição de DNA após extensivo tratamento fotodinâmico com acridina laranja, foi documentado por Freiel e Mahler (A103). Eles observaram que após este tratamento, ocorria uma diminuição no ponto de fusão do DNA, o qual era proporcional ao conteúdo de guanina, indicando mudanças em suas conformações. Bellin e Yankus (A104) observaram danos no esqueleto da molécula de DNA após tratamento fotodinâmico, evidenciado pelas mudanças em sua viscosidade. Um exemplo frequentemente encontrado na literatura, mostra o efeito da irradiação sobre *E.coli* B na presença de acridina laranja em diversas concentrações, como o observado na figura 1.34. Como podemos verificar, a concentração do sensibilizador também é um fator importante, se não determinante, na sobrevivência destes microorganismos. As investigações posteriores a esses efeitos, mostraram que o material genético é, sem dúvida, danificado. Após minucioso trabalho, Cadet e Teoule (A105) demonstraram que a guanina é a base preferencialmente atacada por $^1\text{O}_2^*$ durante a ação fotodinâmica, como será comentado mais tarde no capítulo III.

O oxigênio singlete, produzido desta maneira, também causou mudanças genéticas em levedura. A inativação fotodinâmica neste caso aumentou quando H_2O foi substituída por D_2O , a qual se

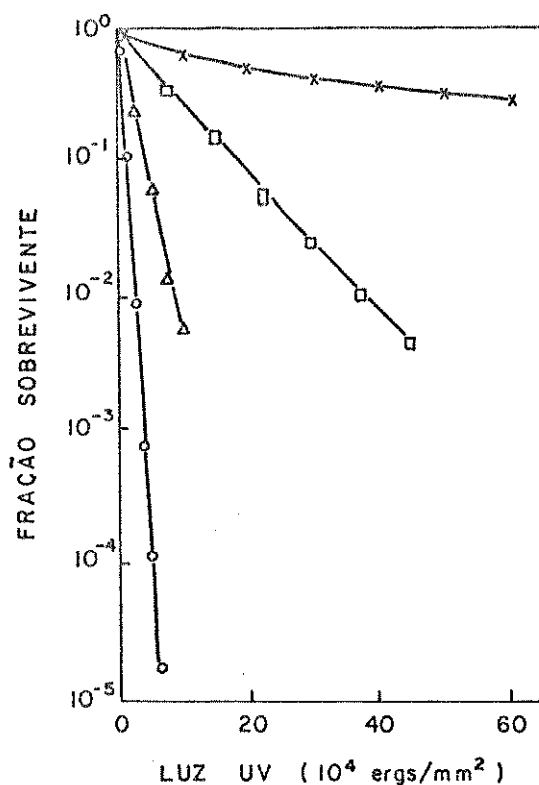


Figura 1.34 - Curva de sobrevivência de *E. coli* quando irradiada com luz visível e na presença de diferentes concentrações de acridina laranja (A106):

(—○—) 1 : 2 × 10⁵ (—□—) 1 : 8 × 10⁵
 (—Δ—) 1 : 4 × 10⁵ (—x—) 1 : 16 × 10⁵

sabe aumenta a vida média da espécie $^1\text{O}_2^*$. Por outro lado, a inativação foi grandemente reduzida na presença de íons azoteto, conhecidos por suprimir a emissão de $^1\text{O}_2^*$ (A106). Esta prova *in vivo* é considerada de suma importância, uma vez que demonstrou a participação de $^1\text{O}_2^*$ durante a ação fotodinâmica e sua influência sobre o material genético.

OBJETIVOS DA TESE

Como foi verificado neste capítulo, o DNA desempenha uma função biológica muito importante, seja na preservação das espécies através da replicação ou na síntese de proteínas que são vitais aos organismos vivos. Chega-se então à seguinte questão: qual a relação entre os sistemas bioenergizados e a ação fotodinâmica com os ácidos nucleicos, principalmente o DNA?

Foi visto que a irradiação UV sobre ácidos nucleicos tem sido responsável por muitos danos no material genético, induzindo certos microorganismos à uma mutagênese e até mesmo à morte. Embora a irradiação visível não afete diretamente os constituintes do material genético, ela pode, por efeito indireto de fotossensibilização, onde principalmente a espécie ativada $^1O_2^*$ é formada, produzir danos semelhantes. Recentemente, com o avanço das pesquisas sobre "fotoquímica sem luz" (geração de fótons sem incidência de luz), certos sistemas de degradação enzimática vem merecendo um estudo à parte, visto que eles geram espécies ativas, singletes ou tripletes, as quais são responsáveis pela bioluminescência observada. Além do bom rendimento em que tais espécies são geradas, elas têm se mostrado reativas frente aos diversos substratos orgânicos, reagindo com eles ou transferindo sua energia de excitação aos mesmos.

Dentre os muitos estudos que tem sido feitos com sistemas bioenergizados, ainda é pouco conhecido os seus efeitos sobre os ácidos nucleicos. Sabe-se, no entanto, que alguns sistemas em estudo tem apresentado alterações em t-RNA e DNA. A acetona triplete, gerada na oxidação do 2-metilpropanal catalisada por HRP, transfere sua energia para o DNA, induzindo a formação de regiões

de fita simples e o rompimento de ligações de hidrogênio entre as bases (A6).

Um estudo muito bem detalhado sobre os efeitos de $^1\text{O}_2^*$, gerado por reação fotoquímica e bioenergizada, em t-RNA, mostrou a formação de um aduto entre a espécie excitada e o ácido ribonucleico, o qual foi isolado e reconhecido através de RMN, IV e Massa (A7, A33).

Um trabalho recente do nosso grupo, que está sendo desenvolvido com bactérias *E.coli* na presença de sistemas enzimáticos, tem mostrado que o número de colônias assim tratadas diminui em relação às não tratadas; possivelmente devido aos danos produzidos no material genético na presença das espécies excitadas. Durante a oxidação de malonaldeído por HRP, onde $^1\text{O}_2^*$ é gerado, foram notadas modificações espectrais de DNA na região do UV e um abaixamento da fluorescência do complexo DNA-Tb(III), implicando que a guanosina está diretamente envolvida com a espécie excitada.

Tendo em mente tais precedentes, este trabalho foi proposto, visando contribuir em alguns aspectos para os estudos sobre a influência de espécies excitadas, geradas enzimaticamente e por ação fotodinâmica, sobre o ácido desoxirribonucleico. Os objetivos básicos que norteiam esta tese, podem ser assim enunciados:

1. Estudar os sistemas de degradação enzimática do ácido fólico, do malonaldeído e do ácido indol-3-acético, na presença de bilirrubina e tentar acompanhar a variação na constante de associação-dissociação do complexo Bil.-HRP, bem como sua eficiência em suprimir a emissão destes sistemas, por reagir com $^1\text{O}_2^*$ via formação de um intermediário dioxetânico.

2. Investigar, com o auxílio de alguns métodos espectroscópicos (UV, fluorescência, CD) e de reações químicas, possíveis alterações estruturais que os sistemas bioenergizados, na presença e na ausência de Bil., induzem no DNA.
3. Comparar os resultados obtidos com os sistemas enzimáticos e os obtidos por fotossensibilização, usando-se um sensibilizador adequado.
4. Verificar a ocorrência de degradação no resíduo guanosina, quando tratado em presença de $^1O_2^*$, através de fluorescência direta de um hidrolisado de DNA.
5. Detectar a formação de um aduto DNA-IAL, através de reação de marcação isotópica com ^{14}C , comparando-se com os resultados obtidos para o t-RNA.

Em resumo, deseja-se estudar as mudanças produzidas no DNA pelos sistemas bioenergizados, através das técnicas utilizadas (p.ex. fluorescência, CD, reatividade da guanosina, etc.) em transformações fotoquímicas onde são gerados $^1O_2^*$ e carbonilas triplete. Isto possibilitará evidenciar a importância de estados excitados em sistemas biológicos.

REFERÊNCIAS

- (A1) P.C.Neto e E.J.H.Bechara, *Arq.Biol.Tecnol.*, 27:439,1984.
- (A2) E.Cadenas, em "Oxidative Stress", (H.Sies, ed.), Academic Press, London, pag.311 (1985).
- (A3) G.Cilento, *Photochem.Photobiol. Rev.*, 5:199,1980.
- (A4) N.I.Krinsky, *TIBS*, 35,1977.
- (A5) S.T.Faria-Furtado, Tese de Mestrado, UNICAMP (1982).
- (A6) L.A.Guillo, Tese de Mestrado, UNICAMP (1982).
- (A7) M.P. De Mello, S.M. De Toledo, H.Aoyama, H.Sarkar, G.Cilento e N.Durán, *Photochem.Photobiol.*, 36:21,1982.
- (A8) G.Cilento, K.Zinner, E.J.H.Bechara, N.Durán, R.C.Baptista, Y.Shimizu, O.Augusto, A.Faljoní-Alário,, C.C.C.Vidigal, O.M. M.Faria Oliveira e M.Haun, *Ciência e Cultura*, 31:290,1979.
- (A9) E.Cadenas, *Photochem.Photobiol.*, 40:823,1984.
- (A10) H.B.Dunford e J.S.Stillman, *Coord.Chem.Rev.*, 19:187,1976.
- (A11) J.E.Frew e P.Jones, *Advan.Inorg.Bioinorg.Mech.*, 3:175,1984.
- (A12) N.N.Ugarova e O.V.Lebedeva, *Biokhimiya*, 43:1731,1978.
- (A13) H.B.Dunford, *Advan.Inorg.Biochem.*, 4:41,1982.
- (A14) G.Cilento, *Pure Appl.Chem.*, 56:1179,1984.
- (A15) N.Durán e E.Cadenas, *Rev.Chem.Intermediates*, no prelo.
- (A16) W.Adam e G.Cilento, *Ang.Chem.Int.Ed.*, 22:529,1983.
- (A17) W.H.Richardson, M.B.Yalvington e H.F.O'Neal, *J.Am .Chem. Soc.*, 94:1619,,1972.
- (A18) K.R.Kopecky e C.Munford, *Can.J.Chem.*, 47:709,1969.
- (A19) N.Durán, K.Zinner, C.C.C.Vidigal e G.Cilento, *Biochem. Biophys.Res.Comm.*, 74:1146,1977.
- (A20) K.Zinner, N.Durán, C.C.C.Vidigal, Y.Shimizu e G.Cilento, *Arch.Biochem.Biophys.*, 173:58, 1976.
- (A21) S.A.Gordon, R.J.M.Fry e S.Ban, *Am.J.Physiol.*, 222:399,1972.

- (A22) K.V.Thimann e B.M.Sweeney, *J.Gen.Physiol.*, 121:123,1937.
- (A23) A.W.Galston, J.Bonner e R.S.Baker, *Arch.Biochem.Biophys.*, 42:456,1953.
- (A24) P.L.Goldacre, *Aust.J.Sci.Res.*, B-4:293,1951.
- (A25) O.P.Srivastava e R.B.Van Huystee, *Can.J.Bot.*, 51:2207,1972.
- (A26) C.C.C.Vidigal, K.Zinner, N.Durán e G.Cilento, *Biochem. Biophys.Res.Comm.*, 65:138,1975.
- (A27) N.Durán, K.Zinner, R.C.De Baptista, C.C.C.Vidigal e G.Cilento, *Photochem.Photobiol.*, 24:383,1976.
- (A28) C.C.C.Vidigal, A.Faljoni-Alário, N.Durán e G.Cilento, *Photochem.Photobiol.*, 30:195,1979.
- (A29) Y.Morita, Y.Kominato e K.Schimizu, *Mem.Res.Inst.Food Sci., Kyoto Univ.*, 28:1,1967.
- (A30) R.Nakajima e I.Yamazaki, *J.Biol.Chem.*, 254:872,1972.
- (A31) T.Wilson, M.T.P.In.Rev.Sci.Chem.Kinet, ser.II, 265,,1976.
- (A32) P.-S.Song e W.E.Kurtin, *J.Am .Chem.Soc.*, 91:4892,1969.
- (A33) M.P.De Mello, Tese de Doutorado, Unicamp(1982).
- (A34) M.P.De Mello, S.M.De Toledo e N.Durán, *Acta sud Amer de Quím* , 1::135,1981.
- (A35) M.P.De Mello, S.M.De Toledo, M.Haun, G.Cilento e N.Durán, *Biochemistry*, 19:5270,1980.
- (A36) D.H.Hug e R.C.Venema, *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 453:388,1985*.
- (A37) R.C.Venema e D.H.Hug, *J.Biol.Chem.*, 260:12190,1985.
- (A38) U.Riess e A.L.Tappel, *Biochim.Biophys.Acta*, 312:608,1973.
- (A39) O.L.Klamerth e H.Levinsky, *FEBS Lett.*, 3:205,1969.
- (A40) F.W.Summerfield e A.L.Tappel, *Anal.Biochem.*, 111:77,1981.
- (A41) U.Riess, A.L.Tappel e K.S.Chlo, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 48:921,1972.
- (A42) F.W.Summerfield e A.L.Tappel, *Anal.Biochem.*, 143:265,1984.
- (A43) N.Durán e H.Mansilla, *J.Macromol.Sci.-Chem.*, A21:1467,1984.

- (A44) G.L.Shapiro, V.V.Shereskovets, V.P.Kosakov, V.D.Komissarov e G.A.Tolstikov, *Izv.Akad.Navk., SSSR Ser.Khim.*, 5:1216, 1985* (Chem.Abst. 103, 131592m(1985)).
- (A45) N.Durán, S.T.Farias-Furtado, A.Faljoní-Alárido, A.Campa, J.E. Brunet e J.Freer, *J.Photochem.*, 25:285, 1984.
- (A46) M.I.Botez e B.Lambert, *Union Med. du Can.*, 108:939, 1975
- (A47) M.Webb, *Biochim.Biophys.Acta*, 17:212, 1955.
- (A48) B.Stea, P.S.Backlund, Jr., P.B.Berkey, A.K.Cho, B.C.Halpern, R.M.Halpern e R.A.Smith, *Cancer Res.*, 38:2376, 1978.
- (A49) B.M.Braganca, I.Aravindakshan e D.S.Ghanekar, *Biochim. Biophys.Acta*, 25:623, 1957.
- (A50) L.H.Innocentini-Mel, *Tese de Mestrado, Unicamp*(1981).
- (A51) A.F.McDonagh, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 44:1306, 1971.
- (A52) J.G.Peak, M.J.Peak, R.S.Sikorski e C.A.Jones, *Photochem. Photobiol.*, 41:295, 1985.
- (A53) R.J.Cremer, P.W.Perryman e D.H. Richards, *Lancet*, 1:1094, 1958.
- (A54) G.B.Odell, R.S.brown e A.E.Kopelman, *J.Pediatr.*, 81:473, 1972.
- (A55) D.A.Lightner e Y.-T.Park, *Tetrahedron Lett.*, 2209, 1976.
- (A56) R.Bonnett e J.C.M.Steward, *J.C.S.Perkin I*, 224, 1975.
- (A57) G.Lober e L.Kittler, *Photochem.Photobiol.*, 25:215, 1975.
- (A58) W.T.Speck e H.Rosenkranz, *Pediatr.Res.*, 9:703, 1975.
- (A59) W.T.Speck e H.Rosenkranz, *Pediatr.Res.*, 10:553, 1976.
- (A60) E.M.Witkin, *Bacterial.Rev.*, 40:869, 1976.
- (A61) A.L.Leningher, em "Principles of Biochemistry", (S.Anderson e J.Fox, eds.), Worth Publishers Inc., N.Y., cap.2, (1982).
- (A62) R.Barker, em "Organic Chemistry of Biological Compounds", (Lowell Hager e Finn Wold, eds.), Prentice-Hall, N.J., pag.281(1971).
- (A63) A.White, P.Handler e E.L.Smith (eds.), "Principles of Bio

- chemistry", McGraw-Hill, 4 ed., pag.181(1968).
- (A64)D.T.Hurst(ed.),em"Chemistry and Biochemistry of Pyrimidines, Purines and Pteridines", John Wiley & Sons Ltd., G.B., pag.15 (1979).
- (A65)A.L.Leningher,em"Principles of Biochemistry", (S.Anderson e J.Fox,eds.), Worth Publishers Inc., N.Y.,pag.804(1982).
- (A66)H.R.Mahler e E.H.Cordes(eds.),em"Biological Chemistry", Harper e Row Publ., pag.194(1971).
- (A67)S.Y.Wang(ed.), "Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids", Academic Press, N.Y., vol.II, pag.2(1976).
- (A68)J.D.Watson e F.H.C.Crick, Nature, 171:964,1953.
- (A69)E.Chargaff, Experientia, 6:201,1950.
- (A70)J.N.Davidson(ed.), "The Biochemistry of Nucleic Acids", Cox & Wyman, G.B., pag.29(1972).
- (A71)J.N.Davidson(ed.), "The Biochemistry of Nucleic Acids", Cox & Wyman, G.B., pag.23(1972).
- (A72)A.L.Leningher(ed.), "Bioenergetics", W.A.Benjamin, USA, pag.155(1973).
- (A73)J.N.Davidson(ed.), "The Biochemistry of Nucleic Acids", Cox & Wyman, G.B., pag.233(1972).
- (A74)K.C.Smith(ed.), "The Science of Photobiology", Plenum Press, N.Y., pag.115(1977).
- (A75)A.C.Giese, Photochem.Photobiol., 8:527,1968.
- (A76)F.J.Bollum e R.B.Setlow, Biochim.Biophys.Acta, 68:599,1963.
- (A77)G.T.Bowden, M.Kasunie e A.E.Cress, Radiat.Res., 89:203,1982.
- (A78)A.J.Fornace e J.B.Little, Biochim.Biophys.Acta, 477:343,1977.
- (A79)M.G.Simic e M.Dizdaroglu, Biochemistry, 24:233,1985.
- (A80)H.S.Kaplan e R.Zavarine, Biochem.Biophys.Res.Commun.,8:432, 1962.
- (A81)A.H.Sparrow e F.M.Rosenfeld, Science, 104:245,1946.

- (A82) J.A.V. Butler e K.A. Smith, *Nature*, 165:847, 1950.
- (A83) B.E. Holmes, *Brit. J. Radiol.*, 22:487, 1949.
- (A84) G. Hevesy, *Nature*, 163:869, 1949.
- (A85) R. Abrams, *Arch. Biochem. Biophys.*, 30:90, 1951.
- (A86) M.J. Peak, J.G. Peak e L. Nerad, *Photochem. Photobiol.*, 37:169, 1983.
- (A87) R.B. Webb e J.R. Lorenz, *Photochem. Photobiol.*, 12:283, 1970.
- (A88) D.A. Pearlman, S.R. Holbrook, D.H. Pirkle e S.H. Kim, *Science*, 227:1304, 1985.
- (A89) C.S. Foote, em "Free Radicals in Biology", (W.A. Pryor, ed.), Academic Press, N.Y., pag. 85 (1975).
- (A90) C.S. Foote, *Science*, 162:963, 1968.
- (A91) N.I. Krinsky, *TIBS*, 35, 1977.
- (A92) K. Gollnick, em "Singlet Oxygen", (B. Ranby e J.F. Rabek, eds.), John Wiley & Sons Ltd., pag. 112 (1978).
- (A93) E.W.S. Caughey (ed.), "Biochemical and Chemical Aspects of Singlet Oxygen", Academic Press, N.Y., (1979).
- (A94) H.H. Wasserman e R.W. Murray (eds.), em "Singlet Oxygen", Academic Press, N.Y., pag. 300 (1979).
- (A95) W. Adam e G. Cilento (eds.), "Chemical and Biological Generation of Excited States", Academic Press, N.Y., (1982).
- (A96) A.A. Frimer (ed.), "Singlet Oxygen", C.R.C. Press, Boca Raton, Florida (1985).*
- (A97) D.R. Kearns, *Chem. Rev.*, 71:395, 1971.
- (A98) K. Gollnick, *Advan. Photochem.*, 6:1, 1968.
- (A99) C.S. Foote, *Acc. Chem. Res.*, 1:104, 1968.
- (A100) T. Wilson e A. Schaap, *J. Am. Chem. Soc.*, 93:4126, 1971.
- (A101) J.D. Spikes, *Singlet Oxygen*, 4:91, 1985.*
- (A102) N.V. Shinkarenko e V.B. Aleskovskii, *Rus. Chem. Rev.*, 51:407, 1982.

(A103) D. Freifelder e H.R. Mahler, Biochim. Biophys. Acta,
53:199, 1961.

(A104) J.S. Bellin e C.A. Yankus, Biochim. Biophys. Acta,
112:363, 1966.

(A105) J. Cadet e R. Teoule, Photochem. Photobiol., 28:661, 1978.

(A106) K. Kobayashi, Photochem. Photobiol., 28:535, 1978.

CAPITULO II

DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 11- DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

11.1 - DROGAS UTILIZADAS

Substâncias	Procedência
Ácido acético glacial*	J.T.Backer Laboratório
Ácido clorídrico*	Merck
AFo(Ácido fólico)*	Merck
Acetato de sódio*	Dyne Produtos Químicos
Acetona*	Carlo Erba
Ácido indol-3-acético*	Merck
Ácido tricloroacético*	Carlo Erba
Bil.(Bilirrubina de bile de boi)*	Sigma Chemical Co.
Catalase de fígado de boi(C40)*	Sigma Chemical Co.
Cacodilato de sódio*	Fisher Scientific Co.
Cloreto de potássio*	Tennant Química S.A.
Cloreto de térbio hexahidratado*	Alfa products
Clorofórmio*	Merck
Citrato de sódio*	Dyne Produtos Químicos
Cloreto de cobre*	Carlo Erba
DNAX(ácido desoxirribonucleico de timo de bezerro) tipo I	Sigma Chemical Co.
Etanol*	Aldrich Chemical Co.
éter etílico*	Aldrich Chemical Co.

EDTA(sal dissódico do ácido etileno- nodiáminatetetracético)*	Carlo Erba
Fosfato monobásico de sódio*	Sigma Chemical Co.
Fosfato bibásico de sódio*	Sigma Chemical Co.
Fenol (purificado por destilação)	Fisher Scientific Co.
Formaldeído*	Fisher Scientific Co.
GSH(Glutationa reduzida)*	Sigma Chemical Co.
Hidróxido de sódio*	Merck
Hidróxido de amônia*	Merck
HRP VI(peroxidase de rabanete tipo VI)*	Sigma Chemical Co.
(L)-Histidin*	Sigma Chemical Co.
IAA(ácido indol-3-acético)*	Merck
IAA (2-C ¹⁴) - (55 mCi/mMol)	Amersham U.K.
Isopropanol*	SICA-Brás Produtos Químicos
Metanol*	Merck
MA(Malonaldeído)	Sintetizado no laboratório.
MDVP(4'-metoxycarboniletal-4,3'- dimetal-3-vinil-2,2'-pirrometenona.	Max Planck Institut
Manitol*	Merck
Nitrato de sódio*	Merck

PPO(2,5-difeniloxazol)*	Sigma Chemical Co.
POPOP(1,4-bis[2-(5-feniloxazolil)] benzeno)*	Sigma Chemical Co.
RBp(Polímero de Rosa Bengala)	Hidron Laboratories, Inc.
Sulfato de manganês monohidratado*	BDH Chemica Ltd.
SOD(Superóxido dismutase bovina tipo I)	Sigma Chemical Co.
Tolueno*	Grupo Química Industrial Ltda
TEP(1,1,3,3,-tetraetoxipropano)*	Aldrich Chemical Co.

* (substâncias com grau de pureza máximo).

11.2 - EQUIPAMENTOS

As pesagens foram feitas em uma balança Mettler (Modelo ME-22) para massas acima de 5g e em uma microbalança Sartorius (Modelo 2406) para massas abaixo de 5g.

O controle dos pHs foi feito num potenciômetro Meethron Herisau (Modelo E-512).

Para se medir o consumo de oxigênio durante as reações enzimáticas, empregou-se um monitor de oxigênio da Yellow Springs Instruments (Modelo 53), com termostatização.

Os espectros de absorção na região do visível e do ultra violeta, foram registrados num espectrofotômetro da Zeiss (Modelo DMR-21).

Para estudo de dicroísmo circular, utilizou-se um espectropolarímetro Cary -60 (Modelo 6002).

Os estudos de fluorescência foram desenvolvidos em um espectrofluorímetro da Perkin-Elmer (Modelo MPF-44B).

A precipitação de DNA foi realizada numa centrífuga refrigerada da Sorvall (Modelo RC-28), equipada com rotor SS-34.

As contagens de emissão, proveniente dos sistemas enzimáticos, foram feitas num contador de cintilação líquida da Beckman (Modelo LS-100c), com o circuito de coincidência desligado. As contagens das marcações isotópicas, foram feitas em um cintilador para líquidos da Beckman (Modelo LS-7000).

As amostras de DNA para o estudo de fotossensibilização, foram irradiadas com uma lâmpada de média pressão de mercúrio da Osram.

11.3 - PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

11.3.1-Tampões : foram preparados segundo o método de Gomori (B1).

11.3.2-Acido fólico (P.M.441,41 ; $\epsilon = 7413 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 368 nm) : dissolveu-se 13,20 mg em 2ml de solução de NaOH 20% e estocou-se no escuro e na geladeira por no máximo uma semana. A concentração real foi de 15 mM.

11.3.3-Acido indol-3-acético (P.M.175,18 ; $\epsilon = 5012 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 280 nm): pesou-se 3,50 mg e dissolveu-se em 2ml de etanol. A solução estoque foi de 10 mM e foi mantida na geladeira, protegida da luz.

11.3.4-Bilirrubina (P.M.584,65 ; $\epsilon = 47200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 438 nm) : dissolveu-se 1,17 mg em 2ml de NaOH 0,1N, para se obter uma solução de 1 mM. Diluiu-se uma alíquota desta solução em um volume conhecido de tampão fosfato salino 0,01M (pH=7,4) e 0,9% em NaCl, para a leitura da absorção em 438 nm (B2). Esta solução foi preparada 10 minutos antes de ser usada para se evitar sua conversão à biliverdina com o tempo.

11.3.5-) 4'-metoxycarboniletill-4,3'-dimetil-3-vinil-2,2'-pirrometona MDVP (P.M.300,20) : pesou-se 0,3 mg do composto e dissolveu-se em 0,8 ml de etanol e 0,2 ml de NaOH 0,2N. Mantendo-se a solução estoque de 1 mM em banho gelado, é possível trabalhar por um período de até 4 horas, tomando-se o cuidado de protegê-la da luz (B3).

11.3.6-Horseradish peroxidase (HRP) (P.M.40000; $\epsilon = 102000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 403 nm) : foi preparada uma solução estoque de 0,2 mM, dissolvendo-se cuidadosamente 8,0 mg em 1 ml de água deionizada (B4).

11.3.7-Catalase (15000 unidades/mg de proteína): dissolveu-se 3,0 mg em 2 ml de água deionizada para dar uma concentração de 1500 unidades/ml. A estocagem foi feita por no máximo uma semana.

11.3.8-Superoxido dismutase (SOD) (30000 unidades/11 mg de proteína): diluiu-se a amostra de 30000 unidades/11 mg em 3 ml de tampão fisiológico 50 mM (pH=7,4) para se obter uma solução de 10000 unidades/ml. A seguir, tomou-se uma alíquota de 0,55 ml e ddiluiu-se até 2 ml do mesmo tampão para dar uma solução final de 2750 unidades/ml.

11.3.9-Ácido desoxirribonucleico (DNA) ($\epsilon = 6700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 260 nm) : preparou-se soluções que variavam de 1 a 4 mg/ml, em água deionizada e protegida da luz, na geladeira. Tomou-se uma alíquota de volume conhecido e diluiu-se em 3 ml de água deionizada e leu-se a absorbância (D.O.) em 260 nm (B5). Sabe-se que 1 D.O. corresponde a uma concentração de 45 $\mu\text{g/ml}$, portanto calculou-se a concentração de DNA do seguinte modo:

1 D.O.	-----	45 $\mu\text{g/ml}$
A (260 nm)	-----	z $\mu\text{g/ml}$

Tendo-se o valor de z, calculou-se então o valor real da concentração de DNA em $\mu\text{g/ml}$, como segue:

z $\mu\text{g/ml}$	x	3 ml	-----	$\mu\text{g/ml}$ de DNA na solução
volume (ml) da alíquota			-----	DNA real

11.3.10-Incorporação isotópica em DNA

Preparou-se tres misturas de reação contendo, cada uma, 50 μM de $(2\text{-C}^{14})\text{-IAA}$; 30 μM de EDTA e 30 $\mu\text{g/ml}$ de DNA em um volume final de 100 μl e em tampão acetato 50 mM, à tres pHs diferentes, ou seja, 3,8; 5,6 e 6,8. As reações foram iniciadas pela adição de HRP 1,0 μM e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. As reações foram interrompidas pela adição de igual volume de uma mistura fenol:clorofórmio (1:1) e posteriormente centrifugadas. A fração aquosa desproteinizada, adicionou-se 50 μl de uma solução 5% de ácido tricloroacético. O DNA precipitado em cada reação, foi filtrado, em filtro miliporoso, sob vácuo. O filtro foi posteriormente seco com uma corrente de ar à temperatura ambiente e colocado em um recipiente para cintilação líquida contendo PPO-POPOP tolueno como "cocktail". A quantidade de isótopo foi determinada em contador de cintilação líquida.

11.3.11-Cocktail PPO-POPOP : dissolveu-se 4,0 g de PPO e 0,1 g de POPOP em 1 litro de tolueno.

11.3.12-Incorporação isotópica de $\text{IAA}(2\text{-C}^{14})$

A mistura de reação continha, num volume final de 100 μl , 30 μM de EDTA, 50 μM de $\text{IAA}(2\text{-C}^{14})$ e 0,15 mM de timidina ou 10 unidades/ml de politimidina em tampão acetato de sódio 50 mM (pH=3,8) e era incubada à 37°C por 15 minutos. Após este tempo, a mistura era colocada no gelo e aplicada em papel Whatmann nº 1, sendo posteriormente desenvolvida em isopropanol, amônia e água na proporção de 13:1:1, respectivamente (B6). Quando pronto o cromatograma, cortava-se o mesmo em frações de 0,5 cm, as quais

eram colocadas em frascos apropriados para cintilação em meio líquido, contendo o "cocktail" PPO-POPOP (vide item 11.3.11) e contadas a radioatividade.

11.3.13-Estudos fotodinâmicos usando polímero de rosa bengala (RBp) como sensibilizador.

O estudo de fotossensibilização de DNA foi feito em tampão cacodilato de sódio 20 mM e 10 mM em KCl à pH 6. Este tampão foi usado porque após a irradiação de DNA com RBp, o primeiro foi complexado com Tb (III), e a fluorescência do complexo foi seguidamente registrada.

A irradiação do sistema foi feita em 546 nm, onde é o máximo de absorção de RBp, empregando-se uma lâmpada de vapor de mercúrio de média pressão, com uma fluência de $5,6 \text{ mJ/cm}^2$. A seguir o sensibilizador foi separado do meio, por filtração, e o DNA foi complexado com o Tb (III).

11.3.14-Filtro para irradiação : usou-se uma solução de NaNO_2 3,5 M, para filtrar a radiação de comprimento de onda abaixo de 400 nm e outra mistura de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,85 M) e CaCl_2 (2,97 M) para permitir a incidência de irradiação de comprimento de onda somente na faixa de 540-550 nm (B7).

11.3.15-Preparação do DNA para complexação com Tb (III).

A extração dos DNAs tratados nos sistemas enzimáticos, consiste da adição de 10 gotas de uma mistura de fenol:clorofórmio (1:1), para cada 2 ml da mistura de reação. A seguir, centrifuga-se por 2 minutos para isolar o fenol-clorofórmio contendo a

enzima HRP precipitada. A parte aquosa restante é dialisada por 48 horas, usando-se o tampão da reação. Coleta-se esta solução aquosa e adiciona-se NaCl 0,1 M final, para tornar o meio isotônico. Posteriormente, agrega-se 3 volumes de etanol absoluto para precipitação do DNA (B8), seguida de centrifugação à 0 °C e 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante é então desprezado e o DNA seco em uma corrente leve de nitrogênio. O DNA é ressuspenso em 3 ml de tampão cacodilato 20 mM (pH=6) e 10 mM em KCl, sendo a concentração verificada pela absorção em 260 nm. Uma vez conhecida a concentração do DNA, acrescenta-se um volume conhecido de cloreto de térbio, tal que a razão da concentração molar de DNA por concentração de térbio, seja aproximadamente 6. Segundo Ringer e col. (B9), esta é uma condição necessária para se obter uma maior intensidade de fluorescência do complexo DNA-Tb (III).

11.3.16-Cloreto de térbio hexahidratado (P.M.453,15) : a solução estoque foi de 0,1 M, sendo preparada pela dissolução de 45,32 mg em 1 ml de tampão cacodilato 20 mM (pH=6) e 10 mM em KCl. Segundo Prados e col.(B10), isto previne a formação de hidróxidos.

11.3.17-Citrato de sódio/Cloreto de sódio (P.M.294,12/P.M.58,45) : preparou-se uma solução estoque de 25 ml, contendo citrato de sódio 10 mM (73,50 mg/25 ml H₂O) e cloreto de sódio 30 mM (43,80 mg/25 ml H₂O). Esta solução forneceu um pH de 8,3 (B11).

11.3.18-Glutathione (P.M.307,33) : dissolveu-se 6,15 mg em 2 ml de água deionizada, para obter-se uma solução estoque de 10 mM.

II.3.19-Malonaldeído sódico (P.M.94)

Empregou-se uma modificação do método de Grabowski e Autrey (B12). Agitou-se vigorosamente 3,30 g de TEP; 1,2 ml de HCl e 1,6 ml de água destilada, por aproximadamente 1 hora e 20 minutos, à temperatura ambiente. Com menor tempo de agitação, torna-se maior a possibilidade de formar β -etóxiacroleína em quantidades significantes (B13). Com o tempo de agitação maior ocorre a formação de dímeros de malonaldeído.

A solução amarela resultante, foi resfriada em gelo e o pH ajustado para 10 com NaOH 5,0 N. A seguir, adicionou-se 0,51 l de acetona, vagarosamente, e os cristais formados foram filtrados em papel Whatman 2, lavados com acetona e secos à vácuo em temperatura ambiente por 12 horas. A dissolução do sal foi feita com um volume mínimo de etanol, à quente, seguida da adição de carvão ativo. Após 15 minutos, filtrou-se a solução com papel Whatman 2 e, ao filtrado, adicionou-se éter etílico até que todo malonaldeído sódico fosse precipitado. Posteriormente, filtrou-se o mesmo e secou-se à temperatura ambiente e à vácuo, por 24 horas. A pureza do sal assim obtido, foi testada pelo espectro UV em etanol, à 266 nm onde $\epsilon = 22700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

II.3.20-Hidrólise ácida de DNA

A obtenção dos DNAs pré-tratados nos sistemas enzimáticos, foi feita segundo o procedimento discutido no item II.3.1. Neste caso, as amostras de DNA foram ressuspensas em 2 ml de água deionizada e suas concentrações foram medidas em 260 nm, como estabelecido no item II.3.9. Uma vez igualada as concentrações das amostras, adicionou-se 160 μl de HCl concentrado para se obter so

luções de aproximadamente 1,0 N. A seguir, colocou-se as mesmas em tubos de ensaio, os quais foram selados, e submetidos a um banho de água em ebulição por 45 minutos.

