

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Orientador Prof. Dr. Nelson Durán

Aluna: Yoshiko Makita

Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Química Orgânica.

*Título: INTERAÇÃO DE 2-METILPROPANAL E
CLORPROMAZINA COM BIOMOLÉCULAS.*

CAMPINAS

1980

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

*Agradeço ao Prof. Dr. Nelson Durán pela
orientação segura, amizade e grande pres_
teza na elaboração deste trabalho.*

Aos meus pais por tudo que tenho
sido e que sou hoje,
aos meus irmãos.

A José Massato com muito carinho.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece sinceramente:

- A Dra. M. Haun que indicou o caminho seguro para o início do manuscrito e amizade.
- Ao grupo do laboratório de Dr. N. Durán pela amizade e incentivo.
- Ao Prof. Dr. C. Cilento que cedeu com gentileza o seu laboratório e seus aparelhos.
- Ao Prof. Dr. W. Martins pelo apoio, amizade e correção desta redação.
- Ao Prof. Dr. A. Vercesi pela cooperação e amizade.
- Ao Prof. Dr. A. Forcesi do Instituto de Biologia que ce deu-nos os aparelhos de sua responsabilidade.
- Ao Instituto de Química e seus funcionários que colaboraram para que esse trabalho fosse realizado.
- Ao Noriaki, pelo eficiente trabalho realizado nos desenhos.
- A Edy e Carlitos, Adelaide e demais colegas do Instituto de Bioquímica da USP, pela amizade, incentivo e cola boração.
- À Financiadora de Estudos e Projetos, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Na cional de Pesquisa pelo auxílio material.

- A Profa. Dra. C.H. Collins e Prof. Dr. J. Miller pela significativa colaboração prestada na correção da redação em Inglês ao longo de todo o trabalho.
- A todos que ajudaram e forneceram condições para que este trabalho fosse realizado.

ÍNDICE

	Pag.
I- INTRODUÇÃO	1
I.1- INTRODUÇÃO À GERAÇÃO QUÍMICA DE ESPÉCIES EXCITADAS.....	1
I.2- BIOLUMINESCÊNCIA.....	8
I.3- QUIMILUMINESCÊNCIA.....	11
I.4- PROCESSOS BIOENERGIZADOS.....	16
I.4.1-ESTUDOS JÁ REALIZADOS EM SISTEMAS ENZIMÁTICOS PRODUZINDO QUIMILUMINES CÊNCIA.....	17
I.4.2- ALGUMAS APLICAÇÕES DE SISTEMAS BIO LÓGICOS.....	22
I.5- TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA.....	24
I.5.1- FATORES QUE GOVERNAM A EFICIÊNCIA DE TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA.....	28
I.6- OBJETIVO DA TESE.....	38
I.7- ESTRUTURA E FUNCIONAMENTO DA MEMBRANA DE ERITRÓCITOS.....	41
I.7.1- MORFOLOGIA E ULTRAESTRUTURA DA MEM BRANA DE ERITRÓCITOS.....	41
I.7.2- PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DE MEMBRA NA DE ERITRÓCITOS.....	42
I.7.2.1- Membrana lipídica.....	42

I.7.2.2- Membrana proteica.....	44
I.7.2.3- Transporte de íons atra - vês da membrana.....	45
I.7.3- PROPRIEDADES BIOFÍSICAS DA MEMBRA- NA DE ERITRÓCITOS.....	46
I.7.4- HEMÓLISES INDUZIDAS POR AGENTES QUÍMICOS.....	47
I.7.5- MÉTODOS PARA ESTUDAR HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS.....	47
I.7.6- EFEITO FARMACOLÓGICO E FOTOQUÍMI- CO DE CLORPROMAZINA EM ERITRÓCITO HUMANO.....	48
I.7.7- REAÇÃO DE ALDEIDOS COM A MEMBRANA PROTEICA DE ERITRÓCITOS HUMANO...	52
II- PARTE EXPERIMENTAL.....	54
II.1- MATERIAL.....	54
II.2- APARELHAGEM.....	56
II.3- MÉTODOS.....	57
II.3.1- PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO TAMPÃO....	57
II.3.2- SOLUÇÃO DE 2-METILPROPANAL.....	57
II.3.3- SOLUÇÃO DE PEROXIDASE (HRP) DE RABANETE.....	57
II.3.4- PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO DE DBAS E DPAS.....	57

II.3.5- SOLUÇÃO DE RIBOFLAVINA.....	57
II.3.6- SOLUÇÃO DE CLORPROMAZINA.....	58
II.3.7- SOLUÇÃO DE CATALASE E SUA DOSA- GEM.....	58
II.3.8- PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ERITRÔ- CITOS.....	58
II.3.9- PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS.....	59
II.3.10- SOLUÇÃO SALINA FISIOLÓGICA....	59
II.4- IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE REAÇÃO...	60
II.4.1- ACETONA E ÁCIDO FÓRMICO.....	60
II.4.2- CLORPROMAZINA E SEUS PRODUTOS DE REAÇÃO.....	60
III- RESULTADOS.....	62
III.1- PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS DO SISTEMA 2-METILPROPANAL/ERITRÔCITO/ /O ₂	62
III.2- REAÇÃO COM 2-METILPROPANAL/ERITRÔCITO/ /O ₂	63
III.2.1- PRODUTOS DE REAÇÃO.....	63
III.2.2- UTILIZAÇÃO DE ACCEPTORES EMIS- SIVOS.....	64
III.2.3- RESULTADOS DA REAÇÃO BIOENER- GIZADA.....	64

III.2.4- ESTUDO DE ATIVIDADE PEROXIDA TICA DOS ENZIMAS RETIDOS NA MEMBRANA DO ERITRÓCITO.....	70
III.2.5- REAÇÕES CONTROLE.....	70
III.3- EFEITO SINÉRGICO DE CLORPROMAZINA E 2-METILPROPANAL SOBRE A HEMÓLISE DE ERITRÓCITOS HUMANOS.....	73
III.3.1- REAÇÃO NA PRESENÇA DE CLOR - PROMAZINA E 2-METILPROPANAL.	73
III.3.2- MODIFICAÇÃO NA ESTRUTURA DA MEMBRANA.....	73
III.3.3- EFEITO DE ACCEPTOR EMISSIVO NA PRESENÇA DE CLORPROMAZINA.	78
III.3.4- ESTUDO COMPARATIVO DOS SISTE MAS: 2-METILPROPANAL/HRP/CPZ/ /O ₂ (SISTEMA MODELO) E 2-ME- TILPROPANAL/ERITRÓCITO/CPZ/O ₂ EM CONSUMO DE OXIGÊNIO.....	78
III.3.5- PRODUTO DE REAÇÃO BIOENERGI- ZADA.....	82
III.3.6- ESPÉCIES ATIVAS QUE PODEM SER GERADAS NO SISTEMA NA PRESENÇA DE CLORPROMAZINA..	82
IV- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	86

V- SUMÁRIO.....	97
VI- SUMMARY.....	99
VII- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	101
VIII- COMENTÁRIO.....	

