BIBLIOTECA
Instituto de Química
Universidade de São Paulo
9272

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

ANA CAMPA

# Aldeídos Alifáticos Lineares Triplete Formação Enzimática e Efeitos em Estruturas Biológicas

Tese de Doutoramento
Orientada por
Prof. Dr. GIUSEPPE CILENTO

SÃO PAULO
1984

*Por que não ensinam a tirar*
*mel do sol aos helicópteros?*

*Pablo Neruda*

*Ao Edu e Bruno*

*À todos que participaram desta minha adolescência científica, em especial ao chefe.*

*À todos que participaram "não cientificamente" desta estória.*

À
FAPESP, FINEP, CNPq e Volkswagenwerk Stiftung,
pelo auxílio financeiro.

BIBLIOTECA
Instituto de Química
Universidade de São Paulo

# ÍNDICE

Pág.

ABREVIAÇÕES

I. INTRODUÇÃO ..... 1

I.1 - Estados excitados ..... 2

I.2 - Formação química de estados excitados ..... 6

I.3 - Transferência de energia ..... 12

I.3.1 - Transferência radiativa ..... 12

I.3.2 - Transferência não radiativa ..... 13

I.4 - Estados excitados em sistemas biológicos.... 18

I.5 - Importância biológica dos ácidos de cadeia curta, em especial do ácido butírico..... 25

I.6 - Objetivos da Tese ..... 27

II. MATERIAIS E MÉTODOS ..... 28

II.1 - Reagentes ..... 28

II.2 - Aparelhagem ..... 30

II.3 - Métodos ..... 30

II.3.1 - Purificação e armazenamento do IBAL e aldeídos alifáticos lineares ..... 30

II.3.2 - CTAB ..... 31

II.3.3 - Clorofila ..... 31

II.3.4 - Extração de cloroplastos ..... 31

II.3.5 - Dosagem de clorofila em cloroplastos ..... 32

II.3.6 - Extração de microsomas ..... 33

Pág.

II.3.7 - Dosagem de proteína microsomal... 33

II.3.8 - Tratamento com fenobarbital ..... 33

II.3.9 - Dosagem de malonaldeído ..... 33

II.3.10 - Tratamento de microsomas com tripsina ou desoxicolato de sódio ..... 34

II.3.11 - Adição de clorofila a microsomas. 34

II.3.12 - Condições experimentais ..... 35

II.3.13 - Adição de glucose/glucose oxidase/catalase ..... 35

II.3.14 - Cálculos de rendimento quântico de quimioexcitação x rendimento quântico de transferência de energia ..... 36

III. OXIDAÇÃO AERÓBICA DOS ALDEÍDOS ALIFÁTICOS LINEARES ($C_2$-$C_6$), CATALISADA PELA HRP ..... 37

III.1 - Estudos cinéticos comparativos. Transferência de energia para corantes xantênicos e clorofila em micelas ..... 37

III.1.1 - Resultados ..... 37

III.1.2 - Discussão ..... 47

III.2 - Transferência de energia para cloroplastos ..... 55

III.2.1 - Cloroplastos - Estrutura e Função ..... 55

Pág.

III.2.2 - Interação de cloroplastos com sistemas geradores de aldeídos alifáticos lineares triplete ..... 56

III.2.2.1 - Resultados ..... 58

III.2.2.2 - Discussão ..... 69

IV. QUIMIOLUMINESCÊNCIA DE MICROSOMAS EXPOSTOS À OXIDAÇÃO DE ALDEÍDOS LINEARES E OUTROS SUBSTRATOS CATALISADA PELA HRP ..... 73

IV.1 - Retículo endoplasmático e microsomas ..... 73

IV.2 - Interação de microsomas com sistemas geradores de espécies excitadas triplete ..... 77

IV.2.1 - Sistema aldeídos lineares/HRP/$O_2$ .. 78

IV.2.1.1 - Resultados ..... 78

IV.2.1.2 - Discussão ..... 95

IV.2.2 - Exposição a outros sistemas ..... 99

V. CONCLUSÕES ..... 105

VI. SUMÁRIO ..... 106

ABSTRACT..... 109

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 112

## ABREVIAÇÕES

| | | |
|---|---|---|
| t-BuOOH | - | tert - butilhidroperoxido |
| $C_2$ | - | acetaldeído |
| $C_3$ | - | propanal |
| $C_4$ | - | butanal |
| $C_5$ | - | pentanal |
| $C_6$ | - | hexanal |
| CTAB | - | brometo de hexadeciltrimetilamônio |
| EDTA | - | etilenodiaminotetraacetato de sódio |
| HRP | - | peroxidase de rábano (horseradish peroxidase) |
| HRP I | - | peroxidase composto I |
| HRP II | - | peroxidase composto II |
| IAA | - | ácido indol-3-acético |
| IBAL | - | isobutiraldeído |
| NADH | - | nicotinamida-adenina-dinucleotídeo forma reduzida |
| NADPH | - | nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato forma reduzida |
| PS I | - | fotossistema I |
| PS II | - | fotossistema II |
| SKF-525A | - | 2-dietilaminoetil-2,2-difenilvalerato |
| TBA | - | ácido tioubarbiturico |
| TCA | - | ácido tricloroacético |
| tris | - | tris-(hidroximetil)-aminometano |
| $\Phi$ | - | rendimento quântico |

# I. INTRODUÇÃO

Diversos organismos vivos são capazes de emitir luz fria. Este fenômeno, conhecido por bioluminescência, é produto de um processo oxidativo altamente exergônico onde energia química é convertida em energia luminosa. Neste processo há a formação de um intermediário de alta energia, cuja clivagem leva à formação de um produto eletronicamente excitado, o qual decai para o estado fundamental emitindo luz (HASTINGS, 1968; HASTINGS & WILSON, 1976; HENRY & MICHELSON, 1978a,b; ANCTIL, 1979; HART & CORMIER, 1979; WARD, 1981).

Acreditando que a bioluminescência particularize um fenômeno mais amplo, ou seja, que a formação de estados eletronicamente excitados ocorra "in vivo" tendo outras finalidades que não somente a emissão de luz, CILENTO e colaboradores iniciaram uma linha de pesquisa denominada "Fotobioquímica no escuro" (CILENTO, 1973, 1980a, 1980b, 1982).

A hipótese de que espécies eletronicamente excitadas possam ser formadas e usadas em processos biológicos não quimioluminescentes é sustentada por analogia química, uma vez que moléculas quimicamente geradas em um estado excitado podem realizar trabalho tipicamente fotoquímico (WHITE & WEI, 1970;GUNSTEN & ULLMAN, 1970; LAMOLA, 1971).

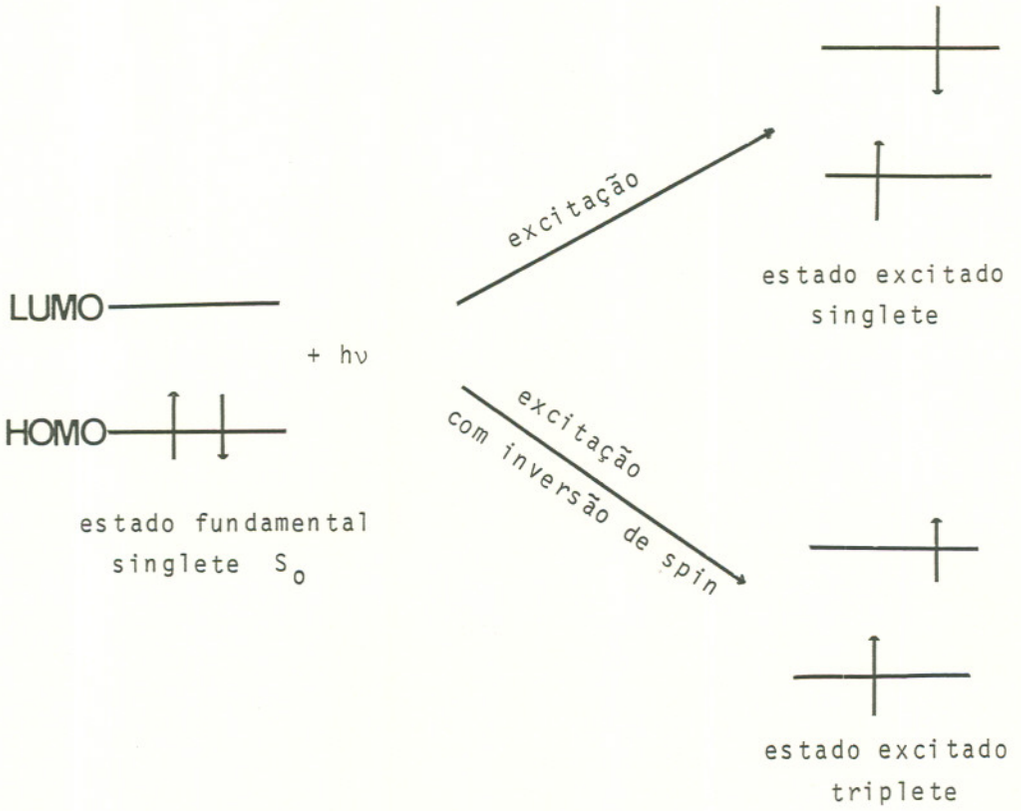
Diversos modelos enzimáticos geradores de espécies eletronicamente excitadas tem sido estudados, assim como a transferência de energia eletrônica para vários aceptores sintéticos e naturais, dentre os quais macromoléculas e recentemente estruturas biológicas complexas (CILENTO, 1982; NASSI & CILENTO, 1982, 1983).

## I.1 ESTADOS EXCITADOS

Moléculas eletronicamente excitadas são comumente formadas pela ação da luz. Quando uma molécula absorve luz visível ou ultravioleta ocorre a excitação (salto eletrônico) de um elétron de um orbital HOMO (highest occupied molecular orbitals) para um outro de mais alta energia LUMO (lowest unoccupied molecular orbitals).

A molécula no estado excitado possui um elétron em um orbital antiligante; neste estado ela pode ser singlete (spins opostos, multiplicidade 1) ou triplete (spins paralelos, multiplicidade 3). A maioria das moléculas orgânicas possui, no estado fundamental, seus elétrons totalmente pareados, i.é, apresentam-se no estado singlete ($S_0$).

Estados eletronicamente excitados podem ser considerados isômeros eletrônicos de moléculas no estado fundamental. Estes isômeros apresentam diferentes distribuições eletrônicas no espaço, consequentemente,




possuem diferentes estruturas, reatividades e propriedades. O que em geral distingue o estado excitado triplete do singlete é sua menor energia e maior tempo de vida ($10^{-5}$s até alguns segundos), devido à menor repulsão eletrostática entre os seus elétrons (TURRO, 1978).

A espécie excitada pode ser desativada por vários processos competitivos. Uma destas vias de desativação é a emissão de luz que, se originada de transições de estados de mesma multiplicidade é denominada fluorescência (exemplo: $S_1 \rightarrow S_0 + h_\nu$) e de estados de multiplicidade diferentes, fosforescência (exemplo: $T_1 \rightarrow S_0 + h_\nu$).

As demais vias de desativação da espécie excitada são não radiativas e incluem conversão interna, cruzamento intersistema e formação de fotoprodutos. Na conversão interna e cruzamento intersistema o decaimento ao estado fundamental ocorre com a liberação de energia na forma de calor, sendo que a primeira é caracterizada por transições entre estados de mesma multiplicidade (exemplos: $S_1 \rightarrow S_0$ + calor; $T_2 \rightarrow T_1$ + calor) e a última por transições entre estados de multiplicidades diferentes (exemplos: $S_1 \rightarrow T_1$ + calor). Transições entre estados de diferentes multiplicidades são proibidas pela regra de seleção de spin e portanto, ocorrem frequentemente com menor eficiência.

A figura I.1 esquematiza vias de formação e desativação de espécies eletronicamente excitadas.

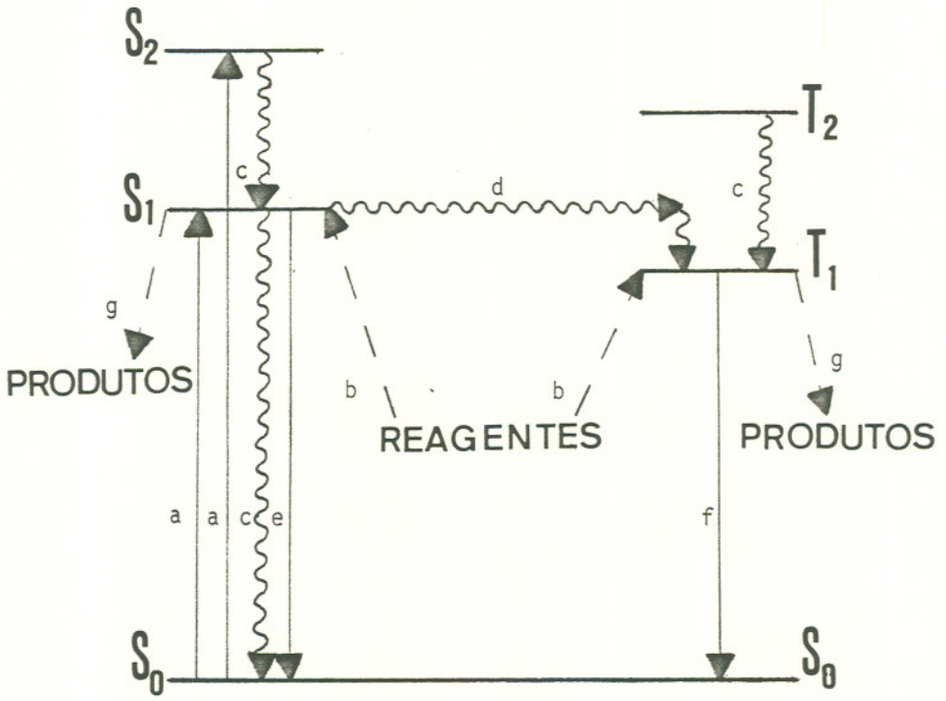



FIGURA I.1 - Diagrama de Jablonski

⟶ transições radiativas

⇝ transições não radiativas

- - → reações químicas

vias de formação
- a - absorção de luz
- b - excitação química
- d - cruzamento intersistema

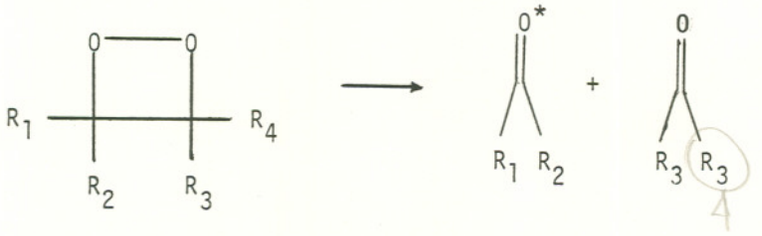
vias de desativação
- c - conversão interna
- d - cruzamento intersistema
- e - fluorescência
- f - fosforescência
- g - formação de fotoproduto

## I.2 FORMAÇÃO QUÍMICA DE ESTADOS EXCITADOS

Diversas reações químicas geram espécies eletronicamente excitadas. Dois mecanismos principais podem, a princípio, explicar a formação de espécies excitadas na quimio e bioluminescência: clivagem de peróxidos cíclicos e transferência de elétrons. No último caso destaca-se o processo CIEEL ("Chemically initiated electron-exchange luminescence").

### Clivagem de peróxidos cíclicos

A reação quimioluminescente mais extensivamente investigada é a clivagem unimolecular de 1,2-dioxetanos a dois produtos carbonílicos, um dos quais gerado em um estado eletronicamente excitado.

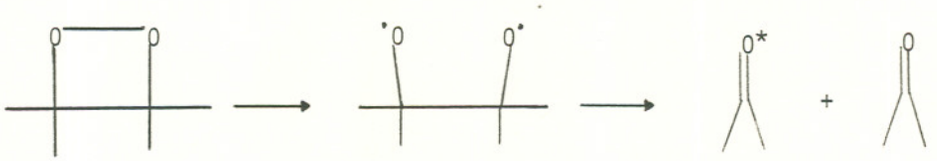



Dioxetanonas (α-peroxilactonas) também sofrem fragmentação com formação de um produto carbonílico excitado e $CO_2$.

KOPECKY & MUNFORD (1969) sintetizaram e caracterizaram o primeiro dioxetano estável (trimetil-1,2-dioxetano). Antes disto, Mc CAPRA (1968) havia sugerido, com base em diagrama de correlação de simetria de orbitais, que na clivagem unimolecular de dioxetanos poderiam ser formados produtos no estado eletronicamente excitado e que, portanto, dioxetanos poderiam ser os intermediários na etapa de quimioexcitação de reações quimio- e bioluminescentes.

Dois mecanismos foram propostos para a decomposição de dioxetanos: a clivagem simultânea das ligações O-O e C-C (TURRO & LECHTKEN, 1973)

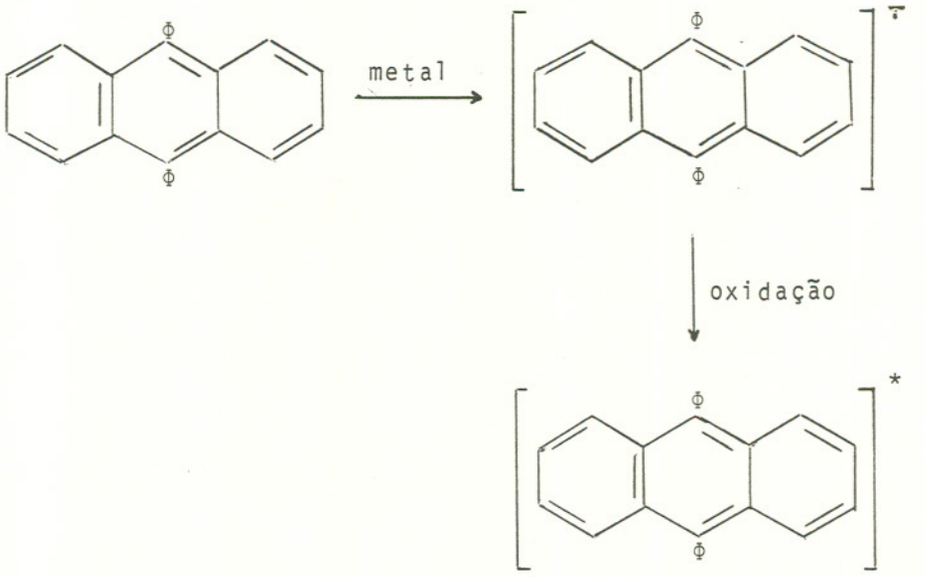
e um outro envolvendo duas etapas, com formação de um intermediário birradicalar (O'NEAL & RICHARDSON, 1970; RICHARDSON *et al.*, 1972).



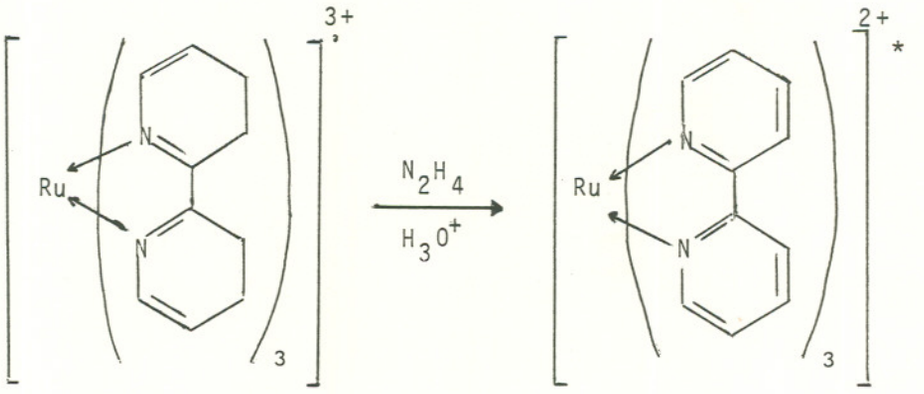
A termólise de alquil-, fenil- e alcoxi-dioxetanos gera predominantemente carbonilos triplete enquanto que os produtos de decomposição de dioxetanos substituidos por grupos com conjugação extensiva (como exemplo, os dioxetanos postulados como intermediários de muitas das reações bioluminescentes) são frequentemente fluorescentes.

## Reações de transferência de elétrons

Em reações de transferência de elétrons, as moléculas excitadas resultam da oxidação de um ânion-radical (equação 1), da redução de um cátion-radical (equação 2) ou do aniquilamento cátion-ânion (Fig.I.2) Em muitos dos casos estudados, o estado excitado é capaz de emitir luz e o processo total representa um exemplo simples de quimioluminescência (CHANDROS & SANNTAG, 1964 ;




|equação 1|




|equação 2|

WELLER & ZACHARIASSE, 1967; HERCULES, 1969; RAPAPORT *et al.*, 1972; ITAYA *et al.*, 1976).

BIBLIOTECA
Instituto de Química
Universidade de São Paulo

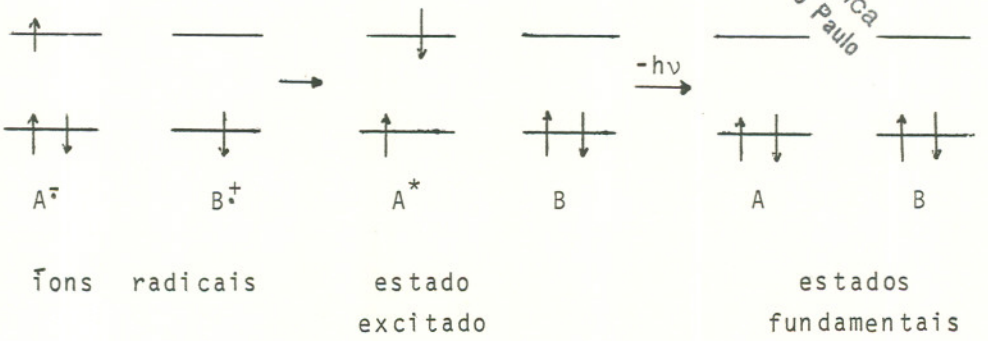


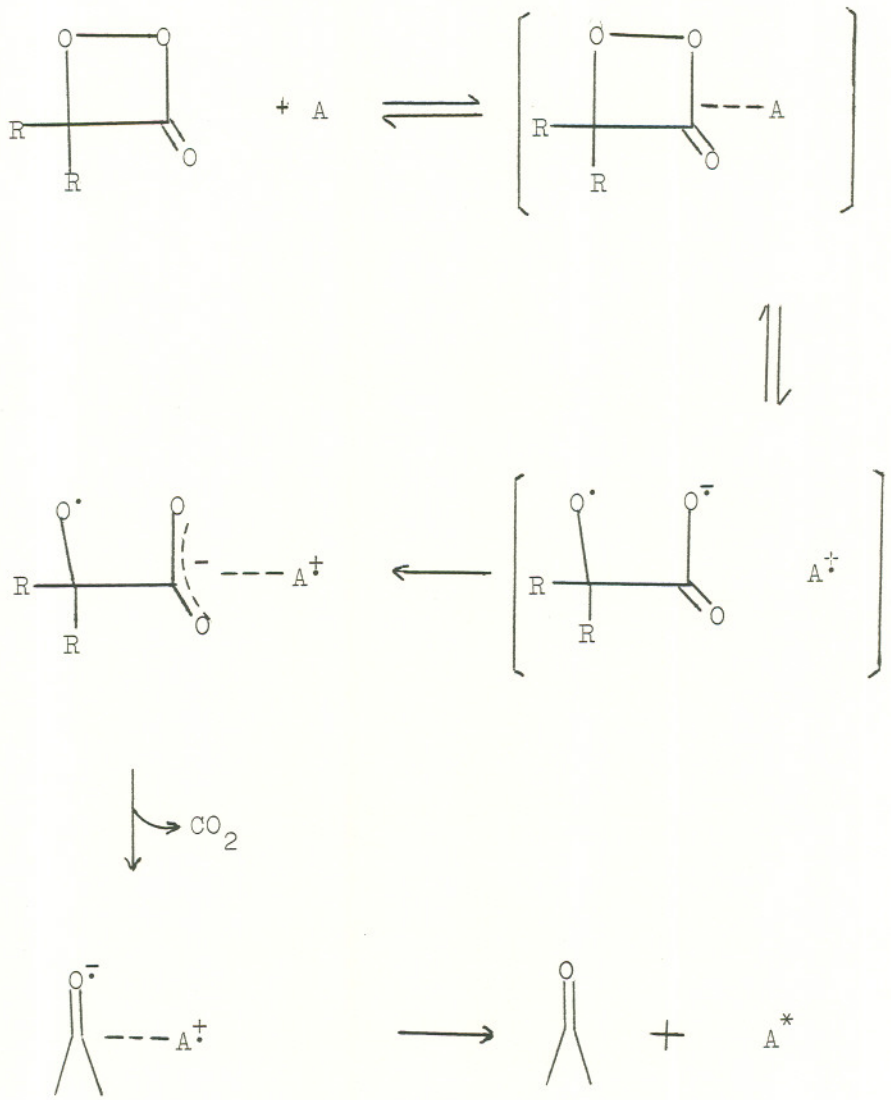

FIGURA I.2 - Quimioexcitação via aniquilação cátion-ânion.

Processo CIEEL (Chemically Initiated Electron-Exchange Luminescene

Este processo consiste essencialmente da combinação dos dois mecanismos anteriormente descritos e foi proposto por SCHUSTER (1979).

A sequência do processo CIEEL aplicada a uma dioxetanona se inicia pela transferência de elétrons de uma molécula A (doadora de elétrons) para a dioxetanona. O aniquilamento dos radicais formados produz o estado excitado de A. (pág. 11).

Se bem que este processo ocorra frequentemente com dioxetanonas, existem evidências de que ele possa ocorrer com certos dioxetanos (ADAM et al., 1981).


+ A
R
R
A
A+
A+
CO2
A*

## 1.3 TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA

A energia de excitação pode ser transferida de uma molécula doadora excitada ($D^*$) para uma molécula aceptora (A) formando o estado excitado $A^*$.

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

Existem dois mecanismos para a transferência de energia: radioativo e não radioativo.

### 1.3.1 Transferência radiativa

A transferência de energia radiativa envolve a possibilidade de absorção da emissão do doador. Este é um processo de duas etapas que envolve a participação de um fóton, não requer interação entre $D^*$ e A e pode ser bastante eficiente se A absorver fortemente na região em que $D^*$ emite.

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

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

Este tipo de transferência de energia, trivial do ponto de vista fotoquímico, é caracterizado por: (i) invariabilidade do tempo de vida de $D^*$ na presença de A, (ii) distorção no espectro de emissão de $D^*$, (iii) alteração da eficiência de transferência de energia com a mudança de geometria do sistema (FÖRSTER, 1959).

A eficiência deste processo depende: (i) do rendimento quântico de emissão do doador; (ii) da concentração do aceptor; (iii) da absortividade molar ($\varepsilon$) de A e (iv) da integral de recobrimento entre o espectro de $D^*$ e o espectro de absorção de A.

### 1.3.2 Transferência não radiativa

A transferência de energia não radiativa envolve a desativação simultânea do doador e excitação do aceptor num processo em que não há a participação de um fóton e que requer interação direta ou indireta entre o doador ($D^*$) e o aceptor (A). Para que a transição ocorra, o estado inicial ($D^* + A$) e final ($D + A^*$) devem ser degenerados ou próximos a degenerescência.

Dois tipos de interações contribuem na velocidade deste processo: interação coulombiana e interação de troca de elétrons.

A probabilidade da transição não radiativa $D^*A \rightarrow DA^*$ ocorrer é dada por:

$$\text{Probabilidade}(D^*A \rightarrow DA^*) \rightarrow \frac{2\pi}{h} (\rho) < \psi_i \,/\, H \,/\, \psi_F >^2$$

equação 3.

onde $\Psi_i$ e $\Psi_f$ são as funções de onda correspondentes ao estado inicial e final, $\rho$ é a densidade de estados iniciais e finais capazes de interagir estando, portanto,

relacionada à extensão do recobrimento espectral entre a emissão de $D^*$ e absorção de A, e H representa a interação específica de acoplamento (hamiltoniano) de $\Psi_i$ e $\Psi_f$ expressa como a soma dos termos de interação coulombiana ($H_c$) e interação de troca ou "exchange" ($H_e$).

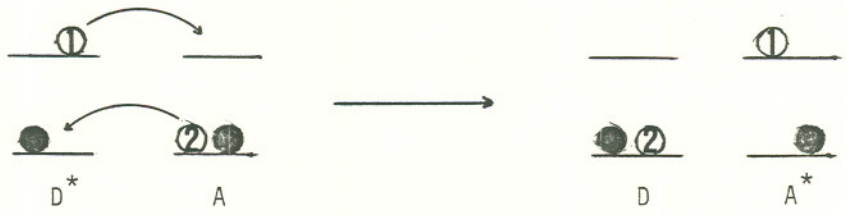
A constante de velocidade de transferência de energia ($K_{ET}$), envolvendo ambas as interações, pode ser derivada da equação I.3, asim sendo:

$$K_{ET_{(total)}} \longrightarrow \left| \langle \Psi_i / He / \Psi_f \rangle^2 + \langle \Psi_i / Hc / \Psi_f \rangle^2 \right|$$

equação I.4

<u>Transferência de energia por interação de troca</u>

A interação de troca representa uma reação de substituição de elétrons onde o elétron inicialmente em $D^*$ (1) é transferido para A com a passagem de um elétron de A (2) para $D^*$.



A transferência de energia por interação de troca necessita contato físico entre $D^*$ e A com sobreposição pelo menos parcial de suas nuvens eletrônicas(a distância entre $D^*$ e A deve ser da ordem do diâmetro de colisão).

DEXTER (1953) derivou a expressão para a velocidade de transferência de energia na qual o estado inicial e final estão acoplados a partir da interação de troca. A constante de velocidade é dada pela equação

$$K_{ET} = K J e^{\frac{-2R}{L}}$$

equação I.5

onde K está relacionado com a interação orbital específica, J é a integral de recobrimento espectral normalizada para o coeficiente de extinção de A (sendo assim independente de $\varepsilon_A$), R é a distância entre $D^*$ e A e L é o raio de Van der Waals.

A transferência de energia por interação de troca é dada pela regra de seleção de Wigner (LAMOLA, 1969). Sendo a soma do número quântico de spin (S) do estado inicial $S_{D*} + S_A$ e final $S_D + S_{A*}$, o processo por interação de troca é permitido por spin se as duas séries $(S_{D*} + S_A) \geqslant /(S_{D*} + S_A - 1)/ \geqslant --- \geqslant /(S_{D*} + S_A)/$ e $(S_D + S_{A*}) \geqslant /(S_D + S_{A*} - 1)/ \geqslant --- \geqslant /(S_D - S_{A*})/$ contiverem pelo menos um elemento comum. Assim sendo, as transições:

singlete(S)-singlete(S) $D^*(S) + A(S) \rightarrow D(S) + A^*(S)$

triplete(T)-triplete(T) $D^*(T) + A(S) \rightarrow D(S) + A^*(T)$

e aniquilamento triplete-triplete $D^*(T) + A^*(T) \rightarrow D(S) + A^*(S)$

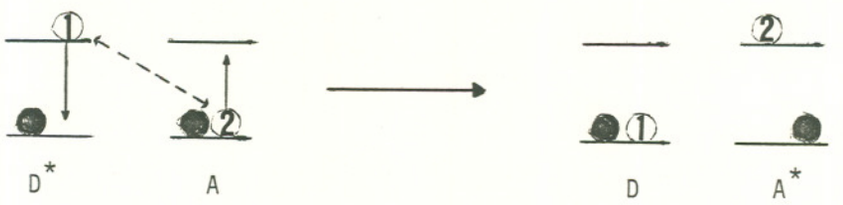
ou

$D(S) + A^{**}(T)$

são permitidas por spin para a interação de troca.