Depois de atingir a temperatura ambiente, os tubos foram abertos e as amostras foram levadas à pH 7 com NaOH 1,0 N. Neste ponto, adicionou-se NH_4OH 1,0 N até atingir pH 11, onde, segundo Udenfriend e Zaltzman (B14), somente a guanina fluoresce. Esta fluorescência foi registrada na região de 310-390 nm, excitando-se as amostras em 275 nm.

11.3.21-Reação de DNA com formaldeído .

Após tratar e isolar os DNAs dos sistemas enzimáticos, como relatado no item 11.3.15, ressuspendeu-se os mesmos em 2 ml de uma solução de citrato de sódio/cloreto de sódio (vide item 11.3.17). Depois de ter acertado as concentrações das amostras pelo valor de suas absorções em 260 nm, e ter adicionado formaldeído à 30%, colocou-se as mesmas em um banho a 60°C. A seguir, leu-se a variação de absorbância à 260 nm, para cada amostra, em intervalos de tempo regulares, e construiu-se um gráfico de ΔA (à 260 nm) versus tempo.

Referências

- (B1) G. Gomori, *Methods. Enzymol.*, 1:967, 1975.
- (B2) A.A. Lamola, J. Eisinger, W.E. Blumberg, S.C. Patel e J. Flores, *Anal. Biochem.*, 100:25, 1979.
- (B3) A.A. Lamola, S.E. Braaslavsky, K. Schaffner e D.A. Lightner, *Photochem. Photobiol.*, 37:263, 1983.
- (B4) H.B. Dunford e J.S. Stielman, *Coord. Chem. Rev.*, 19:213, 1976.
- (B5) B.N. Ames e T. Dubin, *J. Biol. Chem.*, 235:769, 1970.
- (B6) B.B. Stowe e K. Thimann, *Arch. Biochem. Biophys.*, 51:499, 1954.
- (B7) J. Kopecky e F. Liska, *Chem. Listy*, 72:577, 1978.
- (B8) A.D. Kelmers, C.W. Hancher, E.S. Phares e G.D. Novelli, *Methods Enzymol.*, 20:3, 1971.
- (B9) D.P. Ringer, B.A. Howell e D.R. Kizer, *Anal. Biochem.*, 103:337, 1980.
- (B10) R. Prados, L.G. Stadtherr, H. Donatato e R.B. Martin, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 36:689, 1974.
- (B11) A.A. Schothorst, D. Suurmond e R. Schouten, *Photochem. Photobiol.*, 38:659, 1983.
- (B12) E.J. Grabowski e R.L. Autrey, *Tetrahedron*, 25:4315, 1969.
- (B13) L.J. Marnett e M.A. Tuttle, *Cancer Res.*, 40:276, 1980.
- (B14) S. Udenfriend e P. Zaltzman, *Anal. Biochem.*, 3:49, 1962.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO III _ RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1 Degradação Aeróbica de IAA, NA e AFO , Catalisada por HRP

Sob as condições de pH e concentrações indicados na figura III.1, a degradação aeróbica de IAA, catalisada por HRP, consumiu 30% do oxigênio do meio em 0,5 minutos de reação com a produção de IAL como o produto principal. De acordo com Morita e col.(C1), é neste pH que ocorre a produção máxima deste produto, o qual sabemos se forma no estado excitado triplete (C2,3).

Na figura III.2, observamos a cinética de consumo de oxigênio para a degradação enzimática de malonaldeído. Os melhores resultados foram obtidos com as concentrações indicadas na figura, onde o consumo de oxigênio foi de 90% nas condições de pH empregado. A presença de Mn^{+2} é importante pois ele atua como um cofator para a HRP, dando início à sua função catalítica, provavelmente através da formação de traços de H_2O_2 , o qual é indispensável para a formação do composto I (vide esquema, pag.4).

Pela figura III.3, notamos que as melhores condições para a degradação oxidativa do ácido fólico, pela HRP, são obtidas quando glutatona reduzida, catalase e Mn^{+2} estão presentes, atuando como cofatores enzimáticos. A presença de catalase é importante para manter a concentração de H_2O_2 , gerado no meio através da oxidação de glutatona, em um nível baixo o suficiente para garantir a forma reduzida deste cofator. A partir dos estudos realizados, foi possível estabelecermos a reação padrão, obedecendo a ordem de adição dada na figura III.3. Nas concentrações indicadas, e à pH 5,5, a reação consumiu aproximadamente 100% de oxigênio do meio, em quase 3 minutos.

Em todas as três reações enzimáticas, manteve-se a tempe-

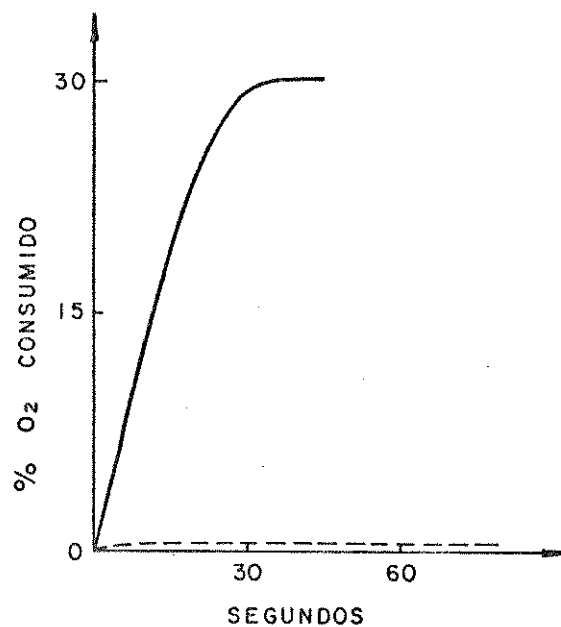


Figura III.1 - Cinética de consumo de oxigênio, em tampão acetato de sódio 50 mM (pH=3,8) e à 37-38°C, de:
 a. IAA (0,1mM)/EDTA(30 μ M)/HRP(0,8 μ M)/O₂ | ——— |
 b. IAA (0,1mM)/EDTA (30 μ M)/O₂ | - - - - |

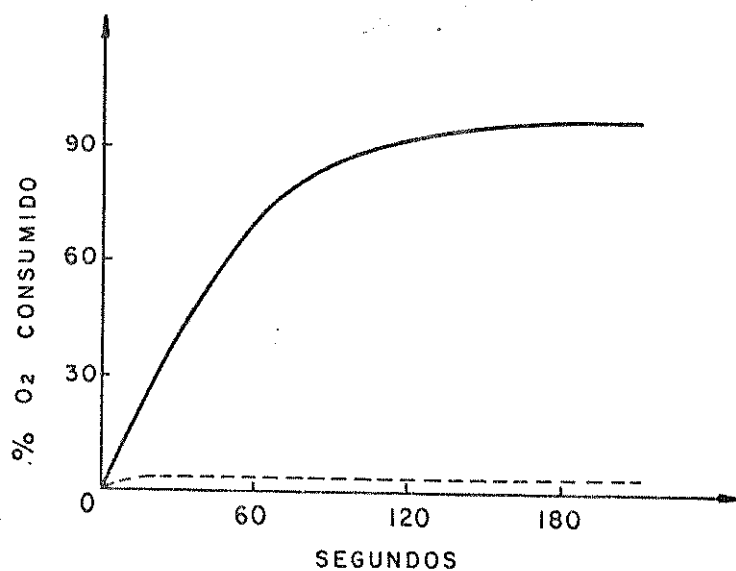


Figura III.2 - Cinética de consumo de oxigênio, em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH=4,8) e à 37-38°C, de:
 a. MA (10 mM)/Mn²⁺(3 mM)/HRP (0,8 μ M)/O₂ | ——— |.
 b. MA (10 mM)/Mn²⁺(3 mM)/O₂ | - - - - |.

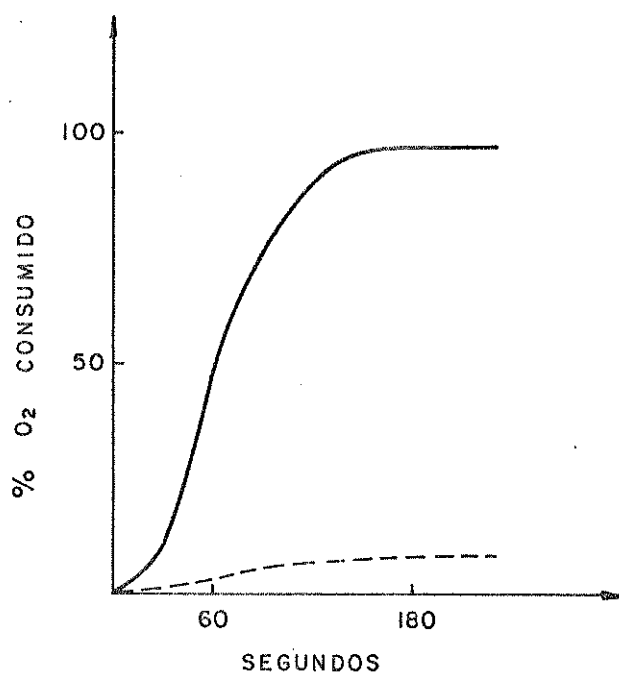


Figura III.3 - Cinética de consumo de oxigênio, em tampão fosfato de sódio 0,5 M (pH=5,5) e à 37-38°C, de:

- Afo(1,2 mM)/GSH(0,3 mM)/Catalase(164 unidades/ml)/HRP(4,0 μ M)/Mn²⁺(80 μ M)/O₂ ————.
- Afo(1,2 mM)/GSH(0,3 mM)/Catalase(164 unidades/ml)/Mn²⁺(80 μ M)/O₂ - - - -.

ratura da cuba de reação na faixa de 37 a 38°C para garantir o máximo de atividade catalítica de HRP. Quando se adicionou outras substâncias no meio de reação, tal como DNA, Bil. e MDVP, acompanhou-se a cinética de consumo de oxigênio na degradação dos substratos, no sentido de verificar que concentração máxima da substância introduzida não afetaria a cinética da reação. Assim, as concentrações de DNA e de outras substâncias que não afetam as reações enzimáticas estão indicadas nas figuras onde elas aparecem. Estas experiências são feitas concomitantemente com o estudo do ciclo da peroxidase (C4).

III.2 - Cálculo das Constantes de Associação-Dissociação de Bilirrubina-HRP

Visto o papel importante que ocupa a albumina na eliminação de Bil. *in vivo*, Chen (C5) realizou um estudo onde calculou algumas constantes de associação-dissociação de Bil., frente à albumina de fontes diferentes. Sabendo que a ligação de Bil. à albumina é acompanhada da perda da fluorescência intrínseca desta proteína, ele determinou estas constantes, baseando-se no método fluorimétrico de Scatchard (C6), cujos resultados obtidos estão resumidos na tabela III.1.

Uma vez que a HRP também possui uma fluorescência intrínseca, atribuída ao resíduo triptofano na sua cadeia, decidimos usar o mesmo método para avaliar a constante de associação-dissociação para Bil-HRP, *in vitro*. Desta maneira, irradiamos o resíduo triptofano à 295 nm e seguimos a sua intensidade máxima de fluorescência em 330 nm. Como a Bil. tem diferentes conformações com o pH, o qual pode ou não favorecer tanto a sua associação à HRP bem como a sua livre rotação através do grupo metilideno, de-

cidimos avaliar também a constante de associação-dissociação usando o MDVP. Este é um éster que compreende meia estrutura da Bil. e portanto tem livre rotação para qualquer pH (C7), (vide figura III.4).

Tabela III.1 - Cálculo das constantes de associação-dissociação para Bil.-albumina de fontes diferentes (C5).

Procedência	Kad x 10 ⁷ (M ⁻¹)
HSA(Human serum albumin)	7,0
BSA(Bovine serum albumin)	2,2
RSA(Rabbit serum albumin)	1,2
HA(Horse albumin)	1,7
PA(Porcine albumin)	1,8

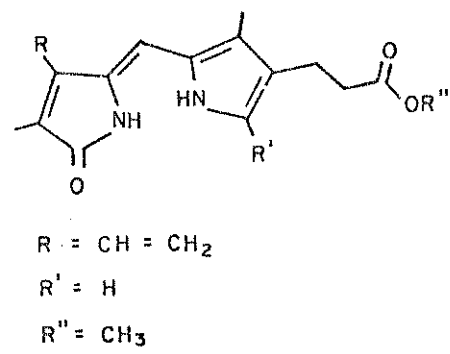


Figura III.4 - Estrutura de 4'-metoxycarboniletill-4,3'-dimethyl-11-3-vinil-2,2'-pirrometenona (MDVP) (C7).

As figuras III.5 a III.7, ilustram os resultados obtidos através do método de Scatchard para as constantes de

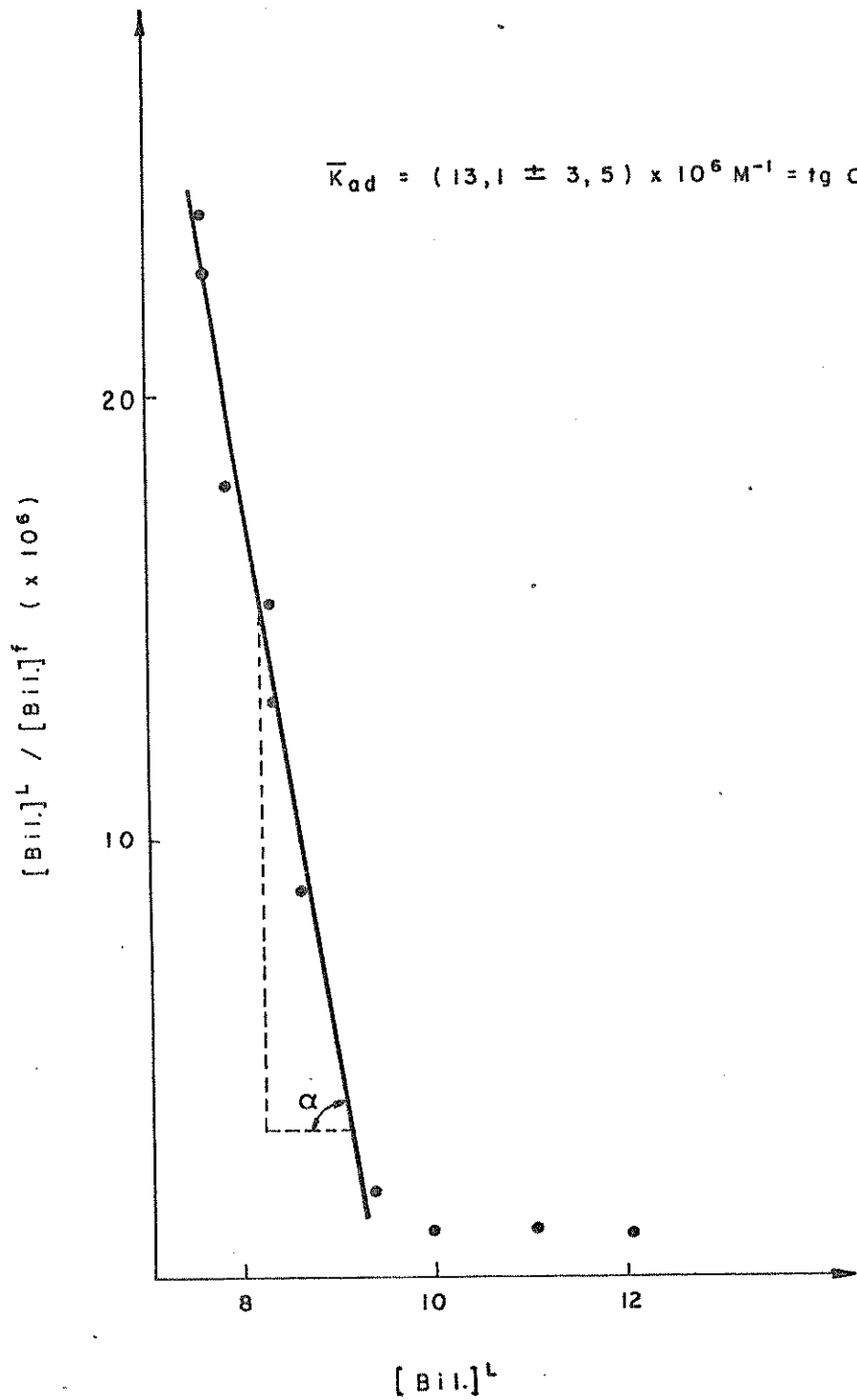


Figura 111.5 - Gráfico de Scatchard para o cálculo da constante de associação-dissociação de Bil.(0-30 μM)-HRP (0-4 μM) em tampão acetato de sódio 50 mM (pH=3,8) e à 25°C.

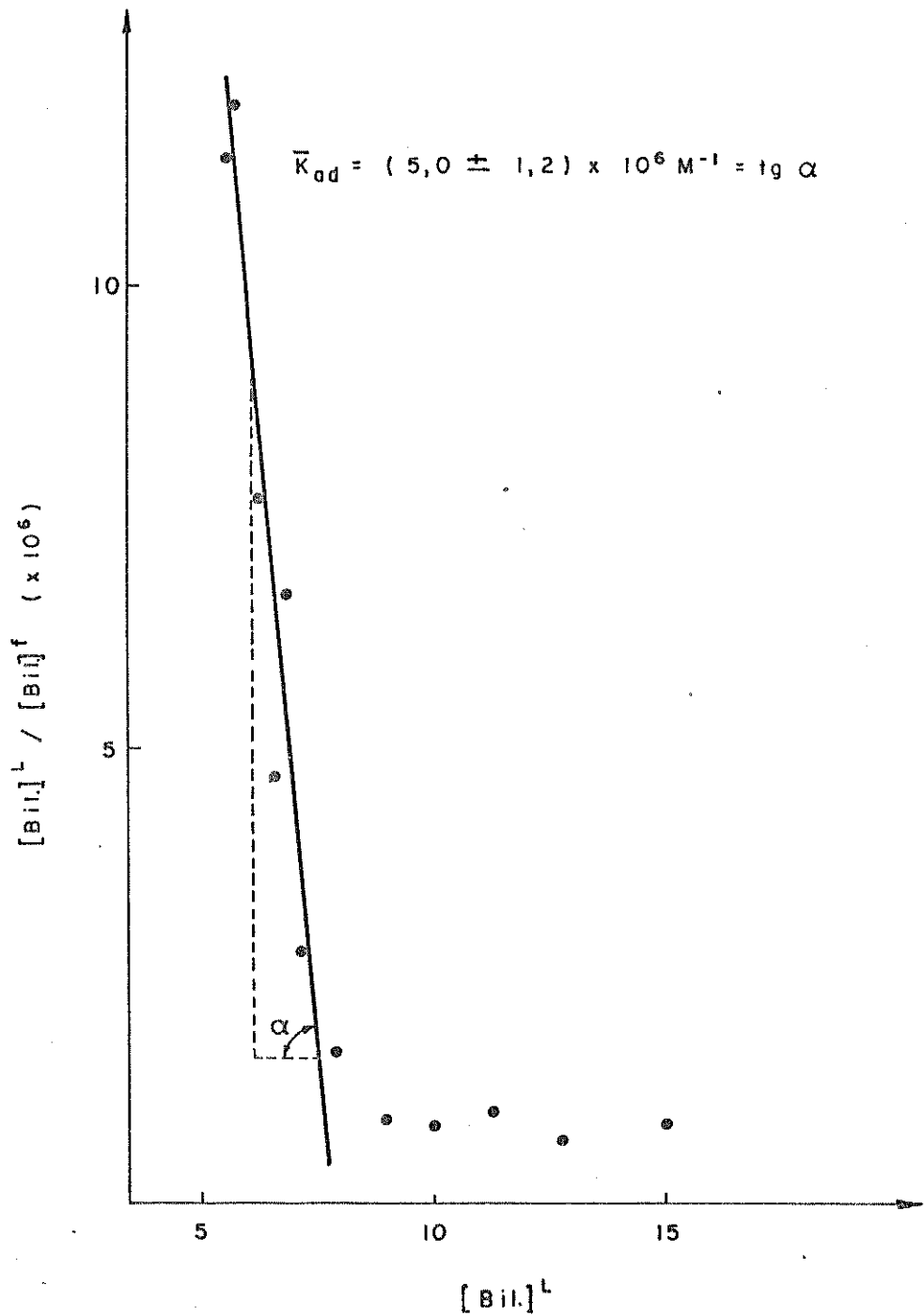


Figura III.6 - Gráfico de Scatchard para o cálculo da constante de associação-dissociação de Bil.(0-30 μM)-HRP (0-4 μM) em tampão acetato de sódio 0,2M (pH=4,8) e à 25 °C.

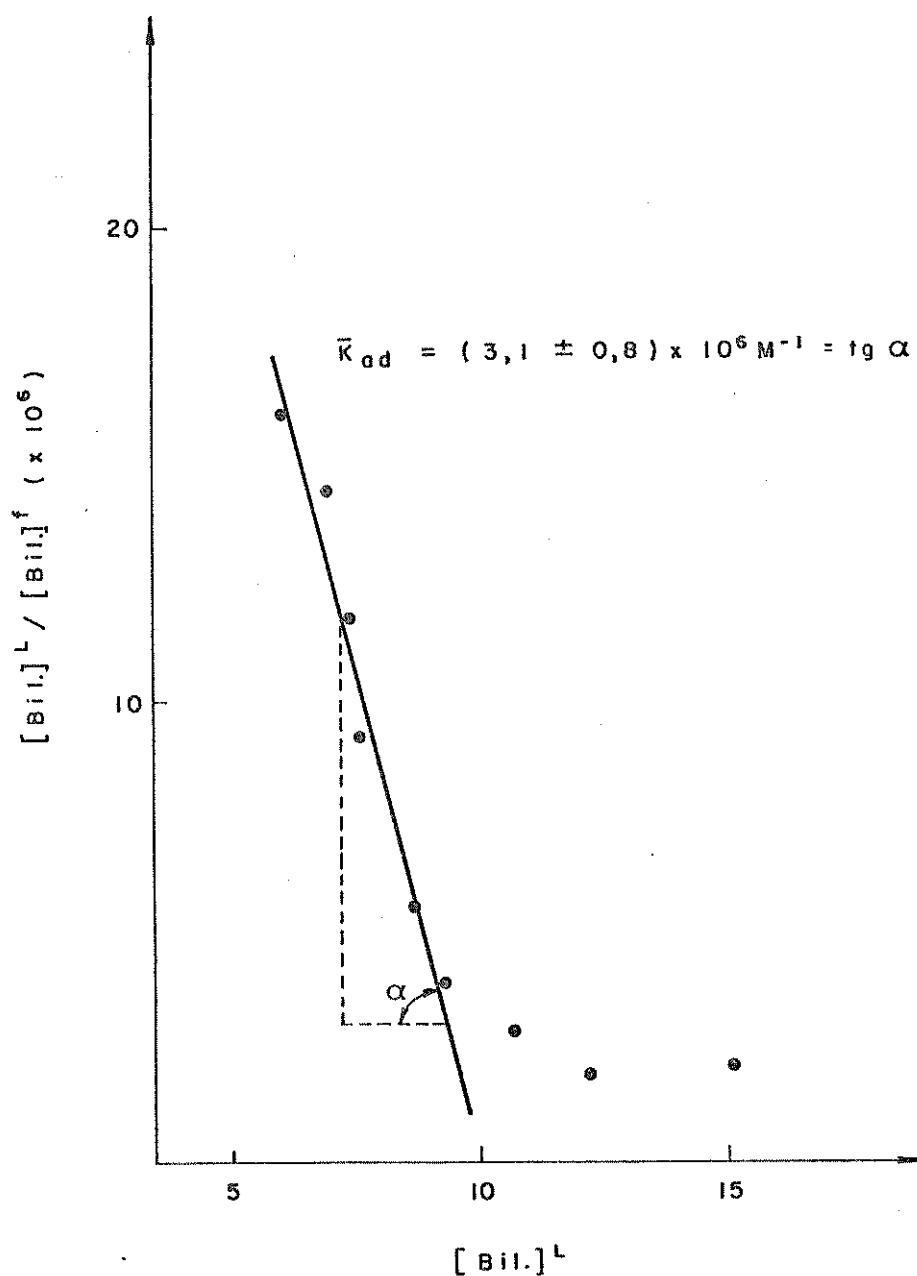


Figura III.7- Gráfico de Scatchard para o cálculo da constante de associação-dissociação de B11(0-30 μM)-HRP (0-4 μM) em tampão fosfato de sódio 0,5 M (pH=5,5), à 25°C.

associação-dissociação de Bil. com HRP (vide apêndice II), à temperatura ambiente, usando-se como solvente os mesmos tampões utilizados nas reações enzimáticas de degradação de IAA, MA e Afo, respectivamente. Isto foi feito para que pudessemos avaliar as constantes no mesmo meio em que ocorre a degradação dos substratos. Para se ter uma idéia da associação de Bil. com HRP em pH fisiológico, o mesmo procedimento foi executado em tampão tris-HCl à pH 7,4, e cujo resultado está ilustrado na figura III.8. De acordo com o mesmo método, calculamos também as constantes de associação-dissociação (K_{ad}) para MDVP-HRP, figuras III.9 a III.11 a fim de compararmos com os resultados obtidos para Bil.-HRP. O valor médio destas constantes, calculados após 3 ensaios para cada pH, estão sumarizados nas tabelas III.2 e III.3. Para efeitos comparativos, foram colocados nestas tabelas os valores de supressão do $^{1}O_2^*$ pela Bil., os quais serão discutidos posteriormente. Analisando-se os dados obtidos, nota-se que as constantes de associação-dissociação para Bil.-HRP diminuem com o aumento do pH, o qual parece desfavorecer uma conformação de Bil. que seria mais adequada à ligação com o esqueleto enzimático. Para se ter uma idéia mais precisa sobre isto, resolvemos registrar o espectro CD de Bil. na presença de HRP, em três diferentes pHs, mantendo a força iônica constante. A figura III.12 mostra que a intensidade das bandas varia de acordo com o pH, sendo mais intensa para valores de pH maiores. Esta variação pode ser explicada, levando-se em conta dois fatores importantes. Um deles considera a mudança estrutural da HRP com o pH. Lembremos aqui que uma variedade de interações não covalentes podem estar envolvidas na associação de Bil. à HRP, tais como ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas através do grupo carboxil da Bil. e os grupos funcionais da enzima. Assim, o grau de associação de Bil.

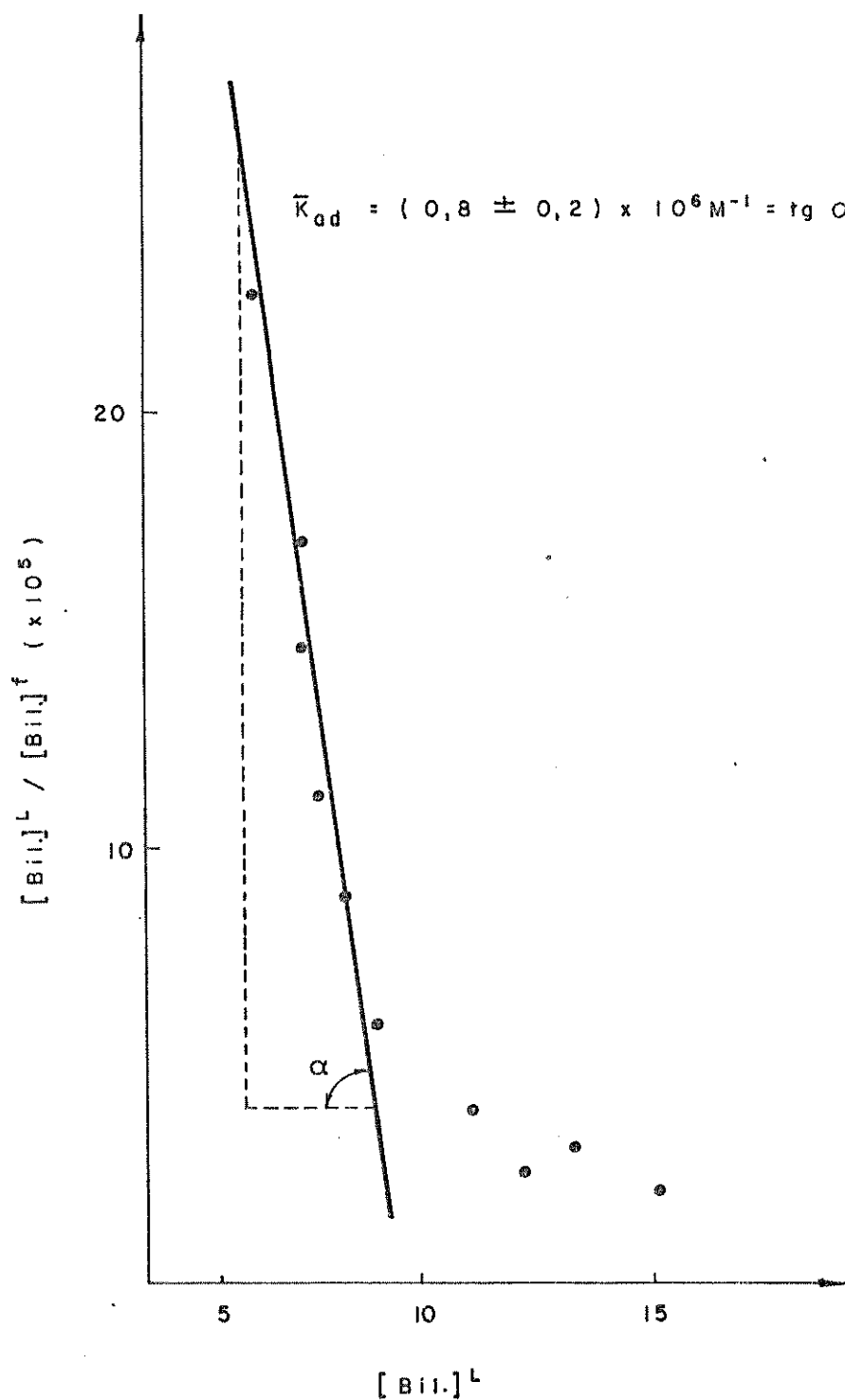


Figura III.8 - Gráfico de Scatchard para o cálculo da constante de associação-dissociação de Bil.(0-30 μM)-HRP (0-4 μM) em tampão Tris-HCl 50 mM (pH=7,4), e à 25°C.

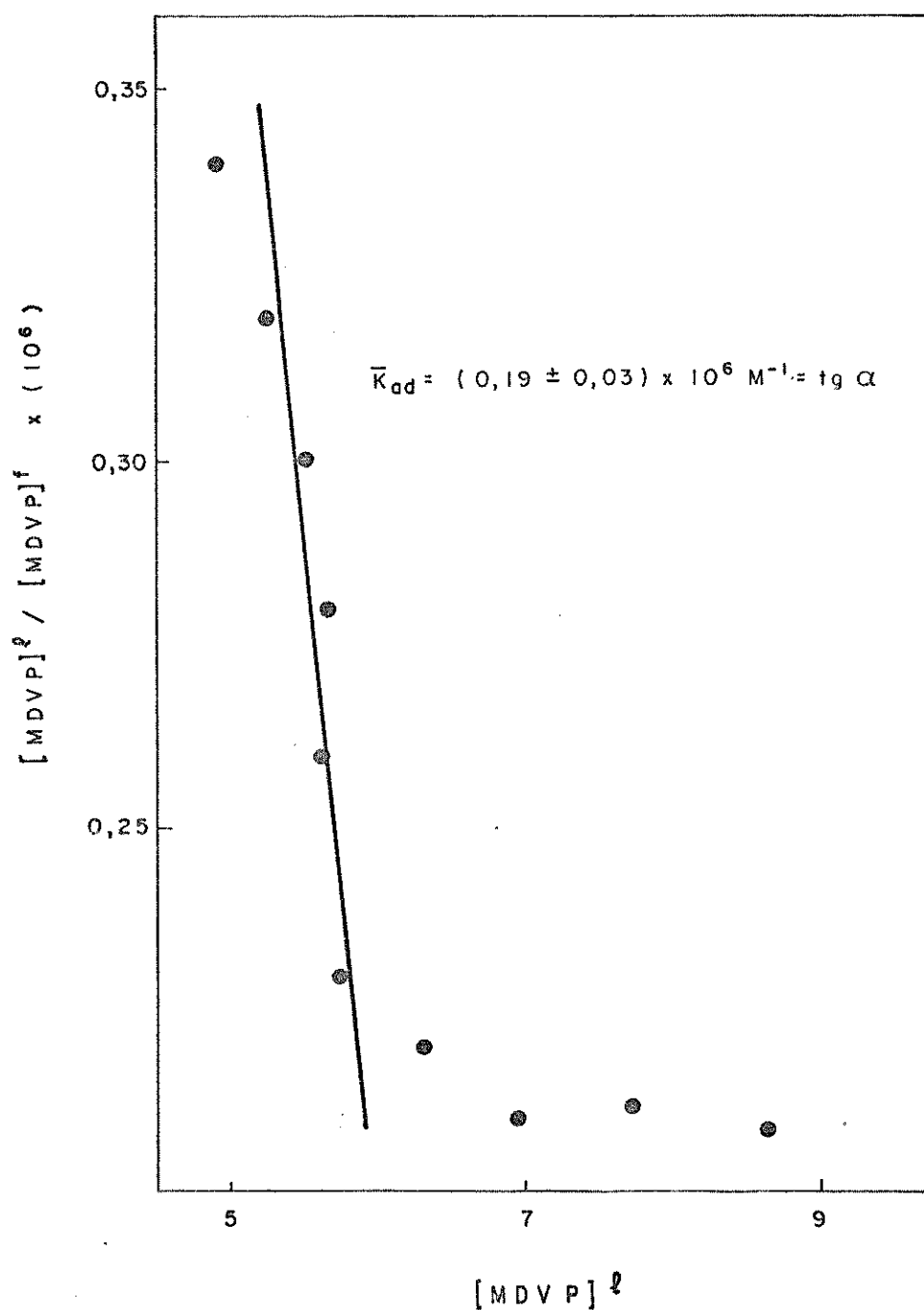


Figura III.9 - Gráfico de Scatchard para o cálculo da constante de associação-dissociação de MDVP (0-30 μM)-HRP (0-4 μM) em tampão acetato de sódio 50 mM (pH=3,8) e à 25°C.

