UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

# OXIDAÇÃO QUIMILUMINESCENTE DE BASES DE SCHIFF CATALISADA POR PEROXIDASE: ASPECTOS MECANÍSTICOS E TOXICOLÓGICOS.

TESE DE DOUTORAMENTO

Marisa Helena Gennari de Medeiros

ORIENTADOR

Prof. Dr. ETELVINO JOSÉ HERIQUES BECHARA

SÃO PAULO
1986

Ao Prof.Dr. Etelvino José Henriques Bechara, pela orientação segura e eficiente abordando todos os problemas com sensibilidade e imaginação.

Ao Guilherme,

por estar próximo nos

bons e maus momentos.

AGRADECIMENTOS

- ao Prof. G. Cilento pela colaboração durante a elaboração deste trabalho.
- à Aninha, Ana Lúcia, Miguelito, Roberto (Memê), Adelaide, Pio, Hugo, Majú, Dulcinéia, Cornélia, Lidia, Vani, Karin, Iguatemy, Carmem, Klaus, Carlos Henrique, Divo,Nelson,Caixo, D. Jacyra, Lydia, Helena, Alberto, Yvone, Júlia, pelo convívio diário e amizade.
- à Lilian e ao Lique, pelo carinho e incentivo por cartas.
- à Meire, Vera, Regina, Ignácio, José Antonio, Ricardo, Felipe, Carolina, Rafael, Laura, Patrícia, Nilda e Paloma, pela pouca atenção a eles dedicada durante a elaboração deste trabalho.
- à Wanda, minha mãe, por ter me compreendido.
- ao Francisco Cilento, pelos desenhos e figuras.
- à Carminha, pelo cuidadoso trabalho de datilografia.
- ao CNPq, FAPESP, FINEP, CAPES, OEA e Wolkswagenwerk Stiftung, pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE


Pág.

1. INTRODUÇÃO 1
   1.1. Fotobioquímica 1
   1.2. Fotobioquímica na ausência de luz 3
   1.3. Formação química de estados excitados 6
      1.3.1. Clivagem de peróxidos cíclicos 6
      1.3.2. Transferência de elétrons (Chemically Initiated Electron-Exchange Luminescence, CIEEL) 9
      1.3.3. Transferência de energia triplete de carbonilas excitadas 10
   1.4. Formação enzimática de estados eletronicamente excitados 15
   1.5. Bases de Schiff 21
      1.5.1. Aspectos gerais 21
      1.5.2. Isomerização imina-enamina 22
      1.5.3. Importância biológica e bases de Schiff 22
      1.5.4. Formação de bases de Schiff de aldeídos e proteínas 28
      1.5.5. Quimiluminescência de bases de Schiff 29
      1.5.6. Formação de estados eletrônicos excitados na conversão do triptofano em indolacetamida 30

2. OBJETIVOS 32

3. MATERIAL E MÉTODOS 34
   3,1. Símbolos e abreviações 34
   3.2. Drogas
   3.3. Equipamentos 37
      3.3.1. Medidas de emissão de luz 37
      3.3.2. Espectros de fluorescência 37
      3.3.3. Medidas de consumo de oxigênio 38
      3.3.4. Medidas espectrofotométricas 38
      3.3.5. Espectros de ressonância magnética nuclear de prótons 38

Pág.

3.3.6. Medidas de índice de refração 38
3.3.7. Espectro de infravermelho 38
3.3.8. Termostatização e agitação das misturas de incubação 38
3.3.9. Medidas de concentração hidrogeniônica 39
3.4. Métodos 40
3.4.1. Preparo de reagentes 40
3.4.2. Bases de Schiff de glicolaldeído-aminoácidos 43
3.4.3. Bases de Schiff de glicolaldeído e proteínas 44
3.4.4. Condições de reação da oxidação aeróbica das bases de Schiff 44
3.4.5. Análise dos produtos da reação 44
3.4.6. Determinação do rendimento da reação 45
3.4.7. Cálculo da atividade da enzima superóxido-dimutase (SOD) 45
3.4.8. Métodos analíticos 46

RESULTADOS 50
4. Oxidação aeróbica de isobutilidenoisopropilamina (BPA) 50
4.1. Estudos cinéticos de consumo de oxigênio 50
4.1.1. Efeito da variação de pH, natureza e concentração do tampão 50
4.1.2. Efeito da concentração de HRP 52
4.1.3. Efeito da substituição do HRP por hemina 53
4.1.4. Efeito da concentração de substrato 53
4.2. Estudos cinéticos de emissão de luz 53
4.2.1. Correlação entre o consumo de oxigênio e a emissão de luz 58
4.2.2. Efeito da concentração de substrato na cinética de emissão de luz do sistema 58
4.2.3. Espectro de quiluminescência do produto gerado na reação enzimática 58

Pág.

4.2.4. Transferência de energia 62
4.3. Análise espectrofotométrica 67
4.4. Verificação da possível participação de outras espécies ativas na reação enzimática: $^1O_2$; $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$; $H_2O_2$ e $OH^{\cdot}$ 71
4.5. Análise dos produtos da reação 74
4.6. Cálculo do rendimento da reação 77

5. Estudos comparativos de emissão de luz e consumo de oxigênio dos sistemas: N-Isobutilidenometilamina (i-BMA), N-sec-butilidenometilamina (sec-BMA), N-isobutilideno-L-valina (BVA) e N-(2)-piridilisobutil-imina (PBI) 77
5.1. Cinética de consumo de oxigênio 77
5.2. Cinéticas de emissão de luz 79
6. Estudo da oxidação aeróbica de misturas de incubação de aminoácidos-glicolaldeído 79
6.1. Consumo de oxigênio e emissão de luz 79
6.2. Estudo da reatividade de amino-grupo 87
7. Estudos da oxidação aeróbica de misturas de incubação glicolaldeído/proteínas 90
7.1. Espectro de fluorescência dos adutos glicolaldeído/proteínas 90
7.2. Emissão de luz e velocidade de consumo de oxigênio 90
7.3. Estudos espectrofotométricos 95
7.4. Efeito da concentração de proteína na intensidade máxima de emissão de luz 95
7.5. Transferência de energia para clorofila a solubilizada em micelas 102

8. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES 107
8.1. Bases de Schiff alifáticas 107
8.2. Bases de Shiff derivadas de aminoácidos e proteínas 118

9. SUMÁRIO 130
10. SUMMARY 133
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 136

## PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$A_o$ = Abosrbância no tempo zero (absorbância inicial).

$A_t$ = Absorbância no tempo t.

$A_\infty$ = Absorbância no tempo infinito.

CDNF = Carbonato de 2,4 Dinitrofenila.

AcImz = Acetilimidazol.

CMC = Concentração micelar crítica.

BzImz = Benzoilimidazol.

EIC = Efeito isotópico cinético.

ER = Estado de Reagente.

ET = Estado de Transição.

$k_{obs}$ = Constante de velocidade observada.

$k_{H_2O}$ = Constante de velocidade observada em água/HCl.

$k_{D_2O}$ = Constante de velocidade observada em $D_2O$/DCl.

MI = Micela inversa.

MI's = Micelas inversas.

R = Razão = $[H_2O]/[CTACl]$.

[ ] = Concentração.

# 1. INTRODUÇÃO

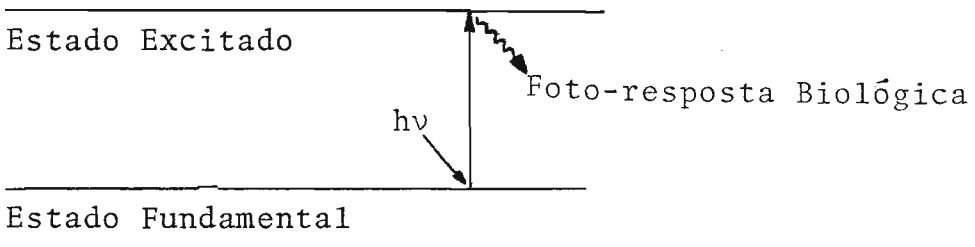
## 1.1. Fotobioquímica

O sol emite radiações eletromagnéticas que atingem a superfície terrestre com um máximo de intensidade na região de 500 nm. A luz solar, como fonte de energia, desencadeia em sistemas biológicos uma série de fenômenos tais como crescimento, desenvolvimento, regulação, levando até ao organismo informações sobre o meio-ambiente. Foto-regulação do crescimento de plantas, fototropismo, fototáxis, fotoperiodismo, visão e ritmos são exemplos de interação da luz visível com sistemas biológicos.

Diversas moléculas biológicas foto-receptoras têm sido caracterizadas e identificadas. A Fig. 1.1. mostra a correlação entre o espectro da luz solar e a resposta espectral de alguns sistemas biológicos (Song, 1983).

A interação da luz (visível e/ou UV) com um foto-receptor biológico envolve a absorção de um fóton que conduz a promoção de um elétron a um estado eletronicamente excitado cuja energia pode ser posteriormente utilizada em sua foto-resposta biológica.

Esquema 1.1.



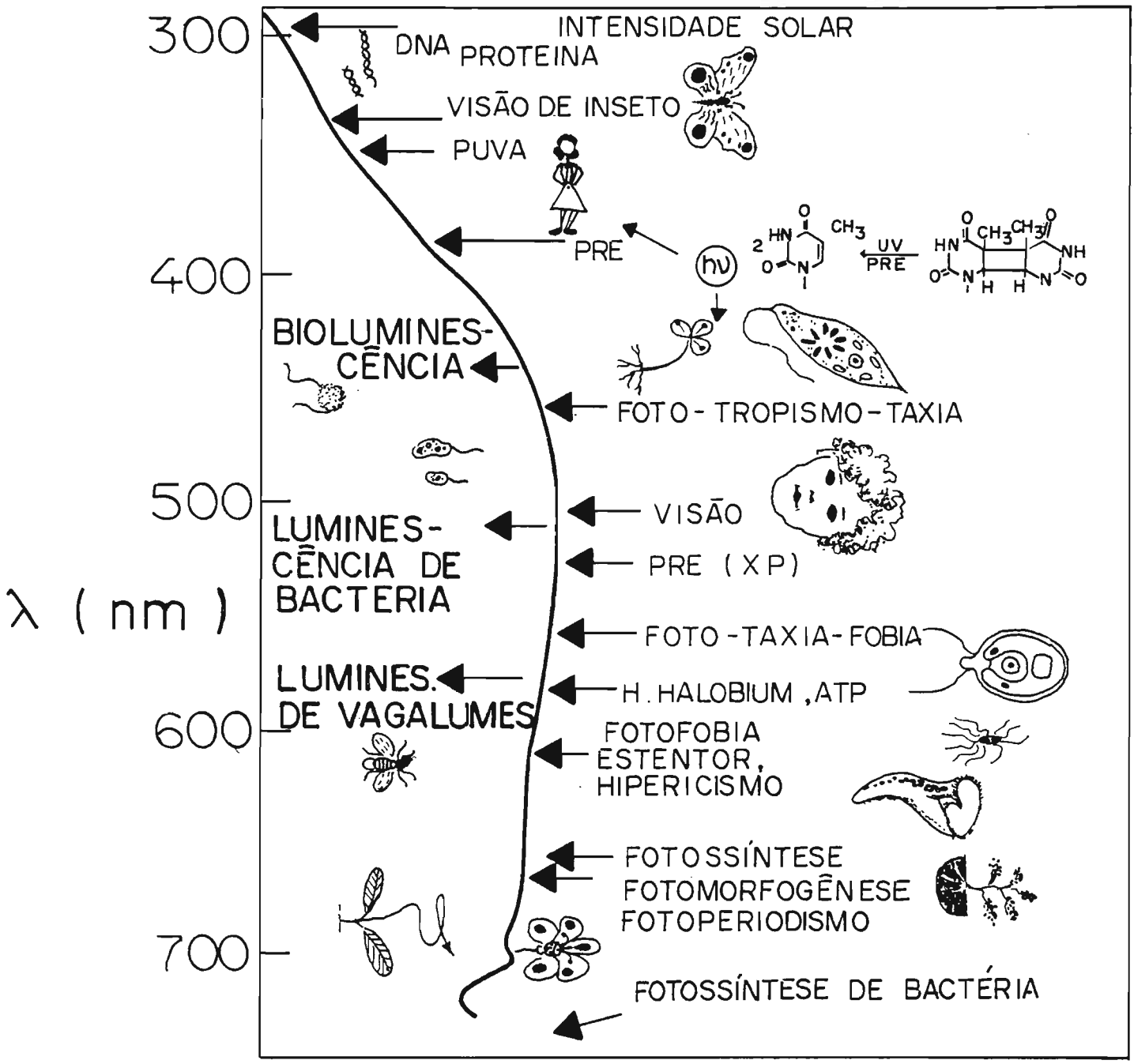



FIGURA 1.1. Curva do espectro fotobiológico sobreposta na curva de distribuição espectral da radiação solar. Abreviações usadas: PUVA, terapia com psoraleno e radiação UV; PRE, enzima de foto-reativação, XP, xeroderma pigmentosum (Song, 1983).

Devemos destacar também a existência de diversos organismos que convertem energia química em energia luminosa, fenômeno este chamado de bioluminescência. A luz emitida por seres vivos é o resultado da desativação radiativa de moléculas eletronicamente excitadas, formadas na oxidação, catalisada por enzimas específicas (luciferases), de determinados substratos (luciferinas).

A bioluminescência e os processos que envolvem a participação da luz em sistemas biológicos são hoje visualizados como parte de um fenômeno mais amplo que é a fotobioquímica.

## 1.2. Fotobioquímica na Ausência de Luz

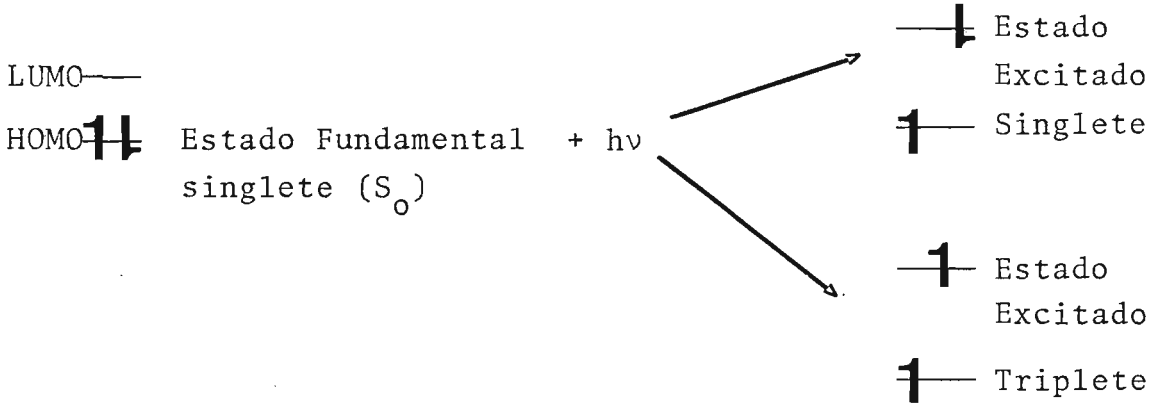
Considerando os diversos efeitos provocados pela luz em sistemas biológicos, é bastante intrigante a ocorrência de transformações fotoquímicas *in vivo*, na ausência de luz. Podemos citar como exemplo: (i) a presença de enzimas do ciclo de Calvin em vermes marítimos que vivem a 2500 metros de profundidade (Morgan, 1981); (ii) a dependência de luz para a ativação de enzimas de reparo de DNA (Sutherland, 1981) e a ocorrência destas enzimas em tecidos não expostos à luz e em animais noturnos (Cook, 1967); (iii) a transformação do alcalóide colchicina em seus lumiderivados, β- e γ-lumicolchicinas, durante a fase escura do desenvolvimento da planta *Colchicum autummale* (Brunetti e colaboradores, 1982); (iv) a presença, em certos peixes, de vitamina D em concentrações muito superiores àquelas esperadas por ingestão de alimentos ou pela quantidade de luz a

eles acessível (Bills, 1927), apesar de se saber que a transformação das pré-vitaminas, ergosterol e 7-dihidrocolesterol, em vitamina D é um processo dependente de luz (Jacobs e Havinga, 1979).

Em 1974, inspirados tanto na bioluminescência quanto nos trabalhos desenvolvidos sobre a química de dioxetanos (item 1.3.1), G. Cilento (1973, 1975, 1980a,b, 1982) e E.W. White (1974), independentemente, propuseram a hipótese de que, em organismos vivos, algumas reações enzimáticas levariam à formação de espécies eletronicamente excitadas ao estado triplete, que poderiam ser utilizadas em processos fisiológicos ou patológicos.

A promoção de um elétron do estado fundamental para um orbital antiligante, pode proporcionar a formação de dois estados eletronicamente excitados: (i) se o elétron promovido mantiver o spin, forma-se o estado singlete, (ii) havendo inversão de spin, forma-se o estado triplete.

Esquema 1.2




(HOMO: "highest occupied molecular orbitals";
LUMO: "lowest unoccupied molecular orbital").

Os estados excitados podem ser considerados isômeros eletrônicos das moléculas no estado fundamental. Uma vez tendo distribuição eletrônica distinta, esses isômeros possuem diferentes estruturas, reatividades e propriedades.

Pelo princípio de exclusão de Pauli, elétrons com spin paralelos não podem ocupar a mesma região do espaço simultaneamente, o que faz com que o estado triplete possua menor energia que o singlete, o qual, por uma vez, devido à maior repulsão eletrônica, forma um estado de maior energia (Turro, 1978).

O estado triplete possui também, maior tempo de vida ($10^{-5}$ s até alguns segundos) que o singlete, uma vez que a emissão $T_1 \rightarrow S_0$ envolve estados de diferentes multiplicidades, sendo portanto tal transição, proibida pela regra de seleção de spin.

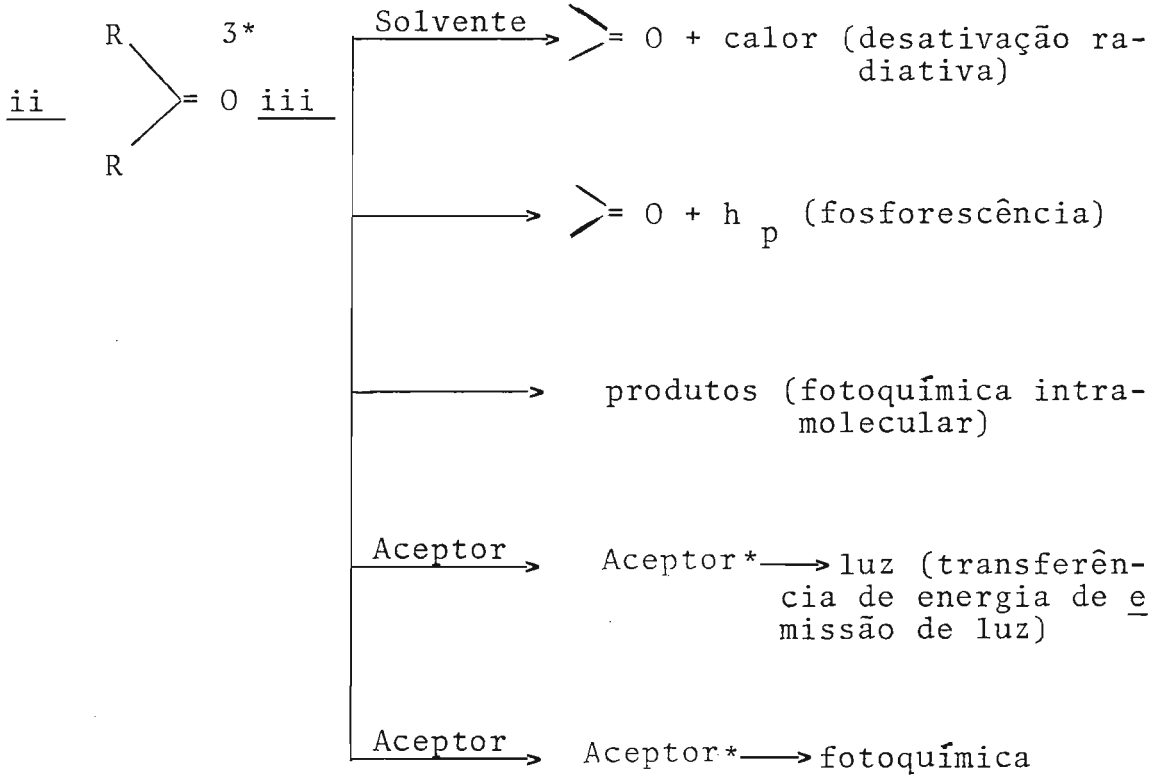
A formação de estados eletronicamente excitados poderia desencadear processos fotoquímicos na ausência de luz ("fotobioquímica e fotoquímica no escuro"). Espécies carbonílicas triplete merecem nesses estudos especial atenção devido ao fato de apresentarem períodos de meia vida intrínseca bastante longos, o que favoreceria suas ações em sistemas biológicos.

Estudos fotoquímicos clássicos com compostos carbonílicos demonstram que, no estado excitado, participam de um largo espectro de reações distintas: isomerização cis-trans, cicloadição a ligações duplas, rearranjos, abstração de hidrogênio intermolecular, oxidação e clivagens Norrish tipo I e II (Turro, 1978).

O conceito de fotobioquímica no escuro pode ser esquematizado da seguinte maneira:

Esquema 1.3

$$\text{Substrato} + O_2(H_2O_2) \xrightarrow[\text{enzima}]{i} |\text{intermediário peroxídico}|$$




(i) etapa de preparação; (ii) etapa de quimiexcitação; (iii) etapa de desativação.

## 1.3. Formação Química de Estados Excitados

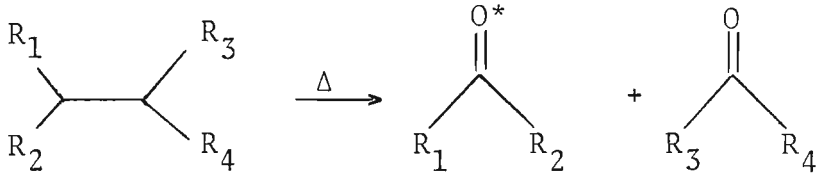
### 1.3.1. Clivagem de peróxidos cíclicos

White e colaboradores (1974), utilizando dioxetanos como fonte química de acetona triplete, conseguiram aco-

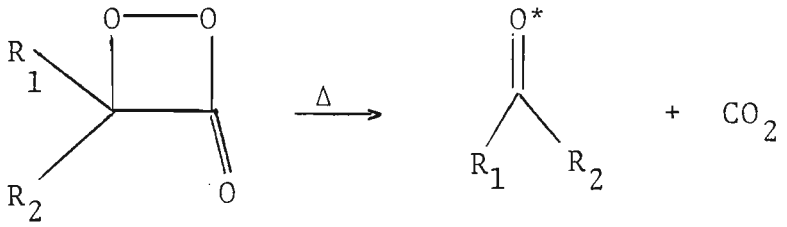
plar a termólise de dioxetanos a processos fotoquímicos no escuro.

Dioxetanos e dioxetanonas são peróxidos cíclicos de anel tetratônico (Kopecky e Munford, 1969), os quais sofrem clivagem térmica produzindo duas moléculas carbonílicas, uma delas no estado eletronicamente excitado (McCapra, 1968).

Esquema 1.4



Dioxetano



Dioxetanona

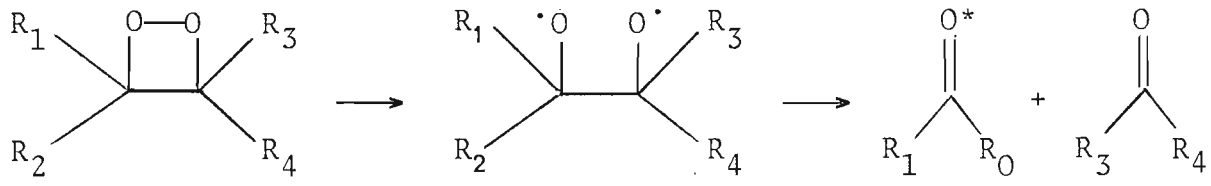
A exotermicidade calculada da termólise de compostos dioxetânicos é da ordem de 80-100 Kcal/mol (Wilson, 1976), enquanto que a excitação de aldeídos e cetonas aos respectivos estados excitados singlete ou triplete requer em geral menos de 85 Kcal/mol (Turro, 1978). Há portanto, possibilidade de popular níveis excitados de um dos seus produtos.

No caso de aldeídos e cetonas alifáticas, a configuração do estado excitado é principalmente $n\pi^*$, isto é,

a excitação resulta da promoção de um elétron não ligante do oxigênio (elétron n) ao orbital anti-ligante $\pi^*$; a energia de excitação fica, assim, localizada na carbonila.

O mecanismo de clivagem dos dioxetanos tem sido bastante discutido. McCapra (1968) postulou que a clivagem de um dioxetano deveria ser "concerted", isto é, a quebra das ligações O-O e C-C ocorrem simultaneamente à formação das carbonilas. Entretanto o mecanismo atualmente mais aceito, uma vez que satisfaz os valores experimentais de $E_a$ de dioxetanos substituídos por grupos alquil, alcoil, acil e homoaril, é o mecanismo via diradical (Horn e colaboradores, 1978, 1979; Adam, 1982)

Esquema 1.5



A termólise de alquil-, fenil- e alcoxi- dioxetanos forma produtos com natureza de excitação eletrônica $n\pi^*$, gerando preferencialmente produtos no estado excitado triplete (Wilson, 1976; Bechara e colaboradores, 1976; Bechara, 1979).

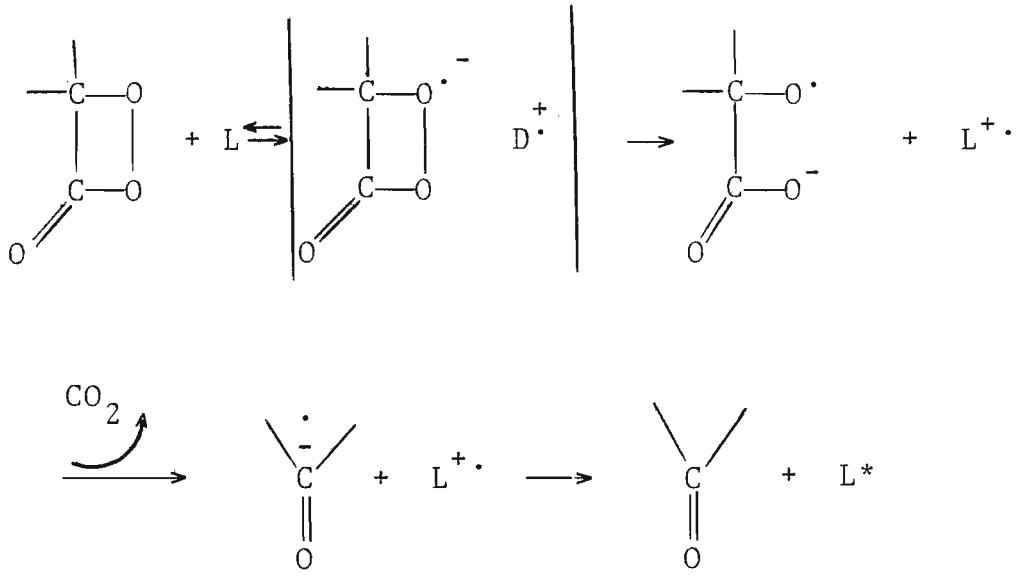
Dioxetanos contendo substitutos heteroaromáticos, ou com substituintes aromáticos policondensados de baixo potencial de oxidação, tem estado excitado de caráter predominantemente $\pi\pi^*$ e produzem preferencialmente estados singletes (Horn e colaboradores, 1978, 1979; Hastings e Wilson, 1976). Tais dioxetanos tem sido propostos como intermediários em sistemas bioluminescentes (Hastings e Wilson, 1976)

e são clivados por um mecanismo que envolve transferência de elétrons (item 1.3.2.).

### 1.3.2. Transferência de elétrons (Chemically Initiated Electron-Exchange Luminescence, CIEEL)

Para explicar a emissão de luz em reações intramoleculares de dioxetanonas ou dioxetanos contendo substituintes de baixo potencial de oxidação, ou em reações intermoleculares com substâncias que apresentem baixo potencial de oxidação, McCapra (1977) e Schuster (1979) propuseram um mecanismo de clivagem por transferência de elétrons.

Esquema 1.6



O posterior aniquilamento dos radicais formados produz o estado eletronicamente excitado. A viscosidade do meio desempenha um papel importante neste processo: em solvente pouco viscoso, o par cátion-ânion se separa por difusão dando outros produtos; uma "gaiola" de moléculas de solvente

viscoso favoreceria o aniquilamento.

1.3.3. Transferência de energia triplete de carbonilas excitadas

A transferência de energia eletrônica de uma molécula excitada (D) para uma molécula aceptora (A) é um processo fotofísico bastante importante.

Esquema 1.7

$$D^* + A \longrightarrow D + A^*$$

Esta transferência pode ocorrer por um processo radiativo ou não radiativo (Turro, 1978; Quina, 1982).

1.3.3.1. Transferência de energia radiativa

Este é o mecanismo denominado "trivial". Neste caso a espécie doadora ao decair para o estado fundamental emite um fóton que vai ser reabsorvido pela espécie aceptora tornando-a excitada.

Esquema 1.8

$$D^* \longrightarrow D + h\nu$$

$$A + h\nu \longrightarrow A^*$$

A probabilidade de ocorrer este processo depende (i) do rendimento quântico de emissão do doador, (ii) da integral de recobrimento entre o espectro de emissão do doador e de absorção do aceptor, (iii) da absorptividade molar

de A. Um processo trivial tem sua caracterização possível pela (i) invariabilidade do tempo de vida do doador na presença do aceptor; (ii) por não depender da viscosidade do solvente e (iii) por ser dependente de geometria do sistema (Förster, 1959).

1.3.3.2. Transferência de energia não radiativa

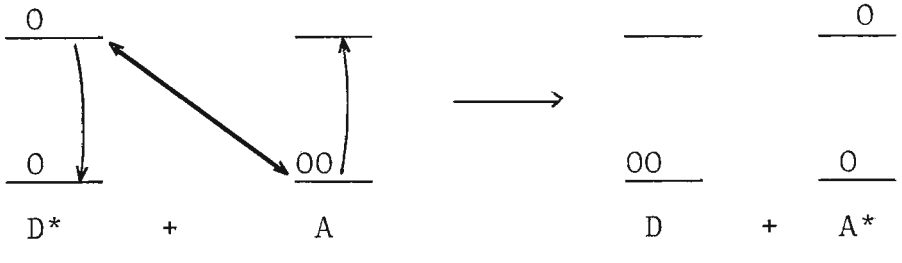
Neste tipo de transferência as moléculas doadoras e aceptoras interagem diretamente, em um processo monofásico, sem a participação de um fóton.

Existem dois mecanismos pelos quais este tipo de transição pode ocorrer: (i) transferência de energia por interações coulômbicas ou (ii) transferência de energia por troca de elétrons.

1.3.3.2.1. Transferência de energia por interações coulômbicas

Neste tipo de mecanismo assume-se que a molécula no estado excitado comporta-se como um dipolo oscilante o qual induz a formação de um momento dipolar na molécula aceptora transferindo assim a sua energia.

Esquema 1.9.



As interações se dão através de campos magnéticos não sendo necessário contacto físico ou troca de elétrons entre as moléculas envolvidas, podendo assim ocorrer transferência de energia a longa distância (>20 $\overset{o}{A}$).

Förster (1959) definiu a seguinte relação matemática para quantificar a velocidade de transferência de energia coulômbica

$$k_{ET} = k \frac{k^2 \, k_D^o}{R_{DA}^6} \quad J(\varepsilon_A)$$

onde

$k_{ET}$ = constante de velocidade de transferência de energia;

$k^2$ = referente à orientação espacial dos momentos de dipolo do doador e do aceptor;

$k_D^o$ = constante de desativação radiativa do doador;

$R_{DA}$ = distância entre doador e aceptor em angstrons;

$J(\varepsilon_A)$ = integral de recobrimento entre o espectro de emissão de D e o de absorção de A, incluindo a absorptividade molar do aceptor.

Para que uma transferência de energia ocorra segundo o mecanismo de interação coulombiana tem que obedecer a seguinte regra: $M_{D^*} = M_D$ e $M_A = M_{A^*}$, onde M é a multiplicidade do estado, e é dada por 2S + 1 (Lamola e Turro, 1969). Segundo esta regra, existem dois processos de interesse em sistemas orgânicos que são permitidos:

$$D^*(S) + A(S) \longrightarrow D(S) + A^*(S)$$

$$D^*(S) + A(T) \longrightarrow D(S) + A^*(T)$$

já a transição

$$D^*(T) + A(S) \longrightarrow D(S) + A^*(S)$$

e o aniquilamento triplete-triplete

$$D^*(T) + A^*(T) \longrightarrow D(S) + A^*(S)$$

embora proibidos pela regra de seleção de spin, podem ocorrer devido ao elevado tempo de vida do doador (Bennet e colaboradores, 1964).

A transição triplete-triplete

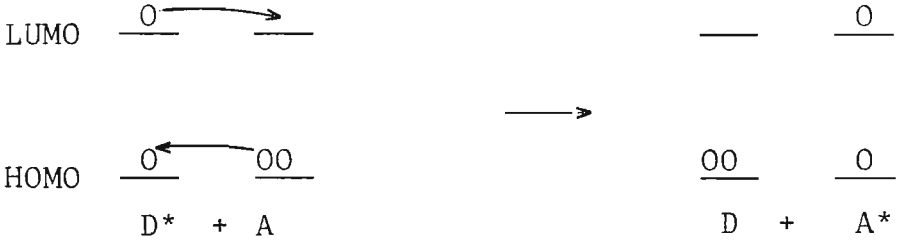
$$D^*(T) + A(S) \longrightarrow D(S) + A^*(T)$$

permitida por spin, é proibida por este mecanismo devido ao baixo valor de $\varepsilon_A$ (Turro, 1968).

1.3.3.2.2. Mecanismo de transferência de energia por troca de elétrons

Neste tipo de mecanismo, proposto por Dexter (1953), a transferência de energia ocorre através da colisão entre as duas moléculas. Existe uma dupla troca de elétrons entre a molécula doadora e aceptora.

Esquema 1.10.




A constante de velocidade de transferência de energia é dada pela equação:

$$k_{ET} = K\ J\ \exp\ (-2\ R_{DA}\ L^{-1})$$

onde:

$k_{ET}$ = constante de velocidade de transferência de energia;
K = constante relacionada a interação orbital específica;
J = integral de recobrimento espectral, normalizada para o coeficiente de extinção de A;
$R_{DA}$ = distância entre doador e aceptor em angstrons;
L = raio de Van der Waals.

Uma vez que a transferência é colisional, $R_{DA}$ tem que ser menor ou igual à soma dos raios moleculares.

A transferência de energia por interação de troca segue a regra de seleção de spin de Wigner, onde as séries:

$$(S_{D^*} + S_A) \geq (S_{D^*} + S_A - 1) \geq \ldots\ldots \geq (S_{D^*} + S_A)$$

e

$$(S_D + S_{A^*}) \geq (S_D + S_{A^*} - 1) \geq \ldots\ldots \geq (S_D - S_A^*)$$

apresentem pelo menos um termo em comum (Lamola e Turro, 1969).

$$D^*(S) + A(S) \longrightarrow D(S) + A^*(S)$$

$$D^*(T) + A(S) \longrightarrow D(S) + A^*(T)$$

$$D^*(T) + A^*(T) \longrightarrow D(S) + A^*(S)$$

O processo triplete-singlete

$$D^*(T) + A(S) \longrightarrow D(S) + A^*(S)$$

apesar de proibido por spin, encontra-se favorecido em alguns casos devido ao longo tempo de vida do doador.

Os mecanismos de transferência de energia dipolo-dipolo e colisional podem ser diferenciados pelos seguintes aspectos (Turro, 1978).

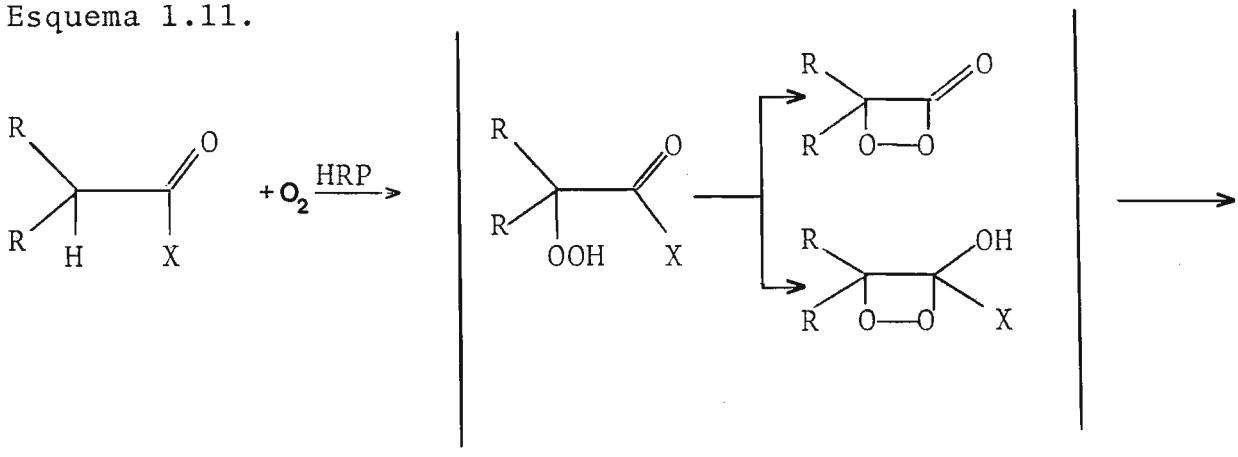
(i) O valor de $k_{ET}$ para o mecanismo colisional fica desprezível quando a distância entre o doador e o receptor é maior que uma ou duas vezes o diâmetro das duas moléculas (5-10 Å).

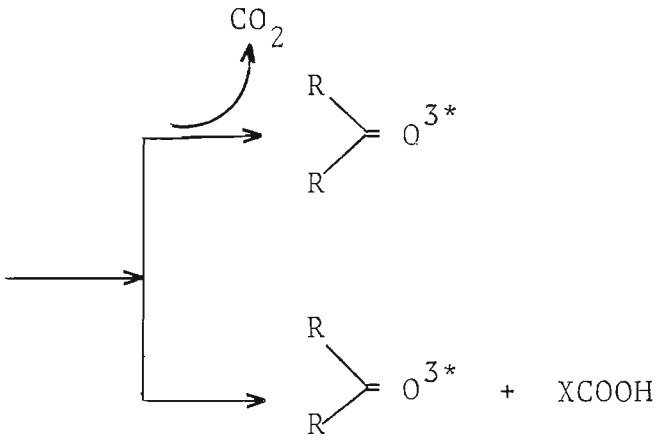
(ii) A eficiência de transferência de energia pelo mecanismo dipolo-dipolo depende principalmente do $\varepsilon_A$ e $\phi_D$ enquanto que a eficiência de transferência pelo mecanismo de troca de elétrons não pode ser diretamente relacionado a nenhuma grandeza experimental.

## 1.4. Formação Enzimática de Estados Eletronicamente Excitados

Cilento e colaboradores (1978, 1984) demonstraram que vários substratos análogos às luciferinas, isto é, compostos contendo α-hidrogênio ligado à grupos carboxílicos ou carbonílicos, através de reação catalisada por peroxidase de rábano (HRP), agindo como uma monooxigenase interna, levam à formação de produtos carbonílicos eletronicamente excitados ao estado triplete.

Esquema 1.11.