## Transferência de energia por interação coulombiana

A interação coulombiana representa uma "ação à distância", ié, ela ocorre através de um campo eletromagnético e não requer contato físico entre $D^*$ e A. Na transferência de energia por interação coulombiana assume-se que a molécula no estado excitado comporta-se como um dipolo oscilante capaz de induzir oscilação na molécula aceptora.



FÖRSTER (1959) desenvolveu uma expressão quantitativa de velocidade de transferência de energia considerando somente o termo dipolo-dipolo da interação coulombiana e derivou para a constante de transferência de energia a seguinte expressão:

$$K_{ET} = K \frac{K^2 K^o_D}{R^6} J(\varepsilon_A)$$

onde K é uma constante dependente das condições experimentais, $K^2$ é o termo relacionado à orientação espacial dos momentos de dipolo de $D^*$ e A, $K^o_D$ é a constante de desativação radiativa do doador, $J(\varepsilon_A)$ é a integral de recobrimento entre o espectro de emissão de $D^*$ e o de absorção de A e R representa a distância entre $D^*$ e A.

As transições permitidas por spin que podem ocorrer segundo a interação coulombiana obedecem à regra: $M_{D^*} = M_D$ e $M_A = M_{A^*}$ ((M = multiplicidade), (LAMOLA & TURRO, 1969)) e portanto, as transições permitidas são:

singlete-singlete $D^*(S) + A(S) \rightarrow D(S) + A^*(S)$

singlete-triplete $D^*(S) + A(T) \rightarrow D(S) + A^*(T)$

Embora as transições

triplete-singlete $D^*(T) + A(S) \rightarrow D(S) + A^*(S)$

e o

aniquilamento triplete-triplete $D^*(T) + A^*(T) \rightarrow D(S) + A^*(S)$

sejam proibidas pela regra de spin, elas podem ser favorecidas pelo elevado tempo de vida do estado doador (BENNET *et al.*, 1964).

## 1.4 ESTADOS EXCITADOS EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Com o advento de técnicas mais sofisticadas e sensíveis pôde-se constatar que organismos vivos, mesmo os não bioluminescentes, emitem luminescência de baixa intensidade. Esta propriedade é originária de processos enzimáticos e não enzimáticos de diversas subestruturas celulares. Quimioluminescência acompanha a atividade fisiológica normal de mitocôndrias (LIPPMAN, 1980; BOH *et al.*, 1982), hepatócitos (CADENAS et al., 1981); outras células (LLOYD *et al.*, 1979); e frações microsomais (CADENAS & SIES, 1982b). Luminescência de leucócitos polimorfonucleares durante a fagocitose (ALLEN, 1982) e de uma série de células durante a mitose (SLAWINSKA & SLAWINSKI, 1983) também tem sido constatada.

Na realidade a hipótese de que espécies eletronicamente excitadas possam ser também geradas em sistemas biológicos não bioluminescentes tem sido considerada desde há muito tempo por diversos autores (SZENT-GÖRGYI, 1941; ANDERSON, 1947; STEELE, 1963; CILENTO, 1965, 1973, WHITE & WEI, 1970; WHITE *et al.*, 1970, 1971, 1974) e explica fenômenos como a ocorrência natural de compostos de origem tipicamente fotoquímica em condições onde pratica-

mente inexiste luz. Destes, dois exemplos significativos são: (i) a formação "in vivo" de lumiderivados da colchicina (alcalóide extraído da plata *Colchicum autumnale*) durante o ciclo escuro do desenvolvimento da planta (BRUNETTI et al., 1982) e, (ii) a ocorrência de enzimas de fotorreativação em tecidos não expostos à luz (COOK,1967; PATERSON et al., 1974).

Para que uma espécie excitada possa desencadear um processo fotoquímico é necessário que ela possua um tempo de vida suficientemente longo para reagir ou transferir energia eletrônica, por isso, espécies excitadas triplete tem sido consideradas potencialmente capazes de realizar este trabalho.

Dioxetanos e dioxetanonas aparecem como intermediários em grande número de processos quimio e bioluminescentes e, desde que são sejam substituidos por grupos de conjugação extensivos, quando clivados produzem essencialmente compostos carbonílicos no estado triplete(Mc CAPRA, 1973; WILSON, 1976; BECHARA et al., 1976). Muitos processos fotoquímicos biológicamente importantes como a conversão de santonina em lumisantonina, conversão de ergosterol em vitamina $D_2$ e formação de dímeros de pirimidina em DNA tem sido induzidos no escuro utilizando dioxetanos como geradores de espécies excitadas (WHITE & WEI, 1970; ULLMAN, 1972; LAMOLA, 1971).

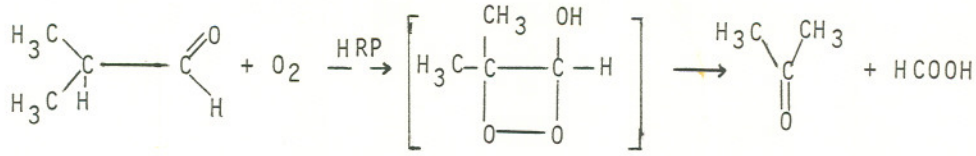
A possibilidade de que existam sistemas bioquímicos capazes de gerar produtos eletronicamente excitados cuja energia de excitação,ao invés de ser emitida, possa ser transferida a uma molécula fotocrômica e/ou ini-

ciar um processo bioquímico normal e mesmo talvez um fenômeno patológico, define o campo da "Fotobioquímica no escuro".

## Formação enzimática de Estados Excitados

Reações enzimáticas que envolvam monooxigenases geram produtos que seriam os esperados da clivagem de um intermediário dioxetânico hipotético. Várias reações foram consideradas, especialmente as catalisadas por peroxidase de rábano ("horseradish peroxidase" HRP) que, atuando como uma oxidase, catalisa a oxidação aeróbica de diversos substratos. Destas, as principais são:

(i) Oxidação enzimática do isobutiraldeído (IBAL) - A oxidação aeróbica do IBAL catalisada por uma peroxidase gerando acetona e ácido fórmico foi primeiramente descrita por KENTEN (1953). Estes produtos são os esperados da clivagem de um intermediário dioxetano, segundo o mecanismo:

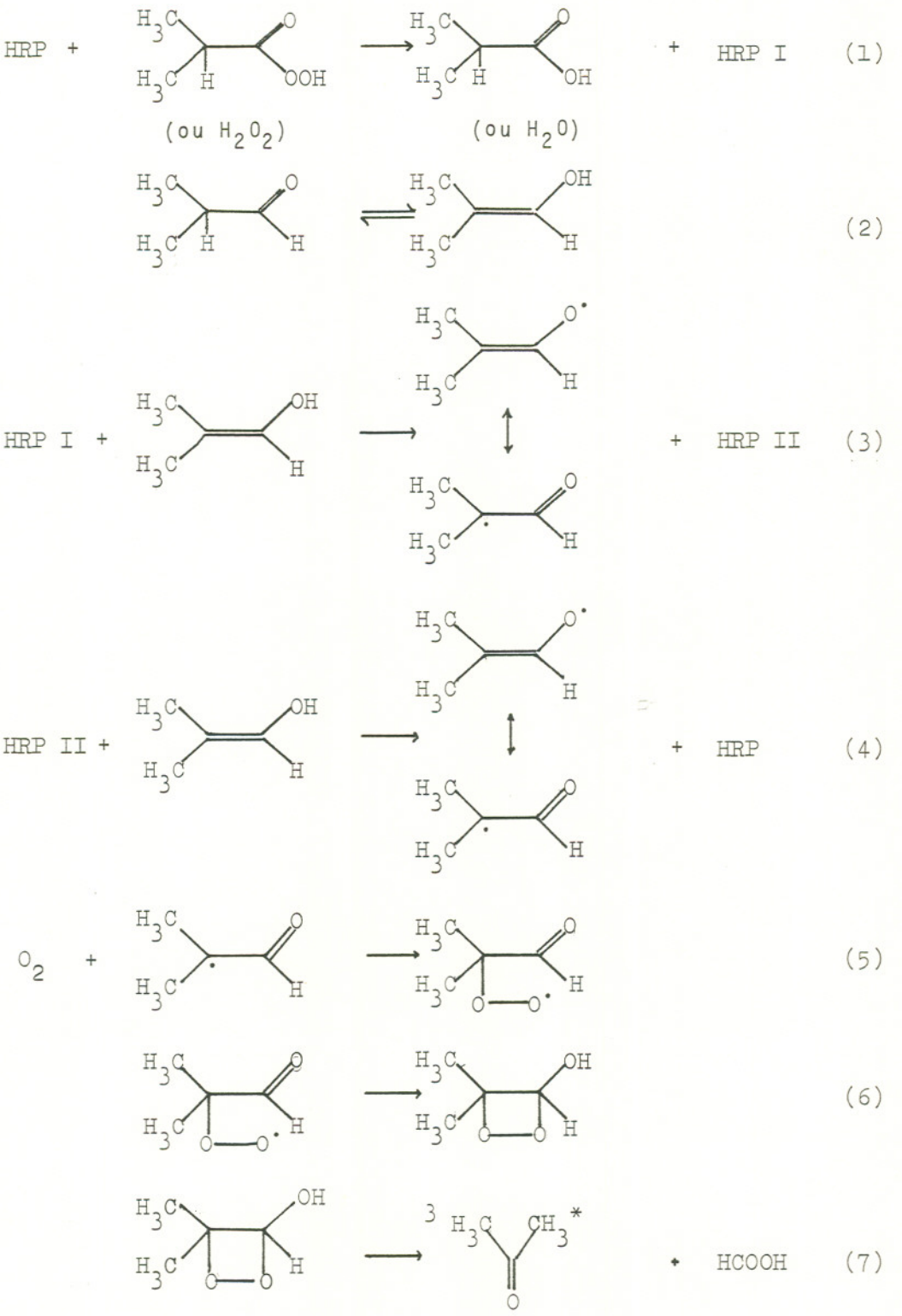



Em condições ótimas (tampão fosfato e um agente quelante) esta reação é fortemente quimiolumines cente e seu espectro de emissão é idêntico ao espectro

de fosforescência da acetona (DURAN *et al.*, 1977a; FARIA OLIVEIRA *et al.*, 1978; BECHARA *et al.*, 1979).

O fato da acetona triplete gerada enzimaticamente fosforescer na presença de oxigênio indica que ela deve estar sendo gerada "protegida" de desativações colisionais pelo $O_2$. A "proteção" desta espécie excitada pela enzima (HRP) é evidenciada por: (i) quando HRP é substituída por hemina a oxidação do IBAL ocorre entretanto fosforescência de acetona não pode ser observada (AUGUSTO & BECHARA, 1980) e (ii) estereoespecificidade da supressão por D- e L- triptofano da acetona triplete gerada enzimaticamente (RIVAS SUAREZ & CILENTO, 1981).

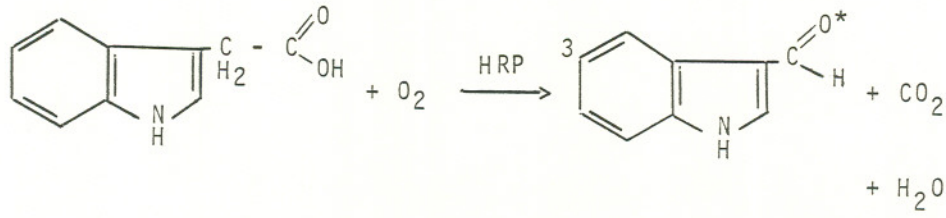
Evidências espectrais indicam que durante a catálise, participam dois estados redox da enzima, isto é, peroxidase composto I (HRP I) e composto II (HRP II). A conversão de HRP à HRP I é realizada por traços de $H_2O_2$ ou por perácidos (1) (DUNFORD *et al.*, 1984a). A dependência de tampão fosfato indica ser a forma enólica do IBAL(2) o substrato da HRP I (GALLARDO *et al.*, 1984). DUNFORD *et al.* (1984b) propuseram recentemente o seguinte mecanismo para a oxidação do IBAL catalisada pela HRP:


HRP +
(ou $H_2O_2$)
(ou $H_2O$)
+ HRP I (1)
(2)
HRP I +
+ HRP II (3)
HRP II +
+ HRP (4)
$O_2$ +
(5)
(6)
(7)
+ HCOOH

Na etapa 6 um equivalente redutor poderia ser fornecido pela enzima ou pelo etanol presente na mistura reacional.

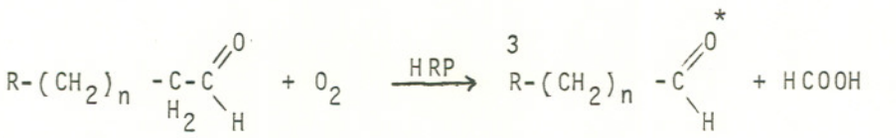
A acetona triplete gerada na reação IBAL/HRP/$O_2$ é capaz de transferir energia para uma série de aceptores emissivos tais como: biacetilo (BECHARA et al., 1979), DBAS (FARIA-OLIVEIRA, et al., 1978), corantes xantênicos (DURÁN & CILENTO, 1980), flavinas (HAUN et al., 1978), clorofila em solução (AUGUSTO & CILENTO, 1979), clorofila em micelas (BRUNETTI et al., 1983) e clorofila em cloroplastos (NASSI & CILENTO, 1982 e 1983). Este sistema também é capaz de induzir quebras de fita simples em DNA (FALJONI et al., 1978; MENEGHINI et al., 1978), fototransformação do fitocromo (AUGUSTO et al., 1978), formação de adutos lisozima-riboflavina (DURÁN et al., 1983) e fototransformação de colchicina em lumicolchicina (BRUNETTI et al., 1982).

(ii) Oxidação enzimática do ácido indol-3-acético. O ácido indol-3-acético (um hormônio vegetal) é oxidado pela HRP a indol-3-aldeído e $CO_2$. O envolvimento de um intermediário dioxetânico é compatível com os produtos observados.

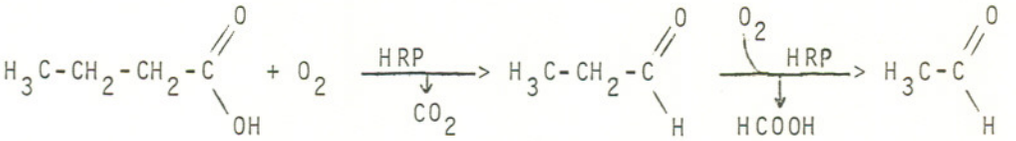


Existem evidências de que a espécie excitada (indol-3-aldeído triplete) é gerada livre em solução e como consequência é parcialmente suprimida pelo oxigênio, com possível formação de oxigênio singlete (De MELLO *et al.*, 1980). A espécie excitada gerada pela reação IAA/HRP/$O_2$ é capaz de transferir energia para corantes xantênicos (VIDIGAL *et al.*, 1979) e para clorofila em cloroplastos (NASSI & CILENTO, 1982 e 1983), além de provocar alterações em DNA (VIDIGAL *et al.*, 1979) e formar aductos com t-RNA$^{phe}$ (De MELLO *et al.*, 1980, 1981).

(III) Oxidação enzimática de aldeídos e ácidos alifáticos lineares. A oxidação aeróbica de propanal catalisada por peroxidase conduz a ácido fórmico e acetaldeído, este último no estado excitado triplete (HAUN *et al.*, 1980). A oxidação de um aldeído ao homólogo inferior e ácido fórmico também ocorre na peroxidação de lipídios (ESTERBAUER, 1982) e é pois biológicamente importante. Com base no trabalho de HAUN et al. (1980) pode-se formular a reação geral:

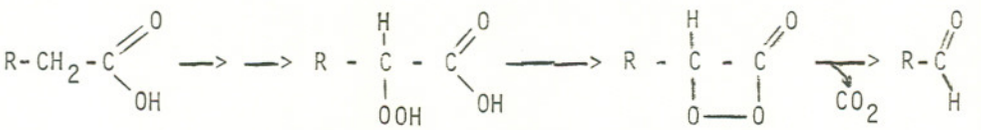



Com muito menor eficiência esta reação também deve ocorrer com ácidos, pois partindo-se de ácido butírico pode ser identificado o acetaldeído, possivelmente tendo propanal como intermediário (HAUN *et al.*, 1980):




No caso de ácidos graxos longos, a oxidação ao aldeído inferior ocorre com eficiência em plantas superiores onde é promovida pelo sistema da α-peroxidase (MARTIN & STUMPF, 1959).

Estas reações que conduzem ao aldeído inferior não são quimioluminescentes, entretanto a formação de estados excitados triplete foi evidenciada por transferência de energia para aceptores fluorescentes (HAUN *et al.*, 1980). No caso do sistema da α-peroxidase existe evidência de um precursor α-hidroperóxido (SHINE & STUMPF, 1974), tal como é de se esperar para um processo que leva ao aldeído excitado:




## 1.5 IMPORTÂNCIA BIOLOGICA DOS ÁCIDOS DE CADEIA CARBÔNICA CURTA, EM ESPECIAL A DO ÁCIDO BUTÍRICO

Ácido butírico exerce uma série de efeitos biológicos. Quando adicionado à cultura de células, induz reversivelmente várias modificações bioquímicas e morfológicas (HAGOPIAN *et al.*, 1977; PRASAD, 1980 ;

BELL & JONES, 1982). Não está ainda estabelecida a natureza destas induções, entretanto, parece tratar-se de uma atuação a nível de genoma.

Comparação entre ácidos homólogos indica que a atividade é sempre máxima a nível de ácido butírico, às vezes de forma dramática (LEDER & LEDER,1975), outras vezes menos acentuadamente (COUSENS et al., 1979 ; SAMUELS et al., 1980). Dois exemplos são mostrados na figura I.3 referentes à indução de atividade de fosfatase alcalina de células HeLa (DEUTSCH et al., 1977) e a inibição de deacetilase de timo de vitela (KRUH, 1982).

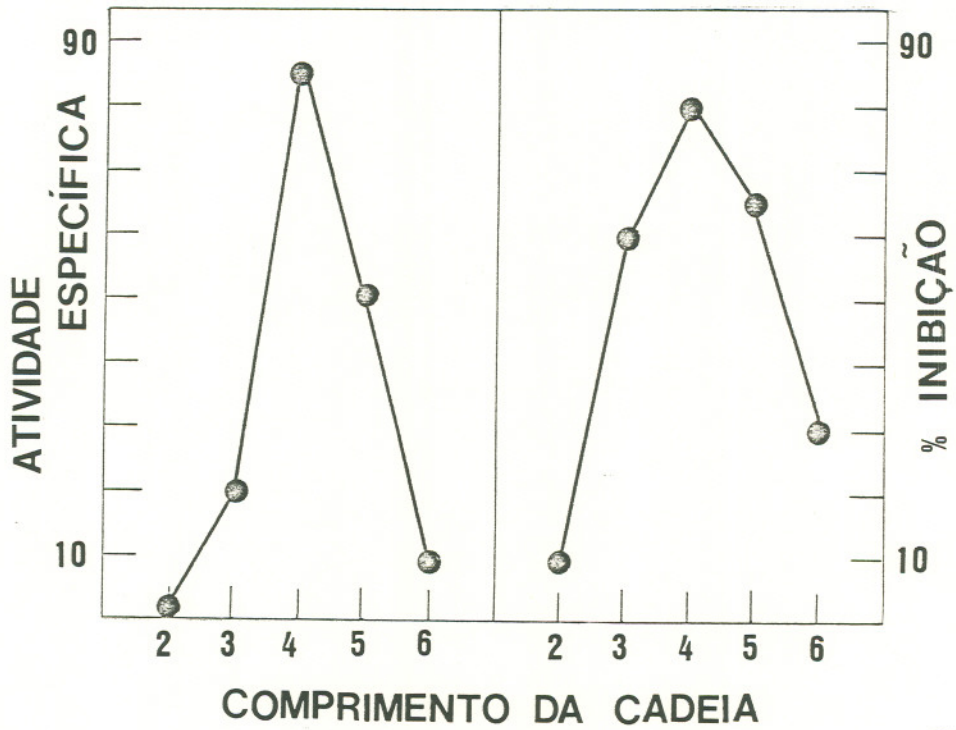



FIGURA I.3 - Efeito dos ácidos alifáticos ($C_2$-$C_6$) sobre a:
(A) indução da atividade da fosfatase alcalina de células HeLa e
(B) inibição da deacetilase de timo de vitela.

## 1.6 OBJETIVOS DA TESE

Visto que espécies excitadas tripletes geradas enzimaticamente são capazes de transferir energia para diversos aceptores incluindo macromoléculas (AUGUSTO *et al.*, 1978; De MELLO *et al.*, 1980; De MELLO *et al.*, 1982; FALJONI *et al.*, 1978; MENEGHINI *et al.*, 1978; RIVAS-SUAREZ *et al.*, 1984), torna-se importante verificar o efeito destas espécies em estruturas mais complexas. Assim sendo, este trabalho objetiva a procura de emissões sensitizadas ou induzidas em cloropladtos e microsomas. Com este intuito utilizou-se como geradores de espécies excitadas triplete, os sistemas aldeídos lineares/HRP/$O_2$, que devido a não serem emissivos são potencialmente úteis na procura de emissões induzidas. Com tais estudos pretende-se obter informações adicionais com respeito ao mecanismo de formação de espécies excitadas e transferência de energia. Adicionalmente, surge inerente a este estudo a oportunidade de analisar os resultados considerando o comprimento da cadeia carbônica do substrato; isto é potencialmente importante em relação à origem das múltiplas atividades biológicas dos ácidos graxos lineares curtos.

# II. MATERIAIS E MÉTODOS

## II.1 REAGENTES

| Reagentes | Procedência |
|---|---|
| - Acetato de sódio | Carlo Erba |
| - Acetona | Merck |
| - Ácido clorídrico | Carlo Erba |
| - Albumina | Sigma |
| - Ascorbato | Sigma |
| - Azul de tetrazolium | Mann Research Lab. |
| - t-BuOOH | Sigma |
| - Butanal | Fluka |
| - Catalase | Sigma |
| - Cloreto de magnésio | Merck |
| - Cloreto de potássio | Carlo Erba |
| - Cloreto de sódio | Qeel |
| - Clorofila a | Sigma |
| - CTAB | Merck |
| - EDTA | Quimbras |
| - Etilenodiaminotetraceato de sódio | Quimbras |
| - Desoxicolato de sódio | Sigma |
| - Eosina amarela | Merck |
| - Etanal (Acetaldeído) | Merck |
| - Etanol | Merck |
| - Fluoresceina | B.D.H. |
| - Fosfato bibásico de potássio | Merck |

| | |
|---|---|
| - Fosfato monobásico de potássio | Merck |
| - Glucose | Becto |
| - Glucose oxidase | Sigma |
| - Hemina | Sigma |
| - Hexanal | Fluka |
| - Hidróxido de sódio | Merck |
| - Histidina | Sigma |
| - HRP | Sigma |
| - IAA | Merck |
| - IBAL | Fluka |
| - NADPH | Sigma |
| - Pentanal | Fluka |
| - Pirofosfato de sódio | Fluka |
| - Propanal | Fluka |
| - Rosa bengala | Fisher Scientific |
| - SKF - 525A | Smith Kline & French |
| - Sorbitol | Sigma |
| - Sulfato cúprico | J.T. Baker |
| - Superóxido dismutase | Sigma |
| - Tiouréia | Sigma |
| - Tripsina | Sigma |
| - D- e L- triptofano | Sigma |
| - TBA | Merck |
| - Tris | Riedel de Haën |

## II.2 APARELHAGEM

As medidas de consumo de oxigênio foram feitas num monitor biológico de oxigênio da "Yellow Springs Instruments", modelo 53 e num manômetro Warburg.

Os espectros na região ultra-violeta e visível foram obtidos num espectrofotômetro de duplo feixe Zeiss DMR-10.

Para as medidas de quimioluminescência utilizou-se um contador de fótons construído neste laboratório (INABA et al., 1979) composto de uma válvula fotomultiplicadora Hamamatsu R-562 acoplada à um contador de fótons Hamamatsu C-767. Este equipamento é provido de um disco giratório contendo vinte e cinco filtros de vidro (Toshiba e Corning) que cobrem a faixa de 400 a 700 nm permitindo a obtenção de espectros de emissão.

Os espectros de fluorescência foram obtidos num espectrofluorímetro Perkin Elmer MPF-4. Não foram feitas correções para a fonte de excitação nem para o monocromador.

## II.3 MÉTODOS

### II.3.1 Purificação e armazenamento do IBAL e aldeídos alifáticos lineares

O IBAL foi destilado sob borbulhamento de $N_2$. Todos estes aldeídos foram mantidos em atmosfera inerte a -20°C.

### II.3.2 CTAB

O CTAB foi recristalizado de acetona/metanol (85:15, vol:vol). A concentração micelar crítica (cmc) deste detergente foi determinada pelo método da tensão superficial em tampão fosfato 0,1M, pirofosfato 38,5 mM, pH 7,4 e 0,43 M de etanol. O valor obtido foi de $5x10^{-5}$ M. (I.L. Brunetti, comunicação pessoal).

### II.3.3 Clorofila

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

A clorofila foi incluida em micelas de CTAB através da adição da solução etanólica desta à uma solução aquosa do detergente.

### II.3.4 Extração de cloroplastos

Os cloroplastos foram extraídos de folhas de espinafre (*Spinacea oleracea*) segundo COCKBURN *et al*. (1968).

O método de extração consiste na trituração de 50 g de folhas (sem o talo central) cortadas em pe

quenos pedaços, durante 3 a 5 segundos num liquidificador doméstico em presença de 200 ml de meio de extração (sorbitol, 0,33 M; pirofosfato de sódio, 0,01 M e cloreto de magnésio, 0,1%, pH 6,5). Este material é filtrado através de gaze, centrifugado a 4.000 xg e ressuspenso em meio de suspensão (sorbitol, 0,33 M; ácido N-2-hidroxietilpiperazina , N'-2-etanolssulfônio, 0,05 M; cloreto de mangânês, 1 mM; etilenodimaminotetraacetato de sódio, 2 mM; pH 7,6). A extração é efetuada a $4^{o}C$ ao abrigo da luz.

Os cloroplastos resultantes são íntegros exceto pela ruptura das suas membranas externas, sendo capazes de promover fotofosforilação, evolução de oxigênio e redução de aceptores de elétrons na presença de cofatores adequados, mas são incapazes de fixar $CO_2$.

A funcionalidade da preparação foi atestada pela sua capacidade em efetuar a reação de Hill, segundo as condições de ASH et al. (1961).

### II.3.5 Dosagem de clorofila em cloroplastos

O conteúdo de clorofila total nos cloroplastos foi determinado espectrofotometricamente por meio da extração em acetona 80% utilizando a seguinte equação (VERNON, 1960):

$$\text{clorofila total } (\mu g/mL) = 6,45(A_{665}) + 17,72(A_{649})$$

II.3.6 Extração de microsomas

A fração microsomal foi preparada de fígados de ratos machos pesando aproximadamente 200 g. Os fígados foram perfundidos "in situ" com solução salina, picados e homogeneizados com uma solução contendo KCl 140 mM e $KH_2PO_4$, 10 mM, a pH 7,0. O homogenato foi centrifugado a 10.000 g por 20 minutos. O sobrenadante recolhido foi centrifugado a 100.000 xg por 60 minutos. O precipitado foi ressuspenso e a operação acima foi repetida. A fração microsomal isolada foi então utilizada ou estocada a -20°C num período máximo de duas semanas.

II.3.7 Dosagem de Proteína microsomal

A concentração proteica da preparação microsomal foi estimada pelo método do biureto utilizando albumina sérica bovina como padrão..

II.3.8 Tratamento com fenobarbital

O tratamento com fenobarbital consiste em permitir aos ratos o consumo de água contendo 0,1% da droga durante os cinco dias que antecedem o sacrifício dos mesmos.

II.3.9 Dosagem de malonaldeído

A formação de malonaldeído foi acompanhada como descrito por BUEGE e AUST (1978).

### II.3.10 Tratamento de microsomas com tripsina ou desoxicolato de sódio

Estes tratamentos foram efetuados como descrito por De PIERRE & DALLNER (1975). Incubbou-se microsomas com tripsina (50 μg/mg de proteína microsomal) ou desoxicolato de sódio (0,05%/mg de proteína microsomal por 10 minutos a 30°C. Interrompeu-se a proteólise (tratamento com tripsina) pelo resfriamento do material através de banho de gelo. As suspensões provenientes destes dois tratamentos foram recentrifugadas a 100.000 xg por 60 minutos. Nos experimentos foram utilizados quantidades de precipitado e sobrenadante originados de microsomas íntegros contendo 8 mg de proteína. Em experimentos controle, microsomas sofreram o processamento acima descrito exceto pela adição de tripsina e de desoxicolato.

### II.3.11 Adição de clorofila a microsomas

Clorofila foi adicionada a microsomas (8 mg de proteína). Esta mistura foi agitada (mecanicamente) por 20 segundos, a seguir adicionou-se 1 ml de tampão e a amostra foi novamente agitada por 20 segundos. O volume (3 ml) foi completado pela adição de tampão e a reação iniciada. A concentração final de clorofila nestes experimentos foi de 1,5 μM.

### II.3.12 Condições experimentais

Os experimentos que contiverem HRP foram iniciados pela adição da enzima. Etanol (0,5 M) foi adicionado à mistura reacional com o intuito de facilitar a solubilização dos substratos. O volume final da mistura reacional foi de 3 ml.

Os experimentos referentes a III.1 foram efetuados em tampão fosfato 0,5 M/pirofosfato 0,04 M, pH 7,4. Vários tipos comerciais de HRP foram utilizados e quando não especificado fez-se uso de HRP tipo VI (2 μM). A temperatura (salvo quando mencionada) foi de 40°C. Condições experimentais particulares aos demais capítulos são especificadas nos subcapítulos que antecedem a apresentação dos resultados (III.2.2 e IV.2).

### II.3.13 Adição de glucose/glucose oxidase/catalase

Em experimentos nos quais adicionou-se glucose (0,3%) /glucose oxidase (0,4 μM) /catalase (0,04 μM), o volume final foi de 25 ml, sendo que as concentrações dos reagentes (mistura padrão de reação) foram mantidas. A cela de reação foi completamente preenchida com tampão e vedada com parafilme para prevenir o contato da solução com o ar.

### II.3.14 Cálculos de rendimento quântico de quimioexcitação x rendimento quântico de transferência de energia

A emissão integrada foi comparada à uma mistura padrão de 2,5 difeniloxazol (PPO) e 1,4 bis 2-(5-feniloxazolil)-benzeno (POPOP) contendo uma fonte de $^{14}C$ que emite $6,2 \times 10^{6}$ fótons.$ml^{-1}$.$seg^{-1}$ com máximo a 416 nm. Os valores de $\Phi_{quimioexcitação} \times \Phi_{transferência\ de\ energia}$ foram calculados com base no número de fótons emitidos por molécula de oxigênio consumido e levando-se em conta o rendimento quântico de fluorescência do aceptor (clorofila), o rendimento de quimioexcitação da espécie triplete doadora e a resposta da fotomultiplicadora na região do vermelho.

# III. OXIDAÇÃO AERÓBICA DOS ALDEÍDOS ALIFÁTICOS LINEARES ($C_2$-$C_6$), CATALISADA PELA HRP

## III.1 ESTUDOS CINÉTICOS COMPARATIVOS. TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA PARA CORANTES XANTÊNICOS E CLOROFILA EM MICELAS

### III.1.1 Resultados

A utilização dos aldeídos lineares $C_2$-$C_6$ como substratos da HRP é limitada pela baixa solubilidade de $C_5$ e $C_6$. Nas concentrações de aldeídos necessárias para as medidas polarográficas de consumo de oxigênio somente $C_2$, $C_3$ e $C_4$ são totalmente solúveis. A reação $C_2$/HRP/$O_2$ apresenta-se anômala, a velocidade de reação é lenta sendo que as vezes o consumo de oxigênio não é detectável, entretanto a oxidação aeróbica de $C_3$ e $C_4$ catalisada pela HRP é mensurável e pode ser observada com diferentes tipos comerciais da enzima (diferentes misturas de isoenzimas). As cinéticas de consumo de oxigênio referentes a $C_3$ e $C_4$/HRP/$O_2$ são apresentadas nas figuras III.1 e III.2 respectivamente.