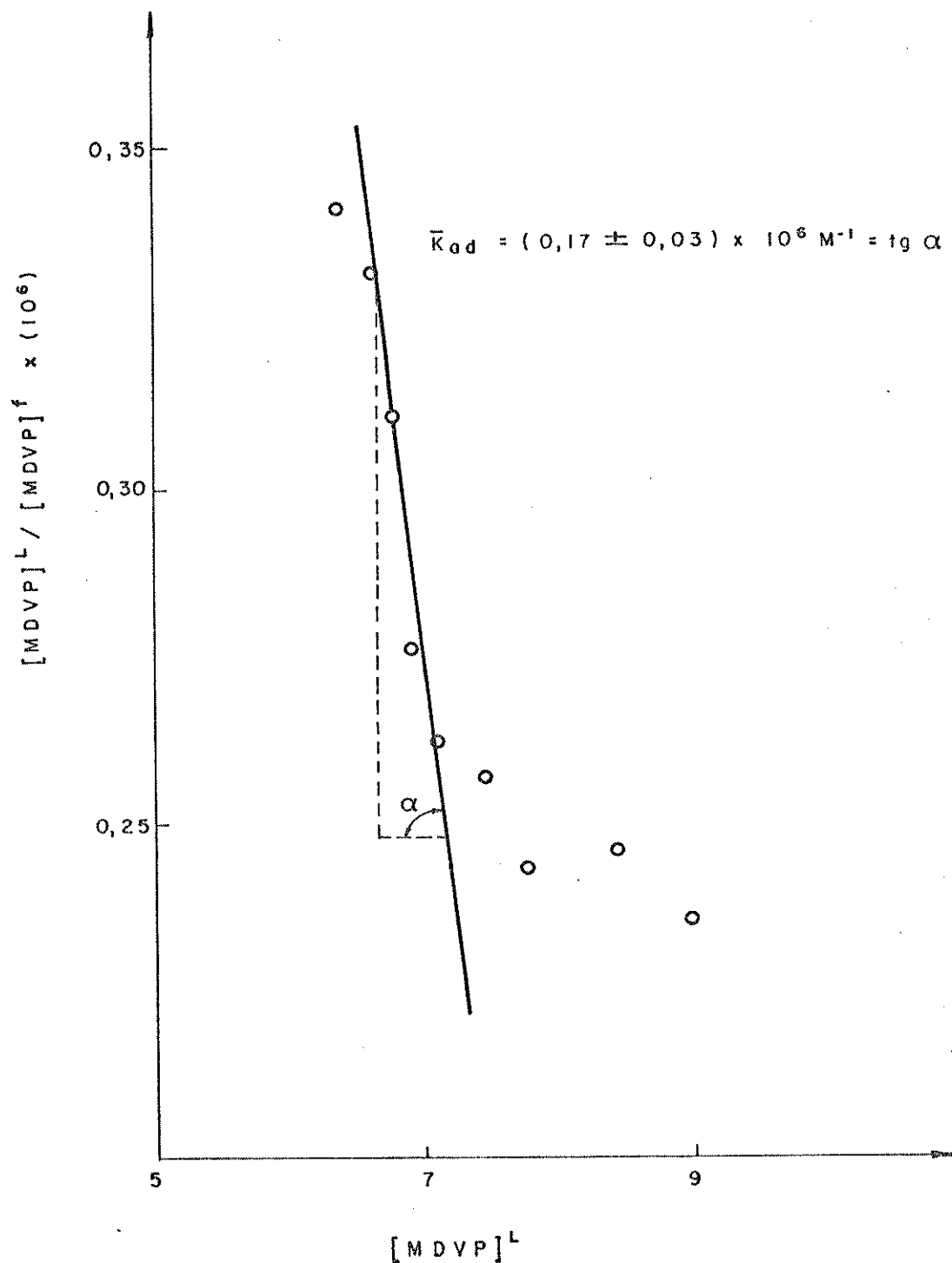


Figura III.10 - Gráfico de Scatchard para o cálculo da constante de associação-dissociação de MDVP(0-30 μM)/HRP (0-4 μM) em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH=4,8) e à 25°C.

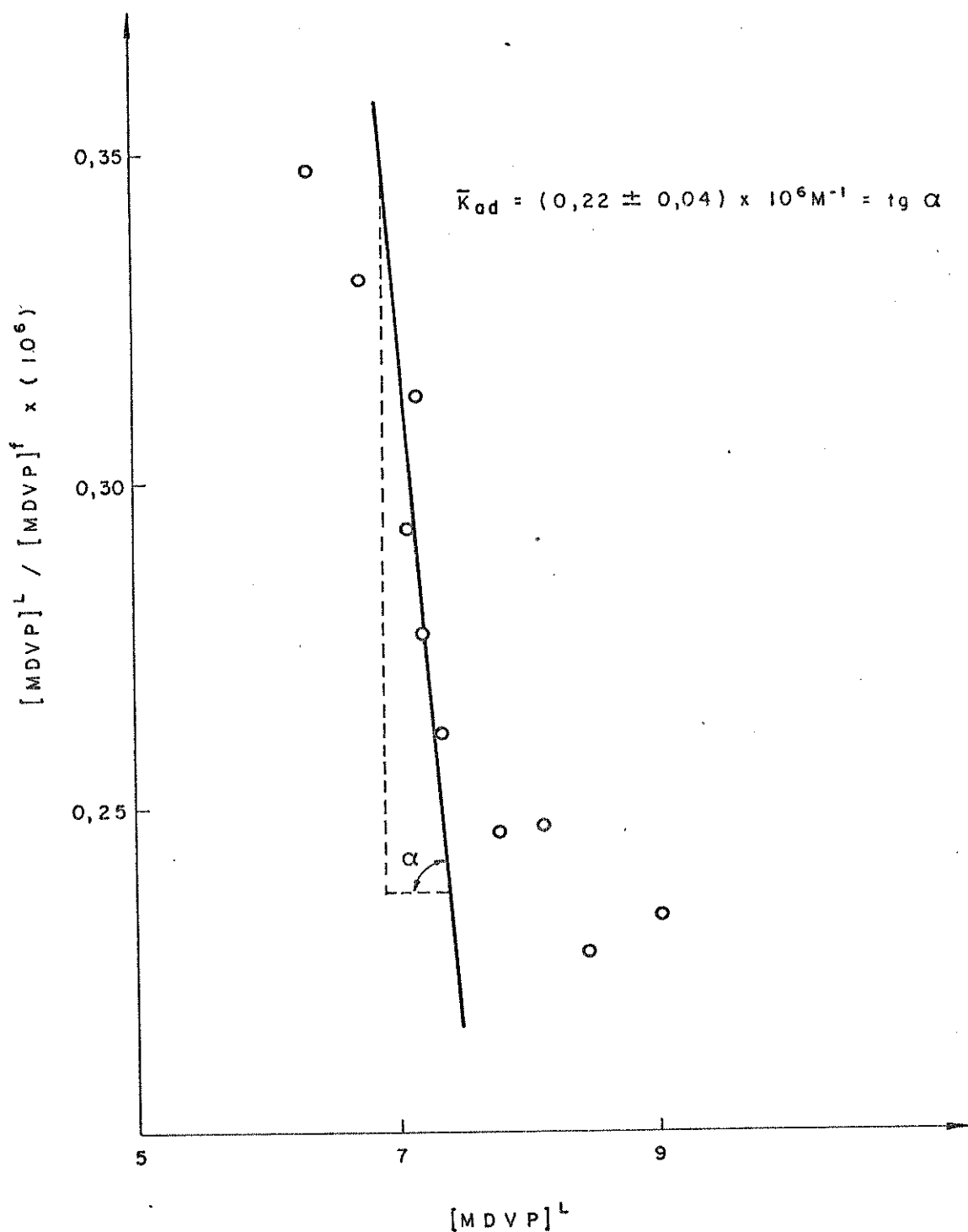


Figura III.11 - Gráfico de Scatchard para o cálculo da constante de associação-dissociação de MDVP(0-30 μM)-HRP (0-4 μM) em tampão fosfato de sódio 0,5 M (pH=5,5) e à 25°C.

Tabela III.2 - Constantes de supressão ($Kq\mathcal{J}$) e de associação-dissociação (Kad) resultantes dos ensaios com Bil e HRP:

pH	$\bar{K}ad \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	$2 \bar{K}q\mathcal{J} \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	$\bar{K}q\mathcal{J} \times 10^4 \text{ M}^{-1}$
3,8	$13,1 \pm 3,5$	$4,3 \pm 0,9$	$2,2 \pm 0,5$
4,8	$5,0 \pm 1,2$	$8,9 \pm 1,2$	$4,5 \pm 0,6$
5,5	$3,1 \pm 0,8$	$22,0 \pm 11,0$	$11,0 \pm 5,5$
7,4	$0,8 \pm 0,2$		

Tabela III.3 - Constantes de supressão ($Kq\mathcal{J}$) e de associação-dissociação (Kad) resultantes dos ensaios com MDVP e HRP

pH	$\bar{K}ad \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	$2 \bar{K}q\mathcal{J} \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	$\bar{K}q\mathcal{J} \times 10^4 \text{ M}^{-1}$
3,8	$0,19 \pm 0,03$	$22,0 \pm 9,0$	$11,0 \pm 4,5$
4,8	$0,17 \pm 0,03$		
5,5	$0,22 \pm 0,04$		

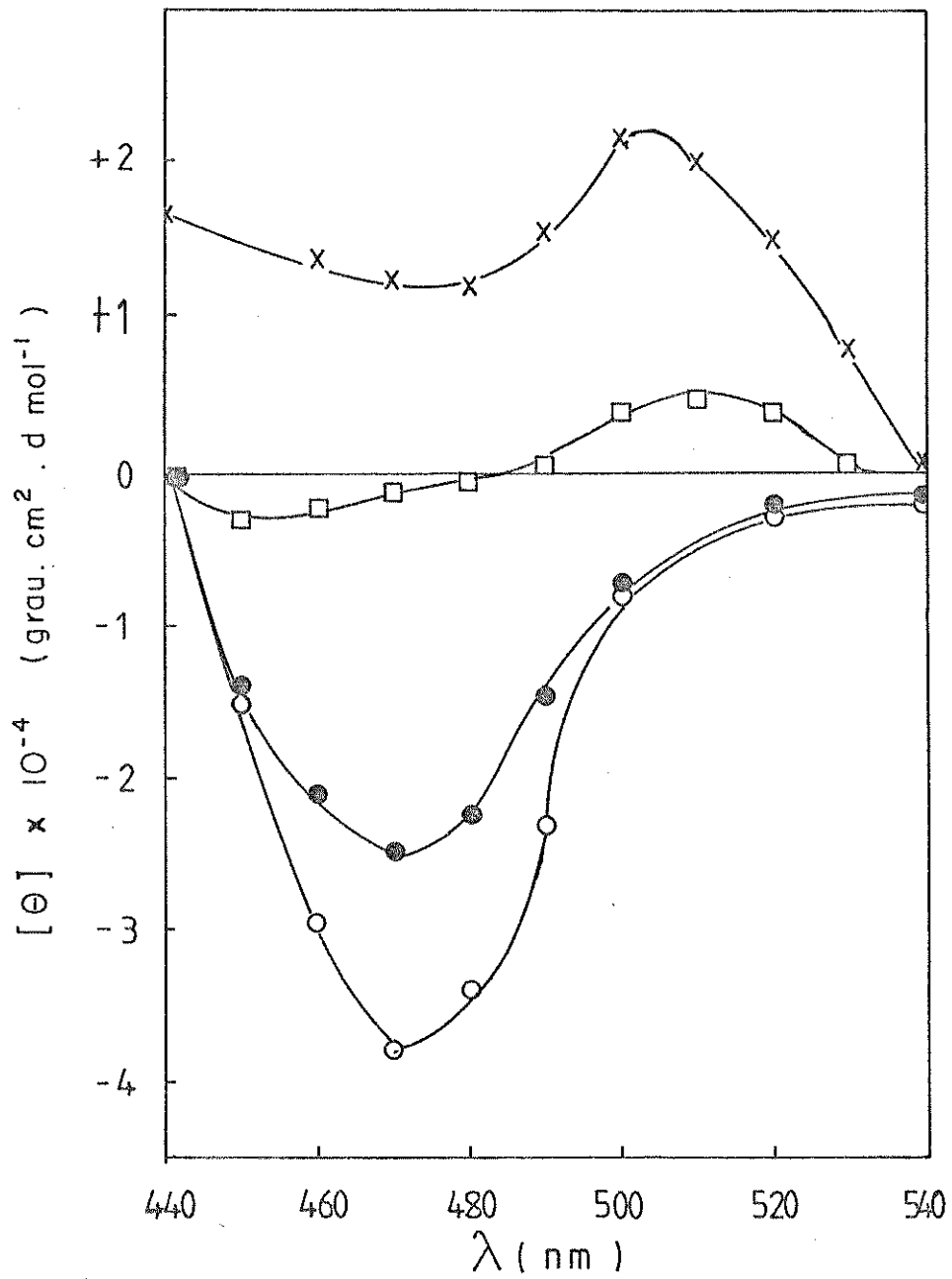


Figura III.12 - Espectro CD da B11. (50 μ M), ligada à HRP (50 μ M) em tampão fosfato de sódio 0,5 M e nos pHs:
a. 5,5 | - □ - □ - | c. 7,4 | - o - o - |
b. 6,6 | - x - x - | d. 7,4 após 3 h | - e - e - |

à HRP vai depender da soma de todos estes fatores, os quais estão intimamente relacionados à estrutura da HRP. Uma mudança de pH implica em uma mudança da estrutura secundária e terciária de uma proteína, alterando o sítio de associação desta à uma molécula qualquer, como Bil., devido ao rearranjo deste sítio, que poderá ou não favorecer a associação através de um aumento ou diminuição das várias interações acima citadas.

Outro fator importante a considerar, é a própria estrutura da Bil. associada, a qual também vai depender do pH. A mudança específica na quiralidade intrínseca da Bil. associada pode ser influenciada pelas mudanças conformacionais da proteína (CB). Pode ser mostrado por modelos, que a rotação em torno da ligação simples do grupo metilideno da Bil. fornece numerosas conformações de vários graus, planar e não distorcidas. Pode-se caracterizar a molécula do pigmento por apenas 2 ângulos diédros, o δ_1 e o δ_2 , como mostrado na figura III.13.

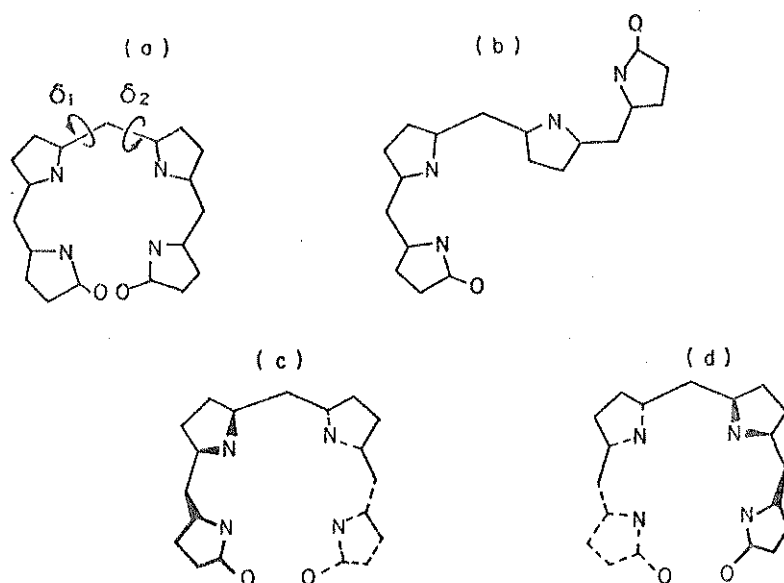


Figura III.13 - Conformações de Bil. caracterizadas por dois ângulos diédros δ_1 e δ_2 (CB):

- | | |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| a. $\delta_1 = \delta_2 = 0$ | c. $0 < \delta_1 = \delta_2 < 90$ |
| b. $\delta_1 = 0$ e $\delta_2 = 180$ | d. $0 < \delta_1 = \delta_2 < -90$ |

Assim, podemos supor que para valores crescentes de pH, a Bil. vai adquirindo uma conformação próxima à de seu análogo MDVP, a qual desfavorece a associação de ambos compostos à enzima. De outro lado, esta conformação pareceu favorável à supressão de $^1O_2^*$, pois com o aumento do pH, o efeito supressor de Bil. também aumenta. Como mostram as figuras III.14, III.16 e III.18, a Bil. suprimiu a emissão dos sistemas enzimáticos de degradação de IAA, MA e AFo, respectivamente. Isto era de se esperar, uma vez que a Bil. é um bom supressor de $^1O_2^*$, como vimos anteriormente, no capítulo I. Portanto, decidimos calcular também as constantes de "Stern-Volmer" (K_{sv} ou $K_q \tau$) de Bil., figuras III.15-III.19, à diferentes concentrações dentro do permitido para não alterar a cinética de degradação do substrato (ver apêndice I, pag.131). Devemos lembrar aqui dos espectros de emissão dos sistemas enzimáticos, (pags 10, 13 e 17 do capítulo I), os quais apresentam um pico de emissão acentuado acima de 600 nm que corresponde à emissão dimol da espécie $^1O_2^*$ ($^1\Delta_g$, $^1\Delta_g$). Nestes casos, os valores obtidos para as constantes de Stern-Volmer são extraídos do gráfico I_0/I_q versus $|B|$ (concentração de supressor), dividindo-se o valor do coeficiente angular por 2, de acordo com o trabalho de Durán e col. (C9).

Devido à escassez de amostra, avaliamos apenas o efeito de MDVP no sistema de degradação de IAA, e o valor de $2K_q \tau$ correspondente, como mostrado nas figuras III.20 e III.21, respectivamente. Pelas tabelas III.2 e III.3, notamos que o valor obtido para Bil., em pH 5,5; é semelhante ao obtido para MDVP em pH 3,8. Teoricamente, o valor de K_q para Bil. é de $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ (C10). Assumindo que a espécie excitada seja o $^1O_2^*$, cuja vida média em solução aquosa é de $2 \times 10^{-6} \text{ s}$ (C11), teremos os valores de K_q para Bil. nos sistemas enzimáticos estudados, como mostra a tabela

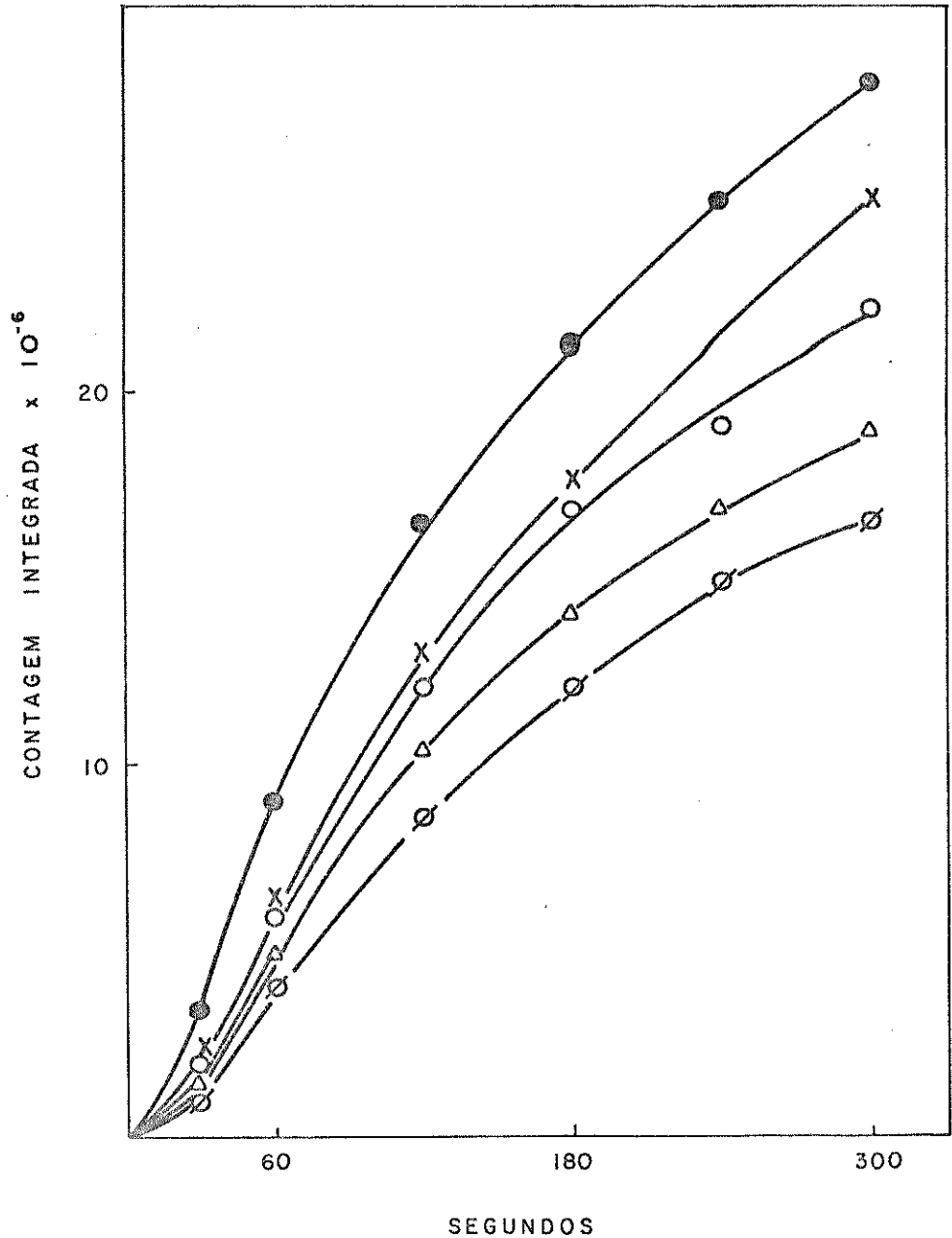


Figura III.14 - Fotoemissão da reação IAA(0,1mM)/EDTA(30 μM)/HRP (0,8 μM)/O₂ em tampão acetato de sódio 50 mM (pH=3,8), à 37-38 °C |—●—●—|; na presença de B11. 6,7 μM |—x—x—|, 10 μM |—○—○—|, 13,5 μM |—△—△—| e 20 μM |—◐—◐—|.

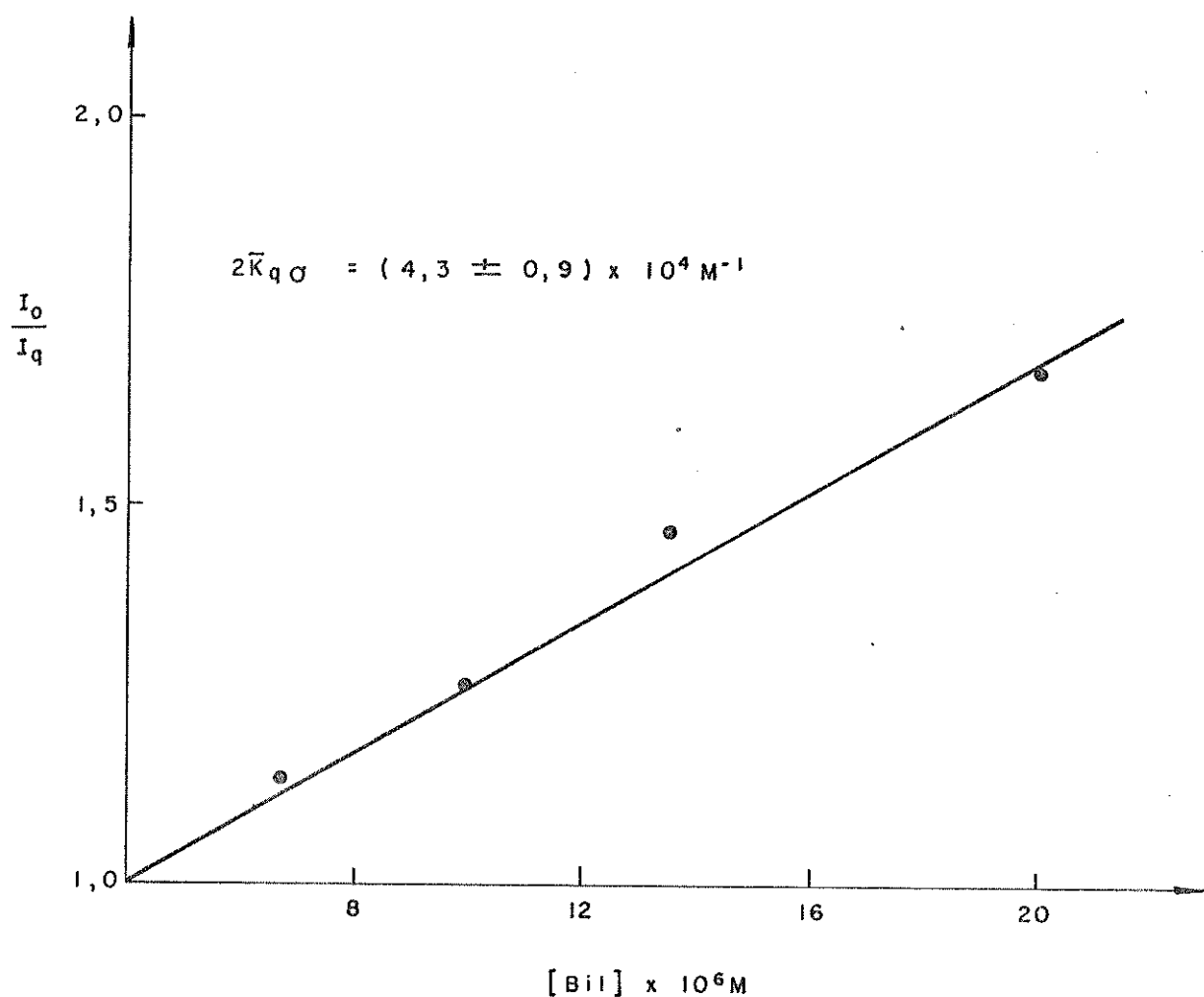


Figura 111.15 - Gráfico Stern-Volmer para a supressão da emissão do sistema enzimático IAA/EDTA/HRP/O₂ pela BiI.

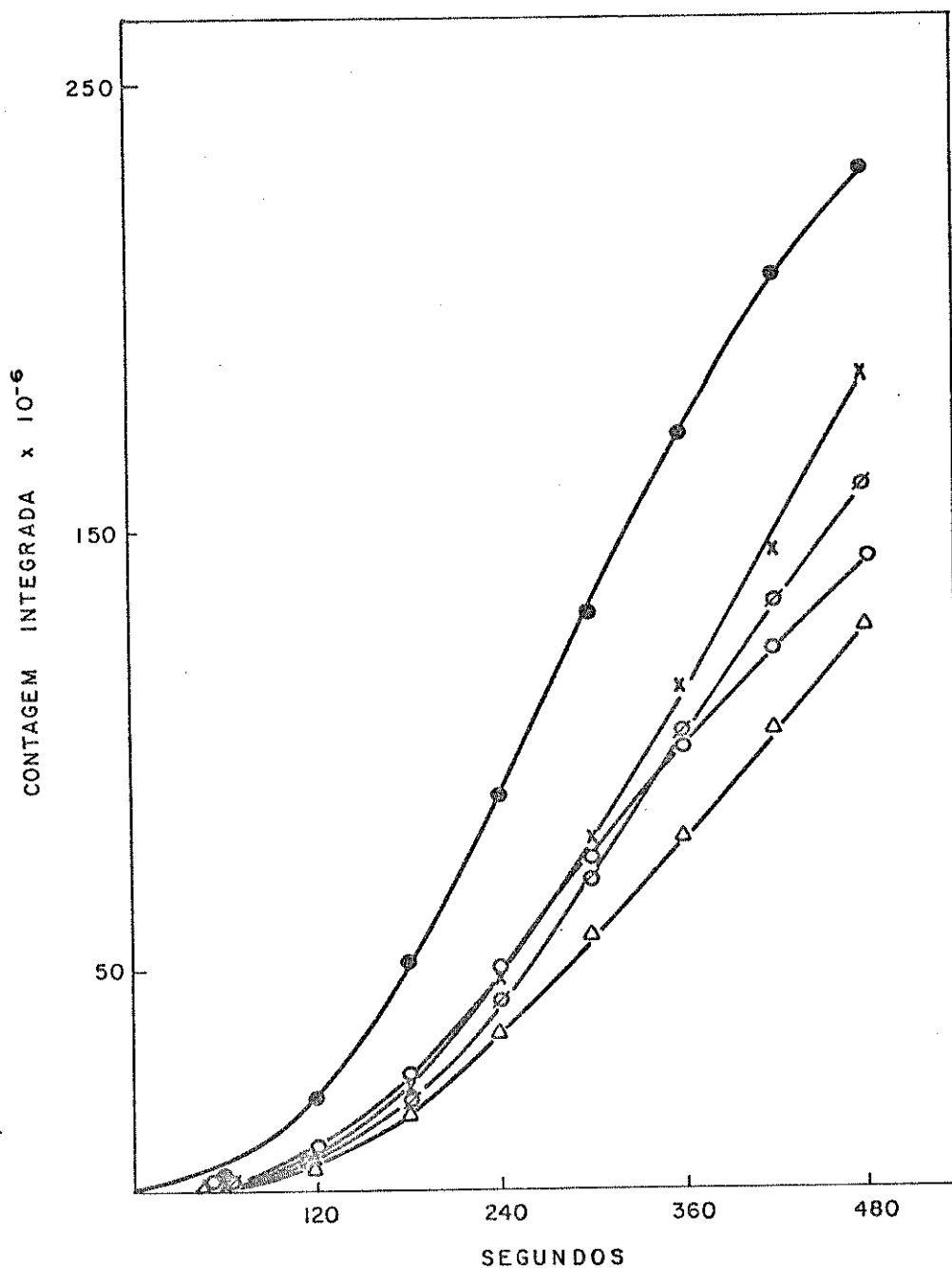


Figura III.16 - Fotoemissão da reação NA(10 mM)/Mn²⁺(3 mM)/HRP (0,8 μM)/O₂ em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH=4,8), à 37-38 °C |—●—●—|; na presença de B11. 3,3 μM |—x—x—|, 5,0 μM |—ø—ø—|, 6,5 μM |—o—o—| e 8,0 μM |—Δ—Δ—|.

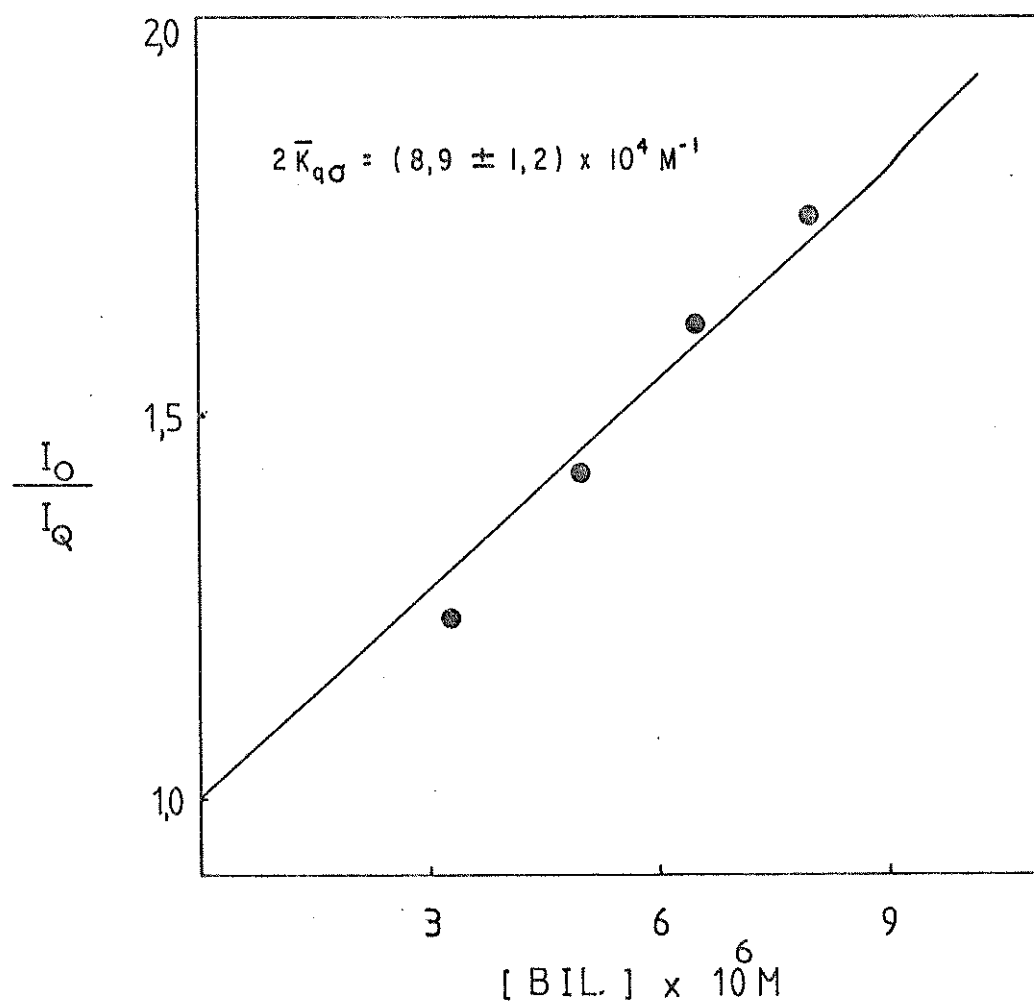


Figura III.17 - Gráfico Stern-Volmer para a supressão da emissão do sistema enzimático HA/Mn²⁺/HRP/O₂ pela BIl.

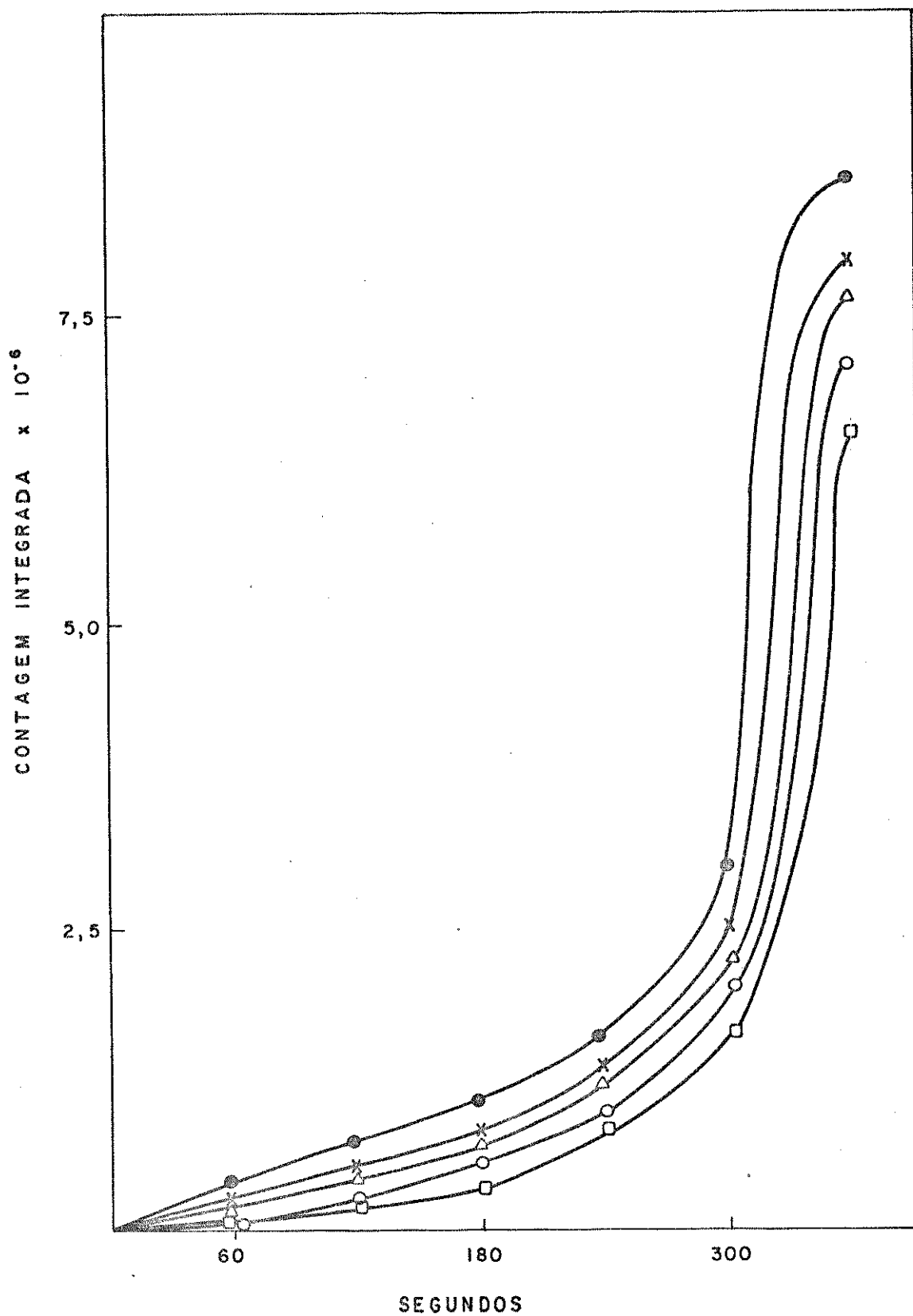


Figura III.18 - Fotoemissão da reação Afo(1,2 mM)/GSH(0,3 mM)/Catalase (164 unidades/ml)/HRP(4,0 μ M)/Mn²⁺(80 μ M)/O₂ em tampão fosfato de sódio 0,5 M (pH=5,5), à 37-38 °C |—●—●—|, na presença de B11: 0,7 μ M |—x—x—|, 1,0 μ M |—△—△—|, 1,3 μ M |—○—○—| e 1,7 μ M |—□—□—|.