LISTA DAS ABREVIACÕES USADAS

<u>ABREVIACÕES</u>	<u>NOME</u>
CPZ	Clorpromazina.
CPZO	5-sulfóxido de clorpromazina
DABCO	1,4-diazobiciclo (2,2,2) octano
DNA	cido desoxirribonucleico
DPAS	9,10-difenilantraceno-2-sulfonato
DBAS	9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato
FMNH ₂	Flavina mononucleotídeo reduzido
HRP	Peroxidase de rabanete
Pi	Fosfato
PPi	Pirofosfato
SOD	Superóxido dismutase
DMSO	Dimetil sulfóxido
t-BuOK	Terc-butóxido de potássio
¹ _φ	Rendimento quântico de singlete
³ _φ	Rendimento quântico de triplete
τ ^o	Vida média da espécie excitada ge- rada enzimaticamente na ausência de aceptores.

I- INTRODUÇÃO

I. 1- INTRODUÇÃO À GERAÇÃO QUÍMICA DE ESPÉCIES EXCITADAS

Em vários processos fotofísicos, que podem ocorrer numa molécula orgânica com absorção da luz, são possíveis dois tipos de estados eletronicamente excitados: (i) o singlete - É o estado inicialmente produzido por absorção de luz e os spins eletrônicos permanecem emparelhados e (ii) o triplete - É aquele que advém do estado excitado singlete através de um processo conhecido como cruzamento intersistema. Nesse caso tem-se os spins eletrônicos não emparelhados.

Cada estado excitado tem uma energia particular, tempo de vida e estrutura e, portanto, pode-se distinguir as moléculas no estado fundamental e no estado excitado, pois estes diferem entre si nas suas propriedades físicas e químicas (1).

Os estados excitados em meio líquido diferem-se quanto ao tempo de vida(τ):

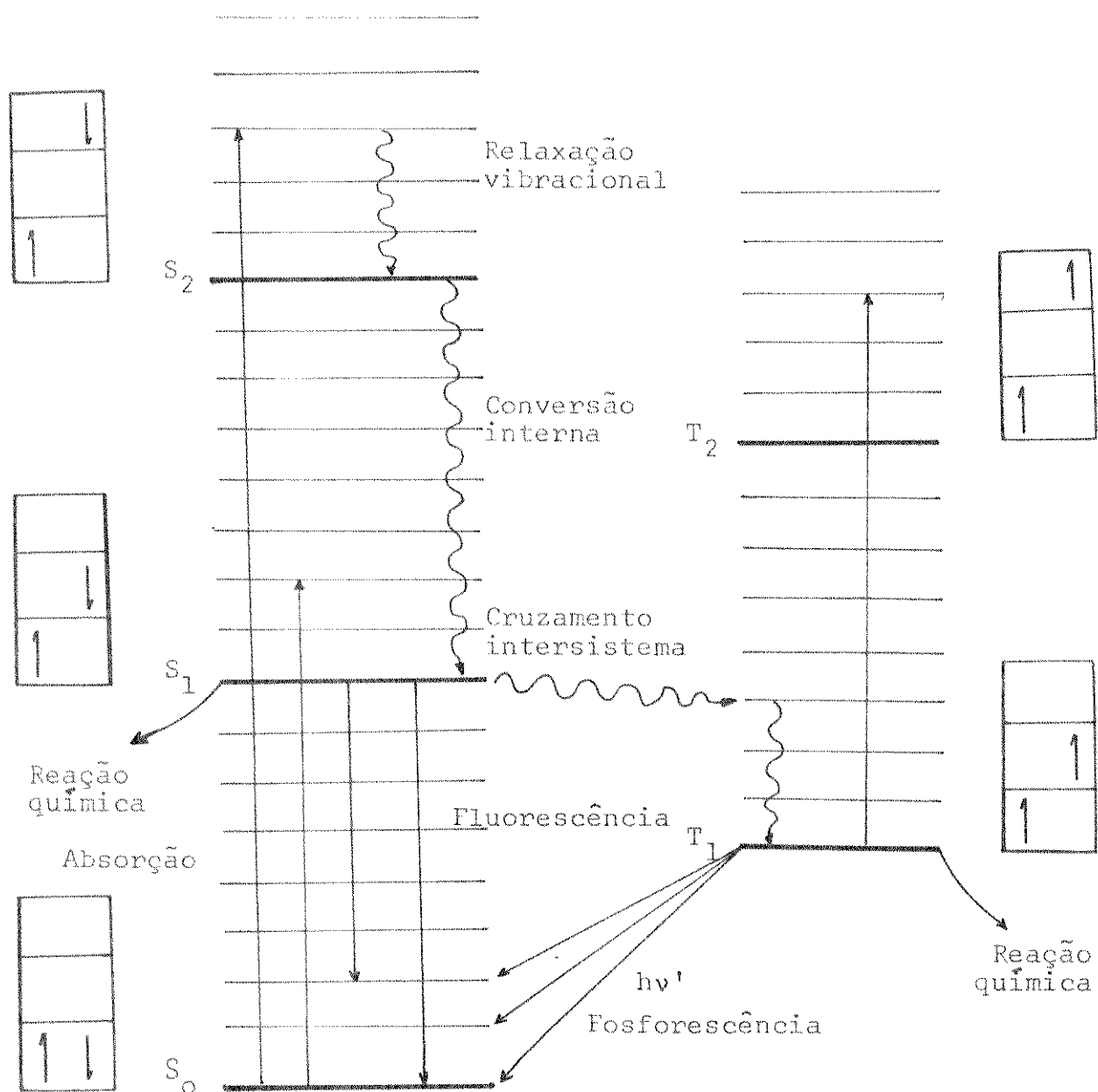
(i) o estado singlete, com raras exceções, tem vida média curta, $\tau = 10^{-6} - 10^{-9}$ s, e

(ii) o estado triplete tem vida média mais longa, $\tau = 10^{-5}$ a alguns segundos (2).

Numa representação esquemática podemos ex-

por os níveis de energia e os processos fotofísicos que ocorrem nas moléculas excitadas.

DIAGRAMA DE JABLONSKI

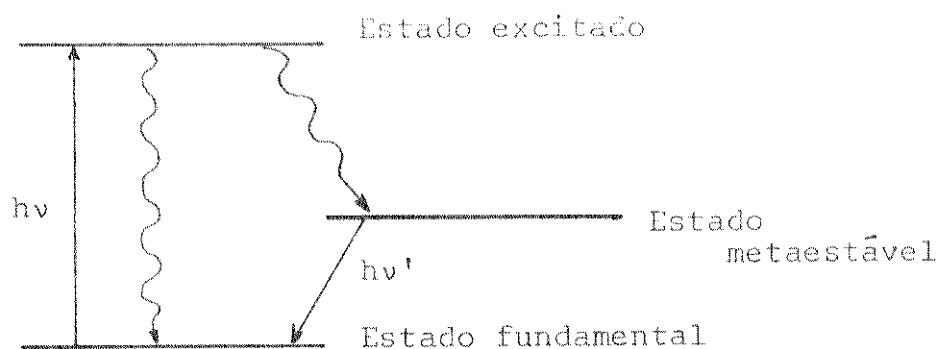


Neste diagrama a direção vertical corresponde à energia crescente; a direção horizontal não possui um significado físico. Os estados eletrônicos são representados pelas linhas horizontais fortes; os símbolos S_0 , S_1 , S_2 representam o estado fundamental, o primeiro e segundo estado singlete excitado respectivamente. Estas séries de níveis de energia são frequentemente referidos como singletes e tripletes múltiplos. A excitação está representada pela promoção de um elétron de estado fundamental (S_0) para um nível eletrônico mais alto. A posição de spin de elétron excitado como também do estado fundamental foram anotados dentro das respectivas caixas e, finalmente, a linha fraca horizontal corresponde ao nível vibracional de estado eletrônico.