Utilizando a técnica manométrica de consumo de oxigênio (Warburg), é possível acompanhar as reações aldeído linear/HRP/$O_2$ em concentração de substrato onde todos são solúveis (8 mM). A velocidade de consumo de oxigênio é extremamente lenta, mas é possível inferir a seguinte sequência de reação: $C_2 < C_3 < C_4 \sim C_5 \sim C_6$.

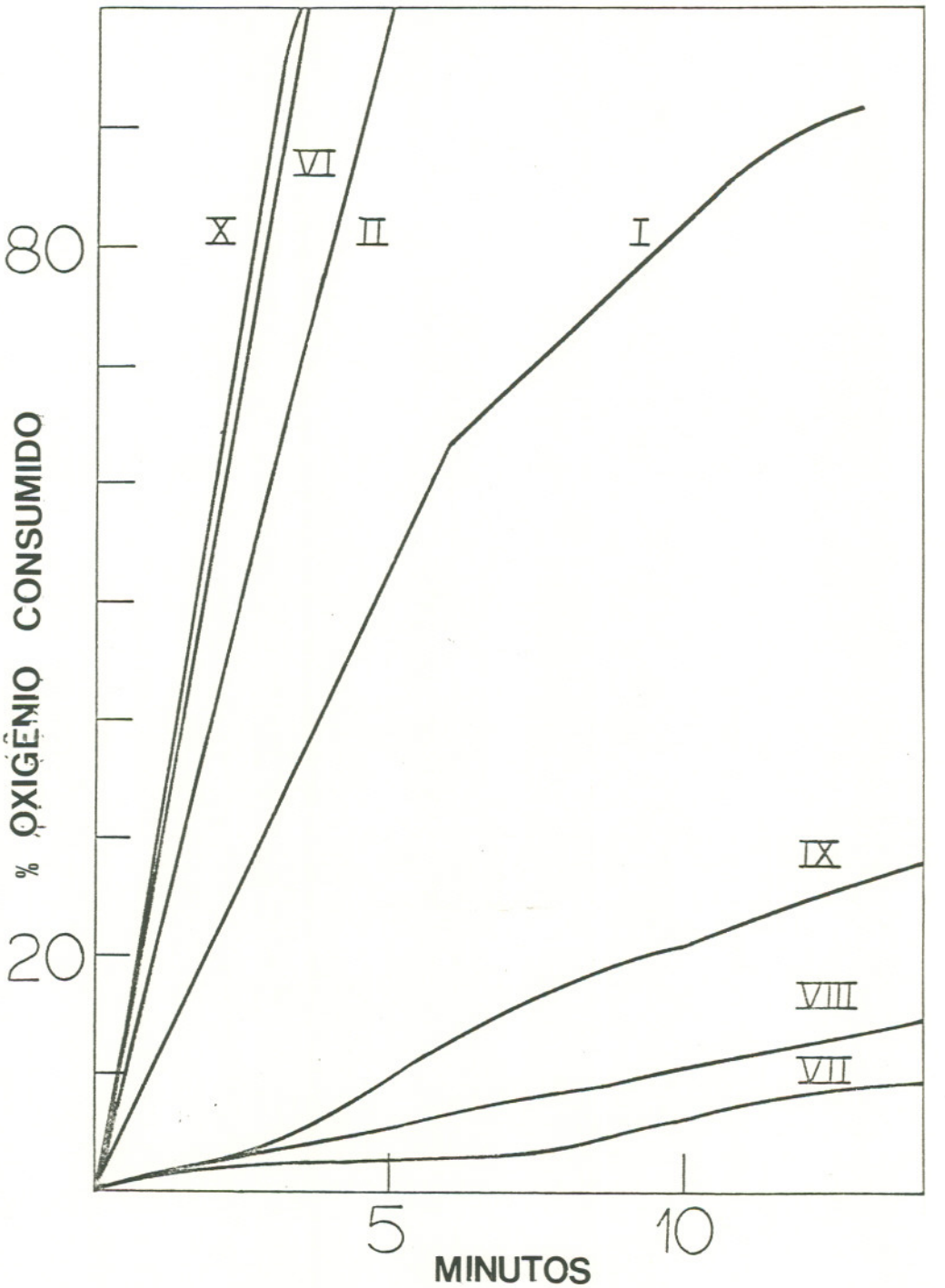



FIGURA III.1 - Oxigênio consumido na oxidação aeróbica de $C_3$(80 mM) catalisada por diferentes tipos de HRP. Tipo I,II e VI, 2 μM; tipo VII, VIII, IX e X, 1 μM.

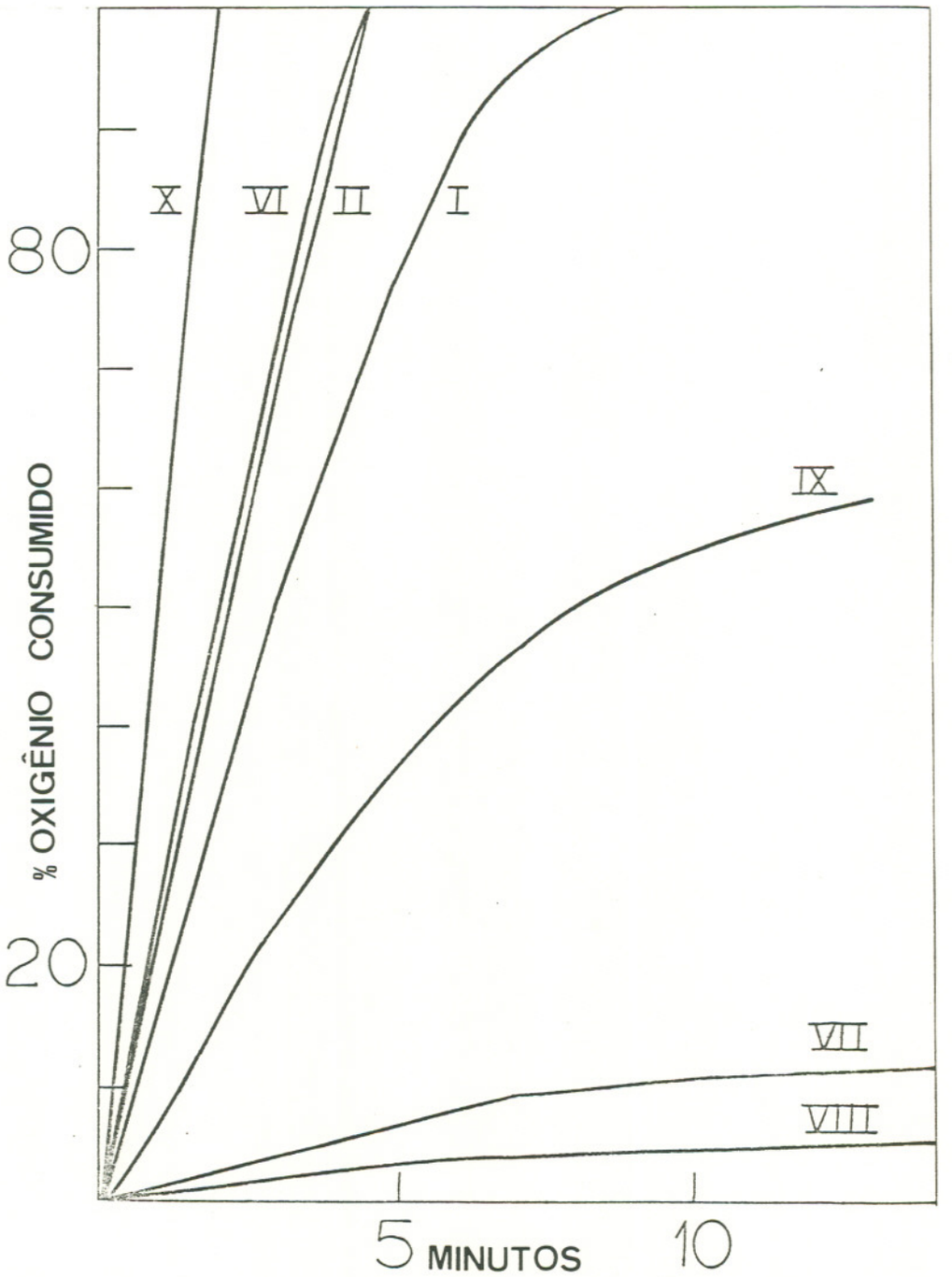



FIGURA III.2 - Oxigênio consumido na oxidação aeróbica do butanal (80 mM) catalisada por diferentes tipos de HRP (as concentrações são como indicado na Figura III.1).

Visto que estes sistemas não são emissivos a formação de estados excitados deve ser monitorada através da transferência de energia para moléculas aceptoras capazes de fluorescer, tais como: fluoresceina, rosa bengala e eosina. Destes corantes xantênicos eosina mostra-se mais adequada, uma vez que fluoresceina é extensivamente destruida quando exposta a estes sistemas e rosa bengala é menos eficiente na monitoração dos estados excitados gerados por estas reações. Medidas de emissão de luz são acompanhadas a várias concentrações de substratos (2, 4, 8 e 80 mM) e em alguns casos com vários tipos de HRP. Os resultados são resumidos na tabela III.1 que relaciona ordenadamente a intensidade de emissão da fluorescência de eosina observada com os diferentes homólogos. Na maioria dos experimentos $C_4$ promove a mais intensa emissão de luz. Alguns dos resultados mais acentuados a nível de $C_4$ são apresentados nas figuras III.3, III.4 e III.5.

RIVAS-SUAREZ & CILENTO (1981), observaram uma discriminação quiral na supressão por D- e L-triptofano da fosforescência da acetona triplete gerada enzimaticamente. Isto os levou a concluir a existência de uma"proteção" da espécie excitada pela enzima. Projeções de Stern-Volmer para a supressão por D- e L- triptofano de acetaldeído e propanal triplete gerados enzimaticamente (ambos monitorados por eosina), são apresentados nas figuras III.6 e III.7 respectivamente. Observa-se que não existe discriminação quiral na supressão de acetaldeído triplete, entretanto um certo grau de discriminação é observado no caso do propanal triplete indicando uma proteção deste pelo menos

TABELA III.1 Sequência das intensidades da fluorescência de eosina produzida durante a oxidação aeróbica dos aldeídos alifáticos lineares $C_2$-$C_6$ catalisada pela HRP.

| HRP tipo | Concentração do Aldeído | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 2 mM | 4 mM | 8 mM | 20 mM[a] | 80mM[b,c] |
| I | | | $C_4 >> C_5 \sim C_6 \sim C_3$ | $C_4 >> C_5 > C_3$ | $C_4 >> C_3$ |
| II | | | $C_4 > C_6 > C_5 > C_3$ | $C_4 > C_5 \sim C_3$ | $C_4 >> C_3$ |
| VI | $C_4 > C_3 >> C_5 > C_6 > C_2$ | $C_4 > C_3 >> C_5 > C_6 > C_2$ | $C_4 > C_3 > C_5 \sim C_6$ | | $C_3 \sim C_4$ |
| VII | | | | | $C_3 > C_4$ |
| VIII | | | | | $C_3 \sim C_4$ |
| IX | | | | | $C_3 > C_4$ |
| X | | | | | $C_3 > C_4$ |

[a] $C_6$ não solúvel; [b] $C_5$ e $C_6$ não solúveis;

c emissão relativamente insignificante de $C_2$

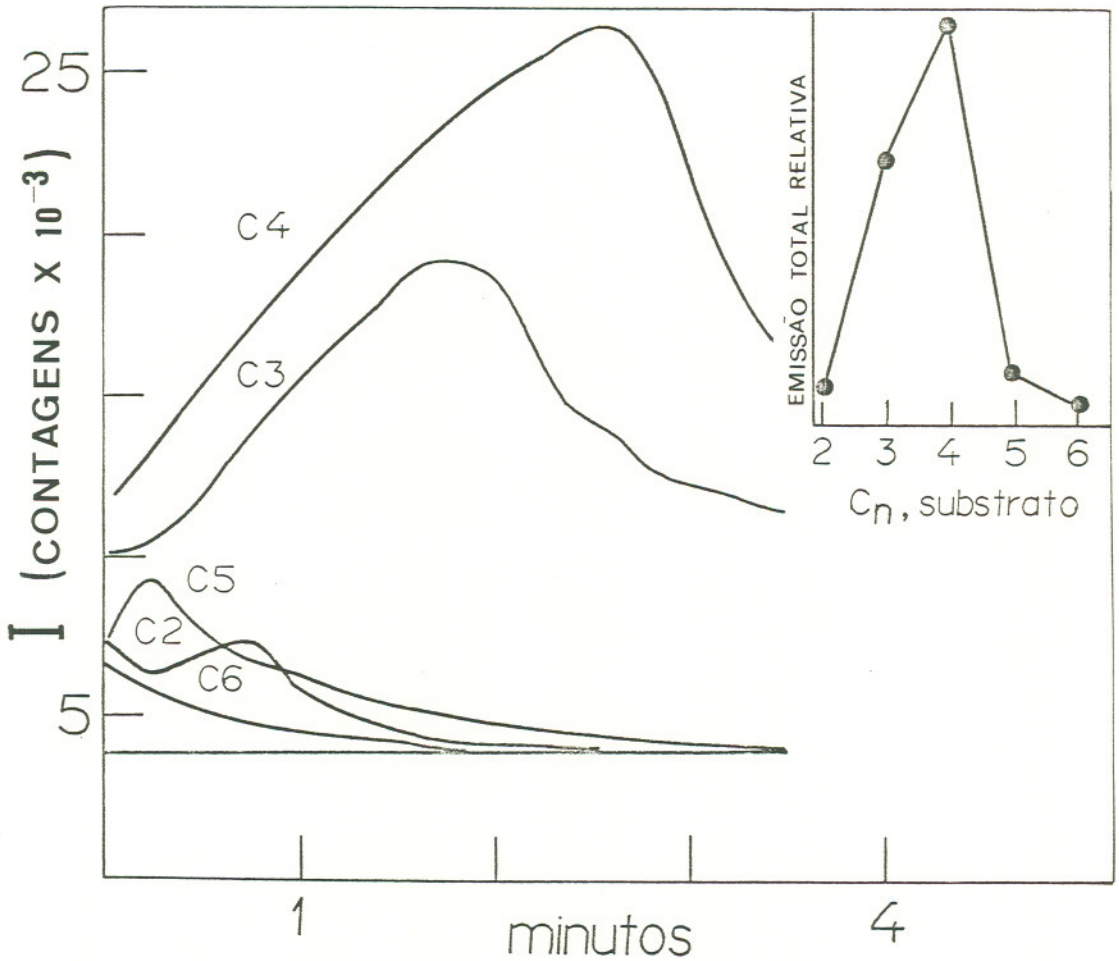



FIGURA III.3 - Fluorescência de eosina ($1x10^{-5}$M) produzida durante a oxidação aeróbica dos aldeídos $C_2$-$C_6$ (8 mM) catalisada pela HRP. A inserção mostra a emissão total em função do número de átomos de carbono do substrato.

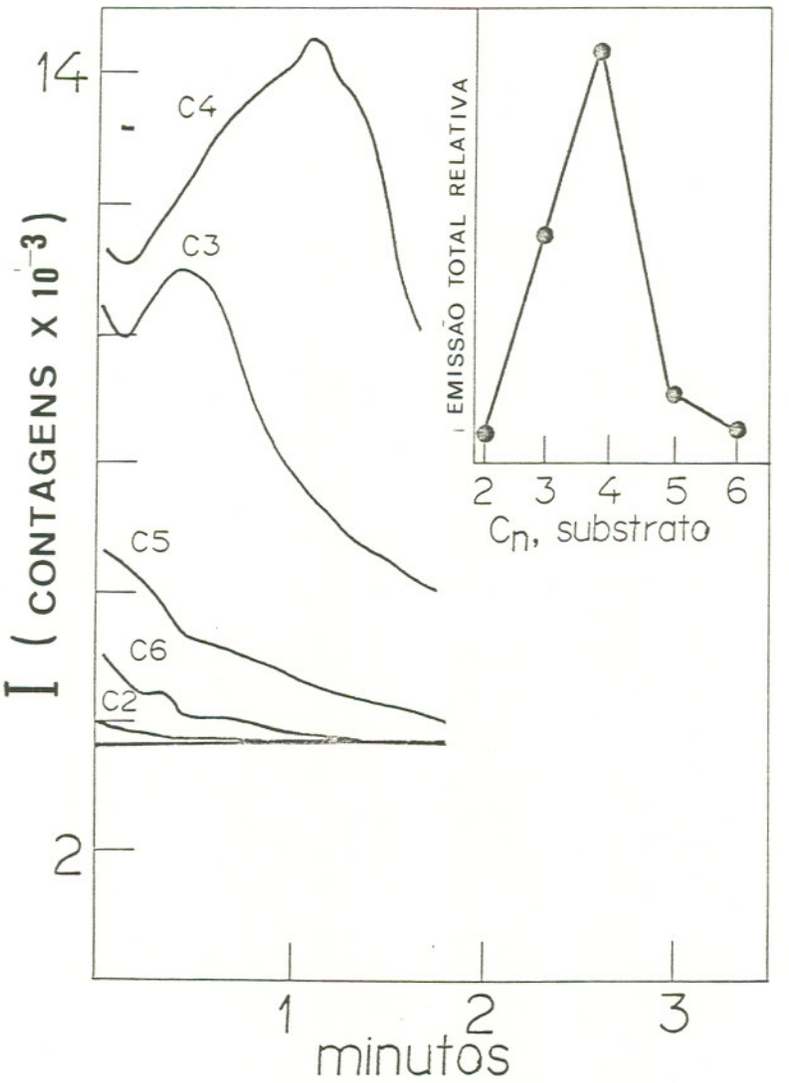



FIGURA III.4 - Idem a Figura III.3, exceto pela concentração dos aldeídos que é de 4 mM.

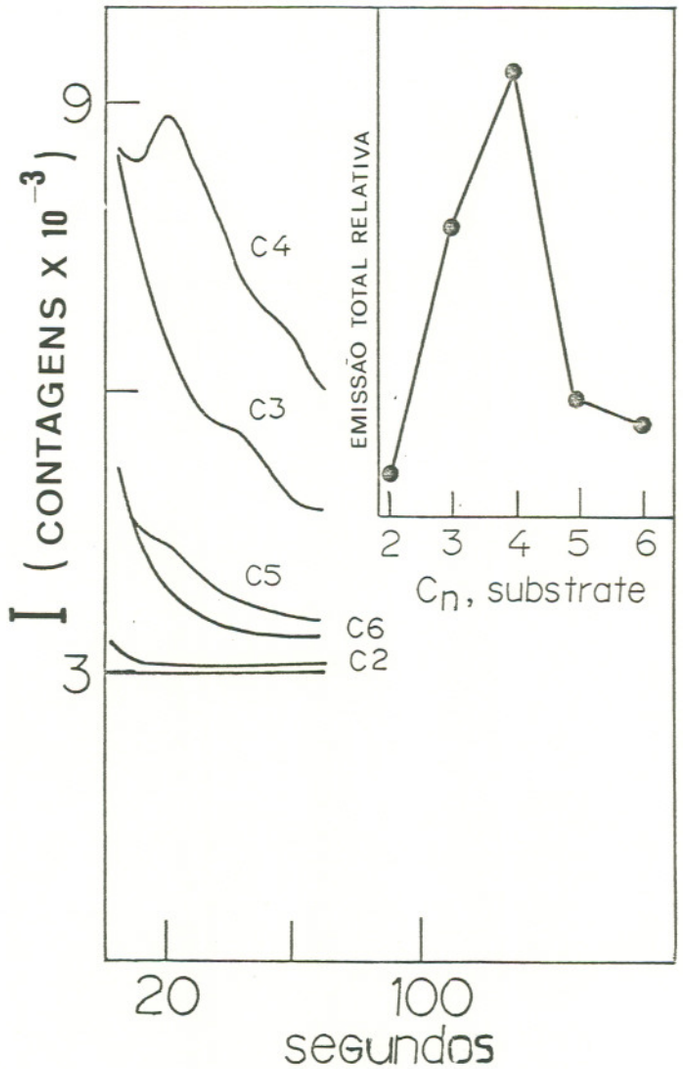



FIGURA III.5 - Idem a Figura III.3, exceto pela concentração dos aldeídos que é de 2 mM.

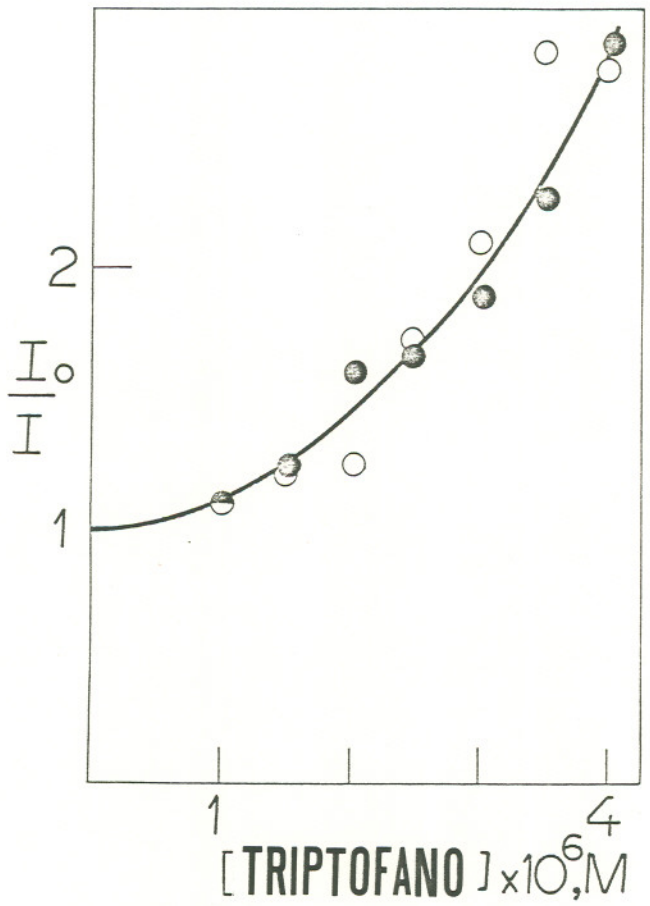



FIGURA III.6 - Projeção de Stern-Volmer para a supressão do acetaldeído triplete por D- (c-o-o) e L- triptofano (•-•-•). A formação de acetaldeído triplete, gerado na oxidação aeróbica do propanal (80 mM) catalisada pela HRP, foi monitorada pela fluorescência da eosina ($1x10^{-5}$M). Temperatura= 38°C.

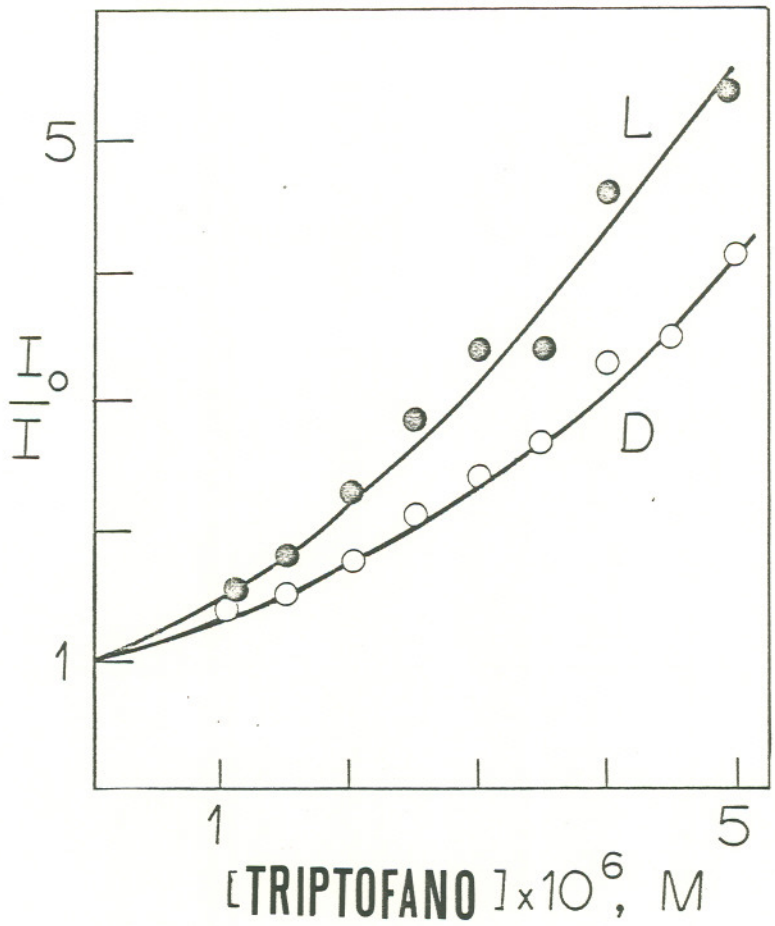



FIGURA III.7 - Projeção de Stern-Volmer para a supressão do propanal triplete por D- (o-o-o) e L-triptofano (-•-•-•). A formação de propanal triplete, gerado na oxidação aeróbica do butanal (80 mM) catalisada pela HRP, foi monitorada pela fluorescência da eosina ($1x10^{-5}$M). Temperatura = 38oC.

parcial.

A adição de CTAB à mistura reacional propicia a total solubilização dos aldeídos $C_5$ e $C_6$ mesmo em concentração 80 mM, assim sendo é possível obter cinéticas de consumo de oxigênio de toda a série homóloga $C_3$-$C_6$ (Fig. III.8). CTAB não afeta significativamente a velocidade de consumo de oxigênio dos aldeídos já solúveis no meio reacional ($C_3$ e $C_4$), entretanto acelera acentuadamente a velocidade de reação para $C_5$ e $C_6$. Este aumento na velocidade de reação reflete-se nas cinéticas das emissões monitoradas por eosina (Fig. III.9).

Clorofila solubilizada em micelas é um eficiente detector de espécies eletronicamente excitadas (BRUNETTI et al., 1983). Os aldeídos triplete gerados nas reações aldeído linear/HRP/$O_2$ também transferem energia para clorofila solubilizada em micelas de CTAB (Fig.III.10); a emissão aumenta com o aumento da cadeia carbônica do substrato ($C_3 \rightarrow C_6$). O espectro de emissão (Fig. III.11) coincide com o espectro de fluorescência de clorofila.

### III.1.2 Discussão

A escolha em se trabalhar com uma série homóloga de aldeídos lineares, substratos de HRP foi motivada pela série de efeitos biológicos induzidos pelo ácido butírico (vide I.5). Suas múltiplas atividades sugerem que este ácido age sobre um processo chave. Como hipótese de trabalho, ele poderia atuar sobre uma molécula fotocrômica

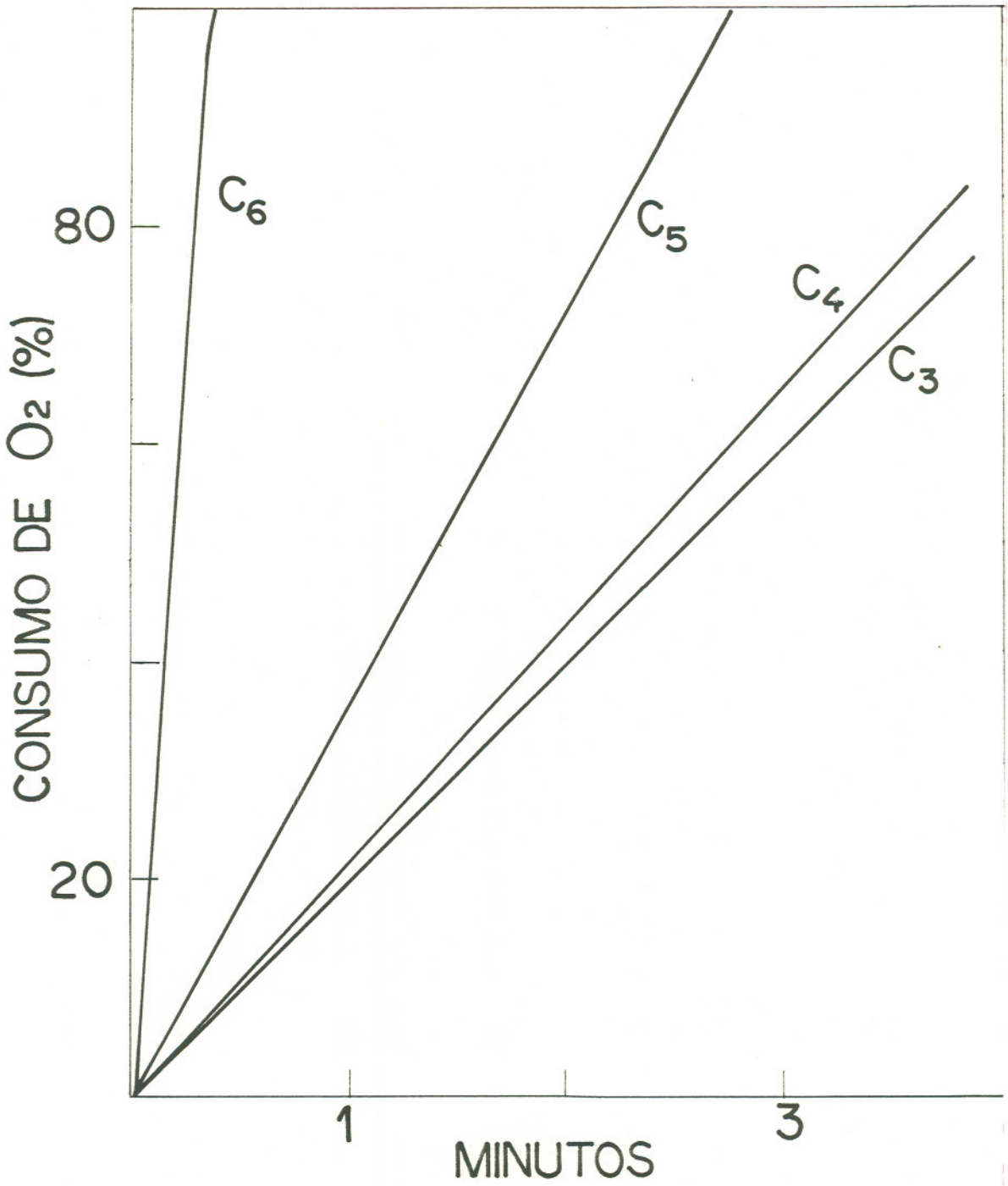



FIGURA III.8 - Oxigênio consumido durante a oxidação aeróbica dos aldeídos ($C_3$-$C_6$) (80 mM), catalisada pela HRP, na presença de CTAB (0,5 mM).