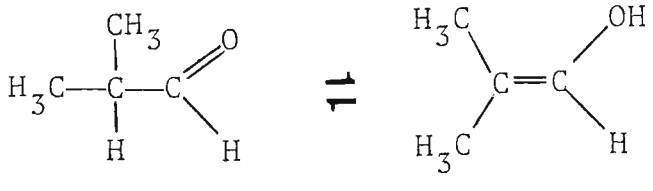


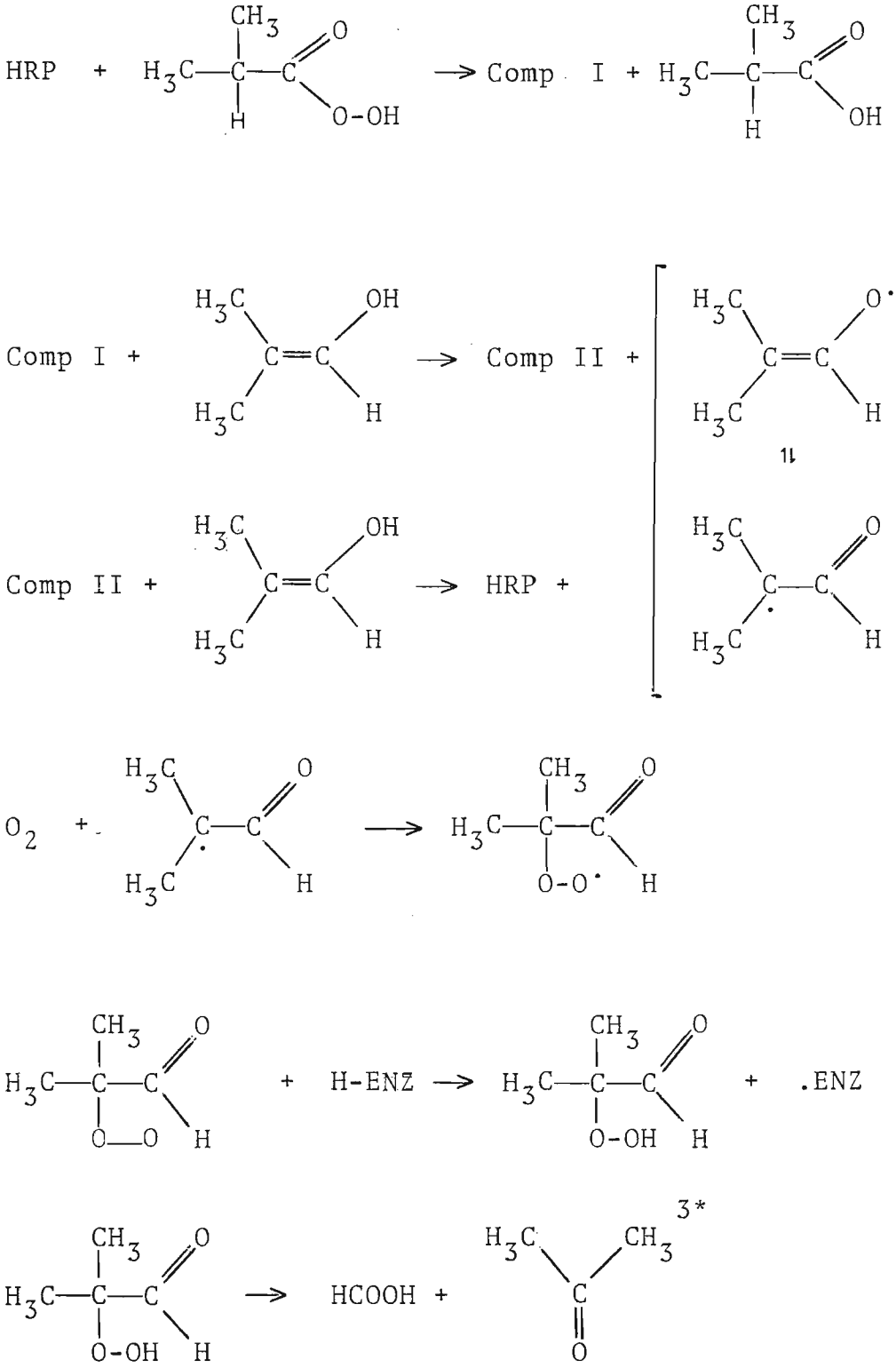

Dentre os sistemas estudados, destacam-se os seguintes:

(i) a oxidação aeróbica do isobutanal (IBAL) gerando acetona triplete (Faria-Oliveira e colaboradores,1978). Neste caso, a espécie excitada deve estar sendo gerada "protegida" de desativações colisionais com o oxigênio, pois a reação é fosforescente mesmo na presença de $O_2$. De fato, Augusto e Bechara (1980) observaram que quando HRP é substituída por hemina, ocorre oxidação do IBAL sem,entretanto, o aparecimento da fosforescência. Foi também descrita a estereoespecificidade da supressão de emissão de acetona triplete por D- e L-triptofano (Rivas Suarez e Cilento, 1981).

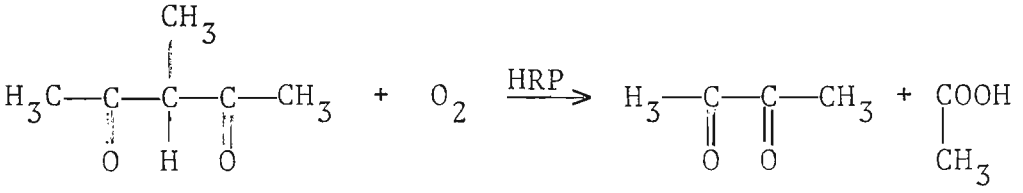
Recentemente, Baader e colaboradores (1985) propuseram o seguinte mecanismo para esta reação (Esquema 1.12), onde a acetona é formada através da oxidação de forma enólica do IBAL.

Esquema 1.12

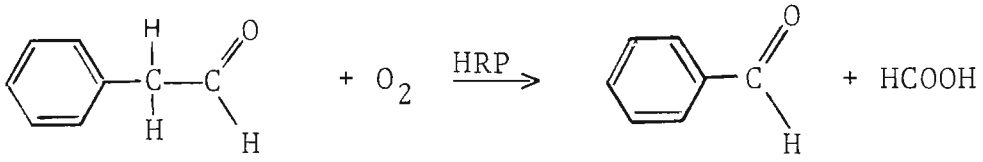




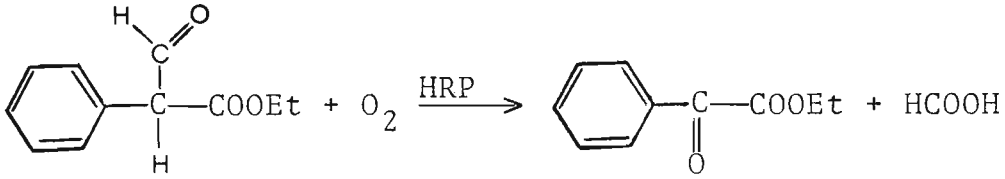
(ii) A oxidação de 3-metilacetoacetona, catalisada por HRP, com a formação de biacetilo triplete (Soares e Bechara, 1982).



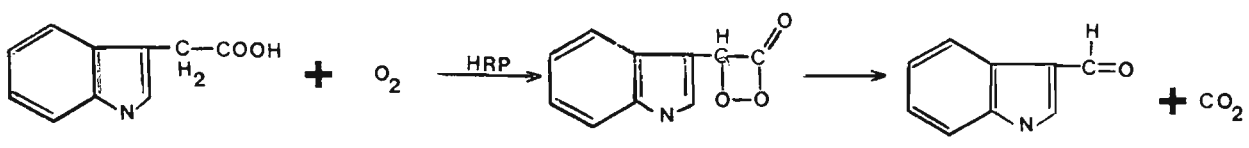
(ii) A oxidação do fenilacetaldeído com a formação de benzaldeído triplete (Durán e colaboradores,1977).



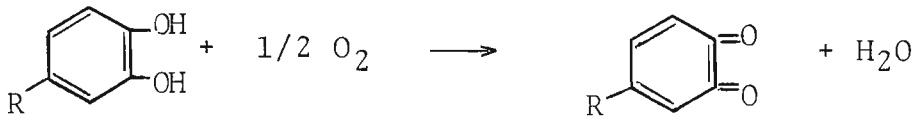
(iii) A oxidação aeróbica do ácido α-formilfenilacético para ácido benzoilfórmico triplete (Adam e colaboradores, 1984). Esta reação é bastante interessante, uma vez que ocorre em raizes da planta Datura innoxia (Kalyanaraman e colaboradores, 1975).



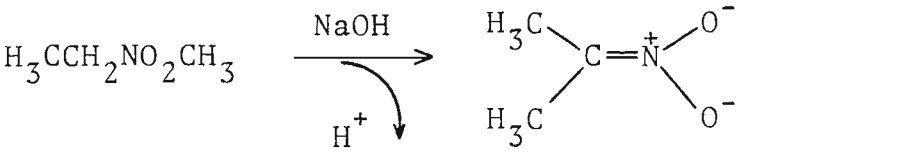
(iIV) O hormônio vegetal (auxina), ácido indol-3-acético (IAA), é oxidado a indol-3-aldeído e $CO_2$, através de uma reação quimiluminescente catalisada por HRP (Vidigal e colaboradores, 1979).

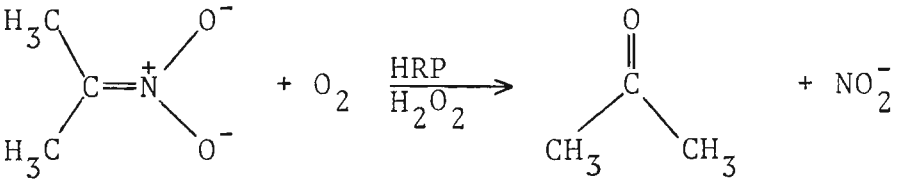


(iv) A oxidação de catecol promovida por catecol oxidase forma estados eletronicamente excitados, os quais são detectados por fluorescência sensitizada por clorofila (Villablanca e Cilento, 1985).



(iVI) A oxidação quimiluminescente de 2-nitropropano, catalisada por HRP, formando acetona e nitrito. Este sistema é de especial interesse, devido à alta toxicidade de 2-nitropropano (Indig e Cilento, comunicação pessoal).





Cilento e colaboradores demonstraram ainda, nos últimos dez anos, a ocorrência de transferência de energia de espécies triplete geradas enzimaticamente para diversos aceptores naturais ou sintéticos tais como: biacetilo, o íon 9-10 dibromoantraceno-2-sulfonato (DBAS), corantes

xantênicos, flavinas, fitocromo, DNA e clorofila (Cilento, 1984). Observaram também transferência de energia para diversas sondas (dansilamida, dansilsarcosina, 7-anilinocumarina e 7-anilinoftaleno-8-sulfonato) ligadas à soroalbumina bovina (Bohne e Cilento, comunicação pessoal). Foi demonstrada também, a ocorrência de emissão fosforescente e supressão de espécie triplete do ácido sórbico, compostos indólicos e quinonas (Rivas-Suárez e colaboradores,1981; Rivas-Suárez e colaboradores, 1983).

Dos sistemas estudados, é notável a transformação de colchicina em seus lumiderivados β- e γ-lumicolchicina, in vitro, por transferência de energia triplete gerada enzimaticamente. Este modelo é interessante uma vez que, na planta Colchicum autummale, ocorre formação destes lumiderivados em partes não expostas à luz. Consiste, este sistema portanto, em evidência da ocorrência in vivo de foto - química no escuro (Brunetti e colaboradores, 1982).

A vitamina D e seus precursores, pró-vitaminas D, sofrem extensa modificação espectral quando expostos à acetona triplete gerada enzimaticamente. Evidências experimentais mostram ser essa alteração resultado de passos "fotoquímicos" mediados pela espécie doadora na ausência de luz (Brunetti e colaboradores, submetido).

Foi observada também, transferência de energia para estruturas biológicas como cloroplastos (Nassi e Cilento, 1983) e microssomas (Campa, 1984). Em vista destes resultados, tem-se atualmente pesquisado este tipo de mecanismo para células intactas. Nascimento e Cilento (1985), observaram um aumento do consumo de oxigê-

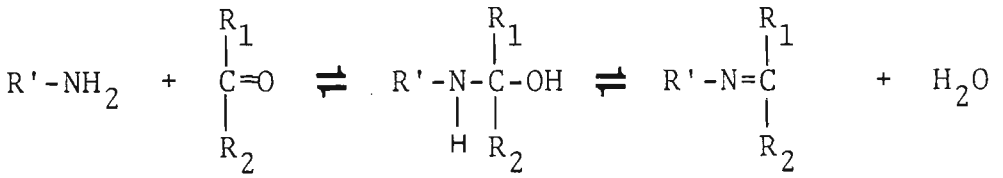
nio e emissão de luz em zoósporos de Blastocladiella emersonii, por transferência de energia gerada pelo sistema fenilacetaldeído/HRP. Também é bastante interessante, a formação de estados excitados, catalisada por mieloperoxidase intracelular, em leucócitos polimorfonucleares, quando expostos ao trimetilsilil enol éter do isobutanal. A formação de estados excitados neste sistema leva à uma lesão considerável de célula, sendo que o mesmo efeito não é observado em células onde a mieloperoxidase está ausente (Nascimento e Cilento, submetido).

## 1.5. Bases de Schiff

### 1.5.1. Aspectos gerais

Iminas são compostos com estrutura geral RR'C=NR". O método usual de preparação destes compostos é através da reação de aldeídos e cetonas com aminas. H. Schiff (1864), descobriu esta reação, e por esta razão as iminas são conhecidas como "bases de Schiff".

O mecanismo de formação das iminas, inclui a presença de uma carbinolamina intermediária (Reeves, 1962; Willi e Robertson, 1953; Willi, 1956).

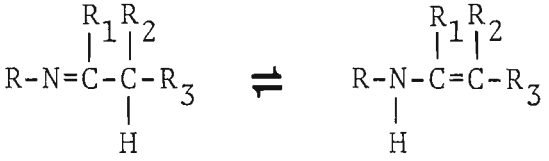


A carbinolamina é bastante instável, e na maioria das reações somente são detectados a imina ou os precursores carbonila e amina. Devido a ocorrência de conden-

sação aldólica, em solução aquosa o equilíbrio está favorecido na direção da carbonila e amina. Entretanto, para o caso de iminas derivadas do isobutanal, que não sofre este tipo de reação (Hine e colaboradores, 1965), a base de Schiff permanece estável por vários dias (Pesek e Frost, 1974).

1.5.2. Isomerização imina-enamina

Compostos carbonílicos contendo hidrogênio α apresentam tautomerismo ceto-enólico. Este tipo de tautomerismo foi demonstrado claramente para o caso de iminas que continham α-hidrogênio (Layer, 1963).



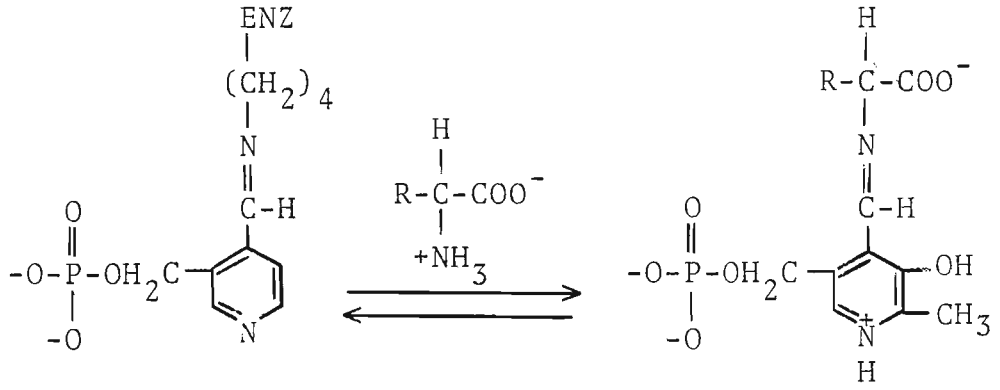
Existe, efetivamente um equilíbrio em solução entre a forma imina e enamina.

1.5.3. Importância biológica de bases de Schiff

Ligações de Schiff são de fundamental importância biológica, uma vez que ocorrem com grande frequência em biomoléculas e participam largamente como intermediários em processos enzimáticos. São descritos a seguir, alguns exemplos de participação das iminas em sistemas biológicos.

1.5.3.1. Enzimas com piridoxal-fosfato (PLP) como grupo prostético

As enzimas contendo PLP, derivado de piridoxina (Vitamina $B_6$), como grupo prostético, formam uma ligação do tipo base de Schiff entre o grupo aldeídico do PLP e um resíduo específico de lisina no sítio ativo. Quando o substrato, um aminoácido, é adicionado, ele substitui o resíduo de lisina formando uma nova base de Schiff (Wiesinger e Hinz, 1984).

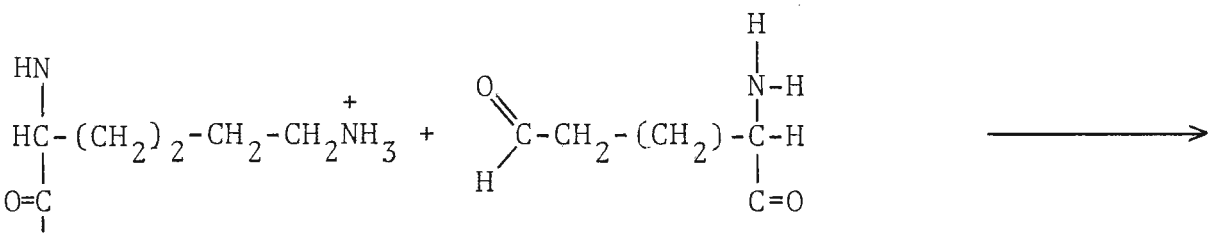


As enzimas que contêm PLP como grupo prostético são bastante versáteis, participando de reações de transaminação, decarboxilação, deaminação, racemização e clivagens aldólicas. Elas também participam de reações de eliminação e troca de átomos de carbono β e γ de aminoácido como por exemplo no caso da triptofano sintetase.

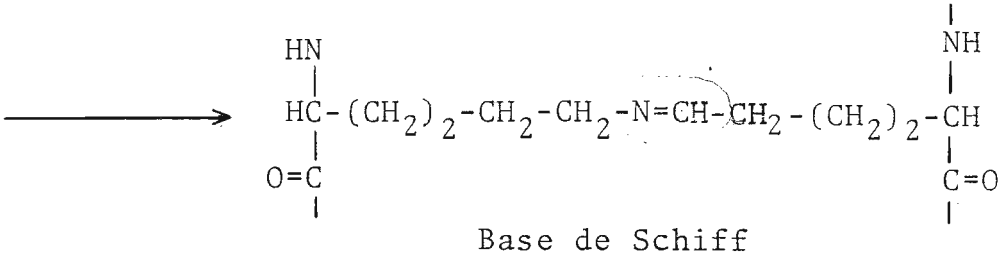
1.5.3.2. Ligações cruzadas do colágeno e da elastina

O colágeno e a elastina são estabilizados por ligações cruzadas derivadas de resíduos de lisina, com a

formação de bases de Schiff (Stryer, 1981).



Resíduo de lisina  Aldeído derivado de lisina

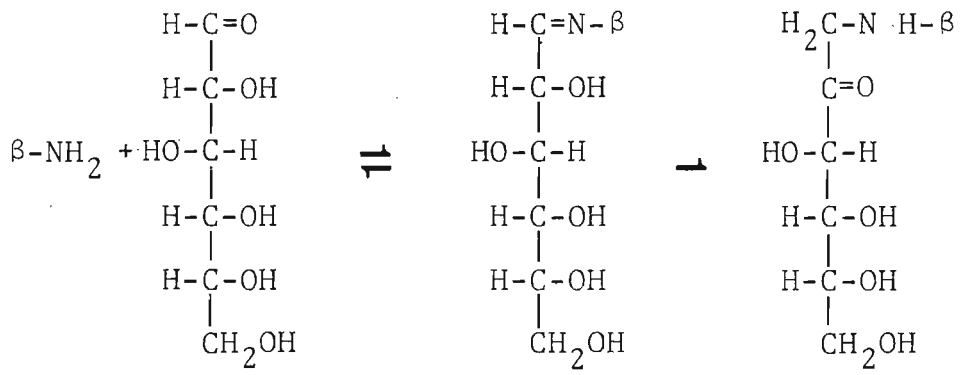


Base de Schiff

1.5.3.3. Hemoglobina $A1_C$

A glicosação não enzimática de proteínas, como a hemoglobina ($HbA1_C$) ocorre em concentrações bem acima do normal em pacientes com diabetes mellitus. Diversos pesquisadores têm associado este fenômeno com as complicações tardias que ocorrem nesta doença (Bunn e colaboradores, 1978; Cerami e Koenig, 1978).

A hemoglobina $A1_C$ é uma glicoproteína na qual um resíduo de glicose forma uma ligação de Schiff com a valina terminal de uma das cadeias β da proteína (Bunn e colaboradores, 1976). A ligação de Schiff (aldimina) sofre posterior rearranjo, formando uma cetoamina mais estável.



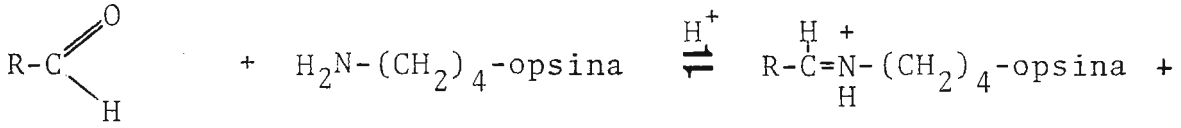
Aldimina Cetoamina

Considerando a grande importância biológica da glicosação de proteínas, Bunn e Higgins (1981) estudaram a reatividade de diversos monossacarídeos com a hemoglobina.A reatividade de cada açúcar é dependente de concentração deste açúcar na forma de cadeia aberta, uma vez que é esta forma que reage com os amino grupos de proteínas. Este tipo de comportamento dos açúcares pode ser considerado em termos de evolução. A seleção de glicose como principal combustível metabólico pode ser atribuída à estabilidade da sua forma em cadeia fechada. Esta estrutura estável de glicose permite a coexistência de concentrações altas deste açúcar e de diversas proteínas nos tecidos animais.

1.5.3.4. A ligação do retinal na molécula de rodopsina

Nas células foto-receptoras humanas, a proteína rodopsina, apresenta como grupo prostético o 11-cis-retinal o qual,sob a ação de luz, sofre isomerização transformando-se em retinal-todo-trans. Este é o evento primário de excitação visual (Ottolenghi, 1980).

O 11-cis-retinal está lidado à molécula de opsina por meio de uma ligação do tipo base de Schiff.



11-cis-retinal + $H_2O$ | Resíduo de lisina | Base de Schiff

1.5.3.5. Na peroxidação de lipídeos

Durante a peroxidação de lipídeos há formação de cromolipídeos fluorescentes. Estes compostos têm as mesmas características espectrais da lipofucsina, um pigmento que se acumula nos tecidos animais como função do envelhecimento. Estes produtos fluorescentes são uma família de compostos com estrutura -N=C-C=C-N- (Dillard e Tappel, 1971; Koster e colaboradores, 1982).

Enzimas contendo resíduos de lisina, tal como a ribonuclease A, são inativadas pela ligação com o malonaldeído, importante produto de lipoperoxidação, com a produção de produtos fluorescentes (Dillard e Tappel, 1971).

Shimasaki e colaboradores (1981), mostraram que aminoácidos e proteínas reagem com hidroperóxidos lipídicos formando bases de Schiff. Estudando este tipo de efeito com o hidroperóxido do ácido linolênico e BSA, estes autores demonstraram que existe uma correlação entre o aumento de formação de bases de Schiff e o aumento da formação de produtos fluorescentes.

1.5.3.6. Efeitos tóxicos associados ao alcoolismo crônico

Os efeitos tóxicos de etanol têm sido recentemente associados ao metabolismo do acetaldeído. Gaines e colaboradores (1977), apresentaram evidências de que o acetaldeído reage com proteínas de membranas de eritrócitos humanos intactos e produzem mudanças morfológicas na célula. Mais recentemente, Nomura e Lieber (1981) mostraram que acetaldeído,endogicamente formado de etanol, liga-se também com microssomos de fígado de rato. Este processo é acelerado após ingestão crônica de álcool. Boveris e colaboradores (1980, 1984) têm detectado fraca quimiluminescência em ratos vivos quando seus fígados são expostos diretamente à uma fotomultiplicadora sensível. A quimiluminescência de fígado de rato in situ, é aumentada sob alcoolismo agudo.

Tuma e colaboradores (1984) demonstraram que o acetaldeído liga-se covalentemente à soroalbumina bovina formando uma base de Schiff instável que se transforma posteriormente em um aduto estável. Observaram também que o ascorbato estabiliza a formação deste aduto. Este fato pode ter importantes implicações biomédicas, uma vez que pessoas ingerindo megadoses de Vitamina C e álcool podem estar potencializando efeitos tóxicos associados ao alcoolismo crônico.

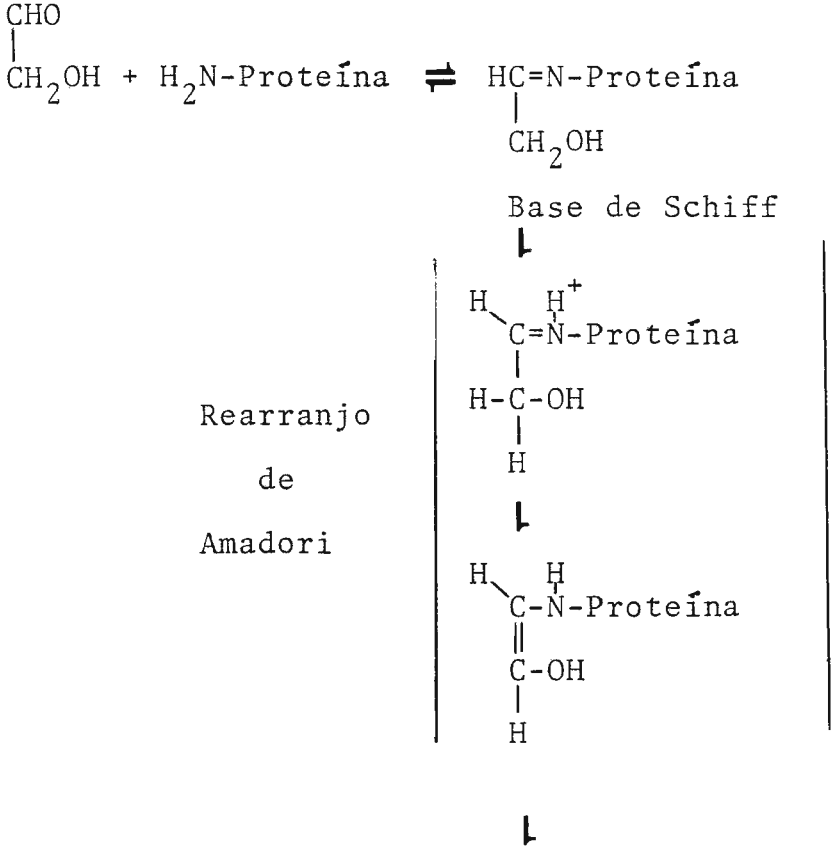
1.5.3.7. Bases de Schiff como agentes anticancer e antivirais

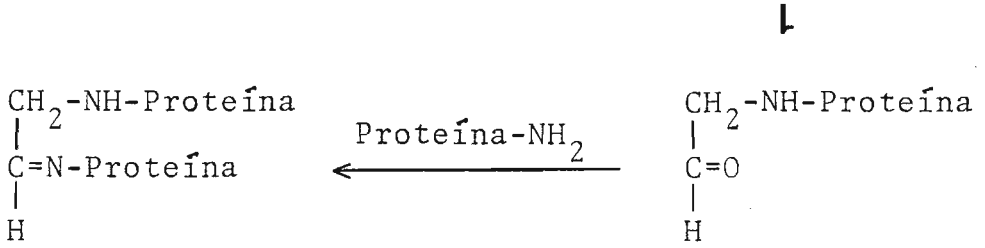
Bases de Schiff de N-hidroxi-N'-aminoguanidina foram tratadas com relação as suas atividades anticancer e

antivirais (T'ang e colaboradores, 1985). Foi demonstrado que esses compostos inibem transformação celular por vírus de sarcoma de Rous. Alguns dos compostos testados também apresentaram atividade contra leucemia P388 em camundongos.

1.5.4. Formação de bases de Schiff de aldeídos e proteínas

Glicolaldeído reage com proteínas formando adutos estáveis. O aduto provem de uma base de Schiff intermediária, que sofre rearranjo de Amadori gerando um novo grupo aldeídico que reage com uma nova molécula de proteína (Acharya e Manning, 1983).





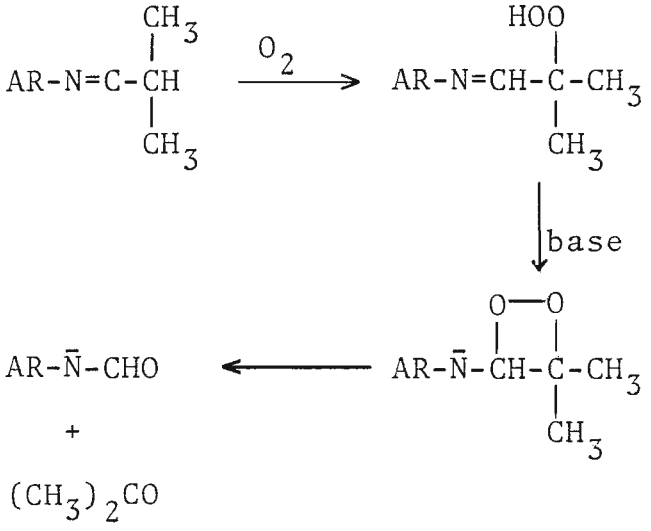

Aduto Aldoamina

Um aspecto interessante da reação de glicolaldeído com proteínas é o aparecimento de fluorescência. A presença de agentes redutores, como o cianoborohidreto de sódio, que reduz as bases de Schiff, previnem o aparecimento da fluorescência das misturas de incubação de aldeídos com proteínas.

1.5.5. Quimiluminescência de bases de Schiff

McCapra e Burford (1976) demonstraram que bases de Schiff derivadas de isobutiraldeído e várias aminas aromáticas, cujas formamidas-ânion ($AR\text{-}\bar{N}\text{-}CHO$) têm um estado singlete de baixa energia, claramente de natureza $\pi\pi^*$, são quimiluminescentes no tratamento com base forte (terc-butóxido) em DMSO. Neste trabalho foi demonstrada a formação preferencial de estado $\pi\pi^*$ em vez de $n\pi^*$.

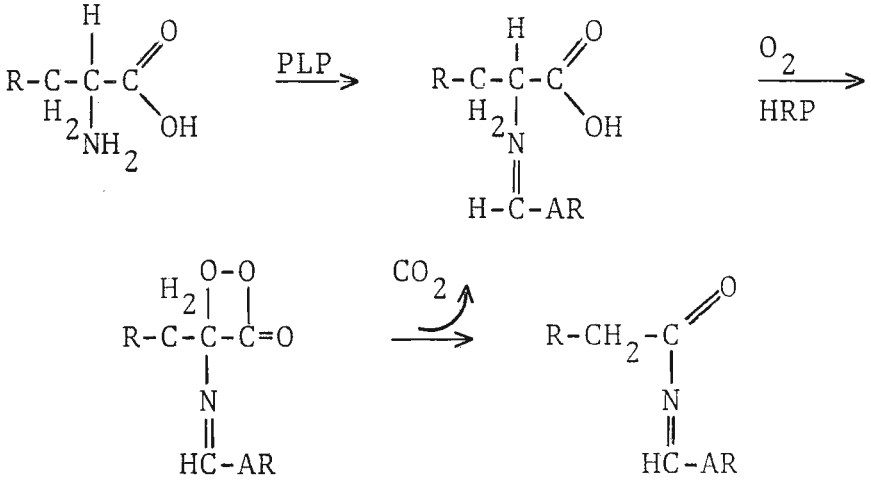
Recentemente, Akutagwa e colaboradores (1985), estudando o mesmo tipo de reação, isolaram o hidroperóxido intermediário, e propuseram o seguinte mecanismo de reação:



Os autores propõem este sistema como modelo para a bioluminescência de Latia neuritoides, um molusco, e bactérias luminescentes.

1.5.6. Formação de estados eletrônicos excitados na conversão do triptofano em indolacetamida

Augusto e Cilento (1977), observaram emissão de luz, na presença de HRP, quando triptofano é convertido em indolacetamida via formação de base de Schiff com o piridoxal-fosfato (PLP). O mecanismo provável de reação é:



A base de Schiff formada é similar à luciferina e a oxiluciferina em vagalumes celenterados e cipridina (McCapra e Wrigglesworth, 1969; Hastings e Wilson, 1976).

## 2. OBJETIVOS

Considerando que:

(i) espécies excitadas no estado triplete, em virtude de sua vida média relativamente longa e alta reatividade, se produzidas in vivo, podem promover uma série de conversões tipicamente fotoquímicas em biomoléculas, com consequências normais ou lesivas à célula (Cilento, 1984);

(ii) bases de Schiff derivadas de isobutiraldeído e várias aminas aromáticas são quimiluminescentes em meio orgânico aerado contendo base forte. Estas iminas têm sido propostas como "modelo" para a bioluminescência de bactérias e de Latia (McCapra e Burford, 1976; Akutayawa e colaboradores, 1985).

(iii) ligações de Schiff têm grande importância biológica, uma vez que participam como intermediários, por exemplo, nas reações de transaminação, na biossíntese de aminoácidos, na biossíntese de porfirinas, nas reações cruzadas do colágeno e da elastina, etc.

(iv) diversos processos patológicos têm sido associados com formação de ligação de Schiff; de especial interesse são os danos hepáticos associados ao alcoolismo crônico (Nomura e Lieber, 1981; Tuma e colaboradores, 1984) decidimos investigar a oxidação aeróbica de substratos iminicos catalisada por uma hemeproteína, a peroxidase de raiz forte (HRP). Foram desenvolvidos os seguintes aspectos:

(i) estudo da oxidação aeróbica de iminas alifáticas e da possível geração de estados eletronicamente exci-

tados, com o objetivo de se obter informações cinéticas e mecanísticas;

(ii) estudo da transferência de energia da espécie excitada para diversos aceptores no sentido de caracterizar a natureza do estado formado e comparar os parâmetros de transferência de energia com os dos sistemas já descritos;

(iii) estudo da oxidação, catalisada por HRP, de bases de Schiff formadas por aminoácidos e proteínas e análise das possíveis implicações toxicológicas deste processo.

# 3. MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1. Símbolos e Abreviações

BSA - Soroalbumina bovina

BPA - Isobutilidenoisopropilamina

BVA - N-isobutilideno-L-valina

i-BMA - N-isobutilidenometilamina

sec-BMA - N-sec-butilidenometilamina

PBI - N-2-piridil-isobutilimina

IBAL - Isobutiraldeído

SOD - Superóxido dismutase

DABCO - 1,4-Diazobiciclo|2.2.2|octano

2,4 DNPH - 2,4-Dinitrofenilhidrazina

DBAS - 9,10-Dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio

DPAS - 9,10-Difenilantraceno-2-sulfonato de sódio

TMD - Tetrametil-1,2-dioxetano

Tris - Tris-hidroximetil aminometano

HRP - Peroxidase de raiz forte; "horseradish peroxidase"

$K_M$ - Constante de Michaelis-Menten

$K_{sv}$ - Constante de Stern-Volmer ($kq\tau^o$)

$K_{ET}$ - Constante de velocidade de transferência de energia

$E_a$ - Energia de ativação

$\emptyset_F$ - Rendimento quântico de fluorescência

$\tau^o$ - Tempo de vida de espécie excitada

3.2. Drogas

- Acetato de sódio - Carlo Erba
- Acetona - E. Merck-D
- Ácido acético glacial - E. Merck-D
- Ácido sórbico - Sigma Chemical Co.
- Ácido aminocapróico*
- 2-Aminopiridina - Sigma Chemical Co.
- Arginina - Sigma Chemical Co.
- Benzoato de sódio - BDH-Laboratory Reagents
- p-Benzoquinona - Aldrich
- Benzeno - E. Merck-D
- Brij-35 - Sigma Chemical Co.
- sec-Butilidenometilamina****
- Catalase - Sigma Chemical Co.
- Clorofila a - Sigma Chemical Co.
- Deuterocloroformio - E. Merck-D
- 1,4-Diazobiciclo 2.2.2 octano - Sigma Chemical Co.
- 9,10-Dibroantraceno-2-sulfonato de sódio**
- 9,10-Difenilantraceno-2-sulfonato de sódio**
- 2,4-Dinitrofenilhidrazina - E. Merck-D
- Etanol absoluto - E. Merck-D
- Éter etílico - Aldrich
- Fenilalanina - Sigma
- Formato de metila - Aldrich
- Fosfato bibásico de potássio - E. Merck-D
- Fosfato monobásico de potássio - E. Merck-D
- Glicolaldeído - Sigma Chemical Co.
- n-Hexano - E. Merck-D
- Hidróxido de potássio - Aldrich

- Hidróxido de sódio - Aldrich
- Histidina - Sigma Chemical Co.
- Indol - J.T. Baker Chemical Co.
- Iodeto de potássio - E. Merck-D
- Isobutiraldeído - Fluka
- Isopropilamina - Sigma Chemical Co.
- N-isobutilidenometilamina****
- Lisina - Sigma Chemical Co.
- Lisozima - Sigma Chemical Co.
- D-Manitol - E. Merck-D
- L-Metionina - Sigma Chemical Co.
- Nitro-"blue"-tetrazolium - Sigma Chemical Co.
- Peroxidase Tipo VI - Sigma Chemical Co.
- Peróxido de hidrogênio - Carlo Erba
- Protamina***
- Riboflavina - E. Merck-D
- Soroalbumina bovina - Sigma Chemical Co.
- Superóxido dismutase - Sigma Chemical Co.
- Tris-(hidroximetil)-aminometano - Riedel de Haën
- Tosil - lisina*
- Valina - Sigma Chemical Co.

---

* Drogas gentilmente cedidas pelo Dr. L.Juliano da Escola Paulista de Medicina

** Drogas gentilmente cedidas pelo Dr. Luiz H. Catalani, métodos de preparação e purificação descritos em Catalani, 1984.

*** Droga gentilmente cedida pelo Dr. Alejandro Arellano (Universidad de Concepción, Chile).

**** Droga gentilmente cedida pela Dra. T. Wilson(Harward University, USA).

## 3.3. Equipamentos

### 3.3.1. Medidas de emissão de luz

As medidas de emissão de luz foram feitas em um contador de fótons Hamamatsu, modelo C-767, acoplado à uma fotomultiplicadora R-562. O equipamento (Inaba e colaboradores, 1979; Shimizu e colaboradores, 1979) foi construído em nosso laboratório e está dotado de um sistema de filtros de vidro (Toshiba e Corning), que permitem medidas de espectro de emissão muito fraca, na faixa de 400-670 nm.

Nos casos em que a quimiluminescência é extremamente fraca, utilizou-se um Contador de Cintilação Líquida Beckman LS-250.

### 3.3.2. Espectros de fluorescência

Os espectros de fluorescência foram traçados em um espectrofluorímetro Perkin-Elmer MPF-4. Quando indicado, os espectros foram corrigidos segundo a curva-resposta da válvula fotomultiplicadora Hammatsu R-446 fornecida pelo fabricante. Não foram feitas correções para a fonte de excitação nem para o monocromador.

3.3.3. Medidas de consumo de oxigênio

As medidas de consumo de oxigênio foram feitas polarograficamente em um oxígrafo marca Yellow Springs Instruments, modelo 53.

3.3.4. Medidas espectrofotométricas

Espectros de absorção e medidas cinéticas foram obtidos em espectrofotômetro Zeiss, modelos DMR-10 e DMR-21.

3.3.5. Espectros de ressonância magnética nuclear de prótons

Os espectros de 'HRMN foram obtidos em espectrômetros Varian, modelos T-60 e T-360.

3.3.6. Medidas de índice de refração

As medidas de índice de refração foram feitas com a utilização de um Abbe refratômetro da Atago Optical Works Co., Ltda., modelo 301.

3.3.7. Espectro de infravermelho

Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Perkin-Elmer PE-283.

3.3.8. Termostatização e agitação das misturas de incubação

Foi utilizado um banho de termostatização com agitação programada("Shaker-bath") da marca Forma Scientific, modelo 2564.

3.3.9. Medidas de concentração hidrogeniônica

Os valores de pH foram determinados com o auxílio de um potenciômetro Methrohm, modelo E-510, equipado com um eletrodo combinado modelo EA 121.

## 3.4. Métodos

### 3.4.1. Preparo de reagentes

#### 3.4.1.1. Solução de peroxidase

As soluções aquosas de peroxidase foram preparadas pela dissolução de massa adequada de enzima em água e sua concentração determinada espectrofotometricamente ($\varepsilon_{403}$ = 1,02 x $10^5$ $M^{-1}.cm^{-1}$; Ohlsson e Paul, 1976).

#### 3.4.1.2. Solução de clorofila

Clorofila a comercial foi solubilizada em etanol, imediatamente antes de sua utilização, e a solução mantida em gelo ao abrigo da luz. A concentração de clorofila foi determinada espectrofotometricamente a 660 nm ($\varepsilon_{etanol}$ = 6,94 x $10^4$ $M^{-1}.cm^{-1}$). O espectro de absorção neste solvente deve apresentar a relação $A_{431}/A_{665}$ = 1,023 (Seely e Jensen, 1965).