O nível triplete (T_1) está localizado abaixo do nível de singlete excitado (S_1) de acordo com a regra de Hund: maior multiplicidade menor energia. Quando dois elétrons possuem o mesmo número quântico de spin (spin não emparelhado) não podem estar juntos na mesma zona de superposição (overlap) de seus respectivos orbitais, portanto suas distâncias médias separadamente são maiores que a do estado singlete e a repulsão coulombica de elétrons é menor. Respeitando o princípio de exclusão de Pauli.

Resumindo este diagrama em tres níveis de energias distintos temos: (i) estado fundamental, (ii) es

tado excitado populado pela absorção de luz e (iii) um estado metaestável populado pela desativação de estados excitados, sendo que as linhas sólidas representam as transições radiativas e as linhas sinuosas as não radiativas, que pode ocorrer no processo de decaimento não radiativo, acarretando perda de energia e voltando ao estado fundamental.



A fosforescência se produz pelo decaimento radiativo de estado meta-estável designado como um processo proibido pela regra de spin, mas essa regra de seleção não é tão rígida e frequentemente é observada uma emissão fraca. Além das formações de estados excitados por processos de absorção de energia eletrônica entraremos a discutir a geração química destes estados.

a) Geração de estados excitados por transferência de elétrons.

As reações de transferência de elétrons que poderiam gerar estado eletronicamente excitados (quimiluminescentes) são aquelas onde se encontram pequenas diferenças configuracionais entre os estados fundamentais e excitados.

Em reações de transferências de elétrons, as moléculas excitadas resultam da oxidação de um radical anion (Esquema 1) ou da redução de um radical cátion ou do aniquilamento cátion-cátion (Esquema 2).

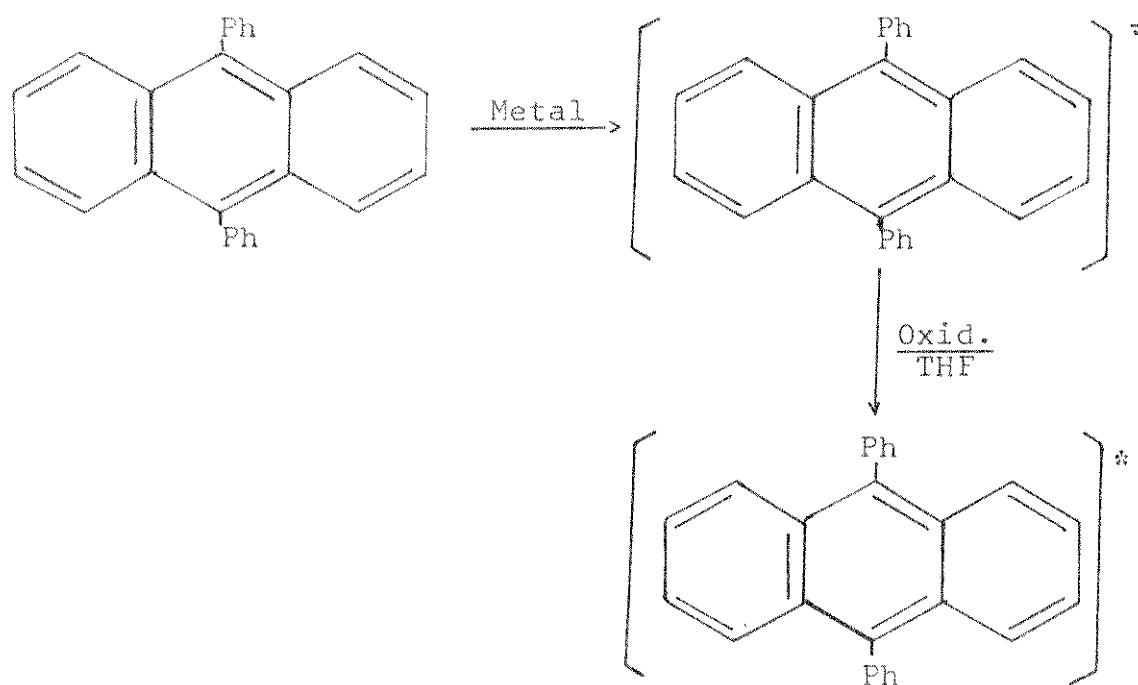


foto oxidação



quimiexcitação, via aniquilação cátion-anion.



Esquema 2

Num complexo de transferência de carga (A ... D), a transferência de elétrons leva à configuração $A^- \dots D^+$, que corresponde a um estado excitado do complexo, podendo ser de energia suficientemente baixa para tornar-se excitada por reações moderadamente exotérmicas. De acordo com Förster (3) isto poderia ser um método potencial de geração de estados excitados em sistemas biológicos.

b) Geração de estados excitados via intermediário 1,2-dioxetano.

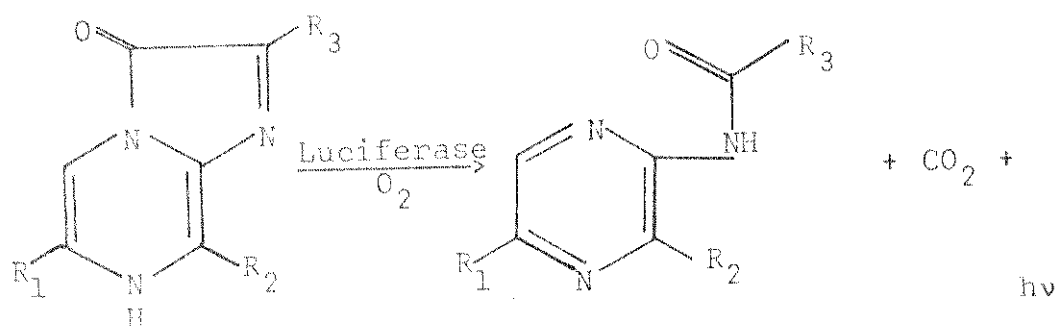
McCapra em 1968 (4) sugeriu que a decomposição "concerted" de um peróxido cíclico, 1,2-dioxetano, dá uma produção eficiente de estados eletronicamente excitados (quimiluminescência). Esta sugestão foi seguida por uma extraordinária síntese de primeiro 1,2-dioxetano por Kopecky e Munford (5) e em 1972 Adam e Liu (6) sintetizaram a primeira dioxetanona ou α -peroxilactona. A clivagem térmica desses compostos fornecem essencialmente compostos carbonílicos no estado triplete (ver item I.3).