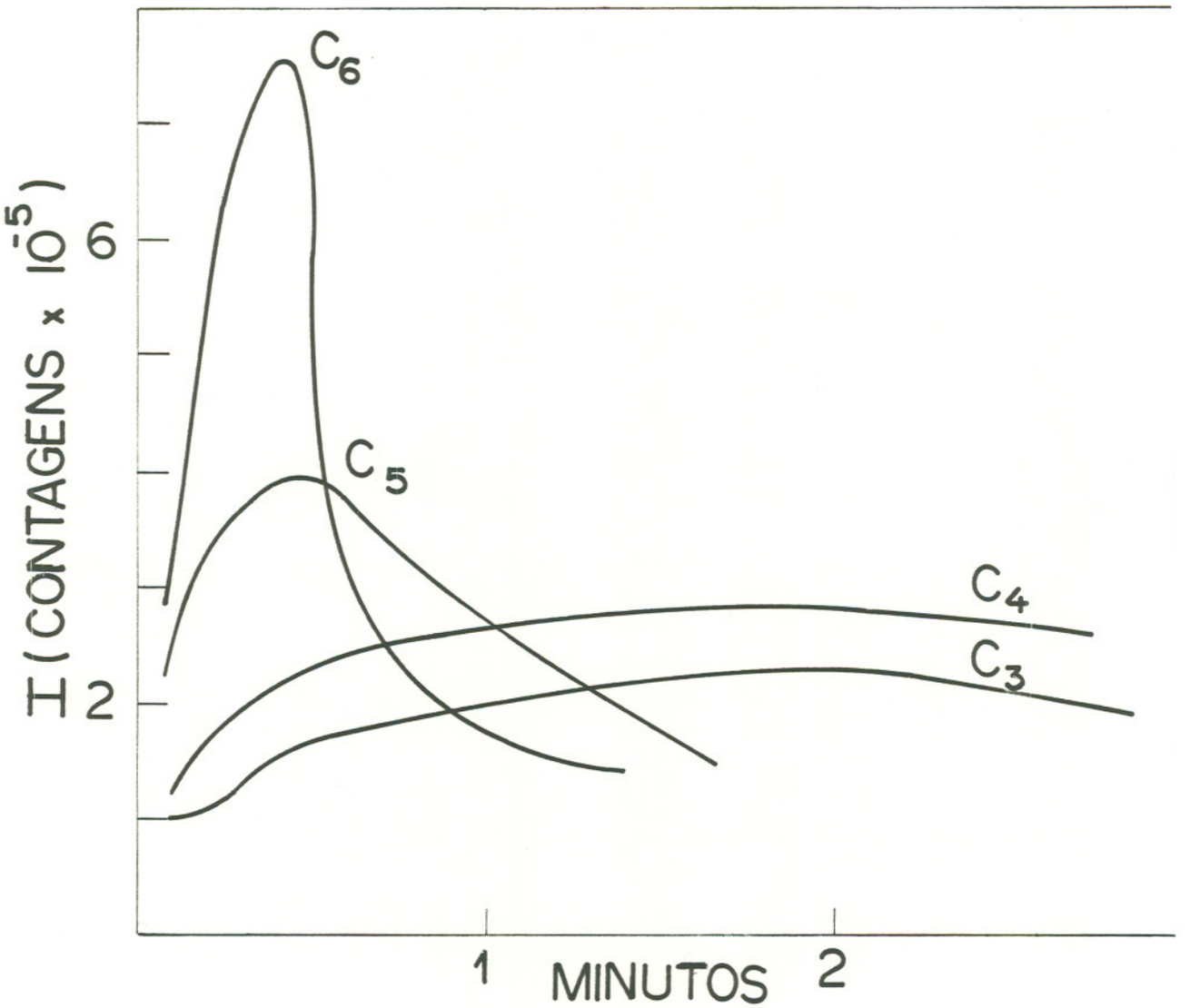



FIGURA III.9 - Fluorescência de eosina ($1x10^{-5}$M) promovida durante a oxidação aeróbica dos aldeídos $C_3$-$C_6$ (80 mM) catalisada pela HRP, na presença de CTAB (0,5 mM).

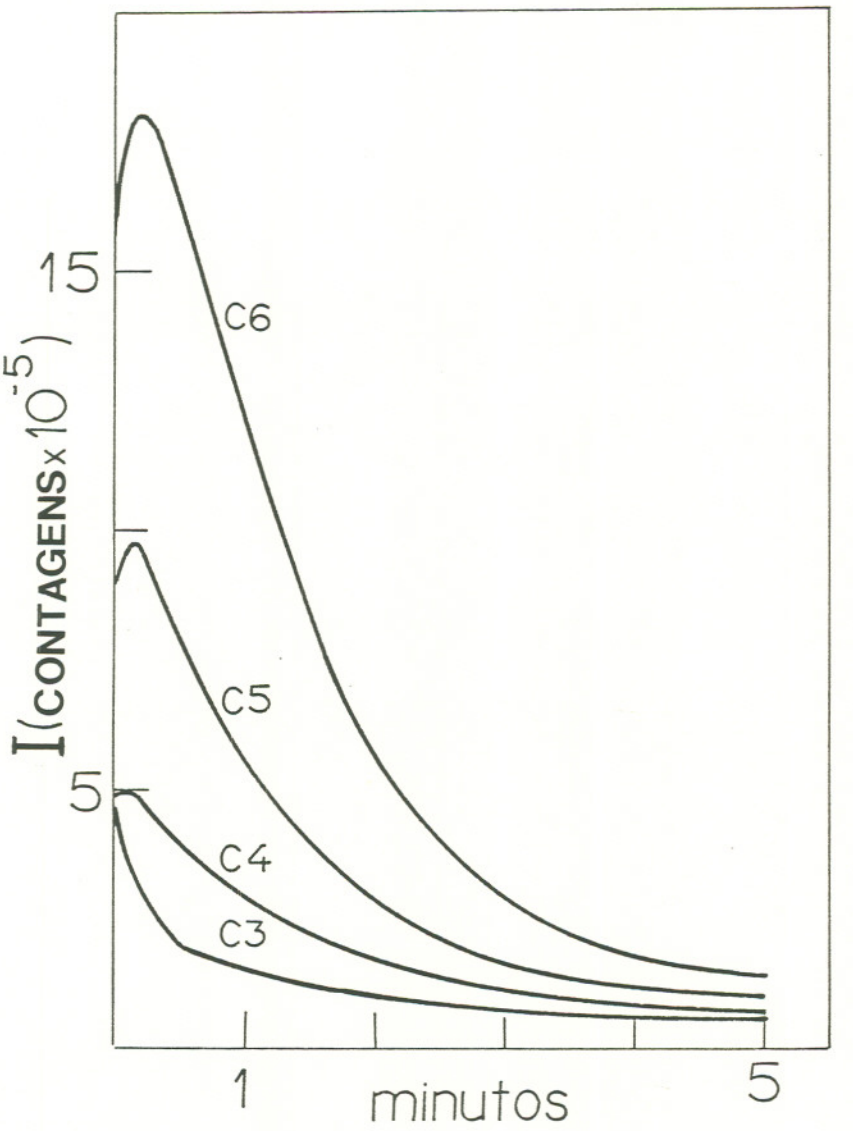



FIGURA III.10 - Fluorescência de clorofila (2,4μM) promovida durante a oxidação aeróbica dos aldeídos $C_3$-$C_6$ (1 mM) catalisada pela HRP (1 μM), na presença de CTAB (0,3 mM).

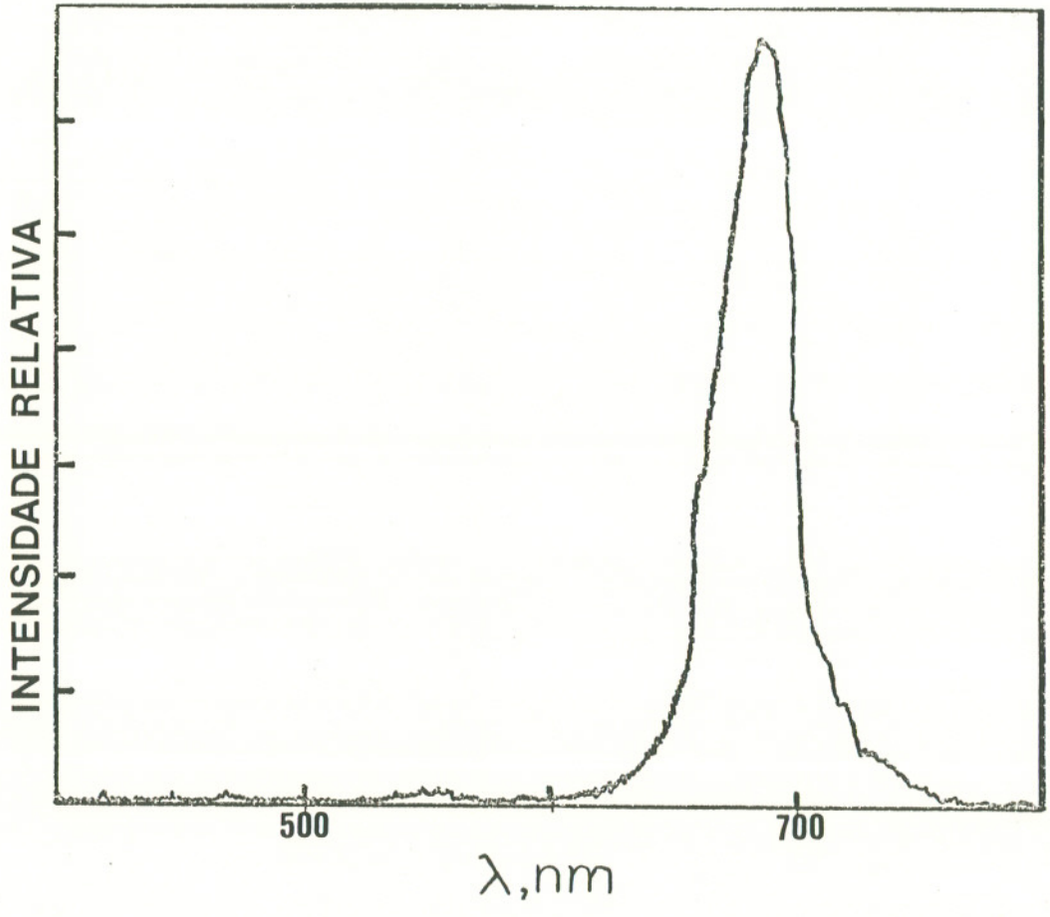
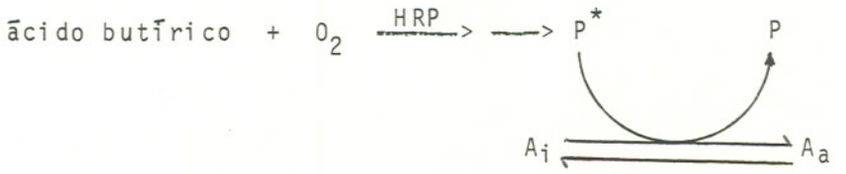



FIGURA III.11 - Espectro de emissão do sistema aldeído linear ($C_3 \rightarrow C_6$)/ HRP/$O_2$/clorofila/CTAB, o qual coincide com o espectro de fluorescência de clorofila. As concentrações utilizadas são as mesmas que especificadas na Figura III.10.

através de espécies eletronicamente excitadas (P*) gerando uma forma biologicamente ativa. Esquematizando:




onde $A_i$ e $A_a$ são formas biológicas inativas e ativas de uma molécula fotocrômica. Isto representaria um "processo fotobioquímico na ausência de luz" (CILENTO, 1982) análogo a interconversão do fitocromo (AUGUSTO et al, 1978). Em muitos destes processos fotobioquímicos "escuros", a espécie doadora excitada é um carbonilo triplete gerado na oxidação aeróbica de substratos apropriados, catalisada pela HRP (AUGUSTO et al., 1978; BRUNETTI et al., 1982).

Teria sido interessante estudar uma série homóloga de ácidos carboxílicos alifáticos lineares como substratos da HRP e observar um efeito especial associado com o homólogo $C_4$, em particular um maior rendimento de estados excitados, entretanto a oxidação enzimática destes ácidos é extremamente lenta (HAUN et al., 1980). A investigação de uma série homóloga de aldeídos alifáticos lineares reflete o fato de que, pelo menos em certos casos, ácidos

são convertidos *in vivo* no aldeído (JOHNSON & GILBERTSON, 1972; NATARAJAN & SASTRY, 1976; ULITZUR & HASTINGS, 1978; DAY & GOLDFINE, 1978; CLARK & CRONAN, 1980; BISHOP & HAJRA, 1981; De POOTER *et al.*, 1981; RODRIGUEZ *et al.*,1983). Adicionalmente, no único caso em que o ácido butírico é comparado a butanal — indução de diferenciação eritrocitária em células eritroleucêmicas de ratos (MALININ & EBERT, 1980) — o aldeído mostra-se mais eficiente.

É interessante notar que maior intensidade de emissão monitorada por eosina é, na quase totalidade dos experimentos, obtida com a reação $C_4$/HRP/$O_2$ sem que a este fato se associe uma maior velocidade de reação. Se bem que a discriminação quiral só possa ser estudada com os homólogos $C_3$ e $C_4$, é importante notar que $C_4$ já apresenta comportamento diferente do homólogo $C_3$.

De modo geral, os resultados suportam a hipótese de trabalho inicial se bem que esta seja limitada por algumas suposições: (i) uma vez que alguns compostos estruturalmente não relacionados ao ácido butírico(BELL & JONES, 1982) também exercem algumas das atividades mencionadas, supõe-se neste caso que o mecanismo seja diferente do operante com a série homóloga dos ácidos, (ii) embora a conversão de ácido a aldeído tenha sido demonstrada para ácidos graxos longos (JOHNSON & GILBERTSON, 1972; NATARAJAN & SASTRY, 1976; ULITZUR & HASTINGS, 1978; DAY & GOLDFINE, 1978; BISHOP & HAJRA, 1981; RODRIGUEZ *et al.*, 1983), e para ácido acético (CLARK & CRONAN, 1980) e propionico (De POOTER *et al.*, 1981), assume-se que a conversão pode também

ocorrer com outros ácidos alifáticos e com eficiências similares. Curiosamente, em um caso de administração de ácido butírico (De POOTER et al., 1981), acetaldeído e butanol são encontrados, sugerindo que butanal e propanal são gerados como intermediários.

A hipótese de que ácido butírico age através de um produto excitado numa molécula fotocrômica pode explicar a rapidez e completa reversibilidade dos efeitos produzidos por este ácido e seus homólogos.

Quando estas reações são efetuadas na presença de CTAB, a intensidade máxima de emissão monitorada por eosina ou clorofila aumenta com o aumento da cadeia carbônica do aldeído. Isto presumivelmente se deve a um efeito micelar que favorece a reação com os homólogos superiores, não se encontrado portanto efeito máximo em $C_4$.

Observa-se que os homólogos superiores também levam a uma maior emissão com cloroplastos e microsomas (vide III.2 e IV).

## III.2 TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA PARA CLOROPLASTOS

### III.2.1 Cloroplastos - Estrutura e Função

Cloroplastos típicos de plantas superiores são organelas lentiformes com um diâmetro de 3 a 10μm. Possuem um sistema tríplice de membranas, duas externas, que definem e compartimentalizam a organela e uma interna, bastante complexa e densa embebida na matriz. A membrana interna consiste no empilhamento de membranas na forma de discos que são chamadas de tilacóides, onde está contido todo o aparato fotossintético.

Tratamento brando com detergentes e subsequente fracionamento permite isolar três principais complexos macromoleculares dos tilacóides (BOARDMAN et al., 1966; JENNINGS et al., 1980): (i) fotossistema II(PS II), que contém uma molécula de clorofila especializada denominada P-680 e um complexo antena constituído por centenas de moléculas de clorofila e pigmentos acessórios); (ii) um complexo clorofila a/b-proteína captador de luz ("light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex-LHCP) e (iii) fotossistema I (PS I) constituído por uma clorofila especializada $P_{700}$ e um complexo antena.

Nos cloroplastos ocorre a fotossíntese que é o processo biológico da conversão de energia luminosa em energia química. Este processo se realiza em duas etapas: reações luminosas e reações escuras. Nas reações luminosas a clorofila e outros pigmentos absorvem energia luminosa que é convertida em energia química na forma de

ATP e NADPH através de um sistema de transporte de elétrons da água (ou outra molécula doadora de hidrogênio) ao $NADP^+$. Nas reações escuras o ATP e NADPH, formados nas reações luminosas, são utilizados na biossíntese de carboidratos (ciclo de Calvin).

Nas reações luminosas estão envolvidos os PS I, PS II e uma série de moléculas transportadoras de elétrons. A figura III.12 esquematiza o fluxo de elétrons através dos diversos transportadores e localiza os sítios de fosforilação.

Em cloroplastos isolados observa-se uma via alternativa do fluxo de elétrons que envolve somente o PS I e alguns dos aceptores de elétrons da cadeia. Esta via não forma NADPH nem libera oxigênio, entretanto possui um sítio de fosforilação (fotofosforilação cíclica).

### III.2.2 Interação de cloroplastos com sistemas geradores de aldeídos alifáticos lineares triplete

Os experimentos são efetuados em tampão fosfato 0,5 M/pirofosfato 0,04 M, pH 7,4. As concentrações dos reagentes na mistura reacional são: HRP (tipo VI), 2μM; cloroplastos contendo 3,5 μM de clorofila; aldeídos($C_2$-$C_6$), 80 mM; etanol 0,5M. Deve-se salientar que os homólogos $C_5$ e $C_6$ não estão totalmente solubilizados quando utilizados na concentração acima especificada, entretanto são também descritos experimentos efetuados a baixas concentrações (8 e 2 mM) de aldeído.

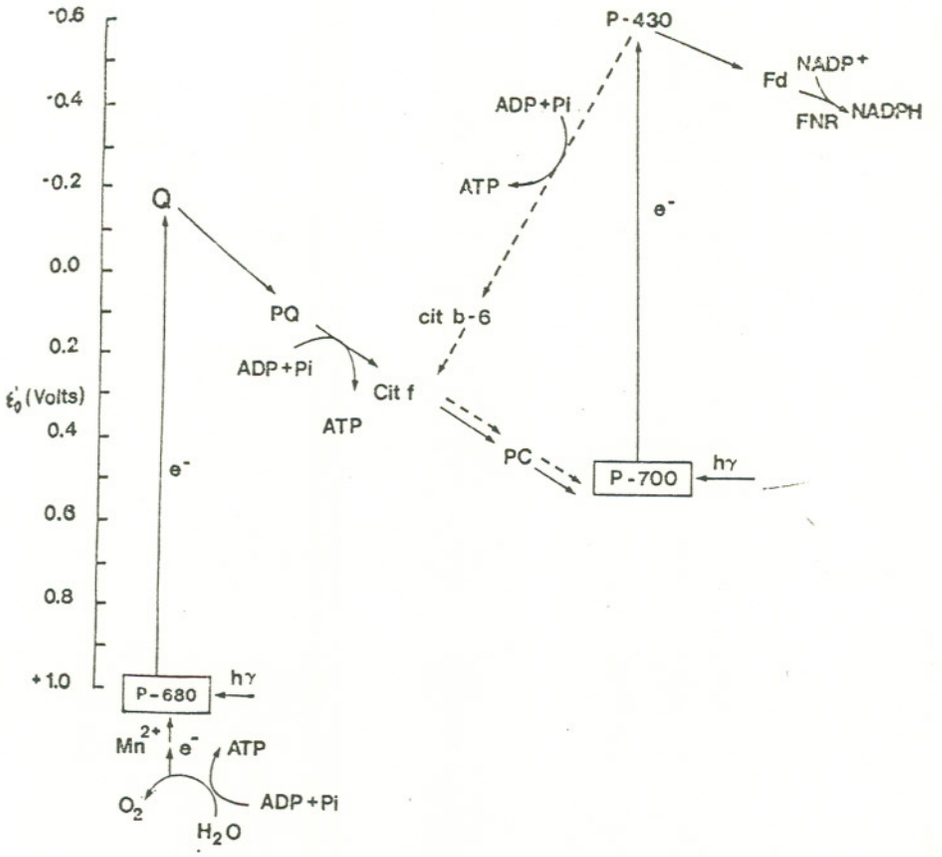



FIGURA III.12 - Diagrama de energia do transporte de elétrons fotossintético; fosforilação cíclica (--->) e não cíclica (→), em função do potencial redox. P-680, centro de reação de PS-II; Q, primeiro aceptor de PS-II; PQ, plastoquinona; cit f, citocromo f; PC, plastocianina; P-700, centro de reação de PS-I; P-430, ferredoxina, associada à membrana; Fd, ferredoxina livre; FNR, ferredoxina-NADP-redutase; cit b-6, citocromo, b-6; Pi, fosfato inorgânico.

### III.2.2.1 Resultados

Emissão de luz proveniente de cloroplastos é promovida tanto pelos aldeídos $C_2$-$C_6$, como pelas reações $C_2$-$C_6$/HRP/$O_2$ (Fig.III13A→E). Estas emissões situam-se acima de 630 nm, como atestado pelo uso de filtro. As curvas de consumo de oxigênio das reações $C_2$-$C_6$/HRP/$O_2$ na presença e na ausência de cloroplastos são apresentadas na figura III.14. Cloroplastos diminuem discretamente a velocidade das reações $C_3$-$C_4$/HRP/$O_2$, as demais não chegam a esgotar o oxigênio, sendo que para $C_2$ e $C_6$ a velocidade é extremamente baixa. Não se observa consumo de oxigênio na ausência de HRP.

A emissão induzida pelo aldeído é rápida e em decaimento, sendo que no caso de $C_5$ e $C_6$ ela é maior e mais persistente. Quando HRP é adicionada após o decaimento da emissão aldeído/cloroplasto, desenvolve-se uma nova e persistente emissão com as mesmas características daquela observada quando HRP é adicionada inicialmente. (Fig. III.13)

Os sistemas $C_2$-$C_6$/HRP/cloroplastos e aldeído/cloroplastos ensaiados a baixas concentrações do aldeído (2 e 8 mM) mostram que a emissão do sistema que contém HRP é sempre maior do que aquela promovida somente pelo aldeído. As intensidades de emissão seguem a ordem $C_6 > C_5 > C_4 \sim C_3 \sim C_2$ (2 mM) e $C_6 > C_5 \sim C_4 \sim C_3 > C_2$ (8 mM).

Superóxido dismutase (100 U) e catalase ($1 \times 10^7$ M) não alteram a emissão de luz proveniente

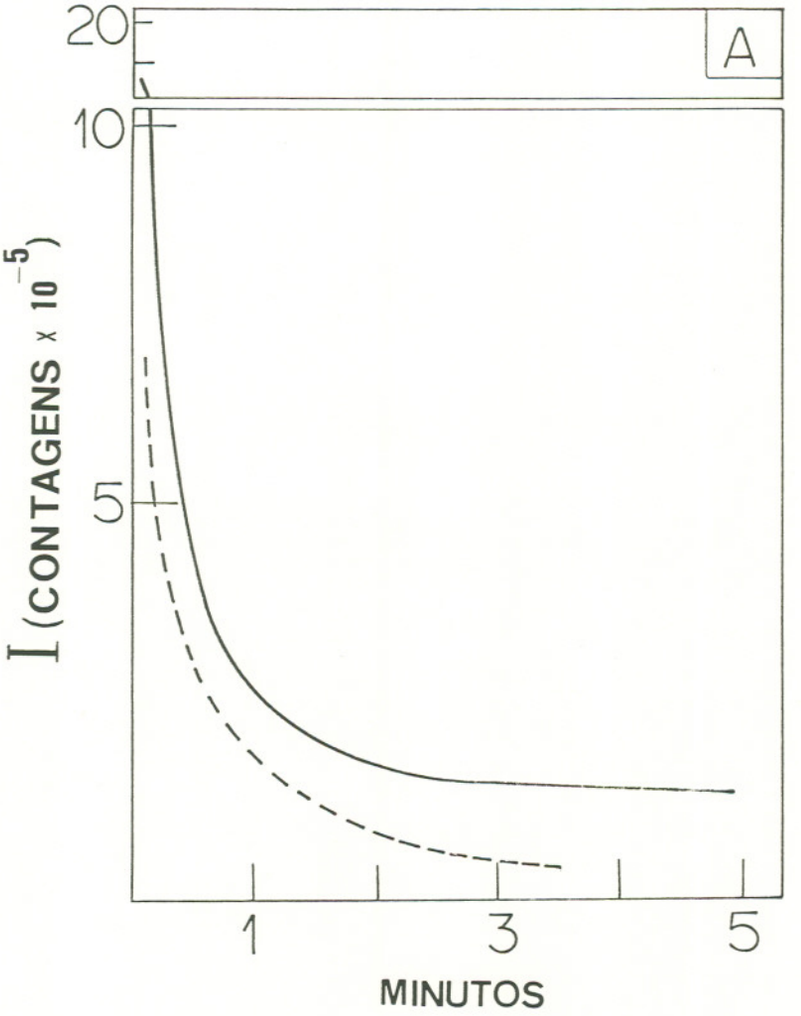
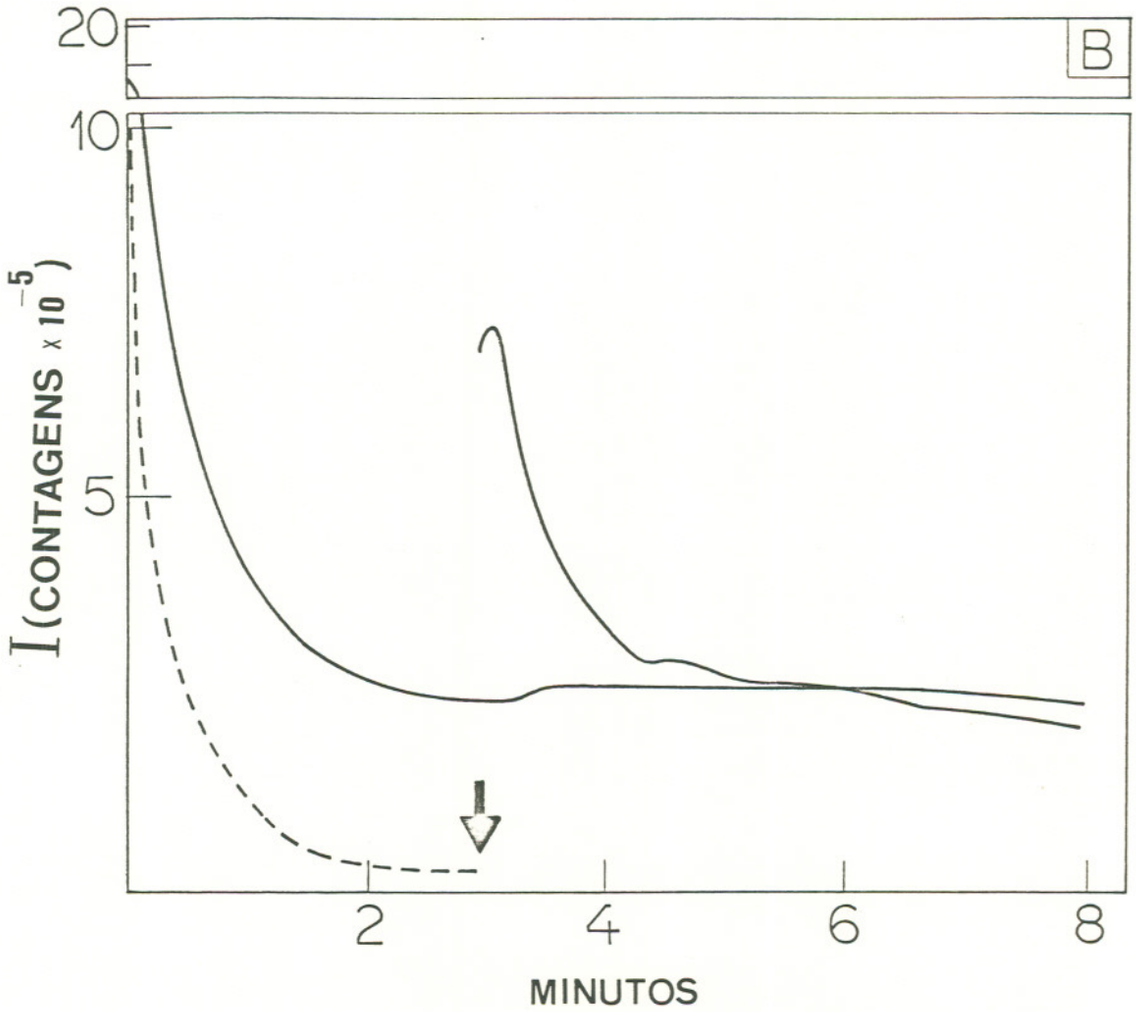
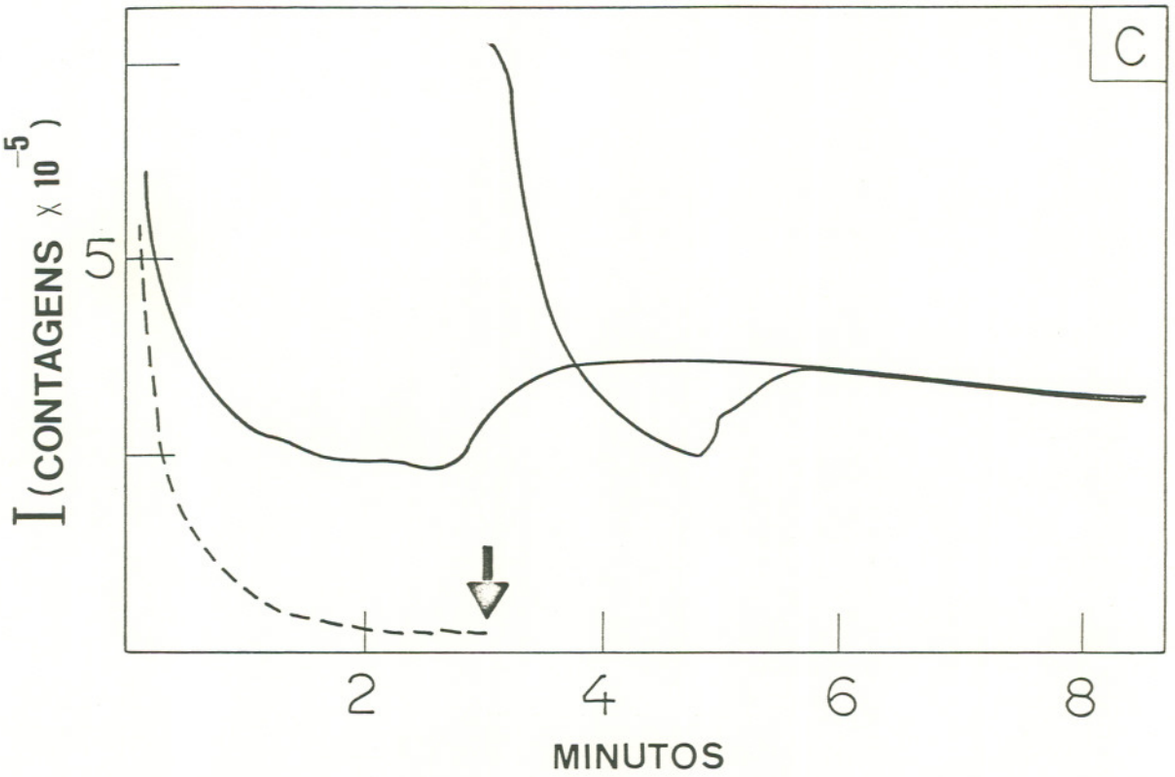
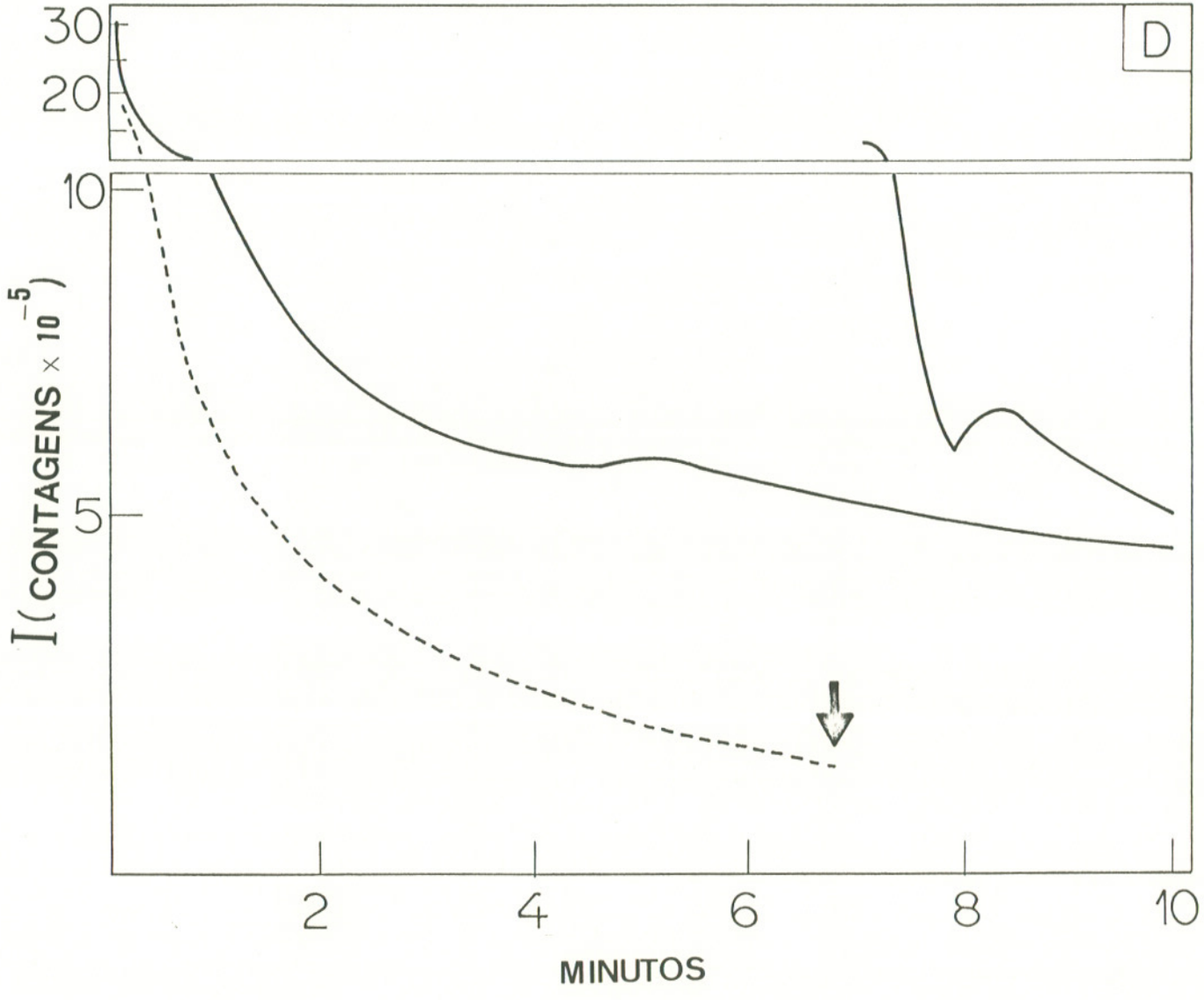
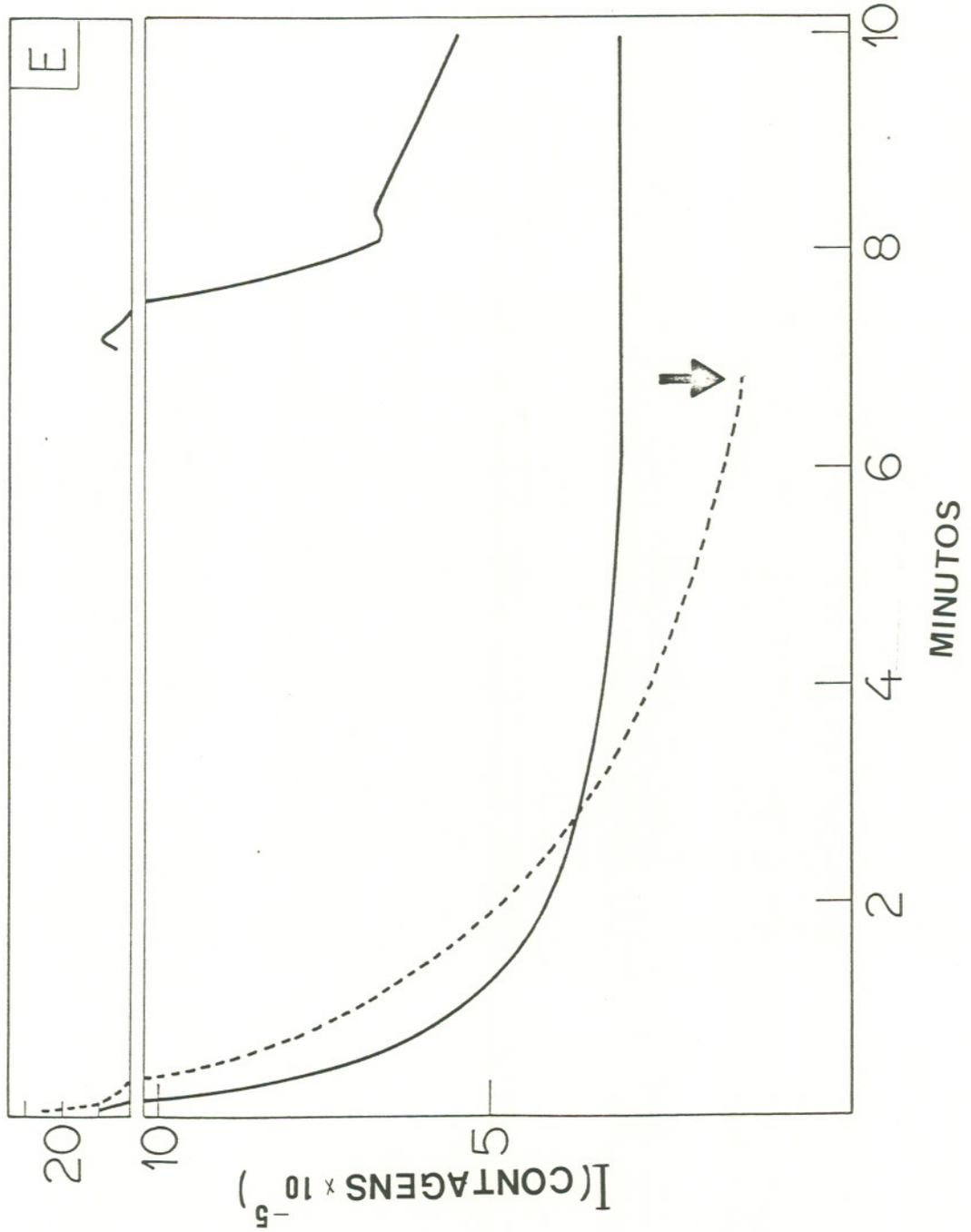