A inclusão de clorofila em micelas foi feita adicionando-se a quantidade apropriada de solução etanólica a uma solução aquosa de detergente, antes de cada experimento.

#### 3.4.1.3. Determinação de peróxido de hidrogênio

As dosagens de peróxido de hidrogênio, feitas segundo Cotton e Dunford (1973), baseiam-se na oxidação de iodeto por $H_2O_2$, catalisada por peroxidase. O ensaio (2 ml), realizado em cela de quartzo, contém solução de peróxido de hidrogênio, HRP 5 x $10^{-9}$ M e KI 0,05 M em tampão acetato

0,1 M, pH 3,8. A reação é iniciada pela adição de KI na forma de cristais e mede-se a absorbância do íon $I_3^-$ formado, a 353 nm ($\varepsilon_{I_3^-}$ = 2,55 x $10^4$ $M^{-1}.cm^{-1}$).

3.4.1.4. Soluções de derivados sulfonados de antraceno

Soluções aquosas de 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio (DBAS) e 9,10-difenilantraceno-2-sulfonato de sódio (DPAS) foram preparadas e suas concentrações determinadas espectrofotometricamente (DBAS: $\varepsilon_{384}$ = 7950 $M^{-1}.\ cm^{-1}$; DPAS: $\varepsilon_{377}$ = 8400 $M^{-1}.cm^{-1}$; Catalani, 1984).

3.4.1.5. Preparação de isobutilideno-isopropilamina (BPA)

O método utilizado é baseado no descrito por Tiollais (1947). Em um balão de fundo redondo, refrigerado com uma mistura de gelo e sal (cerca de -5° a -18°C) e contendo 35 g de isopropilamina, adiciona-se, sob agitação, 43 g de isobutiraldeído. Após a adição, agita-se por cerca de meia hora. Deixa-se a mistura atingir a temperatura ambiente retirando-se o banho de resfriamento. Nesta etapa a reação já está avançada o suficiente para observar-se a separação de uma camada aquosa inferior.

A separação de água nesta fase de operação é completada pela ação de um desidratante (hidróxido de potássio). Deixa-se a solução em contacto com o secante por 24 horas.

Transfere-se finalmente a camada orgânica para um pequeno balão e deixa-se em contacto com lentilhas de hidróxido de sódio por 24 horas. Filtra-se o líquido e destila-se.

A caracterização do produto foi feita por índice de refração ($n^{13,5}_{encontrado}$ = 1,4063; $n^{13,5}$ (Tiollais,1947)= 1,4064) e por 'HRMN

$(CH_3)_2$- CH- CH= N- CH - $(CH_3)_2$;

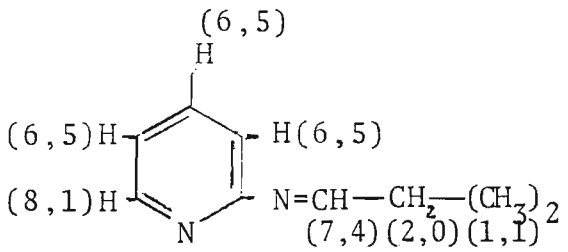
(1,02)(3,00)(7,51) (3,20)(1,08)*

resultados de acordo com Hine e Yeh (1967)

* deslocamentos químicos de bandas, δ, dos espectros via 'HRMN, em partes por milhão, ppm, solvente ($CDCl_3$).

3.4.1.6. Preparação de N-2-piridil-i-butilimina (PBI)

O método de preparação foi baseado no descrito por Tiollais e colaboradores (1969). A reação é feita a frio, em etanol, através da mistura de quantidades equimolares de 2-aminopiridina e isobutiraldeído. O produto é instável e se transforma espontaneamente em um aduto de fórmula R-$CH(C_5H_5N_2)_2$. A purificação do sólido formado foi feita com lavagem em éter e secagem. A caracterização do produto foi feita por 'HRMN




(deslocamentos químicos de bandas, , dos espectros via 'HRMN, em partes por milhão, ppm, solvente $CDCl_3$)

3.4.1.7. Reagente 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4 DNPH)

Adiciona-se 0,5 g de 2,4 DNPH a uma mistura de 1 ml de ácido acético glacial e 10 ml de etanol a 95%.

3.4.1.8. Preparação da isopropilformamida

O método utilizado é baseado no descrito por Tiollais (1947). Uma mistura equimolar de formato de metila e isopropilamina é deixada a temperatura ambiente por 3 horas. Em seguida é coletada a fração que destila a 220°C (literatura b.p. = 220°C; Parker e colaboradores, 1955).

3.4.1.9. Preparação de N-isobutilideno-L-valina (BVA)

O método utilizado é baseado em uma modificação do descrito por Pesek e Frost (1974).

Uma quantidade apropriada de aminoácido foi pesada e dissolvida em água. Isobutiraldeído é adicionado em concentração de forma a obtermos uma mistura equimolar deste com o aminoácido. Após a adição, agita-se por cerca de meia hora. Nesta fase a reação já está avançada o suficiente para observar-se a formação de um sólido. A solução é então filtrada e o sólido é purificado por extração com álcool etílico. A caracterização do produto foi feita por I.R. (Nujol) 1630 (-C=N-); 1705, 2920, 1450, 1370 $cm^{-1}$.

3.4.2. Bases de Schiff de glicolaldeído-aminoácidos

Aminoácidos foram incubados com glicolaldeído em um agitador termostatizado, em meio tamponado a pH 7,4, a 37°C durante pelo menos 8 horas. A formação de bases de Schiff nestas misturas de incubação foi descrita por Pesek e Frost (1974).

3.4.3. Bases de Schiff de glicolaldeído e proteínas

Foram preparadas misturas de incubação de proteínas com glicolaldeído em um agitador termostatizado, em meio tamponado a pH 7,4, a 37°C durante pelo menos 8 horas. A formação das bases de Schiff foi monitorada pelo espectro de fluorescência ($\lambda_{máx.}$ = 400 nm, lisozima; 415 nm protamina; 512 nm,BSA)sob irradiação ($\lambda_{exc}$ = 332,349 e 435 nm, respectivamente); (Acharya e Manning, 1980).

3.4.4. Condições de reação da oxidação aeróbica das bases de Schiff

Nos estudos de quimiluminescência, consumo de oxigênio, fluorimetria e absorção de luz, a reação foi iniciada com a adição de concentrações micromolares de HRP a 3 ml da mistura de incubação proteína-glicolaldeído.

3.4.5. Análise dos produtos da reação

Misturas de reação (10 ml) contendo BPA (10 mM)/ HRP (2 μM) em tampão fosfato 0,6 M pH 7,4 foram colocadas em frasco de 50 ml, fechados sob atmosfera de $O_2$ e deixados a temperatura constante (37°C), sob agitação contínua, por 12 horas. Em seguida a acetona foi identificada através de seu derivado 2,4-dinitrofenilhidrazona (Shriner e colaboradores, 1956) por cromatografia de camada delgada (placas de silica gel 60), através de seu Rf comparado ao do padrão, utilizando como solvente a mistura benzeno/n-hexano (10:1).

A isopropilformamida foi isolada por cromatrografia gasosa, empregando-se uma coluna de Porapak-Q de 3/16 polegadas de diâmetro e 1,2 m de comprimento, a 150°C com

fluxo de $H_2$ de 50 ml/min. Temperatura do vaporizador = 210°C. Foi utilizado um detector de ionização de chama, com temperatura de 240°C.

Utilizando-se o método de comparação de tempo de retenção com o de padrão externo, foi feita tentativamente a identificação da isopropilformamida como produto da reação.

3.4.6. Determinação do rendimento da reação

Os cálculos do rendimento da reação foram baseados no rendimento obtido de acetona, após a separação por TLC. O derivado 2,4-dinitrofenilhidrazona da acetona foi retirado por raspagem das placas de sílica, solubilizados em etanol e medidos os espectros de absorção. Para o cálculo da concentração do derivado de acetona, foi utilizado o valor de $\varepsilon_{360}$ = 21.100 $M^{-1}.cm^{-1}$ (Robert e Green, 1946). Determinação da taxa de recuperação usando acetona autêntica como produto de partida.

3.4.7. Cálculo da atividade da enzima superóxido-dimutase (SOD)

O cálculo da atividade de SOD foi feito segundo método descrito por Maral e colaboradores (1977), por meio da inibição da redução do nitroblue tetrazolium (NBT) por $O_2^-$ gerado durante a reoxidação de riboflavina fotoreduzida. O sistema de dosagem é constituído de riboflavina $2 \times 10^{-6}$ M, metionina $10^{-2}$ M, KCN $2 \times 10^{-5}$ M e NBT $1{,}7 \times 10^{-4}$ M em tampão fosfato $5 \times 10^{-2}$ M pH 7,8. A esta mistura, na cubeta de reação (2 ml), adiciona-se 50 µl de solução de SOD, e a solução final é irradiada a 365 nm utilizando-se uma lâmpada ultravioleta Mineralit UVL-22, acoplada a um suporte termostatizado à 25°C. A cela de reação é fixada dentro do

suporte a uma distância de 2 cm. O tempo de irradiação é ajustado de forma tal que seja observado em um branco, na ausência de SOD, um aumento na absorbância a 560 nm de 0,20 a 0,21.

A atividade de SOD é definida da seguinte forma: 1 UI é aquela capaz de inibir a redução do NBT de 50%.

### 3.4.8. Métodos analíticos

#### 3.4.8.1. Supressão da energia de excitação eletrônica por aceptores não-emissivos: Cálculo da constante de Stern-Volmer ($K_{SV}$)

Para os estudos de supressão de luz por aceptores não emissivos, foram utilizadas projeções de $I_o/I$ versus $|Q|$, onde $I_o$ e I são, respectivamente intensidade de emissão na ausência e na presença de supressor e $|Q|$ é a concentração do supressor. Esta projeção fornece uma reta, definida pela equação de Stern-Volmer (Wagner, 1967).

Equação 3.1

$$\frac{I_o}{I} = 1 + k_q \tau^o \, |Q|$$

onde $k_q$ é a constante de velocidade de supressão e $\tau^o$ é a vida média da espécie excitada na ausência do supressor.

A tangente desta reta fornece o valor de $k_q \tau^o$ (= constante de Stern-Volmer, $K_{SV}$).

#### 3.4.8.2. Transferência de energia: cálculo de $K_{ET}\tau^o$

Para os estudos de transferência de energia, para aceptores emissivos, foram utilizadas projeções do tipo

duplo-recíproco 1/I versus 1/|S|, onde 1/I é o inverso da intensidade de emissão sensitizada e 1/S é o inverso da concentração do aceptor. Wilson (1976) obteve a seguinte equação para transferência de energia de acetona triplete, gerada na termólise de tetrametildioxetano, para 9,10-dibromoantraceno e 9,10-difenilantraceno.

Considere o seguinte processo

$$D^* + A \longrightarrow D + A^*$$

onde: D = dioxetano; A = sensitizador

Equação 3.2

$$\frac{1}{I} = \frac{kd}{\phi_T^A \, k_{TS} \, k_1 \, [D]^3\phi} \; \frac{1}{[A]} + \frac{k_{TS} + k_{TT} + k'_{TS}}{\phi_f^A \, K_{TS} \, k_1 \, [D]^3\phi}$$

I representa a intensidade de emissão de luz do aceptor.

$^3D^* + A \xrightarrow{k_{TT}} D + A^*$ (transferência triplete-triplete)

$^3D^* + A \xrightarrow{k_{TS}} D + {}^1A^*$ (transferência triplete-singlete)

$^3D^* + A \xrightarrow{k'_{TS}} D + A$ (transferência triplete-singlete estado fundamental)

$^1A^* \xrightarrow{kd} A + h_F$ (fluorescência de A)

$^1A^* \xrightarrow{k_{ISC}} {}^3A^*$ (cruzamento intersistema)

$^1A^* \xrightarrow{k_{IC}} A$ (conversão interna)

$1/kd = \tau_D^o$ (tempo de vida do doador na ausência do aceptor)

$\frac{kd}{kd + k_{ISC} + k_{IC}} = {}^{1}\phi_F$ (rendimento quântico de fluorescência do aceptor)

$k_{TT} + k_{TS} + k'_{TS} = k_{ET}$ (constante de transferência de energia de D* para A)

$k_1 [D]^3 \phi$ (representa o fluxo de acetona triplete gerada na termólise do tetrametildioxetano. Na formação enzimática de espécies triplete, este fator corresponde ao rendimento de estados excitados por quantidade de oxigênio consumido.

Experimentalmente, quando o gráfico 1/I X 1/S resulta em uma reta, a relação coeficiente linear/coficiente angular fornece

$\frac{k_{TS} + k_{TT} + k'_{TS}}{kd}$ ou seja $k_{ET} \tau_D^o$

3.4.8.3. Cálculo da constante de Michaelis-Menten ($K_M$) da velocidade máxima de reação ($V_{máx}$)

Os cálculos de $K_M$ e $V_{máx}$ foram feitos utilizando-se a projeção dos duplos-recíprocos 1/velocidade versus 1/concentração de substrato. Esta projeção é baseada em um arranjo da equação de Michaelis-Menten $V = V_{máx} \frac{S}{S + K_M}$ onde S = concentração de substrato e V = velocidade inicial onde obtem-se o inverso desta equação (Equação de Lineweaver-Burk)

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{máx}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

Portanto, graficamente obtemos no intercepto no eixo $\frac{1}{V}$ o valor $\frac{1}{V_{max}}$ e no intercepto no eixo $\frac{1}{S}$ o valor de $-\frac{1}{K_M}$. A inclinação fornece o valor de $K_M/V_{max}$ (Segel, 1974).

3.4.8.4. Cálculo de energia de ativação (Ea)

A energia de ativação da oxidação aeróbica de BPA, catalisada por HRP, foi determinada por projeção de Arrhenius (log vel versus temperatura$^{-1}$). A inclinação da reta fornece os valores de Ea.

Equação de Arrhenius

$$k' = A \exp \frac{-Ea}{RT}$$

onde A = fator pré-exponencial.

k' = constante de velocidade.

R = constante dos gases por mol.

# RESULTADOS

## 4. Oxidação Aeróbica de Isobutilidenoisopropilamina (BPA)

### 4.1. Estudos cinéticos de consumo de oxigênio

A adição da enzima HRP a soluções de BPA em tampão fosfato normalmente aerado resulta em um consumo rápido do oxigênio dissolvido, a uma velocidade constante (cinética de ordem zero na concentração de oxigênio). Foram feitos estudos no sentido de optimizar as condições experimentais para obter consumo rápido e total do oxigênio dissolvido.

#### 4.1.1. Efeito da variação de pH, natureza e concentração do tampão

Em tampão fosfato, o estudo do efeito de variação do pH sobre a velocidade de consumo de oxigênio mostra um máximo de atividade enzimática em pH 7,4 (Figura 4.1).

A natureza do tampão é um parâmetro bastante importante, uma vez que, passando-se de tampão fosfato para Tris-HCl, o sistema não consume oxigênio em nenhum dos valores de pH testados (pH 7,9; 8,2 e 9,0). Também não é detectado consumo de oxigênio quando o sistema é colocado em tampão acetato (pH 5,6; 4,8 e 3,8).

Um aumento de velocidade de consumo de oxigênio é também observado quando a concentração do tampão é aumentada (Tabela 4.1).

Nenhum efeito de "conteúdo iônico" é detectado, uma vez que a adição de NaCl 0,3 M ao sistema descrito na Tabela 4.1 não altera a velocidade de consumo de oxigênio.

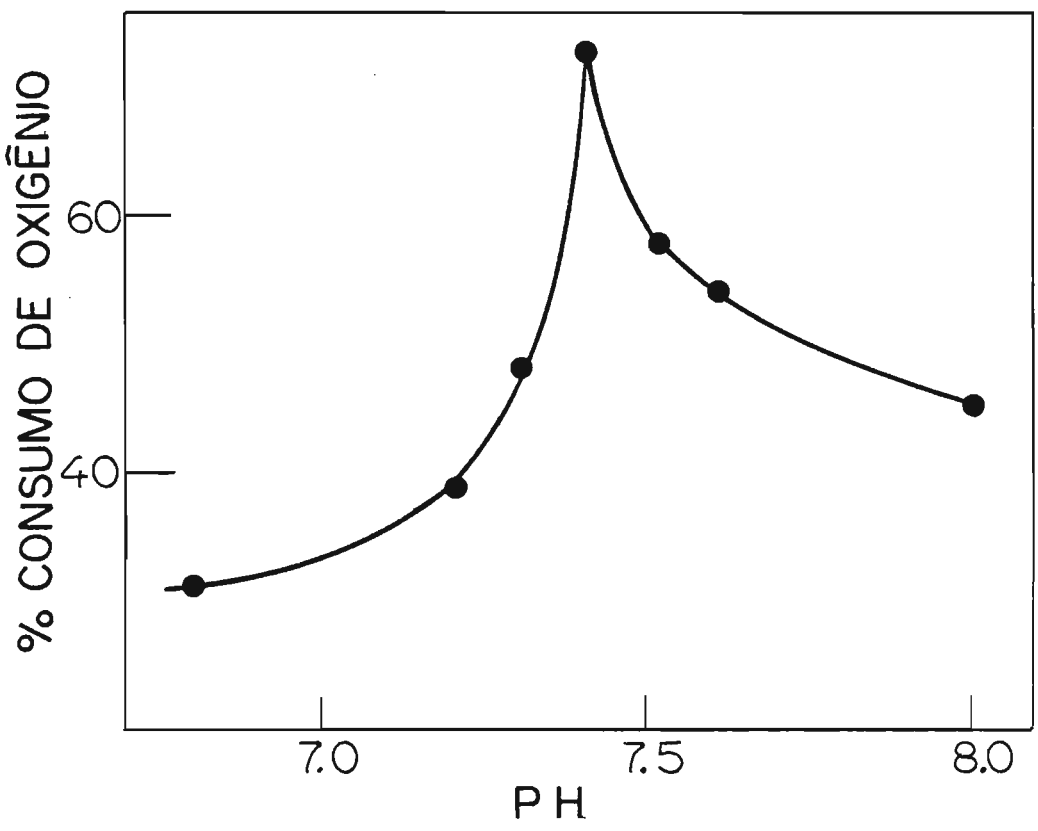



FIGURA 4.1. Efeito do pH na velocidade de consumo de oxigênio do sistema BPA (40 mM)/HRP (1 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,6 M, T = 35°C.

Tabela 4.1. Efeito da concentração de tampão fosfato*

| Concentração do tampão M | Velocidade de consumo de $O_2$ (% de $O_2$/min) |
|---|---|
| 0,1 | 16 |
| 0,3 | 22 |
| 0,5 | 40 |
| 0,6 | 59 |

* Todas as medidas foram realizadas com tampão fosfato pH 7,4 para o sistema BPA (10 mM)/HRP (2 µM)/$O_2$ a 39°C.

4.1.2. Efeito da concentração de HRP

O aumento da concentração da enzima provoca um aumento na velocidade de consumo de oxigênio até atingir-se um máximo com cerca de 2,0 µM de enzima (Tabela 4.2) para concentração de substrato = 10 mM, em pH 7,4 a 39°C.

Tabela 4.2. Efeito da concentração de HRP*

| Concentração de HRP (µM) | Velocidade de consumo de $O_2$ (% $O_2$/min) |
|---|---|
| 0,1 | 21 |
| 0,5 | 29 |
| 1,0 | 31 |
| 2,0 | 50 |
| 2,5 | 50 |

* Todas as medidas foram feitas em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4 com o sistema BPA (10 mM)/HRP/$O_2$ a 39°C.

4.1.3. Efeito da substituição de HRP por hemina

As curvas de consumo de oxigênio da oxidação aeróbica de BPA catalisada por HRP e hemina estão apresentadas na Figura 4.2. Nota-se que a substituição de HRP por hemina também promoveu o consumo de oxigênio do sistema BPA/$O_2$. Deve-se ressaltar que esta reação é essencialmente não emissiva.

4.1.4. Efeito da concentração de substrato

Observa-se um aumento da velocidade de reação com o aumento da concentração de substrato até atingir-se uma "saturação" (Figura 4.3). A projeção dos duplos-recíprocos (figura inserida, 4.3) é linear. Este tipo de comportamento é típico de enzimas que seguem uma cinética de Michaelis-Menten. Em vista destes resultados, foram efetuados os cálculos da constante de Michaelis-Menten ($K_M$) e de velocidade máxima de reação ($V_{máx}$) tendo-se obtido os valores 26 mM e 12 x $10^{-4}$M/min respectivamente.

4.1.5. Determinação da energia de ativação ($E_a$)

A energia de ativação da reação foi determinada pela projeção log vel versus temperatura$^{-1}$ (Figura 4.4.), tendo sido obtido o valor de 11,2 Kcal/mol.

4.2. Estudos Cinéticos de Emissão de Luz

A oxidação aeróbica do BPA é acompanhada de emissão de luz detectável em um contador de fótons (Figura 4.5).

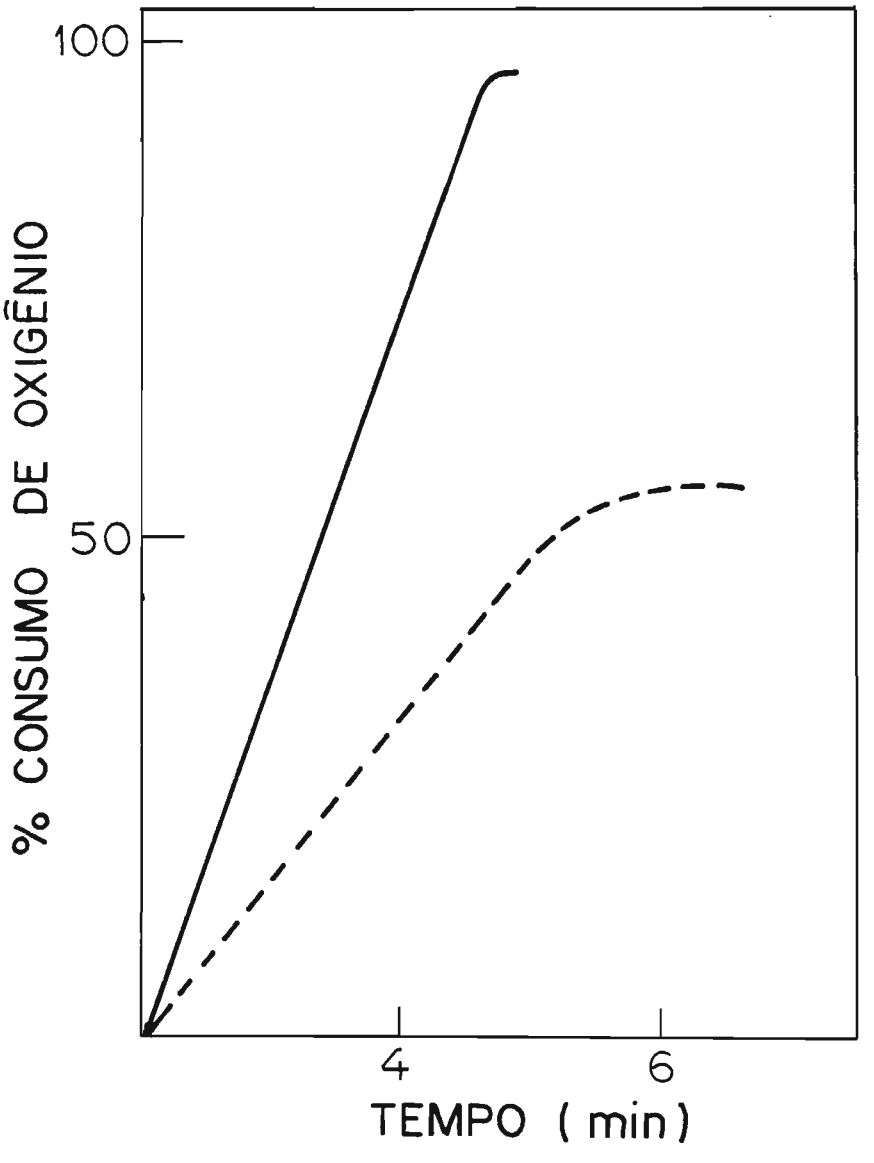



FIGURA 4.2. Consumo de oxigênio em função do tempo da oxidação aeróbica do sistema BPA (10 mM)/$O_2$ por ( — ) HRP (2 μM) e (---) hemina (6 μM) em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 35°C.

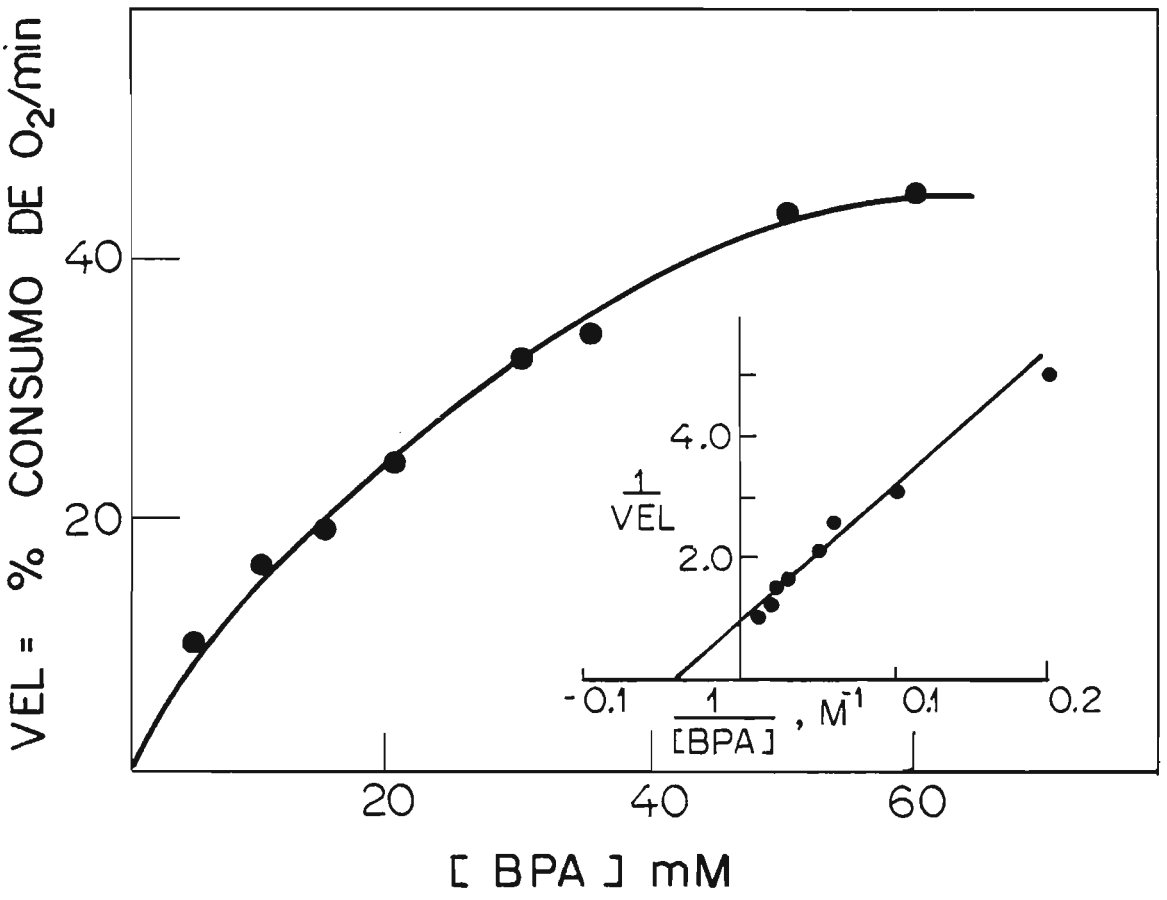



FIGURA 4.3. Efeito da concentração de BPA na velocidade de consumo de oxigênio do sistema BPA/HRP (1 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 36°C. Na figura inserida temos as projeções dos duplos-recíprocos da mesma figura.

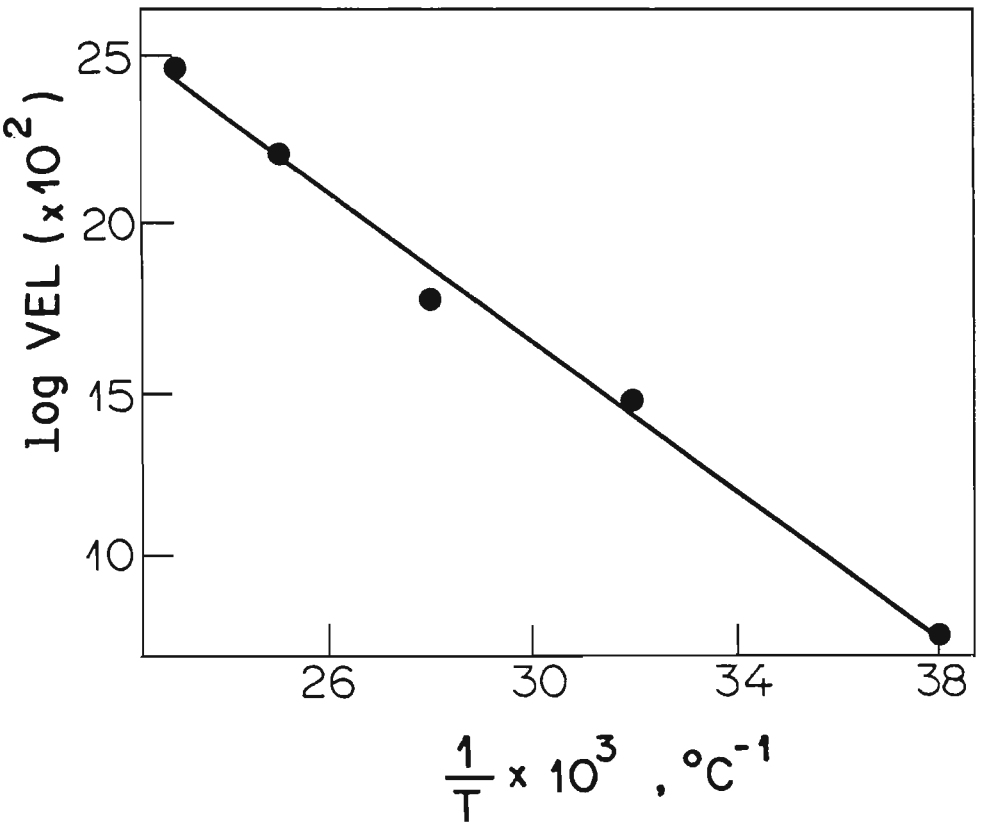



FIGURA 4.4. Projeção de Arhenius para a oxidação aeróbica do sistema BPA (40 mM)/HRP (1 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,6 M; pH 7,4.

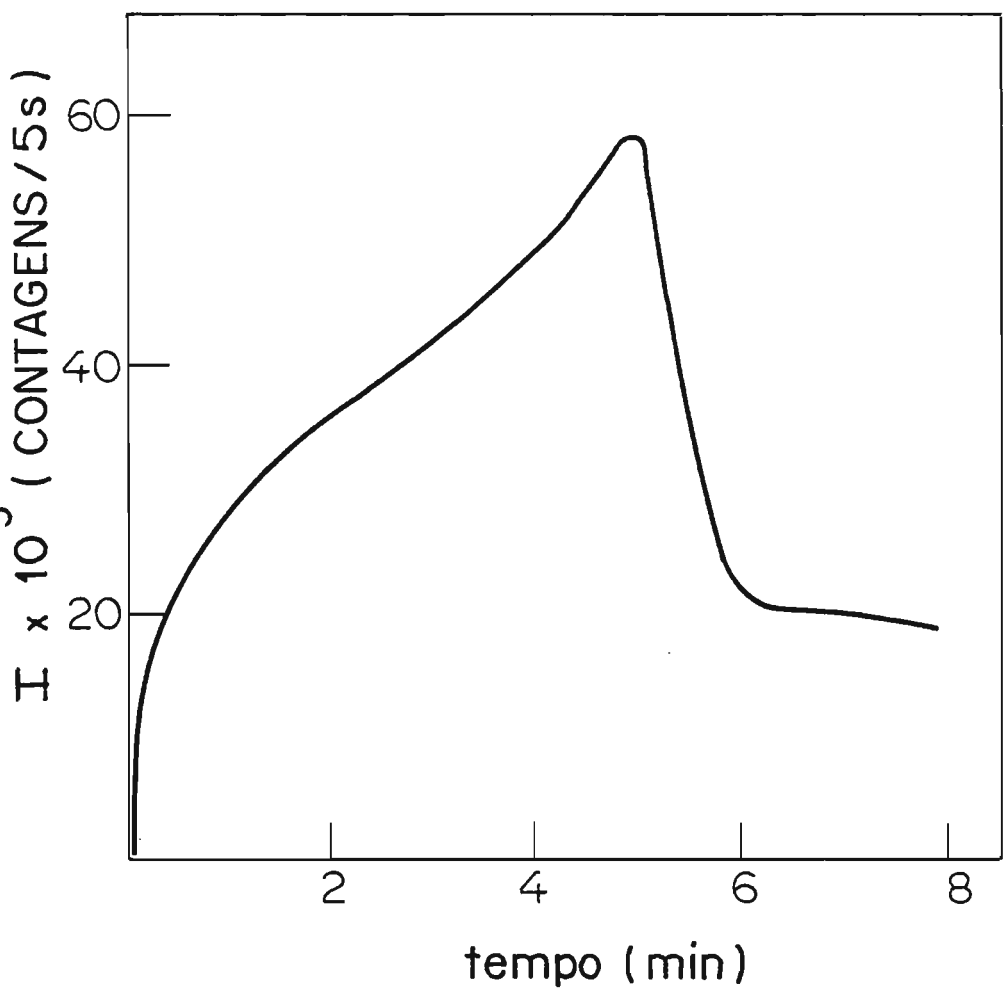



FIGURA 4.5. Intensidade de quimiluminescência em função do tempo do sistema BPA (15 mM)/HRP (1 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 37°C.

4.2.1. Correlação entre o consumo de oxigênio e a emissão de luz

A Figura 4.6 mostra a existência de correlação entre a velocidade de consumo de oxigênio e a emissão total (integrada) de luz. Isto é consistente com a suposição de que a espécie excitada está sendo gerada pela reação principal e não em algum processo secundário.

4.2.2. Efeito da concentração de substrato na cinética de emissão de luz do sistema

A Figura 4.7 mostra o efeito da concentração de BPA na intensidade de emissão de luz. Observa-se um aumento da intensidade de emissão com o aumento da concentração de substrato, até atingir-se um máximo. Para concentrações elevadas de substrato, nota-se uma queda de emissão, provavelmente porque começa a ocorrer reabsorção de luz pelas moléculas de substrato. Para efeito de comparação, foi colocado na mesma figura o efeito da concentração de substrato na velocidade de consumo de oxigênio. Como inserção temos a projeção dos duplos recíprocos.

4.2.3. Espectro de quimiluminescência do produto gerado na reação enzimática

O espectro de emissão de luz mostra uma banda larga de emissão na região entre 430-500 nm (Figura 4.8). Para efeitos de comparação, mostramos na mesma figura, o espectro de emissão da acetona triplete ($\lambda_{max.}$ = 430 nm, Becharra e colaboradores, 1979).

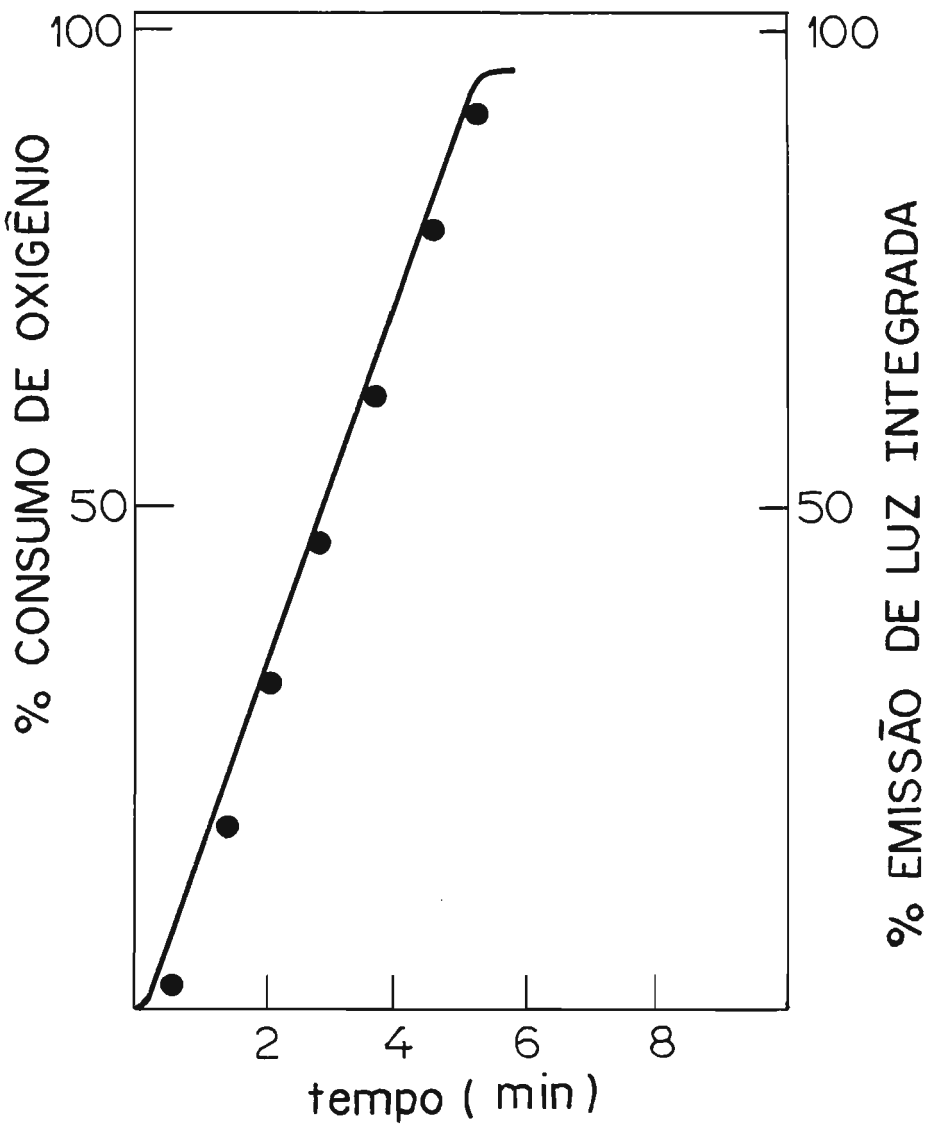



FIGURA 4.6. Correlação entre (——) consumo de oxigênio e (O) emissão de luz em função do tempo para o sistema BPA (10 mM)/HRP (1 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 35°C.

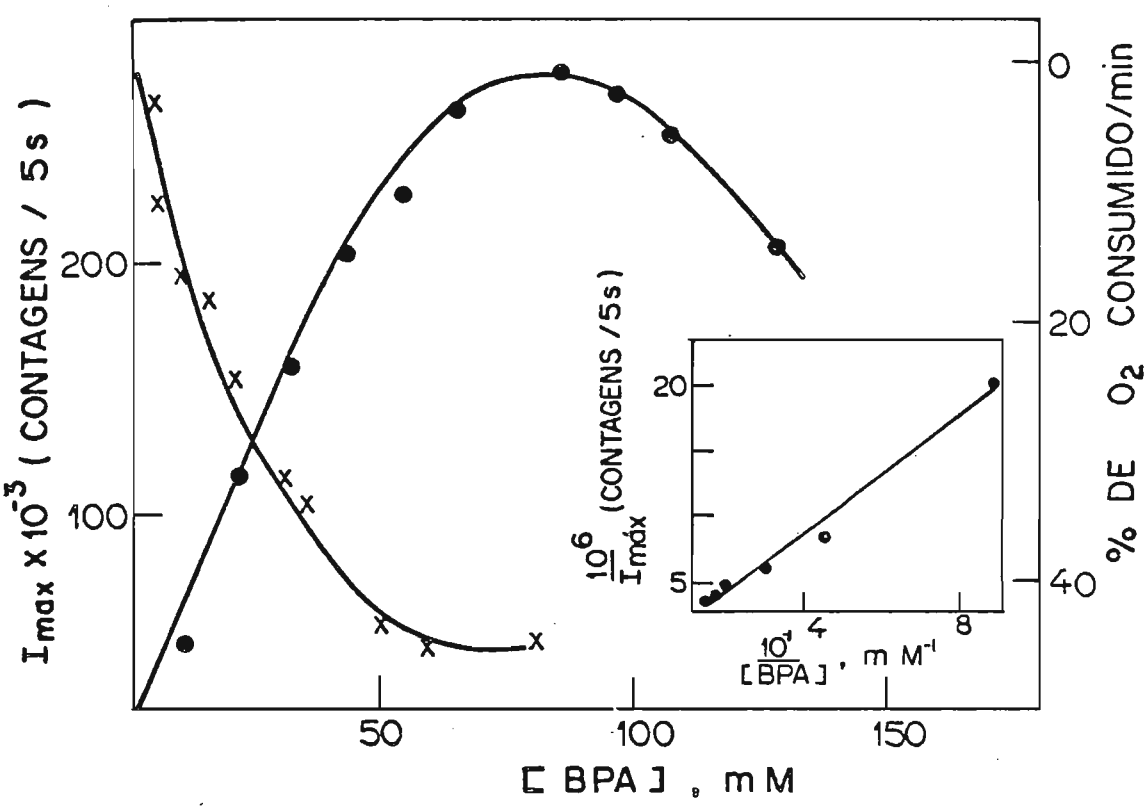



FIGURA 4.7. Efeito da concentração de BPA na (O) intensidade de quimiluminescência e no (X) consumo de $O_2$ em função do tempo para o sistema BPA/HRP (1 µM)/ $O_2$ em tampão fosfato 0,6 M; pH 7,4, T = 36°C. Na figura inserida apresentamos o gráfico dos duplos-recíprocos no caso da intensidade de quimiluminescência.