Dentro das formas possíveis de geração de

de energia eletrônica discutiremos os processos relacionados com processos biológicos como bioluminescência, quimiluminescência e processos bioenergéticos.

I.2 - BIOLUMINESCÊNCIA

É resultante de uma reação quimiluminescente (reação química que pode gerar estados excitados) catalizada por enzimas. A energia livre negativa produzida na reação química se transforma de reação química para um produto eletronicamente excitado o qual ocorre numa única etapa. É proposto a desativação por emissão de luz e concomitantemente descarboxilação.



Esquema 3

A reação bioluminescente é de real importância em termos de bioenergética quando é encarado como transformação biológica de energia química em radiação luminosa, sem que haja evolução direta de energia térmica .

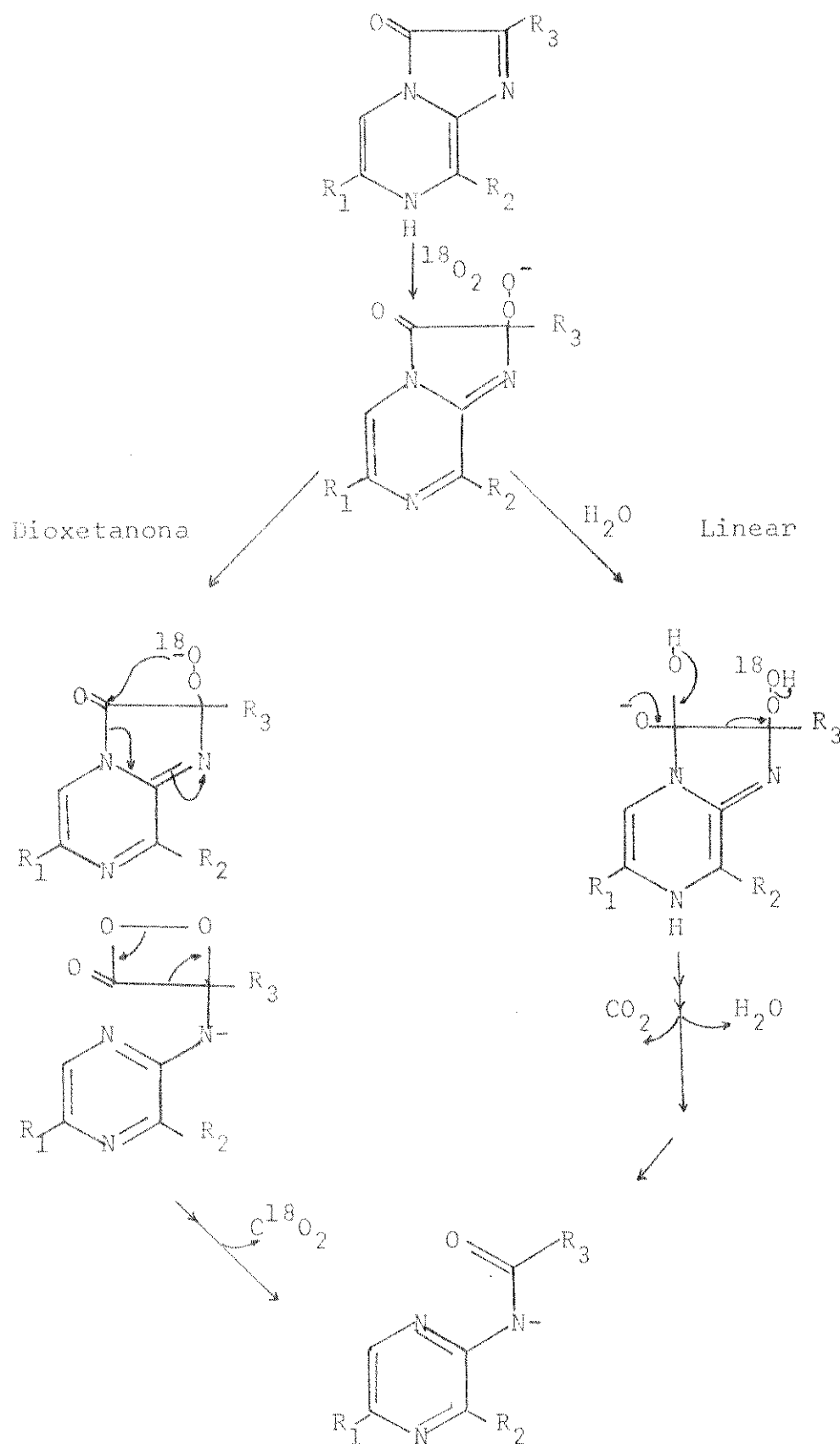
O mecanismo proposto de peroxidação foi

postulado para diversos sistemas bioluminescentes tais como: para vagalumes (4), crustáceo Cipridina (7) e mais recentemente para o sistema do celenterado Renilla (8).

Por volta de 1977 Shimomura e col. (9) conseguiram elucidar o mecanismo da reação do intermediário dioxetano. Shimomura utilizou $^{18}\text{O}_2$ e H_2^{16}O marcados e verificou 75% de $\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$, o que justifica a incorporação de um átomo de oxigênio vindo do oxigênio molecular mas não da água como tinham proposto DeLuca e col. (10) numa reação de hidroperóxido linear (ver Esquema 4).

Em outros sistemas bioluminescentes foi demonstrado o envolvimento de aldeídos ou em suas formas enôlicas durante o processo, como na molusca *Látia* (11) e no verme *Diplocardia Longa* (12). Esta luciferina de "North American species" é um simples composto aldeídico, N-isovarenil-3-aminopropanal com um grupo funcional amida. Vários trabalhos provam que o aldeído é convertido para o seu ácido correspondente. Por exemplo, in vitro, a reação catalizada pela luciferase bacteriana envolve a oxidação de flavina mononucleotídeo reduzida (FMNH_2) pelo oxigênio molecular na presença de um aldeído de cadeia longa.

REAÇÃO PROPOSTA



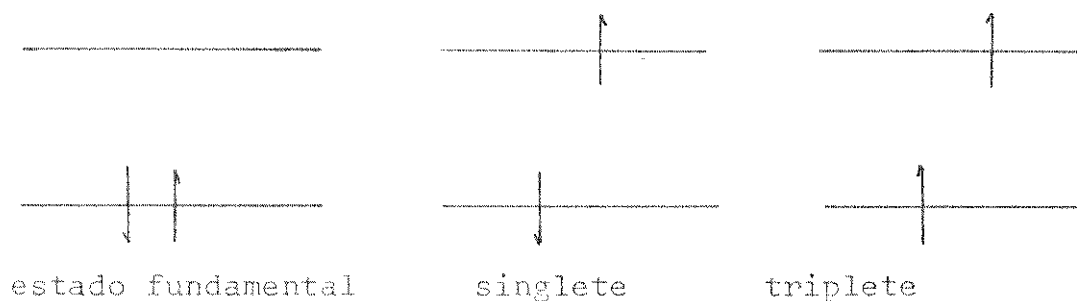
Esquema 4.