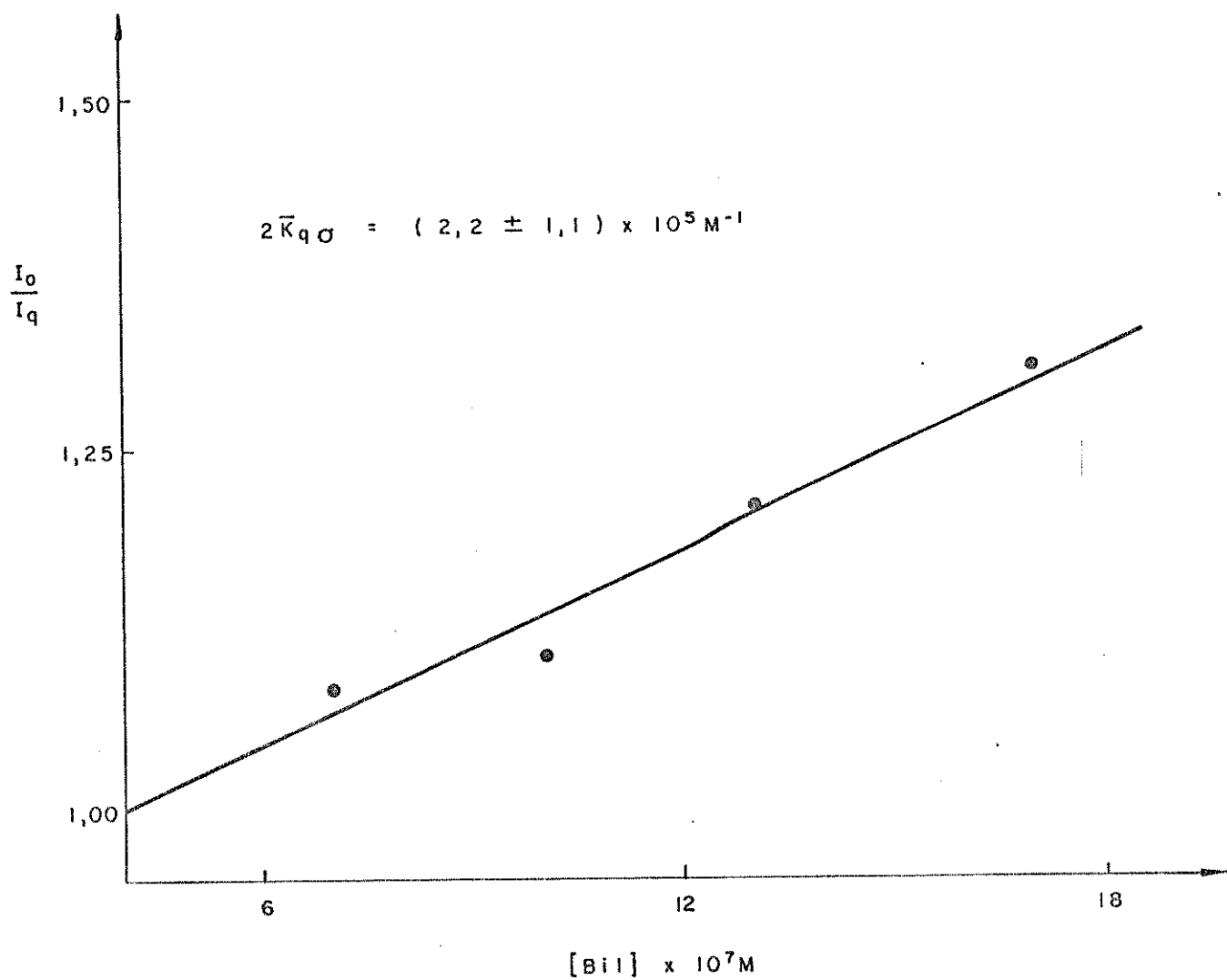


Figura III.19 - Gráfico Stern-Volmer para a supressão da emissão do sistema enzimático Afo/GSH/Catalase/HRP/Mn⁺²/O₂ pela BII.

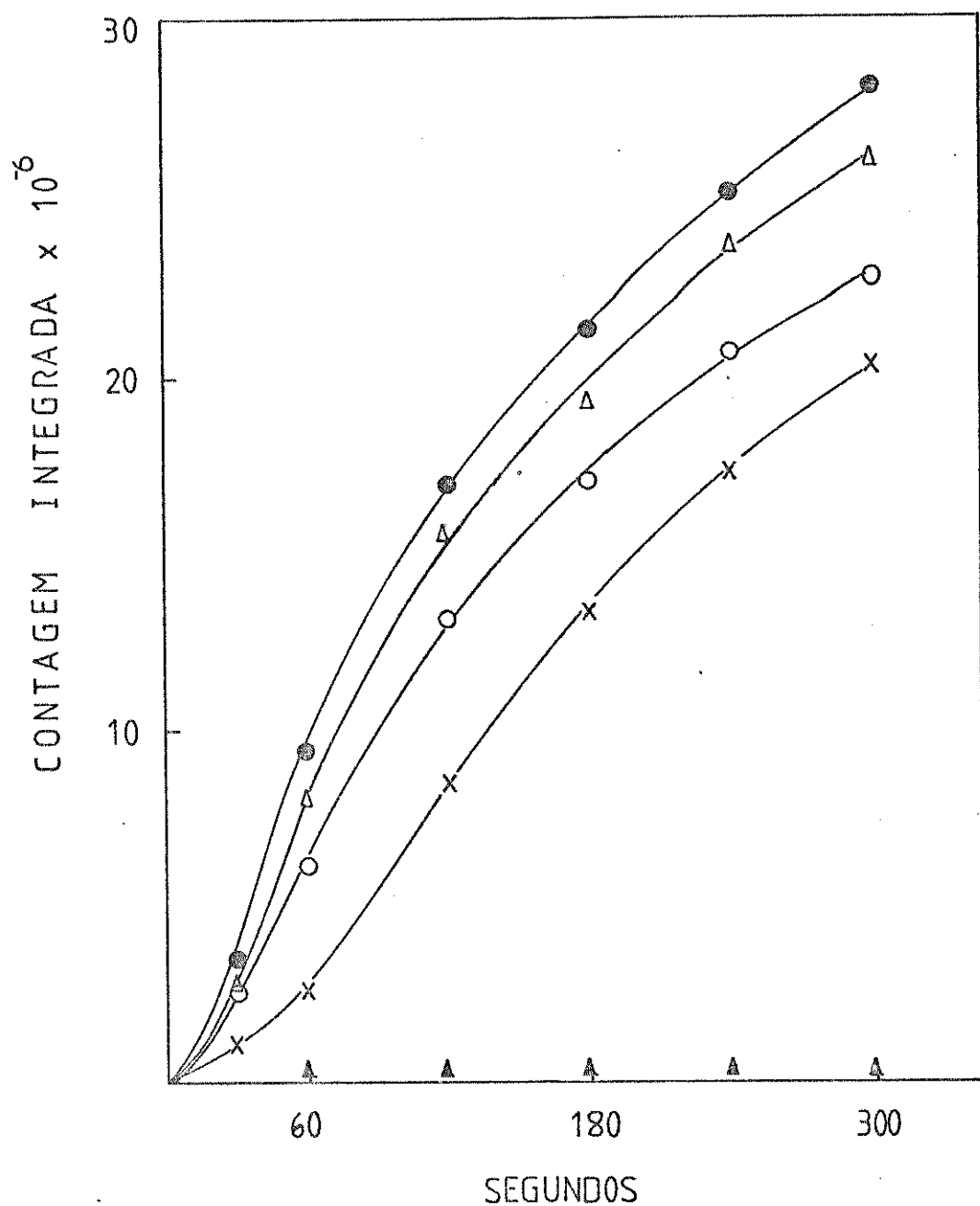


Figura III.20 - Fotoemissão da reação IAA(0,1mM)/EDTA(30 μ M)/HRP(0,8 μ M)/O₂ em tampão acetato de sódio 50 mM (pH=3,8), à 37-38 °C |—●—●—|:
 a. na presença de NDVP 0,67 μ M |—Δ—Δ—|, 1,0 μ M |—○—○—| e 1,35 μ M |—x—x—|.
 b. fotoemissão da reação NDVP(1,35 μ M)/EDTA(30 μ M)/HRP(0,8 μ M)/O₂ |—▲—▲—|

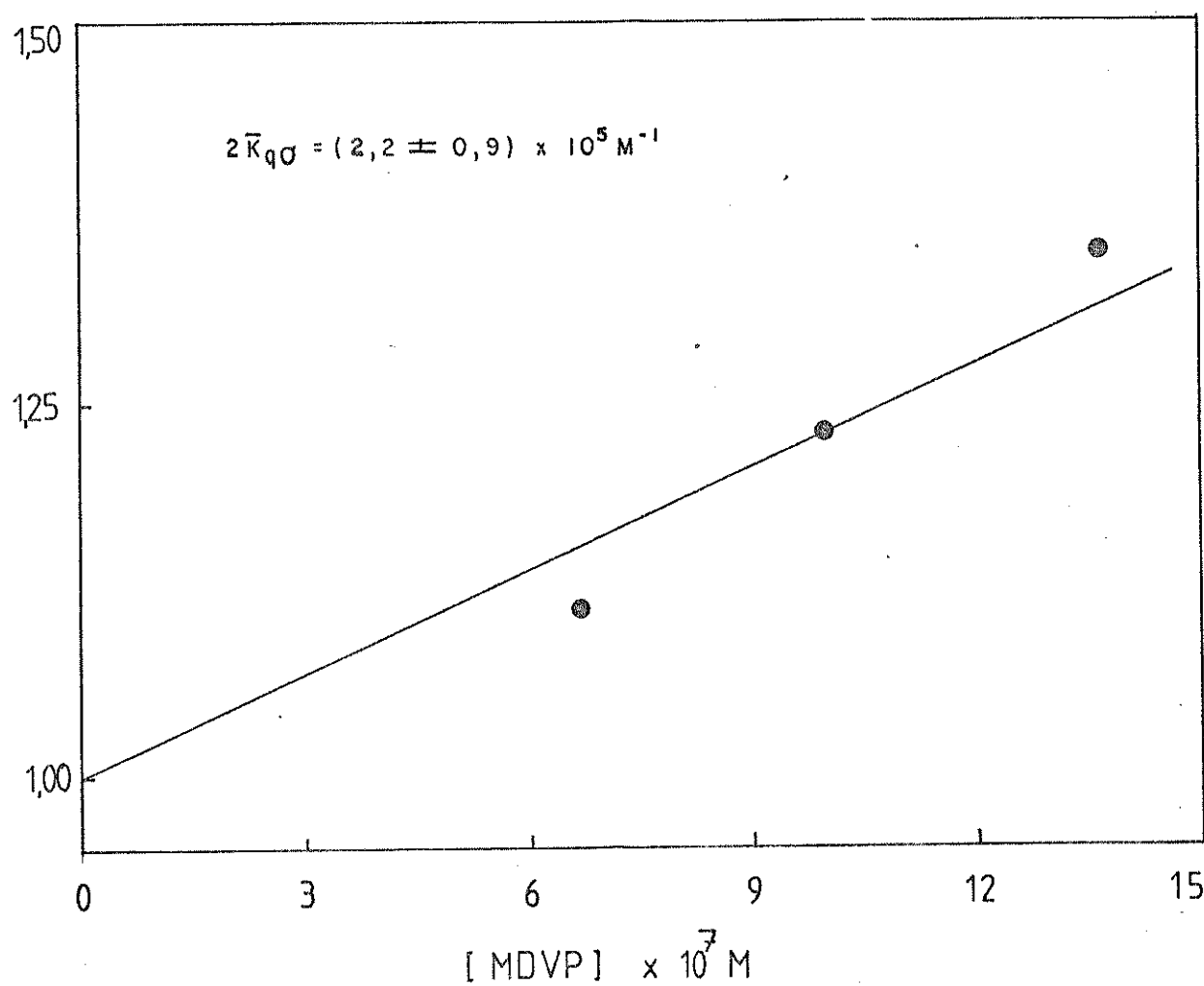


Figura III.21 - Gráfico Stern-Volmer para a supressão da emissão do sistema enzimático IAA/EDTA/HRP/O₂ pelo MDVP.

III.4. Assim, notamos que com o aumento do pH, e portanto da Bil. livre em solução, a constante de velocidade para a reação de supressão de $^1\text{O}_2^*$ aumenta, sendo semelhante ao valor de K_q para MDVP à pH 3,8. Em outras palavras, quando a concentração de Bil. livre aumenta com o pH, sua eficiência para suprimir $^1\text{O}_2^*$ também aumenta. A semelhança nos valores de K_{ad} da Bil. à pH 7,4 e do MDVP à pH 3,8-5,5 sugere que de fato a Bil. estando livre em solução, poderá se arranjar mais favoravelmente, de maneira a suprimir o $^1\text{O}_2^*$ gerado, tal como o MDVP.

Tabela III.4 - Valores de K_q obtidos da tabela III.2 e III.3, considerando o valor de $\tau = 2 \times 10^{-6}$ s .

Sistemas	pH	$\bar{K}_q \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$
IAA/EDTA/Bil./HRP/ O_2	3,8	1,1
MA/ Mn^{+2} /Bil./HRP/ O_2	4,8	2,3
AFo/HRP/GSH/Catalase/Bil./ Mn^{+2} / O_2	5,5	5,5
IAA/EDTA/MDVP/HRP/ O_2	3,8	5,5

Resumindo, podemos dizer que a associação de Bil. à HRP, diminui com o aumento do pH, devido, provavelmente, à mudanças estruturais da molécula, as quais estariam desfavorecendo as interações tipo van der Waals entre os grupos hidrofóbicos da HRP e os grupos hidrofóbicos da Bil. Como consequência disto, a Bil. dissociada atua melhor como supressor de $^1\text{O}_2^*$ gerado nos sistemas enzimáticos, em função do aumento produzido no K_q com o aumento do pH.

III.3 - Estudos com o Ácido Desoxirribonucleico (DNA).

Nossas pesquisas sobre o comportamento do DNA nos sistemas enzimáticos, foram iniciadas com o estudo da emissão destes sistemas na presença de concentrações da macromolécula que não afetavam a degradação dos substratos.

Como mostram as figuras III.22, III.24 e III.26, o DNA suprimiu a emissão dos sistemas de degradação de IAA, MA e AFO, respectivamente. Estes resultados (vide tabela III.6) estão dentro do esperado, se lembrarmos de dois fatores importantes. Primeiro, tais sistemas geram $^1O_2^*$, como já visto anteriormente no capítulo I, pag. 3. Segundo, uma das bases que compõem o DNA é a guanina, cuja interação com o oxigênio singlete é bem conhecida (C12,13). De acordo com Cadet e Teoule (C14), a habilidade dos quatro desoxirribonucleosídeos, que formam o DNA, em serem oxidados por $^1O_2^*$ gerado quimicamente ou por descarga de microondas, diminui na ordem $dG \gg dT \gg dC \sim dA$. A tabela III.5 mostra os resultados obtidos por estes pesquisadores, incluindo também o efeito fotodinâmico para 2-desoxiguanosina e timidina.

A análise dos produtos de degradação de desoxiguanosina foi também feita e os resultados obtidos concordam com o esperado para um mecanismo onde o $^1O_2^*$ participa. Os principais produtos caracterizados por IV, TLC e MS estão ilustrados na figura III.28.

A propriedade supressora de guanosina, em reações onde o $^1O_2^*$ é gerado, já havia sido testada nos sistemas enzimáticos com os quais trabalhamos (C15,C16). Em um trabalho recente de Durán e col.(C9), foi calculado o valor de Ksv para a reação de degradação de malonaldeído, utilizando a guanosina como um dos supressores do $^1O_2^*$. O valor obtido de Ksv foi de 10 M^{-1} , o qual está mu-

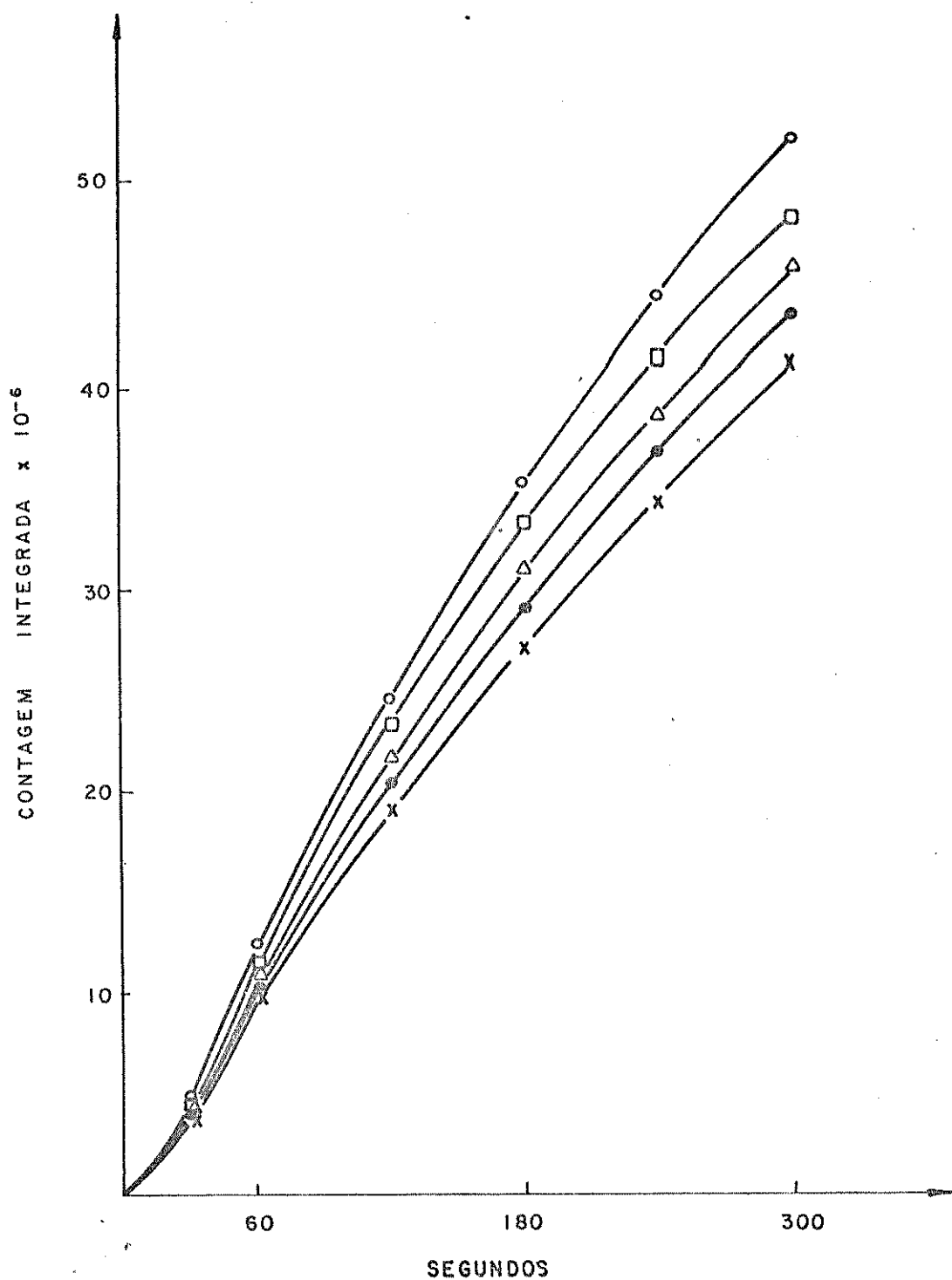


Figura III.22 - Fotoemissão da reação IAA(0,1mM)/EDTA(30 μ M)/HRP(0,8 μ M)/O₂ em tampão acetato de sódio 50 mM (pH=3,8), à 37-38 °C 1-○-○-1; na presença de DNA 5,5 μ M 1-□-□-1, 18,7 μ M 1-△-△-1, 28,0 μ M 1-●-●-1 e 37,3 μ M 1-x-x-1.

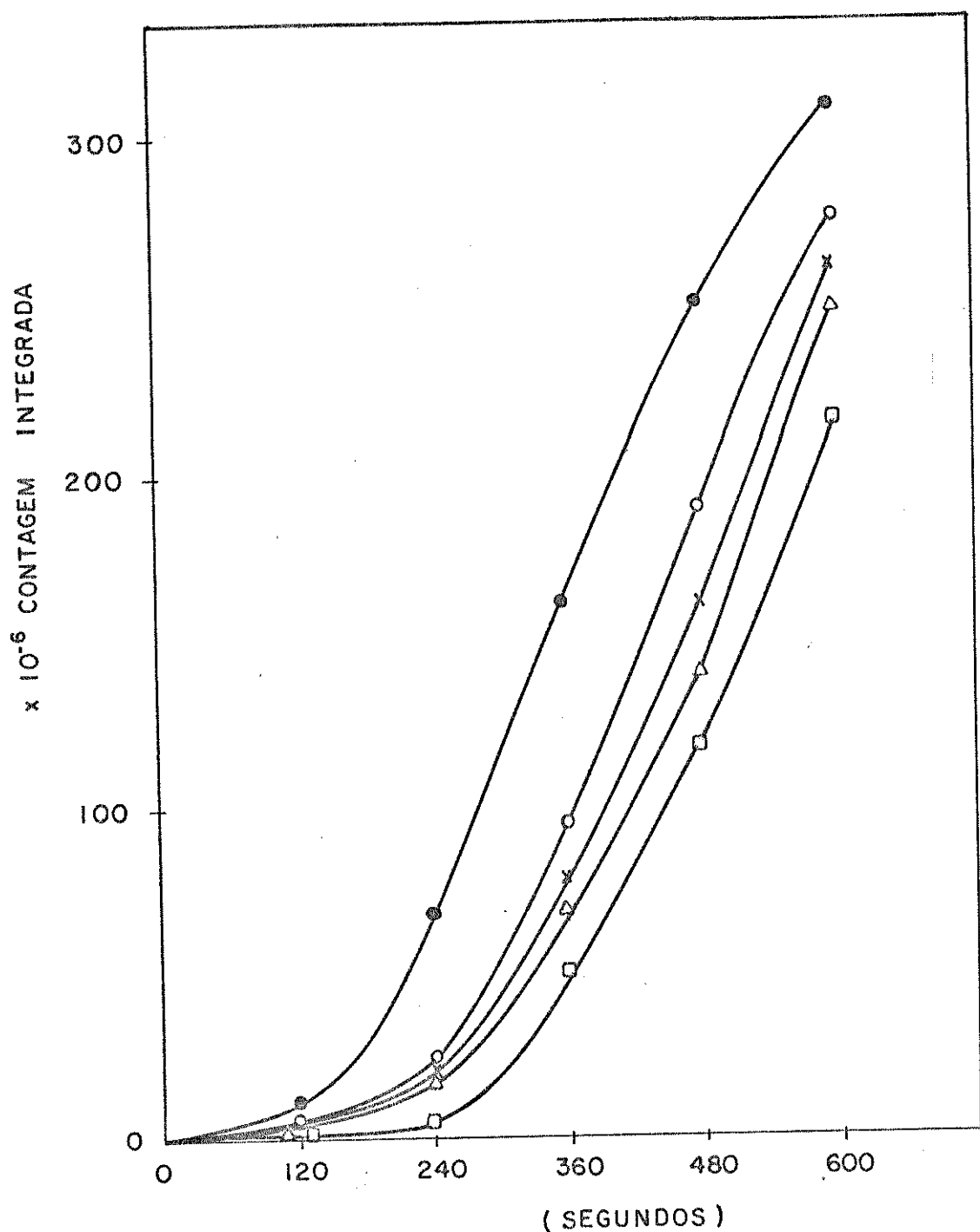


Figura III.24 - Fotoemissão da reação MA(10 mM)/Mn²⁺ (3 mM)/HRP (0,8 μM)/O₂ em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH=4,8), à 37-38°C $\text{---}\bullet\text{---}$; na presença de DNA 37 μM $\text{---}\circ\text{---}$, 74 μM $\text{---}x\text{---}$, 112 μM $\text{---}\Delta\text{---}$ e 149 μM $\text{---}\square\text{---}$.

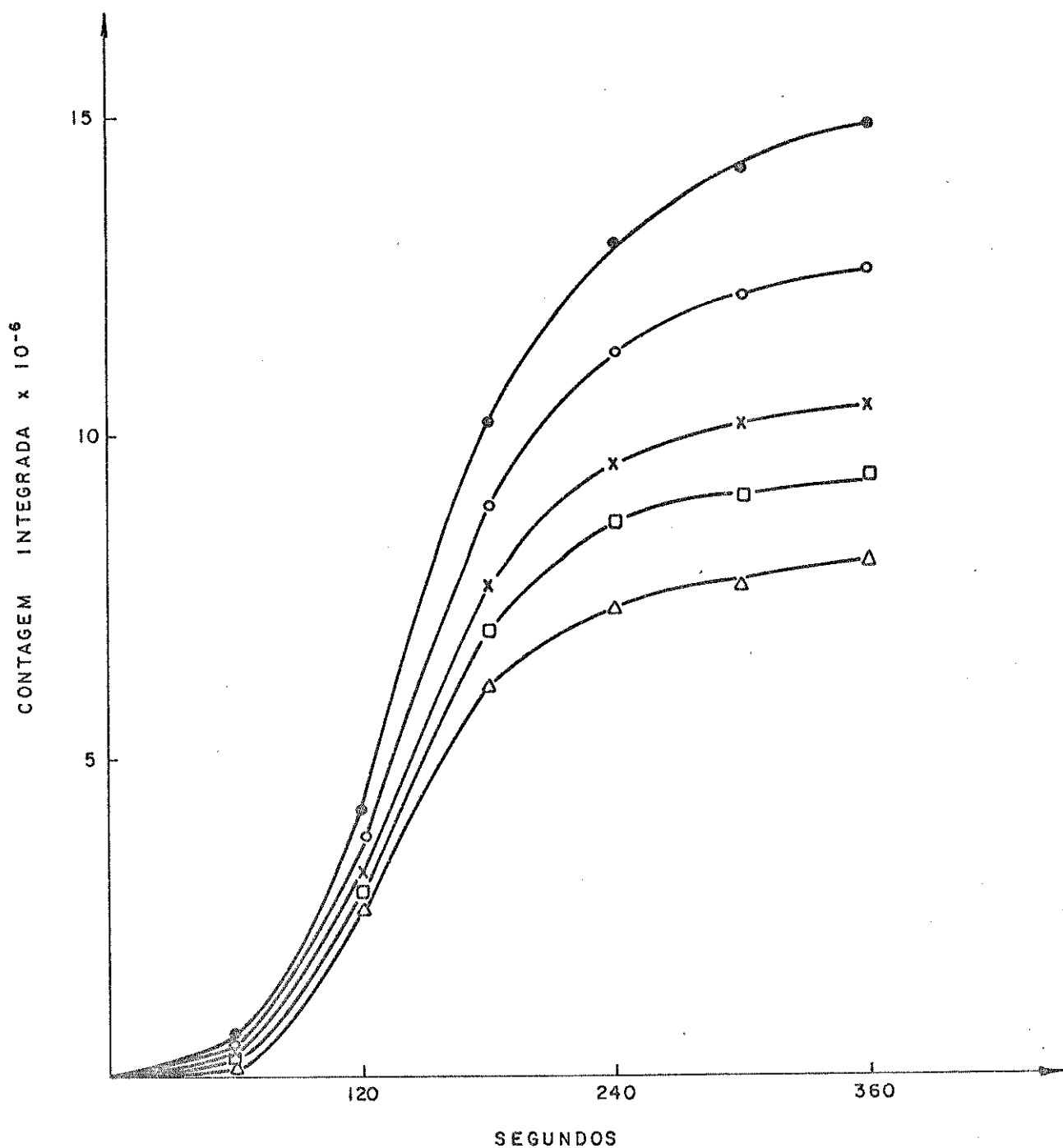


Figura III.26 - Fotoemissão da reação Afo(1,2 mM)/GSH(0,3 mM)/Catalase (164 unidades/ml)/HRP(4,0 μM)/Mn²⁺(80 μM) O₂ em tampão fosfato de sódio 0,5 M (pH=5,5), à 37 - 38°C |—●—●—|, na presença de DNA 16 μM |—○—○—|, 32 μM |—x—x—|, 48 μM |—□—□—| e 80 μM |—Δ—Δ—|.

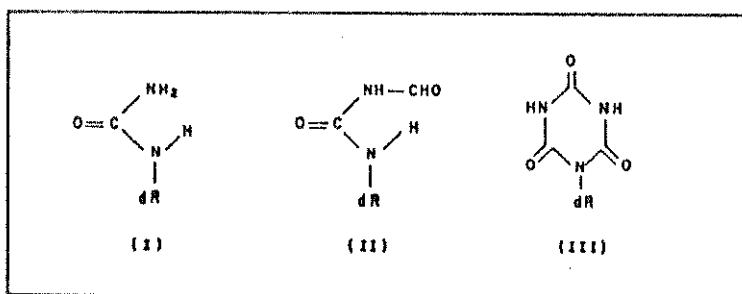
TABELA III.5 - Efeito de Oxigênio Singlete e de Fotossensibilização com Azul de Metileno (AM) em purinas - e pirimidinas - 2' - desoxirribonucleosídeos^a:

Nucleosídeos	% de Destruição ^b					
	H ₂ O ₂ - NaOCl (H ₂ O - CH ₃ OH)	Descarga de Microondas ^c (H ₂ O ; pH 10)	Fotocxigenação com AM ^c (H ₂ O ; pH 7,6)	AM (H ₂ O ; pH 7,6) 0,5 mM Na N ₃	AM (D ₂ O ; pH 7,3)	AM (H ₂ O ; pH 10)
2 - Desoxiguanosina	54	31	65	53	72	95
Timidina	2	1,5	< 0,1	< 0,1	< 0,1	3

a. A concentração em nucleosídeos nas experiências foi de 5 mM para oxidação química; 0,1 mM para descarga de microondas e 0,5 mM para a fotossensibilização.

b. As porcentagens foram baseadas na contagem de cintilação líquida de [¹⁴C], levando em conta a perda de radioatividade devido aos compostos voláteis. Nenhuma degradação foi observada para dA e dC nos vários sistemas.

c. O tempo de exposição foi de 30 min. para a reação de H₂O₂ - NaOCl ; de 1 h para descarga de microondas e de 20 min. para fotossensibilização com AM, exceto a experiência com D₂O (5 min.).



onde (I) = N(2-desoxi-D-eritro-pentosil) uréia

(II) = N (2-desoxi- β -D-eritro-pentofuranosil)-N² -formil
uréia

(III) = ácido (2-desoxi- β -D-eritro-pentofuranosil) cianúri
co

Figura III.28 - Produtos de degradação de desoxiguanosina, depois de sua reação com $^1\text{O}_2^*$.

to próximo do valor do Ksv para as bases individuais, ou seja, de 4 a 7 M⁻¹.

Nossa próxima etapa foi então calcular os valores de Ksv para os sistemas enzimáticos em estudo, a partir dos dados obtidos nas figuras III.22, III.24 e III.26. Construímos assim os gráficos I_0/I_t versus Tempo como mostram as figuras III.23, III.25 e III.27, considerando os pontos de máxima contagem integrada, os quais são mostrados nas figuras acima citadas (ver apêndice I). Através do coeficiente angular de cada gráfico, obtivemos os valores de Ksv, os quais estão reunidos na tabela III.6. Como verificamos, os valores foram da ordem de 10^3 M^{-1} , portanto muito maiores que o valor correspondente para as bases livres. Resultado similar foi também obtido para a supressão do sistema enzimático IAA/EDTA/HRP/O₂ por tRNA, cujo Ksv foi também da ordem de 10^3 M^{-1} . Acreditamos que a maior eficiência de supressão dos ácidos nucleicos em relação às bases livres, seja devido à organi-

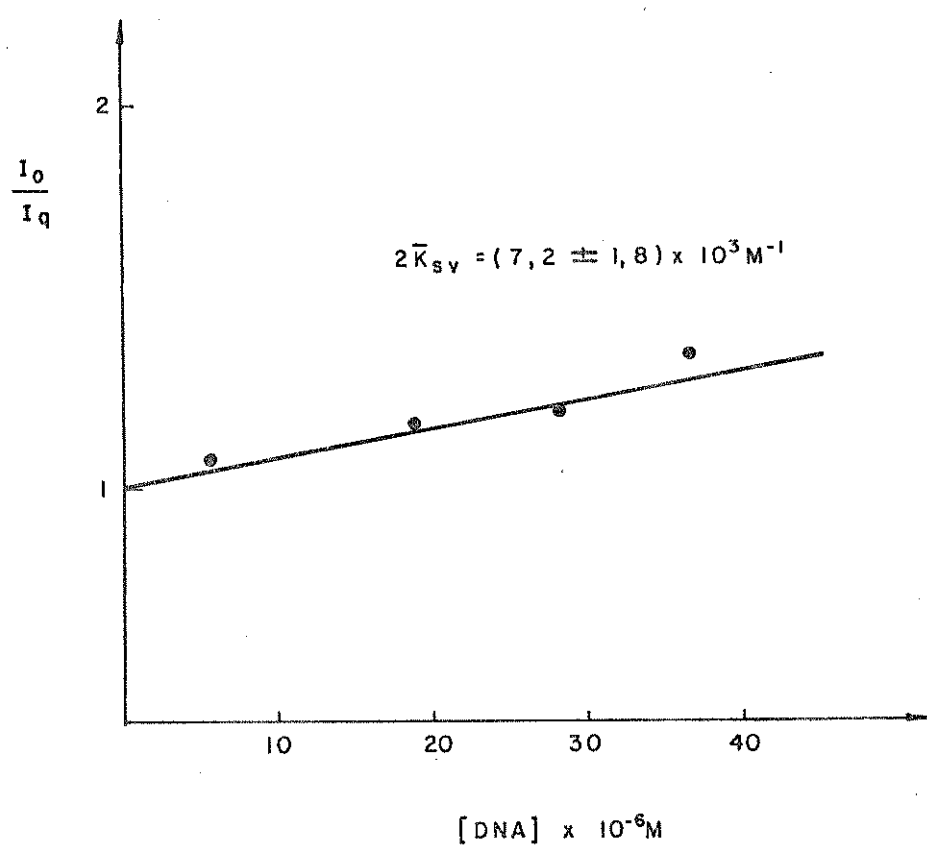


Figura III.23 - Gráfico Stern-Volmer para a supressão da emissão do sistema enzimático IAA/EDTA/HRP/O₂ pelo DNA.