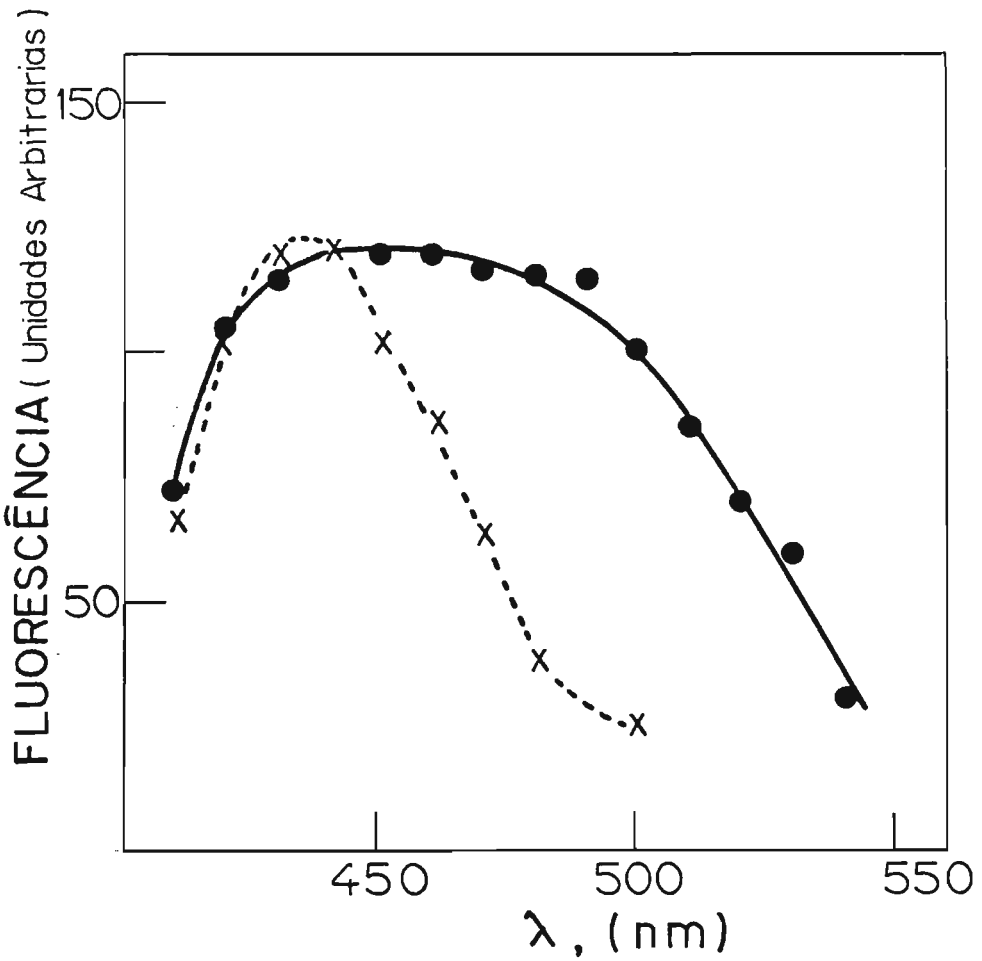



FIGURA 4.8. Espectro de quimiluminescência, corrigido segundo curva resposta da fotomultiplicadora, do sistema (o) BPA (40 mM)/HRP (1 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 37°C e da (x) termólise do TMD a 53°C sob $N_2$ (Bechara e colaboradores,1979).

4.2.4. Transferência de energia

4.2.4.1. Transferência de energia para sensitizadores emissivos

O estudo do sistema com o aceptor emissivo DBAS, estritamente relacionado ao conhecido aceptor para espécies triplete, o DBA (Belyakov e Vassil'ev, 1970; Berenfeld e colaboradores, 1970; Wilson e Schaap, 1971; Wilson, 1976), mostra uma intensificação da emissão de luz. Ao contrário, a adição de DPAS (contador de singletes; Wilson e Schaap, 1971) leva a uma redução drástica de emissão de luz (Figura 4.9). Pela análise do gráfico de duplos recíprocos do efeito do DBAS na emissão do sistema (Figura 4.10) obtem-se um valor de $k_{ET}\tau^{o} = 1,8 \times 10^{5}\ M^{-1}$, a partir do quociente $Y_{intersecção}$/tangente (item 3.4.8.2.). É importante ressaltar que as concentrações de DBAS utilizadas não alteram significativamente a velocidade de consumo de oxigênio. A Figura 4.11 mostra o efeito da adição de várias concentrações de DBAS na cinética de emissão de luz do sistema BPA/HRP/$O_2$.

Foi estudada também a ocorrência de transferência de energia para clorofila a solubilizada em micelas de Brij-35. A Figura 4.12 mostra a projeção dos duplos-recí - procos do efeito da concentração de clorofila a na emissão do sistema BPA/HRP/$O_2$. Pela análise do gráfico obtem-se um valor de $k_{ET}\tau^{o} = 1,3 \times 10^{6}\ M^{-1}$.

4.2.4.2. Estudo da supressão da quimiluminescência

Os supressores de carbonilas triplete como indol, sorbato e p-benzoquinona são bastante eficientes com

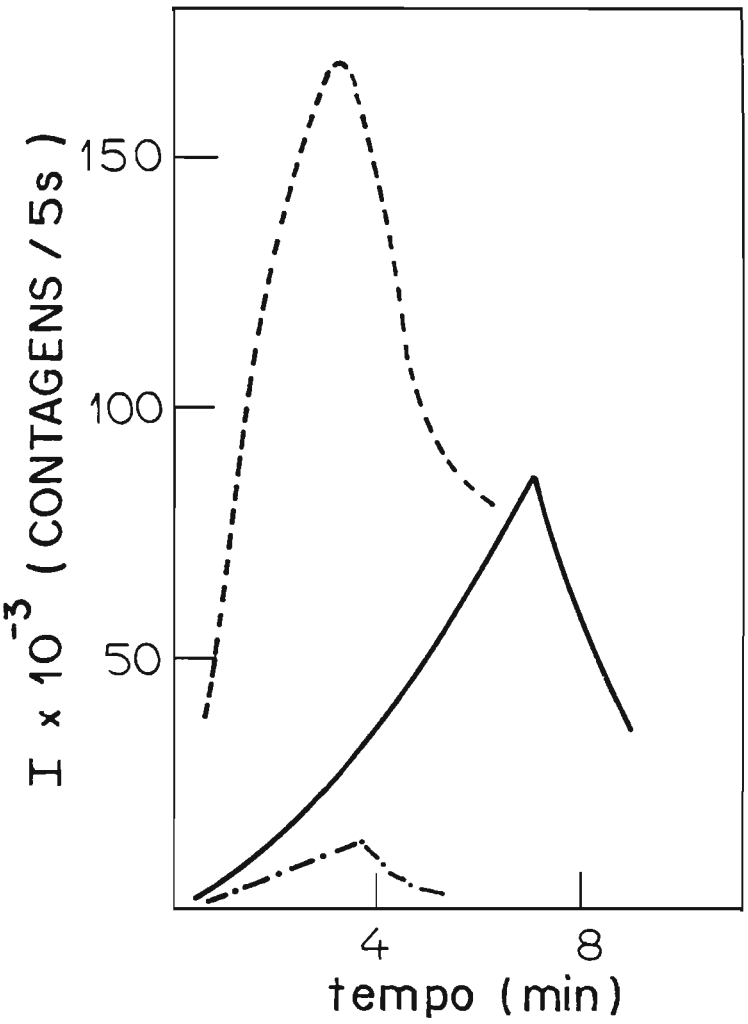



FIGURA 4.9. Efeito da adição de (---) DBAS ($1,3 \times 10^{-5}$ M) e (-o-) DPAS ($1,5 \times 10^{-5}$ M), na cinética de quimi luminescência do sistema (——) BPA (10 mM)/HRP (1 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,3 M; pH 7,4, T = 36°C.

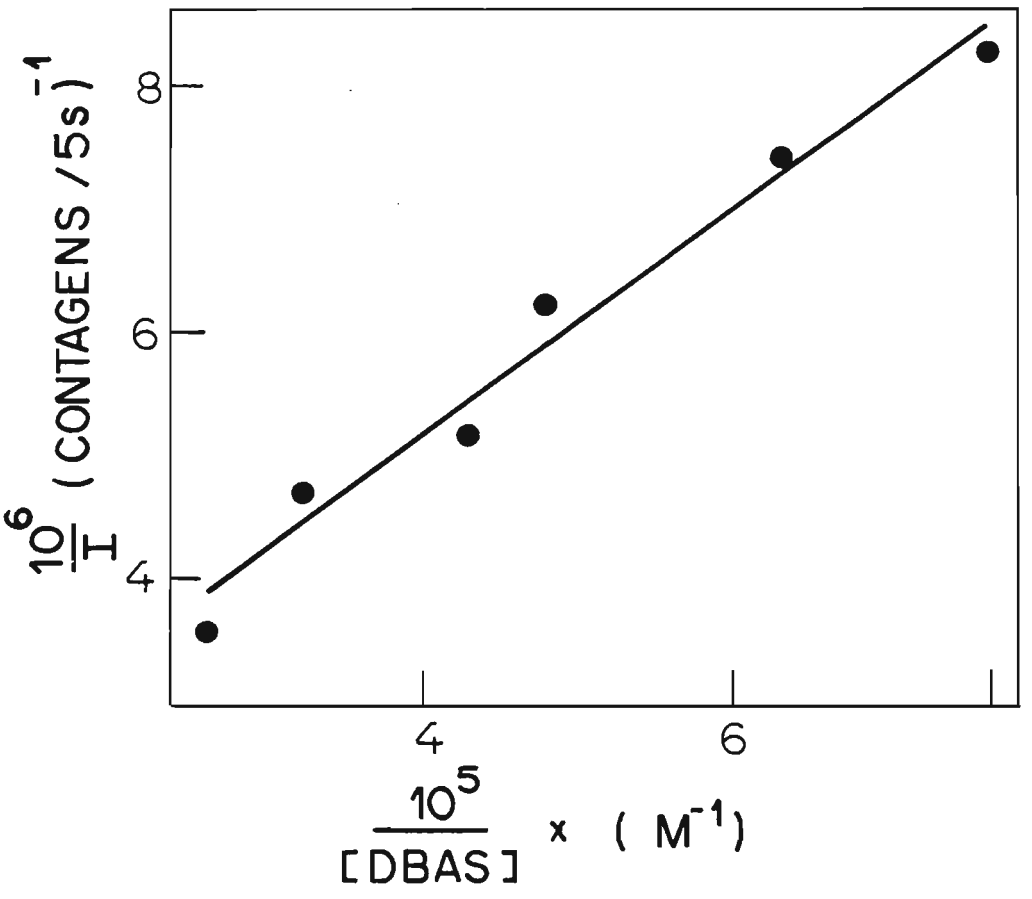



FIGURA 4.10. Gráfico de duplos recíprocos do efeito da concentração de DBAS na emissão quimiluminescente do sistema BPA (40 mM)/HRP (1 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,6 M; pH 7,4; T = 36°C.

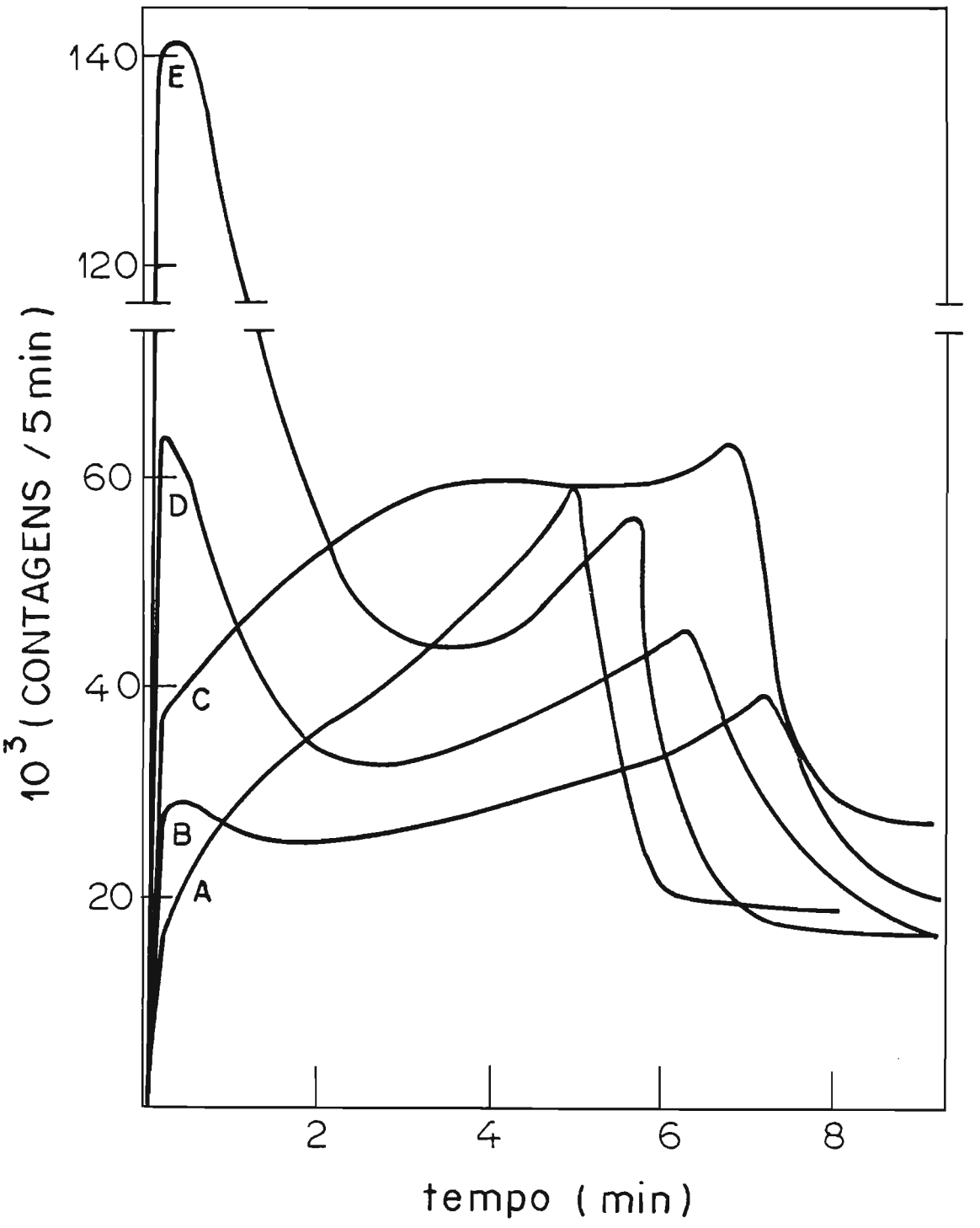



FIGURA 4.11. Efeito da adição de DBAS na cinética de emissão quimiluminescente do sistema BPA (40 mM)/HRP ( 1 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,6 M; pH 7,4. T = 36°C. (A) sem DBAS e (B), (C), (D) e (E) com concentrações de 1,3; 3,1; 2,6; 5,2 x $10^{-6}$ M de DBAS, respectivamente.

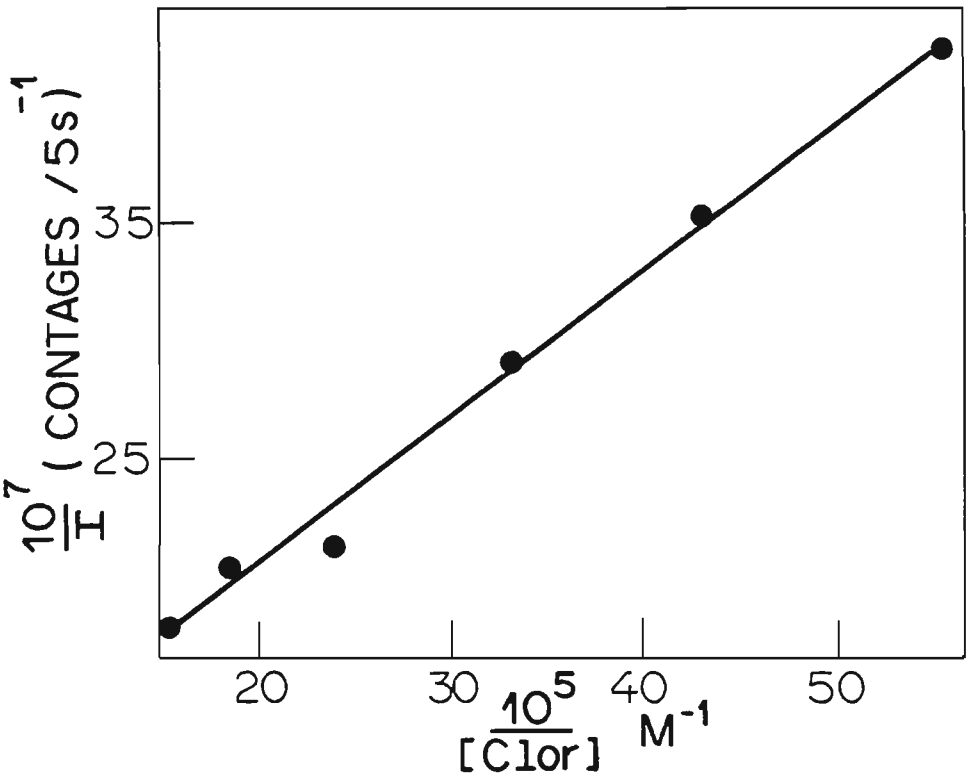



FIGURA 4.12. Gráfico de duplos-recíprocos do efeito de clorofila a na emissão do sistema BPA (40 mM)/HRP (1 μM)/$O_2$ em Brij-35 (0,2%) em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 38°C.

relação ao sistema BPA/HRP/$O_2$ (Figuras 4.13, 4.14 e 4.15). A Tabela 4.3. mostra as constantes de Stern-Volmer ($kq^o$) obtidas pela análise destas figuras e comprova esses valores com os correspondentes $kq^o$ para a acetona triplete gerada pelo sistema IBAL/HRP/$O_2$ (Bechara e Cilento, 1984) e da termólise do tetrametildioxetano (Catalani e Bechara, 1984).

Tabela 4.3. Comparação das constantes de Stern-Volmer obtidas pelo sistema IBAL/HRP/$O_2$ e pela termólise de tetrametildioxetano (TMD) com aquelas obtidas com o sistema BPA/HRP/$O_2$

| Supressor | $10^{-3}$ $kq^o$, $M^{-1}$ | Fonte de espécie triplete $10^{-3}$ $kq^o$, $M^{-1}$ | |
|---|---|---|---|
| | BPA/HRP | IBAL/HRP | TMD($H_2O$) |
| Ácido sórbico | 2 | 6 | 5 |
| Indol | 100 | 30 | 4 |
| p-benzoquinona | 400 | $10^3$ | 20 |

## 4.3. Análise Espectrofotométrica

Com o intuito de se analisar o comportamento da enzima HRP durante a reação, seguiu-se espectrofotometrica - mente, a formação dos compostos intermediários da HRP durante o ciclo catalítico. Foram feitas medidas a 420 nm (formação do composto II de HRP), a 400 nm (desaparecimento de HRP nativa) e a 411 nm (ponto isosbéstico entre os espectros de absorção do composto II de HRP e HRP nativa) (Dunford e Stillman, 1976).

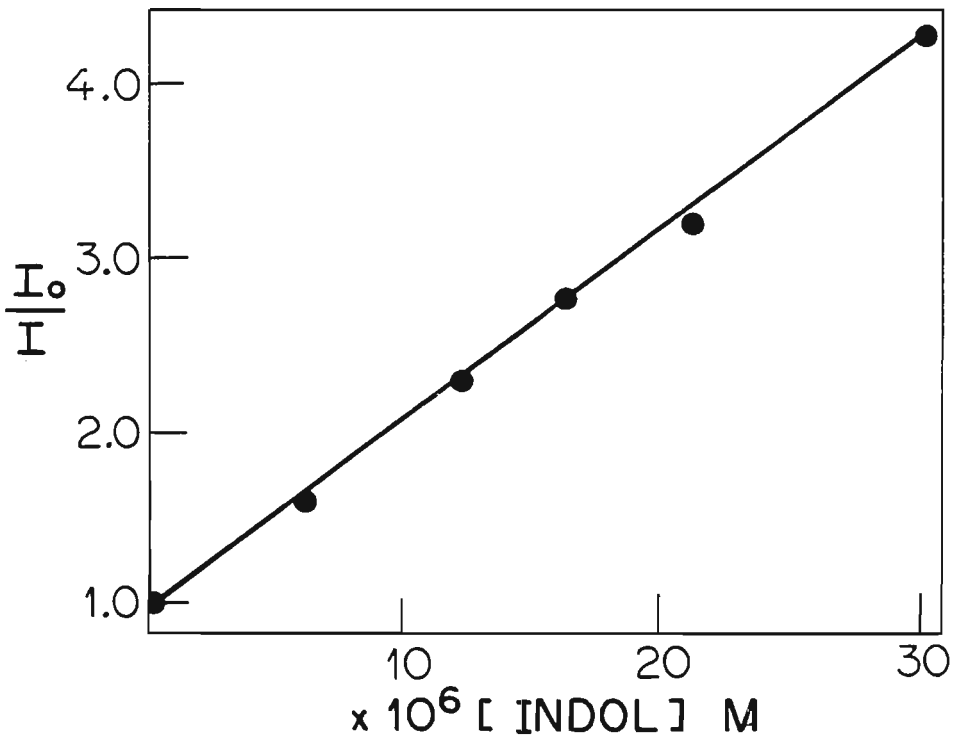



FIGURA 4.13. Projeção de Stern-Volmer para o sistema BPA (30 mM)/HRP (1 μM)/$O_2$ com indol em tampão fosfato 0,6 M; pH 7,4; T = 37°C.

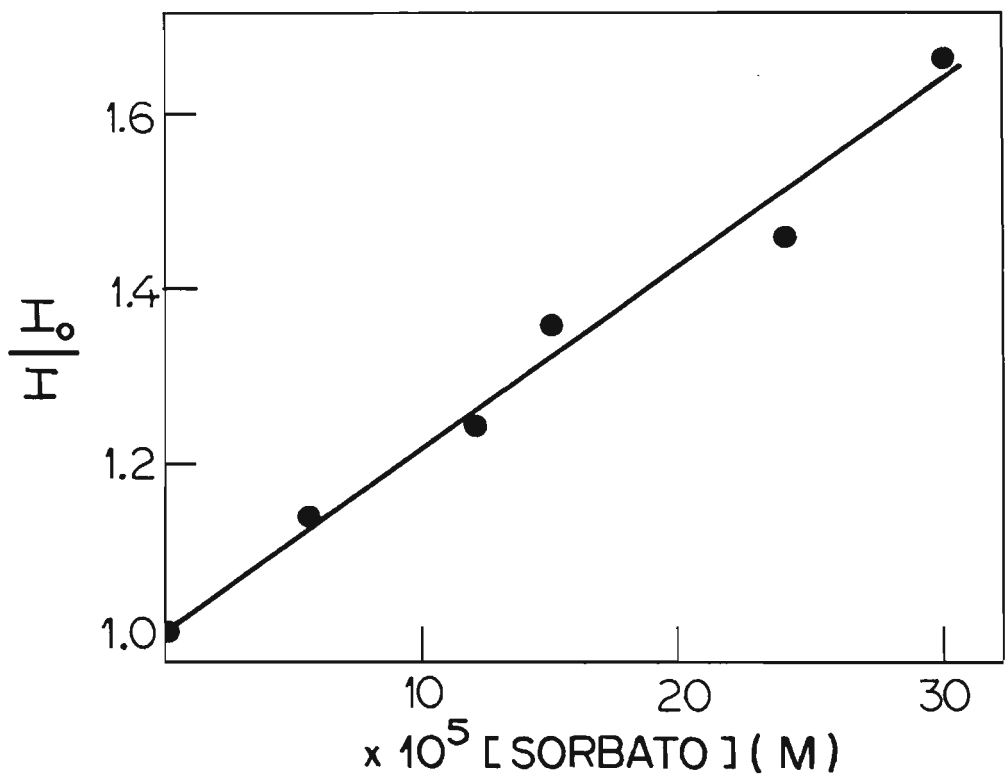



FIGURA 4.14. Projeção de Stern-Volmer para o sistema BPA (30 mM)/HRP (1 μM)/$O_2$ com ácido sórbico em tampão fosfato 0,6 M; pH 7,4, T = 37°C.

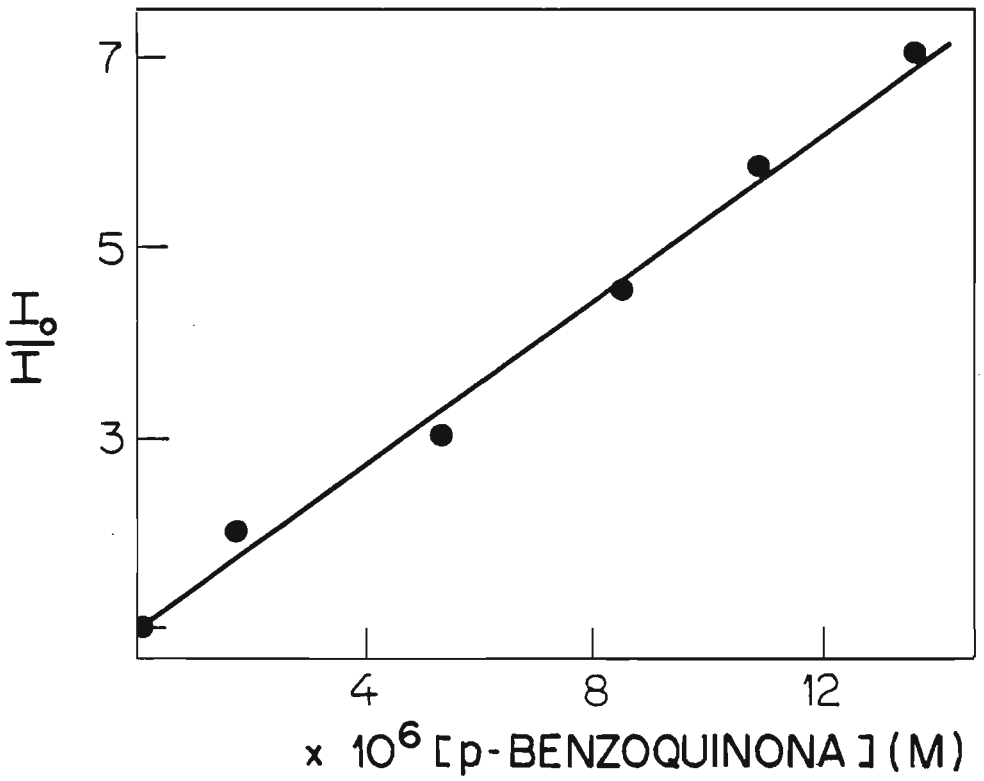



FIGURA 4.15. Projeção de Stern-Volmer para o sistema BPA (30 mM)/HRP (1 μM)/$O_2$ com p-benzoquinona em tampão fosfato 0,6 M; pH 7,4; T = 37°C.

A Figura 4.16 mostra um aumento da absorbância a 420 nm e uma diminuição de absorbância a 400 nm. Após o término de reação, observamos um decaimento a 420 nm e aumento em 400 nm. Durante a reação a absorbância no ponto isosbéstico permanece constante. Estes resultados estão coerentes com a suposição de que durante a reação a enzima cicla entre peroxidase nativa e peroxidade composto II.

## 4.4. Verificação da Possível Participação de Outras Espécies Ativas na Reação Enzimática: $^1O_2$; $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$; $H_2O_2$ e $OH^{\cdot}$

Estudamos o consumo de oxigênio e a emissão de luz do sistema BPA/HRP/$O_2$ na presença de agentes sequestradores de radicais (Tabela 4.4). A adição de manitol (Halliwell, 1977) não afeta o consumo nem a emissão de luz do sistema indicando portanto uma não participação de $OH^{\cdot}$. Outra possibilidade seria a formação de $^1O_2$, porém a adição de DABCO (Durán, 1982) ou histidina (Nilsson e colaboradores, 1972), 2 mM, não altera nenhuma das medidas estudadas.

Outra possibilidade seria a participação de $H_2O_2$. Neste caso observamos com concentrações da ordem de 4,5 µM de catalase (Nicholls e Schombaum, 1963), uma grande redução na emissão de luz. Tal efeito leva-nos a acreditar que tal espécie esteja participando efetivamente da reação. De fato, para o sistema IBAL/HRP/$O_2$, a concentração de $H_2O_2$ é um fator muito importante, uma vez que esta espécie participa como iniciador da reação, isto é transforma HRP nativa em composto I (Baader e colaboradores, 1985).

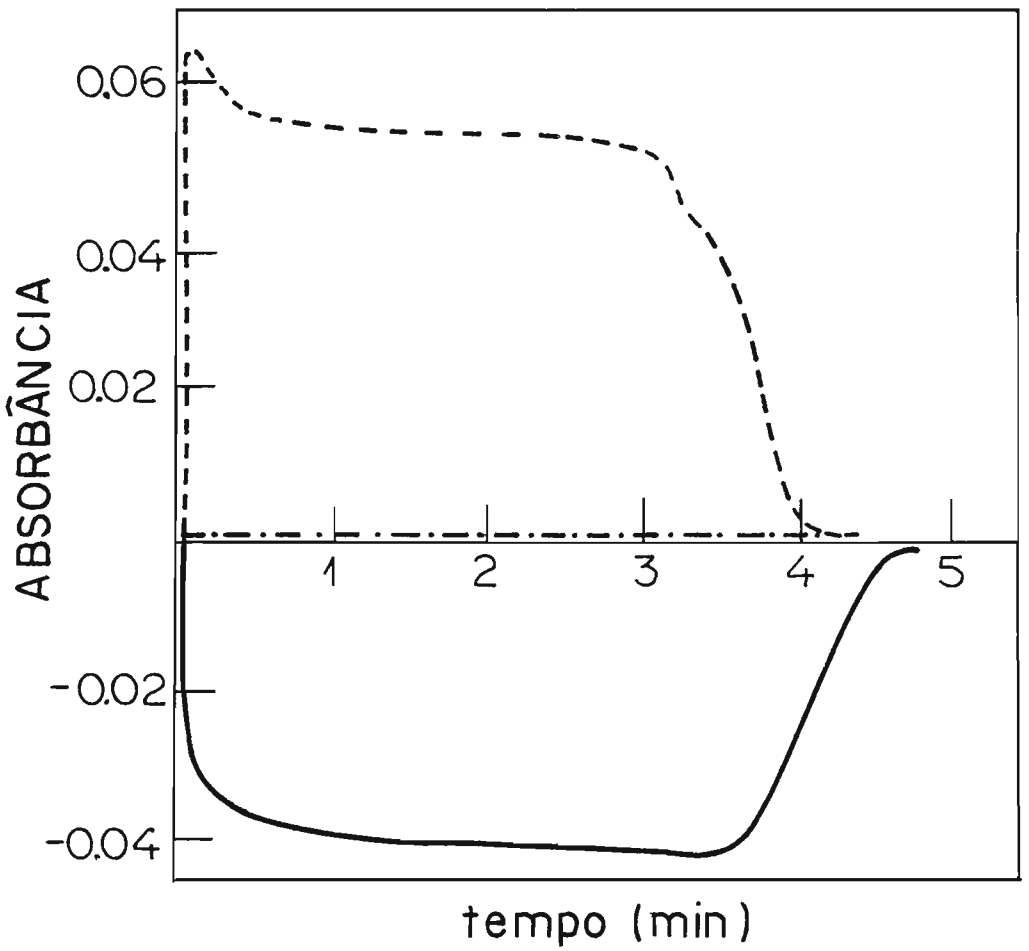



FIGURA 4.16. Variação de absorbância a (---) 420 nm, (-o-)411 nm e (——) 400 nm durante a reação de oxidação aeróbica do sistema BPA (40 mM)/HRP (2 μM)/ $O_2$ em tampão fosfato 0,6 M; pH 7,4; T = 38°C.

Tabela 4.4. Efeito de vários agentes sobre a velocidade de consumo de $O_2$ e/ou sobre a emissão de luz do sistema BPA/HRP/$O_2$

| | Efeito sobre | | |
|---|---|---|---|
| | Consumo de $O_2$ (velocidade) | Emissão de luz (intensidade) | Observação |
| Manitol (100 mM) | 30% redução | nenhum | p/$OH^{\cdot}$ |
| Histidina (2 mM) | nenhum | 7% redução | p/$^1O_2$ |
| DABCO (100 mM) | nenhum | nenhum | p/$^1O_2$ |
| Catalase (0,45 µM) | nenhum | 12% redução | p/$H_2O_2$ |
| (4,5 µM) | 18% redução | 55% redução | p/$H_2O_2$ |
| SOD (0,6 µM) | 56% redução | 40% redução | p/$O_2^{\cdot-}$ |

A adição da enzima SOD (McCord e Fridovich,1968) mostra um efeito bastante drástico tanto no consumo de oxigênio como na emissão de luz. Para testarmos se este tipo de efeito era uma ação inespecífica da adição de proteínas, adicionamos a mesma concentração, 0,6 μM, de soroalbumina bovina à mistura de reação. Não observamos nenhum efeito com a adição desta última proteína. Com o intuito de esclarecer o efeito de SOD nesta reação, a enzima foi denaturada com calor, até não apresentar mais atividade na dismutação de $O_2^{\cdot-}$ (o método empregado para avaliar a atividade da SOD foi o descrito por Maral e colaboradores (1977)). Mesmo com a enzima denaturada continuamos observando a redução do consumo de oxigênio e de emissão de luz.

Em vista destes resultados, estudamos o efeito da adição de SOD nativa e denaturada sob o ciclo da enzima HRP, ocorrido durante a reação. A Figura 4.17 mostra que a enzima SOD mesmo denaturada diminui em cerca de duas vezes a velocidade de conversão HRP II — HRP nativa. Concluimos portanto que o efeito de SOD no sistema não é em dismutar $O_2^{\cdot-}$ mas um efeito específico desta proteína.

## 4.5. Análise dos produtos da reação

As soluções de BPA/HRP/$O_2$ (triplicata) foram incubadas como descrito no item 3.4.5. e a acetona foi tentativamente identificada por cromatografia em camada delgada (Tabela 4.5).

A isopropilformamida foi tentativamente identificada por cromatografia gasosa (método descrito no item 3.4.5.). Os resultados estão mostrados na Tabela 4.6.

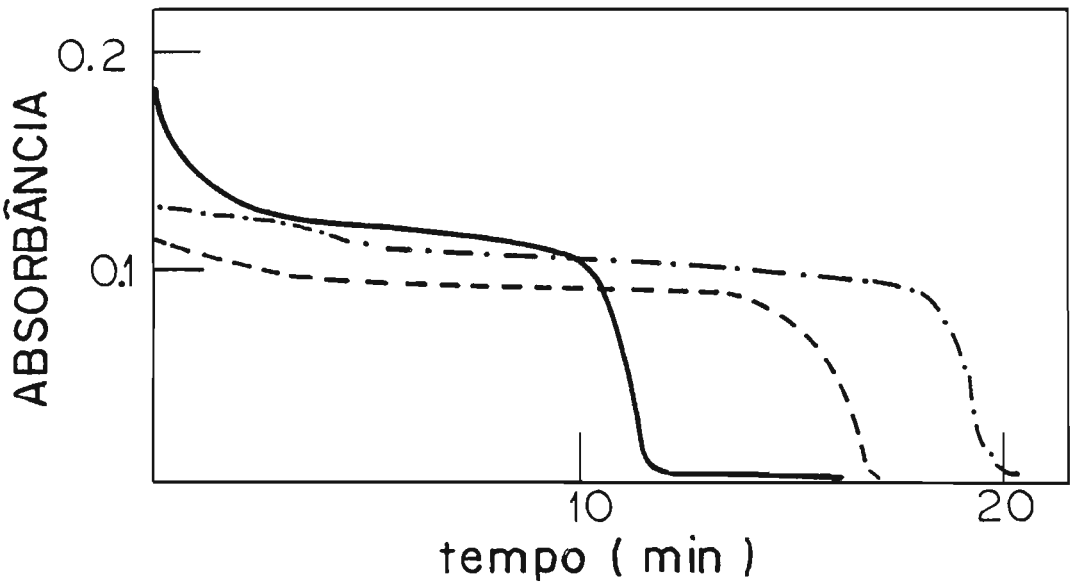



FIGURA 4.17. Variação da absorbância a 420 nm do sistema BPA (40 mM)/HRP (2 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 38°C ( ——); com adição de $5,6x10^{-6}$ M SOD (---) e com adição de $5,6 \times 10^{-7}$ M SOD denaturada (-o-).

Tabela 4.5. Análise cromatográfica em camada delgada

| Amostra | $R_f$ | |
|---|---|---|
| 2,4-dinitrofenilhidrazona de acetona | 0,10 | - |
| 2,4-DNPH + BPA | - | 0,18 |
| BPA/HRP/$O_2$ | 0,10 | 0,18 |

Placa: Silicagel-60.
Solvente: benzeno-n-hexano (10:1).

Tabela 4.6. Análise da isopropilformamida por C.G.

| Amostra | Tempo de retenção (min) | |
|---|---|---|
| | Pico 1 | Pico 2 |
| Isopropilformamida (padrão) | | 7,9 |
| Acetona (padrão) | 1,3 | |
| BPA (padrão) | 1,3 | |
| BPA/HRP/$O_2$ | 1,3 | 7,9 |

Coluna Porapak: comprimento 1,2 m; diâmetro = 3/16", temperatura 150°C.
Temperatura do vaporizador = 210°C
Temperatura do detector = 240°C
Gás de arraste, $H_2$, fluxo = 50 ml/min
Detector de ionização de chama.

Pela análise da Tabela 4.6, concluimos ser a isopropilformamida um dos produtos da reação. Destacamos, que não foi possível identificar acetona por cromatografia gasosa, pois não obtivemos uma boa separação (em diversas condi

ções experimentais testadas), do pico da acetona e BPA padrão.

4.6. Cálculo do Rendimento da Reação

Os cálculos de rendimento da reação foram baseados nos rendimento de acetona (item 3.4.6). Foi obtido o seguinte valor de rendimento de acetona (triplicata ) = 69%$\pm$6,5. Concluimos portanto que a formação de acetona ocorre durante a reação principal e não é portanto um produto secundário.

5. Estudos Comparativos de Emissão de Luz e Consumo de Oxigênio dos Sistemas: N-Isobutilidenometilamina (i-BMA), N-sec-Butilidenometilamina (sec-BMA), N-Isobutilideno-L-Valina (BVA) e N-(2)-Piridilisobutil-imina (PBI)

Com o intuito de se obter algumas informações sobre a cinética de consumo de oxigênio e emissão de luz de outras bases de Schiff para comparar tais resultados com os obtidos com o BPA, testamos estes parâmetros para os sistemas i-BMA; sec-BMA; BVA e PBI/HRP/$O_2$.

5.1. Cinética de consumo de oxigênio

A Figura 5.1 mostra a cinética de consumo de oxigênio para os quatro sistemas estudados. Observamos em todos os casos um rápido consumo de oxigênio. Ressaltamos, que para o caso do PBI foi observado um consumo de oxigênio de cerca de 30% por minuto na ausência de HRP. Portanto, esta substância sofre autoxidação bastante rápida. As medidas de consumo de oxigênio para o sistema BVA/HRP/$O_2$ foram feitas a 25$^{o}$C, pois acima de 35$^{o}$C o consumo fica extremamente rápido não sendo possível sua monitoração.