I.3 - QUIMILUMINESCÊNCIA

O dioxetano é isoeletrônico com o ciclobutano e portanto deve-se esperar que o diagrama de correlação orbital de decomposição deva ser qualitativamente semelhante ao da decomposição de ciclobutano para duas moléculas de etileno.

O diagrama de correlação de estado e de orbital prediz uma reação relacionada com o produto final carbonil excitado que foi visto por Kearns (13) e McCapra (14).

A maioria dos dioxetanos ou compostos similares até agora estudados fornece produtos carbonílicos cujo nível energético mais baixo corresponde a uma configuração n, π^* . A opção por transições $n\pi^*$ e $\pi\pi^*$ pode também estar intimamente ligada ao tipo de mecanismo que governa a clivagem pois um estado excitado π, π^* possui um conteúdo de energia maior que daria eventualmente um número maior de estados singletes ao invés de triplete. A menor energia do estado triplete é devido à natureza repulsiva da interação spin-spin entre elétrons do mesmo spin (Regra de Hund: maior multiplicidade menor energia).



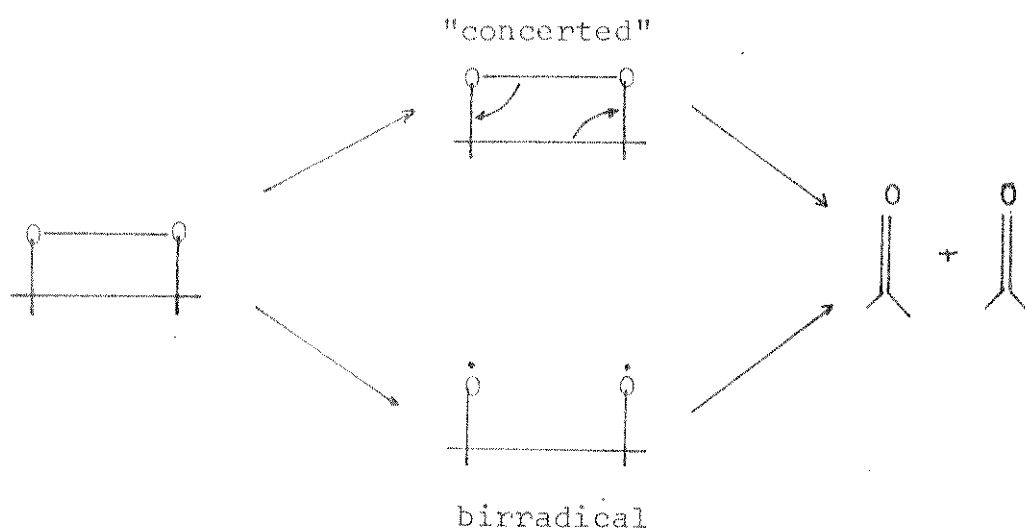
Esta classe particular de peróxidos cíclicos, os dioxetanos, tem sido vista como um possível precursor comum de muitas reações quimiluminescentes (15). As suas qualificações são várias:

a) Produto de clivagem dando dois novos grupos carbonílicos que frequentemente estão ligados à quimi- ou bioluminescência.

b) clivagem fortemente exergônica,

c) uma configuração torcida $>\text{C}^{\text{O}}$ como carbonilo, singlete e triplete contrastando com o estado fundamental $>\text{C}=\text{O}$, e

d) a possibilidade de que a clivagem seja "concerted" através de um orbital simétrico, o qual provida um meio de excitar eficientemente ou necessariamente um dos fragmentos de clivagem.

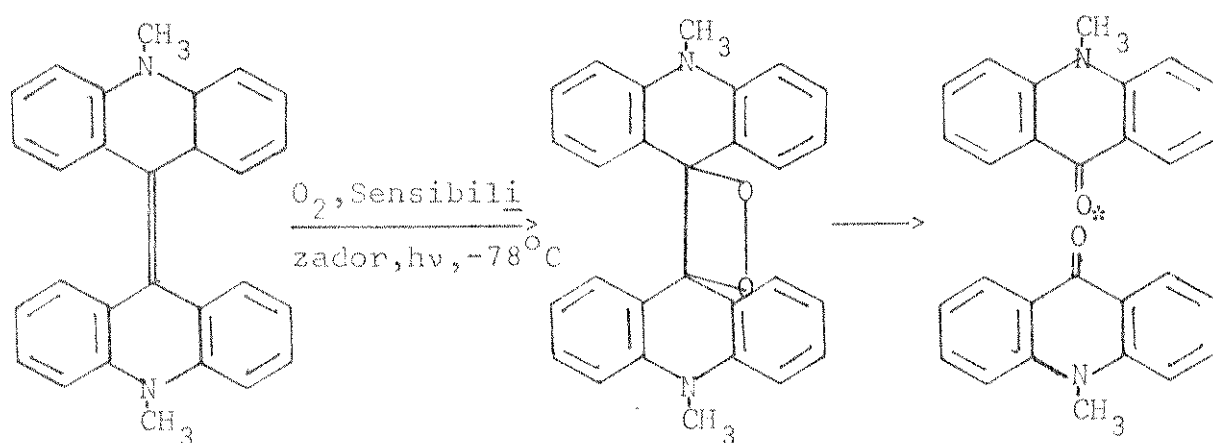


Esquema 5.

Os estados excitados formados na clivagem de dioxetanos simples são essencialmente tripletes acompanhados da presença de pouco singlete ($\phi^3/\phi^1 = \sim 10^2 - 10^4$) (16, 17).

Vários dioxetanos foram até agora sintetizados (~ 80) com muito sucesso.

Dentre os dioxetanos simples, somente um caso fôra descrito no qual o rendimento de singletes era maior que o de tripletes por Darling e Foote (18), contudo foi invalidado por Bechara e col. (19) que os valores obtidos por Foote estavam dentro de erro experimental. Para os dioxetanos em que os substituintes não são alquila tem sido descrito alguns casos nos quais $\phi^3/\phi^1 = 1$, como para a decomposição do dioxetano derivado do bisacrili deno