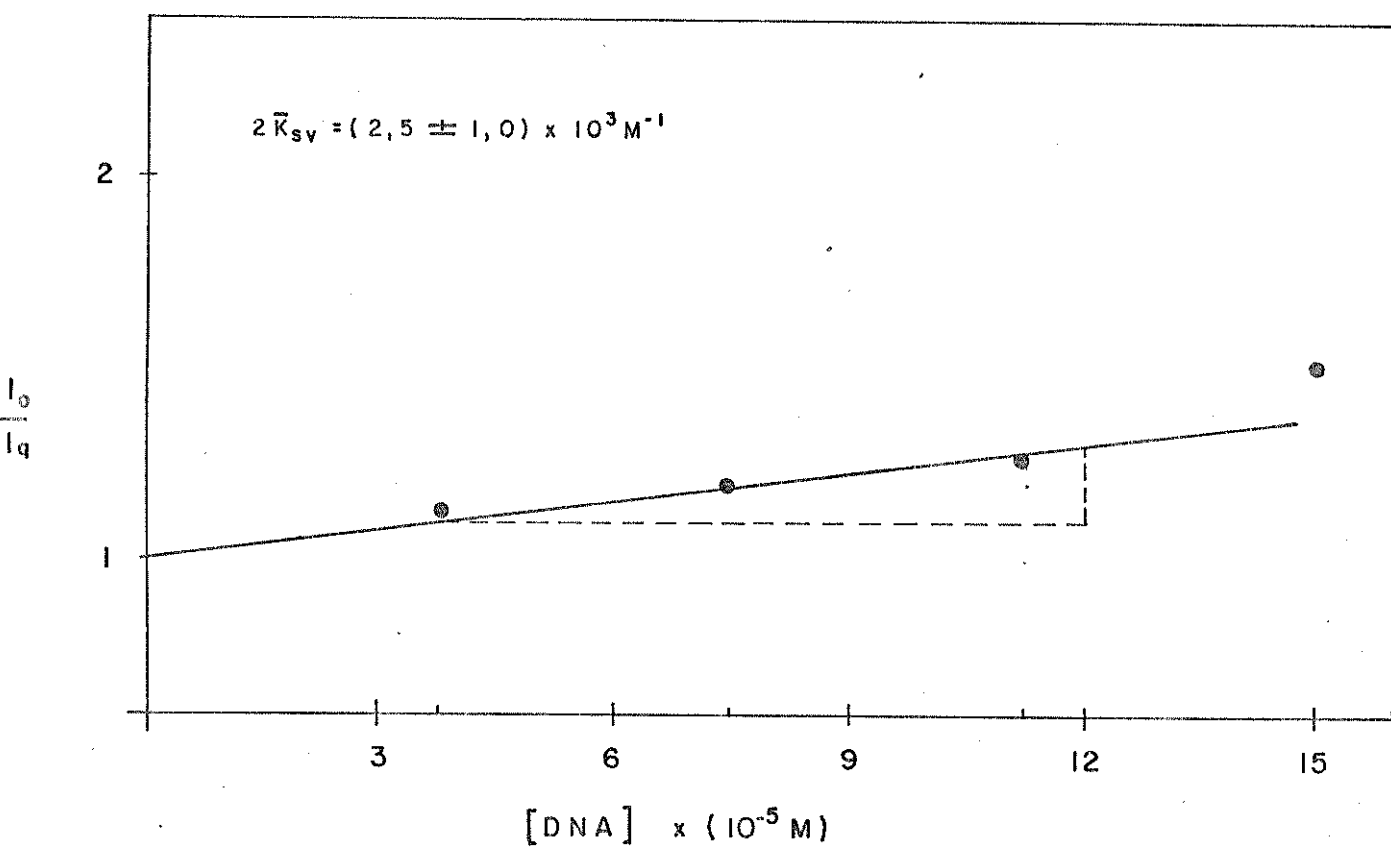


Figura III.25 - Gráfico Stern-Volmer para a supressão da emissão do sistema enzimático MA/Mn²⁺/HRP/O₂ pelo DNA.

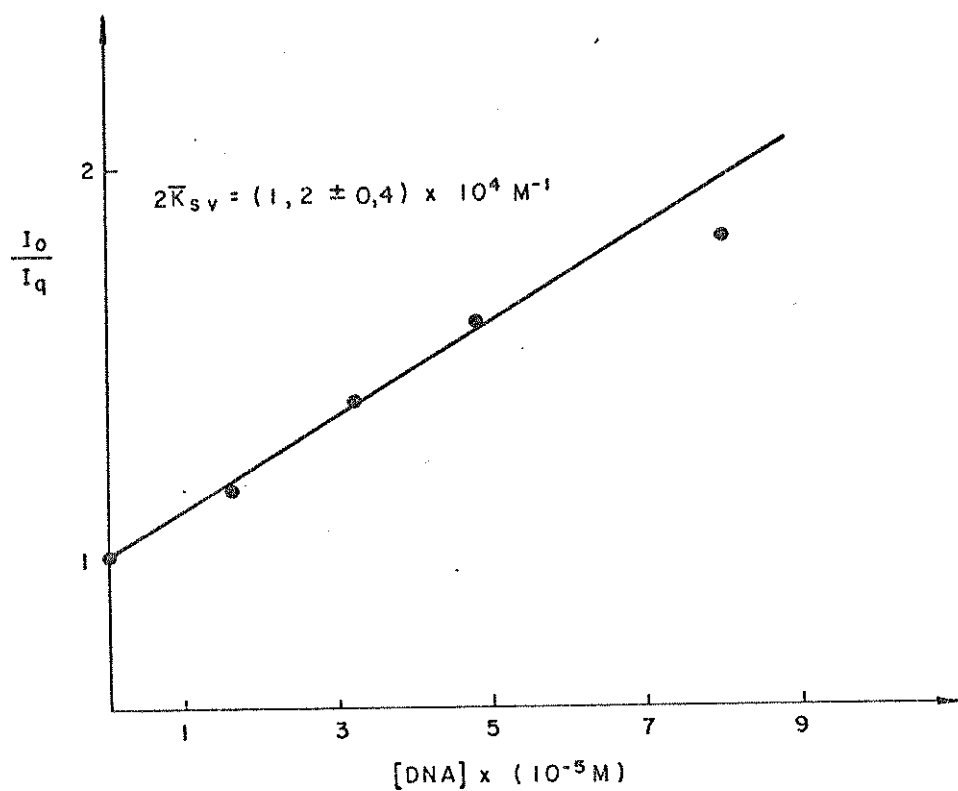


Figura III.27 - Gráfico Stern-Volmer para a supressão da emissão do sistema enzimático AFo/GSH/Catalase/HRP/Mn⁺²/O₂ pelo DNA.

Tabela III.6 - Valores de Ksv para a supressão da emissão dos sistemas enzimáticos pelo DNA:

Sistemas	Ksv x 10 ³ M ⁻¹
IAA/EDTA/HRP/O ₂	(3,6 ± 0,9)
MA/Mn ⁺² /HRP/O ₂	(1,3 ± 0,5)
AFo/HRP/GSH/Catalase/Mn ⁺² /O ₂	(6,0 ± 2,0)

zação das bases no esqueleto da macromolécula, conferindo às mesmas, e em particular à guanina, uma conformação mais adequada à reação com o $^1\text{O}_2^*$. Isto também é possível de ocorrer com enzimas, cujo isolamento do sítio catalítico, em alguns casos, diminui a velocidade de catálise devido à perda de conformação terciária própria para promover o encaixe enzima-substrato. Supondo-se a partir destes dados, que DNA estivesse interagindo com o oxigênio singlete gerado nas reações enzimáticas em estudo, e baseando-se no fato de que tRNA havia mostrado interação com $^3\text{IAL}^*$ gerado na degradação de IAA (C15), decidimos fazer uso de algumas técnicas que nos permitissem acompanhar alguma modificação estrutural de DNA quando pré-tratado nos sistemas enzimáticos. É sobre tais recursos e seus resultados que trataremos a seguir.

A. Reação de DNA com formaldeído

Segundo Lewin (C18), os átomos de hidrogênio dos grupos amino ($-\text{NH}_2$) que não são requeridos para formar a ligação de Watson-Crick (pontes de hidrogênio) entre os pares de bases, são capazes de reagir com formaldeído para formar metilol, de acordo

com a figura III.29 .

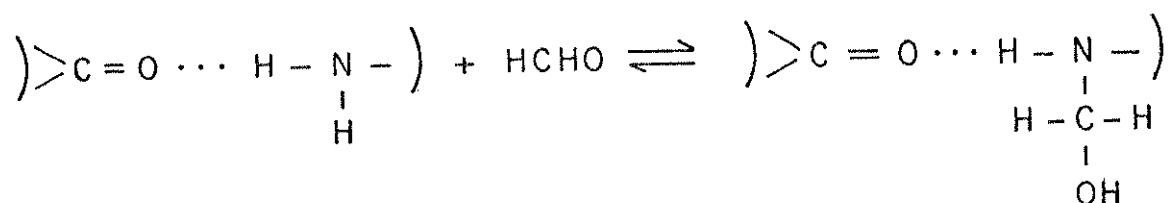


Figura III.29 - Reação de DNA com formaldeído (C18).

Para que a reação se processe, é necessário que os grupos reagentes do DNA sejam previamente expostos ou deslocados, para que o contato deles com o formaldeído seja facilitado. Observando-se as figuras III.30, III.31 e III.32, notamos que os DNAs, quando submetidos às degradações de IAA, MA e AFo, reagiram mais rapidamente com formaldeído em relação aos DNAs não tratados desta maneira. Resultado semelhante foi obtido por Scothorst e colaboradores (C18), em que o DNA tratado na presença de CPZO (fotoproduto da degradação de clorpromazina pelo O_2) apresentou uma velocidade de reação maior com o formaldeído em relação ao não tratado. Embora se saiba que três das bases que constituem o DNA possuam o grupo $-\text{NH}_2$ (guanina, citidina e adenosina), o método não especifica qual delas, ou, se todas elas, estão sofrendo maior ou menor interação. Mesmo assim, podemos sugerir que o DNA sofra mudanças estruturais na presença das espécies excitadas geradas em nossos sistemas enzimáticos. Tais modificações de estrutura podem contribuir para a desestabilização das pontes de hidrogênio, proporcionando um maior contato entre os grupos amino das bases e o formaldeído.

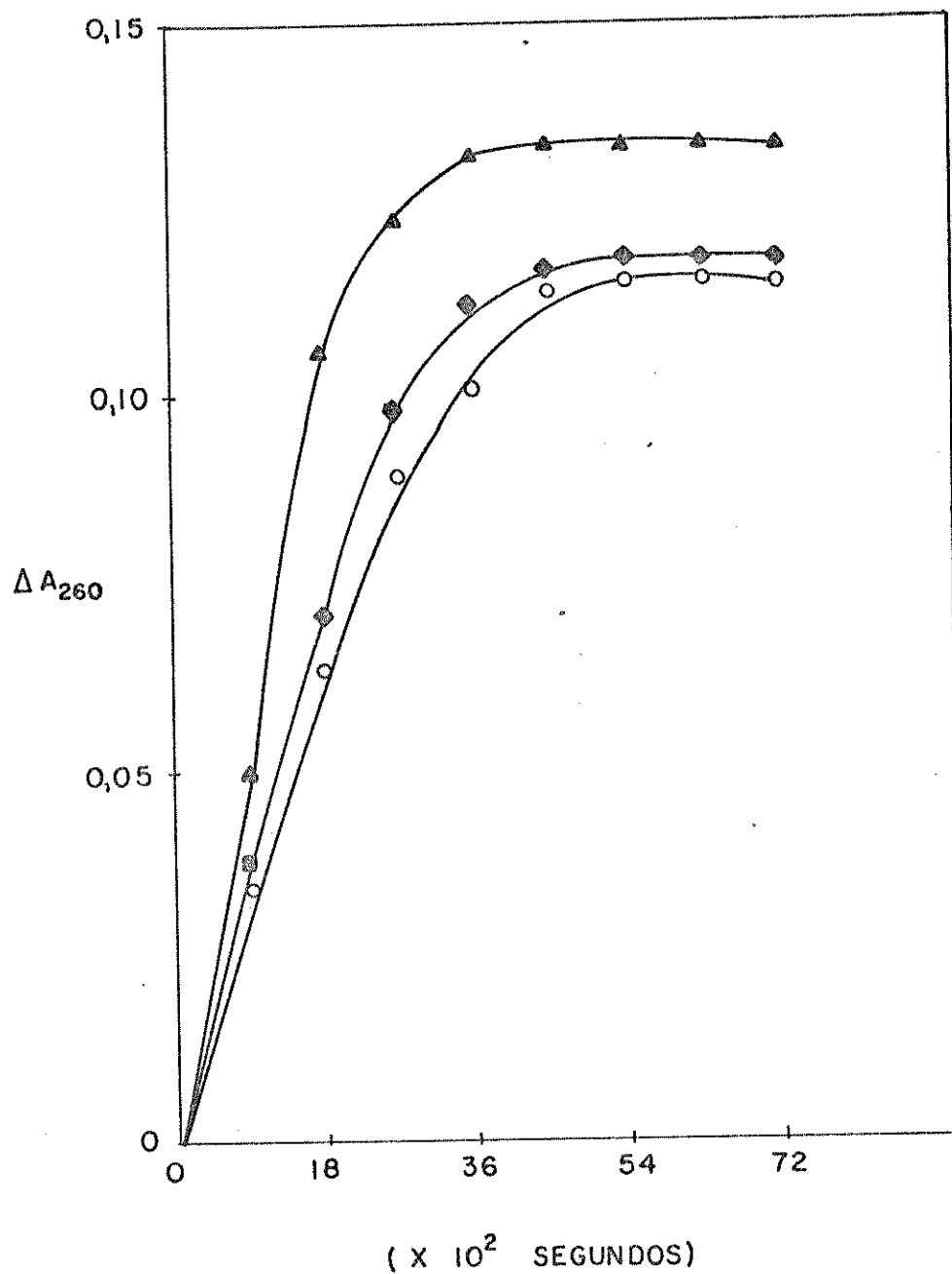


Figura III.30 - Gráfico da variação de absorbância de DNA (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$), à 60 °C, na presença de formaldeído 30% em um meio constituído pela mistura de citrato de sódio 10 mM e cloreto de sódio 30 mM (pH=8,3):
 a. DNA nativo $\text{---}\circ\text{---}\circ\text{---}$
 b. DNA pré-tratado com IAA/EDTA/ O_2 $\text{---}\diamond\text{---}\diamond\text{---}$
 c. DNA pré-tratado com IAA/EDTA/HRP/ O_2 $\text{---}\triangle\text{---}\triangle\text{---}$

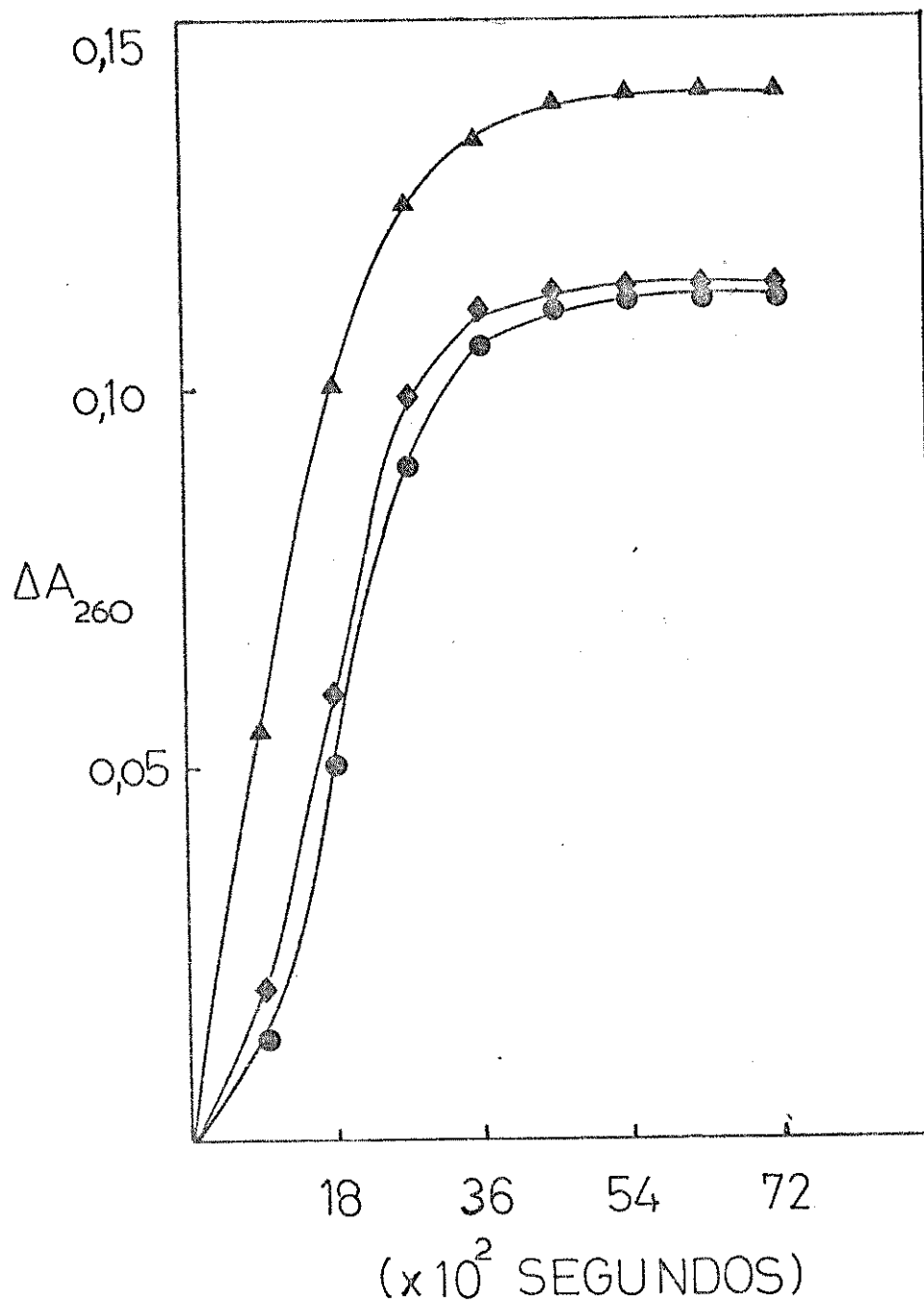


Figura III.31 - Gráfico da variação de absorbância de DNA (80 µg/ml), à 60°C, na presença de formaldeído 30% em um meio constituído pela mistura de citrato de sódio 10 mM e cloreto de sódio 30 mM (pH=8,3):
a. DNA nativo 1-●-●-1
b. DNA pré-tratado com MA/Mn²⁺/O₂ 1-◆-◆-1
c. DNA pré-tratado com MA/Mn²⁺/HRP/O₂ 1-▲-▲-1

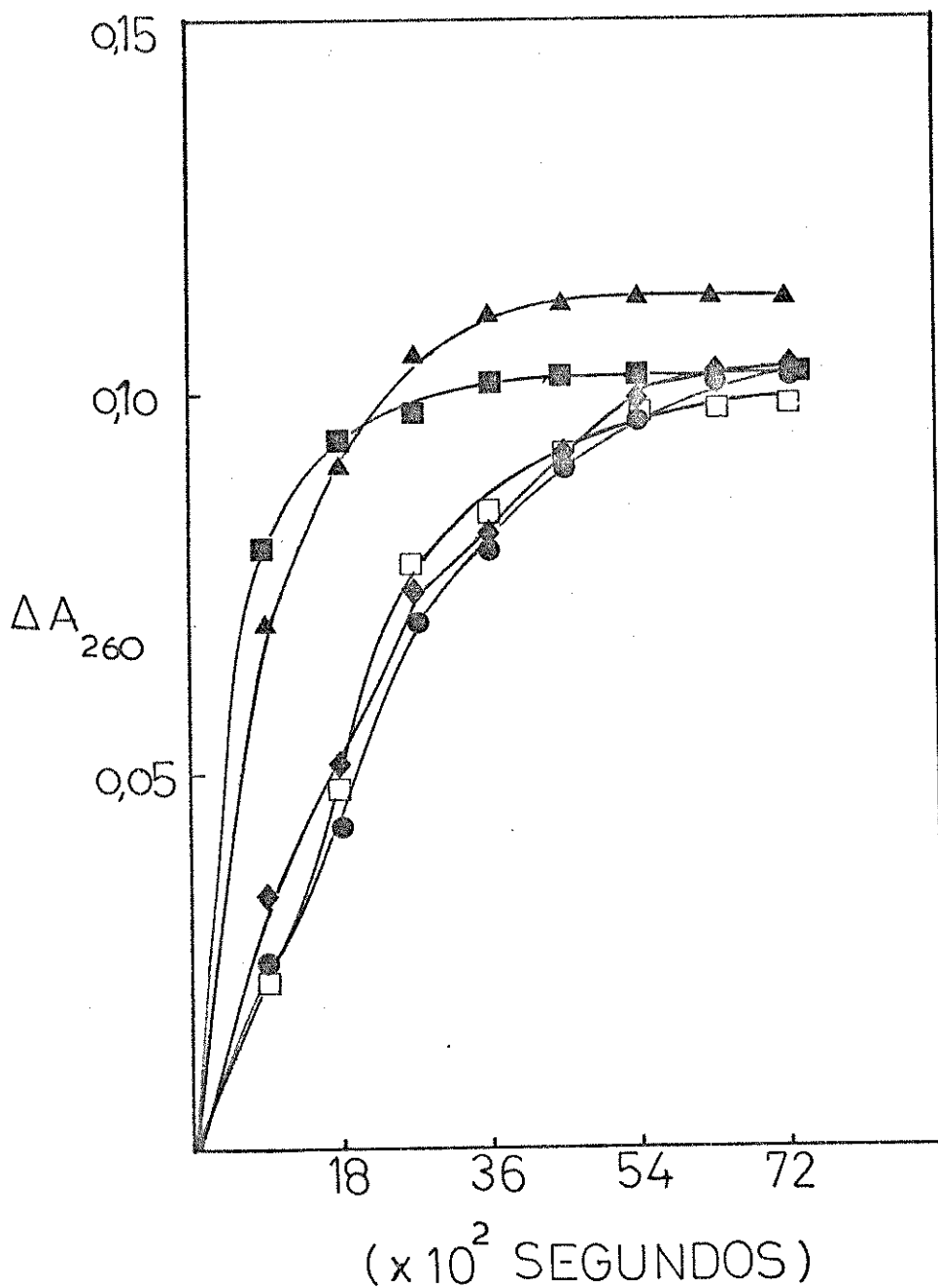


Figura III.32 - Gráfico da variação da absorbância de DNA (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$), à 60°C, na presença de formaldeído 30% em um meio constituído pela mistura de citrato de sódio 10 mM e cloreto de sódio 30 mM (pH=8,3):
 a. DNA nativo |—●—●—|
 b. DNA pré-tratado com Afo/GSH/Catalase/Mn²⁺/O₂ |—◆—◆—|
 c. DNA pré-tratado com Afo/GSH/Catalase/HRP/Mn²⁺/O₂ |—▲—▲—|
 d. DNA pré-tratado com Afo/GSH/Catalase/Bil(20 μM)/Mn²⁺/O₂ |—□—□—|
 e. DNA pré-tratado com Afo/GSH/Catalase/Bil(20 μM)/HRP/Mn²⁺/O₂ |—■—■—|.

B. Complexação e fluorescência do complexo DNA-Tb

Nossa atenção durante este trabalho, foi dirigida ao íon Tb(III) e sua interação com ácidos nucleicos, preferencialmente com o resíduo guanosina do DNA. Trabalhos como os de Ringer e col. (C19,C20) e de Topal e Fresco (C21), dentre outros, concordam que a guanina é a base diretamente envolvida (vide apêndice VI). Por exemplo, em 1973 Formoso (C22) publicou uma pesquisa sobre a fluorescência dos complexos ácidos nucleicos-Tb(III), onde ele sugeriu que a maior fluorescência observada para o complexo 5'-GMP:Tb(III) era devido às propriedades eletrônicas da guanina ou à diferente estrutura do complexo em relação às outras bases. Em um trabalho recente de Rudman e col. (C23) sobre a natureza da emissão dos complexos de certos nucleotídeos ou ácidos nucleicos com Tb(III), eles também admitem que a geometria do complexo é muito importante na transferência de energia das bases para este íon.

Ringer e col. (C24) usaram, recentemente, esta propriedade da guanosina para sondar as mudanças na estrutura duplex do DNA, resultante de sua interação com drogas antitumores.

Com base em tais trabalhos, resolvemos estudar a fluorescência dos complexos DNA-Tb(III), no sentido de investigar o comportamento da emissão, quando o DNA é previamente tratado nos sistemas enzimáticos, bem como no sistema fotodinâmico na presença de RBp como sensibilizador. Nosso interesse era o de verificar se o $^1\text{O}_2^*$ gerado nestes sistemas interagia, de fato, com os resíduos guanosina do DNA.

As figuras III.33-III.35 ilustram os resultados de fluorescência dos complexos DNA-Tb(III) em que o ácido nucleico foi previamente tratado nos sistemas geradores de $^1\text{O}_2^*$: IAA/EDTA/HRP/ O_2 , MA/ Mn^{+2} /HRP/ O_2 e Afo/GSH/Catalase/HRP/ Mn^{+2} / O_2 . Também foram

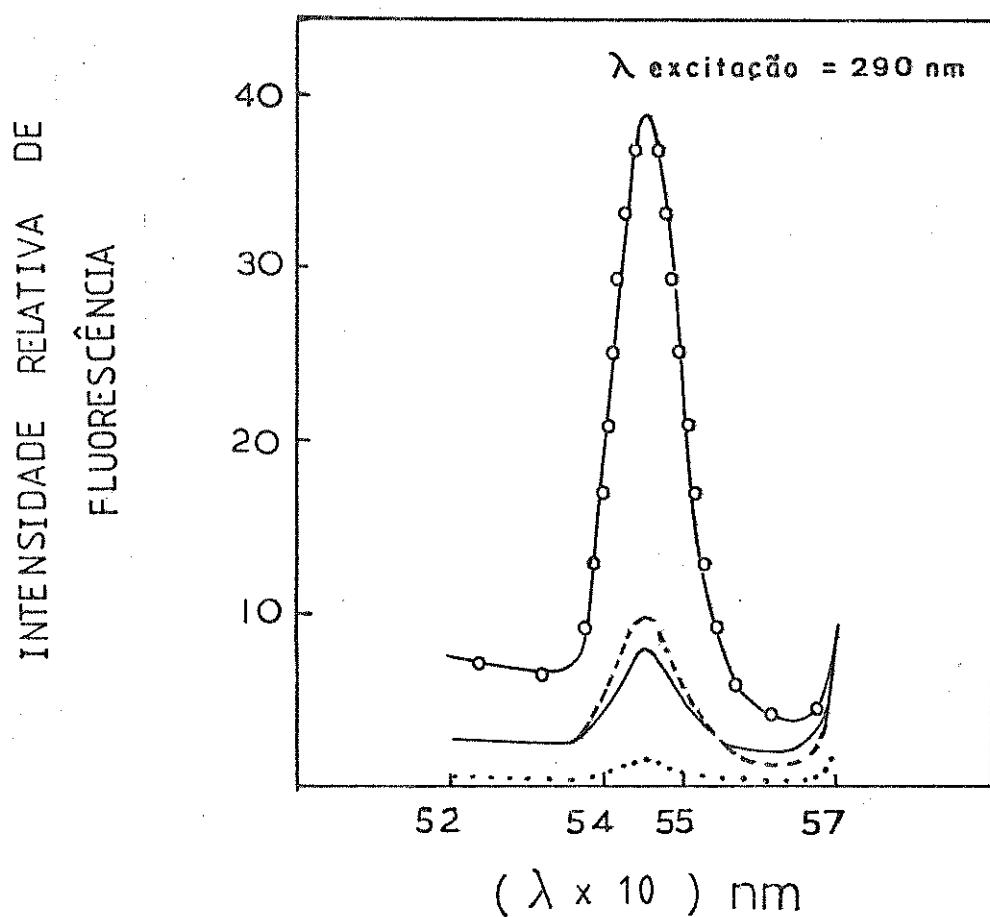


Figura III.33 - Intensidade relativa de fluorescência de 3 μM de Tb(III) em tampão cacodilato de sódio 20 mM contendo 10 mM em KCl (pH=6,0) |.....|:
a. na presença de 18 μM de DNA nativo |-----|
b. na presença de 18 μM de DNA pré-tratado com IAA/EDTA/ O_2 |———|
c. na presença de 18 μM de DNA pré-tratado com IAA/EDTA/HRP/ O_2 |—o—o—|

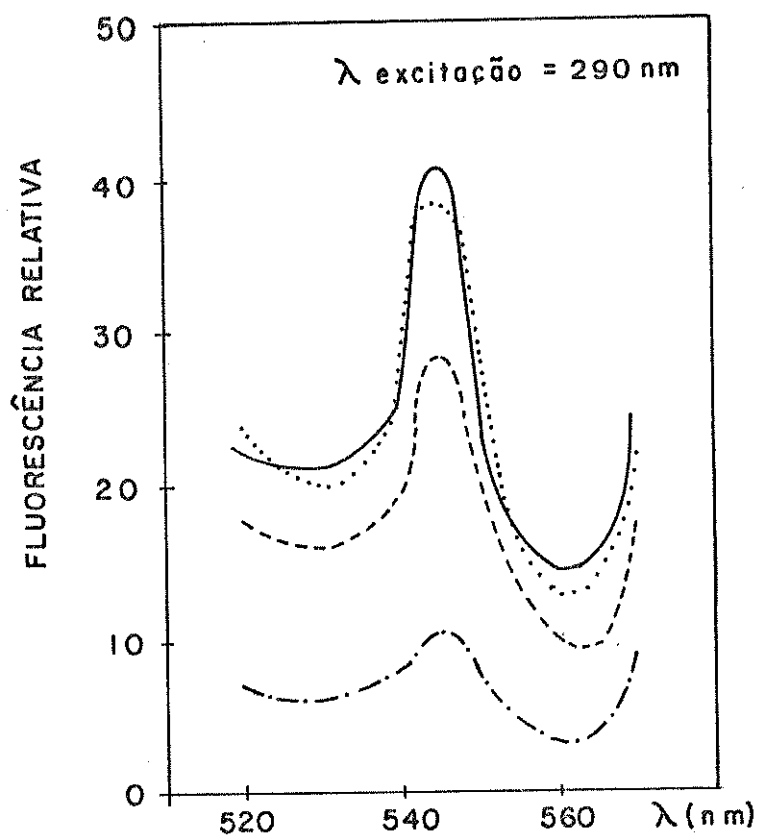


Figura III.34 - Intensidade relativa de fluorescência de 8 μM de Tb(III) em tampão cacodilato de sódio 20 mM contendo 10 mM em KCl (pH=6,0) |—•—•—|:

a. na presença de 48 μM de DNA nativo |———|

b. na presença de 48 μM de DNA pré-tratado com $\text{MA}/\text{Mn}^{+2}/\text{O}_2$ |.....|

c. na presença de 48 μM de DNA pré-tratado com $\text{MA}/\text{Mn}^{+2}/\text{HRP}/\text{O}_2$ |----|

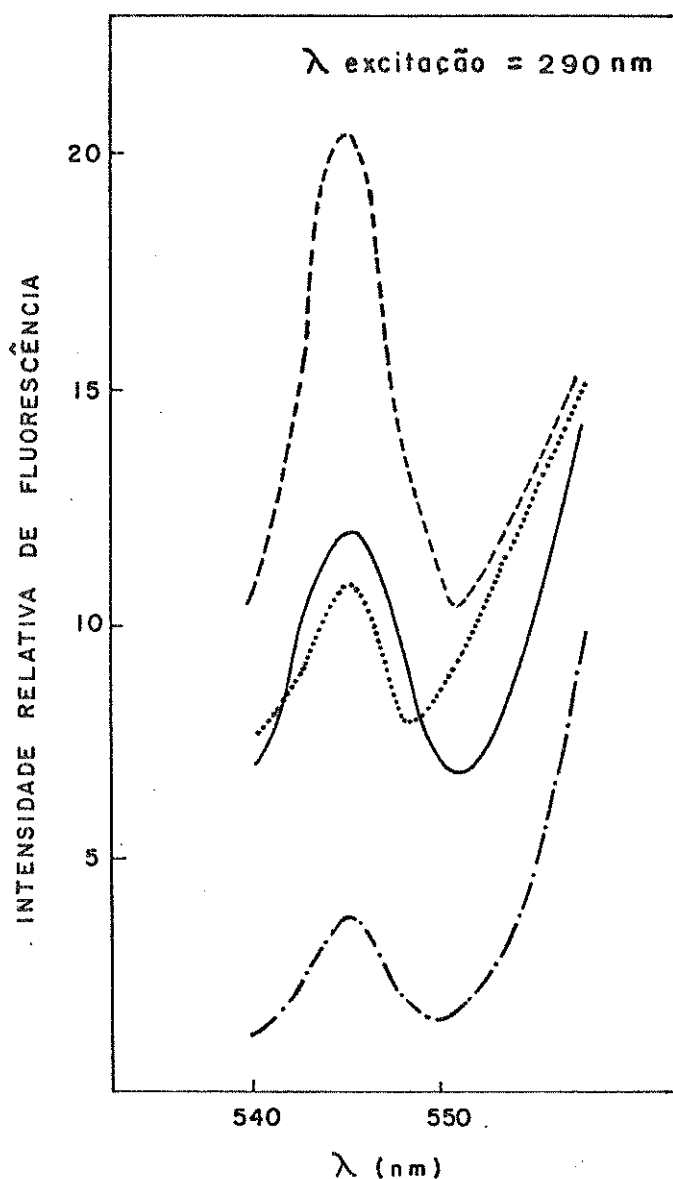


Figura III.35 - Intensidade relativa de fluorescência de 16 μM de Tb(III) em tampão cacodilato de sódio 20 mM contendo 10 mM em KCl (pH=6,0) $|- \bullet - \bullet -|$:
 a. na presença de 93 μM de DNA nativo $| - - - - |$
 b. na presença de 93 μM de DNA pré-tratado com Afo/HRP/GSH/Catalase/ $\text{Mn}^{+2}/\text{O}_2$ $| \cdot \cdot \cdot \cdot |$
 c. na presença de 93 μM de DNA pré-tratado com Afo/HRP/GSH/Catalase/Bil (20 μM)/ $\text{Mn}^{+2}/\text{O}_2$ $| - - - |$.
 As fluorescências de b.e c. na ausência de HRP foram aproximadamente iguais à de a.

utilizados sistemas geradores de espécies excitadas tripletes : IAA/EDTA/HRP/O₂ e Afo/Bil./GSH/Catalase/HRP/Mn⁺²/O₂. Como podemos verificar pelos resultados, a fluorescência do complexo diminui quando o DNA é tratado com ¹O₂*. Isto, de certa forma, já era esperado , pois a guanosina, provavelmente, deve ter reagido durante a degradação enzimática, e portanto, o número de resíduos livres, para a complexação com Tb(III), diminuiu. Um efeito oposto foi verificado quando o DNA foi tratado em sistemas com espécies tripletes, como por exemplo durante a degradação do 2-metil propanal (C25), do IAA (C15) e do ácido fólico na presença de Bil. (C26). Acreditamos que o aumento da emissão, nestes casos, seja devido ao aparecimento de regiões de fita simples no DNA, causadas pela formação de dímeros base-base ou base-triplete excitado, por transferência de energia. Lembrando das experiências de Ringer e col. (C19,C20), acreditamos que este efeito deve contribuir para o aumento de resíduos guanosina livres que estarão disponíveis para a complexação com Tb(III). Trabalhos da literatura como os de Huang e Gordon (C27) mostram a possibilidade de formação de dímeros tipo T^T, C^C, U^C e U^U, através da transferência de energia da acetona triplete fotossensibilizada. Tais dímeros, se formados, devem alterar a estrutura secundária do DNA com a destruição de pontes de hidrogênio e a formação de regiões de fita simples, onde os resíduos guanina estariam disponíveis para a complexação. Isto parece consistente com as observações de Ringer e col. (C19,C20), Topal e Fresco (C21) e de Formoso (C22).