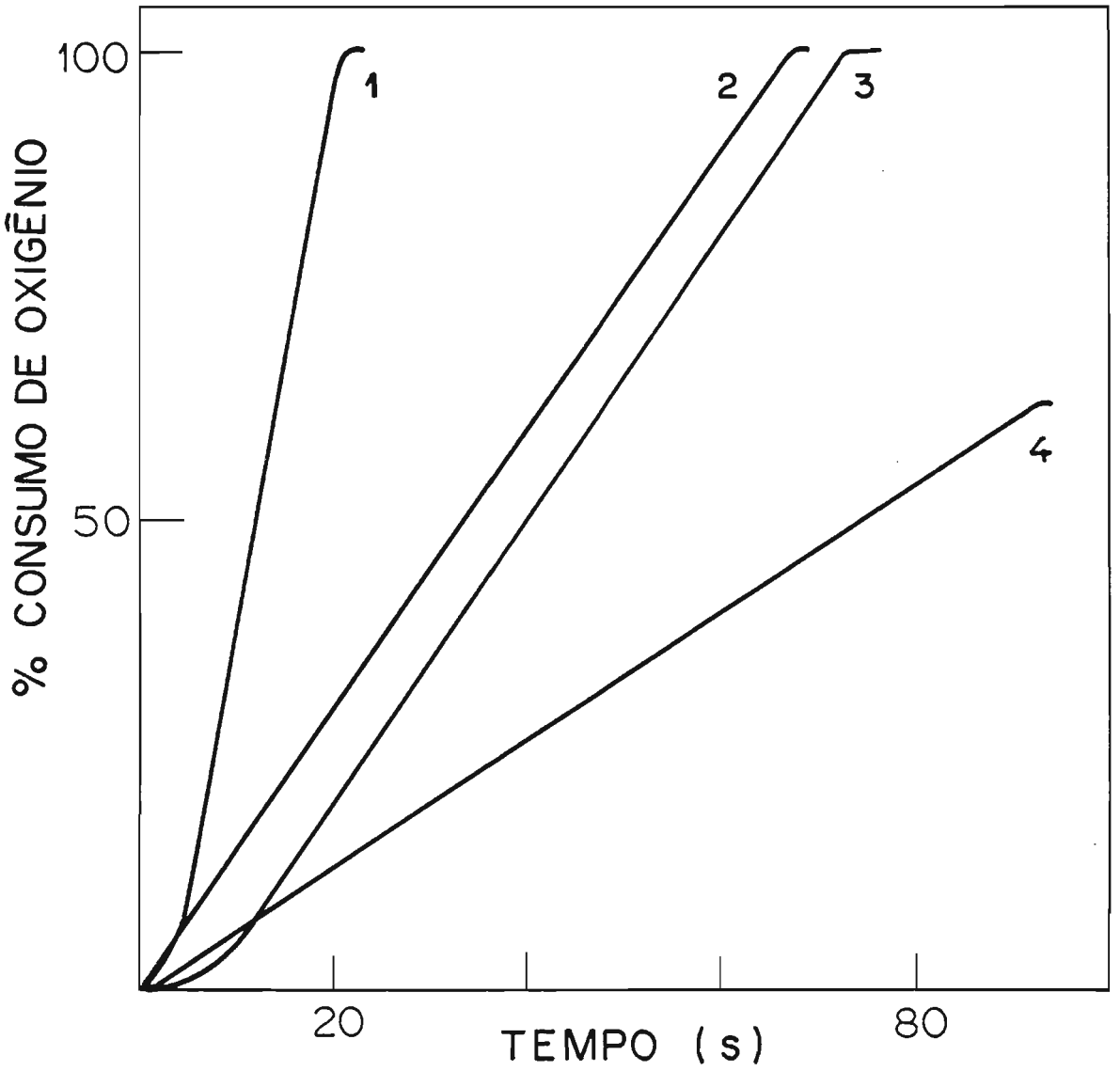



FIGURA 5.1. Consumo de oxigênio em função do tempo dos sistemas:
(1) PBI (10 mM/HRP(0,08 μM)/$O_2$, T = 40°C;
(2) sec-BMA (10 mM)/HRP (2 μM)/$O_2$, T = 35°C;
(3) i-BMA (30 mM)/HRP (2 μM)/$O_2$, T = 40°C e
(4) BVA (10 mM)/HRP (2 μM)/$O_2$, T = 25°C.
Todos os sistemas encontram-se em tampão fosfato 0,6; pH 7,4.

## 5.2. Cinéticas de emissão de luz

A Figura 5.2 mostra a intensidade de emissão de luz dos sistemas i-BMA; sec-BMA e BVA/HRP/$O_2$. Para o caso do sec-BMA e BVA não foi possível detectar a intensidade máxima de emissão. Para todas as condições testadas a cinética de emissão de luz já mostra um decaimento. A intensidade de emissão de luz do sistema BVA/HRP/$O_2$ é bastante fraca cerca de (30.000 contagens/s). Com o abaixamento de temperatura a fim de se detectar o pico máximo de emissão, não foi possível medir intensidade de luz direta. Em vista de tais resultados, testamos transferência de energia deste sistema para a clorofila. A Figura 5.3 mostra que sistema transfere energia para clorofila a solubilizada em micelas, sendo assim possível detectar considerável emissão de luz.

Nos estudos com a base de Schiff aromática PBI, apesar de ter sido observado consumo de oxigênio, não observamos emissão de luz. Com a adição dos aceptores fluorescentes, 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio (DBAS), eosina e clorofila também não observamos emissão de luz.

## 6. Estudo da Oxidação Aeróbica de Misturas de Incubação de Aminoácidos-Glicolaldeído

### 6.1. Consumo de oxigênio e emissão de luz

Em estudos com misturas de incubação de aldeídos com diversos aminoácidos em solução aquosa Pesek e Frost (1974) detectaram formação de bases de Schiff utilizando espectros de ressonância magnética nuclear. Por estarem estas iminas, em solução aquosa, em equilíbrio com a carbonila

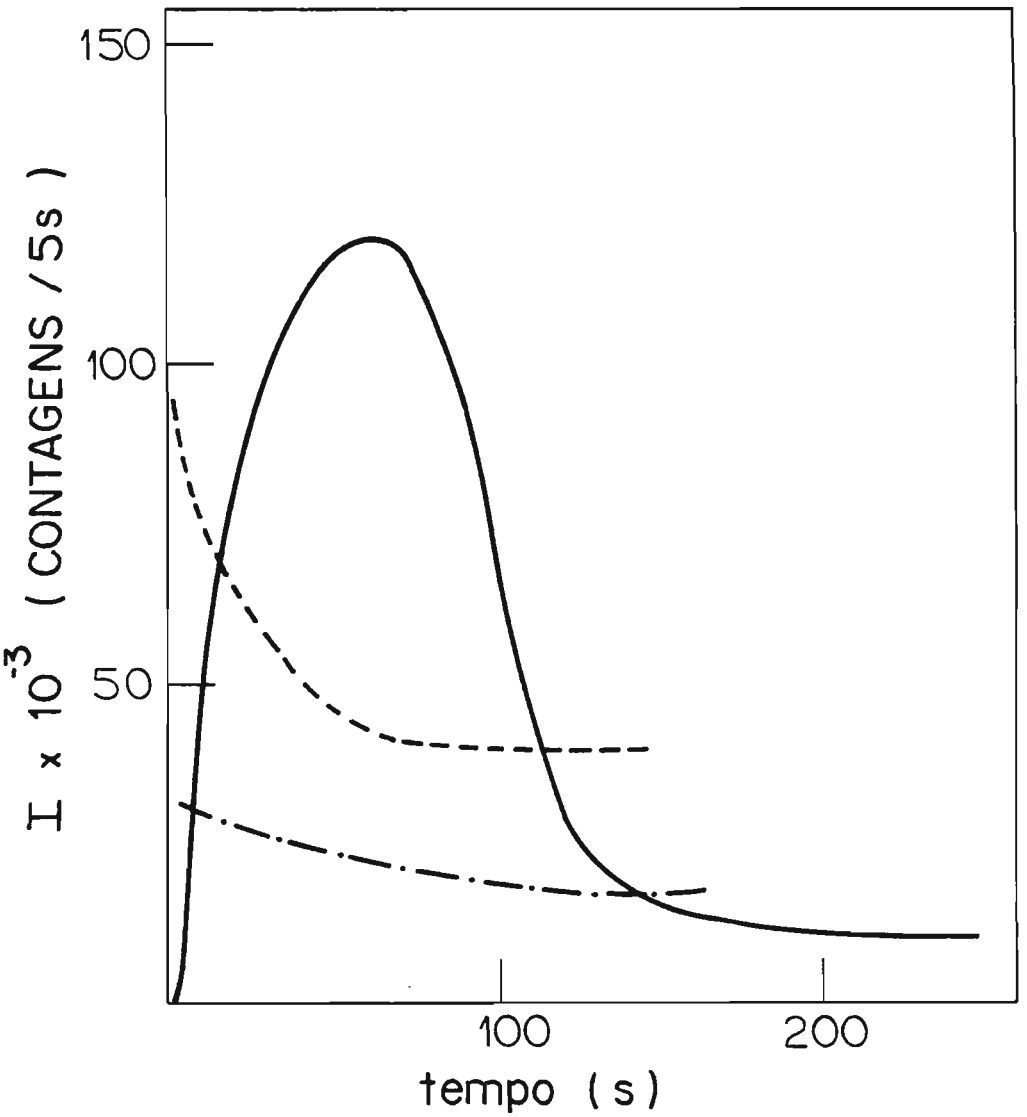



FIGURA 5.2. Intensidade de quimiluminescência em função do tempo dos sistemas: (——) i-BMA (30 mM)/HRP (2 μM)/$O_2$; (---) sec-BMA (30 mM)/HRP (1 M)/$O_2$ e (-o-) BVA (20 mM)/HRP (2 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 40°C.

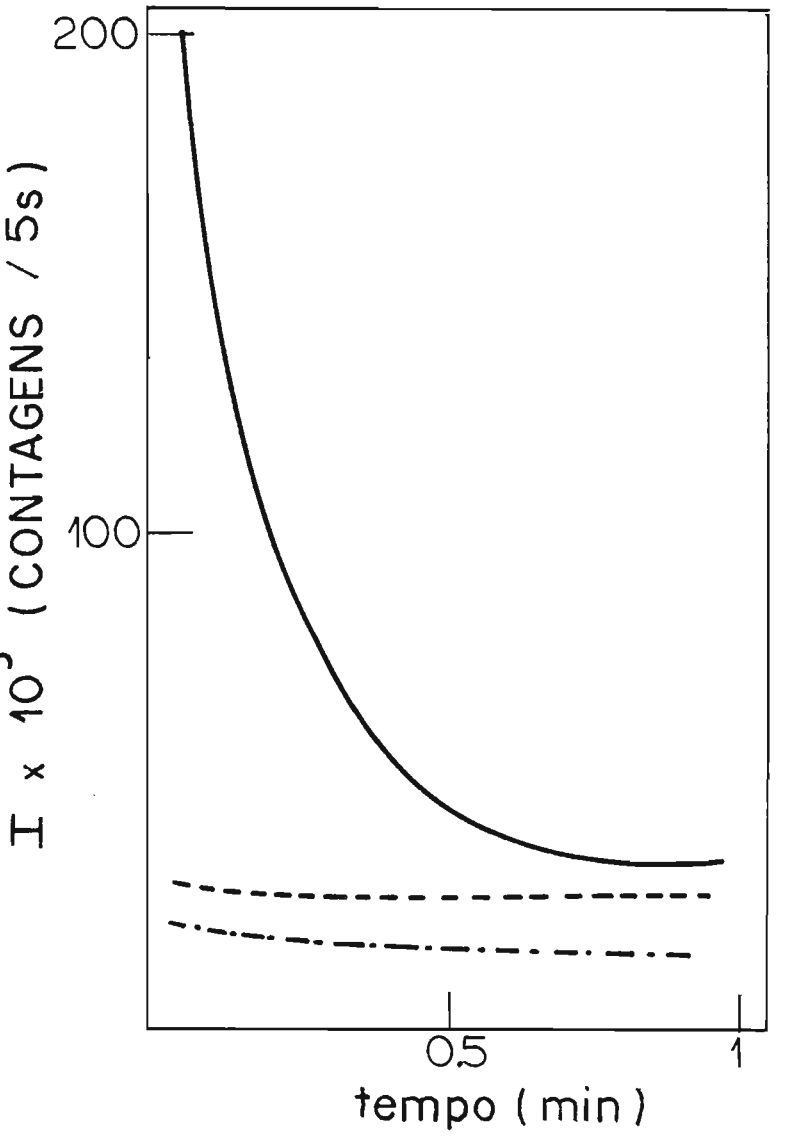



FIGURA 5.3. Intensidade de quimiluminescência em função do tempo do sistema (-o-) BVA (20 mM)/HRP (2 μM)/$O_2$; (——) na presença de clorofila a ($10^{-6}$ M) solubilizada em Brij-35 (0,02%) e (---) mesmo sistema anterior, na ausência de HRP. Todos os sistemas encontram-se em tampão fosfato 0,6M,pH 7,4, T = 40°C.

e amina precursoras, a sua formação é extremamente difícil de ser detectada. A ligação -HC=N- tem um pico de ressonância de próton próximo de 7,5 ppm, utilizando-se TMS como padrão, para iminas alifáticas e próximo de 8,3 ppm para iminas aromáticas.

Em vista dos resultados acima, estudamos a ocorrência de emissão de luz e consumo de oxigênio para diversas misturas de incubação aminoácidos-glicolaldeído.

Como controle, o glicolaldeído foi testado em todos os experimentos, não apresentando nem consumo de oxigênio nem emissão de luz detectável, tanto na presença como na ausência de HRP.

As Figuras 6.1, 6.2. e 6.3 mostram a velocidade de consumo de oxigênio e a emissão de luz das misturas de incubação histidina; arginina e lisina/HRP/$O_2$/$H_2O_2$ respectivamente. Devemos ressaltar que na ausência de HRP os sistemas não são emissivos nem consomem oxigênio. Os controles com os aminoácidos isolados, isto é na ausência de glicolaldeído também não emitem luz nem ocorre consumo de oxigênio.

Peróxido de hidrogênio foi adicionado a todos os sistemas, uma vez que, na sua ausência ocorre um consumo de oxigênio muito lento e emissão rápida de luz.

Com o intuito de obtermos informações sobre efeito da adição de peróxido de hidrogênio na quimiluminescência e na velocidade de consumo de oxigênio das misturas de incubação com aminoácidos e proteínas, utilizamos o sistema fenilalanina/HRP/$O_2$ como modelo. A Figura 6.4 mostra o efeito, na quimiluminescência deste sistema, da adição de concentrações variadas de $H_2O_2$. Observamos um aumento de intensidade de

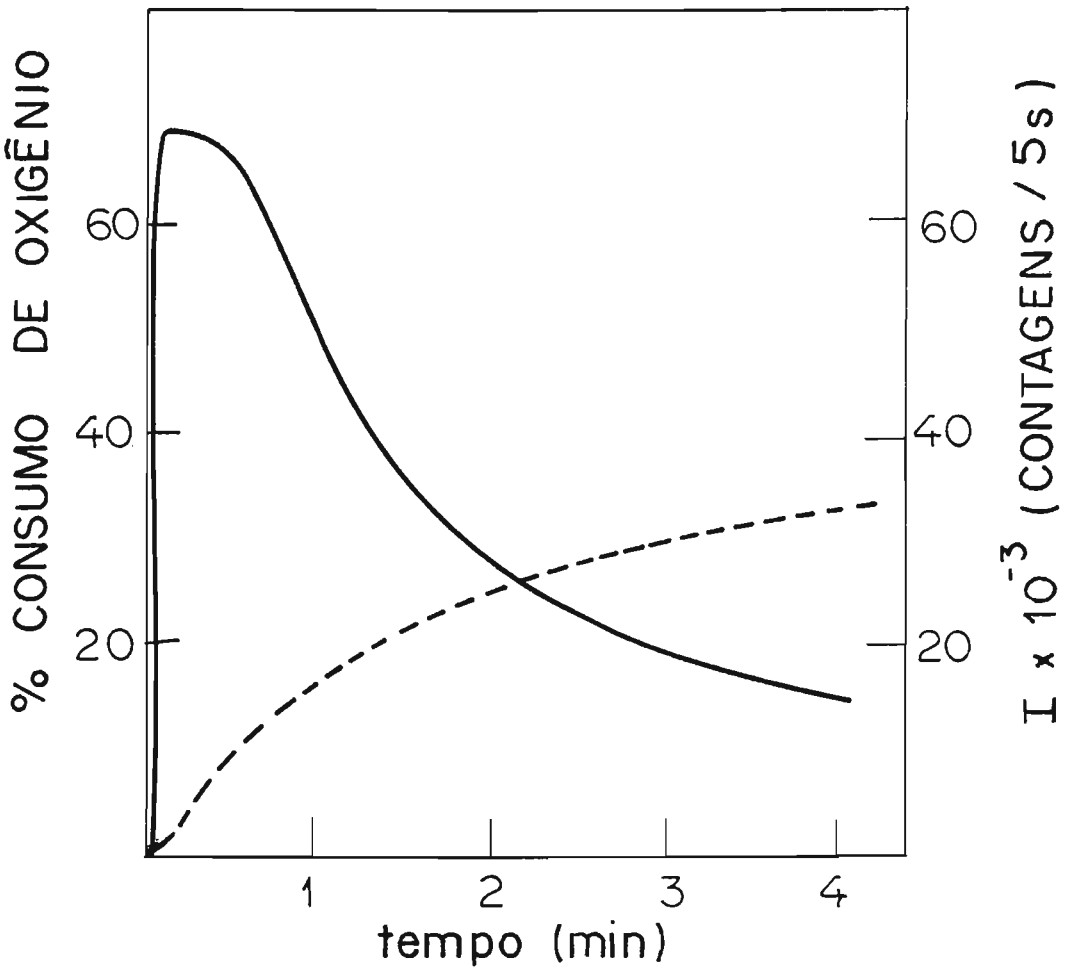



FIGURA 6.1. Consumo de oxigênio (---) e intensidade de quimiluminescência (——) em função do tempo do sistema histidina (10 mM)-glicolaldeido (20 mM)/HRP (2 μM)/$O_2$, $H_2O_2$ (8 x $10^{-3}$ M) em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 37°C.

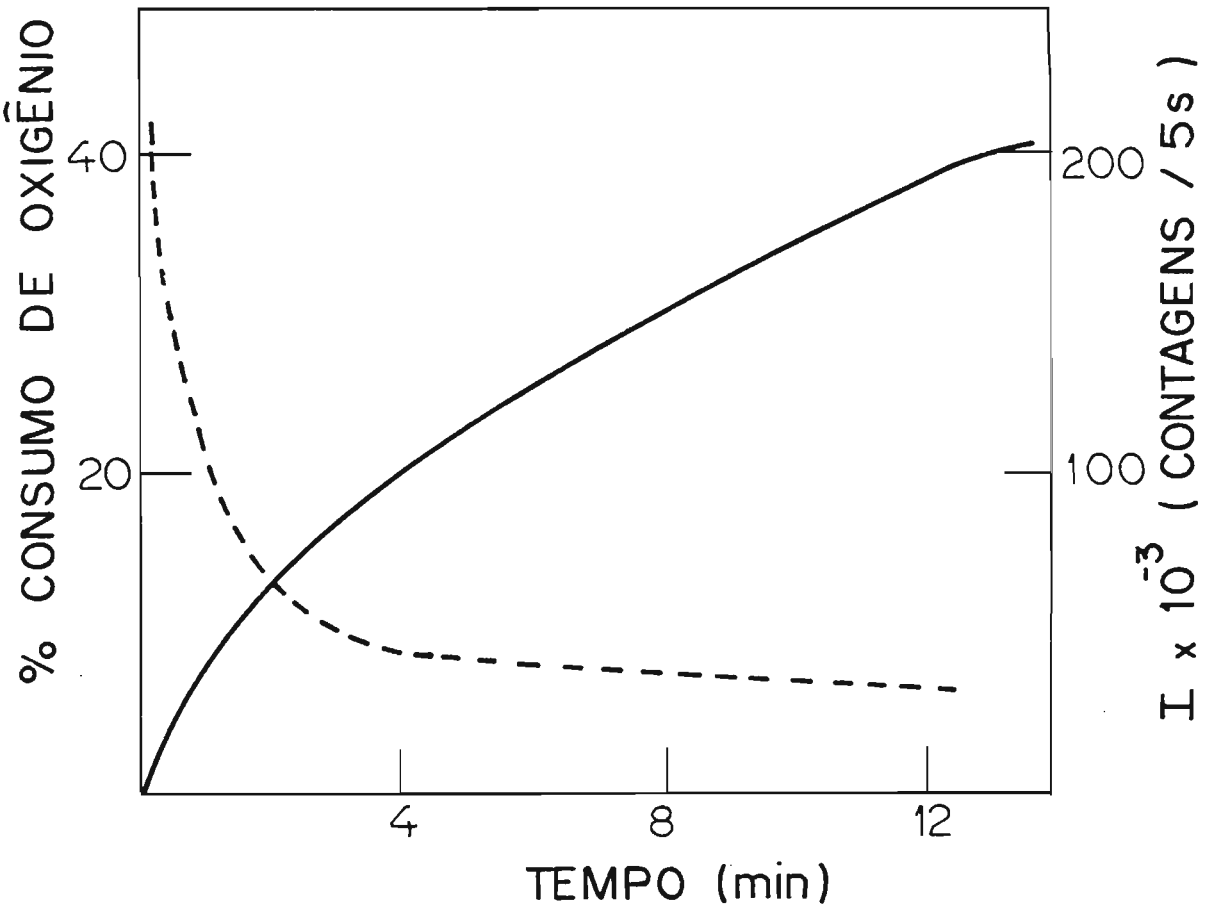



FIGURA 6.2. Consumo de oxigênio (——) e intensidade de quimiluminescência (---) em função do tempo do sistema arginina (20 mM)-glicolaldeído (40 mM)/HRP (2 μM)/$O_2$; $H_2O_2$ ($8 \times 10^{-3}$ M) em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 37°C.

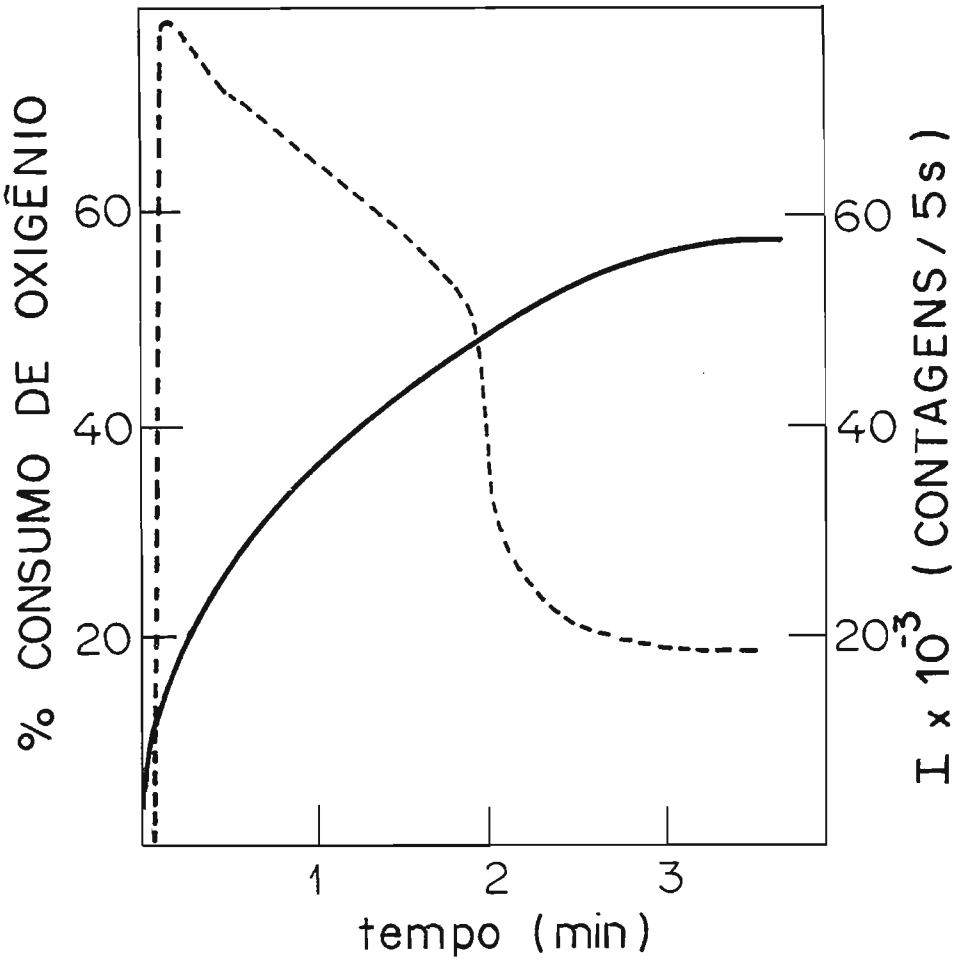



FIGURA 6.3. Consumo de oxigênio (——) e intensidade de quimiluminescência (---) em função do tempo do sistema lisina (10 mM)-glicolaldeído (20 mM)/HRP(2 μM)/$O_2$; $H_2O_2$ (8 x $10^{-3}$ M) em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 37°C.

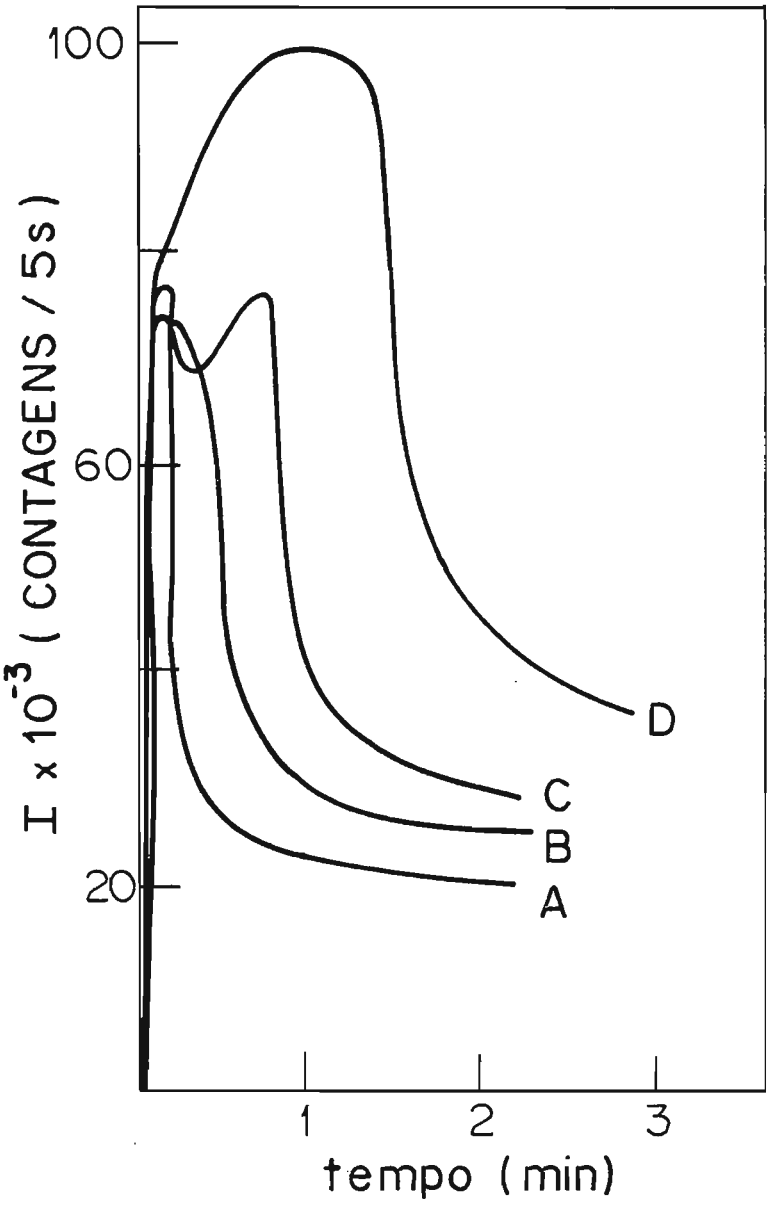



FIGURA 6.4. Efeito da adição de $H_2O_2$ na cinética de emissão de luz do sistema fenilalanina (16 mM)-glicolaldeído (32 mM)/HRP (0,4 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 40°C: (A) sem $H_2O_2$; (B) $H_2O_2$ (2,6 x $10^{-5}$ M); (C) $H_2O_2$ (6,6 x $10^{-5}$ M) e (D) $H_2O_2$ (1,3 x $10^{-4}$ M).

emissão de luz e um prolongamento do máximo de emissão, em contraste com a curva na ausência de $H_2O_2$ na qual observamos uma queda abrupta da emissão. Na Figura 6.5 observamos o mesmo efeito na velocidade de consumo de oxigênio. No início da reação ocorre um consumo rápido provavelmente devido a efeitos de hidroperóxidos acumulados durante o tempo de incubação e após observarmos uma estabilização na reação, apenas ocorrendo um consumo bastante lento de oxigênio. A adição de $H_2O_2$, restaura o consumo de oxigênio, além do patamar indicado.

6.2. Estudo da reatividade de amino-grupo

Com o intuito de estudar, para o caso da lisina qual amino grupo era mais reativo, comparou-se a reatividade do α- e ε-amino grupo com relação a intensidade de quimiluminescência para os sistemas: glicolaldeído /lisina; glicolaldeído/tosil-lisina e glicolaldeído /ácido aminocapróico (Figura 6.6. O α-amino grupo resultou numa intensidade de quimiluminescência cerca de duas vezes menor que o ε-amino grupo. A lisina contendo os dois amino grupos reativos apresentou uma intensidade de quimiluminescência cerca de 5 vezes maior que a tosil-lisina e cerca de duas vezes maior que o ácido aminocapróico. Concluimos portanto que os dois amino grupos podem reagir com o glicolaldeído, sendo entretanto o ε-amino grupo mais reativo que o α.

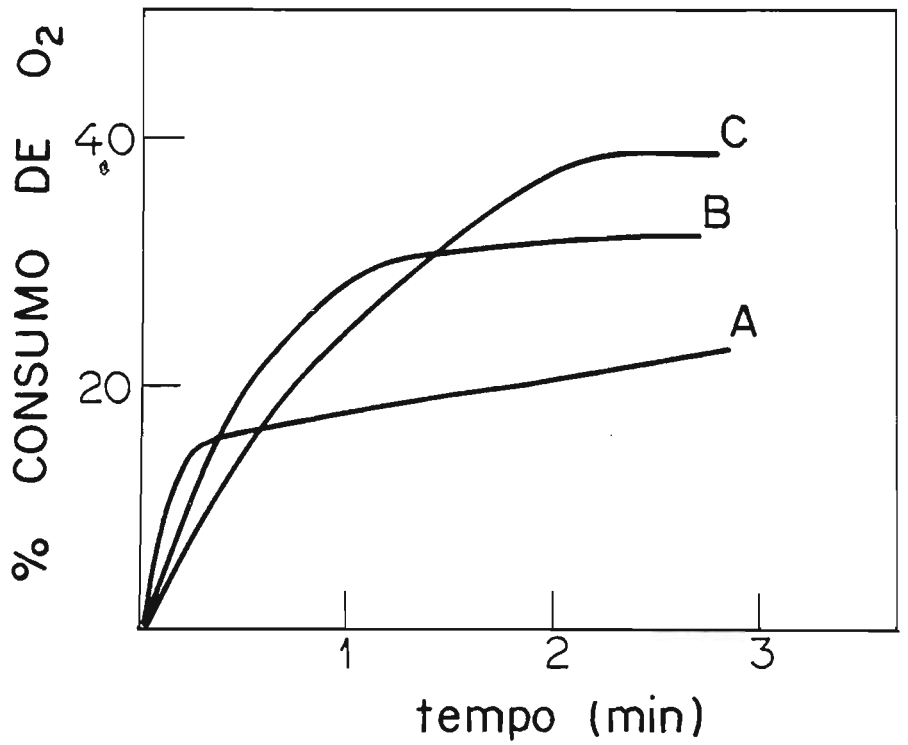



FIGURA 6.5. Efeito da adição de $H_2O_2$ na cinética de consumo de oxigênio do sistema fenilalanina (16 mM)-glicolaldeído (32 mM)/HRP (0,4 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 40°C. (A) sem $H_2O_2$; (B) $H_2O_2$ ($6,6 \times 10^{-5}$ M) e (D) $H_2O_2$ ($1,3 \times 10^{-4}$ M).

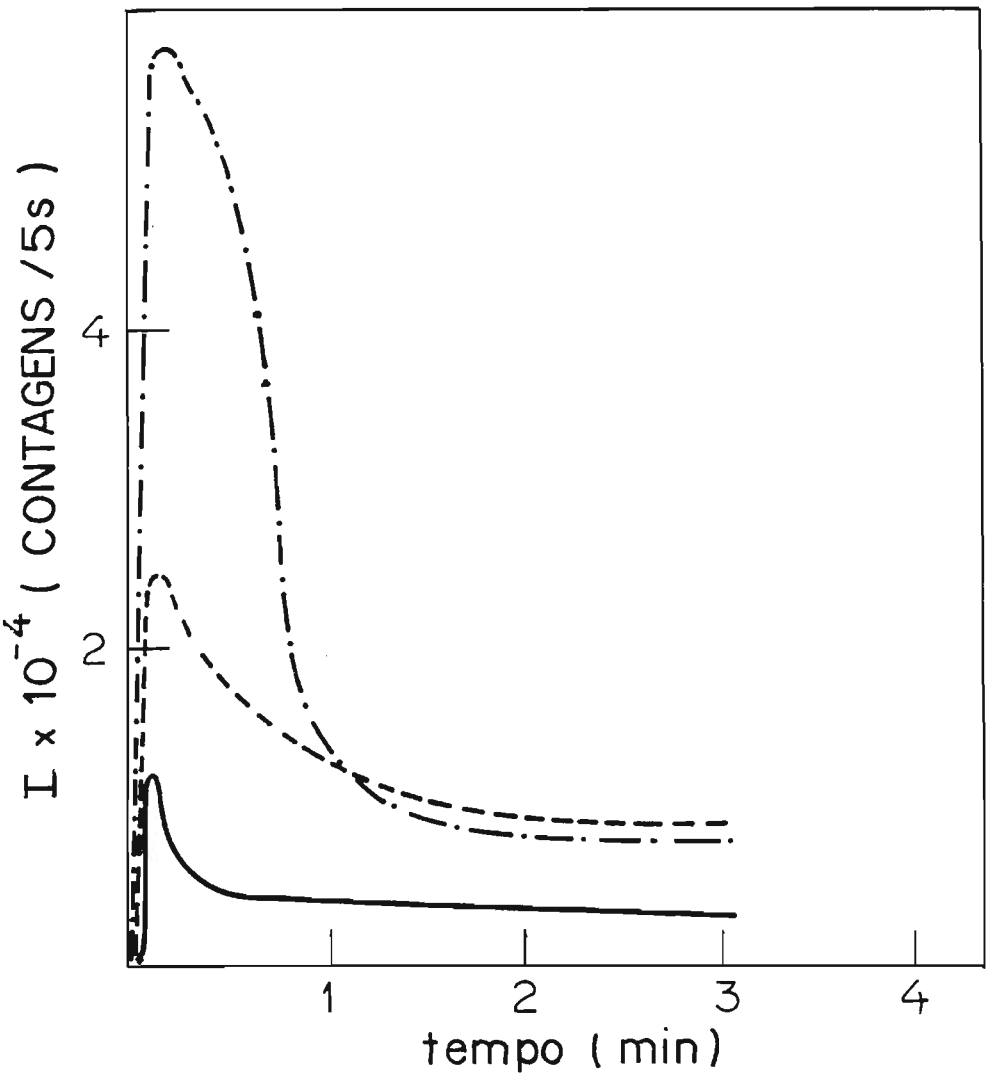



FIGURA 6.6. Quimiluminescência em função do tempo dos sistemas (-o-) lisina (5 mM)-glicolaldeído (10 mM)/$O_2$; (---) ácido amino-capróico (5 mM)-glicolaldeído (10 mM)/$O_2$ e (——) tosil-lisina (5 mM)-glicolaldeído (10 mM)/$O_2$. Todos os sistemas encontram-se em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 40°C na presença de HRP (0,6 μM).

## 7. Estudos da Oxidação Aeróbica de Misturas de Incubação Glicolaldeído/Proteínas

Glicolaldeído foi incubado com proteínas (lisozima, BSA e protamina) segundo método descrito no item 3.4.3. A seguir foi estudada a oxidação aeróbica dos adutos glicolaldeído/proteínas os quais contêm ligação de Schiff, catalisada pela enzima HRP.

### 7.1. Espectro de fluorescência dos adutos glicolaldeído/proteínas

A formação de bases de Schiff nas misturas de incubação glicolaldeído/proteínas foi testada através do espectro de fluorescência (Acharya e Manning, 1983). A Figura 7.1 mostra o espectro de excitação e emissão para o aduto glicolaldeído/lisozima. Na projeção inserida nesta figura, observamos a saturação da intensidade de fluorescência de lisozima com o aumento da concentração de glicolaldeído (relação 1:10). As Figuras 7.2 e 7.3 mostram o espectro de excitação e emissão do aduto glicoaldeído/BSA e glicoaldeído/protamina respectivamente.

### 7.2. Emissão de luz e velocidade de consumo de oxigênio

Adutos glicolaldeído/proteína consomem oxigênio lentamente e são emissivos, na presença da enzima HRP.

A Figura 7.4 mostra a velocidade de consumo de oxigênio e a emissão de luz para o sistema glicolaldeído-lisozima/HRP/$O_2$. Para baixas concentrações de aduto, é possível observar o decaimento no pico máximo de fluorescência (400 nm) característico do aduto, com a adição de HRP.

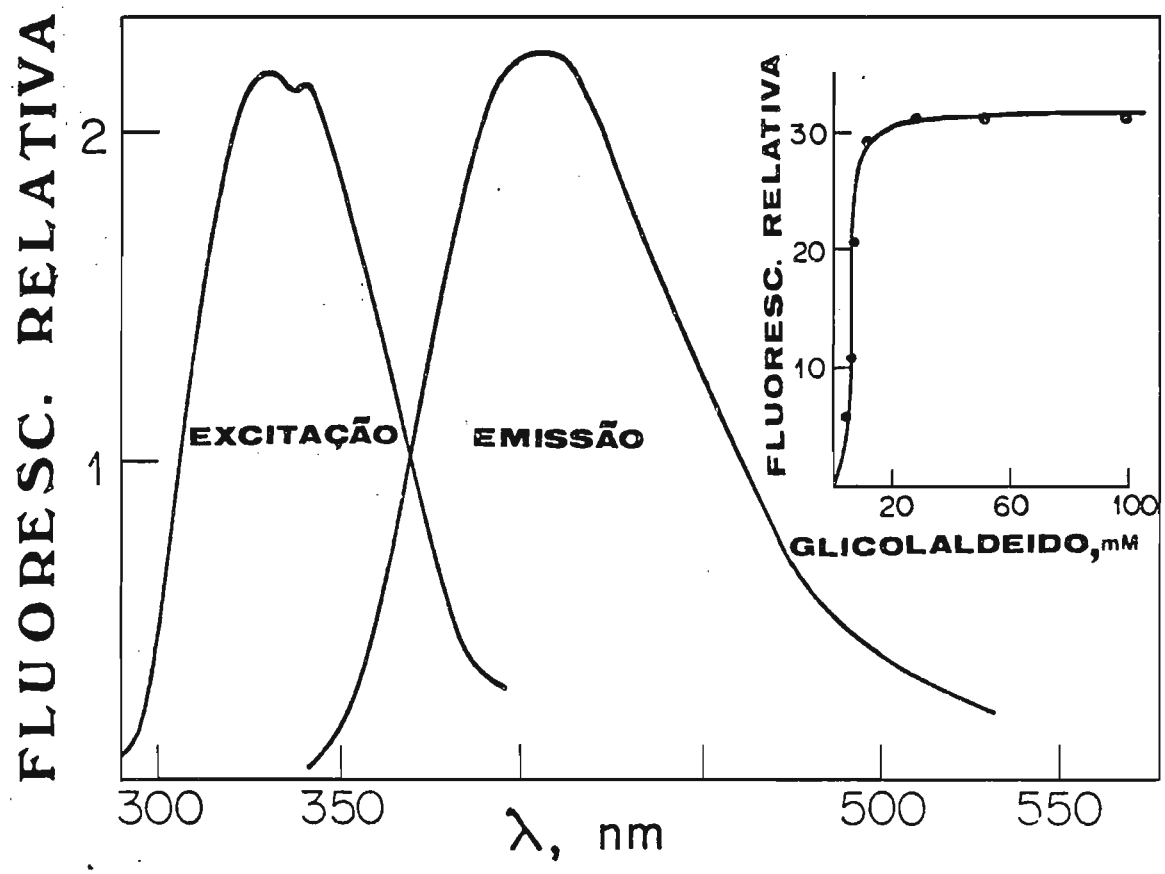



FIGURA 7.1. Espectro de excitação ($\lambda_{em}$ = 400 nm) e emissão ($\lambda_{exc}$ = 332 nm) do sistema lisozima (1,0 mM)-glicolaldeído (4,0 mM) em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 25°C. Na figura inserida temos o efeito da concentração de glicolaldeído na intensidade de fluorescência (400 nm) de reação descrita acima.