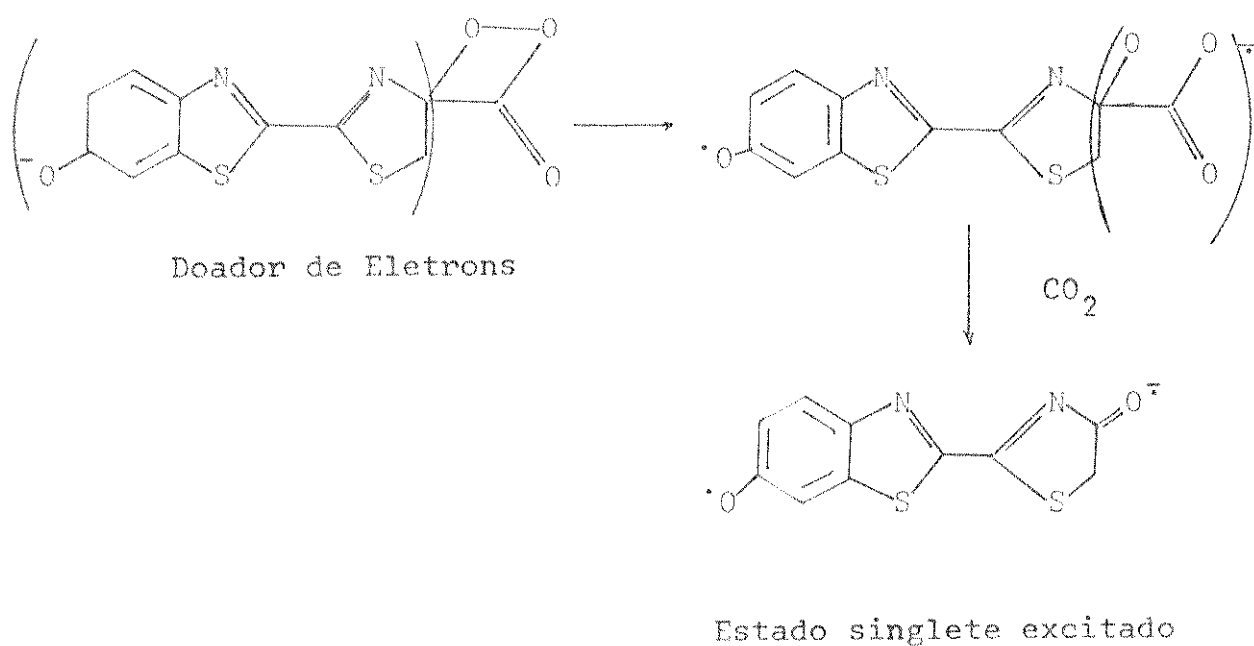


Esquema 6.

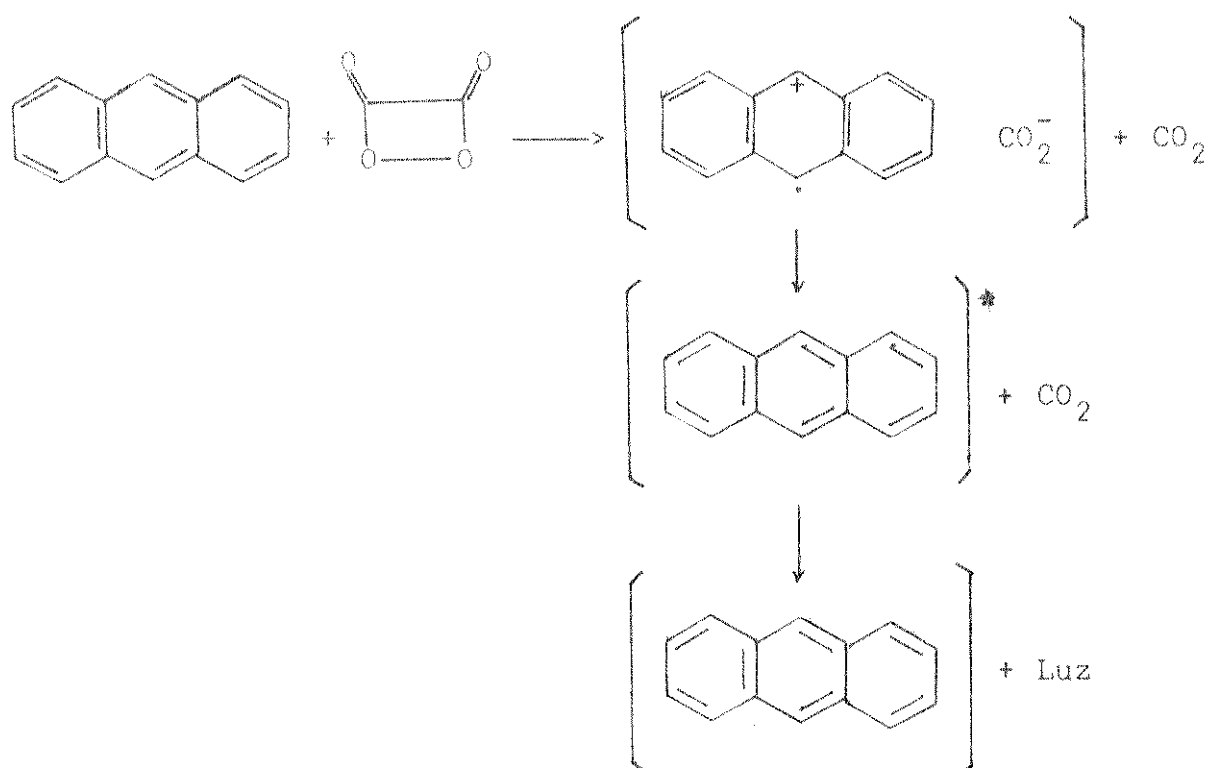
Considerando justamente a estrutura de dioxetanos que fornecem um razoável rendimento de estados singlete, McCapra, (21) propôs um mecanismo alternativo para a decomposição "concerted" de dioxetanos. Ele sugere que dioxetanos substituídos por, ou reagindo com, compostos com grupos fortemente doadores de elétrons decompõe-se via íons radicais sendo que a excitação ocorre por transferência de elétrons.

E recentemente, uma ligeira variação do mecanismo proposto por McCapra foi apresentado por Schuster e Bryant (22) e outros como um novo mecanismo geral para a quimiluminescência. Neste, descrito como "luminescência quimicamente iniciada por troca de elétrons" (CIEEL), a sequência geradora de luz é iniciada pela transferência de um elétron de um doador adequado para o peróxido. Em seguida temos a reação química dos íons radicais e a etapa de excitação é a aniquilação de íon.

O mecanismo proposto por Schuster e Bryant (22) explica convenientemente a quimiluminescência em vários sistemas inclusive nos bioluminescentes, para os quais se pode propor uma troca de elétrons, ocorrendo intramolecularmente segundo:



Esquema 7.



Esquema 8.

I.4 - PROCESSOS BIOENERGIZADOS

O fato de que um modelo dioxetânico simples quando clivado termicamente produz suficiente compostos carbonílicos tripletes (19) encaixou-se perfeitamente na hipótese de que existem processos biológicos gerando moléculas eletronicamente excitadas diferentes dos bioluminescentes (23). Geralmente são reações enzimáticas catalizadas pela peroxidase, uma hemeproteína reconhecida por ter uma banda de absorção solet a 400 nm, (banda de absorção do grupo heme).