C.Ligação IAL-DNA

Como vimos na figura III.22, o DNA quando adicionado à reação de degradação de IAA, é capaz de suprimir a emissão do sistema. Trabalhos de Faljoni e col. (C28) e de Meneghini e col. (C29), mostraram que espécies eletronicamente excitadas, geradas em reações enzimáticas, podem transferir sua energia para diversos aceitadores, inclusive para macromoléculas como o DNA. Em um trabalho recente, De Mello e col. (C30) mostraram que a oxidação aeróbica de (2-C¹⁴)-IAA, na presença de t-RNA, levava à incorporação isotópica na macromolécula, confirmando os resultados obtidos por Bednar e col. (C31), o qual encontrou 13,6% de radiatividade no tRNA assim tratado. Continuando suas pesquisas, De Mello (C15) demonstrou a formação de um aduto IAL-tRNA, em que a base uridina da macromolécula estava diretamente envolvida. Assim, podemos supor que dois processos podem acontecer na formação de uma espécie triplete na presença de DNA. Um deles envolveria a transferência de energia da espécie excitada para as bases do DNA, com posterior formação de dímeros. Neste caso, uma reação de marcação, semelhante à realizada por De Mello e col. (C32), não resultaria em marcação do DNA. O outro processo, consideraria a formação de aduto entre a espécie excitada e alguma base do DNA, com marcação deste após seu isolamento do meio de reação. Este último processo ganha nossa confiança quando analisamos os resultados da tabela III.7, onde notamos uma marcação acentuada no DNA pós-tratado durante a reação. Além disso, a marcação diminui com o aumento do pH, fato este esperado, visto que a formação de IAL triplete diminui com o aumento do pH da reação (C1), favorecendo assim nossa suspeita de que, realmente, a formação de um aduto IAL-DNA esteja ocorrendo. Para nos certificarmos disto, realiza-

mos várias reações com marcação isotópica. Uma delas consistiu na degradação de IAA(2-C¹⁴) na ausência e na presença de timidina, na esperança de detectarmos a formação de um aduto entre IAL-C¹⁴* e este resíduo. O uso de timidina foi feito com base nos resultados de De Mello e col. (C32), os quais já haviam detectado e iso

Tabela III.7 - Incorporação de IAL Eletronicamente Excitado no DNA Durante a Oxidação de (2-C¹⁴)-IAA Catalisada por HRP à Diferentes pHs:

Ensaio	CPM		
	pH = 3,8	pH = 5,6	pH = 6,8
Branco (a)	5300	4200	4600
Reação (b)	142500	68300	42900
Pós-tratado (c)	39300	23700	14200
Razão	2.8	1.7	1.0

- a. O branco consistiu da mistura (2-C¹⁴)-IAA (50 µM)/EDTA (30 µM)/DNA (30 µg/ml).
- b. A reação consistiu do branco tratado com HRP (0,25 µM) por 30 minutos
- c. O pós-tratado consistiu em adicionar o DNA após a reação e incubá-lo por 30 minutos.

lado um aduto formado por IAL-C¹⁴ e uridina. Como no DNA a uridina é substituída pela timidina, acreditamos que esta base seria

uma forte candidata para a formação de um aduto. Além disso, De Mello (C15) já havia testado a possibilidade de se formar um aduto entre IAL-C¹⁴ e as outras bases, porém os resultados não foram conclusivos.

Como mostra a figura III.36, quando IAA(2-C¹⁴) é colocado em um meio tamponado, sem nenhum outro constituinte, ele fornece um pico de emissão máxima correspondente a um valor de $R_f=0,23$, e, um pico de menor intensidade com valor de $R_f=0,8$, o qual corresponde certamente à algum traço de IAL na amostra. Porém quando se desenvolve as reações IAA(2-C¹⁴)/EDTA/HRP/O₂ e IAA(2-C¹⁴)/Timidina (50 μ M)/EDTA/HRP/O₂ e se faz as contagens após aplicação cromatográfica (vide Cap.II, item II.3.12), obtém-se picos de emissão máxima na mesma região e com o mesmo $R_f=0,77$; ou seja, ambas resultaram na formação de IAL. Assim, visto que a formação de um aduto IAL-timidina aparentemente não procedeu, resolvemos fazer o mesmo tipo de experiência, utilizando desta vez a politimidina no lugar da timidina, com a intenção de verificar se a conformação de timidina era importante na obtenção do aduto. Também neste caso obtivemos resultados similares aos anteriores, como mostra a figura III.37. De tais resultados nós colocamos duas hipóteses :

- a.A formação de um aduto entre alguma base do DNA, provavelmente timina, e o IAL ocorre segundo os resultados da tabela III.7, porém em baixo rendimento, dificultando a sua detecção.
- b.A estrutura secundária característica do DNA deve conferir à base, que forma o aduto, uma conformação mais adequada para ocorrer tal evento.

Para cada valor de pH da tabela III.7 notamos que o DNA adicionado na reação após ela ter aparentemente cessado, sofre alguma incorporação isotópica em relação ao DNA referência (bran-

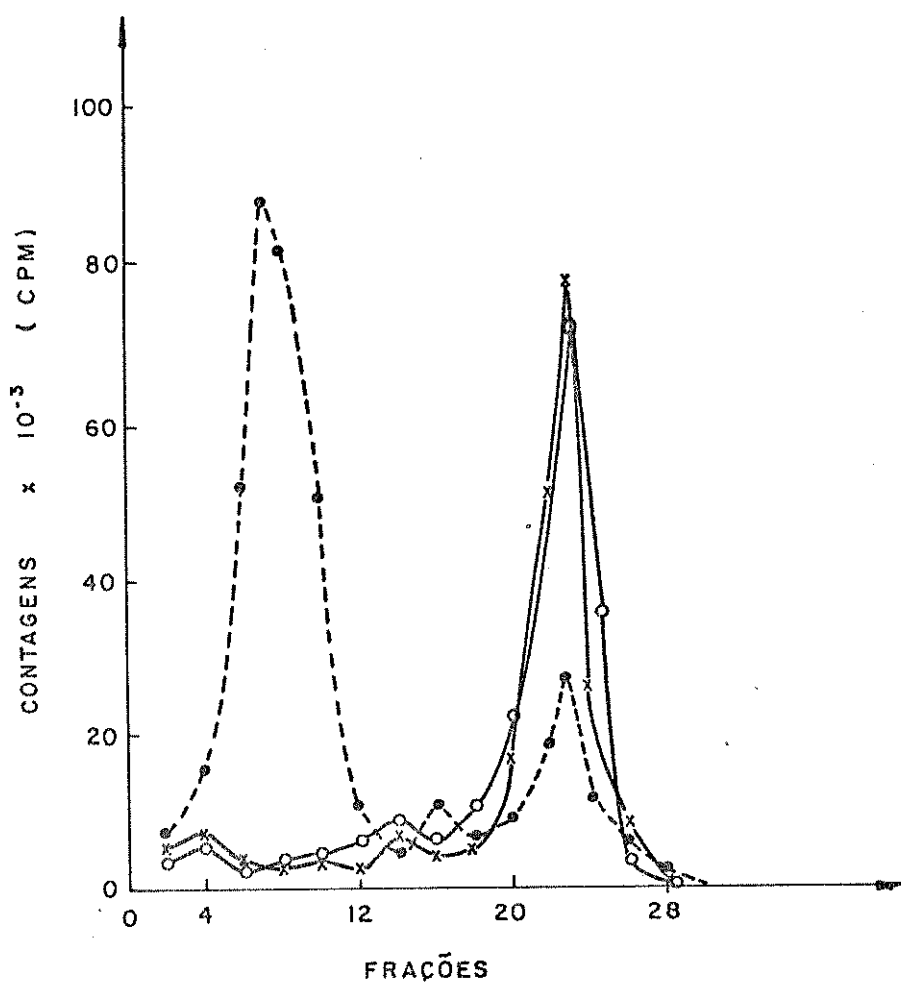


Figura III.36 - Cromatografia TLC de 200 μ l das amostras de:

a. 0,1 mM de IAA(2-C^{14})/30 μ M EDTA/50 μ M timidina/
 O_2 |—●—●—|.

b. 0,1 mM de IAA(2-C^{14})/30 μ M EDTA/50 μ M timidina/
 0,8 μ M HRP/ O_2 |—o—o—|.

c. 0,1 mM de IAA(2-C^{14})/30 μ M EDTA/0,8 μ M HRP/ O_2
 |—x—x—|.

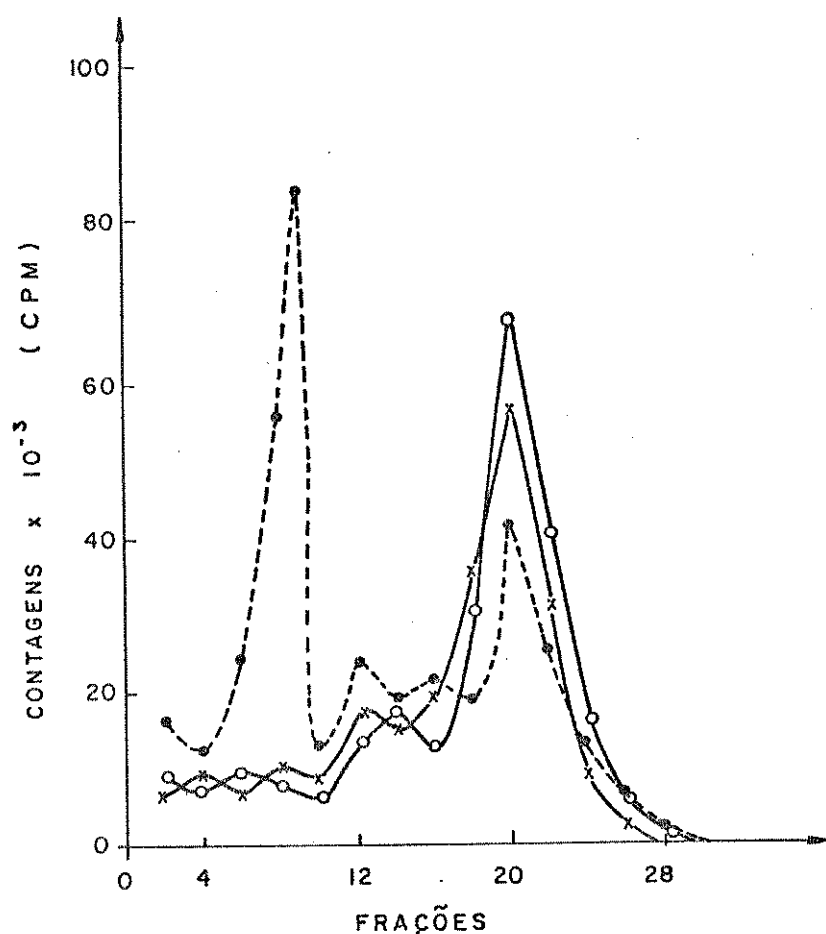


Figura 111.37 - Cromatografia TLC de 200 μ l das amostras de :

a. 0,1 mM de IAA($2-C^{14}$)/30 μ M EDTA/(0,1 unidades/
 μ l) de politimidina /O₂ |—●—●—|.

b. 0,1 mM de IAA($2-C^{14}$)/30 μ M EDTA/(0,1 unidades/
 μ l) de politimidina/0,8 μ M HRP/O₂ |—○—○—|.

c. 0,1 mM de IAA($2-C^{14}$)/30 μ M EDTA/0,8 μ M HRP/O₂
 |—x—x—|.

co). Tal comportamento é aceito devido ao fato de que, ao se adicionar fenol:clorofórmio (1:1) para extrair a enzima do meio de reação, não agitamos vigorosamente a mistura, para que não houvessem quebras no DNA através do manuseio. Segundo Ward (C33), o DNA sofreu mudanças estruturais causadas por diferentes métodos de extração.

D. Estudos fotodinâmicos com DNA

O estudo do efeito fotodinâmico sobre o DNA foi feito utilizando-se rosa bengala como sensibilizador, o qual vem ligado à um polímero suporte de natureza não revelada. As vantagens de se usar tal sensibilizador advem do fato de que ele é insolúvel em água e, portanto, prontamente separado do meio.

Para verificarmos o efeito da fotossensibilização sobre o DNA, utilizamos as propriedades emissivas do complexo DNA-Tb(III) como já comentamos anteriormente. Assim, após irradiar o DNA na presença e na ausência de RBp, complexou-se o mesmo com o térbio e registrou-se a intensidade de fluorescência do complexo. Pelos resultados da tabela III.8, nota-se que a intensidade de fluorescência do complexo DNA-Tb(III), cujo DNA foi previamente irradiado na presença de RBp, é praticamente a metade daquela para o mesmo complexo onde o DNA foi previamente irradiado sozinho. Segundo Houba-Herlin e col. (C34) o RBp foi dentre outros sensibilizadores, um dos mais eficientes em produzir $^1O_2^*$, cuja formação foi medida pela velocidade de desaparecimento de desoxiguanosina e também pela formação de radical nitróxido, nas condições estudadas. A inativação fotodinâmica de *E. coli* por RBp também mostrou que o $^1O_2^*$ ocupa um papel importante no processo (C35). Se, de fato, o $^1O_2^*$ está sendo gerado pela reação:

Tabela III.8 - Efeito da Irradiação de DNA na Presença de RBp

Sistemas	% Relativa de fluorescência do complexo DNA-Tb(III) (média de 3 medidas)
DNA (a)	100
DNA + RBp (b)	55
DNA + RBp + Histidina (c)	91
DNA + RBp + Manitol (d)	50
DNA + RBp + SOD (e)	10
DNA + RBp + SOD (f)	51
DNA + RBp + Catalase (g)	14
DNA + RBp + Catalase (h)	53

(a). DNA (80µg/ml) irradiado e posteriormente complexado com Tb(III). A intensidade de fluorescência deste complexo foi tomada como 100%, excluindo-se a intensidade de fluorescência de Tb(III) sozinho.

(b). DNA(80µg/ml) irradiado na presença de RBp (40 mg) e posteriormente complexado com 13 µM de Tb(III).

(c). Idem (b) + Histidina (50 mM).

(d). Idem (b) + Manitol (50 mM).

(e). Idem (b) + SOD (50 unidades/ml).

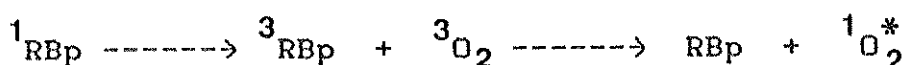
(f). Idem (b) + SOD (50 unidades/ml) desnaturada.

(g). Idem (b) + Catalase (50 unidades/ml).

(h). Idem (b) + Catalase (50 unidades/ml) desnaturada.

Tempo de irradiação = 2 h

Excitação de RBp = 546 nm

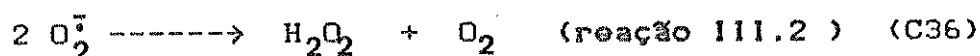


(reação III.1)

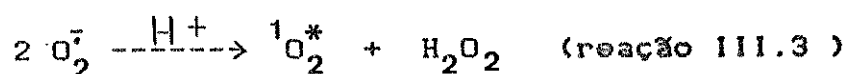
e reage posteriormente com guanosina, o abaixamento da fluorescência do complexo DNA-Tb(III) é uma função direta do número de resíduos disponíveis.

Para nos certificarmos de que apenas $^1\text{O}_2^*$ estava sendo gerado neste processo, utilizamos algumas substâncias que funcionam como supressores de outras espécies ativas de oxigênio, as quais podem também induzir a formação desta espécie.

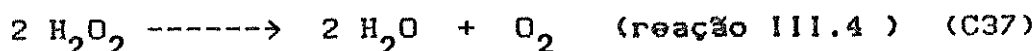
A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima específica para catalisar a reação;



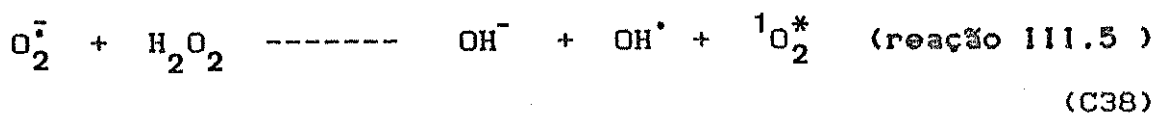
onde, na sua ausência, poderíamos ter a formação de $^1\text{O}_2^*$ pela seguinte reação:

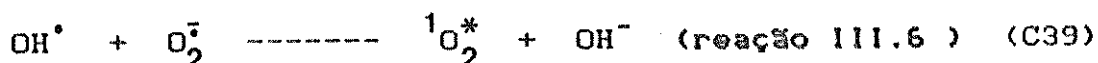


Traços de H_2O_2 também podem ser eliminados pela catalase, segundo a reação abaixo;



e evitar as reações do tipo:





Como também existe a possibilidade de se formar radical hidroxila, usamos, para detectá-lo, uma substância que é conhecida pela sua eficiência em aniquilar tais radicais, ou seja, o manitol.

Convém lembrarmos aqui que a SOD e a catalase são enzimas que podem interferir, por efeito estrutural, na complexação de DNA com Tb(III). Por isso é necessário fazer um teste com a enzima termicamente desnaturada, onde apenas sua atividade catalítica é mantida. Isto explica o comportamento "anormal" da fluorescência do complexo DNA-Tb(III) na presença de SOD e catalase.

Os resultados obtidos com manitol, SOD e catalase parecem indicar que as espécies ativas de oxigênio, acima mencionadas, não tomam parte no processo fotodinâmico. Para confirmarmos a presença de ${}^1\text{O}_2^*$ durante a irradiação do DNA com RBP, utilizamos a histidina livre como supressor desta espécie, visto que ela tem se mostrado eficiente para este propósito (C40,C41).

Como mostram os resultados da tabela III.8, a fluorescência do complexo DNA-Tb(III) foi praticamente recuperada quando a histidina esteve presente, sugerindo que o oxigênio singlete é o responsável pelo decréscimo observado na sua intensidade. Estes resultados reforçam a nossa suspeita de que os resíduos guanosina do DNA reagem quimicamente com ${}^1\text{O}_2^*$, gerado nos sistemas enzimáticos que estamos estudando.

E. Dicroísmo Circular

O uso do dicroísmo circular (CD) tem sido extremamente útil na detecção de alterações estruturais em macromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos. Tais polímeros são opticamente

ativos e as correlações entre suas conformações e atividades ópticas, têm despertado grande interesse (C42).

Em macromoléculas, existem, pelo menos, três espécies de assimetria que podem resultar em atividade óptica:

1. Assimetria relativa à própria estrutura primária, a qual pode ser constituída de várias unidades de carbono ligado à quatro constituintes diferentes,
2. Assimetria devido ao arranjo helicoidal que apresentam muitos polímeros.
3. Assimetria causada pelo arranjo de um grupo simétrico em ambiente assimétrico.

Os efeitos de CD resultam do fato de que ao passarmos luz circularmente polarizada através de uma substância opticamente ativa, os componentes circularmente polarizados à direita e à esquerda, serão absorvidos diferentemente. Assim, define-se o dicroísmo circular a um dado comprimento de onda, como sendo a diferença em coeficientes de extinção dos componentes da direita e da esquerda, ou seja, $\Delta \epsilon = \epsilon_e - \epsilon_d$ (ver apêndice III). Uma vez que a luz incidente é convertida em luz elipticamente polarizada ao emergir do meio, expressamos o CD em termos de elipticidade θ_0 , a qual é relacionada à diferença em absorção por uma constante de proporcionalidade (C43):

$$\theta_0 = 3300 \times \Delta \epsilon \quad (\text{equação III.1})$$

Com base no fato de que ácidos nucleicos exibem dicroísmo circular, aproveitamos para utilizar esta propriedade na procura de obtermos mais informações sobre mudanças conformacionais de DNA tratado enzimaticamente e também no sistema fotodinâmico.

As figuras III.38 - III.40, exibem os resultados de CD obtidos para DNAs nativos e pré-tratados nos sistemas de degradação de IAA, MA e AFo, respectivamente, na faixa de 260-340 nm. Nota-se em todas as figuras, uma pequena variação entre o CD da amostra de DNA tratado com os componentes da mistura na ausência da enzima e o DNA nativo (não tratado). Este comportamento está dentro do esperado levando-se em conta as flutuações no sistema de medida. Com relação aos CDs dos DNAs pré-tratados nos sistemas enzimáticos, notamos pelas mesmas figuras que houve uma diminuição expressiva nas intensidades em relação às amostras não tratadas. Da mesma maneira, o espectro CD de DNA tratado no sistema fotodinâmico exibiu um comportamento similar, ou seja, a intensidade do CD para o DNA pré-irradiado na presença de RBp foi menor em relação ao DNA irradiado sozinho, como mostra a figura III.41. Num trabalho de Van Holde e col. (C44), foi mostrado, entre outras experiências, que a intensidade do espectro CD é proporcional ao conteúdo de estrutura em hélice de uma amostra e que a atividade óptica exibida por um polímero é muito maior e qualitativamente diferente daquela para um monômero. Em outras palavras, a maior helicidade de um polímero aumenta sua atividade óptica e, portanto, o sinal do CD, (vide apêndice III).

Adotando a mesma linha de raciocínio, acreditamos que os DNAs tratados nos sistemas enzimáticos, e, portanto, na presença de espécies excitadas como o $^1O_2^*$ e o $^3IAL^*$, sofram mudanças estruturais, as quais tendem a diminuir sua helicidade devido à uma diminuição no conteúdo de ligações de hidrogênio entre as bases. Devemos lembrar que tais ligações conferem ao DNA sua estrutura helicoidal.

De acordo com os resultados obtidos, sugerimos que a diminuição de ligações de hidrogênio se deva à dois fatores. Pri-

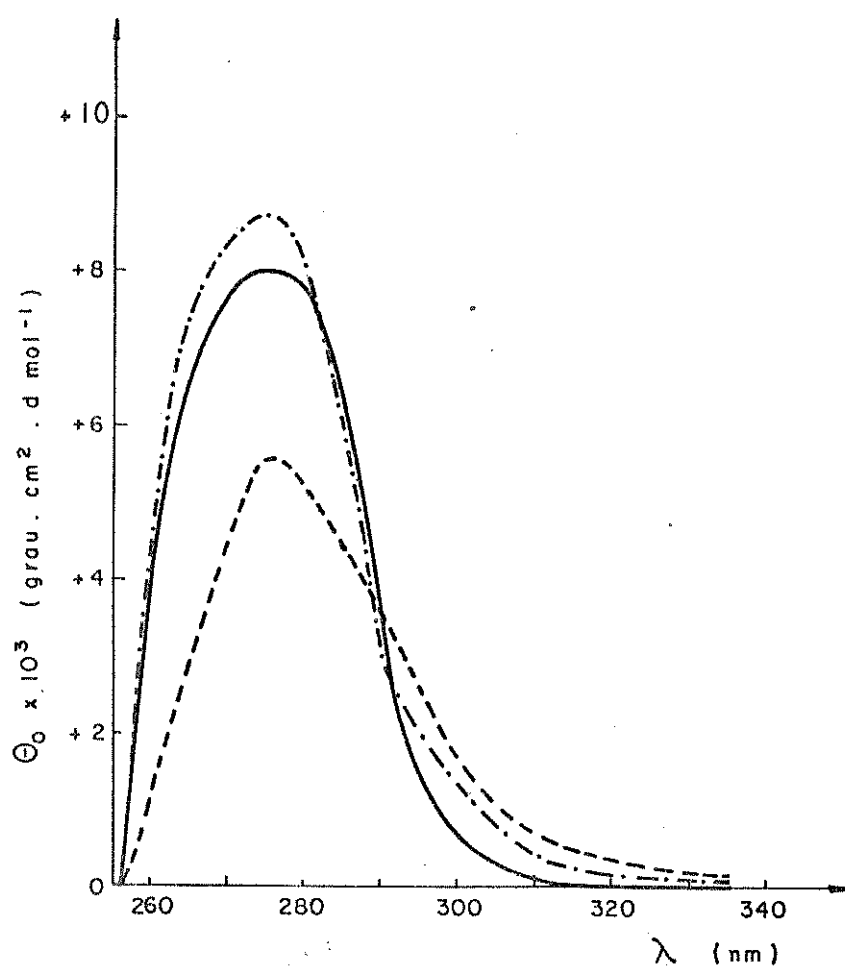


Figura III.38 - Espectro de Dicroísmo Circular de:

- a. 55 μ M de DNA nativo | ——— |
- b. 55 μ M de DNA pré-tratado com IAA/EDTA/O₂
| -●-●- |
- c. 55 μ M de DNA pré-tratado com IAA/EDTA/HRP/O₂
| - - - - |

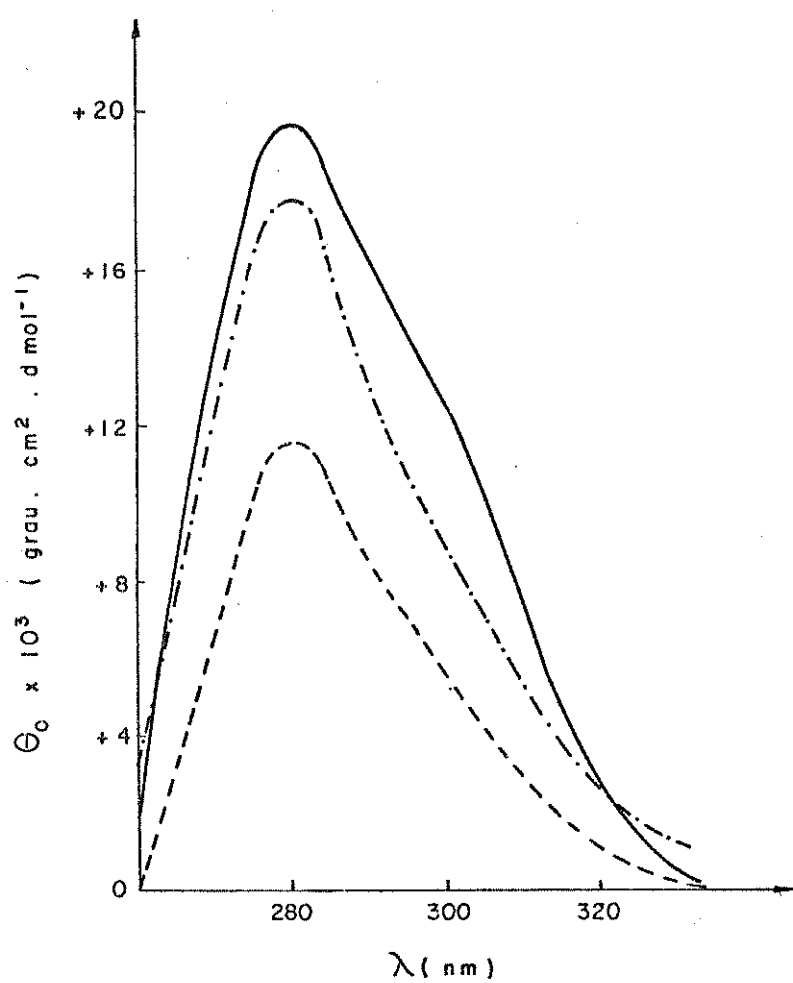


Figura III.39 - Espectro de Dicroísmo Circular de:
 a. 58 μM de DNA nativo |———|
 b. 58 μM de DNA pré-tratado com MA/ Mn^{+2} / O_2
 |—●—●—|
 c. 58 μM de DNA pré-tratado com MA/ Mn^{+2} /
 HRP/ O_2 |-----|

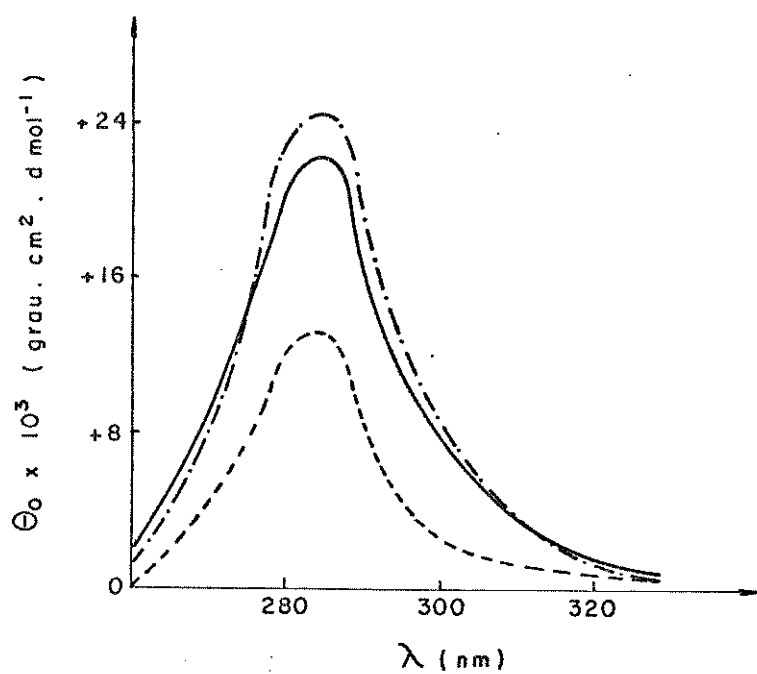


Figura III.40 - Espectro de Dicroísmo Circular de:

- a. 150 μM de DNA nativo | ——— |
- b. 150 μM de DNA pré-tratado com AFo/GSH/Catalase/ $\text{Mn}^{+2}/\text{O}_2$ | -●-●- |
- c. 150 μM de DNA pré-tratado com AFo/GSH/Catalase/HRP/ $\text{Mn}^{+2}/\text{O}_2$ | - - - - |

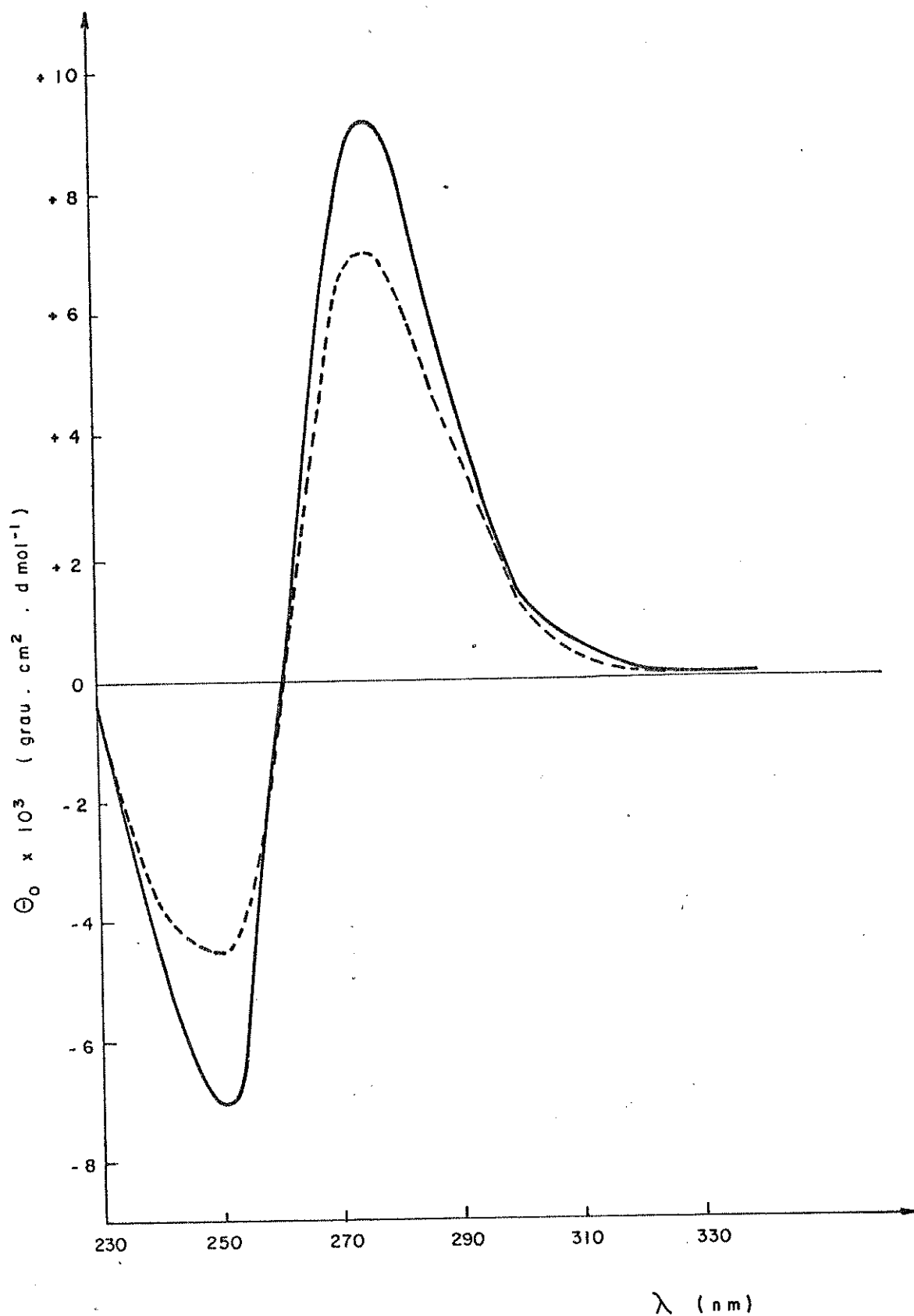


Figura III.41 - Espectro de Dicroísmo Circular de:
 a. 33 μM de DNA irradiado à 546 nm por 2 horas e à temperatura ambiente | ——— |
 b. 33 μM de DNA e 40 mg de RBp irradiados à 546 nm por 2 horas e à temperatura ambiente | - - - - |.

meiro; o oxigênio singlete gerado nos sistemas enzimáticos deve estar reagindo quimicamente com o resíduo guanosina, resultando em outros produtos e, portanto, diminuindo para cada par de bases Guanina-Citidina afetado, três ligações de hidrogênio. Segundo; na presença da espécie excitada triplete, alguma base do DNA poderá estar formando: ou um aduto com a mesma, tal como sugerimos nos experimentos de marcação isotópica, ou algum dímero entre duas bases, via transferência de energia do triplete excitado para o DNA, ou ainda os dois simultaneamente. Acredita-se que, em qualquer caso, o conteúdo de ligações de hidrogênio será comprometido e, conseqüentemente, a estrutura do DNA terá um menor grau de helicidade.