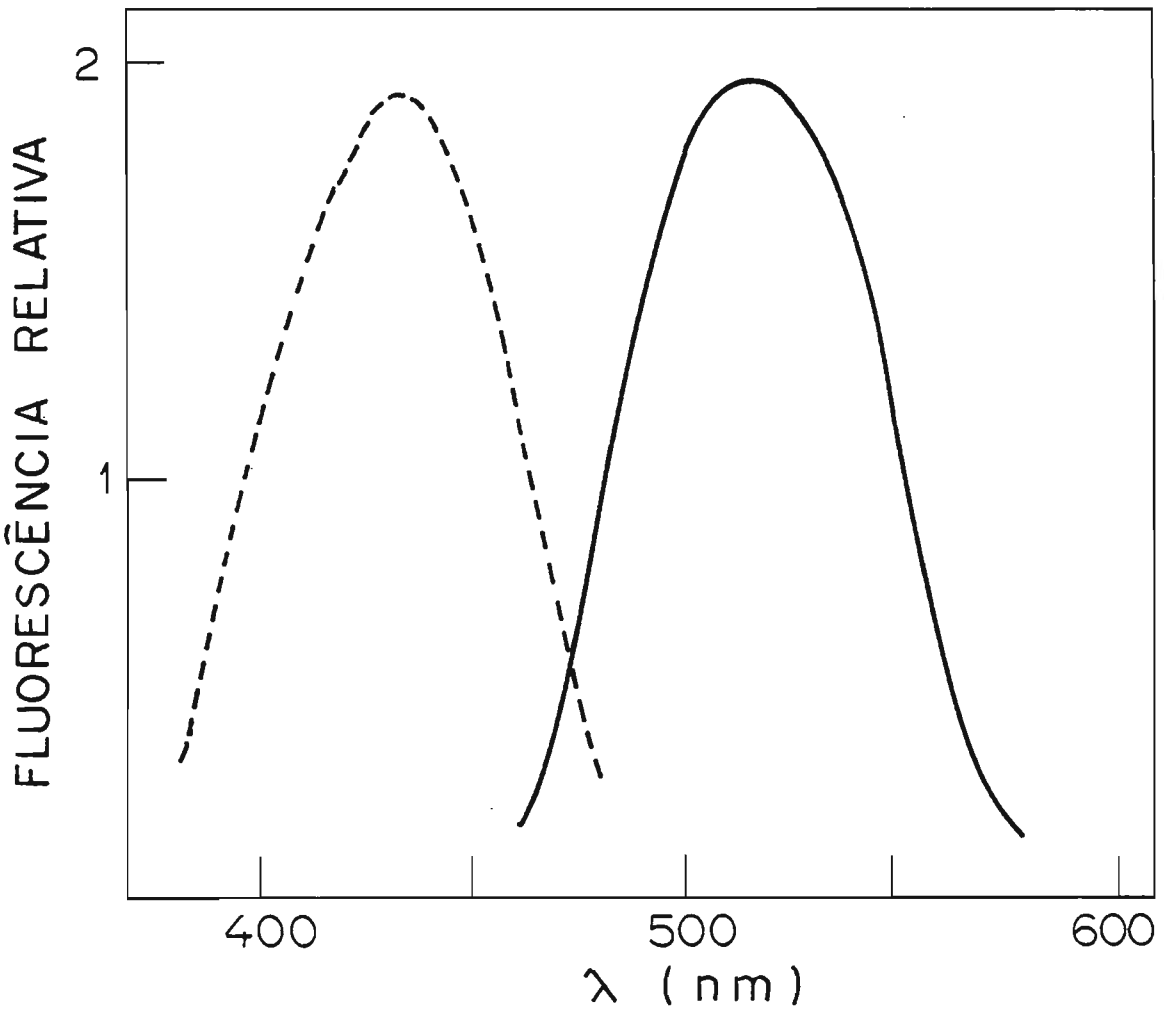



FIGURA 7.2. Espectro de excitação ($\lambda_{em}$ = 512 mm) e emissão ($\lambda_{exc}$ = 435 nm) do sistema BSA (1 mM)-glicolaldeído (4,0 mM) em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 25°C.

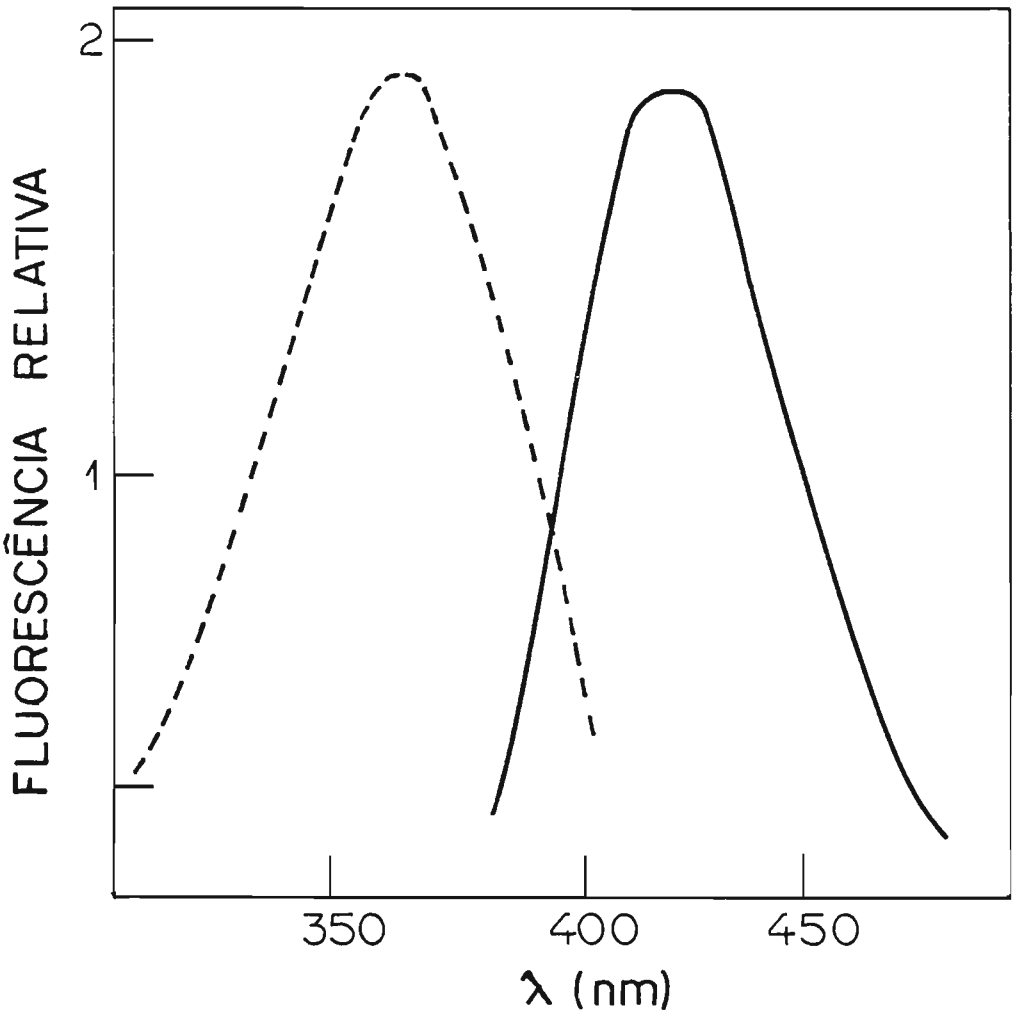



FIGURA 7.3. Espectro de excitação ($\lambda_{em}$ = 415 nm) e emissão ($\lambda_{exc}$ = 342 nm) do sistema protamina (1 mM)-gli colaldeído (4,0 mM) em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 25°C.

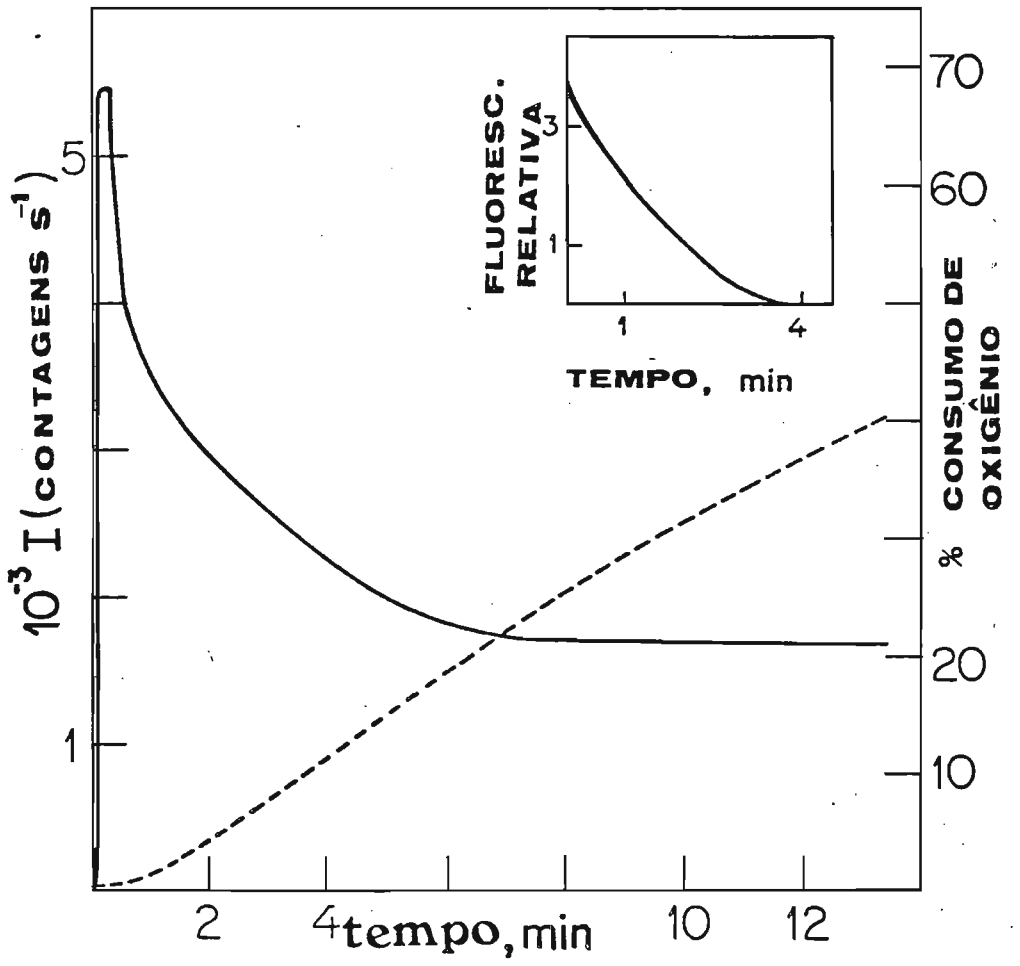



FIGURA 7.4. Cinética de quimiluminescência (——; medida no contador de fótons) e de consumo oxigênio (---) do sistema lisozima (0,3 mM)/glicolaldeído (1,0 mM)/HRP (2 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 35°C. Na figura inserida temos o decaimento da intensidade de fluorescência (a 400 nm), após a adição de HRP (0,8 μM) ao sistema lisozima (3,3 μM)/glicolaldeído (30 μM) no mesmo tampão. T = 39°C.

As Figuras 6.5 e 6.6 mostram as cinéticas de enzimas de luz e consumo de oxigênio para os sistemas glicolaldeído-BSA/HRP/$O_2$ e glicolaldeído-protamina/HRP/$O_2$ respectivamente.

Sistemas-controle com glicolaldeído/HRP/$O_2$ e proteína/HRP/$O_2$ não apresentam emissão de luz nem consomem oxigênio.

## 7.3. Estudos espectrofotométricos

A participação da enzima HRP como catalizador da reação é demonstrada diretamente através das variações de absorbância a 420 nm (Soret $\lambda_{max}$ HRP-composto II; $\varepsilon$ = 1,05x $10^4$ $M^{-1}.cm^{-1}$), 411 nm (ponto isosbéstico para a conversão HRP nativa/HRP composto II) e 400 nm (Soret $\lambda_{max}$ de HRP nativa; $\varepsilon$ = 1,02 x $10^5$ $M^{-1}$ $cm^{-1}$) Yokota e Yamazaki (1971). A Figura 7.7. mostra o ciclo de HRP para o sistema glicoaldeído-lisozima. A Figura 7.8 mostra o ciclo de HRP para os sistemas glicolaldeído-BSA/HRP/$O_2$ e glicolaldeído-protamina/HRP/$O_2$.

## 7.4. Efeito da concentração de proteína na intensidade máxima de emissão de luz

A concentração de proteína apresenta uma relação linear com a intensidade máxima de quimiluminescência do aduto na presença de HRP. A Tabela 7.1 mostra a dependência da emissão de luz integrada nos primeiros cinco minutos com a concentração de proteína na mistura de incubação.

As medidas foram efetuadas em um cintilador líquido, uma vez que observamos linearidade entre intensidade

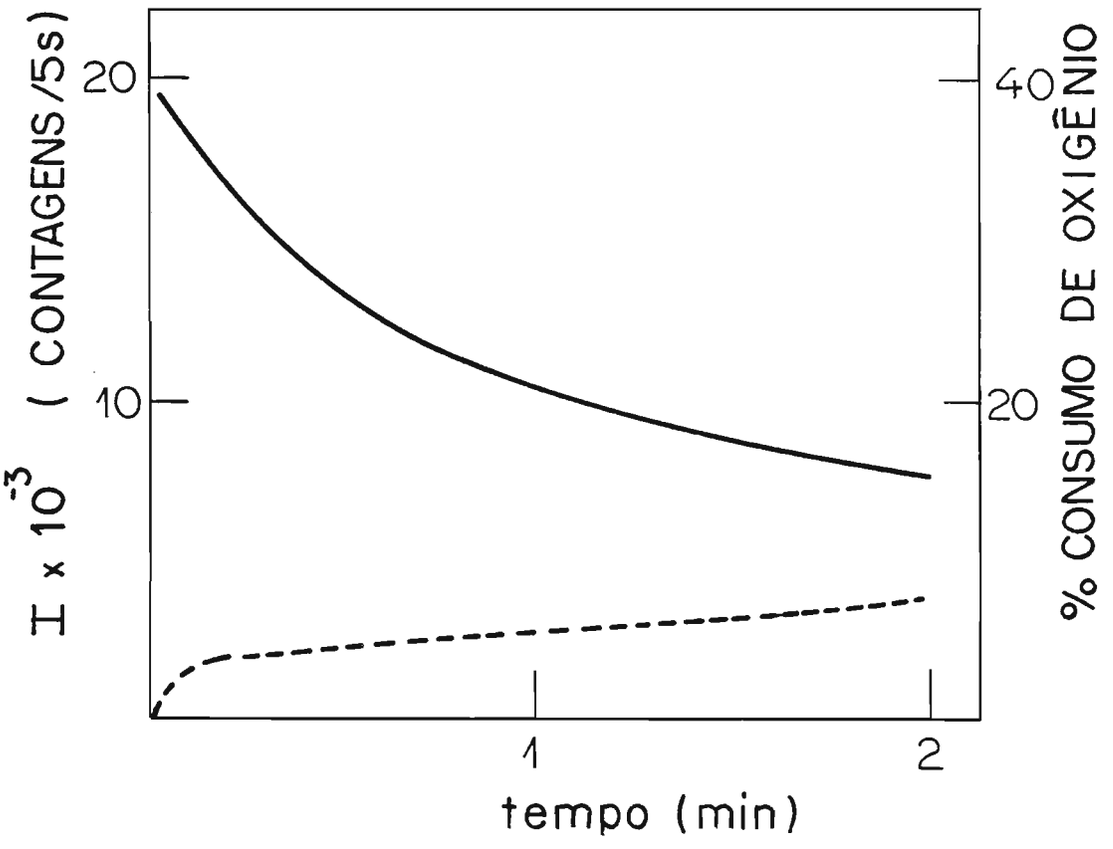



FIGURA 7.5. Cinética de quimiluminescência (——; medida no contado de fótons) e de consumo de oxigênio (---) do sistema BSA (1 mM)-glicoladeído (2 mM)/HRP (2 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 37°C.

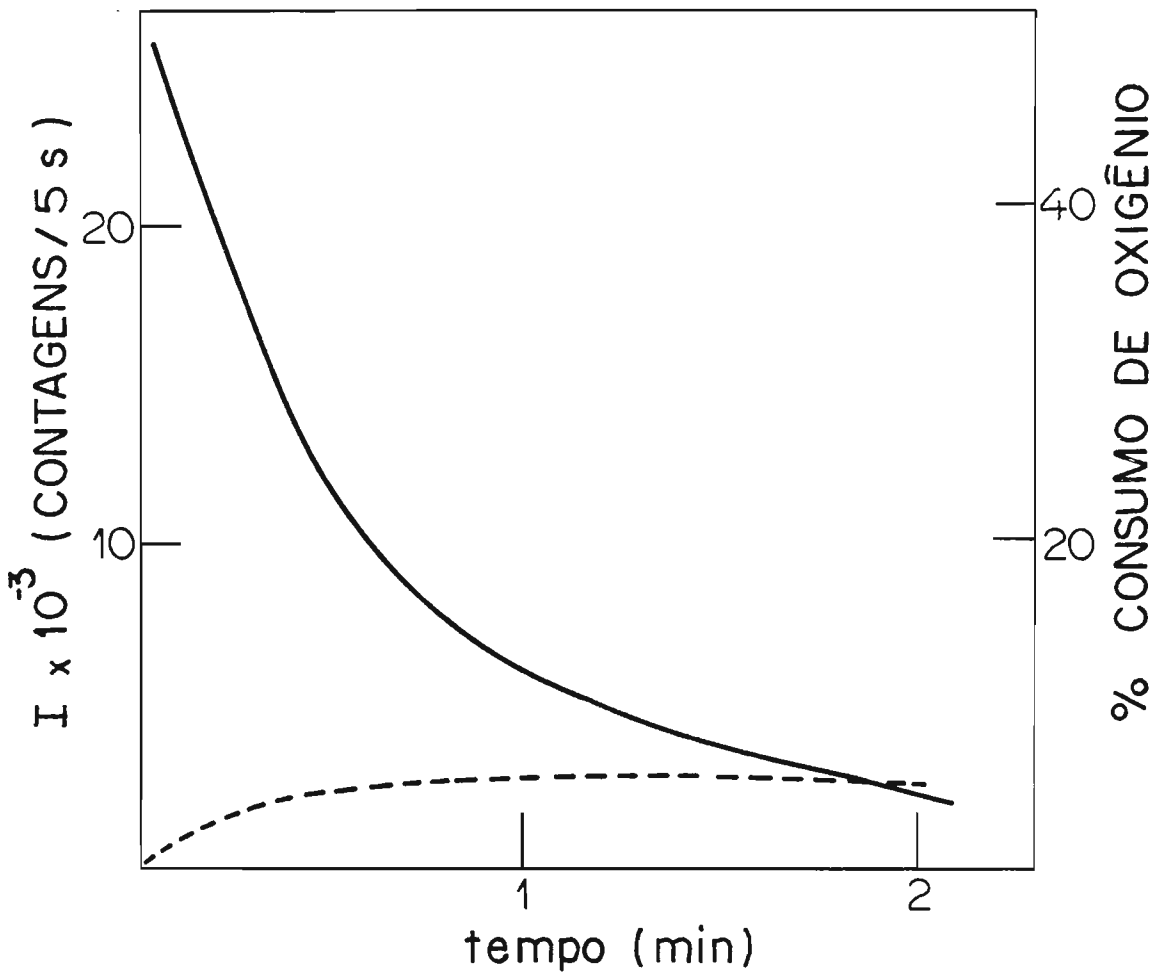



FIGURA 7.6. Cinética de quimiluminescência (——; medida no contador de fótons) e de consumo de oxigênio (---) do sistema protamina (1 mM)-glicolaldeído (2 mM)/HRP (2 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 37°C.

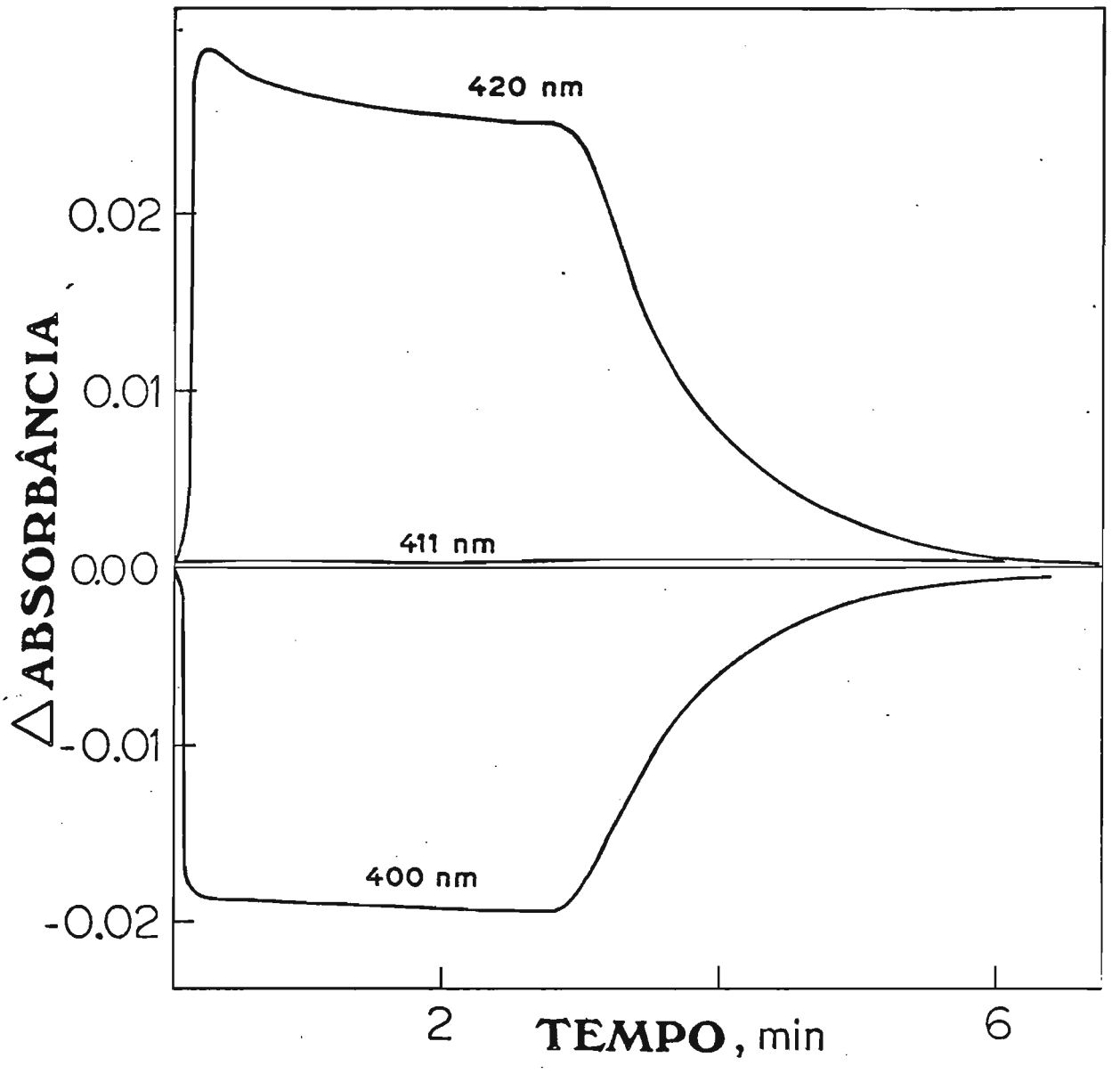



FIGURA 7.7. Variação da absorbância a 420, 411 e 400 nm do sistema lisozima (1,0 mM)-glicolaldeído (4,0 mM)/HRP (2 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4, T = 36°C.

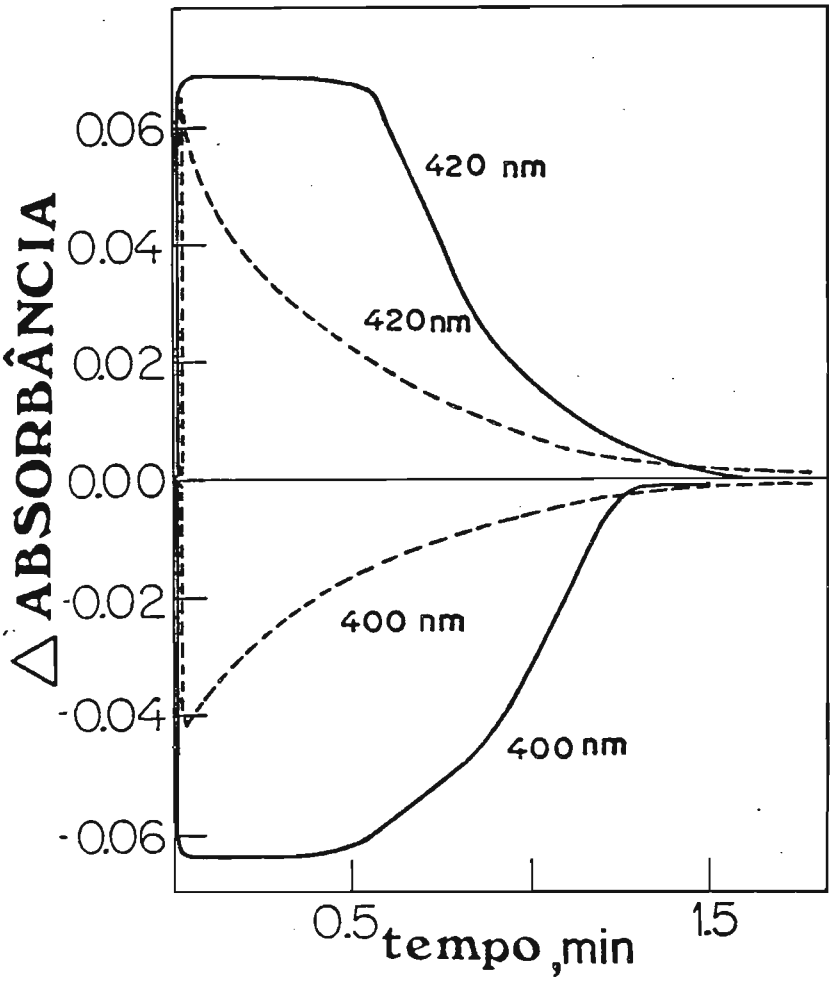



FIGURA 7.8. Variação da absorbância a 420, 411 e 400 nm dos sistemas: ( —— ) protamina (2,6 mM)-glicolaldeído (10 mM)/HRP (4,0 M) e 39°C e (---) BSA (0,16 mM)-glicolaldeído (1,0 mM)/HRP (2 μM) a 25°C, ambos em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4.

Tabela 7.1. Dependência linear da intensidade de quimiluminescência (I) com a concentração de aduto glicolaldeído/proteína na presença de HRP (0,8 M), a 36°C[a]

| Proteína[b] (μM) | Inclinação I[c] vs Proteína ($10^{-10}$ contagens/ M) | R[d] |
|---|---|---|
| Lisozima (0,5;5;10;25;40) | 1,0 | 0,998 |
| BSA (1,5;2,0;2,5;3,0;4,0) | 24,0 | 0,994 |
| Protamina (2,0;4,7;6,0;7,5;9,2) | 3,8 | 0,988 |

a. Mistura de reação: proteina:glicolaldeído(1:4), incubada por 8 h em tampão fosfato 0,6 M pH 7,4.
b. Concentração inicial de proteína na mistura de incubação.
c. Quimiluminescência integrada nos primeiros 5 minutos de reação, medida em um cintilador líquido.
d. Coeficiente de correlação.

máxima de emissão e concentração de proteínas para concentrações na ordem de μM, onde a intensidade de emissão é baixa sendo portanto necessário utilizar uma fotomultiplicadora mais sensível.

A Figura 7.9 mostra o efeito da concentração do aduto glicoaldeído-lisozima na velocidade de decaimento da fluorescência do aduto de 400 nm, após a dição de HRP.

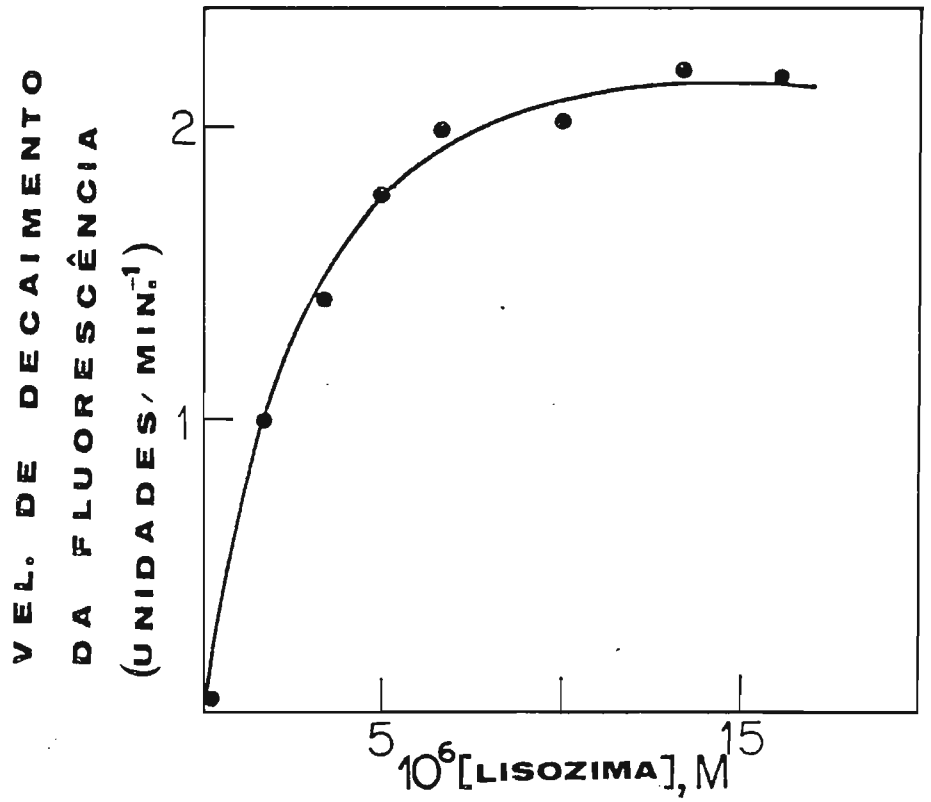



FIGURA 7.9. Efeito da concentração do aduto lisozima-glicolaldeído na velocidade de decaimento da fluorescência ($\lambda$ = 400 nm) em tampão fosfato 0,6 M, pH 7,4 a 39°C, após a adição de 0,8 µM HRP. Mistura de incubação (8 h): lisozima (0,10 mM)-glicoaldeído (1,0 mM) no mesmo tampão.

## 7.5. Transferência de energia para clorofila a solubilizada em micelas

Tem-se indicações de que a espécie emissiva é triplete, pelo aumento da intensidade de emissão dos sistemas glicolaldeído-proteína/HRP/$O_2$ na presença de clorofila a solubilizada em micelas (Figura 7.10). A transferência de energia de espécie triplete para clorofila foi descrita por Cilento e colaboradores (1983) para o sistema isobutanal/HRP/$O_2$ e por Cadenas e colaboradores (1984) para a lipoperoxidação microsomal induzida por terc-butil-hidroperóxido.

Com o intuito de se avaliar o tempo de vida de espécie excitada gerada pelo sistema glicoaldeído-proteína/HRP/$O_2$ foram efetuadas projeções dos duplos-recíprocos de intensidade máxima de quimiluminescência na presença de clorofila, $I^{-1}_{clor}$ versus $|clor|^{-1}$, (item 3.4.8.2). As Figuras 7.11, 7.12 mostram essas projeções para os sistemas glicolaldeído-proteína (lisozima e protamina)/HRP/$O_2$ na presença de clorofila a solubilizada em micelas de Brij-35. Não se observa transferência de energia para o sistema glicolaldeído/HRP/$O_2$.

A Tabela 7.2 apresenta os valores de $k_{ET}{}^{o}$ obtidos dos gráficos anteriores para os sistemas glicolaldeído-(lisozima, protamina)/HRP/$O_2$.

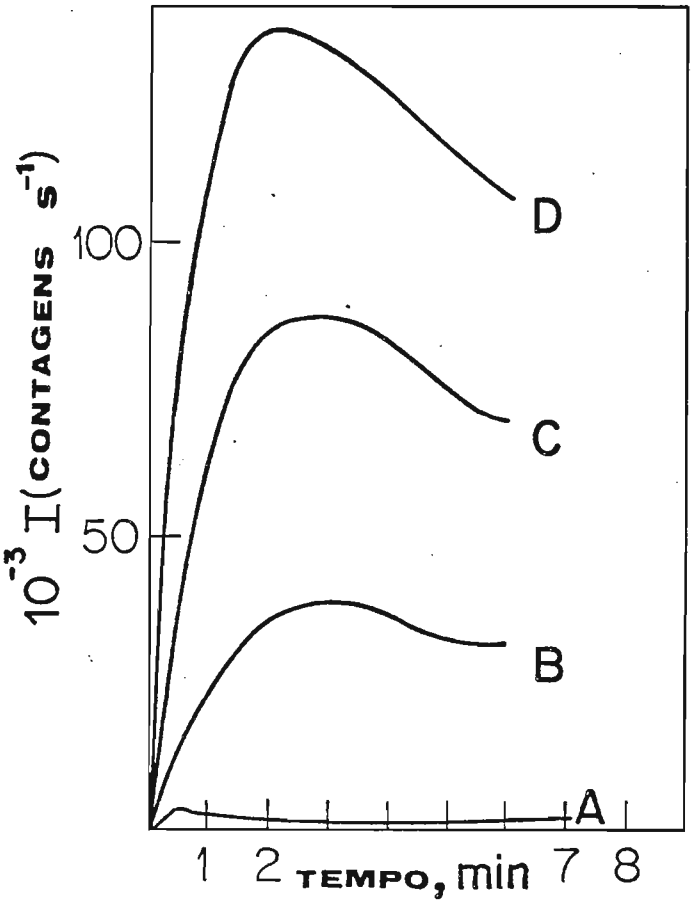



FIGURA 7.10. Cinética de quimiluminescência direta (A) e na presença de clorofila a (B-D) do sistema lisozima (0,10 mM)-glicoaldeído (1,0 mM)/HRP (0,4 μM)/$O_2$ em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo 0,2% de Brij-35, a T = 40°C. Concentração de clorofila a; (B) 1,2 μM; (C) 3,7 μM; (D) 7,5 μM. As medidas foram efetuadas no contador de fótons.

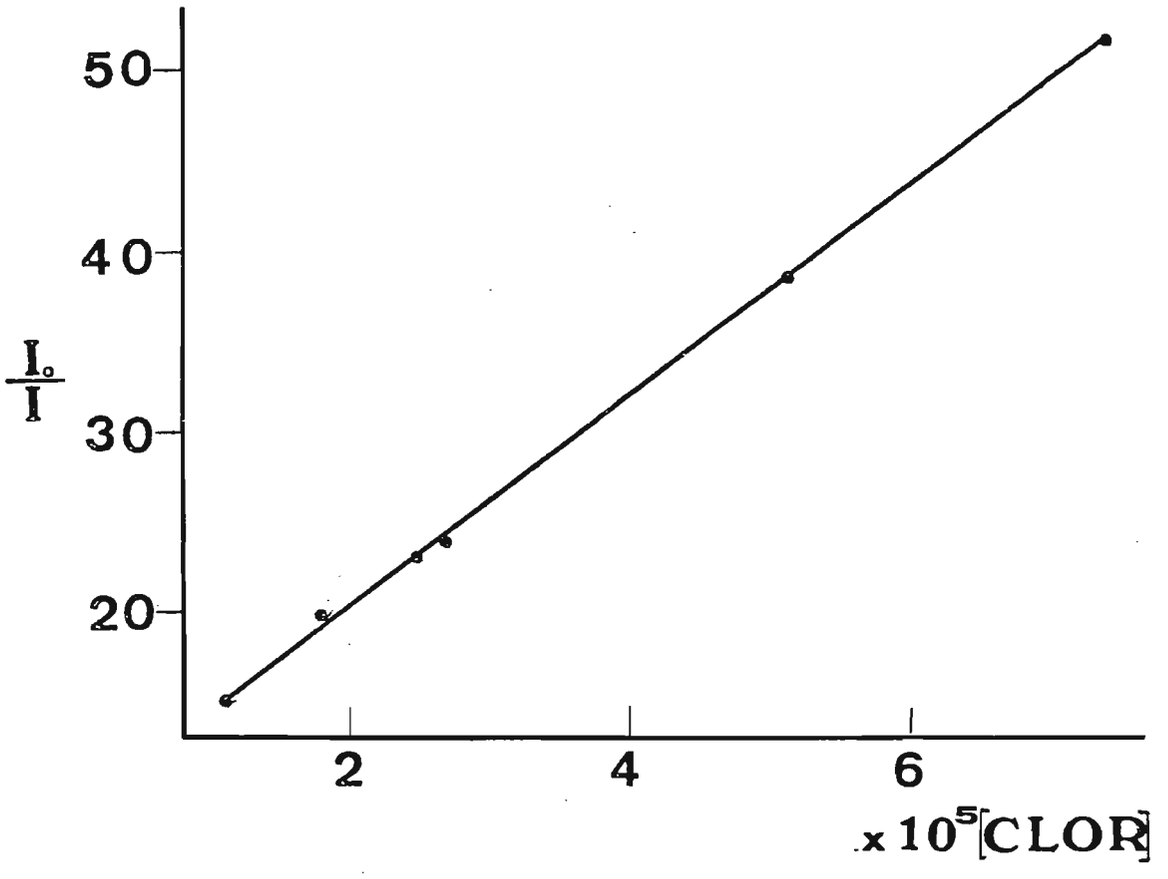



FIGURA 7.11. Gráfico de duplos-recíprocos do efeito de concentração de clorofila a na emissão quimiluminescente do sistema: lisozima (1 x $10^{-4}$ M)-glicolaldeído (1,0 x $10^{-3}$ M), HRP (0,4 μM), Brij-35 (0,2%) em tampão fosfato pH 7,4, 0,6 M a 40°C.