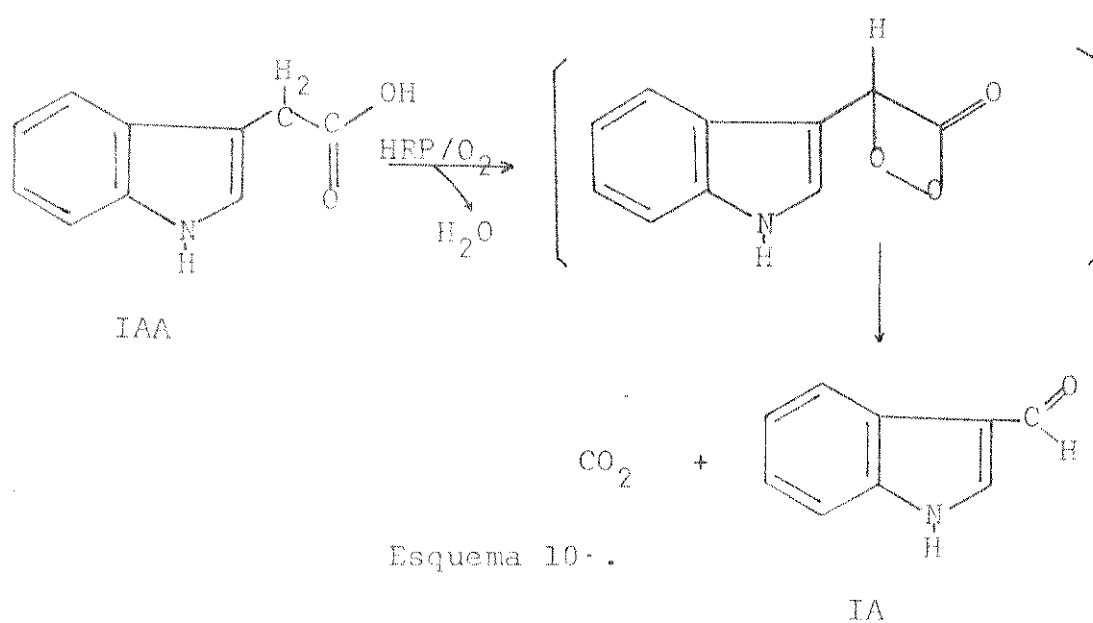
Os tripletes sob condições normais de reação não são emissivos. Entretanto, se as espécies tripletes fossem geradas dentro do enzima, portanto, protegida da desativação pelo oxigênio molecular, deve emitir fôtons numa extensão considerável pela analogia feita da fosforescência de certas proteínas em solução a temperatura ambiente mesmo na presença de oxigênio visto por Saviotti e Galley (24). A emissão surge do resíduo de triptofano da molécula de proteína.

As emissões, por sua vez, podem ser investigadas na presença de sensibilizadores específicos principalmente 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato (DBAS) para acetona triplete e 9,10-difenilantraceno-2-sulfonato (DPAS) para acetona singlete. A proteção das espécies excitadas tripletes pelo enzima, restringe a transferência

mioglobina que é comparável à obtida por irradiação a 270 nm. Nesta reação, observa-se uma correlação excelente entre a emissão, consumo de oxigênio e formação de metilglioxal que apresenta uma banda de quimiluminescência a 520 nm em DMSO- sistema modelo que consiste de DMSO/t-BuOH/t-BuOK/O₂ (28). Este resultado indica que a reação produz estados eletronicamente excitados por clivagem de um intermediário dioxetânico.

2) Ácido indol-3-acético: é uma das auxinas biologicamente importante no crescimento das plantas que pela ação de peroxidase/O₂ produz rapidamente uma espécie excitada. Foi também observada a alteração no espectro do grupo heme do enzima (27).

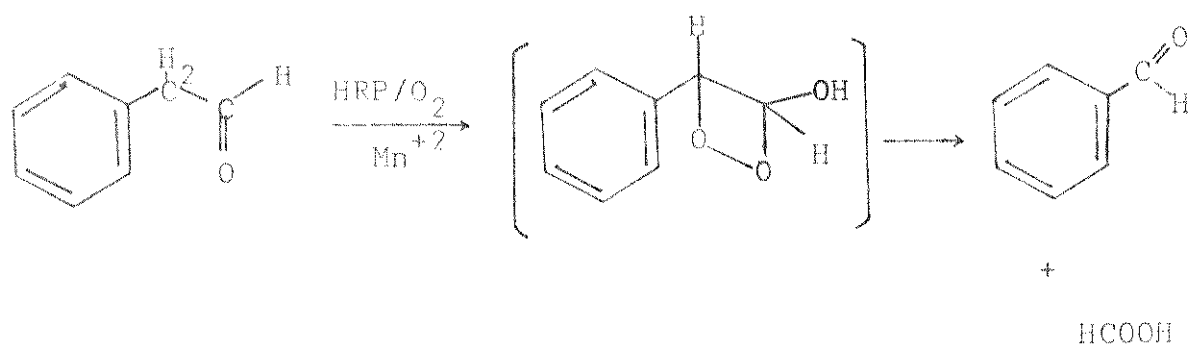
Existe a possibilidade de que a função hormonal tenha relação direta com a formação da espécie excitada indol-3-carboxaldeído, o produto esperado da clivagem do intermediário dioxetânico.



A transferência de energia para aceptores DBAS, eosina e rosa bengala reforça a idéia da transferência de energia proibida pela lei de spin (T-S).

Em 1979 Vidigal e col. (29) acoplando este sistema ao DNA observaram uma mudança no espectro CD comparável aos efeitos ocasionados por irradiação no mesmo,

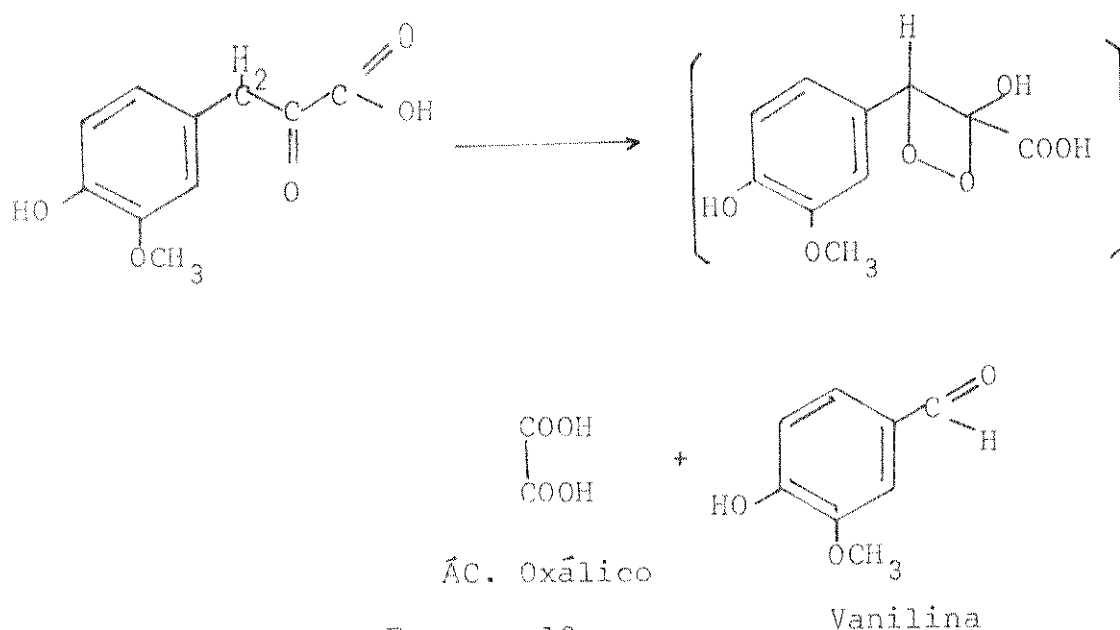
3) Oxidação de acetaldeído aromático: fenilacetaldeído- é um substrato que pode ser formado em plantas a partir do β -fenilalanina. Quando oxidado pelo extrato de plantas ou simplesmente pelo sistema HRP/ Mn^{+2} / O_2 dá como produto benzaldeído e ácido fórmico, esperados pela clivagem de um dioxetano (intermediário) (30).