F. Fluorescência de guanina em hidrolisado de DNA

Desde que a guanosina tem sido citada na literatura como o alvo de ataque de $^1O_2^*$ e, visto que trabalhamos com sistemas geradores de tal espécie, decidimos aplicar um método direto para analisarmos o efeito desta espécie sobre o DNA, tratando o mesmo no sistema de degradação de malonaldeído e também no sistema fotodinâmico. A facilidade em se trabalhar com estes dois sistemas, reside no fato de que ambos geram somente $^1O_2^*$ e, não são constituídos de muitos componentes no meio, tal como o sistema de degradação de ácido fólico.

Após termos tratado o DNA no sistema enzimático de degradação do MA ou no sistema fotodinâmico, este foi hidrolisado em meio ácido por 40 minutos (C45). A seguir neutralizou-se a amostra e elevou-se a mesma à pH 11, onde foi feito o registro da fluorescência da base guanina (vide capítulo 11, pag.59). Os re-

sultados das figuras III.42 e III.43 indicam que a intensidade de fluorescência da guanina, quando tratada em presença de sistemas geradores de $^1O_2^*$, é menor que a da guanina não tratada no sistema enzimático e nem na presença do sensibilizador RBp. Com estes resultados torna-se claro que o DNA sofre um ataque químico de $^1O_2^*$ em seus resíduos guanosinas, confirmando assim nossos resultados e as suposições anteriores.

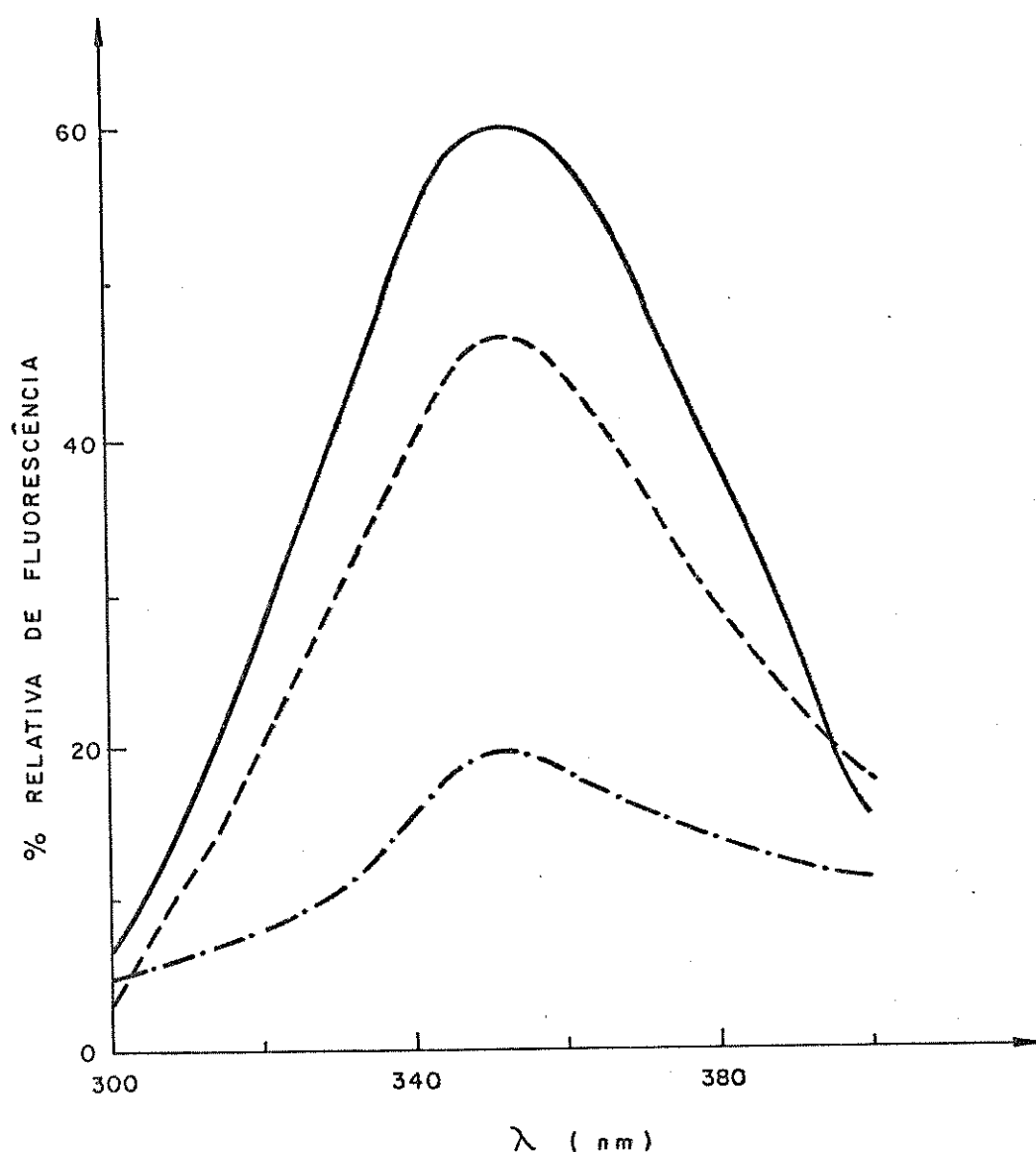


Figura III.42 - Gráfico da fluorescência de guanina presente em um hidrolisado de DNA (200 μ g/ml), previamente colocado na presença de :

- a. tampão acetato de sódio 0,2 M (pH=4,8) |——|
- b. tampão acetato de sódio 0,2 M (pH=4,8)/MA(10 mM)/Mn²⁺ (3 mM)/O₂ |----|
- c. MA(10 mM)/Mn²⁺ (3 mM)/HRP (0,8 μ M)/O₂ em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH=4,8) |---●---|

λ exc.=275 nm

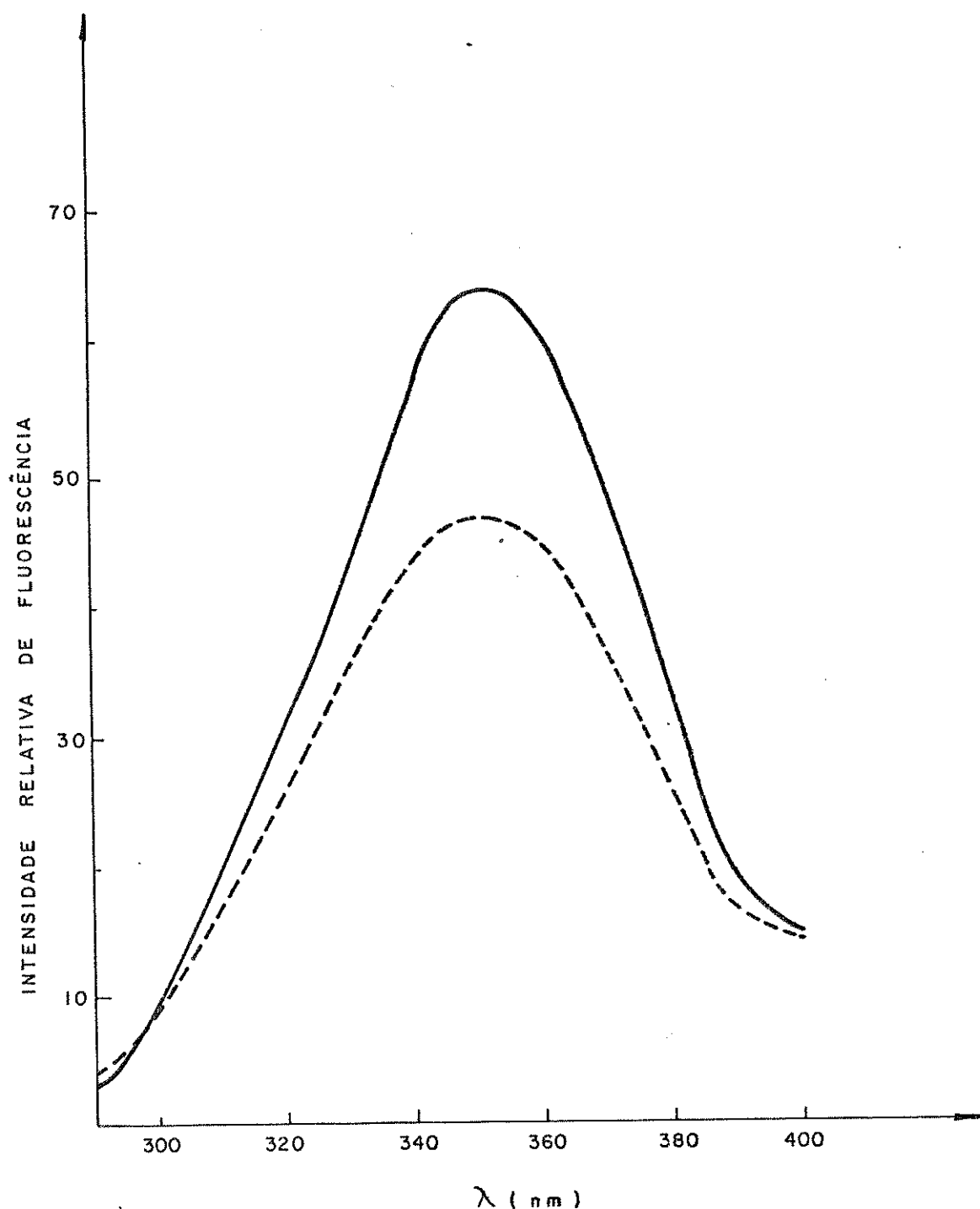


Figura III.43 - Gráfico de fluorescência de guanina presente em um hidrolisado de DNA (200 μ g/ml), previamente irradiado por 2 horas à 546 nm:
 a. em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH=4,8) |——|
 b. em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH=4,8) e na presença de RBp (20 mg/ml)/O₂ |-----|.

CONCLUSÕES

Podemos dizer que quando o DNA de timo de bezerro esteve presente durante a oxidação enzimática de IAA, MA e Afo, ele sofreu mudanças conformacionais atribuídas às espécies eletronicamente excitadas, geradas nestas reações. Com base nas experiências realizadas, sugerimos que sua estrutura secundária tenha sido afetada, supostamente devido à perda de ligações tipo pontes de hidrogênio entre as bases através de mudanças nas mesmas.

Acreditamos que a formação de regiões de fita simples deva ocorrer porque houve aumento de fluorescência do complexo DNA-Tb(III) quando o DNA foi previamente exposto à espécies tripletes. Também no caso em que o DNA interage com triplete excitado, como o $^3\text{IAL}^*$, supomos que ocorra a formação de dímeros tipo ciclobutano, mais provavelmente entre duas bases timina adjacentes, e/ou a formação de um fotoaduto. Tal suposição é viável por dois motivos:

1. Foi caracterizado um fotoaduto formado, via reação tipo Paterno-Buchi, entre uridina e $^3\text{IAL}^*$ (C33).
2. O DNA, presente na reação de degradação do IAA(2-C¹⁴) a IAL-C excitado, apresentou, quando posteriormente isolado, uma considerável marcação, embora todas as tentativas de localizarmos o sítio marcado tenham sido infrutíferas.

A bilirrubina, quando presente na degradação de ácido fólico juntamente com DNA, é capaz de ocupar um papel protetor da guanina, reagindo mais eficientemente com o $^1\text{O}_2^*$ gerado nesta reação. Por outro lado, o seu produto de fotooxidação, o $^3\text{MVM}^*$, resultante de um intermediário dioxetânico formado entre bilirrubina e $^1\text{O}_2^*$ (C26), parece agir no sentido de alterar a conformação do DNA. Isto parece coerente com a colocação de Peak e col.

(C46), o qual admite que quando a bilirrubina atua como sensibilizador celular via ação fotodinâmica, ela pode provocar quebras no DNA de fibroblastos humanos.

Em síntese, acreditamos que os estados excitados em sistemas biológicos poderiam representar transformações fisiológicas normais (através de alguns processos fotoquímicos desenvolvidos no escuro) como também patológicas (como efeitos tóxicos sobre DNA ou outros danos como mutagênese e carcinogênese).

Referencias

- (C1) Y. Morita, Y. Kominato e K. Shimizu, Mem. Res. Food Sci., Kyoto Univ., 28:1, 1967.
- (C2) C.C.C. Vidigal, K. Zinner, N. Durán, E.J.H. Bechara e G. Cilento, Biochem. Biophys. Res. Commun., 65:138, 1975.
- (C3) C.C.C. Vidigal, A. Faljoni-Alário, N. Durán, K. Zinner, Y. Shimizu e G. Cilento, Photochem. Photobiol., 30:195, 1979.
- (C4) N. Durán, J.E. Brunet e H. Gallardo, Biochem. Educ., 12:173, 1984.
- (C5) R.F. Chen, em "Fluorescence Techniques in Cell Biology", (A.A. Thaer e M. Serntz, eds.), Springer-Verlag, N.Y., pag. 273 (1973).
- (C6) F.C. Chignell, em "Methods in Pharmacology. Physical Methods", (F.C. Chignell e A. Schwartz, eds.), Merediyh Corporation, N.Y., vol. 2, pag. 33 (1972).
- (C7) A.A. Lamola, S.E. Braslavsky, K. Schaffner e D.A. Lightner, Photochem. Photobiol., 37:263, 1983.
- (C8) G. Blauer e G. Wagniere, J. Am. Chem. Soc., 97:11949, 1975.
- (C9) N. Durán, S.T. Faria-Furtado, A. Faljoni-Alário, A. Campa, J.E. Brunet e J. Freer, J. Photochem., 25:285, 1984.
- (C10) N.E. Krinsky, em "Singlet Oxygen in Organic Chemistry", (H.H. Wasserman e R.W. Murray, eds.), Academic Press, N.Y., vol. 40, pag. 162 (1979).
- (C11) C.S. Foote, B. Ranby e J.F. Rabek (eds.), em "Singlet Oxygen, Reactions with Organic Compounds and Polymers", Wiley, N.Y., pag. 135 (1978).
- (C12) F.R. Hallett, B.P. Hallett e W. Snipes, Biophys. J., 10:305, 1970.

- (C13) I. Rosenthal e J.N. Pitts, *Biophys. J.*, 11:963, 1971.
- (C14) J. Cadet e R. Teoule, *Photochem. Photobiol.*, 28:661, 1978.
- (C15) M.P. De Mello, Tese de Doutorado, UNICAMP (1982).
- (C16) S.T. Faria-Furtado, Tese de Mestrado, UNICAMP (1982).
- (C17) S. Lewin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 113:584, 1966.
- (C18) A. Schothorst, D. Suurmond e R. Schoten, *Photochem. Photobiol.*, 38:659, 1983.
- (C19) D.P. Ringer, S. Burchett e D.E. Kizer, *Biochemistry*, 17:4818, 1978.
- (C20) D.P. Ringer, B.A. Howell e D.E. Kizer, *Anal. Biochem.*, 103:337, 1980.
- (C21) M.D. Topal e J.R. Fresco, *Biochemistry*, 19:5531, 1980.
- (C22) C. Formoso, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 53:1084, 1973.
- (C23) A. Rudman, S. Paoletti e H.G. Brittain, *Inorg. Chem.*, 24:1285, 1985.
- (C24) D.P. Ringer, J.L. Etheridge e D.E. Kizer, *J. Inorg. Biochem.*, 24:137, 1985.
- (C25) L.A. Guillo, Tese de Mestrado, UNICAMP (1982).
- (C26) L.H. Innocentini-Mel, Tese de Mestrado, UNICAMP (1981).
- (C27) C.W. Huang e M.P. Gordon, *Photochem. Photobiol.*, 15:493, 1972.
- (C28) A. Faljoni, M. Haun, M.E. Hoffmann, R. Meneghini, N. Durán e G. Cilento, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80:490, 1978.
- (C29) R. Meneghini e M.E. Hoffmann, *Biochim. Biophys. Acta*, 608:167, 1980.
- (C30) M.P. De Mello, S.M. De Toledo e N. Durán, *Acta sud Amer de Quím*, 1:135, 1981.
- (C31) T.W. Bednar, E.M. Linsmaier-Bednar e C.M. King, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72:761, 1976.
- (C32) M.P. De Mello, S.M. De Toledo, H. Aoyama, H.K. Sarkar, G. Cilento e N. Durán, *Photochem. Photobiol.*, 36:21, 1982.

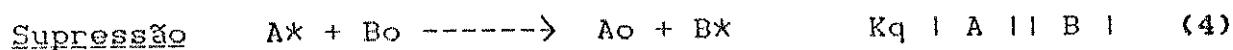
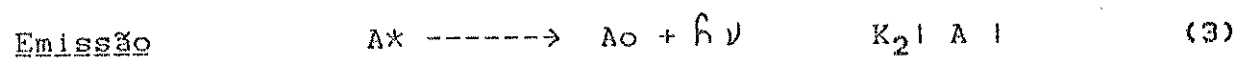
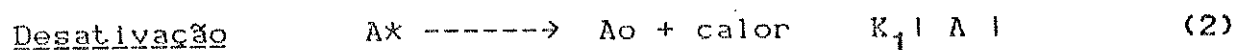
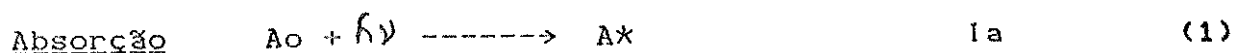
- (C33) E.J. Ward, *Biochemistry*, 24::5803, 1985.
- (C34) N.Houba-Herlin, C.M.Calberg-Bacq, J.Piette e A.Van de Vorst, *Photochem.Photobiol.*, 36:297, 1982.
- (C35) S.A.Bezman, P.A.Burtis, T.P.Izod e M.A.Thayer, *Photochem.Photobiol.*, 28:325, 1978.
- (C36) A.P.Schaap, A.L.Thayer, G.R.Faler, K.Goda e T.Kimura, *J.Am. Chem.Soc.*, 96:4025, 1974.
- (C37) H.B.Dunford e J.S.Stielman, *Coord.Chem.Rev.*, 19:187, 1976.
- (C38) B.Halliwel, *Bull.Europ.Physiopath.Resp.*, 17:21, 1981.
- (C39) R.M.Arneson, *Arch.Biochem.Biophys.*, 136:352, 1970.
- (C40) R.Nilsson, P.B.Merkel e D.R.Kearns, *Photochem.Photobiol.*, 16:117, 1972.
- (C41) I.B.C.Matheson, R.D.Etheridge, N.R.Kratowich e J.Lee, *Photochem.Photobiol.*, 21:165, 1975.
- (C42) K.E.Van Holde, em "Bioquímica Física", (A.M.S.Melo, trad.), Edgard Blucher, pag.159 (1975).
- (C43) J.Tsi Yang e T.Samejima, em "Progress in Nucleic Acid Res. Mol.Biol.", (J.N.Davidson e W.E.Cohn, eds.), Academic Press, N.Y., vol.9, pag.223 (1969).
- (C44) K.E.Van Holde, J.Brahms e M.Michelson, *J.Mol.Biol.*, 12:726, 1965.
- (C45) S.Udenfriend e P.Zaltzman, *Anal.Biochem.*, 3:49, 1962.
- (C46) J.G.Peak, M.J.Peak, R.S.Sikorski e C.A.Jones, *Photochem.Photobiol.*, 41:295, 1985.

APENDICES

APENDICE I

Cálculo da Constante de "Stern-Volmer" (1)

Uma maneira de determinarmos as constantes de velocidade de reações bimoleculares de um estado excitado, é medir a competição entre o decaimento unimolecular e a supressão bimolecular. Como exemplo, consideremos o seguinte esquema:

Velocidades

onde I_a = velocidade de absorção de luz ou velocidade de formação de A (singlete ou triplete).

K_1 = constante de velocidade específica para desativação térmica de A.

K_2 = constante de velocidade específica para emissão de A.

K_q = constante de velocidade específica para transferência de energia de A para B.

Assumindo que o estado estacionário seja alcançado em $| A |$, teremos:

$$\frac{d[A^*]}{dt} = 0 = I_a - (K_1 + K_2 + K_q [B]) [A^*] \quad (5)$$

ou

$$I_a = (K_1 + K_2 + K_q [B]) [A^*] \quad (6)$$

Os rendimentos quânticos para emissão de A, na ausência e na presença de B, são dados respectivamente por:

$$I_0 = \frac{K_2 [A^*]}{I_a} = \frac{K_2}{K_1 + K_2} \quad (7)$$

$$I_n = \frac{K_2 [A^*]}{I_a} = \frac{K_2}{K_1 + K_2 + K_q [B]} \quad (8)$$

Dividindo-se (7) por (8), chegaremos à expressão:

$$\frac{I_0}{I_n} = 1 + \frac{K_q [B]}{K_1 + K_2} \quad (9)$$

Lembrando que a vida média da espécie excitada, na ausência de B, é dada por:

$$\tau = \frac{1}{K_1 + K_2} \quad (10)$$

Podemos substituir (10) por (9) e chegaremos assim à expressão conhecida de "Stern-Volmer":

$$\frac{I_0}{I_n} = 1 + K_q \tau [B] \quad (11)$$

onde Kq também pode ser expresso por Ksv e $|B|$ representa a concentração de supressor.

Recentemente, Durán e col. (2) demonstraram que a equação (11) deve ser rerranjada para os casos onde a emissão de um sistema é proveniente de $^1O_2^*$, $^1O_2^*$ ($^1\Delta g$, $^1\Delta g$). Nestes casos teremos:

$$I_0 = 1 + 2 Kq \tau |B| \quad (12)$$

In

Na prática, calculamos o Ksv ou $Kq\tau$, através do gráfico da cinética de emissão de um sistema na presença de diferentes concentrações de supressor. Assim, teremos:

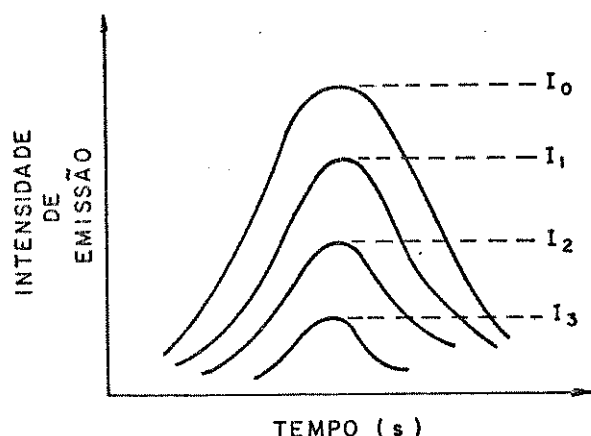


Figura I.1 - Gráfico da cinética de emissão de um sistema, na ausência e na presença de diferentes concentrações do supressor $|B|$, onde:

I_0 = intensidade máxima de emissão do sistema na ausência de supressor.

I_1 , I_2 e I_3 = intensidades máximas de emissão do sistema na presença de diferentes concentrações $|B|$ de supressor.

Se aplicarmos agora a equação (11), podemos construir um gráfico, como na figura 1.2;

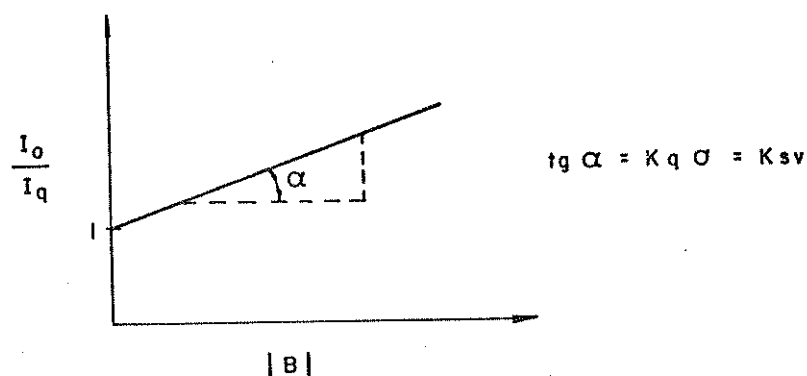


Figura 1.2 - Gráfico Stern-Volmer simbolizando a supressão de emissão de um sistema para diferentes concentrações do supressor $|B|$.

O valor da constante de Stern-Volmer é dado pelo coeficiente angular da reta.

Em alguns sistemas, a emissão é de baixa intensidade, o que nos leva a integrar a área sob cada curva. De modo geral, teremos o gráfico da figura 1.3, de onde escolhemos o valor de I_0 , I_1 , I_2 e I_3 referentes a um mesmo tempo X e a seguir construímos o gráfico de Stern-Volmer tal como explicado na figura 1.2.

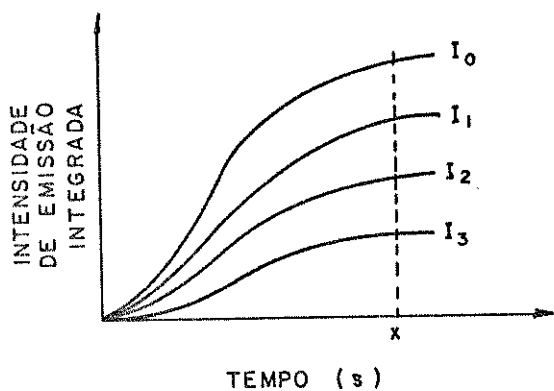


Figura 1.3 - Gráfico da cinética de emissão integrada de um sistema, na ausência e na presença de diferentes concentrações do supressor I B I.

Referências

- (1) N.J. Turro (ed.), "Molecular Photochemistry", Benjamin, N.Y., pag.94 (1967).
- (2) N. Durán, S.T. Farla-Furtado, A. Faljoni-Alário, A. Campa, J.E. Brunet e J. Freer, J. Photochem., 25:285, 1984.

APENDICE II

Método da Constante de Associação-Dissociação HRP-Bil. (1)

Faz-se uma titulação fluorescente com concentração fixa de Bil., variando-se a concentração de HRP até onde não mais se observe a variação da intensidade de fluorescência do triptofano em 330 nm, como ilustrado na figura II.1.

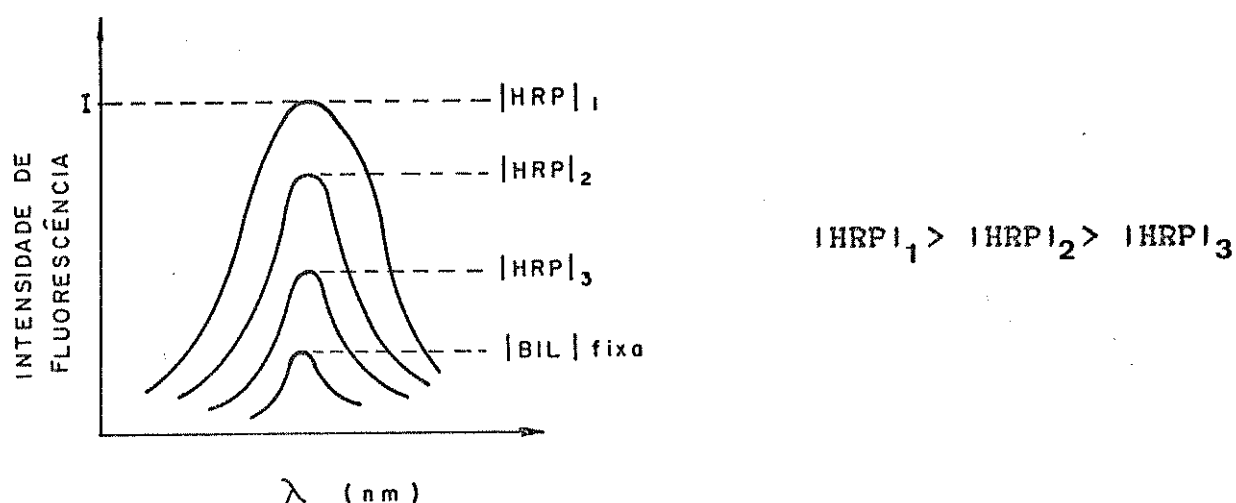


Figura II.1 - Curva de titulação de uma concentração fixa de Bil. com diferentes concentrações de HRP.

Denominando-se a intensidade de fluorescência neste ponto de 1, calcula-se a constante de proporcionalidade p :

$$p = \frac{|Bil|_{fixa}}{1} \quad (1)$$

Tendo-se o valor de p , faz-se agora uma segunda titulação, como mostra a figura II.2, onde a concentração de HRP é fixa em relação à 1, e varia-se a concentração de Bil., (figura II.2).

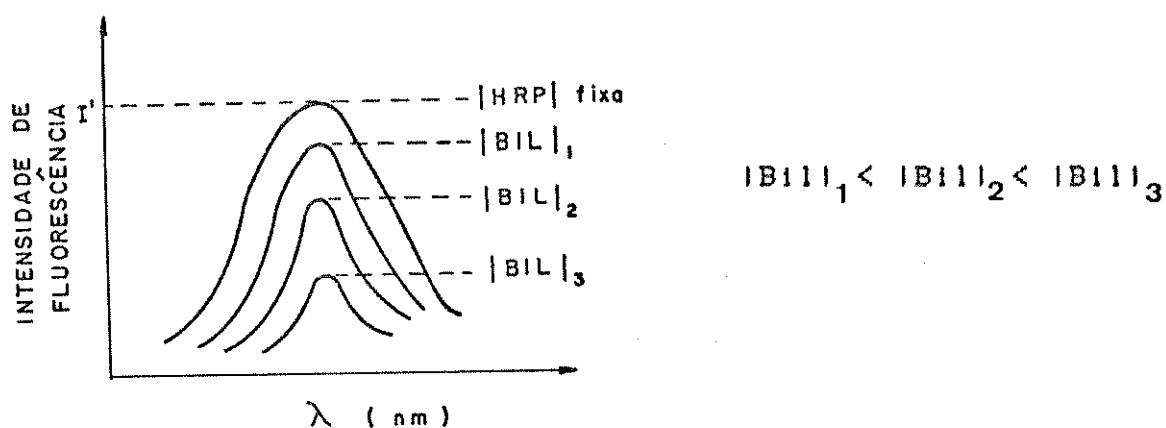


Figura 11.2 - Curva de titulação de uma concentração fixa de HRP com diferentes concentrações de Bil.

Sabendo-se a intensidade I' relativa a cada concentração de Bil. utilizada, pode-se calcular agora a concentração de Bil. ligada:

$$|Bil| = p \times I' \quad (2)$$

A concentração de Bil. livre será dada por:

$$|Bil| \text{ livre} = |Bil| \text{ fixa} - |Bil| \text{ ligada} \quad (3)$$

Referência

- (1) G. Scatchard, J. S. Coleman e A. L. Shen, J. Am. Chem. Soc., 79:12, 1957.

APENDICE III

Dicroísmo Circular (CD)

Se passarmos luz circularmente polarizada através de uma substância opticamente ativa, descobriremos que a absortividade depende do sentido da polarização da luz, se horário ou anti-horário. Algumas faixas de absorção podem absorver mais intensamente o feixe circularmente polarizado à esquerda, outros podem fazer o contrário. Define-se o dicroísmo circular a um dado comprimento de onda, como $\Delta \epsilon = \epsilon_e - \epsilon_d$, ou seja, a diferença em coeficientes de extinção. Uma vez que a luz incidente é convertida em luz elipticamente polarizada ao emergir do meio, nós podemos expressar o CD em termos de elipticidade $|\theta|$, a qual é simplesmente relacionada à diferença em absorção por uma constante de proporcionalidade:

$$|\theta| = 3300 \times (\epsilon_e - \epsilon_d) \quad (1)$$

onde $\epsilon_e - \epsilon_d$ são os coeficientes de extinção molar para os raios de luz da esquerda e da direita, respectivamente. Na prática, calcula-se na maioria das vezes, a elipticidade molar expressa por $|\theta|$, como se segue:

$$|\theta| = \frac{|\theta|_{10}}{10} \times \frac{M}{l \times c'} \quad (2)$$

onde M = peso molecular da substância analisada.

c' = concentração usada na obtenção do espectro.

l = caminho óptico percorrido.

$|\theta|_{10}$ = obtido do próprio gráfico.

Deve-se frisar aqui, que a atividade óptica é observada somente quando o meio em que ocorre uma transição é assimétrico. Em macromoléculas, como proteínas, há pelo menos três espécies de assimetria que podem levar à atividade óptica:

1. A estrutura primária pode ser inerentemente assimétrica. Por exemplo, as transições envolvendo elétrons nas vizinhanças dos C de amino ácidos e polipeptídeos, serão opticamente ativas devido à assimetria inerente neste ponto; os C da maioria dos amino ácidos tem quatro substituintes diferentes.

2. As estruturas secundárias de muitos biopolímeros são helicoidais. Isto pode resultar em atividade óptica para transições na espinha dorsal da cadeia ou nos grupos laterais helicoidalmente arranjados.

3. A estrutura terciária de uma macromolécula pode ser tal que um grupo inerentemente simétrico pode ser lançado num meio assimétrico. Por exemplo, as transições envolvendo os elétrons anelares na tirosina são normalmente de baixa atividade óptica, porém, em algumas proteínas globulares, o meio envolvente de uma tirosina enterrada é tal que produz campos elétricos em torno do anel. Estes podem distorcer o deslocamento de elétrons na transição de modo a levarem à uma atividade óptica.

A influência da estrutura secundária helicoidal na atividade óptica, tem recebido até agora as maiores atenções. Como outro exemplo do efeito da estrutura secundária helicoidal sobre a atividade óptica, consideraremos um dímero em que há interação entre os dipolos de transição, como visto na figura III.1. Considerando as transições no plano dos anéis, lembramos que uma única transição no monômero será partida em duas outras no dímero. Os momentos de transição não são coplanares, pois os anéis, embora paralelos, foram girados com relação um ao outro (início da es-

trutura helicoidal). Assim, em qualquer dos modos de oscilação, haverá uma rotação bem como uma translação de carga. Isto quer

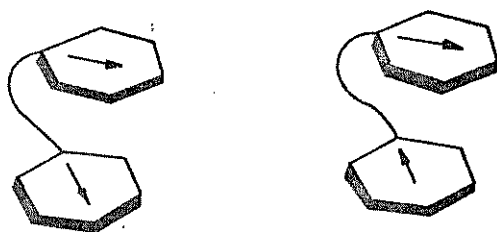


Figura III.1 - Exemplo de um dímero em que as transições eletrônicas nos dois anéis são acopladas. Os anéis são paralelos, mas giram um com relação ao outro (1).

dizer que haverá um dipolo magnético e um elétrico associados a cada modo. Note também que, enquanto num modo os momentos elétrico e magnético estão com a mesma orientação, no outro eles se opõem. Isto resultará em intensidades rotacionais opostas nos dois modos, com $R = -R$. Por conseguinte, o espectro dicróico circular se comportará como na figura III.2.