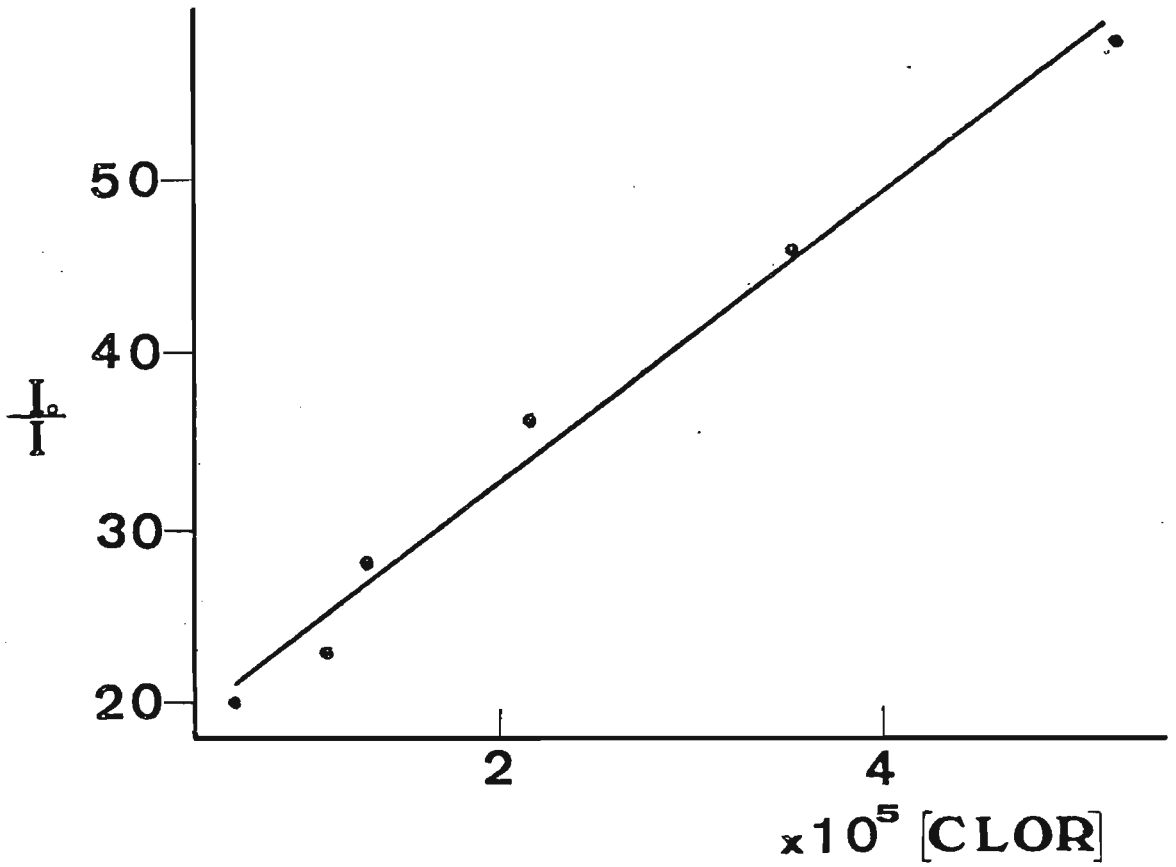



FIGURA 7.12. Gráfico de duplos-recíprocos do efeito da concentração de clorofila a na emissão quimiluminescênte do sistema: protamina (3,5 x $10^{-4}$ M)-glicolaldeído (1,0 x $10^{-3}$ M), HRP (0,4 μM), Brij-35 (0,2%) em tampão fosfato pH 7,4, 0,6 M a 40°C.

Tabela 7.2. Valores de $k_{ET}^{o}$ para a transferência de energia de espécie excitada gerada pelo sistema glicoláldeído/proteína/HRP/$O_2$ para clorofila a

| Aduto | $k_{ET}^{o} \times 10^5 \ M^{-1}$ |
|---|---|
| Glicolaldeído-Lisozima[a] | 1,5 |
| Glicoaldeído-Protamina[b] | 2,0 |

a - Mistura de reação: lisozima ($1x10^{-4}$ M)-glicolaldeído ($1,0x10^{-3}$ M), HRP (0,4 μM), clorofila a solubilizada em 0,2% Brij 35 em tampão fosfato pH 7,4, 0,6 M a 40°C.

b - Iguais condições as descritas em a com o aduto protamina ($3,5x10^{-4}$ M)-glicolaldeído($1,0x10^{-3}$ M).

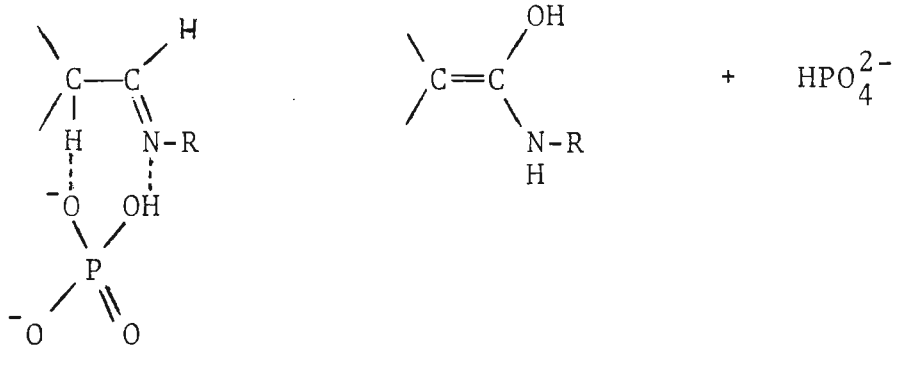
# 8. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

## 8.1. Bases de Schiff Alifáticas

A oxidação aeróbica de BPA catalisada pela enzima HRP, é acompanhada de emissão de luz detectável em um contador de fótons (Fig. 4.5). A velocidade de consumo de oxigênio dissolvido é de ordem zero com relação ao oxigênio (Fig. 4.6.) e de primeira ordem com relação à concentração de BPA, na faixa de 5 a 30 mM (Fig. 4.7).

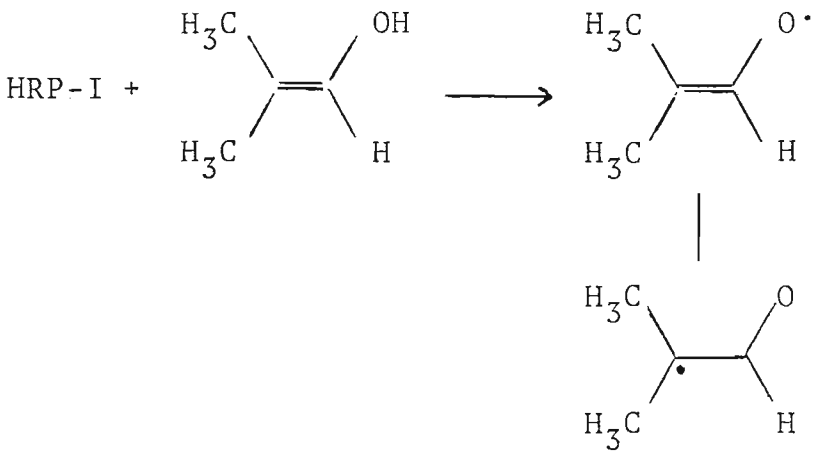
Observa-se também dependência de fosfato nestas reações (Tabela 4.1), o que pode estar associado à sua habilidade em catalisar o equilíbrio tautomérico do substrato(Esquema 7.1) (Thornolley e colaboradores, 1984; Lienhard e Anderson, 1967).

Esquema 8.1.




Similarmente, a reação de oxidação do IBAL, catalisada por HRP, requer fosfato (Cilento, 1982). Recentemente, Dunford e colaboradores (1984) demonstraram que a forma aldeídica do IBAL não sofre oxidação por HRP, pois só com o substrato na forma enólica a enzima é capaz de abstrair

hidrogênio para formar o radical enoil:




Soares e Bechara (1982) já tinham demonstrado claramente que a forma reativa para a enzima HRP é o enol, em estudos sobre a oxidação aeróbica da 3-metilacetoacetona. Este substrato, existe predominantemente na forma enólica em soluções aquosas, em pH elevados. Para este sistema demonstra-se: (i) dependência muito pequena de fosfato, pois, o estabelecimento do equilíbrio cetona-enol é extremamente rápido e (ii) as velocidades iniciais de consumo de oxigênio correlacionam-se com as constantes de enolização das 3-alquilacetonas estudadas (Soares, 1984).

Com relação à concentração de HRP, observamos para o caso do BPA, um aumento da velocidade da reação com o aumento da concentração da enzima, até atingir-se um máximo em 2 M de HRP, com concentração 10 mM de substrato (Tabela 4.2). Provavelmente para esta concentração de enzima, a formação da enamina esteja limitando a velocidade de reação. É bastante interessante que a substituição de HRP por hemina também resulta em consumo de oxigênio pelo substrato

(Fig. 4.2). Em termos de utilização deste sistema como "modelo" para processos bioquímicos envolvendo bases de Schiff em organismos animais, a catálise por hemina (modelo para oxidases em reações biológicas (Augusto e Bechara, 1980) seria talvez mais realista do que a HRP (enzima vegetal). A não observação de quimiluminescência no sistema catalisado por hemina deve-se provavelmente a ocorrência de desativação colisional da espécie excitada produzida pelo oxigênio dissolvido. No caso da reação catalisada por HRP, a apoenzima deve "proteger" a espécie excitada deste tipo de desativação (Cilento e colaboradores, 1978; Bechara e colaboradores, 1979; Cilento, 1980, 1982). Tais autores propuseram que a acetona triplete gerada pelo sistema IBAL/HRP/$O_2$ está "protegida" (barreira entrópica) pela apoenzima contra desativadores externos. A observação de cinéticas diferentes de supressão para D- e L-triptofano constitui uma evidência da formação da espécie excitada em um ambiente quiral (Rivas-Suárez e Cilento, 1981). Calhoum e colaboradores (1983) demonstraram supressão da fosforescência de triptofanos mais expostos das proteínas (álcool desidrogenase de fígado e a fosfatase alcalina) por oxigênio com a mesma eficiência, só que 1-1,5 ordem de grandeza mais lenta do a velocidade de difusão em solução livre. Considerando estes resultados, Catalani (1984) propôs que a "proteção" pela apoenzima deve-se à menor velocidade de difusão do oxigênio no interior da proteína ou a uma baixa concentração local de oxigênio, aumentando a vida média da espécie excitada aí gerada e não à uma barreira proteica propriamente dita.

A reação enzimática mostra uma cinética aparente do tipo Michaelis-Menten (Fig. 4.3), com pH ótimo em 7,4 (Fig. 4.1). O valor de $K_M$ obtido neste caso (26 mM à 36°C) é bastante próximo do obtido para o sistema IBAL/HRP/$O_2$ (30 mM à 40°C) (Gallardo e colaboradores, 1984).

A energia de ativação (Ea) da oxidação enzimática do BPA é da ordem de 11 Kcal/mol (Fig. 4.4). Este valor está dentro da faixa de Ea concentrada para a maioria das reações enzimáticas (5 a 15 Kcal/mol, Segel, 1974).

A velocidade de emissão de fótons ocorre em paralelo aquela do consumo de oxigênio (Fig. 4.6). Este resultado sugere que a reação quimiluminescente é a reação principal e não outra reação em paralelo, ocorrendo em menor escala porém com alto rendimento de quimiluminescência.

O espectro de emissão quimiluminescente está na região de fosforescência de carbonilas (420-460 nm) (Fig. 4.8). O alargamento da banda de emissão na região de 460-520 nm pode ser indicação da possível formação da formamida-ânion ($HCO\bar{N}R$) produzida no estado excitado (McCapra,1976), ou a um exciplexo (Quina, 1982) de acetona com formamida ou com o próprio substrato.

O estudo de transferência de energia do sistema BPA/HRP/$O_2$ para o conhecido aceptor de tripletes, o DBAS (Catalani, 1984) mostra uma intensificação da emissão de luz. Este efeito descarta que a transferência esteja ocorrendo por um processo trivial, onde a emissão do aceptor ocorre por simples reabsorção da emissão do doador. Portanto a transferência de energia está ocorrendo por um processo não radiativo. Em meio fluido, este tipo de transferência

ocorre via $T_1$(doador) $T_2$(aceptor), seguido de rápido cruzamento intersistemas para o estado $S_1$ do DBAS (Adam,1982). A transição triplete ($T_2$) singlete ($S_1$), embora proibida pela regra de seleção de spin, é favorecida pela presença de átomos pesados que intensificam o acoplamento spin-orbital. O valor de $k_{ET}^{o}$ para o sistema em estudo é da ordem de $1,8 \times 10^5$ (Fig. 4.10), compatível com o $k_{ET}^{o}$ de transferência da acetona triplete gerada pelo sistema IBAL/HRP/$O_2$ para o DBAS ($k_{ET}^{o} = 2,0 \times 10^5$), (Cilento, 1982).

Cilento e colaboradores propõem para diversos sistemas estudados (Bechara e colaboradores, 1979; Cilento,1980; Durán e Cilento, 1980; Cilento, 1982) que a transferência de energia da espécie triplete gerada enzimaticamente para o DBAS esteja ocorrendo por um mecanismo a longa distância, uma vez que os valores de $k_{ET}^{o}$ para estes sistemas são consideravelmente maiores que as constantes de Stern-Volmer para supressores colisionais típicos como o $O_2$, o íon sorbato e acrilonitrila (Bechara e colaboradores, 1979; Cilento, 1980).

Observa-se também, transferência de energia do sistema BPA/HRP/$O_2$ para clorofila solubilizada em micelas (Fig. 4.12). O valor de $k_{ET}^{o} = 1,3 \times 10^6\ M^{-1}$ é compatível com o encontrado para o sistema IBAL/HRP/$O_2$, na presença de clorofila solubilizada em vários detergentes ($k_{ET}^{o} = 1 \times 10^6\ M^{-1}$) (Brunetti e colaboradores, 1983). Quando o doador é acetona triplete, é possível propor um mecanismo de transferência de energia a longa distância do tipo Förster (Förster, 1959), uma vez que a condição de sobreposição espectral é satisfeita. Adam e colaboradores (1984)

discutem a possibilidade de que a transferência de energia do sistema etil-α-formilfenilacetato/HRP/$O_2$ para clorofila solubilizada em micelas esteja ocorrendo para um estado triplete superior da clorofila e o posterior cruzamento interssistemas para o estado $S_1$. Esta hipótese está de acordo com o mecanismo de transferência de energia para outros aceptores como corantes xantênicos (Durán e Cilento, 1980) e DBA (Brunetti e colaboradores, 1983).

Não se pode excluir entretanto, que a clorofila esteja sendo excitada por um mecanismo CIEEL (Schuster, 1979). De fato, a clorofila é bastante eficiente em participar de mecanismo CIEEL com α-peroxilactonas (Schmidt e Schuster, 1980).

Em analogia, Kamiya e Aoki (1974) demonstraram que a dismutação da semiquinona de eosina produzida por reação com oxidantes ou redutores, é quimiluminescente devido à regeneração da eosina no estado singlete.

$$2\ \text{Eosina-OH} \xrightarrow{R^{\cdot}} 2\ \text{Eosina-O}^{\cdot} \longrightarrow \text{Eosina-OH}^{*} + \text{Eosina} = 0$$

$$\text{Eosina-OH}^{*} \longrightarrow \text{Eosina} + h\nu_F$$

O fato de que o sistema BPA/HRP/$O_2$ "fosforesce" é uma indicação de que a espécie excitada está sendo gerada, "protegida" de alguma forma, da desativação colisional com o oxigênio. Entretanto, essa proteção não é completa uma vez que observamos aumento da intensidade de quimiluminescência com a diminuição da concentração de oxigênio dissolvido em solução (Fig. 4.6). A quimiluminescência do sistema BPA/HRP/$O_2$ também é suprimida por sorbato, indol e p-

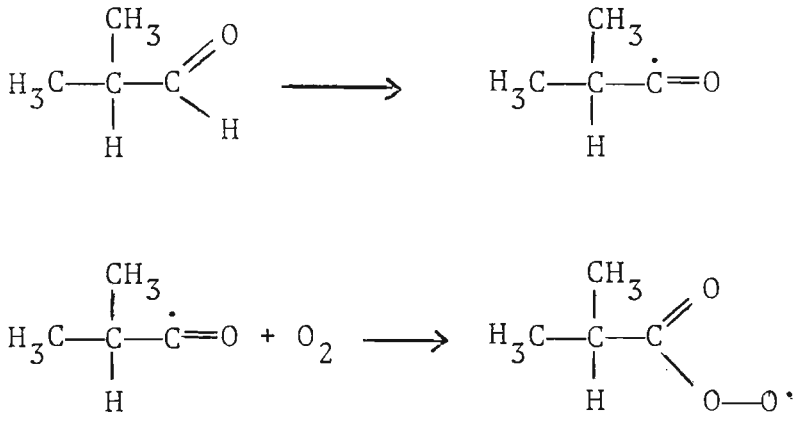
benzoquinona (Tabela 4.3). Comparando-se os dados de $K_{SV}$ obtidos pelo nosso sistema com os descritos por Bechara e Cilento (1984) para o sistema de IBAL e com os obtidos por Catalani (1984) para o sistema do TMD (Tabela 4.3), verifica-se que: (i) para o caso da supressão do sorbato, os valores para os três sistemas são compatíveis e (ii) para o caso da supressão por indol e p-benzoquinona os valores dos sistemas enzimáticos são cerca de 1-2 ordens de grandeza maiores que para o sistema químico. Devido aos altos valores encontrado de $K_{SV}$ para os sistemas enzimáticos, Cilento e colaboradores têm sugerido nestes casos, um mecanismo de transferência de energia a longa distância (Rivas-Suárez e Cilento, 1981; Rivas-Suárez e colaboradores, 1981). Entretanto, Catalani (1984), discute que tais diferenças nos valores de $K_{SV}$ entre o sistema químico e enzimático pode ser apenas um reflexo do maior tempo de vida ($\tau^o$) da espécie excitada na cavidade enzimática, devido à baixa solubilidade local de oxigênio em consequência da maior polarização de água no microambiente do sítio ativo. O valor de tempo de vida de acetona triplete em água deaerada é cerca de uma ordem de grandeza maior que em água normalmente aerada (Catalani, 1984).

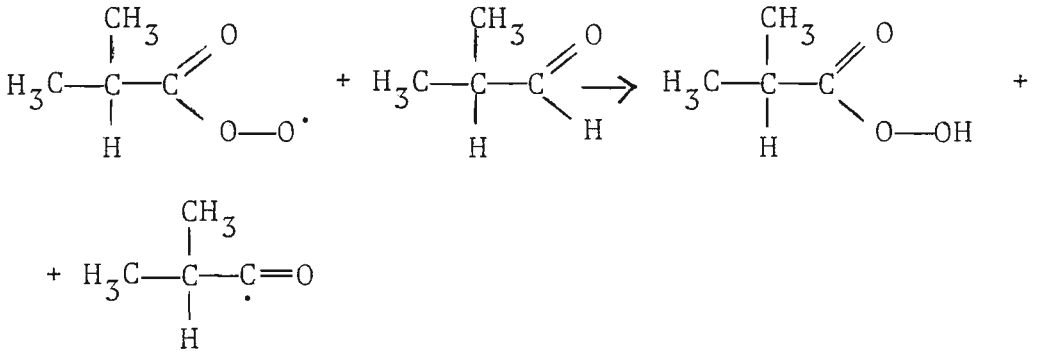
Com respeito ao mecanismo da reação, pode-se afirmar que a enzima HRP participa efetivamente da reação, uma vez que o ciclo enzimático HRP composto II - HRP nativa foi observado, durante a reação, através das variações de absorbância a 420 e 400 nm (Fig. 4.16) (Dunford e Stillman, 1976). A não participação de espécies ativas de oxigênio ($O_2^-$, $OH^\cdot$, $^1O_2$) foi atestada com a utilização de "seques

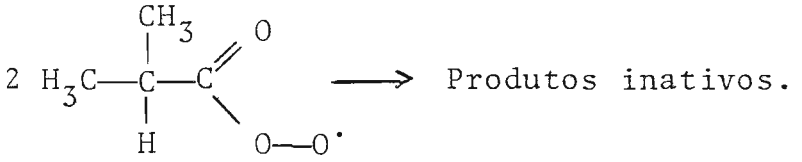
tradores" destas espécies, os quais não revelaram nenhum efeito significativo no consumo de oxigênio e nem na emissão de luz do sistema. A concentração de $H_2O_2$ parece ser um fator importante,uma vez que a adição de catalase (μM) resultou em cerca de 50% de inibição da quimiluminescência. A participação de peróxidos como iniciadores de reação de oxidação enzimática para o sistema IBAL/HRP/$O_2$ já foi claramente demonstrada por Baader e colaboradores (1985), sendo que esta espécie está envolvida na formação do composto I da peroxidase.

A formação da forma enamina em solução, a dependência de fosfato, a observação do ciclo enzimático da HRP, a dependência de peróxidos e os dados de supressão e transferência de energia indicam que este sistema é análogo ao sistema IBAL/HRP/$O_2$, para o qual, foi recentemente proposto o seguinte mecanismo de reação (Baader e colaboradores, 1985), baseado em medidas cinéticas.

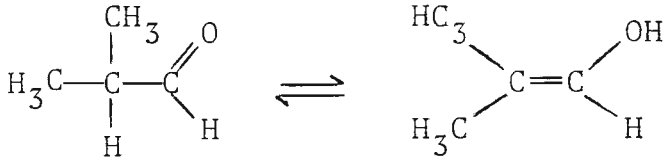
A: Mecanismo da autoxidação não catalisada de IBAL para formar o correspondente peráxido

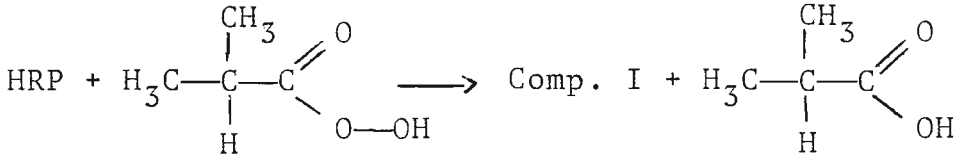


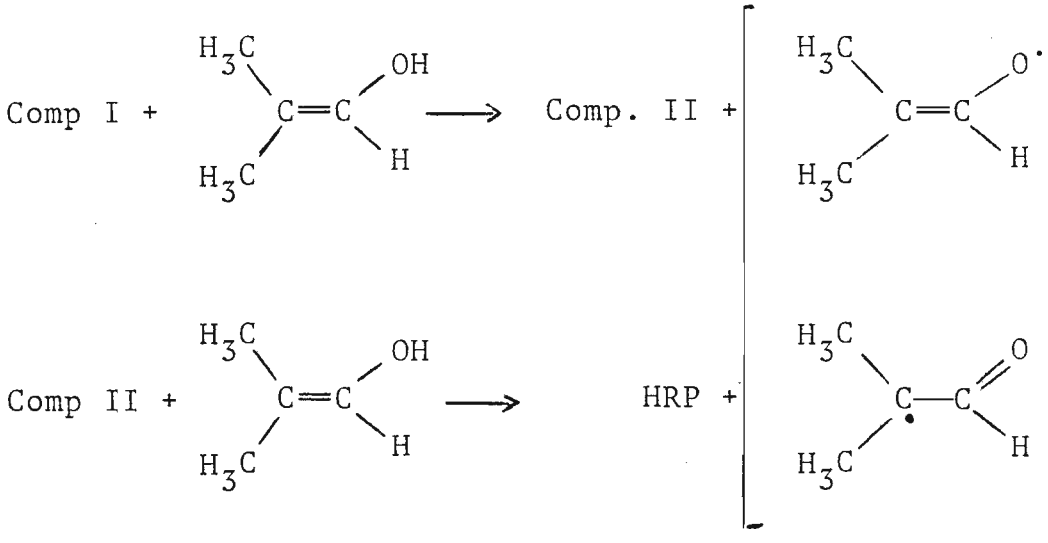


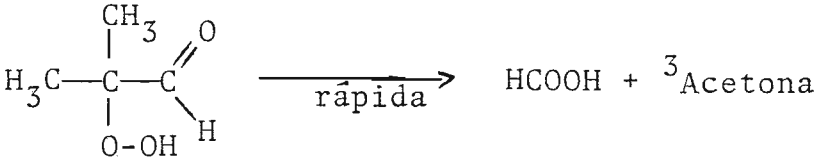


B. Mecanismo de formação da acetona triplete através da oxidação da forma enólica do IBAL, catalisada por HRP.

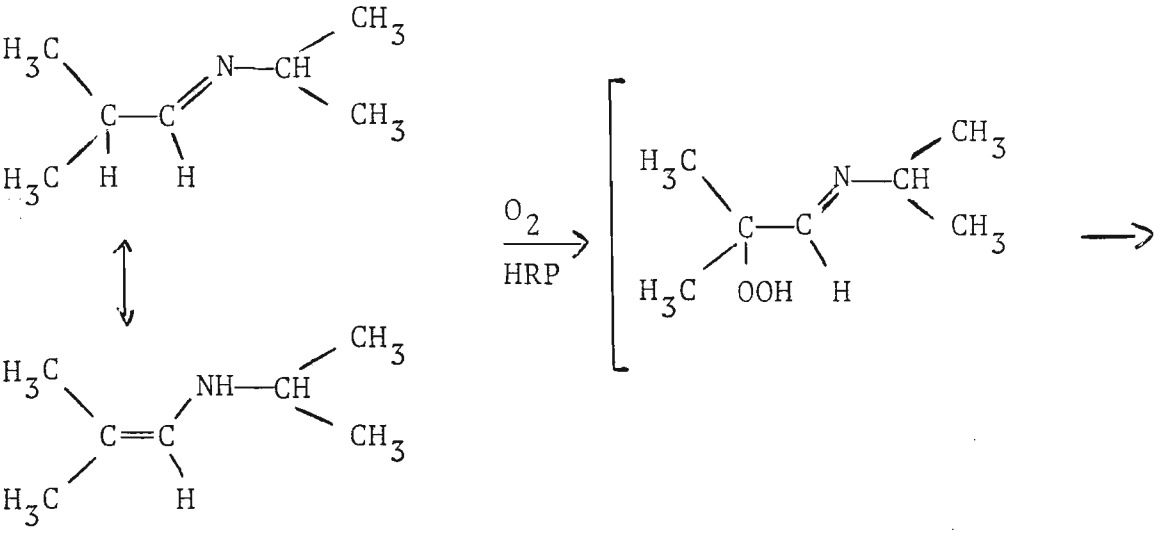


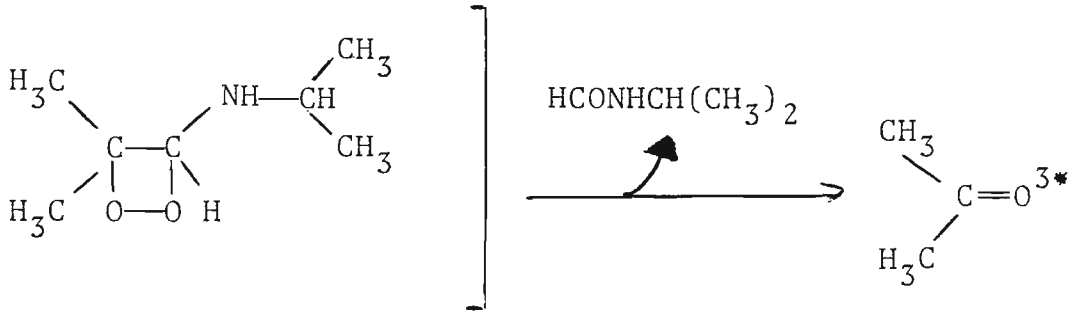







Com base no comportamento cinético e fotoquímico similar ao do sistema IBAL/HRP e na caracterização da acetona (rendimento ~70%) e de i-propilformamida como produtos principais da reação, pode-se propor que a reação principal no caso descrito, se processa através da seguinte rota:






Com o intuito de demonstrar que a oxidação enzimática de ligações de Schiff é um processo mais amplo e não um caso específico para o substrato BPA, procedemos a investigação da oxidação quimiluminescente de outras iminas alifáticas (i-BMA; sec-BMA e BVA) e a imina aromática PBI, catalisada por HRP. Todas as iminas alifáticas estudadas, apresentaram reação de consumo de oxigênio e são quimiluminescentes na presença de HRP (Figs. 5.1-5.3). A imina aromática PBI, apesar de consumir oxigênio, não quimiluminescente sob as condições experimentais empregadas. Entretanto, tal efeito pode ser atribuído a sua pouca solubilidade em água, o que não permitiu estudos com concentrações mais elevadas de substrato. Para altas concentrações de BPA, é necessário a adição de DMSO para que ocorra a solubilização. É sabido, através de estudos de dicroismo circular, que DMSO altera a conformação da enzima peroxidase (Durán e colaboradores, 1981), com consequente perda da atividade enzimática.

No caso do modelo preparado a partir de valina e IBAL (BVA), seria necessária uma análise dos produtos de oxidação para se discriminar as duas possibilidades de rotas descritas no Esquema 8.2:(a) inserção de $O_2$ no carbo-

no α do aminoácido ou (b) no carbono α do aldeído.

A rota (a) (Esquema 8.2), foi demonstrada por Augusto e Cilento (1977) como operante no caso do sistema de incubação de triptofano com piridoxal-fosfato, na presença de HRP.

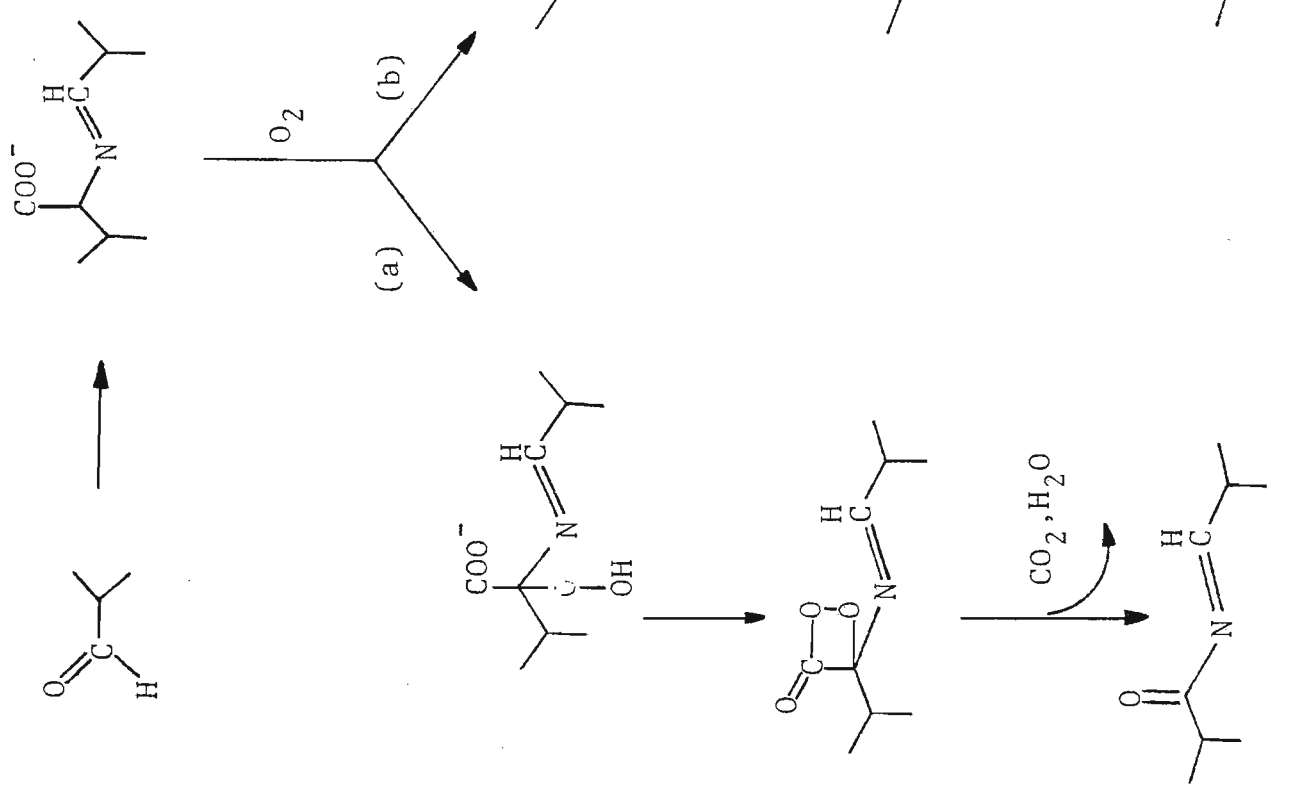
É importante ressaltar que a observação de formação de estados excitados através da oxidação enzimática de ligações de Schiff é notável, uma vez que este tipo de ligação, ocorre em diversas biomoléculas e participam como intermediários em várias reações biológicas. McCapra e Burford (1976), propuseram a oxidação quimiluminescente de bases de Schiff derivados de isobutanal com aminas aromáticas em DMSO aerado/t-butóxido, como modelo para diversas reações bioluminescentes. O sistema aqui descrito, na medida em que se processa em meio aquoso tamponado e com a participação de uma enzima, talvez constitua um modelo mais próximo do real para sistemas biológicos.

## 8.2. Bases de Schiff Derivadas de Aminoácidos e Proteínas

Inspirados nos resultados obtidos com os sistemas-modelo (iminas alifáticas), decidimos ampliar nossos estudos para substâncias de natureza mais biológica. Estudamos a oxidação quimiluminescente catalisada por HRP, de bases de Schiff formadas entre glicolaldeído e aminoácido(histidina, arginina, lisina e fenilalanina).

Já está claramente demonstrado, através de estudos de 'HRMN, que aldeídos alifáticos e aromáticos reagem em solução aquosa com aminoácidos, formando ligações de

Esquema 8.2



Schiff (Pesek e Frost, 1974). A adição de HRP a misturas de incubação de aminoácidos e glicolaldeído em tampão fosfato, leva ao aparecimento de quimiluminescência (Figs. 6.1-6.3). Em analogia ao sistema IBAL/HRP/$O_2$ a quimiluminescência é prolongada e intensificada com adição de $H_2O_2$ (Fig. 6.4). O consumo total de oxigênio aumenta com a adição de $H_2O_2$ (Fig. 6.5). Concluimos portanto, que a incubação da mistura de reação em meio aerado não resulta na formação de peróxidos necessários à fase de iniciação, ao contrário do observado no caso dos modelos com iminas alifáticas e no sistema do IBAL (Baader e colaboradores, 1985).

Com relação à reatividade do amino grupo, observa-se, para o caso da lisina, uma maior reatividade do ε-amino grupo na formação da base de Schiff (Fig. 6.6). Entretanto, tal resultado não é definitivo, uma vez que não conhecemos a concentração final das bases de Schiff formadas.

Glicolaldeído reage com proteínas, formando adutos os quais contêm ligações de Schiff. A adição da enzima HRP, a mistura de incubação de proteínas-glicolaldeído, leva à formação de espécies excitadas (Figs. 7.4-7.6). Foi selecionado o sistema glicolaldeído-lisozima/HRP/$O_2$ para estudos mais detalhados, e os sistemas BSA/HRP/$O_2$ e protamina/HRP/$O_2$ com fins comparativos.

Adutos de glicolaldeído-proteínas consomem oxigênio lentamente e são emissivos na presença de HRP. O aparecimento da quimiluminescência está relacionado (para sistema lisozima-glicolaldeído)com o decaimento de fluorescência típica do aduto (Fig. 7.4). Observa-se uma quimiluminescência rápida e intensa no início da reação (primeiros segun

dos) quando ainda não é detectado consumo de oxigênio. Esta emissão de luz pode ser atribuída a reação com HRP de hidroperóxidos contaminantes, acumulados no período de pré-incubação da proteína com glicolaldeído.

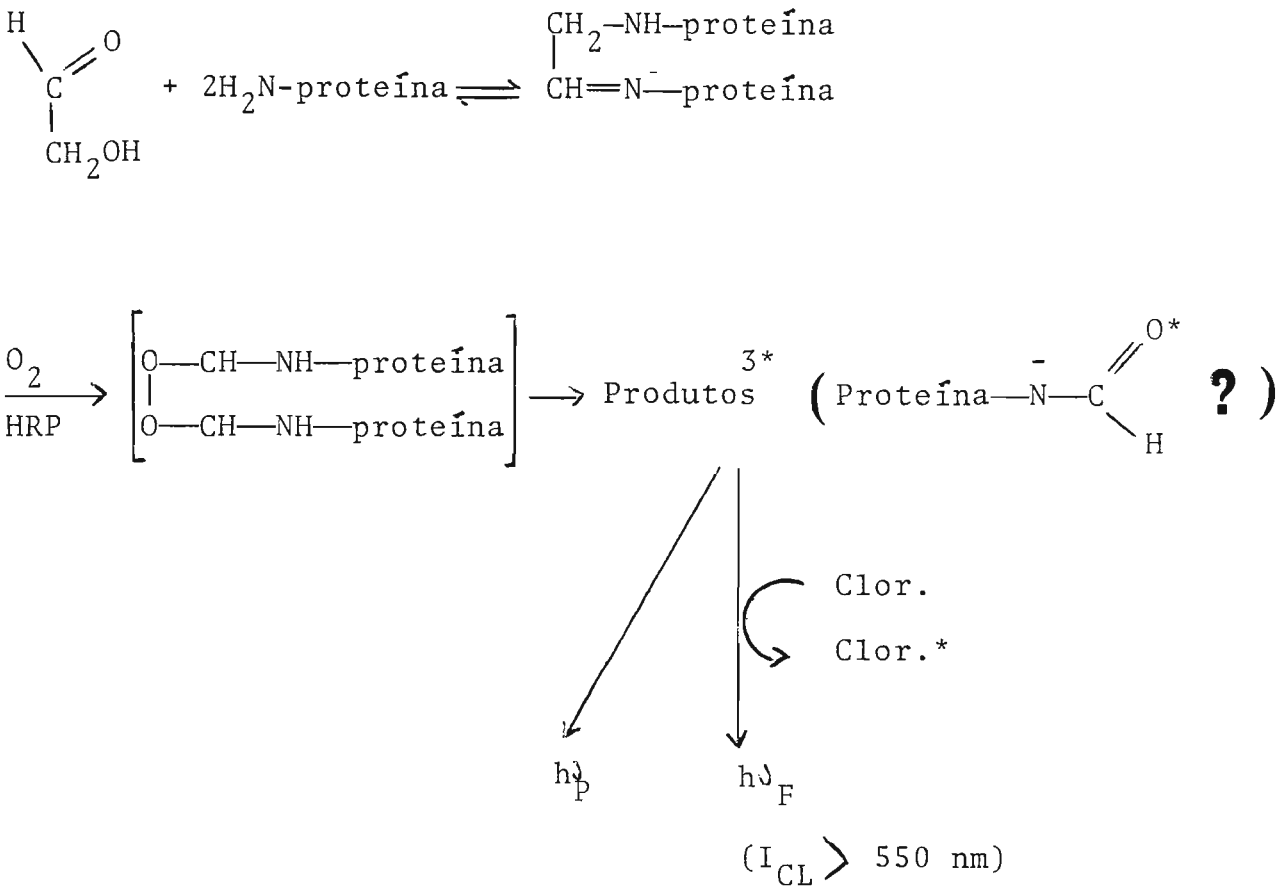
Analogamente ao sistema modelo (iminas alifáticas), observamos durante a reação o ciclo da enzima, HRP Composto II-HRP nativa (Figs. 7.7-7.8), havendo portanto,participação efetiva da enzima na reação.

É importante ressaltar que observamos uma relação linear entre a quimiluminescência e a concentração de proteína inicial na mistura de incubação (Tabela 7.1). Tal resultado pode ser potencialmente relevante para a possível utilização da quimiluminescência como forma de monitorar formação de ligações de Schiff em misturas contendo proteínas. Este tipo de ligação ocorre em intermediários de diversas reações contendo piridoxal-fosfato como grupo prostético e também em diversas biomoléculas.

Para os sistemas glicolaldeído-lisozima/HRP/$O_2$ e glicolaldeído-protamina/HRP/$O_2$ observa-se transferência de energia para clorofila solubilizada em micelas. Os valores de $k_{ET}^{o}$ são altos e compatíveis com os encontrados para o sistema-modelo (Tabela 7.2). A intensificação da quimiluminescência na presença de clorofila é uma indicação de que a espécie emissiva é triplete (Brunetti e colaboradores, 1983; Cadenas e colaboradores, 1984).

Tendo como base tais resultados, podemos propor o seguinte esquema de reação (Esquema 7.3).

Esquema 8.3




$h\nu_P$ = emissão fosforescente

$h\nu_F$ = emissão fluorescente.

É importante esclarecer que as diferenças estruturais dos diversos adutos de glicolaldeído/aminoácidos (proteínas) conferem a essas substâncias características cinéticas e mecanísticas específicas. A analogia direta entre adutos de aminoácidos (proteínas) e o sistema modelo (iminas alifáticas) refere-se apenas à reatividade frente a $O_2$/HRP e ao

aparecimento da quimiluminescência. Estudos posteriores, envolvendo a identificação dos produtos de reação, constantes cinéticas, etc, são necessários para o esclarecimento do mecanismo da reação para cada aminoácido (proteína) estudado.

Recentemente, diversos pesquisadores, têm associado vários processos biológicos normais ou deletérios, com a formação de ligações de Schiff. McLaughlin e colaboradores (1980) demonstraram que BSA, lisozima, caseina e colágeno reagem com metilglioxal formando uma ligação de Schiff (-HC=N-) envolvendo o grupo carbonila do aldeído e o ε-amino grupo da lisina. Está também descrita, a ligação de acetaldeído exógeno e endógeno (formado via metabolismo de etanol exógeno) a microssoma de fígado de rato (Nomura e Lieber, 1981). É interessante o fato de acetaldeído endógeno ligar-se mais a microssoma do que o exógeno. Apesar de ainda não existir uma explicação para este fato, especula-se que o acetaldeído produzido in situ pode ter um maior acesso aos sítios de ligação e portanto pode exercer efeitos tóxicos maiores.