FIGURA III.13 - Emissão de cloroplastos promovida pela oxidação aeróbica catalisada por HRP dos aldeídos (80 mM): A, acetaldeído, B, propanal, C, butanal, D, pentanal, E, hexanal. A linha tracejada corresponde a emissão de cloroplastos desencadeada pelo aldeído. Em B-E o efeito da adição posterior de HRP, indicado pela flecha, também é mostrado. A emissão proveniente de cloroplastos sozinhos é insignificante.


20
10
5
B
I (CONTAGENS x 10^-5)
2
4
6
8
MINUTOS


C
I (CONTAGENS x 10^-5)
5
2
4
6
8
MINUTOS


D
30
20
10
5
I ( CONTAGENS × 10^-5 )
2
4
6
8
10
MINUTOS


E
20
10
5
I(CONTAGENS x 10^-5)
2
4
6
8
10
MINUTOS

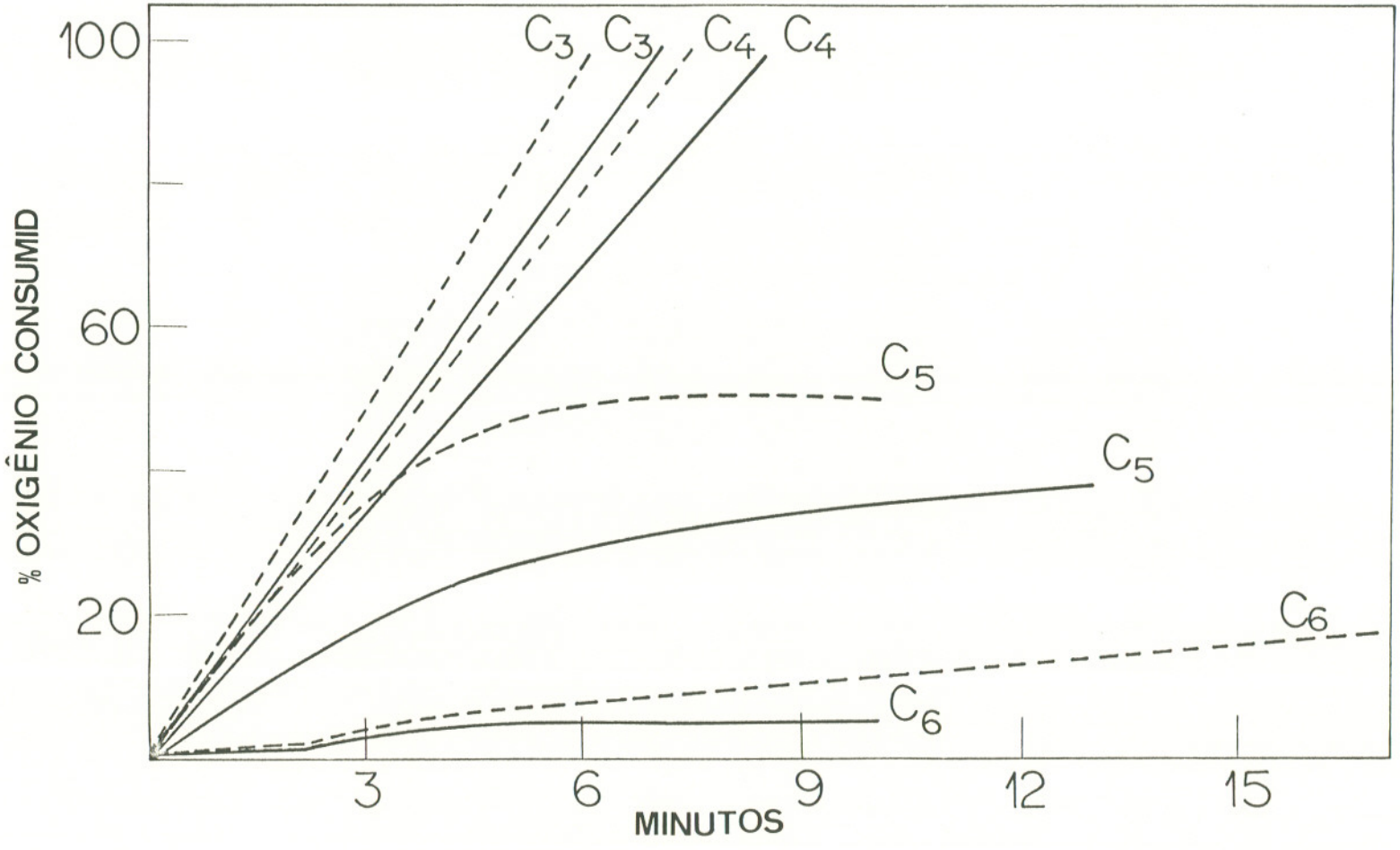



FIGURA III,14 - Oxigênio consumido durante a oxidação dos aldeídos alifáticos $C_2$-$C_6$ (80 mM) catalisada por HRP, na ausência (---) e na presença (—) de cloroplastos.

das reações $C_2$-$C_6$/HRP/$O_2$/cloroplastos.

As emissões provenientes dos sistemas $C_3$-$C_4$/HRP/$O_2$/cloroplastos não estão correlacionadas ao consumo de oxigênio (Figs.III13B e C comparadas a III.14), entretanto quando se esgota extensivamente o oxigênio do meio, através da adição de glucose/glucose oxidase/catalase, a emissão decai abruptamente (Fig. III.15).

A emissão da reação $C_5$/HRP/$O_2$/cloroplastos é suficientemente intensa para que seu espectro seja registrado em fluorímetro convencional (Fig. III.16). O espectro de emissão mostra intensidade máxima a 685 nm, região na qual se situa a fluorescência de clorofila. As reações $C_2$-$C_6$/HRP/$O_2$ também transferem energia para clorofila livre em solução, porém a intensidade da emissão é acentuadamente menor quando comparada às obtidas com o uso da clorofila em micelas e cloroplasplastos. Isto provavelmente se deve ao baixo rendimento quântico de fluorescência da clorofila em água ($\Phi_F$ ~ 0,001).

As eficiências em povoar estados singlete $S_1$ da clorofila foram calculadas baseadas no consumo de oxigênio e assumindo que o rendimento quântico de fluorescência ($\Phi_F$) da clorofila em cloroplastos é de aproximadamente 0,01 (Tabela III.2). Fosforescência de clorofila ($\lambda_{max}$ ~ 960-980 nm) não seria detectada pela aparelhagem utilizada. O homólogo $C_2$ não está contido na Tabela devido ao baixo (e às vezes não detectável) consumo de oxigênio. Os valores referentes ao homólogo $C_6$ também não foram incluídos devido a baixa velocidade de rea-

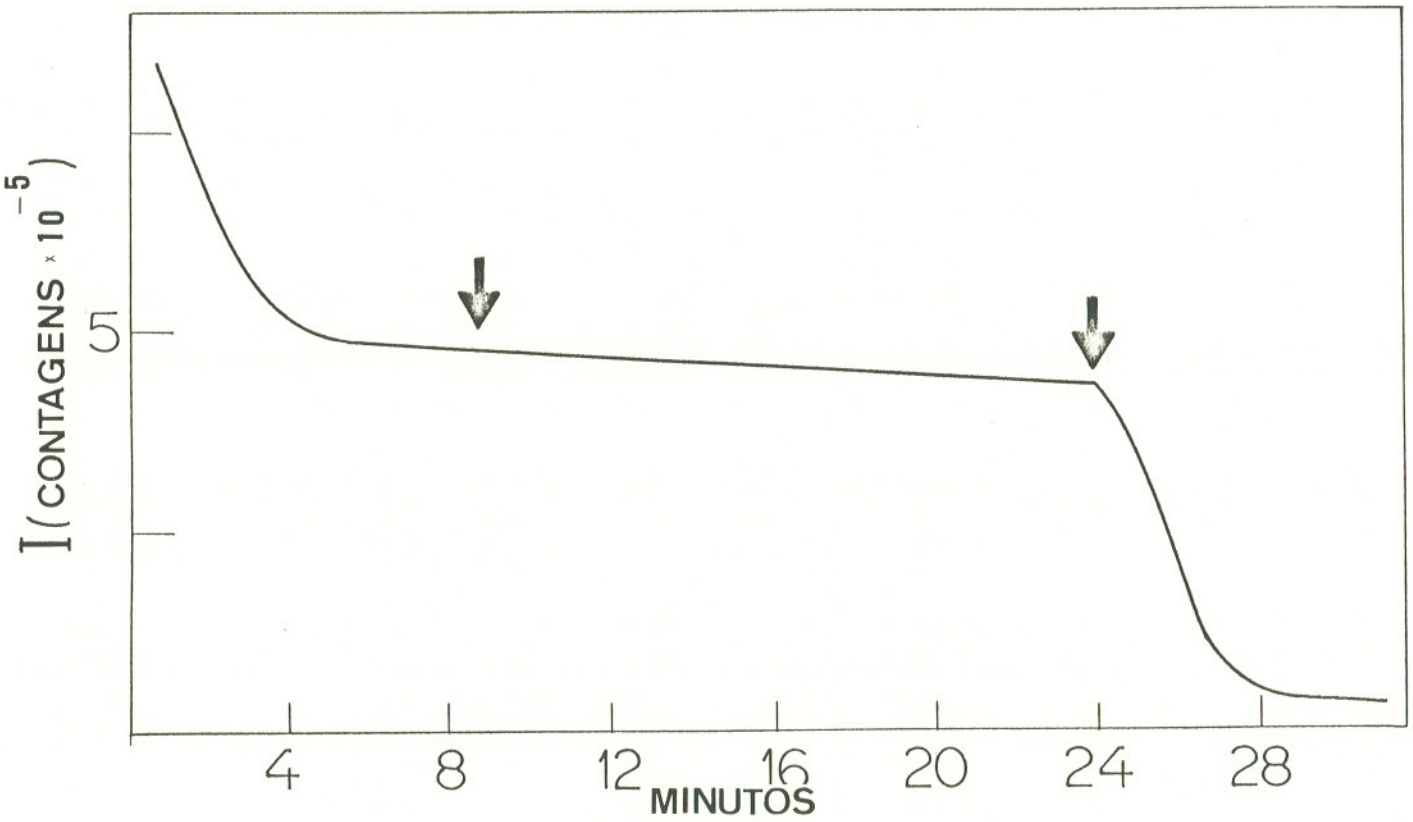



FIGURA III.15 - Supressão da emissão do sistema $C_4$/HRP/$O_2$/cloroplastos através do esgotamento extensivo de $O_2$. A flecha esquerda indica o tempo onde o $O_2$ foi esgotado tornando-se disponível somente por difusão. No tempo indicado pela flecha a direita fez-se a adição de glucose/glucose oxidase/catalase (tornando o sistema praticamente anaeróbico).

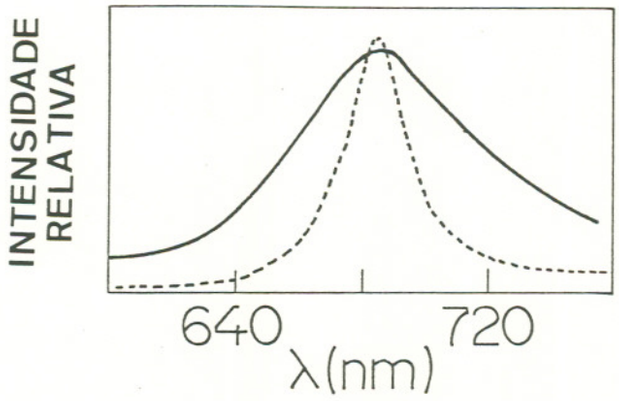



FIGURA III.16 - Comparação entre o espectro de fluorescência de cloroplastos ($\lambda_{exc}$ = 430 nm) (---) e o espectro de emissão do sistema $C_5$/HRP/$O_2$/cloroplastos (——) sendo que o último foi obtido com a fenda completamente aberta.

TABELA III.2 - Eficiências das reações aldeído/HRP/$O_2$ popularem o estado singlete $S_1$ da clorofila em cloroplastos.

| Aldeído [a] | Intervalo de tempo [b] (minutos) | Moles de $O_2$ consumidos | Nº de fótons emitidos | Nº de estados $S_1$ populados [c] | $\Phi_{quimioexcitação} \times \Phi_{transferência}$ [d] |
|---|---|---|---|---|---|
| Propanal ($C_3$) | 1 - 7,1 | $5,2 \times 10^{-7}$ | $3,7 \times 10^{10}$ | $3,7 \times 10^{12}$ | $4,2 \times 10^{-5}$ |
| Butanal ($C_4$) | 1 - 8,5 | $5,3 \times 10^{-7}$ | $5,7 \times 10^{-7}$ | $5,7 \times 10^{12}$ | $6,3 \times 10^{-5}$ |
| Pentanal ($C_5$) | 1 - 3,0 | $7,5 \times 10^{-8}$ | $3,4 \times 10^{10}$ | $3,4 \times 10^{12}$ | $2,6 \times 10^{-4}$ |

[a] 80 mM; [b] valores após o primeiro minuto para minimizar a contribuição da emissão aldeído/cloroplastos; [c] $\Phi_F$ de clorofila em cloroplastos ~ 0,01 (KOCHUBEI *et al.*, 1980); [d] calculado através do número de estados $S_1$ populados dividido pelo número de moléculas de $O_2$ consumidas.

ção e $C_6$/cloroplastos possuir emissão equivalente ao sistema completo. Os valores referentes a $C_5$ incluem parte da emissão desencadeada em cloroplastos somente pelo aldeído.

Nenhum dos sistemas é capaz de reduzir azul de tetrazolium, um aceptor de Hill.

III.2.2.2 Discussão

Devido aos cloroplastos possuirem significativa atividade peroxidásica (HENRY et al., 1981), deve ser considerada a possibilidade desta ser responsável pela emissão desencadeada pelo aldeído, entretanto isto parece improvável pois nenhum dos sistemas $C_2$-$C_6$/cloroplastos consome oxigênio. As emissões promovidas pelo aldeído devem provavelmente constituir um caso de luminescência escura ("dark luminescence"), refletindo a habilidade dos sistemas fotossintéticos totalmente relaxados e adaptados ao escuro emitirem luz como consequência de certos tipos de estímulos (BJORN & SIGFRIDSSON, 1971; LAVOREL, 1980; LAVERGNE & ÉTIENNE, 1980; LAVOREL et al., 1982).

Visto que as reações $C_2$-$C_6$/HRP/$O_2$ não são emissivas e que HRP não promove emissão em cloroplastos, a emissão de luz proveniente das reações $C_2$-$C_6$/HRP/$O_2$/cloroplastos pode ser originária de dois processos não excludentes, ambos como consequência da transferência de

energia do aldeído triplete para o cloroplasto. Estes processos são: (i) emissão da clorofila sensitizada pela própria transferência e, (ii) emissão da clorofila excitada durante um processo induzido nos cloroplastos. A transferência de energia dos aldeídos triplete para clorofila é suportada pela capacidade dos sistemas $C_2$-$C_6$/HRP/$O_2$ transferirem energia para clorofila livre e/ou solubilizada em micelas. Adicionalmente NASSI & CILENTO (1983) evidenciaram transferência de energia de carbonilos triplete para clorofila contida em cloroplastos.

Transferência de energia também pode estar ocorrendo para fragmentos de cloroplastos, uma vez que emissão de luz de aproximadamente mesma magnitude é observada com frações enriquecidas em fotossistemas I e II (NASSI & CILENTO, 1984).

O processo que desencadeia a excitação de cloroplastos parece não envolver as espécies $H_2O_2$ e $O_2^{\bar{\cdot}}$, visto que a catalase e superóxido dismutase não alteram a emissão de luz. A presença de etanol na mistura reacional exclui a participação do radical $H\bar{O}^{\cdot}$. A presença de oxigênio singlete ($^1O_2$) é improvável, pois: (i) não existem evidências de sua formação durante a oxidação dos aldeídos lineares catalisada pela HRP; (ii) carotenóides presentes nos cloroplastos suprimem $^1O_2$ (ASADA *et al.*, 1983); (iii) as emissões provenientes das reações $C_3$-$C_4$/HRP/cloroplastos não estão relacionadas com a concentração de oxigênio presente na solução.

A emissão de cloroplastos permanece praticamente inalterada quando o oxigênio está esgotado e disponível apenas por difusão. A persistência desta emissão pode refletir: (i) a dependência de ordem zero dessas reações em relação ao oxigênio indicada pela linearidade do consumo de oxigênio com os homólogos $C_3$ e $C_4$; (ii) maior tempo de vida das espécies triplete em baixas concentrações de oxigênio, ou (iii) a geração de um processo emissivo induzido cuja contribuição aumenta com o tempo.

Os resultados demonstram que a emissão provém da fluorescência da clorofila, entretanto a participação do primeiro triplete ($T_1$) não é rigorosamente excluída. Embora carotenóides suprimam eficientemente o $T_1$ da clorofila, poderiam existir nos cloroplastos populações não suprimíveis (provavelmente devido a flutuações naturais, resultando no afastamento entre moléculas de clorofila e caroteno; KRASNOVSKY, 1982). Então, a participação do triplete $T_1$ da clorofila será possível se a transferência de energia se der para as moléculas não suprimíveis ou segundo o mecanismo seguinte (KRASNOVSKY *et al.*, 1981; JENSEN *et al.*, 1980; DALLINGER *et al.*, 1981):

$$^3\text{Clorofila}^* + \text{Carotenóide} \rightarrow \text{Clorofila} + {}^3\text{Carotenóide}^*$$

$$^3\text{Carotenóide}^* + {}^3\text{Carotenóide}^* \rightarrow {}^1\text{Carotenóide}^* + \text{Carotenóide}$$

$$^1\text{Carotenóide}^* + \text{Clorofila} \rightarrow \text{Carotenóide} + {}^1\text{Clorofila}^*$$

Também o envolvimento de um triplete superior da clorofi-

la, que através do cruzamento intersistema povoa o estado $S_1$ da mesma, pode ocorrer, como sugerido por BRUNETTI *et al*. (1983).

# IV. QUIMIOLUMINESCÊNCIA DE MICROSOMAS EXPOSTOS À OXIDAÇÃO DE ALDEÍDOS LINEARES E OUTROS SUBSTRATOS CATALISADA PELA HRP

## IV.1 RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E MICROSOMAS

### Estrutura e função. Quimioluminescência

O retículo endoplasmático consiste numa complexa e extensa rede de membranas situadas no citoplasma. Nestas membranas estão localizadas várias enzimas e sistemas enzimáticos. Aproximadamente 60% do retículo endoplasmático possue ribossomos aderidos à sua membrana — regiões denominadas de retículo endoplasmático rugoso. A constituição aproximada do retículo endoplasmático é de 70% de proteínas e 30% de lipídeos (dos quais 85% são fosfolipídeos). Algumas das funções associadas a esta organela são: metabolismo de xenobióticos, síntese e transporte de um grande número de proteínas, síntese de colesterol, fosfolipídeos e triglicerídeos, além da participação na clivagem do glicogênio.

O retículo endoplasmático de fígado responde a fenobarbital e outros xenobióticos, aumentando seu volume e área de superfície, juntamente com um substancial acréscimo quantitativo do citocromo $P_{450}$ (CONEY, 1967).

Contrário a outras organelas, tais como mitocôndrias e lisossomos, o retículo endoplasmático se rompe extensivamente quando o tecido é homogeneizado. Os frag-

mentos obtidos pela homogeneização formam vesículas que são chamadas de microsomas. Essas vesículas são heterogêneas quanto ao tamanho, densidade e carga de superfície (DALLNER & ERNSTER, 1968; SIEKEVITZ, 1962). A membrana microsomal externa corresponde à superfície citoplasmática do retículo endoplasmático.

O retículo endoplasmático contém flavoproteínas e citocromos que funcionam em reações de transporte de elétrons requerendo oxigênio, NADH e NADPH. Um dos principais sistemas de transporte de elétrons nos microsomas é o sistema do citocromo $P_{450}$ dependente de NADPH, que é classificado como oxidase de função mista ou monoxigenase. Este sistema transfere elétrons do NADPH ao oxigênio catalizando a hidroxilação ou demetilação de um substrato pelo oxigênio ativado.

Outro sistema de transporte de elétrons envolve o citocromo $b_5$, sua NADH desidrogenase e uma ferroproteína – dessaturase. O citocromo $b_5$ reduzido participa da dessaturação de ácidos graxos. Essa reação converte o palmitil coenzima A (CoA) e estearil CoA em respectivamente palmitoleil CoA e oleil CoA. Em condições especiais o NADPH citocromo $P_{450}$ redutase pode também catalisar a transferência de equivalentes redutores do NADPH para o citocromo $b_5$ (ESTABROOK, 1978).

Esses dois sistemas de transporte de elétrons microsomais estão representados na figura IV.1.

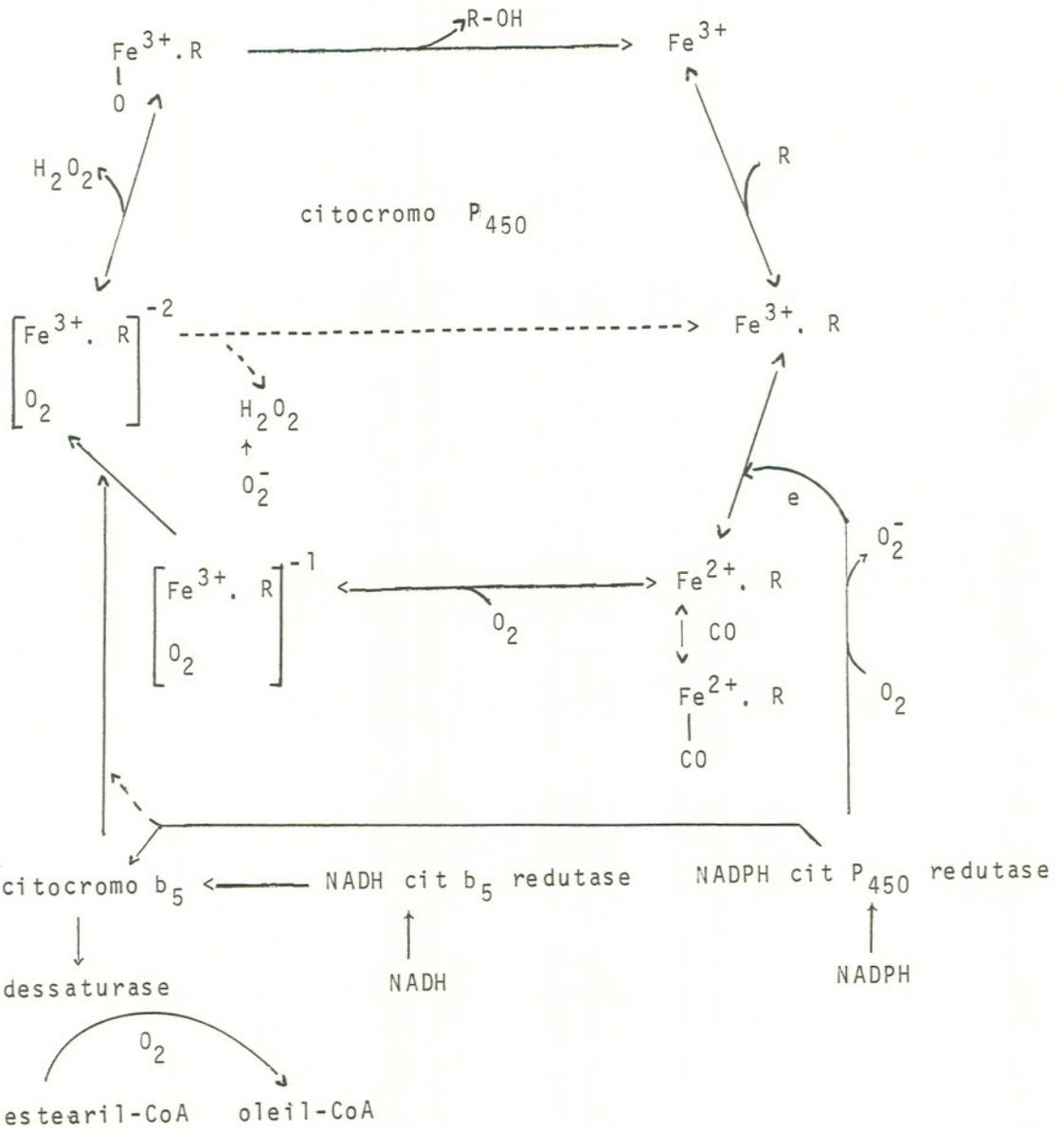



FIGURA IV.1 Representação esquemática das reações de transporte de elétrons que ocorrem em microsomas.

Em microsomas e em outras frações subcelulares como núcleos, lisossomas e mitocôndrias, pode ocorrer peroxidação de lipídeos (PLAYER & HORTON, 1981; YONAHA & OHBAYASHI, 1980; KOSTER & SLEE, 1980; VLADIMIROV et al., 1980; CHANCE et al., 1979; FONG et al., 1973). Na lipoperoxidação ácidos graxos insaturados são peroxidados e clivados com formação de malonaldeído e outros produtos. Os microsomas estão entre as frações subcelulares mais ativas e bem caracterizadas com respeito à peroxidação de lipídeos. Várias espécies reativas de oxigênio, entre elas íon superóxido, radical hidroxila e oxigênio singlete, parecem estar envolvidos tanto na fase de iniciação como na propagação deste processo (AUST & PEDERSON, 1972; KING et al., 1975; NAKANO et al., 1975; FONG et al., 1973; LAY & PIETTE, 1977; SVINGEN et al., 1978; SVIGEN et al., 1979).

A peroxidação de lipídeos é acompanhada por uma emissão fraca que tem sido atribuída ao oxigênio singlete com uma possível contribuição da quimiolumi - nescência de carbonilos (SHOAF & STEELE, 1974; NAKANO & SUGIOKA, 1978; CADENAS et al.,1981a; CADENAS & SIES,1982).