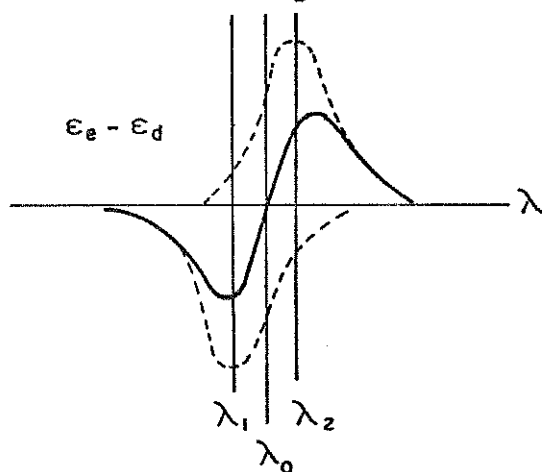


Figura III.2 - Espectro CD esperado para um dímero exibindo um modo de transição em λ_1 e outro em λ_2 (1).

Para hélices maiores, envolvendo maior número de resíduos, cada um girado em relação ao seu vizinho, a partição das transições torna-se mais complexa. Entretanto, a forma das curvas de CD permanece praticamente a mesma. Na figura III.3, vê-se o espectro de CD do ácido polirriboadenílico, comparado com aquele para o dímero e o monômero.

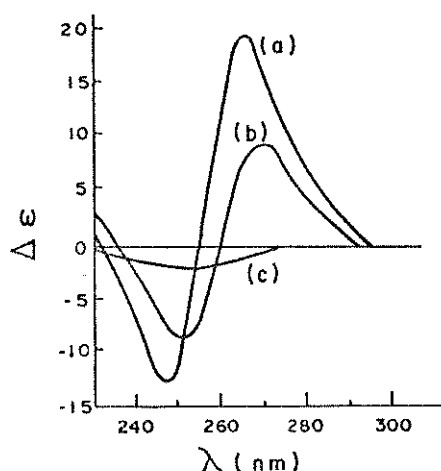


Figura III.3 - Dicroísmo circular do ácido polirriboadenílico(1):

(a) alto polímero.

(b) dímero.

(c) monômero.

Referências

- (1) K.E. Van Holde, em "Bioquímica Física", (Edgard Blucher Ltda, ed.), pag.159 (1975).
- (2) J.T. Yang e T. Samejima, em "Progress in Nucleic Acid Res. Mol. Biol", (J.N. Davidson e W.E. Cohn, eds.), Academic Press, N.Y., vol.9, pag.233 (1975).

APÊNDICE IV

Detecção de estados excitados em sistemas biológicos (1)

Para se detectar a presença de espécies excitadas em reações biológicas, emprega-se vários recursos. Um deles consiste na detecção direta da espécie excitada através de um contador de fótons, com o circuito de coincidência desligado. As espécies triplete, geralmente não emissivas em solução aerada, podem ser detectadas também, desde que se tome a precaução de eliminar o oxigênio do meio.

Outro recurso, consiste em se observar a transferência de energia da espécie excitada para o nível triplete ou singlete de moléculas aceitadoras apropriadas. Quando se desconhece a natureza da espécie emitente, costuma-se usar o 9,10-difenilantreno-2-sulfonato de sódio (DPAS), o qual funciona como aceitador de energia proveniente de um singlete excitado (2). Para tripletes excitados, costuma-se usar o 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio (DBAS) e também rosa bengala e eosina (4). Estes devem absorver na região de fosforescência do doador, isto é, a banda de fosforescência do doador deve penetrar na banda de absorção do aceitador, para que a transferência de energia possa ocorrer. Em certos sistemas não se observa a transferência de energia para certos aceitadores. Neste caso, não se deve concluir que a espécie excitada não tenha sido formada, antes de se procurar algum fotoproduto proveniente de isomerização, dimerização, rearranjo, etc., do estado excitado.

Também bastante útil é o emprego de sistemas modelo. Nestes, a função enzimática é substituída por um solvente aprótico, como o DMSO (dimetil sulfóxido), aerado na presença de base forte

como o terc- butóxi. Estas condições simulariam a ação enzimática. A ocorrência de luz no sistema modelo, nos permite suspeitar que também no sistema enzimático há produção de espécies excitadas, que podem ou não ser emissivas.

Identificação de $^1O_2^*$ (5)

Para se identificar a presença de $^1O_2^*$ numa reação, pode-se fazer uso de várias técnicas, tais como;

1.A análise de produtos:

Difenilfurano	-----	Dibenzoliletieno
Cis- β -caroteno	-----	Trans- β -caroteno
Colesterol	-----	5- α -hidroperóxicolesterol(6-ene)
Guanosina	-----	N(2-desoxi-D-eritropentosil)
uréia		

2.O aumento da vida média da espécie excitada em presença de D_2O (6):

$$\frac{t_{\frac{1}{2}} D_2O}{t_{\frac{1}{2}} H_2O} = 10.$$

3.A inibição por supressores específicos. Os mais usados são: guanosina (7), bilirrubina (8), triptofano (9), histidina (10) e caroteno (11).

4.Emissão monomol característica de $^1O_2^*$ ($^1\Delta_g$) em 1270 nm e emissão bimol de $^1O_2^* \cdot ^1O_2^*$ ($^1\Delta_g \cdot ^1\Delta_g$) em 634 e 703 nm.

5. Supressão da emissão dimol de $^1\text{O}_2$, utilizando-se um supressor de Kq conhecido (por ex: Kq Histidina = $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e Kq Guanosina = $0,86 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) e aplicando-se a equação deduzida por Durán e col. (12), a seguir:

$$\frac{I_0}{I_q} = 1 + 2 K_q \int I Q$$

a qual nos permite calcular a vida média do $^1\text{O}_2$ (13) a qual teoricamente tem o valor de $2 \times 10^{-6} \text{ s}$.

6. Aplicação da técnica de estado estacionário pelo método modificado de Durán e col. (12):

$$\frac{1}{I_0 - I_{A,Q}} = \frac{1}{K_f (^1\text{O}_2)^2} \left\{ (K_f (^1\text{O}_2) + K_d) + \frac{[K_f (^1\text{O}_2) + K_d]^2}{(K_q + K_r)(Q) + K_A(A)} \right\}$$

onde o intercepto é proporcional à

$$[K_f (^1\text{O}_2) + K_d] / K_f (^1\text{O}_2)^2$$

e o coeficiente angular é proporcional à

$$[K_f (^1\text{O}_2) + K_d]^2 / K_f (^1\text{O}_2)^2$$

Logo, uma série de curvas com diferentes concentrações de supressor permite a distinção entre supressor físico e outras alternativas. A incidência do intercepto de $1/(I_0 - I)$ versus $1/(K_q + K_r)(Q) + K(A)$ no mesmo ponto, graficado à diferentes concentrações de supressor, é diagnóstico de supressão de $^1\text{O}_2^*$ e implica que A e Q competem por um intermediário comum.

7. Aumento da emissão na presença de DABCO (14).

8. Transferência de energia para aceitadores adequados.

Referências

- (1) G.Cilento, K.Zinner, E.J.H.Bechara, N.Durán, R.C.De Baptista, Y. Shimizu, O.Augusto, A.Faljoni-Alário, C.C.C.Vidigal, O.M. M.Faria Oliveira e M.Haun, *Ciência e Cultura*, 31:290,1979.
- (2) T.Wilson e A.P.Schaap, *J.Am.Chem.Soc.*, 93:41126,1971.
- (3) C.C.C.Vidigal, K.Zinner, N.Durán, E.J.H.Bechara e G.Cilento, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 65:138,1975.
- (4) N.Durán e G.Cilento, *Photochem.Photobiol.*, 32:113,1980.
- (5) N.I.Krinsky, *Trends Biochem.Sci.*, 2:35,1977.
- (6) P.B.Merkel e D.R.Kearns, *J.Am.Chem.Soc.*, 94:7244,1972.
- (7) J.Cadet e R.Teoule, *Photochem.Photobiol.*, 28:661,1978.
- (8) E.J.Land, *Photochem.Photobiol.*, 24:475,,1976.
- (9) H.H.Wasserman e B.H.Lipshuts, em "Singlet Oxygen", (H.H.Wasserman e R.H.Murray, eds.), Academic Press, N.Y., pag.429 (1979).
- (10) C.S.Foote, em "Free Radicals in Biology", (W.A.Pryor, ed.), Academic Press, N.Y., vol.II, pag.85 (1976).
- (11) R.Nilsson, P.B.Merkel e D.R.Kearns, *Photochem.Photobiol.*, 16:117, 1972.
- (12) N.Durán, S.T.Faria-Furtado, A.Faljoni-Alário, A.Campa, J.E. Brunet e J.Freer, *J.Photochem.*, 25:285,1984.
- (13) C.S.Foote, B.Ranby e J.F.Rabek (eds.), "Singlet Oxygen, Reactions with Organic Compounds and Polymers", Wiley, N.Y., pag.135 1978).
- (14) C.Ouannes e T.Wilson, *J.Am.Chem.Soc.*, 90:6527,1968.

APÊNDICE V

V.1 - Estruturas da bilirrubina

A bilirrubina IX- α possui uma estrutura polar com vários grupos capazes de formar ligações de hidrogênio, isto é, duas carboxilas, dois pirróis NH, duas lactamas NH e dois carbonil lactamas, como mostra a figura V.1:

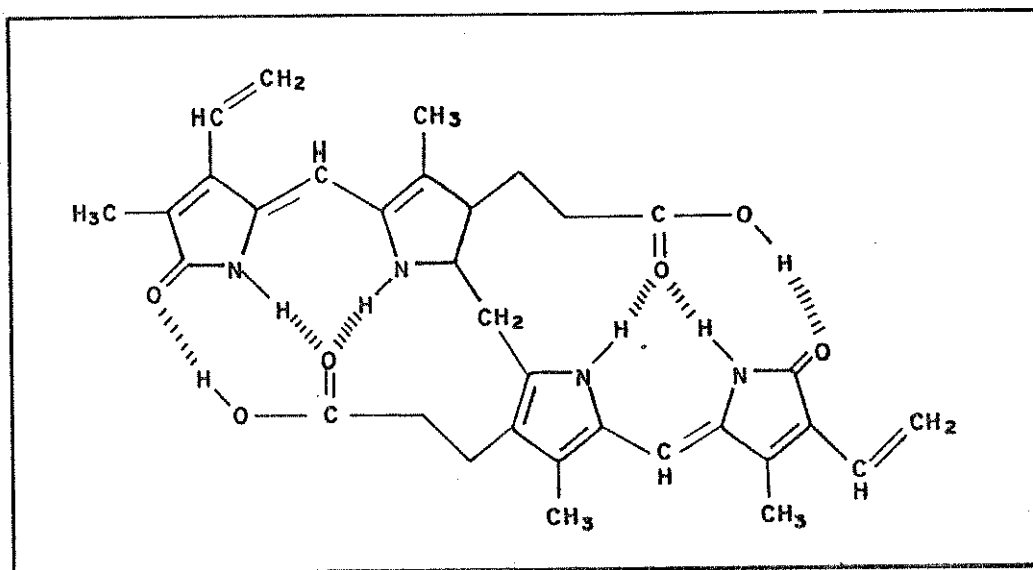


Figura V.1 - Estrutura da bilirrubina IX- α . (1)

Há também vários grupos hidrofóbicos (4 metilas, dois vinil, dois etilenos e 1 metileno), mas estes são pequenos e portanto interferem pouco na forte propriedade hidrofílica dos grupos de ligação de hidrogênio.

A Bilirrubina IX- α ácida, mostra uma baixa solubilidade em água devido às ligações de H intramolecular (1).

Em meio alcalino, os dois prótons carboxílicos são perdidos, e a estrutura é aberta com exposição dos grupos de hidrogênio ligantes .

V.2 - Toxicidade da bilirrubina

A degradação de hemoglobina leva à formação de bilirrubina, um pigmento amarelo que circula no sangue livremente ligado à albumina. Quando alcança o fígado, ele é conjugado com o ácido glucurônico e posteriormente excretado na bile. O recém nascido tem uma capacidade baixa para promover a conjugação e excreção deste pigmento e conseqüentemente apresenta um acúmulo de bilirrubina no plasma sanguíneo (2,3).

Em certos casos, especialmente em bebês prematuros, a hiperbilirrubinemia se desenvolve após o parto e se prolonga, devido ao desenvolvimento atrasado da função excretora. Sob estas circunstâncias, a albumina da circulação pode ser insuficiente para se ligar ao excesso de bilirrubina e assim parte do pigmento é depositado nos tecidos. Nas células, a bilirrubina é ligada às membranas de transporte de enzima, tal como as do mitocôndria, e deste modo impede a função celular. Na prática clínica, o efeito neurotóxico exercido em áreas especiais do cérebro recém-nascido, é muito importante e leva, em casos extremos, à paralisia cerebral ou surdez. Outros danos mais suaves podem ser observados em vida, como o lento desenvolvimento da coordenação senso-motora interferindo no aprendizado escolar (4,5).

Em resumo, algumas experiências feitas, levam a crer que o mecanismo de ação tóxica se produz em duas etapas:

a. A altas concentrações de Bil., ela pode inibir enzimas respiratórias ligadas à membrana mitocondrial tais como citocromo-C oxidase, NADH_2 -oxidase, succinato oxidase e outras (6). Além disso, a lipossolubilidade da Bil. favorece sua fixação sobre a membrana, distorcendo a seletividade osmótica desta e induzindo uma absorção inespecífica de eletrólitos para o interior do mitocôndria

(7);

b. A baixas concentrações, a Bil. se liga a algum cátion essencial para o controle respiratório (supostamente Mg^{++}), situado na membrana mitocondrial, criando um complexo não dissociado e induzindo uma perda do controle da respiração celular.

V.3 - Fototerapia

Em 1958, Cremer, Perryman e Richards (8) observaram que a concentração de Bil. do plasma, diminuiu após aplicação de luz azul à pele do recém-nascido com icterícia. Desde então a fototerapia foi universalmente aceita e utilizada com muito sucesso. A partir de então, a ciência se dedicou aos estudos mais detalhados sobre os mecanismos de eliminação de Bil. na presença de luz.

Alguns pesquisadores (9,10,11) demonstraram que a Bil. pode degradar-se por fotooxidação, *in vitro*, onde o oxigênio excitado singlete participa deste mecanismo, abaixo indicado:

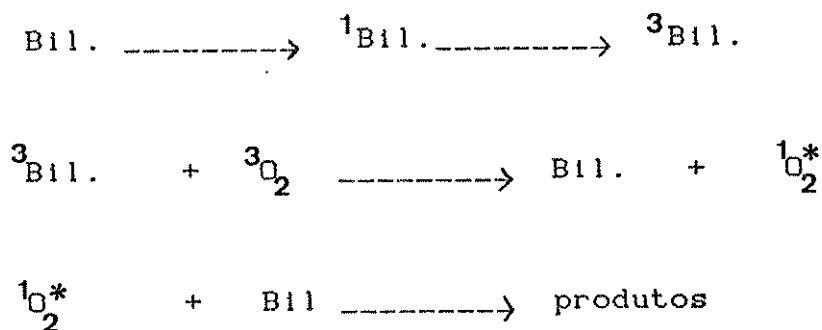


Figura V.2 - Fotooxidação de bilirrubina. (9,10,11)

Segundo McDonagh (12), o principal passo nesta reação envolve a adição auto-sensibilizada de ${}^1\text{O}_2^*$ aos grupos meteno que formam ponte na Bil. não conjugada, dando origem ao intermediário dioxetânico como vimos anteriormante. Lightener (13) em seu tra-

balho sugeriu algumas reações possíveis de Bil. com $^1O_2^*$, baseado nas tres reações conhecidas desta espécie com substratos orgânicos, como já visto anteriormente. As várias possibilidades indicadas para a formação de um intermediário são observadas na figura V.3 .

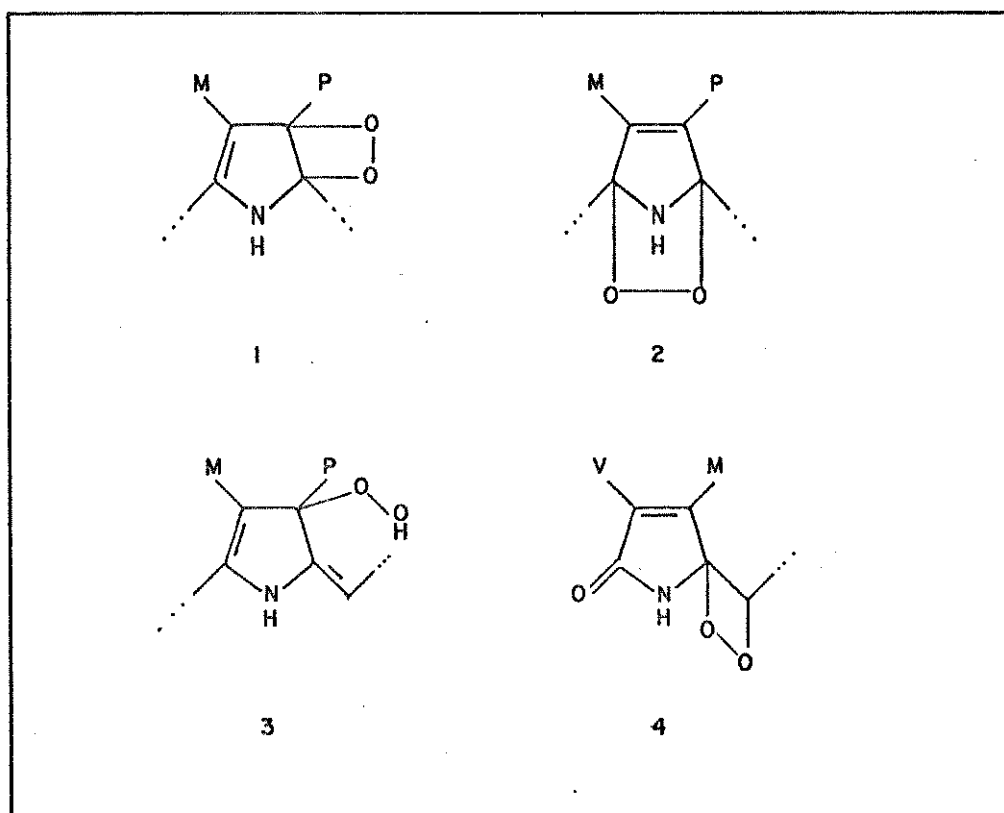


Figura V.3 - Intermediários de bilirrubina na presença de oxigênio singleto. (13)

Entretanto, em 1978, McDonagh e Ramonas (14), sugeriram a possibilidade da fotoisomerização ser o mecanismo principal da fototerapia (15), sendo atualmente o mais aceito (16,17) . Segundo estas pesquisas, sob efeito da irradiação, a Bil. se converte em fotoisômeros hidrossolúveis, os quais se conjugam facilmente com a albumina do plasma e posteriormente são excretados na bile.

A figura V.3 ilustra os fotoisômeros configuracionais da Bilirrubina XI- α , onde o isômero 1(Z,Z) é o composto nativo, os isômeros 2 e 3 são os fotoisômeros instáveis(E,Z) e o composto 4 é o fotoisômero estável(E,E), (figura V.4).

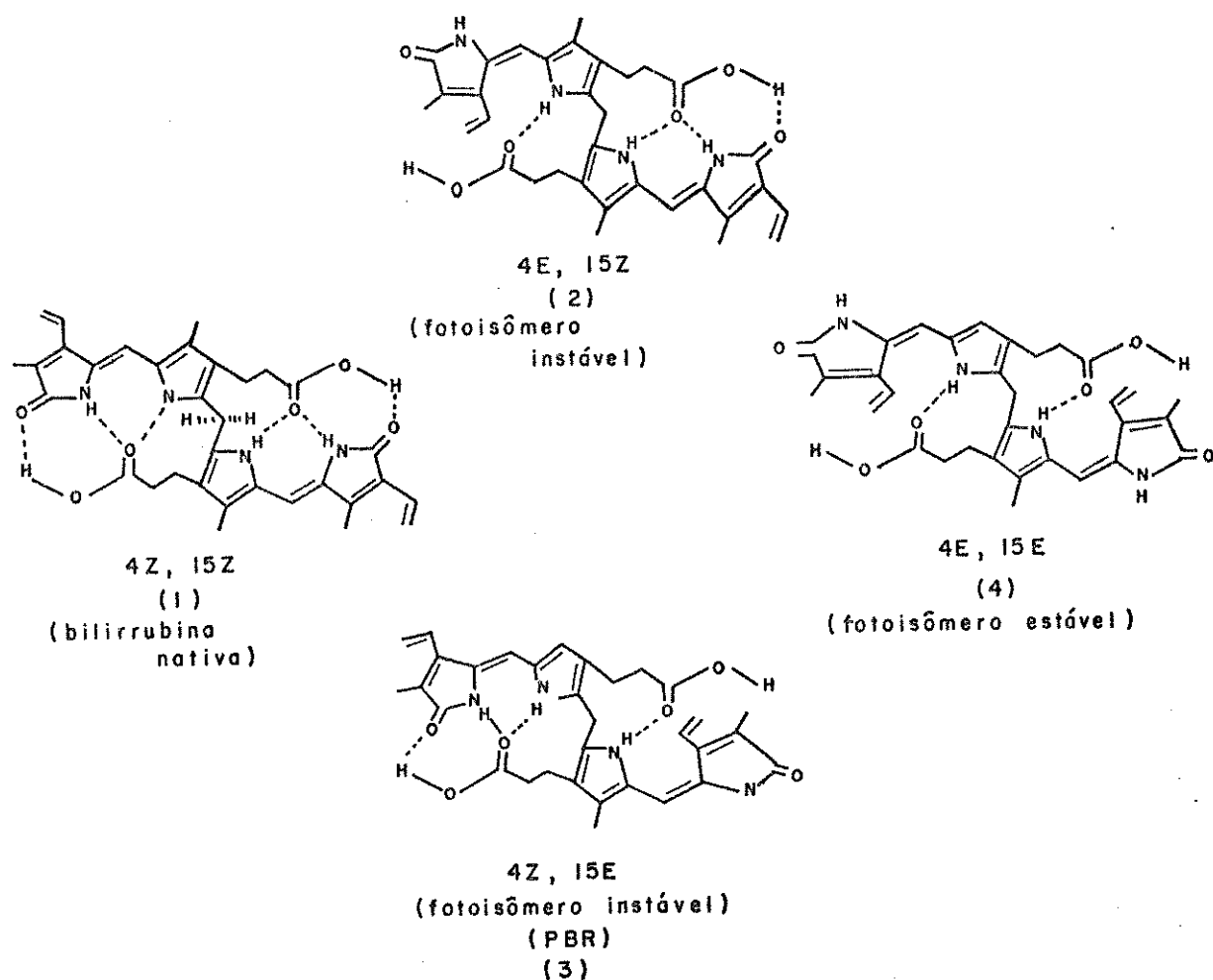


Figura V.4 - Fotoisômeros configuracionais da bilirrubina IX- α .
(16,17).

REFERENCIAS

- (1) L. Strebel e G. B. Odell, *Pediatr. Res.*, 5:548, 1971.
- (2) J. Fog e G. Jellum, *Nature (London)*, 198:88, 1963.
- (3) G. B. Odell, *Pediatrics*, 46:16, 1970.
- (4) C. S. Foote, *Science*, 162:963, 1968.
- (5) R. Day, *Pediatrics*, 17:925, 1956.
- (6) W. Cowger, R. Igo e R. Labbe, *Biochemistry*, 4:2763, 1965.
- (7) M. Justafá, M. Cowger e T. King, *J. Biol. Chem.*, 244:6403, 1969.
- (8) R. J. Cremer, P. W. Perryman e D. H. Richards, *Lancet*, 1:1094, 1958.
- (9) R. Bonnett, *Biochem. Soc. Trans.*, 4:222, 1976.
- (10) C. S. Foote e Ta-Yen Ching, *J. Am. Chem. Soc.*, 97:6209, 1975.
- (11) E. J. Land, *Photochem. Photobiol.*, 24:475, 1976.
- (12) A. F. McDonagh, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44:1306, 1971.
- (13) D. A. Lightner, em "Phototherapy in The Newborn: An Overview",
(G. B. Odell, R. Schaffer e A. P. Simopoulos, eds.), *Nat. Acad. Sci.*,
Washington, pag. 34 (1974).
- (14) A. F. McDonagh e L. M. Ramonas, *Science*, 201:825, 1972.
- (15) A. F. McDonagh, L. A. Palma e D. A. Lightner, *Science*, 208::145, 1980.
- (16) J. D. Ostrow, *J. Clin. Invest.*, 50:707, 1971.
- (17) H. T. Lund e J. Jacobsen, *J. Pediatr.*, 85:262, 1974.

APENDICE VI

Muitos complexos de íons metálicos absorvem radiação UV/visível, mas poucos emitem uma pequena fração da energia absorvida na forma de fótons UV ou visível, devido à fácil desexcitação não radiativa que compete eficientemente com os modos não radiativos. Os íons lantanídeos trivalentes, simbolicamente Ln(III) e seus complexos, tem seus estados excitados mais baixos, compreendendo as configurações $4f$. Os orbitais $4f$ são fortemente protegidos do ambiente e pouco envolvidos em ligações. A extensão total do espalhamento do campo ligante de um elétron f é raramente maior que 100 cm^{-1} e como consequência, os processos de desexcitação sem radiação em complexos Ln(III) são relativamente ineficientes, e a emissão da radiação como luminescência é capaz de competir em muitos casos (1).

O básico para entendimento da luminescência de qualquer Ln(III) , principalmente de Tb(III) sobre o qual estamos interessados, é o próprio diagrama de seus níveis de energia. A figura VI.1 abaixo mostra os primeiros níveis de energia para o íon Tb(III) :

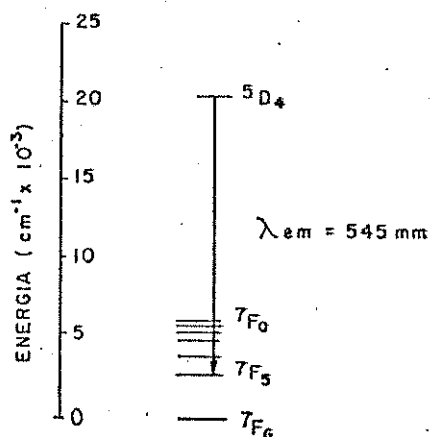


Figura VI.1 - Diagrama de energia para o íon Tb(III)

Dos Ln(III) , o Tb(III) e o Eu(III) tem razoavelmente grandes diferenças de energia e emitem fortemente na região visível.

vel do espectro.

Nossa atenção durante este trabalho, foi dirigida ao íon $Tb(III)$ e sua interação com ácidos nucleicos, preferencialmente com o DNA. Muitos estudos de luminescência de $Ln(III)$ com nucleotídeos monoméricos, foram conduzidos juntamente com pesquisas de polímeros de ácidos nucleicos. Ringer e col. (2) e Topal e Fresco (3), estudaram a extensão do aumento de luminescência de $Tb(III)$ pelos mononucleotídeos e polímeros de ácidos nucleicos. Suas principais conclusões foram que as bases guanina são muito mais eficientes que as outras bases na transferência de energia sensibilizada na emissão do $Tb(III)$. Formoso (4) já tinha chegado às mesmas conclusões quando verificou que GMP e DGMP eram os mais eficientes em aumentar a luminescência de $Tb(III)$ e que a eficiência era maior ainda nos polímeros que nos dímeros. Ringer e col. (2), em uma estudo da luminescência aumentada de $Tb(III)$ na presença de DNA e rRNA de fígado de rato, concluíram que apenas os nucleotídeos contendo guanina aumentavam com eficiência esta luminescência. Estudos envolvendo comparações de homopolímeros contendo os quatro ribinucleotídeos, mostraram que apenas o poli (G) atuou como um forte aumentador da luminescência do íon $Tb(III)$. Modificações químicas dos resíduos guanina abolem o aumento da luminescência do $Tb(III)$ induzida pelos mesmos, fornecendo um meio conveniente de monitorar tais modificações. Ringer e col (5) e Topal e Fresco (3), descobriram independentemente que o $Tb(III)$ é uma sonda seletiva para regiões de fita simples (resíduos de bases não pareadas dos ácidos nucleicos). Ainda, Ringer e col (5), observaram que a desnaturação térmica do DNA de fígado de rato potencializou sua habilidade em aumentar a luminescência de $Tb(III)$, mais que 10 vezes.

Trabalho recente de Ringer e col.(6), faz uso destas propriedades do complexo DNA-Tb(III) para sondar modificações em DNA provenientes do uso de drogas antitumor.

REFERÊNCIAS

- (1) S.J.Lippard (ed.), "Progress in Inorganic Chemistry", Wiley, N.Y., vol:31, pag.5(1984).
- (2) D.P.Ringer, S.Burchett e D.E.Kizer, Biochemistry, 17:4818, 1978.
- (3) M.D.Topal e J.R.Fresco, Biochemistry, 19:5531, 1980
- (4) C.Formoso, Biochem.Biophys.Res.Comm., 53:1084, 1973.
- (5) D.P.Ringer, B.A.Howell e D.E.Kizer, Anal.Biochem., 103:337, 1980.
- (6) D.P.Ringer, J.L.Etheridge e D.E.Kizer, J.Inorg.Biochem., 24:137, 1985.

ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O PERÍODO DE PESQUISA.

Publicações

- (1) N.Durán, Y.Makita e L.H.Innocentini, "Peroxidase Activity in Humam Red Cell Membranes: a Biological Model for Excited States Generation", *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 88:642,1979.
- (2) L.H.Innocentini, S.M.De Toledo e N.Durán, "Oxidation of Glutathione and Cysteine by Horseradish Peroxidase", *An.Acad. Brasil.Ciênc.*, 52:691,1980.
- (3) L.H.Innocentini e N.Durán, "Estudos em Fotobioquímica: Geração de Estados Excitados pelo Ácido Fólico Oxidase em Eritrócitos (Resumo)", *Arq. Biol.Tecnol.*, 23:167,1980.
- (4) N.Durán, S.T.Faria-Furtado, M.P.De Mello, L.H.Innocentini, S.M.De Toledo e J.E.Brunet, "Geração de Oxigênio Singlete em "Oxidações Aeróbicas Catalizadas pela Peroxidase" (Resumo), *Ciência e Cultura*, 33:797,1981.
- (5) N.Durán e L.H.Innocentini, "Degradação de Ácido Fólico por Peroxidase" (Resumo), *Química Nova*, 4:18,1981.
- (6) G.Gisler, L.H.Innocentini e N.Durán, "Inativação de Xantina Oxidase pelos Catabólitos do Ácido Fólico em Células Cancero sas" (Resumo), *Química Nova*, 4:22,1981.
- (7) L.H.Innocentini e N.Durán, "Human Red Blood Cell Membrane Oxidase and Horseradish Peroxidase Cleavage of Folic Acid: Evidence for Formation of Singlet Oxygen", *Brazilian J.Med.Biol. Res.*, 15:11,1982.
- (8) L.H.Innocentini e N.Durán, "Degradação de Bilirrubina na Interação com o sistema Ácido Fólico/Ácido Fólico Oxidase" (Resumo), *Arq.Biol.Tecnol.*, 25:151,1982.
- (9) L.H.Innocentini, A.Faljon-Alário e N.Durán, "Parâmetros Foto

bioquímicos de Bilirrubina no Sistema Ácido Fólico/Peroxidase/
O " (Resumo), Arq.Biol.Tecnol., 26:219,1983.

(10)A.Faljoni-Alário, L.H.Innocentini e N.Durán, "Estudos Confor
macionais de Bilirrubina Quando Complexada com Peroxidase"
(Resumo), Arq. Biol.Tecnol., 26:248,1983.

(11)N.Durán, M.P. De Mello, M.C.Marcucci, L.H.Innocentini, L.C.C.
Leite e A.Faljoni-Alário,em"tRNA and DNA Transformations by
Biophotoenergised Molecules Generated by HRP Catalysed Oxi
dation of Indole-3-aldehyde", em preparação.

Participação em Congressos

- (1) H. Innocentini e N. Durán, "Estudos em Fotobioquímica: Geração de Estados Excitados pelo Ácido Fólico Oxidase em Eritrócitos Humanos", VIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Abril de 1979, Caxambú, M.G., Brasil.
- (2) N. Durán, Y. Makita e L. H. Innocentini, "Peroxidase Activity in Human Red Cells: a 2-Methyl-Propanal and Folic Acid Oxidase", XI Congresso Internacional de Bioquímica, Julho de 1979, Toronto, Canadá.
- (3) N. Durán e L. H. Innocentini, "Degradação de Ácido Fólico por Peroxidase", II Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Química, Novembro de 1980, Araraquara, S.P., Brasil.
- (4) G. Gisler, L. H. Innocentini e N. Durán, "Inativação de Xantina Oxidase por Catabólitos de Ácido Fólico em Células Cancerosas", II Reunião Regional da Sociedade de Química, Novembro de 1980, Araraquara, S.P., Brasil.
- (5) L. H. Innocentini e N. Durán, "Estudos em Fotobioquímica: Geração de Estados Excitados pelo Ácido Fólico Oxidase em Eritrócitos", IX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Abril de 1980, Caxambú, M.G., Brasil.
- (6) N. Durán, S. T. Faria-Furtado, M. P. De Mello, L. H. Innocentini, S. M. De Toledo e J. E. Brunet, "Geração de Oxigênio Singlete em Oxidações Aeróbicas Catalizadas pela Peroxidase", XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Julho de 1981, Salvador, BA, Brasil.
- (7) N. Durán e L. H. Innocentini, "Pterin-6-aldeído: um Metabólito de Células Cancerosas", XIV Congresso Latino Americano de Química, Fevereiro de 1981, San José, Costa Rica.
- (8) L. H. Innocentini e N. Durán, "Degradação de Bilirrubina na Inte

ração com o sistema Ácido Fólico/Ácido Fólico Oxidase", XI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Abril de 1982, Caxambú, M.G., Brasil.

(9) L.H. Innocentini, A. Faljoni-Alário e N. Durán, "Parâmetros Fotoquímicos de Bilirrubina no sistema Ácido Fólico/Peroxidase/O", XII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Abril de 1983, Caxambú, M.G., Brasil.

(10) A. Faljoni-Alário, L.H. Innocentini e N. Durán, "Estudos Conformationais de Bilirrubina Quando Complexada com Peroxidase", XII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Abril de 1983, Caxambú, M.G., Brasil.

(11) L.H. Innocentini-Mel e N. Durán, "Singlet Oxygen Acting on DNA", XV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Maio de 1986, Caxambú, M.G., Brasil.