Gaines e colaboradores (1977) demonstraram que acetaldeído liga-se a proteínas de membrana de eritrócitos humanos em células intactas e produzem mudanças na morfologia celular. Estes resultados sugerem que tais ligações podem ser a possível base molecular para explicar os danos celulares observados durante o alcoolismo crônico.

A ligação covalente de acetaldeído com proteínas é aumentada e estabilizada na presença de ácido ascórbico (Tuma e colaboradores, 1984). Tais resultados podem ter

implicações biomédicas, inclusive aquelas relacionadas com os efeitos patológicos em lesão hepática causada por alcoolismo. Os autores, baseando-se em tais resultados, sugerem que indivíduos ingerindo megadoses de vitamina C e bebendo álcool poderiam estar favorecendo a formação de adutos acetaldeído-proteínas estável e portanto terem suas chances de lesão hepáticas aumentadas.

Sabendo-se que adutos proteína-aldeído contendo ligações de Schiff, sofrem oxidação aeróbica formando espécies excitadas no estado triplete, podemos especular que tais processos, ocorrendo in vivo, poderiam explicar os efeitos deletérios da formação de bases de Schiff em tecidos hepáticos durante o alcoolismo crônico. A espécie excitada seria, na verdade, o agente tóxico. De fato, espécies eletronicamente excitadas ao estado triplete, interagem com diversas biomoléculas (Cilento, 1980) incluindo o DNA, proteínas, t-RNA (De Mello, 1980) e enzimas (urocanase; Venema, 1985).

É também de especial interesse, a formação de ligações de Schiff durante a peroxidação de lipídeos (Dillard e Tappel, 1981). Durante este processo, ocorre a formação de peróxidos lipídicos e malonaldeído. Esta última substância é capaz de ligar-se a amino grupos de fosfatidiletanolamina e proteínas (Koster e colaboradores, 1982). Enzimas contendo resíduos de lisina, como por exemplo a ribonuclease A, são inativadas pela ligação com malonaldeído formando um produto fluorescente. Este produto pertence a uma família de compostos com estrutura -N=C-C=C-N- (Tappel,1970) e tem as mesmas características espectrais dos pigmentos acu

mulados nos tecidos animais em razão do envelhecimento,por exemplo lipofucsina (Chio e colaboradores, 1969).

Boveris e colaboradores (1980, 1983) têm detectado fraca quimiluminescência em ratos vivos quando seus fígados são expostos diretamente à uma fotomultiplicadora sensível. A quimiluminescência de fígado de rato *in situ*, é aumentada sob alcoolismo crônico, estando atualmente sendo investigada a promoção de lipoperoxidação por etanol.

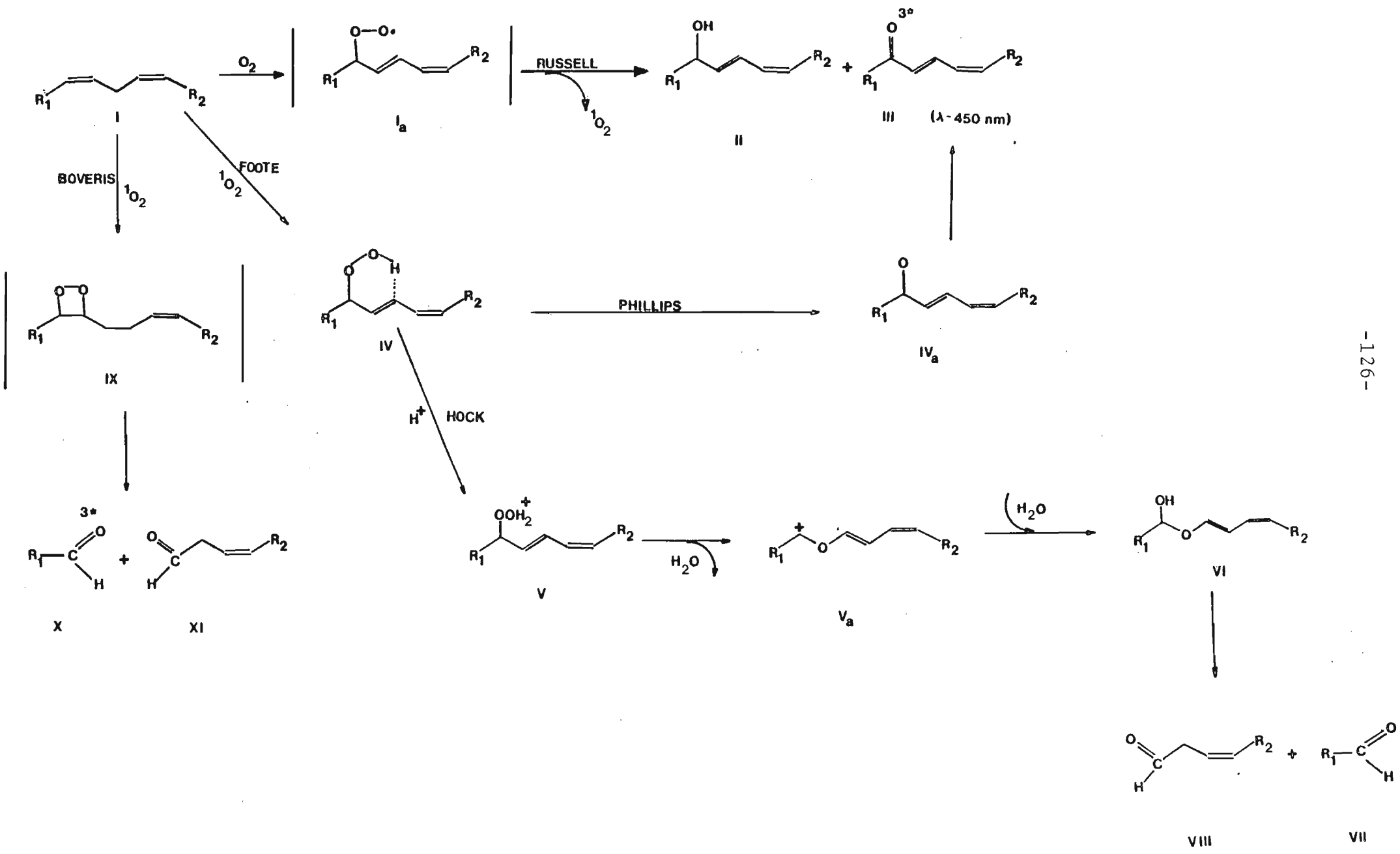
Cadenas e colaboradores (1984) têm estudado a quimiluminescência que acompanha o processo de lipoperoxidação em preparações de microssomas hepáticos.

Os diversos grupos que têm investigado a origem da quimiluminescência oriunda de peroxidação lipídica em sistemas isolados ou em preparações biológicas (Cilento, Boveris, Sies) propões várias vias para a etapa de quimexcitação eletrônica do produto. O Esquema 8.4 tenta resumir as sugestões da literatura até o presente.

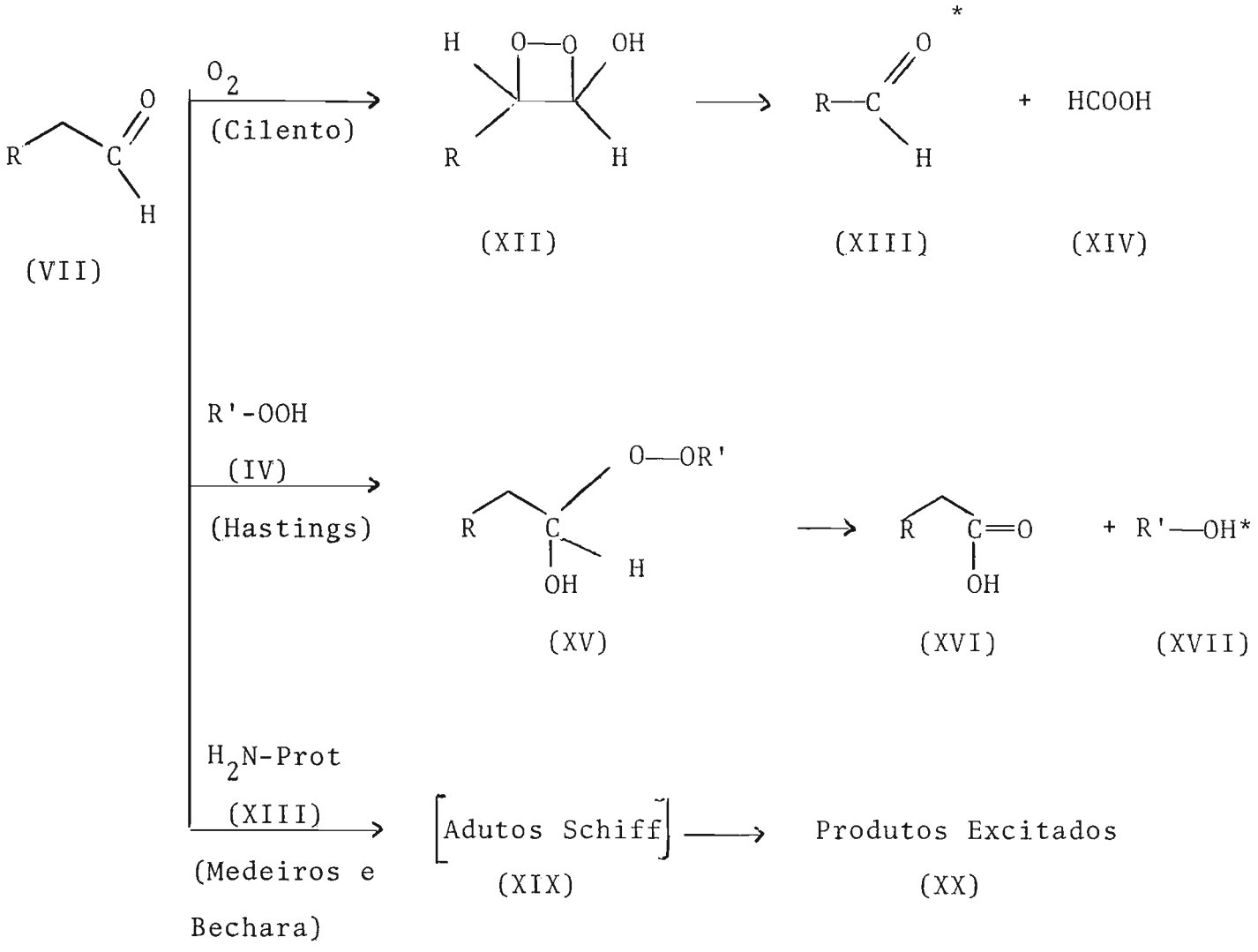
A formação de compostos carbonílicos excitados (Esquema 8.4) pode ocorrer pelo desproporcionamento do peróxi radical ($I_a$) (formado na etapa de terminação de lipoperoxidação) por um mecanismo do tipo Russell (Russell,1957). A formação de $^1O_2$ foi confirmada espectroscopicamente (Sugioka e Nakano, 1976), e a carbonila eletronicamente excitada (III) foi detectada através de sua emissão característica na região azul, = 450 nm (Cadenas e colaboradores, 1983, 1984).

A interação e $^1O_2$ com olefinas substituídas com grupos alquila pode resultar na formação de um hidroperóxido

Esquema 8.4 (A)


O2
RUSSELL
1O2
BOVERIS
FOOTE
PHILLIPS
HOCK
H+
H2O
(λ - 450 nm)
I
Ia
II
III
IV
IVa
V
Va
VI
VII
VIII
IX
X
XI

Esquema 8.4 (B)


O2
(Cilento)
(VII)
(XII)
(XIII)
(XIV)
HCOOH
R'-OOH
(IV)
(Hastings)
(XV)
(XVI)
(XVII)
R'—OH*
H2N-Prot
(XIII)
(Medeiros e
Bechara)
Adutos Schiff
(XIX)
Produtos Excitados
(XX)

alílico (IV) (Foote, 1969), o qual levaria à formação da carbonila triplete (III) via desproporcionamento do alkoxi radical (IVa) formado. Tal mecanismo foi descrito por Phillips e colaboradores (1967) e Cadenas e colaboradores (1984).

O hidroperóxido alílico (IV) pode também sofrer uma clivagem do tipo Hock (Frankee, 1982) com formação dos mesmos fragmentos produzidos na termólise do dioxetano relacionado (VII e VIII). Entretanto, este tipo de clivagem não é quimiluminescente (Frimer, 1974; Bechara, 1979) ao contrário do indicado por Cadenas e colaboradores (1984).

Boveris e colaboradores (1983) propõem que a emissão na região de carbonilas durante a lipoperoxidação é devida à interação de oxigênio singlete com as ligações duplas dos lipídeos insaturados, formando o 1,2-dioxetano(IX) o qual cliva subsequentemente com formação do produto carbonílico no estado eletronicamente excitado (X). Entretanto, para que ocorra adição 1,2 à dupla ligação, as olefinas têm que apresentar as seguintes características (Wieringa e colaboradores, 1972): (i) a olefina deve ser suficientemente "rica" em elétrons (tais como as enaminas e os ésteres vinílicos); (ii) não deve ter hidrogênio alílico disponível e (iii) a reação deve estar estericamente favorecida.

A formação de dioxetano intermediário, para o caso descrito por Boveris, como rota para a formação de produtos excitados durante a peroxidação lipídica é, portanto, bastante improvável.

Carbonilas eletronicamente excitadas também podem ser geradas à partir da oxidação de aldeídos alifáticos (VII) formando o homólogo inferior (XIII) e ácido fórmico (XIV).Este tipo de reação ocorre no processo de lipoperoxidação (Esterbauer, 1982). Sabe-se que tal reação quando catalisada por HRP leva à formação do aldeído no estado eletronicamente excitado (Cilento, 1984; Cadenas, 1984).

Os aldeídos alifáticos formados durante a lipoperoxidação (VII) poderiam, ainda, reagir com hidroperóxidos (IV) por um mecanismo do tipo Baeyer-Villiger (Sykes, 1977 ) formando o fragmento XVIIno estado eletronicamente excitado. Este tipo de mecanismo foi proposto por Eberhard e Hastings (1972) para a oxidação bioluminescente de flavina mononucleotídeo reduzida em bactérias e não se pode excluir a possibilidade de que também seja operante no caso da lipoperoxidação.

No presente trabalho, sugerimos que a formação de carbonilas triplete no processo de peroxidação lipídica tem a contribuição da oxidação enzimática de adutos de Schiff (XIX) formados via interação de aldeídos (VII) com proteínas de membranas (XIII).

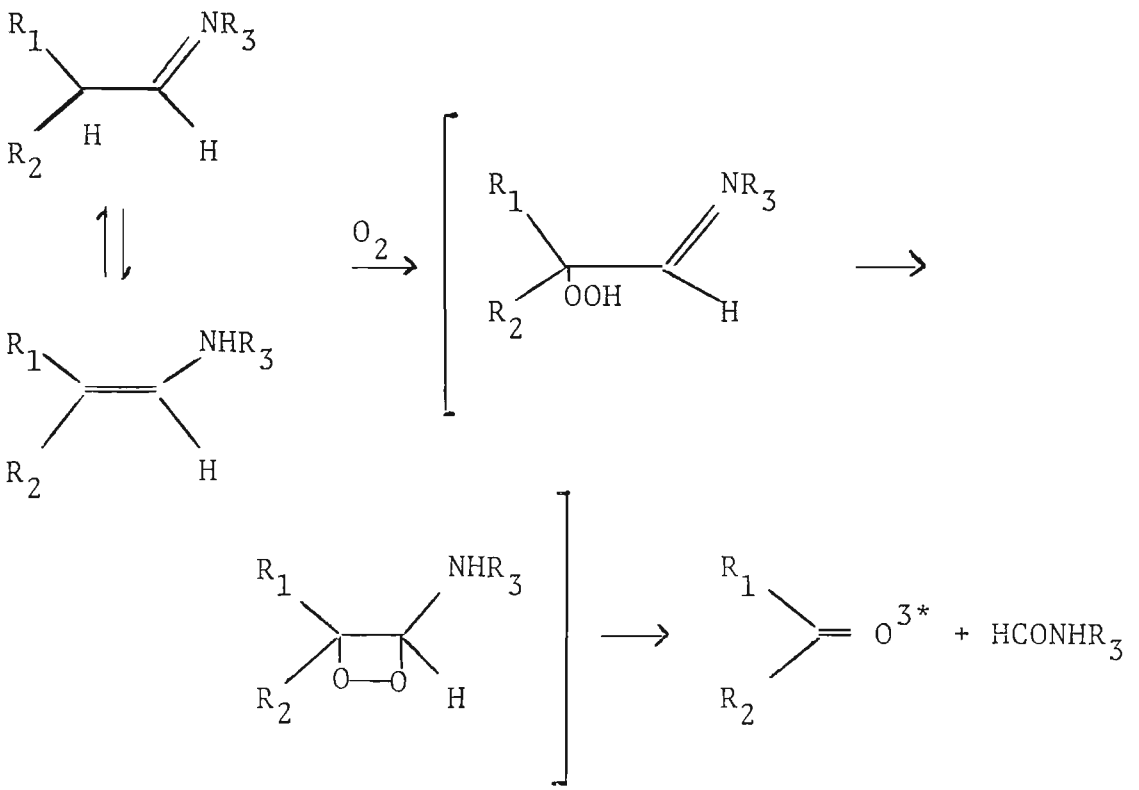
## 9. SUMÁRIO

A enzima peroxidase (HRP), agindo como uma oxigenase em substratos apropriados, promove a formação de espécies excitadas no estado triplete. Estes produtos excitados podem ser formados em sistemas bioquímicos e promover processos fotoquímicos no escuro.

Nesta linha de estudos, investigamos a oxidação aeróbica, na presença de HRP, de substratos contendo ligações de Schiff. Esses compostos são de grande importância biológica, uma vez que participam como intermediários em diversas reações enzimáticas (transaminação, biossíntese de aminoácidos, biossíntese de profirinas), nas ligações cruzadas do colágeno e da elastina, na hemoglobina $A1_C$, na rodopsina e bacterionodopsina e como produtos finais da lipoperoxidação.

A oxidação aeróbica de quatro iminas alifáticas (BPA, i-BMA, sec-BMA e BVA), catalisada por HRP, é quimiluminescente. A natureza triplete da espécie excitada foi sugerida pelo espectro de quimiluminescência, por meio de estudos de transferência de energia para DBAS e clorofila e pela supressão de quimiluminescência por oxigênio, sorbato, indol e p-benzoquinona. Com base nos altos valores de $k_{ET}^{o}$ encontrados, concluimos que a transferência de energia esteja ocorrendo provavelmente por um mecanismo a longa distância.

A análise dos produtos da reação e os dados cinéticos indicam que a reação ocorre provavelmente segundo a via:




Ressalta-se que esta reação constitui um modelo mais adequado para sistemas bioluminescentes do que o proposto por McCapra e Burford (1976) com bases de Schiff aromáticas em t-butóxido e DMSO. Os sistemas aqui descritos também apresentam a possibilidade de desenvolvimento de método analítico, empregando quimiluminescência, para detectar formação de bases de Schiff em sistemas biológicos.

Os estudos com base de Schiff alifáticos (sistemas modelo) foram estendidos para adutos contendo ligação de Schiff entre glicolaldeído e aminoácidos (Lys, Arg, His e Phe) ou proteínas (lisozima, BSA e protaminas). Todos os sistemas estudados são quimiluminescentes na presença de HRP; a fluorescência característica da formação do aduto decai concomitantemente com a emissão de luz; e, durante a reação, a peroxidase encontra-se principalmente na forma

de composto II. Observa-se também transferência de energia dos sistemas glicolaldeído-lisozima/HRP/$O_2$ e glicolaldeído-protamina/HRP/$O_2$ para clorofila.

Estes estudos têm grande interesse do ponto de vista da toxicidade associada à ingestão de álcool etílico, a qual, segundo trabalhos recentes da literatura, é atribuída à formação de bases de Schiff entre proteínas de membranas e acetaldeído. É notável também, a formação de iminas durante o processo de lipoperoxidação e a quimiluminescência que o acompanha. Nossos dados levantam a possibilidade de que a toxicologia do álcool pode envolver espécies eletronicamente excitadas formadas na oxidação aeróbica dos adutos aldeído-proteínas.

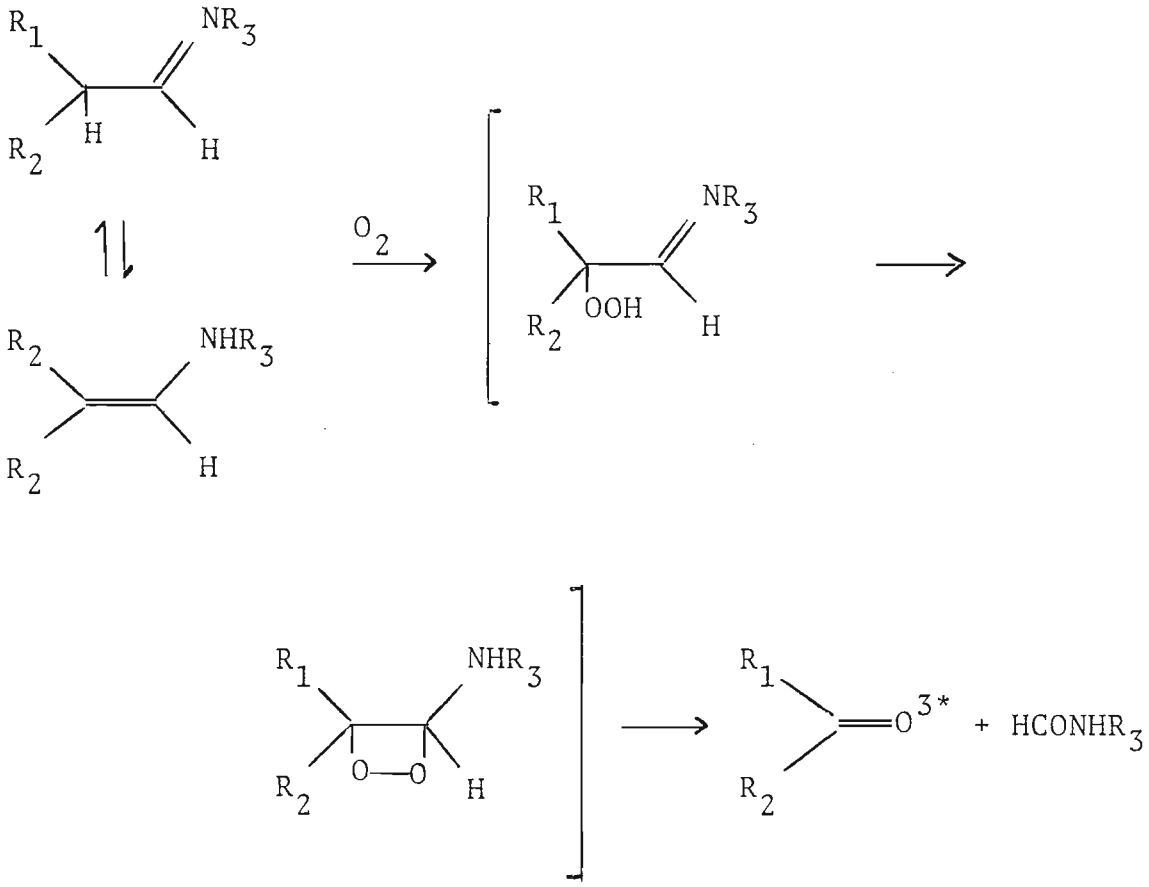
## 10. SUMMARY

Horseradish peroxidase (HRP), acting as an oxigenase on various substracts, promotes the generation of electronically excited triplet species. These species can also be formed in many biochemical reactions and drive photochemical processes in the absence of light.

Enlighted by this hypothesis (photobiochemistry in the dark) we have investigated the HRP-catalyzed aerobic oxidation of substrates containing Schiff linkage. These compounds are of utmost biological importance as they participate as intermediates of several enzymatic reactions (transamination, amino-acid biosyntheses, porphyrin biosyntheses, a.s.o.), in the crosslinking of collagen and elastin, in hemoglobin $A1_C$, in rhodopsin and bacteriorhodopsin, and as final products from lipid peroxidation.

The aerobic oxidation of four aliphatic imines (BPA, i-BMA, sec-BMA and BVA), catalyzed by HRP, has been shown to be chemiluminescent. The triplet nature of the products is suggested by the chemiluminescence spectrum, by energy transfer studies to DBAS and chlorophyll a and by quenching of the chemiluminescence by molecular oxygen, sorbate ion, indol and p-benzoquinone. Based on the high values of $k_{ET}\tau^{o}$ found in these experiments we have concluded that the energy transfer process occur through a long range mechanism.

Analyses of the products found in the spent reaction mixtures and the kinetic data indicate that the reaction follows the route:



We stress that this reaction constitutes a more realistic model for bioluminescent systems than that reported by McCapra and Burford (1976), which uses aromatic Schiff bases in DMSO/t-butoxi. In addition, the reaction described here point out for the possible development of chemiluminescent analytical procedure to detect the formation of Schiff bases in biological systems.

Our studies on aliphatic Schiff bases were extended to adducts of both amino acids (Lys, Arg, His and Phe) and proteins (lyzozyme, bovine serum albumin and fish protamins) with glycolaldehyde. All these adducts are chemiluminescent when exposed to HRP in an aerated buffered solution. The fluorescence typical of the adducts decays concomitantly with light emission and, during the reaction,

the enzyme remains predominantely in the form of HRP Compound II. Energy transfer to chlorophyll a from the systems glycolaldenyde-lyzozyme/$O_2$/HRP and glycolaldehyde-protamine/$O_2$/HRP occur.

These studies are relevant with respect to the toxicity associated to ethyl alcohol intake which, according to recent reports, is attributed to the formation of Schiff linkages between membrane proteins and acetaldehyde. Also noteworthy is the formation of imines along lipid peroxidation and the accompanying chemiluminescence. Our data raise the hypothesis that the alcohol toxicology may involve generated electronically excited species formed during aerobic oxidation of protein-aldehyde adducts.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acharya, A.S. e J.M. Manning (1980), J. Biol. Chem. 255, 7218.

Acharya, A.S. e J.M. Manning (1983) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 80, 3590.

Adam, W. (1982) Em "Chemical and Biological Generation of Excited States" (W. Adam e G. Cilento, eds.) Academic Press, New York, NY, pp. 115-152.

Adam, W., L.A.A. Encarnación, G. Cilento, M. Haun e L. Nassi (1984) Photochem. Photobiol., 40, 189.

Akutagawa, M., A. Katoh, H. Yamamoto, H. Aoyama e Y. Omote (1985) J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1290.

Augusto, O. e G. Cilento (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun., 79, 1238.

Augusto, O. e E.J.H. Bechara (1980) Biochim. Biophys. Acta, 631, 203.

Baader, W.J., C. Bohne, G. Cilento e H.B. Dunford (1985) J. Biol. Chem., 260, 10217.

Bechara, E.J.H. (1979) "Tese de Livre-Docência", Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Bechara, E.J.H., A.L. Baumstark e T. Wilson (1976) J. Am. Chem. Soc., 98, 4648.

Bechara, E.J.H., O.M.M. Faria Oliveira, N. Durán, R. Casadei de Baptista e G. Cilento (1979) Photochem. Photobiol., 30, 101.

Bechara, E.J.H. e G. Cilento (1984) Quim. Nova, 7(4), 210.

Belyakov, V.A. e R.F. Vassile'ev (1970) Photochem. Photobiol., 11, 179.

Bennet, R.G., R.P. Schwenber e R. Kellog (1964) J. Chem. Phys., 41, 3040.

Berenfeld, V.M., E.V. Chumaevskii, M.P. Grinev, Y.I. Kuryatnikov, E.T. Artem'ev e R.V. Dzhagatspanyan (1970) Bull. Acad. Sci. USSR, Ser. Phys., 3, 597.

Bills, C.E. (1927) J. Biol. Chem., 72, 751.

Boveris, A., E. Cadenas, R. Reiter, M. Filipkowski, Y. Nakase e B. Chance (1980) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 77, 347.

Boveris, A., C.G. Fraga, A.I. Varsavsky e O.R. Koch (1983) Arch. Biochem. Biophys., 227, 534.

Brunetti, I.L., E.J.H. Bechara, G. Cilento e E.H. White (1982) Photochem. Photobiol., 36, 245.

Brunetti, I.L., G. Cilento e L. Nassi (1983) Photochem. Photobiol., 38, 511.

Bunn, H.F., K.H. Gabbay e P.M. Gallop (1978) Science, 200, 21.

Bunn, H.F. e P.J. Higgins (1981) Science, 213, 222.

Cadenas, E. e H. Sies, H. Graf e V. Ullrich (1983) Eur. J. Biochem., 130, 117.

Cadenas, E., H. Sies, A. Campa e G. Cilento (1984) Photochem. Photobiol., 40, 661.

Calhoun, D.B., J.M. Vanderkooi, G.V. Woodrow III e S.W. Englander (1983) Biochemistry, 22, 1533.

Campa, A. (1984) "Tese de Doutoramento", Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Catalani, L.H. (1984) "Tese de Doutoramento", Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Catalani, L.H. e E.J.H. Bechara (1984) Photochem. Photobiol., 39, 823.

Cerami, A. e R.J. Koenig (1978) Trends Biochem. Sci., 3, 73.

Chio, K.S., V. Reiss, B. Fletcher e A.L. Tappel (1969) Science, 166, 1535.

Cilento, G. (1973) Quart. Revs. Biophys., 6, 485.

Cilento, G. (1975) J. Theor. Biology, 55, 471.

Cilento, G. (1980a) Photochem. Photobiol. Rews., 5, 199.

Cilento, G. (1980b) Acc. Chem. Res., 13, 225.

Cilento, G. (1982) Em "Chemical and Biological Generation of Excited States" (W. Adam e G. Cilento, eds.), Academic Press, N.Y., pp. 207-307.

Cilento, G. (1984) Pure & Appl. Chem., 56, 1179.

Cilento, G., N. Durán, K. Zinner, C.C.C. Vidigal, O.M.M. Faria Oliveira, M. Haun, A. Faljoni, O. Augusto, R. Casadei e Baptista e E.J.H. Bechara (1978) Photochem. Photobiol., 28, 445.

Cook, J.S. (1967) Photochem. Photobiol., 6, 97.

Cotton, M.L. e H.B. Dunford (1973) Can. J. Chem., 51, 582.

De Mello, M.P., S.M. de Toledo, M. Haun, G. Cilento e N. Durán (1980) Biochemistry, 19, 5270.

Dexter, D.L. (1953) J. Chem. Phys., 21, 836.

Dillard, C.J. e A.L. Tappel (1971) Lipids, 6, 715.

Dunford, H.B. e J.S. Stillman (1976) Coord. Chem. Rev., 19, 187.

Dunford, H.B., W.J. Baader, C. Bohne e G. Cilento (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 28.

Durán, N. (1982) Em "Chemical and Biological Generation of Excited States". (W. Adam e G. Cilento, eds.). Academic Press, N.Y., pp. 345-363.

Durán, N., K. Zinner, C.C.C. Vidigal e G. Cilento (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun., 74, 1146.

Durán, N. e G. Cilento (1980) Photochem. Photobiol., 32,113.

Durán, N., J. Baeza, J. Freer, J.E. Brunet, G.A. Gonzales, C.P. Sotomayor, A. Faljoni-Alario (1981) Biochem.Biophys. Res. Commun., 103, 131.

Eberhard, A. e J.W. Hastings (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun., 47, 348.

Esterbauer, H. (1982) Em "Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer (D.C.H. McBrien e T.F. Slater) Academic Press, N.Y., pp. 101-122.

Faria Oliveira, O.M.M., M. Haun, N. Durán, P.J. O'Brien, C.R. O'Brien, E.J.H. Bechara e G. Cilento (1978) J. Biol. Chem., 253, 4707.

Foote, C.S. (1976) Em "Free Radicals in Biology". (W.A. Pryor, ed.), Academic Press, N.Y., pp. 85-133.

Förster, T. (1959) Discuss. Faraday Soc., 27, 7.

Frankel, E.N. (1982) Progr. Lipid Res., 22, 1.

Frimer, A.A. (1974) PhD Thesis, Harvard University, Cambridge, Mass., USA.

Gaines, K.C., J.M. Salhany, D.J. Tuma e M.F. Sorrell (1977) FEBS Lett., 75, 115.

Gallardo, H., L.A. Guillo, N. Durán e G. Cilento (1984) Biochem. Biophys. Acta, 787, 57.

Halliwell, B. (1977) Em "Superoxide and Superoxide Dismutases (A.M. Michelson, J.M. McCord e I. Fridovich, eds.) Academic Press, NY, pp. 335-349.

Hastings, J.W. e T. Wilson (1976) Photochem. Photobiol., 23, 461.

Hine, J., J.G. Houston, e J.H. Jensen (1965) J. Org. Chem., 30, 1184.

Hine, J. e C.Y. Yeh (1967) J. Amer. Chem. Soc., 89, 2669.

Horn, K.A., J.-Koo, S.P. Schmidt e G.B. Schuster (1978-9), Mol. Photochem., 9, 1.

Inaba, H., Y. Shimizu, Y. Tsuji e A. Yamagishi (1979) Photochem. Photobiol., 30, 169.

Jacobs, H.J.C. e E. Havinga (1979) Adv. Photochem., 11, 305.

Kalyanaraman, V.S., S. Mahadevan e S.A. Kumar (1975) Biochem. J., 149, 565.

Kamiya, I. e K. Aoki (1974) Bull. Chem. Soc. Jpn., 47, 1908.

Kopecky, K.R. e C. Munford (1969) Can. J. Chem., 47, 709.

Kopecky, K.R., J.E. Filby, C. Munford, P.A. Lockwood e J.Y. Ding (1975) Can. J. Chem.,53, 1103.

Koster, J.F., R.G. Slee e Th.J.C. Van Berkel (1982) Biochim. Biophys. Acta, 710, 230.

Lamola, A.A. e N.J. Turro (1969) Em "Energy Transfer and Organic Photochemistry" (P.A. Leermakers e A. Weissberger, eds.) Interscience Publisher, N.Y.

Layer, R.W. (1963) Chem. Rev., 63, 489.

Lienhard, G.E. e F.H. Anderson (1967) J. Org. Chem., 32, 2229.

Maral, J., K. Punget e A.M. Michelson (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun., 77, 1525.

McCapra, F. (1968) J. Chem. Soc. Chem. Commun., 155.

McCapra, F. (1976) Acc. Chem. Res., 9, 201.

McCapra, F. (1977) J. Chem. Soc. Chem. Commun., 946.

McCapra, F. e A. Burford (1976) J. Chem. Soc., Chem. Commun., 607.

McCord, J.M. e I. Fridovich (1968) J. Biol. Chem., 243,5753.

McLaughlin, J.A., R. Pethig e A. Szent-Györgyi (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 949.

Morgan, P.A. (1981) Sciquest, 54, 24.

Nascimento, A.L.T.O. e G. Cilento (1985) Biochim. Biophys. Acta, 843, 254.

Nassi, L. e G. Cilento (1983) Photochem. Photobiol., 37,233.

Nicholls, P. e G.R. Schombaum (1963) Em "The Enzymes (P.D. Boyer, H. Lardy e K. Myrback, eds). Academic Press, N.Y., pp. 147-225.

Nilsson, R., P.B. Merkel e D.R. Kearns (1972) Photochem. Photobiol., 16, 117.

Nomura, F. e C.S. Lieber (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun., 100, 131.

Ohlsoon, P.-I. e K.-G. Paul (1976) Acta Chem. Scand., B30, 373.

Ottolenghi, M. (1980) Adv. Photochem., 12, 97.

Parker, J., A.L. Thomson e J. Waugham (1955) J. Chem. Soc., 2601.

Pesek, J.J. e J.H. Frost (1974) J. Magnetic Resonance, 15, 520.

Phillips, D., V. Anissimov, O. Karpukhin e V. Shliapintokh (1967) Nature, 215, 1163.

Quina, F. (1982) Em "Chemical and Biological Generation of Excited States" (W. Adam e G. Cilento, eds.) Academi Press, N.Y., pp. 1-32.

Reeves, R.L. (1962) J. Am. Chem. Soc., 84, 3332.

Rivas-Suârez, E. e G. Cilento (1981) Biochemistry, 20, 7329.

Rivas-Suárez, E., O. Augusto e G. Cilento (1981) Photochem. Photobiol., 33, 279.

Rivas-Suárez, E., L.H. Catalani, E.J.H. Bechara e G. Cilento (1983) Photochem. Photobiol., 37, 93.

Roberts, J.D. e C. Green (1946) J. Am. Chem. Soc., 68, 214.

Russell, G.A. (1957) J. Am. Chem. Soc., 79, 3871.

Schiff, H. (1864) Ann., 118.

Schmidt, S.P. e G.B. Schuster (1980) J. Am. Chem. Soc., 102, 7100.

Schuster, G.B. (1979) Acc. Chem. Res., 12, 366.

Seely, G.R. e R.G. Jensen (1965) Spectroquim. Acta, 21, 1835.

Segel, I.H. (1974) Em "Enzyme Kinetics" Wiley-Interscience Publication, N.Y.

Shimasaki, H., M. Otomo e N. Ueda (1981) Teikyo Igaku Zasshi, 4, 207.

Shimizu, Y., R. Casadei de Baptista e K. Zinner (1979) Quim. Nova, 2, 85.

Shriner, R.L., R.C. Fuson e D.Y. Curtin (1956) Em "Systematic Identification of Organic Compounds" (J. Wiley & Sons-Inc., eds.) N.Y., pp. 219 e 254.

Soares, C.H.L. (1984) "Dissertação de Mestrado", Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Soares, C.H.L. e E.J.H. Bechara (1982) Photochem. Photobiol., 36, 117.

Song, P.-S. (1983) Em "Topics in Photobiology" (H.O. Kim e P.S. Song, eds.). Published by the Graduate School and the Research Institute for Subtropical Agriculture - Jeju National University pp. 3-13.

Stryer, L. (1981) Em "Biochemistry". W.H. Freeman and Company. San Francisco.

Sugioka, K. e M. Nakano (1976) Biochim. Biophys. Acta, 423, 203.

Sutherland, B.M. (1981) Bioscience, 31, 439.

Sykes, P. (1977) Em "A Guidebook to Mechanism in Organic Chemistry". Longman, 4ª ed.

T'ang, A., E.J. Lien e M.M.C. Lai (1985) J. Med. Chem., 28, 1103.

Tappel, A.L. (1970) Amer. J. Clin. Nutr., 23, 1137.

Thornalley, P., S. Wolff, J. Crabbe e A. Stern (1984) Biochim. Biophys. Acta, 797, 276.

Tiollais, R. (1947) Bull. soc. chim., 708.

Tiollais, R.M.M., H. Bouget, J. Huet e A. Sauleau (1969) C.R. Acad. Soc. Paris, 269, 1319.

Tuma, D.J., T.M. Donohue, Jr., V.A. Medina e M.F. Sorrell (1984) Arch. Biochem. Biophys., 234, 377.

Turro, N.J. (1978) Em "Modern Molecular Photochemistry", The Benjamin/Cummings Publishing Co., Menlo Park, California.

Venema, R.C. e D.H. Hug (1985) J. Biol. Chem., 260, 12190.

Vidigal, C.C.C., A. Faljoni-Alário, N. Durán, K. Zinner, Y. Shimizu e G. Cilento (1979) Photochem. Photobiol., 30, 1985.

Villablanca, M. e G. Cilento (1985) Photochem. Photbiol., 40, 1.

Wagner, P.J. (1967) J. Am. Chem. Soc., 89, 5715.

White, E.H., J.D. Miano, C.J. Watkins e E.J. Breaux (1974) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 13, 229.

Wieringa, J.H., J. Strating, H. Wynberg e W. Adam (1972) Tetrahedron Lett,, 169.

Wiessinger, H. e H.J. Hinz (1984) Arch. Biochem. Biophys., 235, 34.

Willi, A.V. (1956) Helv. Chim. Acta, 39, 1193.

Willi, A.V. e R.E. Robertson (1953) Can. J. Chem., 31, 361.

Wilson, T. (1976) Em "Chemical Kinetics" (D.R. Herschback, ed.) M.T.P. Int. Rev. Sci. Phys. Chem. Ser. Two, vol. 9, Butterworth, London, 265.

Wilson, T. e A.P. Schaap (1971) J. Am. Chem. Soc., 93, 4126.

Wilson, T., M.E. Landis, A.L. Baumstark e P.D. Bartlett (1973) J. Am. Chem. Soc., 95, 4765.

Yokota, K. e I. Yamazaki (1977) Biochemi-try, 16, 1913.