Várias classes de processos de lipoperoxidação em microsomas podem ser distinguidos: (i) um processo não enzimático e que pode ser induzido por ascorbato; (ii) um processo enzimático dependente de NADPH e ferro, o qual está associado com a cadeia de transporte de elétrons que catalisa a oxidação de xenobióticos (KOSTER & SLEE, 1980) e; (iii) um processo promovido por hidroperóxidos o qual não requer doadores de elé-

trons e cuja formação de estados excitados se dá através da quebra do hidroperóxido pelo citocromo $P_{450}$ (CADENAS & SIES, 1982).

A quimioluminescência e a peroxidação de lipídeos microsomal, provenientes do processo enzimático (NADPH dependente) são diminuídas na presença de catalase e tiouréia (KOSTER & SLEE, 1980), além de serem abolidas por EDTA (SHAH et al., 1983). SKF-525 A (um inibidor do citocromo $P_{450}$) inibe efetivamente a quimioluminescência microsomal promovida por t-BuOOH (CADENAS & SIES, 1982).

## IV.2 INTERAÇÃO DE MICROSOMAS COM SISTEMAS GERADORES DE ESPÉCIES EXCITADAS TRIPLETE

A não ser quando especificado, os experimentos são efetuados em tampão fosfato 0,5 M pirofosfato 0,04 M, pH 7,4 a 37°C. As concentrações dos reagentes na mistura reacional (3 ml) são: HRP (tipo VI), 0,5 µM; microsomas contendo 8 mg de proteína por reação; propanal ($C_3$) 80 mM; etanol 0,5 M. Os resultados são altamente reprodutíveis com a mesma preparação microsomal, entretanto preparações distintas podem acarretar mudanças não acentuadas na intensidade e cinética das emissões de luz. Todos os experimentos foram comparados à reações controle com a mesma preparação microsomal.

Microsomas também foram expostos aos sistemas IBAL/HRP/$O_2$ e IAA/HRP/$O_2$, os quais geram res-

pectivamente acetona triplete e indol-3-aldeído triplete. O fato desses sistemas já serem emissivos, limita a visualização do processo desencadeado nos microsomas.

### IV.2.1 Sistema aldeídos lineares/HRP/$O_2$

#### IV.2.1.1 Resultados

Quando microsomas estão presentes durante a oxidação aeróbica do $C_3$ catalisada pela HRP observa-se emissão de luz de baixa intensidade (Fig. IV.2). Esta emissão depende do sistema completo, pois os sistemas $C_3$/microsomas e HRP/microsomas não são emissivos.

A adição de microsomas (8 mg de proteína) provoca um aumento na velocidade de consumo de oxigênio (Fig. IV.3). Pode-se notar que a emissão de luz persiste após o oxigênio ter sido esgotado e disponível somente por difusão (Fig. IV.4). O efeito de quantidades distintas de microsomas no tempo de indução e intensidade de emissão é apresentado na figura IV.5.

Quando se substitui tampão fosfato por Tris o sistema $C_3$/HRP/microsomas ainda consome oxigênio (Fig. IV.6), porém não se observa emissão.

Cinéticas de emissão de luz a vários pHs e diferentes concentrações de tampão fosfato aparecem representadas nas figuras IV.7 e IV.8. Passando-se de 35 a 40°C a emissão total aumenta em cerca de 30%. Variação na concentração de HRP na faixa de 0,5 a 2,0 μM não induz

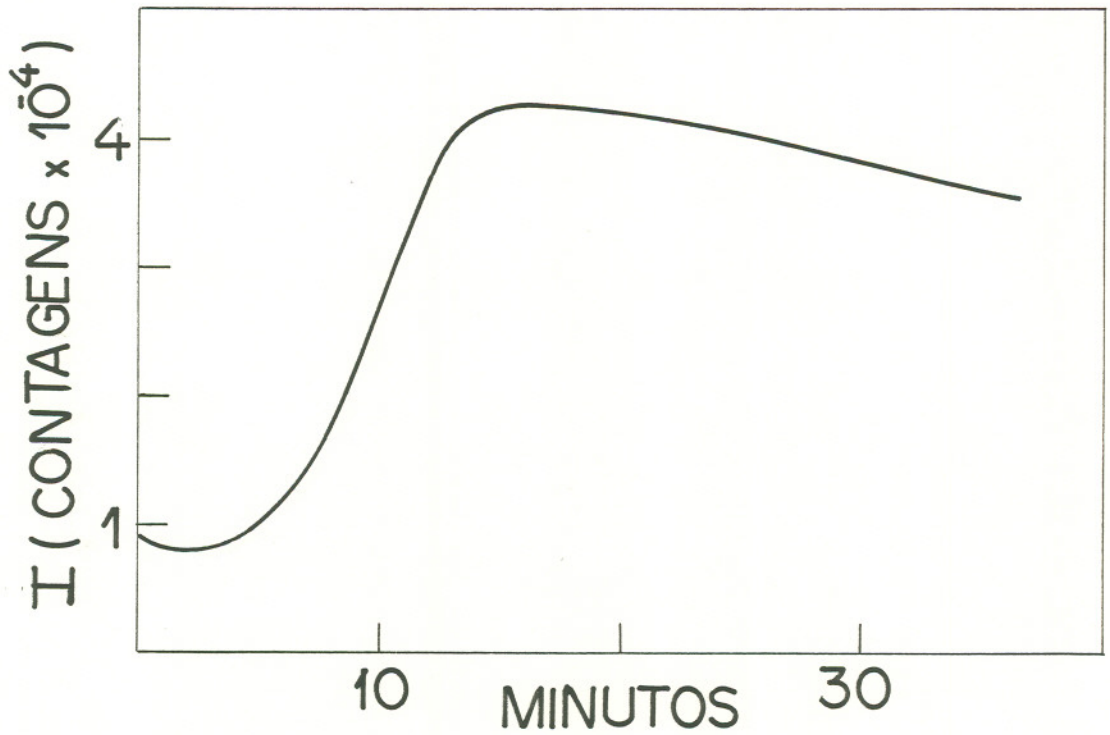



FIGURA IV.2 - Quimioluminescência microsomal promovida pelo sistema $C_3/HRP/O_2$.

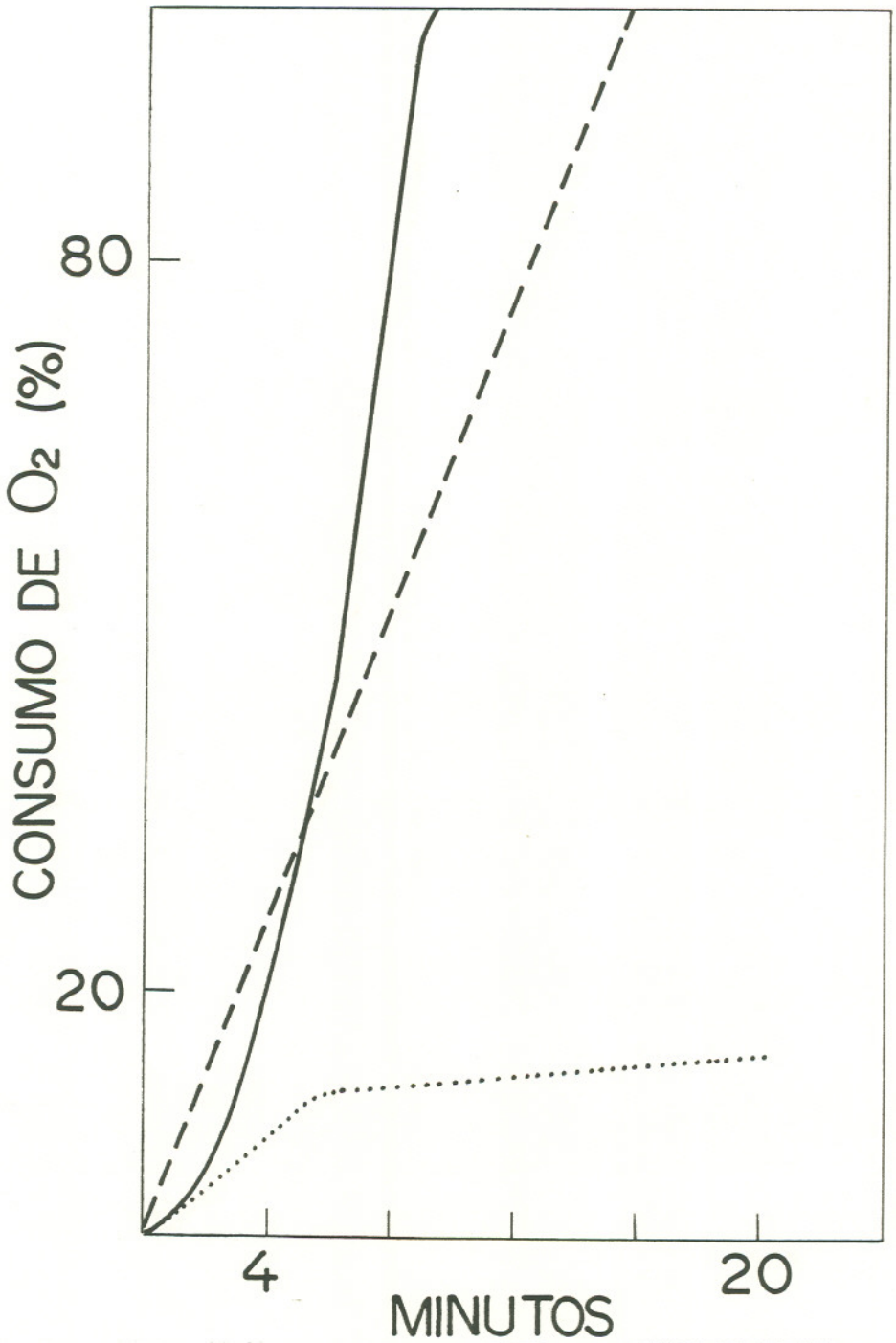



FIGURA IV.3 - Oxigênio consumindo durante a oxidação aeróbica de $C_3$ catalisada por HRP na ausência (---) e na presença (——) de microsomas (8 mg de proteína). O consumo de oxigênio por $C_3$/microsomas também é apresentado (...).

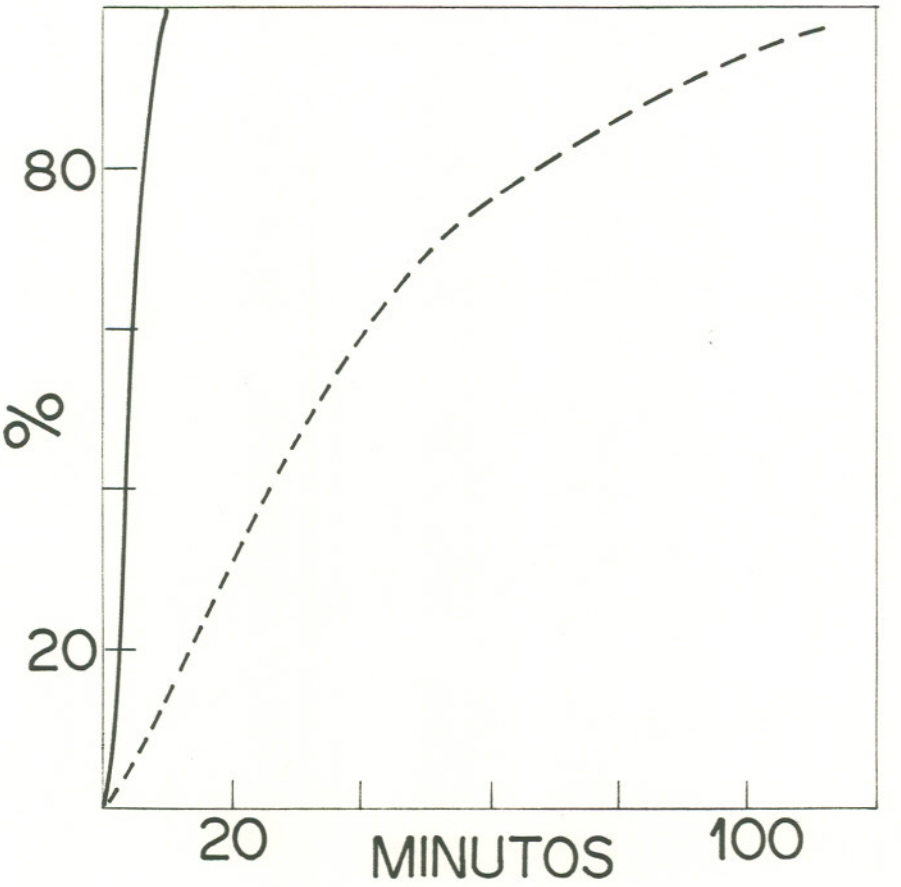



FIGURA IV.4 - Comparação entre consumo de oxigênio (—) e a emissão integrada (---) do sistema $C_3$/HRP/$O_2$/microsomas.

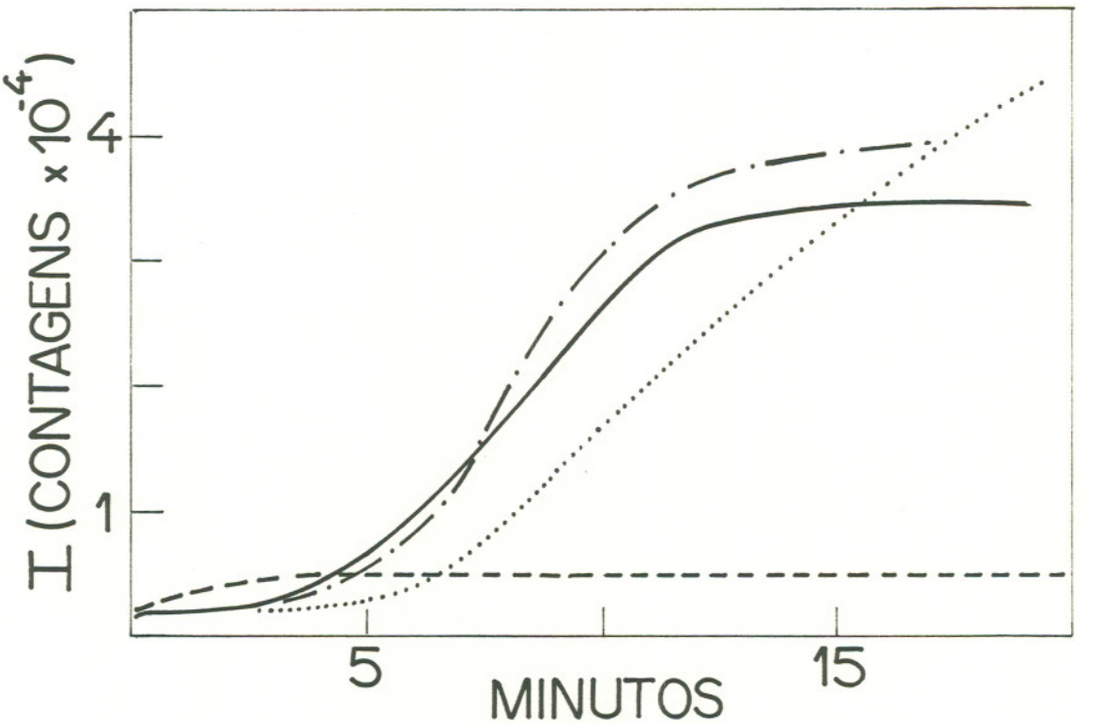



FIGURA IV.5 - Efeito da concentração (proteica) de microsomas (——, 8; -·-·-, 16; ...,24; --- 80 mg de proteína) na emissão promovida por $C_3/HRP/O_2$.

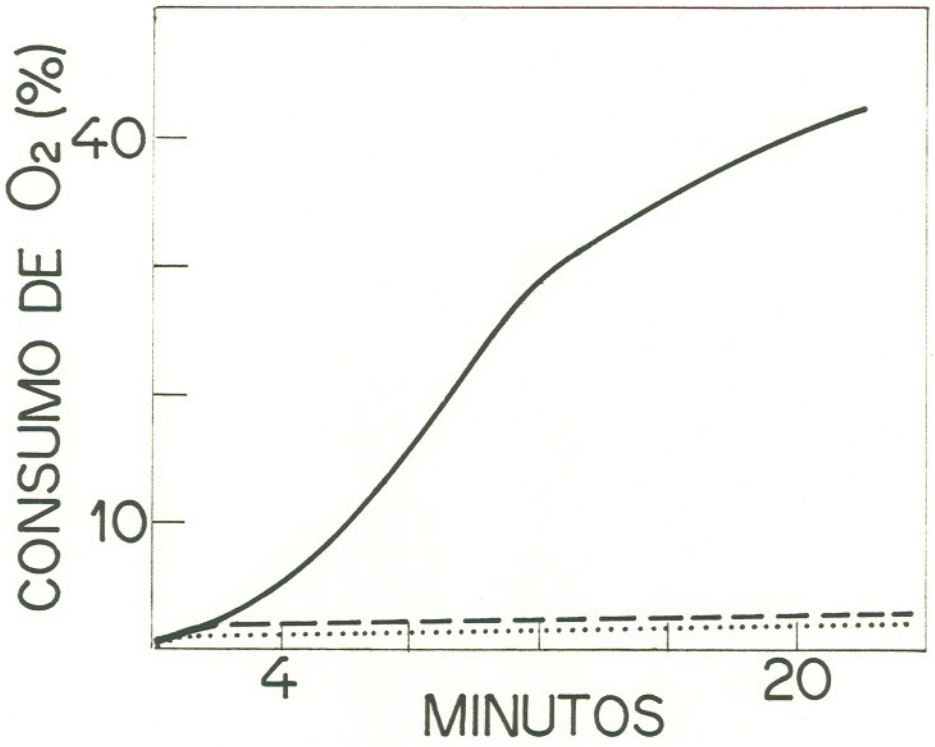



FIGURA IV.6 - Oxigênio consumido pelo sistema $C_3$/HRP/$O_2$/ em tampão Tris-HCl 0,5M pH 7,4, na ausência (---) e presença (—) de microsomas. O controle $C_3$/microsomas também é apresentado (...).

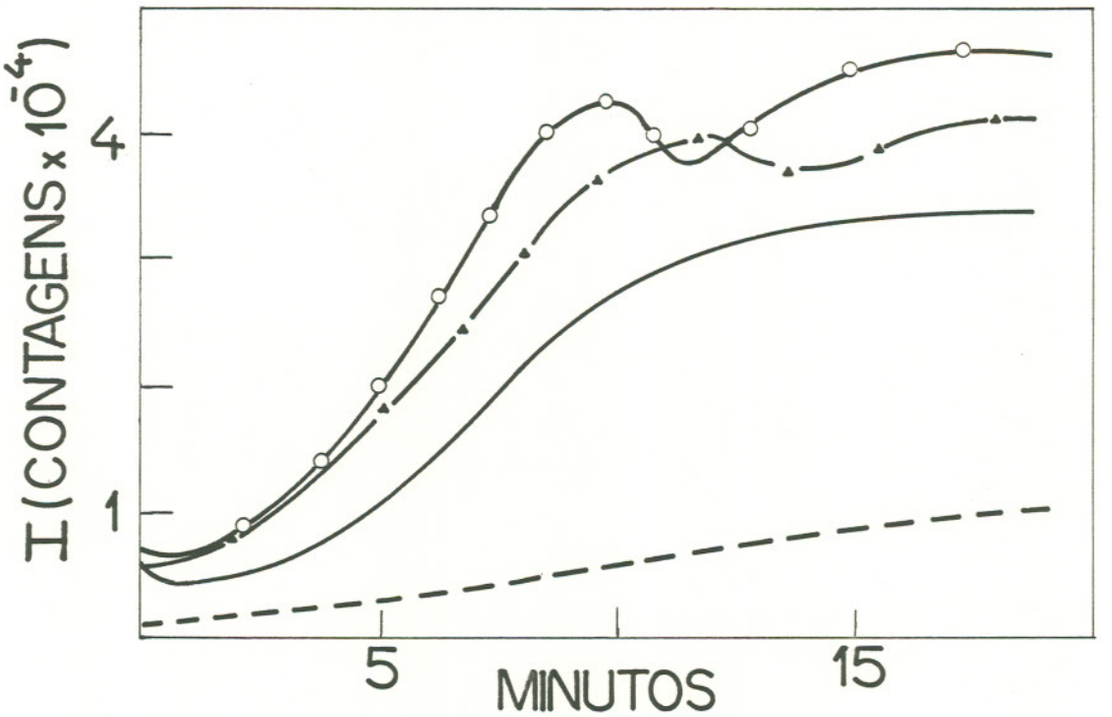



FIGURA IV.7 - Efeito do pH (tampão fosfato 0,5M, pH 6,8 ---, 7,4 ——, 7,8 —o— e 8,0 —▲—) na emissão de luz proveniente de $C_3$/HRP/$O_2$/microsomas.

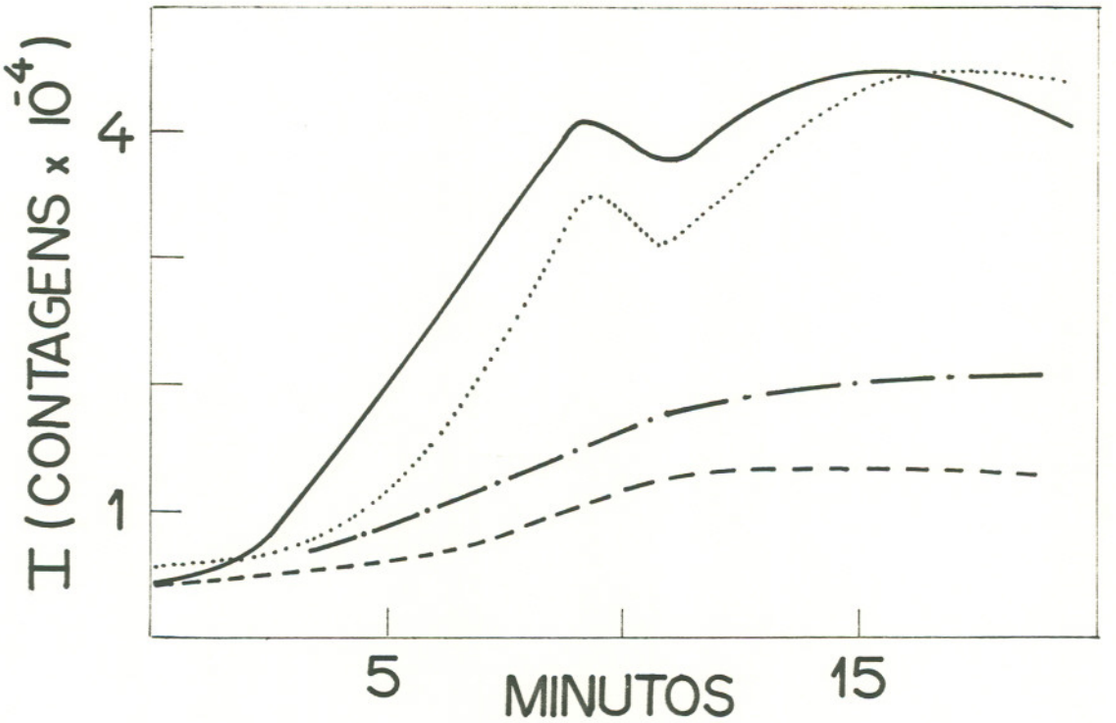



FIGURA IV.8 - Cinéticas de emissão de luz proveniente de $C_3$/HRP/$O_2$/microsomas, acompanhadas a diferentes molaridades de tampão fosfato pH 7,4 (---) 0,05; (-.-) 0,1, (—) 0,5 e (...) 1,0 M.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo



aumento significativo da emissão.

Apesar da emissão de luz ser pouco intensa ela é suficiente para se obter, com o uso de filtros, o espectro de emissão aproximado. Este é apresentado na figura IV.9. Para fins comparativos, nesta figura são incluídos também o espectro de microsomas oticamente excitados ($\lambda_{exc}$ = 400 nm) e o espectro de emissão de fibroblastos de ratos |$\lambda_{exc}$ = 488; (BENSON et al., 1979)|.

Medidas da formação de malonaldeído de microsomas expostos por 15 minutos à reação $C_3/HRP/O_2$ mostram o mesmo valor (5,6 x $10^{-10}$ moles de malonaldeído/mg de proteína microsomal) que o de microsomas não expostos e conservados em tampão.

A participação de espécies ativas de oxigênio no processo emissivo é examinada através de supressores específicos. A adição de histidina ($10^{-3}$ M), tiouréia ($10^{-5}$ - $10^{-4}$ M), SOD (100 U); ascorbato ($10^{-6}$ M) ou catalase ($10^{-7}$ M), não altera significativamente a emissão de luz. A presença do radical HO· é excluída pela existência de etanol na mistura reacional (0,5 M). A fim de obter outras evidências contrárias à participação de peróxidos, $H_2O_2$ ($10^{-6}$ - $10^{-4}$ M) e t-BuOOH (5 mM) são adicionados a microsomas. Nenhuma destas espécies promove emissão de luz detectável pela aparelhagem utilizada.

Microsomas mantidos em tampão fosfato liberam a NADH-citocromo $b_5$ redutase (DEY et al., 1981). Para verificar se a emissão é proveniente de um componente microsomal solubilizado pelo meio, foram realizados dois ex-

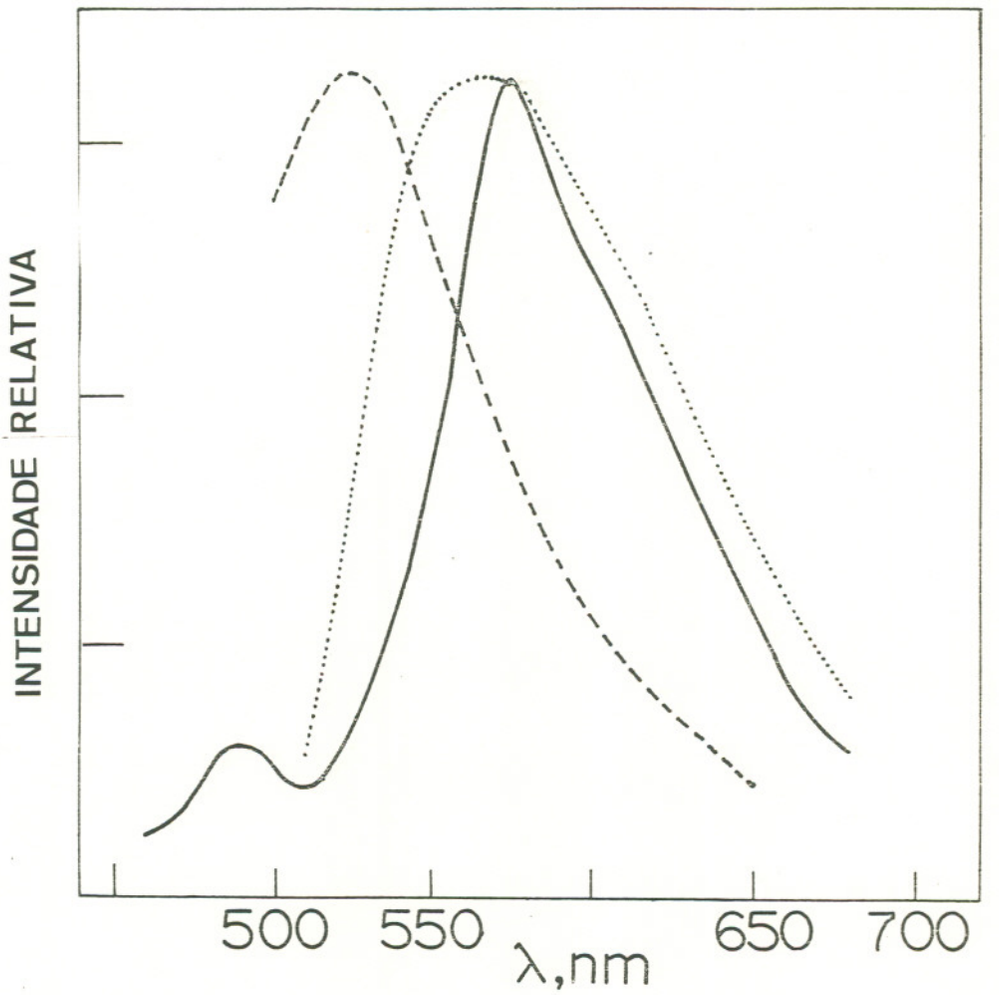



FIGURA IV.9 - Espectros de emissão da luminescência microsomal promovida por: —, exposição ao sistema $C_3/HRP/O_2$ e --- irradiação a 400 nm. O espectro da emissão de fibroblastos de ratos irradiados à 488 nm também é apresentado (...). Estes espectros foram normalizados.

perimentos. Primeiramente, manteve-se microsomas em tampão por 3 horas antes da reação $C_3/HRP/O_2$ ser iniciada. A emissão é análoga à obtida com microsomas imediatamente usados. Num outro experimento, microsomas foram mantidos em tampão por 30 minutos e então recentrifugados; a emissão desenvolvida pelo sobrenadante é muito menor do que aquela promovida pelo precipitado.

Quando microsomas são incubados com $C_3$ ou HRP, por 10 minutos e a reação em seguida é iniciada, a emissão de luz permanece praticamente a mesma. Se microsomas são adicionados após a reação $C_3/HRP/O_2$ ter consumido oxigênio, a intensidade de emissão diminui mas a cinética permanece a mesma.

O sistema também não é afetado quando reoxigenado, entretanto o esgotamento extensivo de oxigênio, obtido através da adição de glucose / glucose oxidase / catalase, leva a uma drástica diminuição da emissão (Fig. IV.10). Quimioluminescência microsomal já foi descrita em condições completamente anaeróbicas (CADENAS et al., 1983). Entretanto, não se pode averiguar se a emissão microsomal aqui observada requer oxigênio, já que este é indispensável para o sistema que a aciona ($C_3/HRP/$ $/O_2$).

A mesma cinética de emissão de luz é observada com microsomas contendo altos níveis de citocromo $P_{450}$, microsomas estes provenientes de fígados de ratos tratados com fenobarbital.

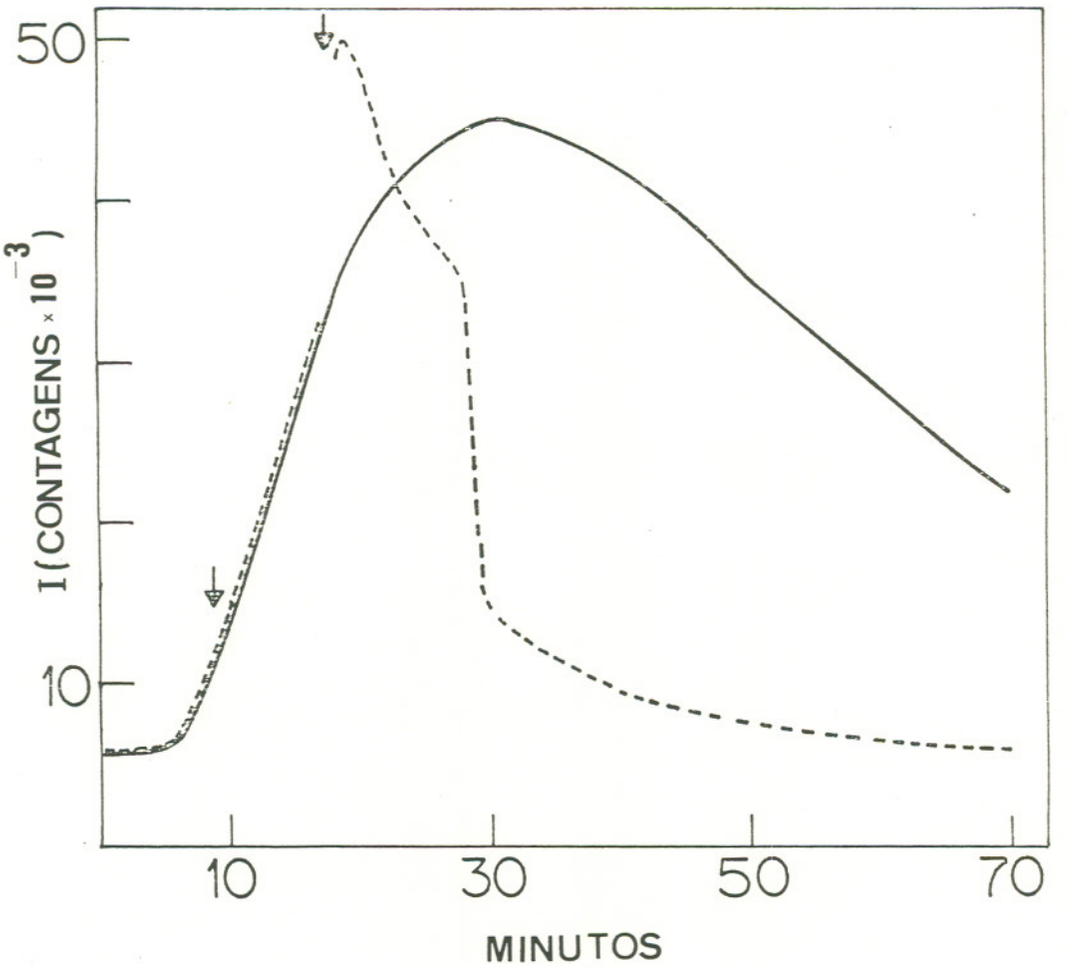



FIGURA IV.10 - Efeito do consumo extensivo de $O_2$ na emissão microsomal promovida por $C_3$/HRP/$O_2$. A primeira flecha indica o tempo onde o $O_2$ foi consumido tornando-se disponível apenas por difusão. A segunda flecha indica a adição, em experimento duplicata (---), de glucose/glucose oxidase/catalase; neste a cela foi completamente preenchida e vedada com parafilme.

Para se obter maiores informações referentes à espécie microsomal emissiva, microsomas foram tratados com tripsina e desoxicolato. O tratamento com tripsina remove 35% das proteínas totais: destas aproximadamente 50% representam proteínas ribossomais, as demais são proteínas expostas na superfície externa da membrana microsomal (De PIERRE & DALLNER, 1975). As proteínas mais atingidas por este tratamento são a NADPH-citocromo $P_{450}$ redutase, o citocromo $b_5$ e o citocromo $P_{450}$, as quais perdem, respectivamente, 88, 70 e 41% de suas atividades no precipitado obtido após recentrifugação do material tratado (De PIERRE & DALLNER, 1975). A emissão de luz derivada do precipitado é moderadamente reduzida e a do sobrenadante é muito baixa (Fig. IV.11).

Tratamento brando com desoxicolato dissocia 25% das proteínas microsomais, diminuindo drasticamente a atividade da IDPase, β-glucoronidase e esterase (De PIERRE & DALLNER, 1975). A emissão proveniente do precipitado é moderadamente maior (Fig. IV.12).

A adição de SKF-525A (um inibidor do citocromo $P_{450}$) no sistema $C_3$/HRP/$O_2$/microsomas, só diminui a emissão quando em altas concentrações (150 μM): ainda assim o efeito é pouco pronunciado. A presença de EDTA (0,1 M) também não modifica a emissão.

Para verificar se o estado reduzido dos componentes microsomais influenciaria as propriedades emissivas, adicionou-se NADPH ($10^{-3}$ M) ao sistema. Esta adição, seja ela feita inicialmente ou durante a rea-

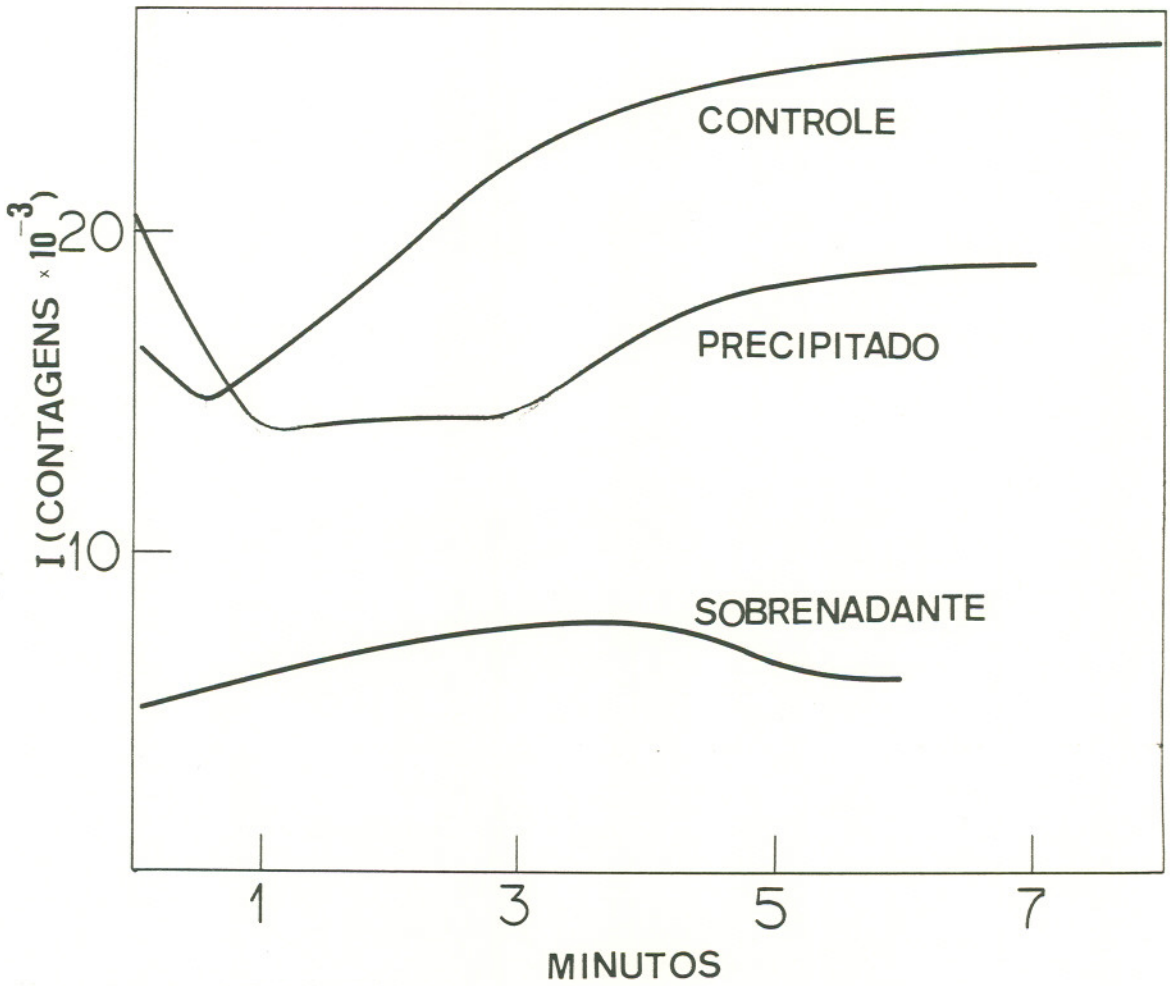



FIGURA IV.11 - Cinéticas de emissão de luz acompanhadas após o tratamento de microsomas com tripsina. Com o precipitado deste tratamento obtem-se menor emissão de luz promovida por $C_3$/HRP/$O_2$ do que a obtida com microsomas não tratados (controle). Com o sobrenadante deste tratamento também se observa, baixa porém significativa, emissão de luz.

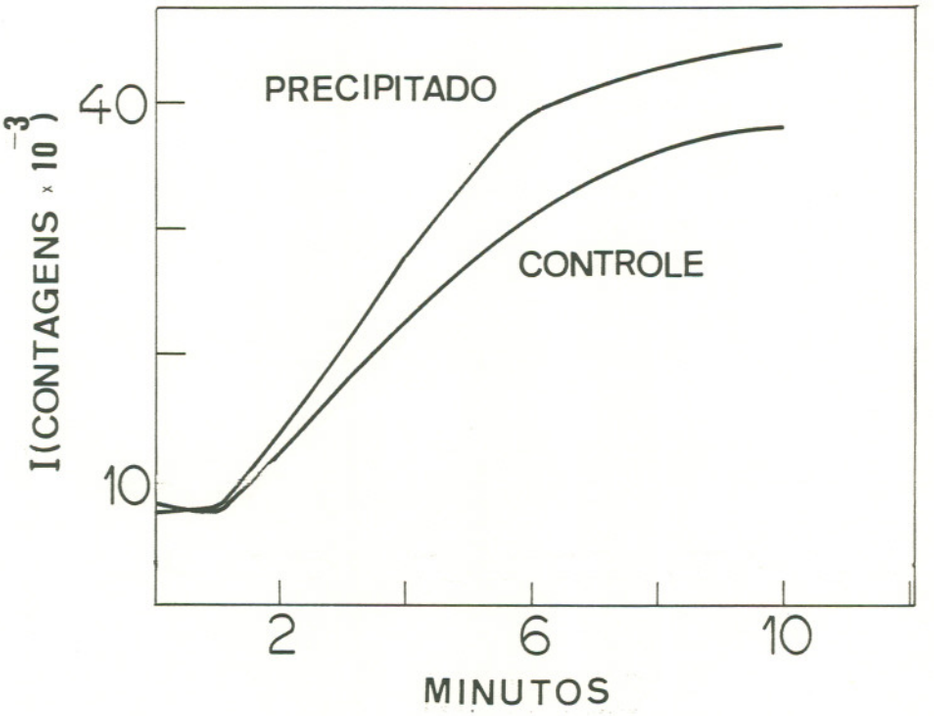



FIGURA IV.12 - Emissão de luz acompanhada após o tratamento de microsomas com desoxicolato. Com o precipitado deste tratamento obtem-se maior emissão de luz promovida por $C_3/HRP/O_2$ do que a de microsomas não tratados(controle). Com o sobrenadante deste tratamento não se obtem emissão de luz.

ção, suprime totalmente a emissão sem haver modificação no consumo de oxigênio da reação $C_3/HRP/O_2$. Entretanto, este efeito está associado à supressão de acetaldeído triplete, pois NADPH também suprime a emissão de eosina promovida por transferência de energia do acetaldeído triplete gerado na reação $C_3/HRP/O_2$, sem contudo afetar a fluorescência oticamente excitada da eosina.

CADENAS & SIES (1982) observam quimioluminescência microsomal promovida por t-BuOOH. Esta quimioluminescência provém parcialmente de carbonilos triplete, uma vez que um aumento acentuado desta emissão é observado na presença de clorofila (CADENAS et al., 1984).

Emissão de luz acompanhada com microsomas contendo clorofila(1,5μM) é apresentada na figura IV.13. Observa-se neste caso novo perfil cinético. Com a utilização de filtros de interferência constata-se que nos primeiros dois minutos esta emissão situa-se acima de 630nm (região de fluorescência de clorofila). Entretanto com o decorrer da reação há contribuição crescente de emissão abaixo de 600nm. Isto sugere que a espécie microsomal responsável pela emissão ($\lambda \sim 560$ nm, vide Figura IV.9) não transfere energia para clorofila; enquanto que a emissão inicial ($\lambda > 630$ nm) é produto da transferência direta de energia do acetaldeído triplete para clorofila (emissão análoga ao sistema $C_3/HRP/O_2$/cloroplastos, Fig. III.13B e $C_3/HRP/O_2$/clorofila/CTAB, Fig. III.10).

Para fins comparativos, butanal (80 mM) foi usado como substrato. O sistema $C_4/HRP/O_2$/microsomas a-

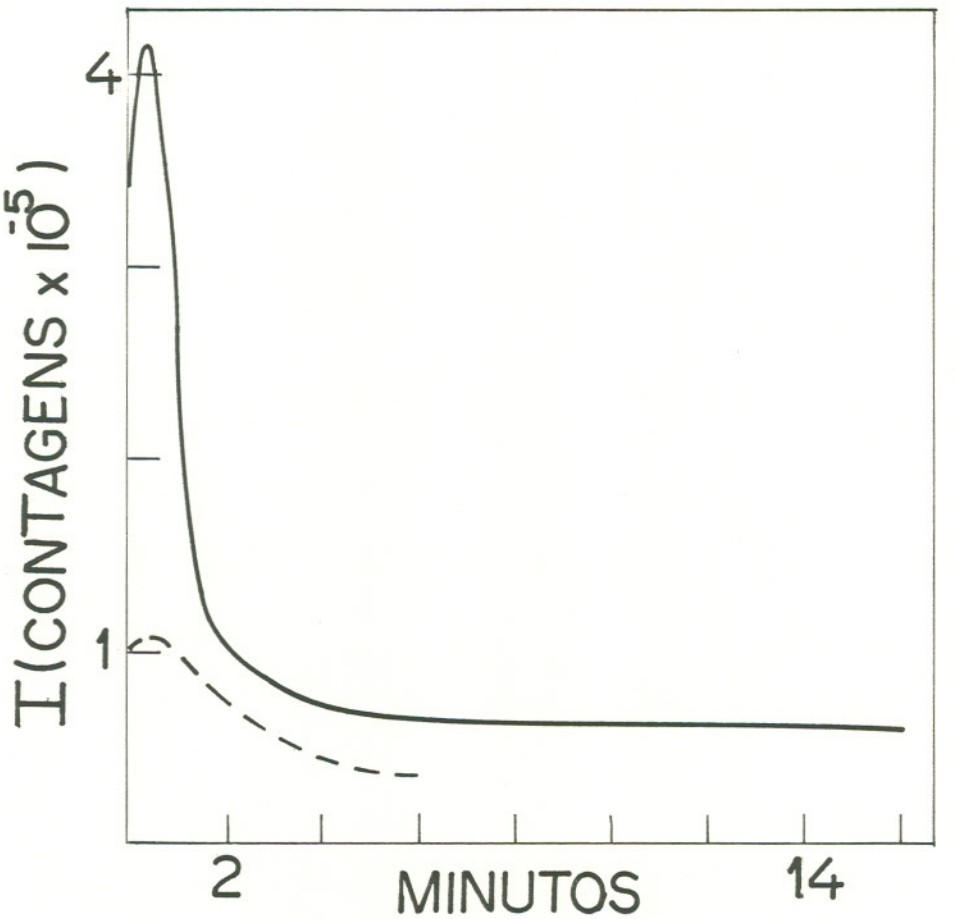



FIGURA IV.13 - Emissão de luz dos sistemas $C_3/HRP/O_2$/microsomas/clorofila (——) e $C_3/HRP/O_2$/clorofila (----).

presenta emissão um pouco mais intensa, porém de mesmas características daquela promovida por $C_3$/HRP/$O_2$/microsomas (Fig. IV.14). Redução da concentração de $C_3$ (8 mM), diminui acentuadamente a emissão de microsomas, entretanto permite a comparação entre os homólogos $C_3$-$C_6$. Como apresentado na figura IV.15, a intensidade da emissão aumenta de $C_3$ a $C_6$; contudo, consumo de oxigênio não pode ser detectado devido à baixa concentração dos aldeídos.

### IV.2.1.2 Discussão

Uma das características mais pronunciadas da emissão de luz, observada quando microsomas estão presentes na oxidação enzimática do propanal, é um período de indução ("lag time"). Este fato sugere que cromóforos microsomais não são excitados por transferência direta de energia, mas sim através de um processo induzido. Após o período de indução, o processo emissivo se mantém às custas da difusão de oxigênio.

A possibilidade de espécies intermediárias do sistema, isto é: HRP I, HRP II e o radical αperóxido, promoverem o processo quimioluminescente pode ser excluída, pois microsomas não inibem a oxidação enzimática do propanal. Além do mais HRP I (HRP + $H_2O_2$), tert-BuOOH e $H_2O_2$ não induzem emissão de microsomas detectável pela aparelhagem utilizada. Provavelmente, seja o acetaldeído triplete o responsável pela indução do processo emissivo nos microsomas. De fato NADPH (um supressor de acetaldeído triplete) suprime a emissão microsomal sem afetar a

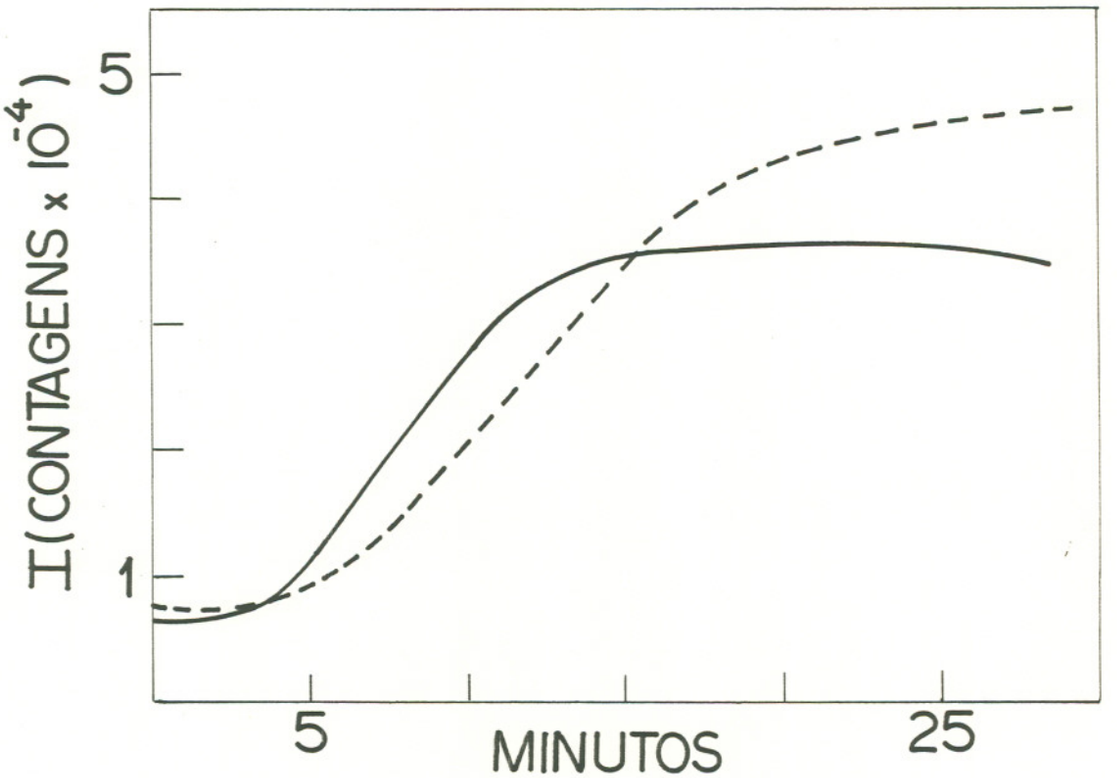



FIGURA IV.14 - Emissão de luz acompanhada durante a oxidação de $C_3$ (—) e $C_4$(---) catalisada pela HRP, na presença de microsomas.

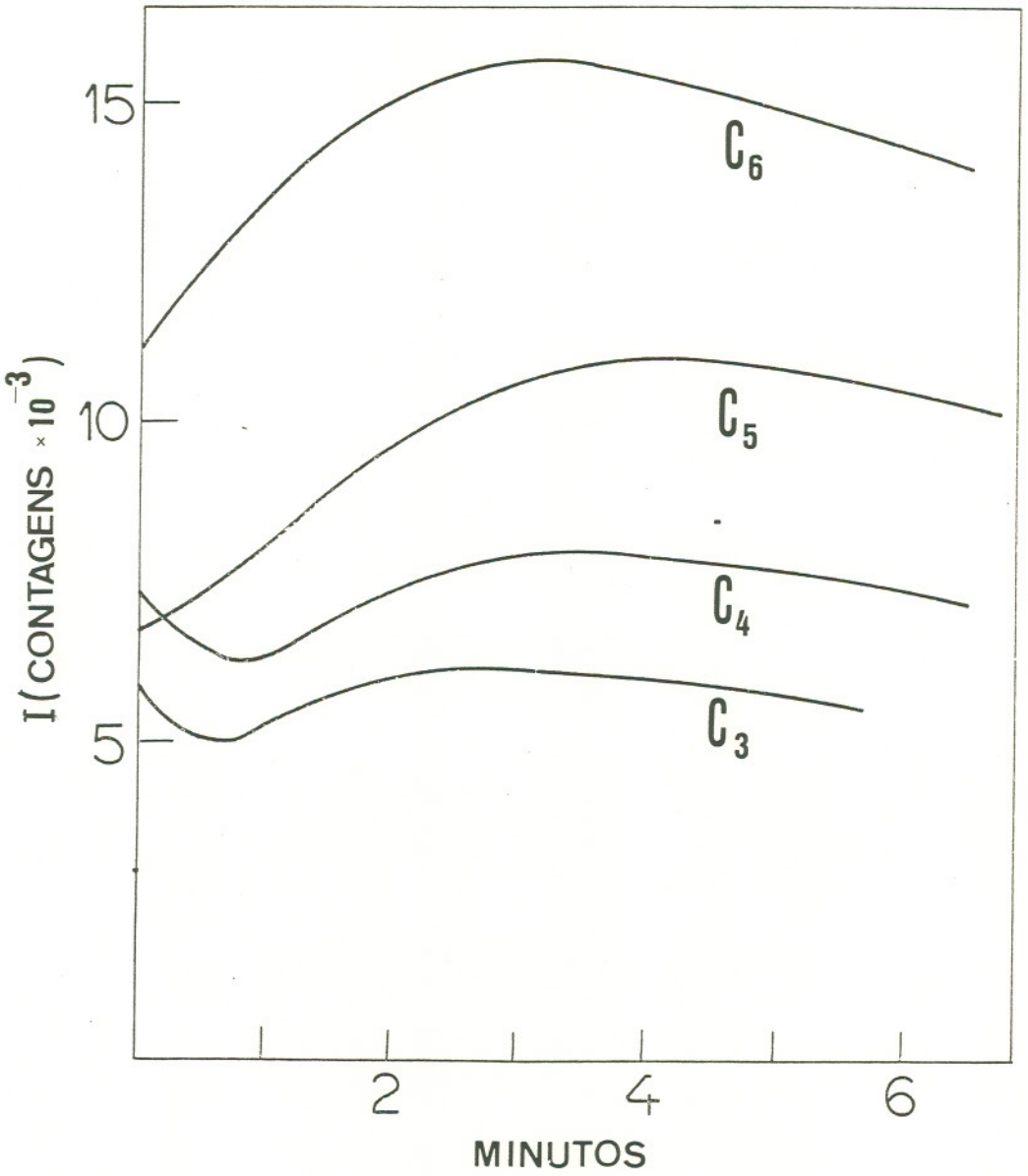



FIGURA IV.15 - Luminescência microsomal proveniente de sua exposição à oxidação aeróbica dos aldeídos $C_3$-$C_6$ (8 mM) catalisada pela HRP.

reação $C_3/HRP/O_2$. Esta suposição é reforçada pela ausência de emissão em tampão Tris, de acordo com a supressão de espécies excitadas triplete por aminas.

Qualquer que seja o processo emissivo induzido em microsomas, ele aparentemente não envolve espécies ativas de oxigênio e é diferente dos processos quimioluminescentes comumente induzidos. Assim sendo, temos que: (i) não há formação de malonaldeído; (ii) SKF não afeta a emissão; (iii) a emissão não se dá na região esperada para a emissão bimol de oxigênio singlete (NAKANO et al., 1975; CADENAS & SIES, 1983); (iv) a emissão continua quando se usam microsomas que contém clorofila.

Se bem que a espécie microsomal emissiva não tenha sido identificada, o espectro de emissão se parece com os obtidos de vários tipos celulares, tal como fibroblastos de ratos (Fig. IV.9), os quais tem sido atribuidos a flavoproteínas (BENSON et al., 1970). Evidência da participação de uma flavoproteína também é suportada pelos resultados obtidos com microsomas tratados com tripsina (Fig. IV.11).

O espectro oticamente excitado se situa a comprimentos de onda menores que a emissão de microsomas expostos a reação (Fig. IV.9). Isto sugere que o processo microsomal excita um componente que não contribua majoritariamente no espectro oticamente excitado.

### IV.2.2 Exposição a outros sistemas

A intensidade da fosforescência da acetona triplete ($\lambda_{max}$ = 435 nm), gerada na oxidação aeróbica do IBAL catalisada pelo HRP, é diminuida na presença de microsomas (8 mg de proteína) (Fig. IV.16). Esta diminuição deve-se, em grande parte, à supressão da espécie excitada por proteínas. Emissão de luz integrada e consumo de oxigênio se correlacionam no sistema IBAL/HRP/$O_2$/microsoma (Fig. IV.17). Utilizando-se filtros constata-se uma pequena diminuição, quando microsomas estão presentes, da relação: emissão acima de 300 nm / emissão acima de 500 nm. Esta diminuição não é acentuada, mas sugere que a emissão proveniente do sistema IBAL/HRP/$O_2$ / microsomas seja a soma da emissão de acetona triplete e de uma emissão proveniente de microsomas. A localização exata desta última não pode ser averiguada devido a sua baixa intensidade.

A oxidação aeróbica do IBAL, gerando acetona triplete, também pode ser catalisada pela hemina (AUGUSTO & BECHARA, 1980). Entretanto a fosforescência de acetona não é observada devido a desativação colisional da espécie excitada, gerada livremente em solução, por oxigênio. Microsomas ensaiados no sistema IBAL/hemina/$O_2$ não promovem emissão de luz.

Um processo de transferência de energia da acetona triplete gerada enzimaticamente para um cromóforo microsomal é viável.

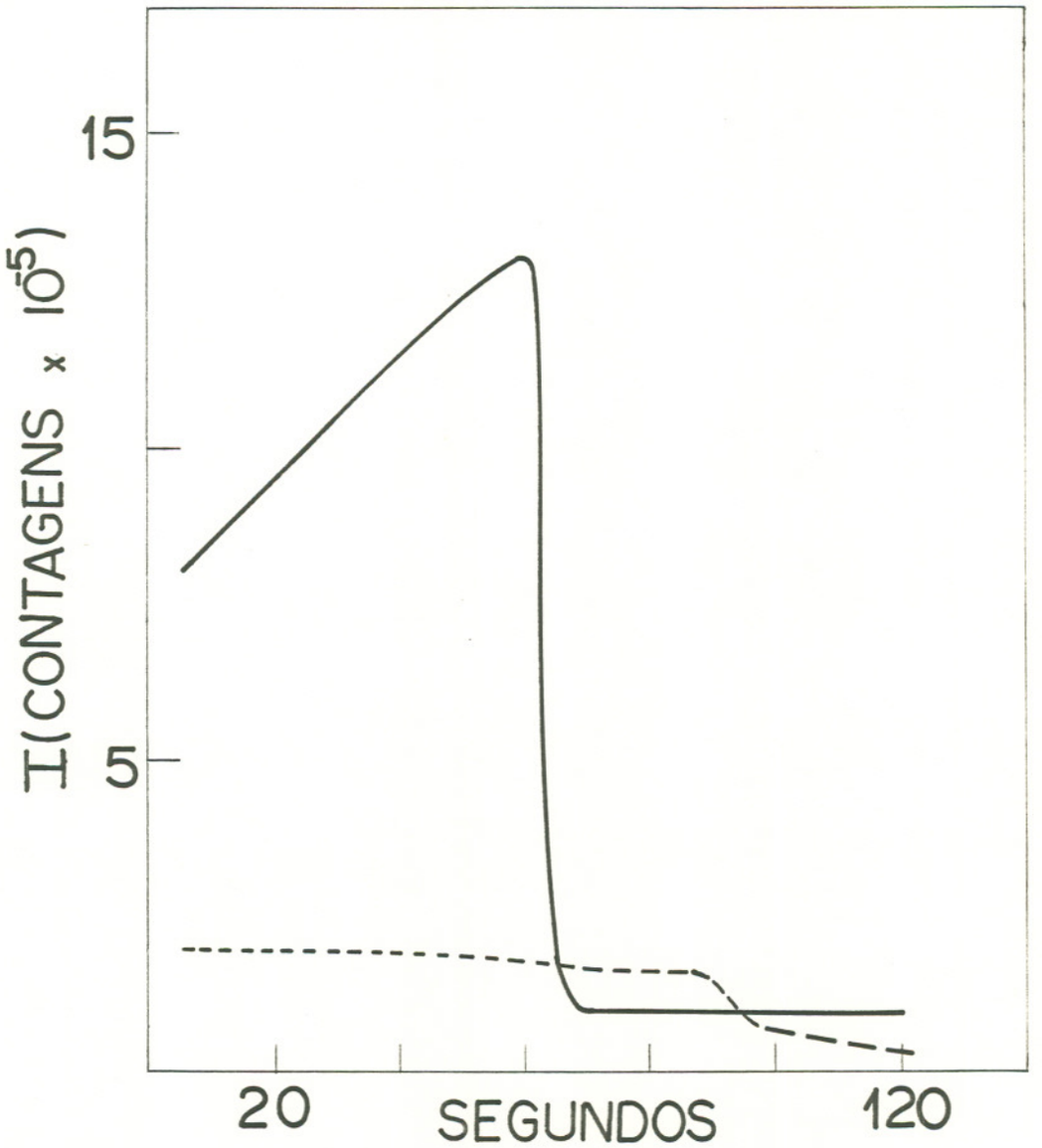



FIGURA IV.16 - Emissão de luz da reação IBAL (80 mM)/HRP (2 μM)/$O_2$ na ausência (—) e na presença (---) de microsomas (2 mg de proteína).

BIBLIOTECA
Instituto de Química
Universidade de São Paulo

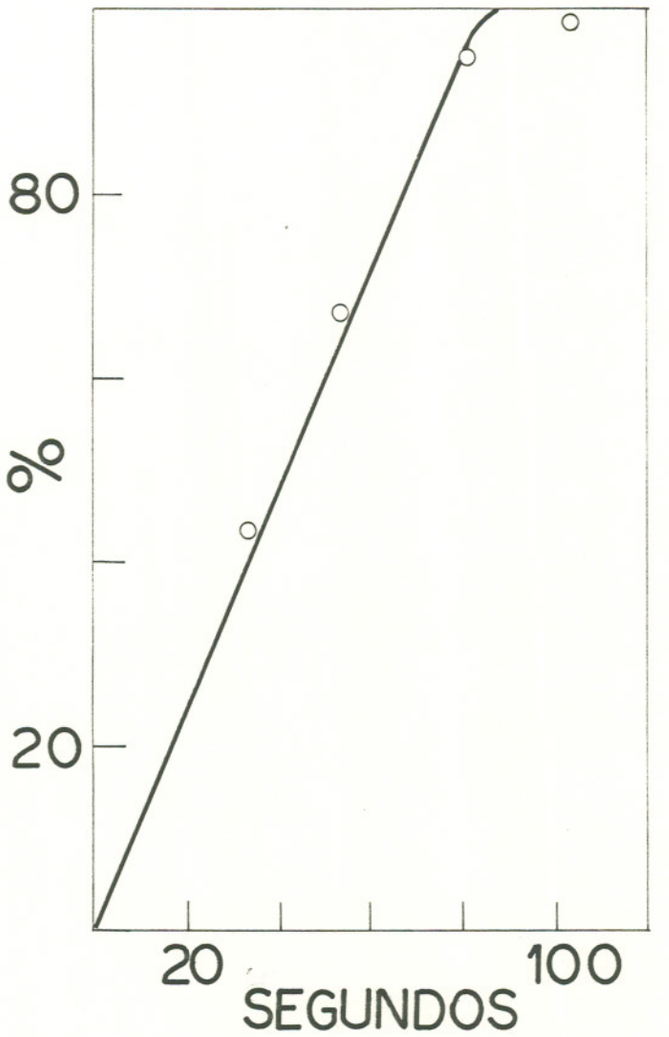



FIGURA IV.17 - Correlação entre o consumo de oxigênio (—) e emissão de luz integrada (O) da reação IBAL/HRP/$O_2$/microsomas.

A oxidação aeróbica do ácido indol-3-acético, catalisada pela HRP, gera indol-3-aldeído excitado. Este sistema apresenta emissão fraca porém nítida. Esta reação pode ser acompanhada em diferentes pHs, sendo que em meio ácido existe maior rendimento do indol-3-aldeído (MORITA et al., 1967). A adição de microsomas (2 mg de proteína) não altera a velocidade de consumo de oxigênio do sistema IAA/HRP/$O_2$ em nenhum dos meios tamponados estudados, i.é. pH 5,6 e 7,4; o oxigênio é esgotado linearmente em 90 e 140 segundos. A pH 5,6 microsomas duplicam a intensidade máxima da emissão sem alterar a cinética da reação (Fig. IV.18); a pH 7,4 a emissão se desenvolve após o esgotamento do oxigênio (Fig. IV.19). Com a utilização de filtros não é possível diferenciar a emissão do sistema IAA/HRP/$O_2$ daquela obtida quando microsomas estão presentes.

O efeito da adição de microsomas no sistema IAA/HRP/$O_2$ em quaisquer dos meios ensaiados é análogo ao obtido pela adição de cloroplastos (NASSI & CILENTO, 1983) sugerindo que pelo menos a pH 5,6 o efeito de organelas se limita a favorecer fisicamente a emissão (efeito do meio).

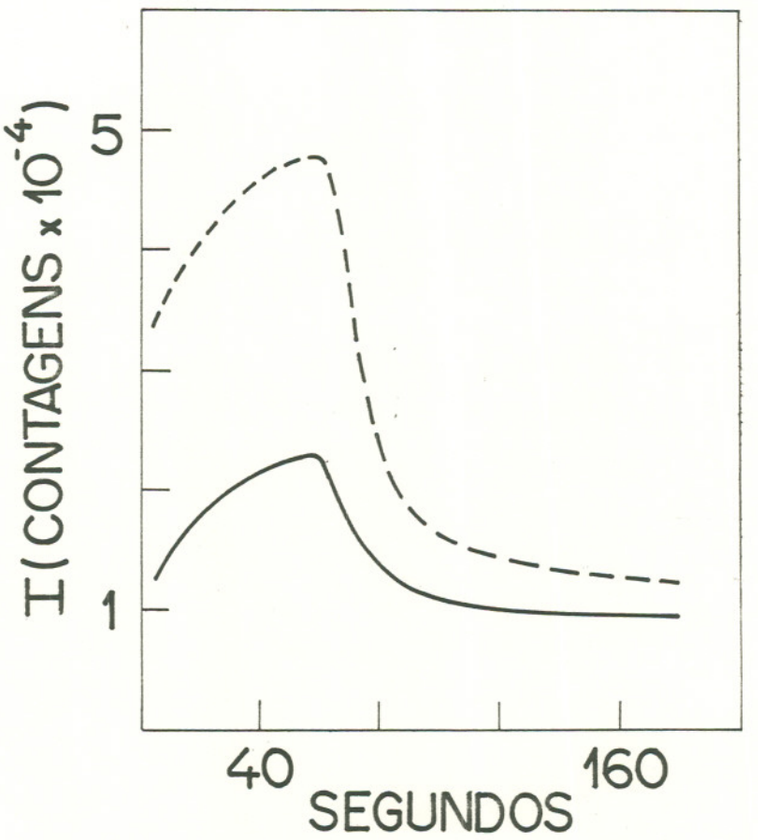



FIGURA IV.18 - Emissão de luz do sistema IAA/HRP/$O_2$ na presença (---) e ausência (——) de microsomas (2 mg de proteína). A reação é efetuada em tampão acetato 0,05 M pH 5,6.

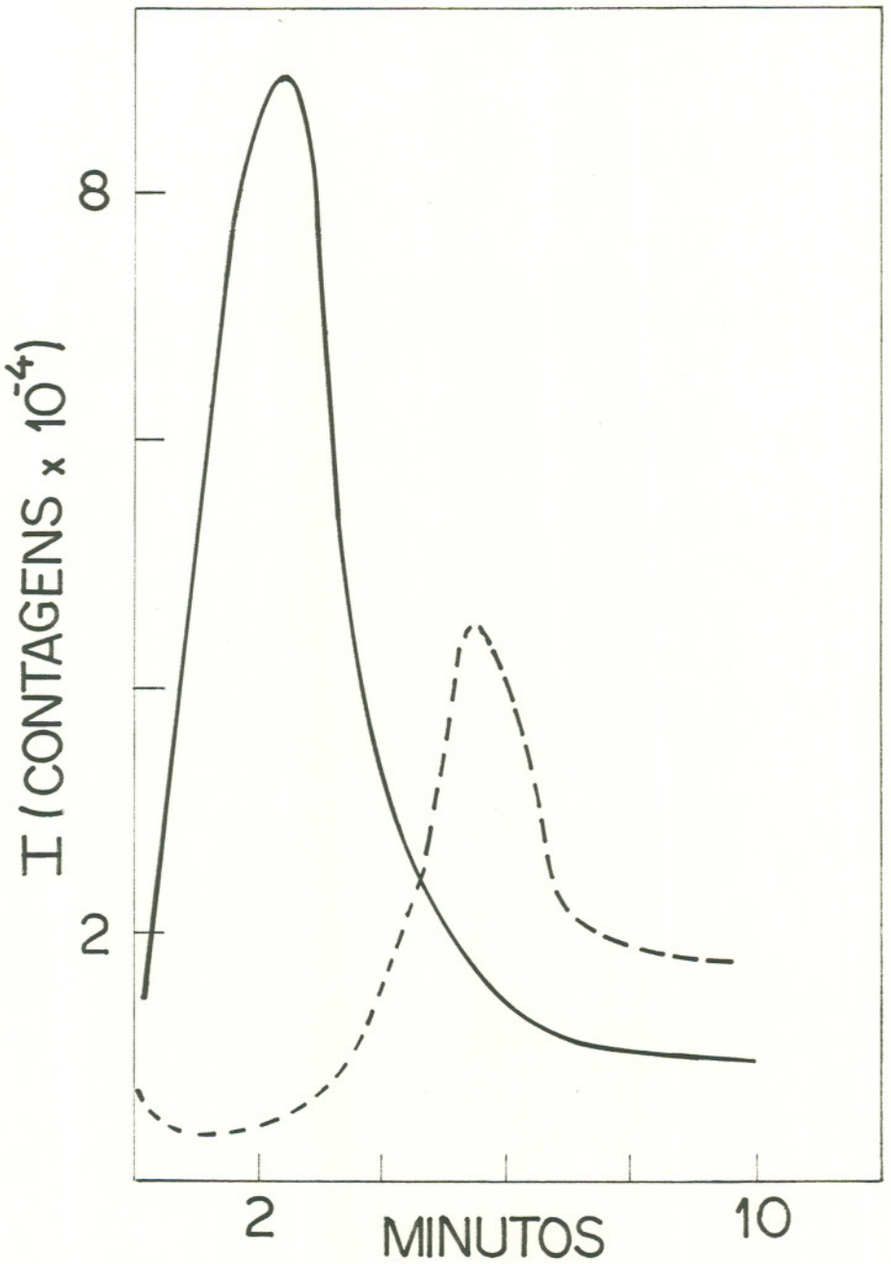



FIGURA IV.19 - Emissão de luz do sistema IAA/HRP/$O_2$ na presença e(---) e na ausência (——) de microsomas (2 mg de proteína). A reação é efetuada em tampão fosfato 0,5M, pH 7,4.

# V. CONCLUSÕES

Este trabalho extende a observação de que aldeídos são geradores de energia eletrônica triplete e que esta energia pode ser transferida para estruturas biológicas complexas como cloroplastos e microsomas. Particularmente em microsomas constata-se um novo e importante dado que é a indução de um processo quimioluminescente diferente dos já descritos (KOOSTER & SLEE, 1980; SHAH *et al.*, 1983). Neste caso a quimioluminescência é produto da reação ou transferência de energia de uma espécie eletronicamente excitada gerada enzimaticamente num processo em que não há a formação de malonaldeído. Estes resultados podem explicar o fato de que em determinados casos a quimioluminescência microsomal induzida não se relaciona à formação de malonaldeído (CADENAS *et al.*, 1984).

Quanto a cloroplastos a luminescência pode ser originária da transferência de energia direta para clorofila e/ou de um processo induzido. É interessante a conecção destes resultados com fenômenos relacionados à germinação, uma vez que luminescência espontânea na região espectral do vermelho é observada na germinação de sementes de trigo contendo clorofila (SLAWINSKI *et al.*, 1981).

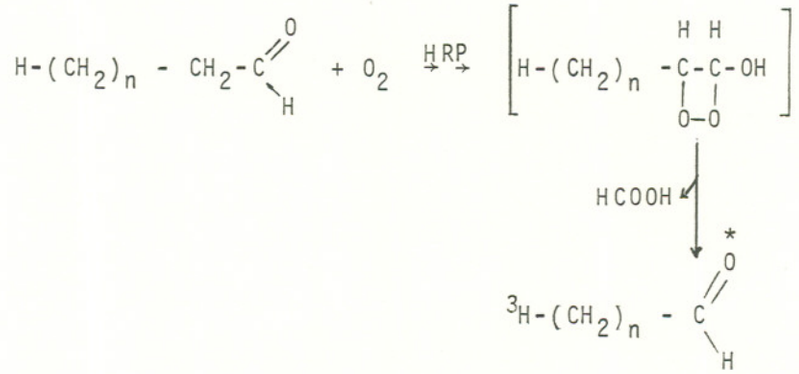
A hipótese de que a quimiobioluminescência pode ser derivada de fontes de energia triplete é reforçada por este trabalho.

# VI. SUMÁRIO

Peroxidase de rábano ("horseradish peroxidase - HRP), atuando como uma oxidase frente a substratos apropriados, catalisa a formação de espécies eletronicamente excitadas triplete. Os produtos obtidos são os esperados da clivagem de um intermediário 1,2-dioxetânico hipotético.

Espécies tripletes geradas enzimaticamente são capazes de transferir energia a vários aceptores incluindo macromoléculas tais como: fitocromo, RNA, DNA e proteínas, além de organelas como cloroplastos.

Acompanhamos a oxidação aeróbica de aldeídos alifáticos lineares ($C_2$-$C_6$) catalisada pela HRP; esta reação gera o aldeído inferior ($C_{n-1}$) no estado excitado triplete e ácido fórmico segundo o mecanismo:




Dois aspectos principais são abordados neste tranalho: (i) análise dos resultados em base

ao comprimento da cadeia carbônica do substrato ($C_2 \rightarrow C_6$) e (ii) a procura de emissões sensitizadas em estruturas biológicas (cloroplastos e microsomas).

- Oxidação aeróbica dos aldeídos alifáticos lineares $C_2$-$C_6$ catalisada pela HRP

Corantes xantênicos e clorofila a solubilizada em micelas foram utilizados para monitorar estados eletronicamente excitadas geradas pela oxidação aeróbica dos aldeídos alifáticos lineares catalisada pela HRP. Quando eosina é o aceptor fluorescente, máxima emissão ocorre com butanal. Este resultado é discutido em conecção com o fato de que uma série de efeitos biológicos de ácidos alifáticos lineares são máximos com o ácido butírico. A possível participação de estados excitados no processo que desencadeia as atividades biológicas deste ácido é sugerida.

- Transferência de energia para cloroplastos

Aldeídos alifáticos lineares ($C_2$-$C_6$) promovem emissão em cloroplastos na região de fluorescência de clorofila. Esta habilidade deve provavelmente constituir um caso de "luminescência escura" ("dark luminescence"). Se HRP estiver presente o aldeído ($C_n$) é oxidado ao homólogo inferior ($C_{n-1}$) no estado triplete, o qual sensitiza direta e/ou indiretamente a fluorescência de clorofila. Clorofila excitada por este processo

é incapaz de reduzir um aceptor de Hill.

- Quimioluminescência de microsomas expostos à oxidação aeróbica de aldeídos lineares catalisada pela HRP

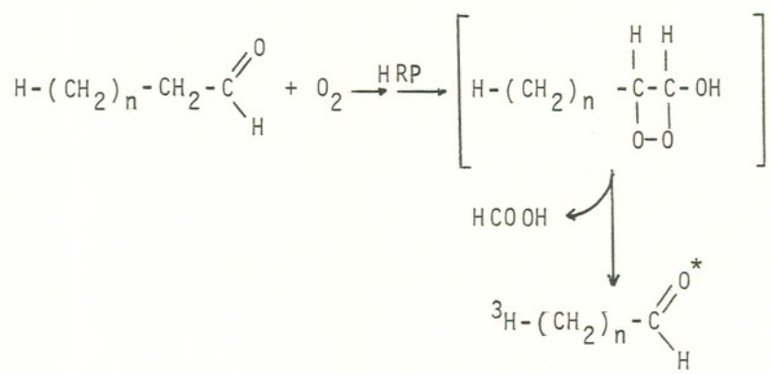
Microsomas expostos ao sistema propanal/HRP/$O_2$ desenvolvem luminescência de baixa intensidade. Este processo emissivo é distinto daquele originário durante a peroxidação de lipídeos uma vez que: (i) a emissão se situa próxima a 560 nm e não na região espectral do vermelho (como esperado para a emissão bimol de oxigênio singlete) e (ii) não há formação de malonaldeído. Acetaldeído triplete parecer ser a espécie responsável pela indução deste processo através da excitação de algum componente microsomal, possivelmente uma flavoproteína.

ABSTRACT

Horseradish peroxidase (HRP), acting as an oxidase upon appropriate substrates, promotes the formation of electronically excite triplet species. The products obtained are those which would be expected from the cleavage of a hypothetical 1,2 dioxetane intermediate.

Enzyme-generated triplet species are able to transfer energy to several acceptors, including macromolecules such as phytochrome, RNA, DNA and proteins, as well as to organeles such as chloroplasts.

In the present study, we investigated the HRP-catalyzed aerobic oxidation of linear aliphatic aldehydes ($C_2$ to $C_6$), a reaction which generates the next lower aldehyde in the triplet state and formic acid:




Two main aspects were emphasized in this work: (i) the dependence of the results of the length of the carbonic chain of the substrate ($C_2$ to $C_6$) and (ii)

the possibility of inducing sensitized emission from biological structures (chloroplasts and microsomes).

## HRP-catalyzed aerobic oxidation of aliphatic aldehydes

Xanthene dyes and micelle-solubilized chlorophyll-a were used to monitor the electronically excited species generated by the peroxidase-catalyzed aerobic oxidation of $C_2$-$C_6$ linear aldehydes. Maximal emission occurs with butanal as substrate and eosine as the fluorescent acceptor. This result is discussed in connection with the fact that the multiple biological effects of short-chain aliphatic acids are maximal for butyric acid. Our observations strengthen the case for a possible role of excited state formation in the biological activity of butyrate.

## Energy transfer to chloroplasts

Linear aldehydes trigger red emission from chloroplasts. If horseradish peroxidase is also present, the aldehyde is oxidized to the next lower homolog in the triplet state, which in turn sensitizes (directly or indirectly) chlorophyll fluorescence. This phenomenon probably is a case of "dark luminescence"; the chlorophyll excited by this process is unable to reduce a Hill acceptor.

## Microsomal luminescence elicited by enzymatic systems that generate triplet species

Microsomes exposed to the propanal/HRP/$O_2$ system develop a weak luminescence. The underlying process is distinct from that occuring during lipid peroxidation because the emission intensity peaks at around 560 nm rather than in the red (as would be expected for bimol singlet oxygen emission) and no malonaldehyde is formed. Triplet acetaldehyde appears to be responsible for initiating the process, which in turn leads to excitation of a component of microsomes, possibly a flavoprotein.

# VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam, W.; K. Zinner, A. Krebs e H. Schmalstieg (1981) Tetrahedron Lett. 22, 4567-4570.

Allen, R.C. (1982) em "Chemical and Biological Generation of Excited States" (Adam, W. e G. Cilento, eds.) pp.309-344. Academic Press, New York.

Anctil, M. (1979) Photochem. Photobiol. 30, 777-780.

Anderson, W. (1947) Nature (London) 160, 892-895.

Ash, O.K., W.S. Zaugg e L.P. Vernon (1961) Acta Chem.Scand. 15, 1629-1638.

Asada, K., M. Takahashi, Y. Nakano e S. Shimada (1983) em "Oxygenases and Oxygen Metabolism" (Nazaki,M., S. Yamamoto, Y. Ishimura, M.J. Coon e L.Ernster,eds.) pp. 255-266. Academic Press, New York.

Augusto, O. e G. Cilento (1979) Photochem. Photobiol. 30, 191-193.

Augusto, O. e E.J.H. Bechara (1980) Biochim. Biophys.Acta 631, 203-209.

Augusto, O., G. Cilento, J. Jung e P.S. Song (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 963-969.

Aust, S.D. e T.C. Pederson (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 789-795.

Bechara, E.J.H., A.L. Baumstark e T. Wilson (1976). J. Am. Chem. Soc. 98, 4648-4649.

Bechara, E.J.H., O.M.M. Faria Oliveira, N. Durãn, R.C. Baptista e G. Cilento (1979) Photochem. Photobiol. 30,101-110.

Bell,P.A. e C.N.Jones (1982) Biochem.Biophys.Res.Commun.104, 1202-1208.

Bennet, R.G., R.P. Schwenber e R. Kellog (1964) J. Chem. Phys. 41, 3040-3041.

Benson, R.C., R.A. Meyer, M.E. Zamba e G.M. McKhann (1979) J. Histochem. Cytochem. 27, 44-48.

Bishop, J.E. e A.K. Hajra (1981) J. Biol. Chem. 256, 9542-9550.

Bjorn, L.O. e B. Sigfridson (1971) Physiol. Plant 25, 308-315.

Boardman, N.K., S.W. Thorne e J.M. Anderson (1966). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 586-593.

Boh, E.E., W.H. Baricos, C. Bernofsky e R.H. Steele (1982) J. Bioenerg. Biomembr. 14, 115-133.

Brunetti, I.L., E.J.H.Bechara, G.Cilento, e E.H. White (1982) Photochem. Photobiol. 36, 245-249.

Brunetti, I.L., G. Cilento e L. Nassi (1983) Photochem. Photobiol. 38, 551-519.

Buege,J.A. e S.D. Aust (1978) em "Methods in Enzymologoy", vol. LII (Fleischer, S. e L. Packer, eds.) pp. 302-310. Academic Press, New York.

Cadenas, E. e H. Sies (1982) Eur. J. Biochem. 124,349-356.

Cadenas, E. e H. Sies (1983) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 519-528.

Cadenas, E., H. Wefer e H. Sies (1981a) Eur. J.Biochem.119, 531-536.

Cadenas, E., A.I. Varsavsky, A. Boveris e B. Chance (1981b) Biochem. J. 198, 645-654.

Cadenas,E., H. Sies, H. Graf e V. Ullrich (1983) Eur. J. Biochem. 130, 117-121.

Cadenas, E., H. Sies, A. Campa e G. Cilento (1984) Photochem. Photobiol, no prelo.

Cilento G. (1965) Photochem. Photobiol. 4, 1243-1247.

Cilento,G. (1973) Q. Rev. Biophys. 6, 485-501.

Cilento,G. (1980a) Acc. Chem. Res. 13, 225-230.

Cilento,G. (1980b) Photochem. Photobiol. Rev. 5,199-228.

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

Chance, B., H. Sies, A. Boveris (1979) Physiol. Rev. 59, 527-605.

Chandross,E.A. e F.I. Sonntag (1964) J. Am. Chem. Soc. 86, 3179-3180.

Clark, D.P. e J. E. Cronan Jr. (1980) J. Bacteriol. 144, 179-184.

Cockburn,W., D.A. Walker e C.S. Baldry (1968) Biochem.J. 107, 89-95.

Coney,A.H. (1967) Pharmacol. Rev. 19, 317-366.

Cook,J.S. (1967) Photochem. Photobiol. 6, 97-101.

Cousens,L.S., D. Gallwitz e B.M. Alberts (1979) J. Biol. Chem. 254, 1716-1723.

Dallinger,R.F., W.R. Woodraff e M.A.J. Rodgers (1981) Photochem. Photobiol. 33, 275-277.

Dallner,G. e L. Ernster (1968) J. Histochem. Cytochem. 16, 611-632.

Day,J.I.E. e H. Goldfine (1978) Arch. Biochem. Biophys. 190, 322-331.

De Mello,M.P., S.M. De Toledo, M. Haun, G.Cilento e N. Durān (1980) Biochemistry 19, 5270-5275.

De Mello,M.P. S.M. De Toledo, H. Aoyama, H.K. Sakar, G. Cilento e N. Durān (1982) Photochem. Photobiol. 36, 21-24.

De Pierre, J.W. e G. Dallner (1975) Biochim. Biophys. Acta 415, 411-472.

De Pooter, H.L., P.J. Dirinck, G.A. Willaert e N.M. Schamp (1981) Phytochemistry 20, 2135-2138.

Dexter, D.L. (1953) J. Chem. Phys. 21, 836-850.

Deutsch, S.I., N.K. Ghosh e R.C. Cox (1977) Biochim. Biophys. Acta 499, 382-391.

Dey,A.C., S.Rahal, R.L.Rimsay e I.R.Senciall (1981) Analytical Biochemistry 110, 373-379.

Dunford, H.B., W.J.Baader, C.Bohne e G.Cilento (1984a) Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 28-32.

Dunford, H.B., W.J.Baader, C.Bohne e G.Cilento (1984b) submetido.

Durān, N., O.M.M.Faria Oliveira, M.Haun e G.Cilento (1977a) J. Chem. Soc. Chem. Commun. 13, 442-443.

Durān, N., K. Zinner, C.C.C. Vidigal e G. Cilento (1977b) Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 1146-1153.

Durān,N. e G.Cilento (1980) Photochem.Photobiol.32, 113-116.

Durān,N., M.Haun, S.M. De Toledo, G.Cilento e E.Silva(1983) Photochem. Photobiol. 37, 247-250.

Esterbauer,H.(1982) em "Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer"(Mc Brien, D.C.M. e T.F.Slater,eds.),pp.101-128, Academic Press, New York.

Estabrook, R.W. (1978) em "Methods in Enzymology" (Fleischer S. e L. Packer, eds.) vol. LII, pp. 43-47. Academic Press, New York.

Faljoni, A., M.Haun, M.E. Hoffmann, R.Meneghini, N. Durān e G. Cilento (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80,490-495.

Faria de Oliveira, O.M.M., M.Haun, N. Durān, P.J.O'Brien, C.R. O'Brien, E.J.H. Bechara e G. Cilento (1978) J.Biol. Chem. 253, 4707-4712.

Fong, K.K., P.B. McCay, J.E. Poyer, B.B. Keele, H. Misra (1973) J. Biol. Chem. 248, 7792-7797.

Förster, T. (1959) Discuss. Faraday Soc. 27, 7-17-

Gallardo, H., L.A.Guillo, N. Durán e G. Cilento (1984) Biochim. Biophys. Acta, no prelo.

Gunsten, H. e E.F. Ullman (1970) Chem. Commun. 28-32.

Hagopian, H.K., M.G. Riggs, L.A. Swartz e V. M. Ingram (1977) Cell 12, 855-860.

Hart, R.C. e M.J. Cormier (1979) Photochem. Photobiol. 29, 209-215.

Hastings, J.W. (1968) Annu. Rev. Biochem. 37, 597-630.

Hastings, J.W. e T. Wilson (1976) Photochem. Photobiol. 23, 461-473.

Haun, M., N. Durán e G. Cilento (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 779-784.

Haun, M., N. Durán, O. Augusto e G. Cilento (1980) Arch. Biochem. Biophys. 200, 245-252.

Henry, J.P. e A.M. Michelson (1978a) Photochem. Photobiol. 27, 855-858.

Henry, J.P. e A.M. Michelson (1978b) Photochem. Photobiol. 28, 293-310.

Henry, E.W., M.N.O'Connor, S.M. Shank e J.M. Demorrow (1981) Photobiochem. Photobiophys. 3, 145-151.

Hercules, D.M. (1969) Acc. Chem. Res. 2, 301-307.

Inaba, H., Y. Shimizu, Y. Tsuji e A. Yamagishi (1979) Photochem. Photobiol. 30, 169-175.

Itaya, K., M. Kawai e S.Toshima (1976) Chem. Phys. Lett. 42, 179-183.

Jennings, R.C., F.M. Garloschi e G. Forti (1980) FEBS Lett. 115, 39-42.

Jensen, N.M., R. Wilbrandt e P.B. Pagsberg (1980) Photochem. Photobiol. 32, 719-725.

Johnson, R.C. e J.R. Gilbertson (1972) J. Biol. Chem. 247, 6991-6998.

Kenten, R.H. (1953) Biochem. J. 55, 350-360.

King, M.M., E.K. Lai e P.D. McCay (1975) J. Biol. Chem. 250, 6496-6502.

Kopecky, K.R. e C. Munford (1969) Can. J. Chem. 47,709-711.

Koster, J.F. e R.G. Slee (1980) Biochim. Biophys. Acta 620, 489-499.

Krasnovsky, A.A. (1982) Photochem. Photobiol. 36, 733-741.

Krasnovsky, A.A., Y.V. Kavalev e E. Lehoski (1981) Dokl. Akad. Nauk SSSR 256, 726-730.

Kruh, J. (1982) Mol. Cell. Biochem. 42, 65-82.

Lamola, A.A. (1969) Tech. Org. Chem. XIV, 17-132.

Lamola, A.A. e N.J. Turro (1969) em "Energy transfer and Organic Photochemistry" (Leermakers, P.A. e A. Weissberger, eds.) Interscience Publisher, New York.

Lamola, A.A. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 43,893-898.

Lavergne, J. e A.L. Étienne (1980) Biochim. Biophys. Acta 593, 136-148.

Lavorel, J. (1980) Biochim. Biophys. Acta 590, 385-399.

Lavorel, J., J. Laverge e A-L. Étienne (1982) Photobiochem. Photobiophys. 3, 287-314.

Lay, C.-S. e L.H. Piette (1977) Biochem.Biophys.Res.Commun. 78, 51-59.

Leder, A. e P. Leder (1975) Cell 5, 319-322.

Lee, C.-S. e T. Wilson (1973) em "Chemiluminescence and Bioluminescence" (Cormier, M.J., D.M. Hercules e J. Lee,eds.), pp.265-283, Plenum Press, New York.

Lippman, R.D. (1980) Exp. Gerontol. 15, 339-351.

Lloyd, D., A. Boveris, R. Reiter, M. Filipkowski e B.Chance (1979) Biochem. J. 184, 149-156.

Malinin, G.I. e P.S. Ebert (1980) FEBS Lett 109, 264-266.

Martin, R.O. e P.K. Stumpf (1959) J. Biol. Chem.234, 2548-2554.

Mc Capra, F. (1968) Chem. Commun. 155-156.

Mc Capra, F. (1973) Prog. Org. Chem. 8, 231-277.

Meneghini, R., M.E. Hoffmann, N. Durán, A. Faljoni e G.Cilento (1978) Biochim. Biophys. Acta 518, 177-180.

Morita, Y., Y. Kominato e K. Shimizu (1967) Mem.Res.Inst. Food. Sci. Kyoto Univ. 28, 1-17.

Nakano, M., T.Noguchi, K. Sugioka, H. Fukuyama e M. Sato (1975) J. Biol. Chem. 250, 2404-2406.

Nakano, M. e K. Sugioka (1978) Biochim. Biophys. Acta 529, 387-397.

Nassi, L. e G. Cilento (1982) Photochem. Photobiol. 36, 121-124.

Nassi, L. e G. Cilento (1983) Photochem. Photobiol. 37, 233-237.

Nassi, L. e G. Cilento (1984). Submetido.

Natarajan, V. e P.S. Sastry (1976) J. Neurochem. 26, 107-113.

O'Neal, H.E. e W.H. Richardson (1970) J. Am. Chem. Soc., 92, 6553-6557.

Paterson, M.C., P.H.M. Lohman, E.A. De Weerd-Kastelein e A. Westerveld (1974) Biophys. J., 14, 454-466.

Player, T.J. e A.A. Horton (1981) J. Neurochem. 37, 422-426.

Prasad, K.N. (1980) Life Sci. 27, 1351-1358.

Rapaport, E., M.W. Cass e E.H. White (1972) J.Am.Chem.Soc. 94, 3153-3159.

Richardson, W.H., M.B. Yelvington e H.E. O'Neal (1972) J. Am. Chem. Soc. 94, 1619-1622.

Rivas-Suarez, E. e G. Cilento (1981) Biochemistry 20, 7329-7333.

Rivas, E., A. Paladini Jr. e G. Cilento (1984) Photochem. Photobiol., no prelo.

Rodriguez, A., D. Riendeau e E. Meighen (1983) J. Biol. Chem. 258, 5233-5237.

Samuels, H.H., F. Stanley, J. Casanova e T.C. Shao(1980) J. Biol. Chem. 255, 2499-2508.

Schuster, G.B. (1979) Acc. Chem. Res. 12, 366-373.

Seely, G.R. e R.G.H.Jensen (1965) Spectroquim. Acta 21, 1835-1945.

Shah, S.V., F.C. Cruz e W.H. Baricos (1983) Kidney International, 23, 691-698.

Shine, W.E. e P.K. Stumpf (1974) Arch. Biochem. Biophys. 162, 147-157.

Shoaf, A.R. e R.H. Steele (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 1363-1371.

Shropshire Jr., W. (1977) em "The Science of Photobiology" (K.C. Smith, ed.) pp. 281-311, Plenum Press, New York.

Siekevitz, P. (1962) em "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P. e N.O. Kaplan, eds.), vol. V, pp.61-68, Academic Press, New York.

Slawinska, D. e J. Slawinski (1983) Photochem. Photobiol. 37, 709-715.

Slawinski, J., E. Grabikowski e L.Ciesla (1981) J. Luminesc 24/25, 791-794.

Steele, R.H. (1963) Biochemistry 2, 529-536.

Svingen, B.A., F.O. O'Neal e S.D. Aust (1978) Photochem. Photobiol. 28, 803-809.

Svingen, B.A., J.A. Buege, F.O.O'Neal e S.D. Aust (1979) J. Biol. Chem. 254, 5892-5899.

Szent-Györgyi, A. (1941) Science, N.Y. 93, 609-611.

Tichonicky, L., M.A. Santana-Calderon, N. Defer, E.M.Giesen, G. Beck e J. Kruh (1981) Eur. J. Biochem. 120, 427-433.

Turro, N.J. (1978) em "Modern Molecular Photochemistry". The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., Califōrnia, USA.

Turro, N.J. e P. Lechtken (1973) J. Am. Chem. Soc. 95, 264-269.

Ulitzur, S. e J.W. Hastings (1978) Proc. Natl. Acad.Sci. USA 75, 266-269.

Ullman, E.F. (1972) U.S. patent 3.689.391. Chem. Abstr.78, 3585r.

Vernon, L.P. (1960) Anal. Chem. 32, 1144-1150.

Vidigal, C.C.C., A. Faljoni-Alārio, N. Durān, K. Zinner,Y. Shimizu e G. Cilento (1979) Photochem. Photobiol. 30, 195-198.

Vladimirov, Y.A., V.I. Olenev, T.B. Suslova, Z.P.Cheremiseria (1980) Adv. Lipid Res. 17, 173-249.

Ward, W.W. (1981) Photochem. Photobiol. 33, 965-974.

Weller, A. e K. Zachariasse (1967) J. Chem. Phys. 46, 4984-4986.

White, E.H. e C.C. Wei (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 1219-1223.

White, E.H., J. Wiecko e C.C. Wei (1970) J. Am. Chem. Soc. 92, 2167-2168.

White, E.H., E. Rapaport, H.H. Seliger e T.A. Hopkins (1971) Bioorg. Chem. 1, 92-122.

White, E.H., J.D. Miano, C.J. Watkins e E. J. Breaux (1974) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 13, 229-243.

Wilson, T. (1976) em "Chemical Kinetics" (D.R. Hersbach, ed.) MTP Int. Rev. Sci., pp. 265-322, Butterworths, London.

Yonaha, M. e Y. Ohbayashi (1980) Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 30, 113-122.