Esquema 11.

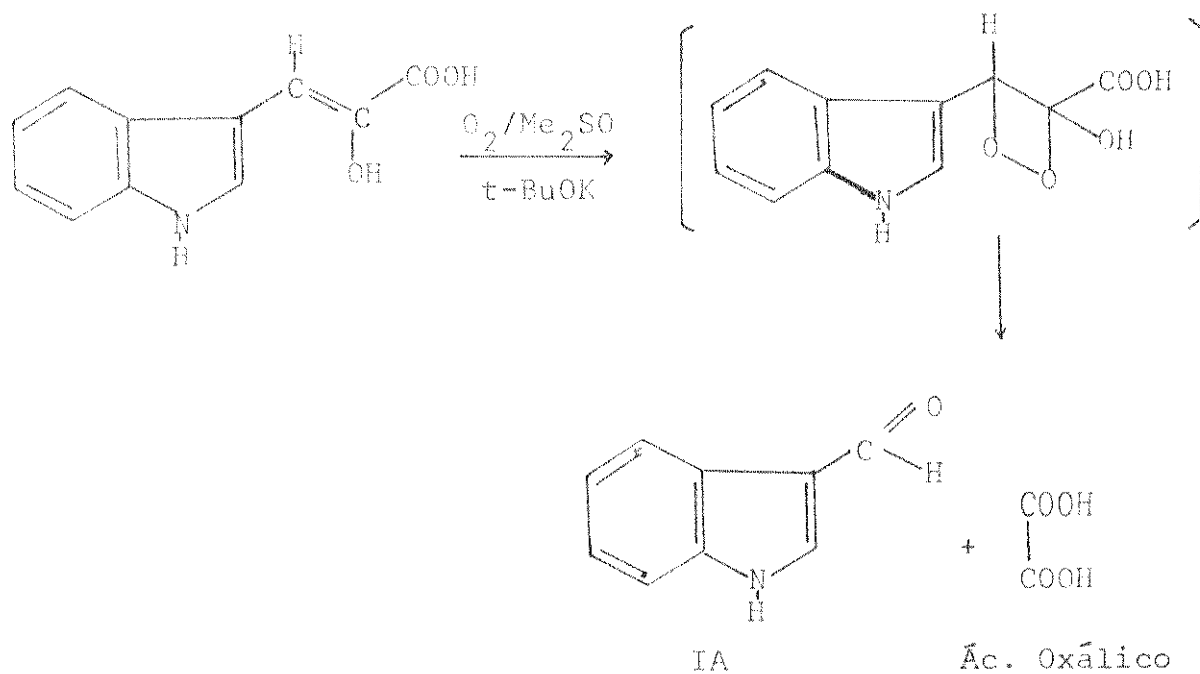
4) Oxidação do ácido vanilpirúvico: es-

ta oxidação catalizada por HRP e laccase (31) constitui in vivo uma das etapas na degradação de lignina por fungos. Obteve-se emissão de luz no sistema enzimático e no sistema modelo sugerindo que a vanilina é gerada no estado excitado. Foi isolada da mistura da reação vanilina e oxalato, produtos esperados da clivagem de um dioxetano (32).



Esquema 12.

5) Oxidação do ácido indol-3-pirúvico: o indolpirúvico foi estudado em sistema modelo DMSO/ base o qual pelos resultados obtidos sugerem ser uma luciferina em potencial. Esta dedução é reforçada através da produção in vivo tanto do indolaldeído como do ácido oxálico (33).



Esquema 13.

6) Oxidação de 2-metilpropanal: da oxidação de 2-metilpropanal no sistema enzimático e também no sistema modelo (2-metilpropanal/DMSO/t-BuOK/t-BuOH/ O_2) obtêm-se os produtos esperados de um intermediário dioxetânico (25, 34, 90).

Nos estudos mais aprofundados feitos, elaborando-os dentro dos recursos necessários tais como a transferência de energia aos aceptores específicos, e ou métodos espectrofotométricos com respeito a esta oxidação aeróbica catalizada por peroxidase, obtiveram-se evidências de que a acetona é gerada no estado excitado triplete. Ele é responsável pela emissão de luz observada.

Este resultado fez argumentá-los que em sistemas biológicos também podem ser formadas espécies eletronicamente excitadas além das que intervêm em bioluminescência. Portanto, o sistema 2-metilpropanal/HRP/O₂ tem sido estudado como fonte geradora de energia para sistemas biológicos convenientemente acoplados.

I.4.2 - ALGUMAS APLICAÇÕES DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

- 1) Efeito fotoquímico de acetona triplete sobre DNA (35).
- 2) Transferência de energia de acetona triplete para clorpromazina (CPZ) (36).
- 3) Efeito do sistema 2-metilpropanal/HRP / O₂ sobre o fitocromo (37).
- 4) Transferência de energia de acetona triplete para flavinas (38).
- 5) Interação de estados excitados com herbicidas (39).
- 6) Modificação de t-RNA por IA excitado enzimaticamente (29).
- 7) Fotoligação no escuro de IA excitado com t-RNA (40).
- 8) Fotoligação de reboflavina com lisozima por transferência de energia de acetona a riboflavina (41).

9) Efeito de acetona triplete sobre enzimas fotoreativáveis de reparo em DNA.(42).

10) Efeito de acetona triplete sobre clorofila (43).

I.5 - TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA

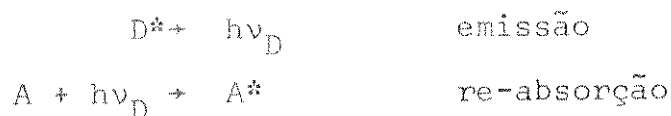
A energia de excitação eletrônica pode ser transferida por processos não radiativos numa distância relativamente grande (50 - 100 Å) (3) em uma só etapa, mas, em sistemas biológicos, a transferência em várias etapas são favorecidas. Isto porque existe certos componentes em concentrações muito altas, localizadas, e com energia baixa de excitação.

Numa maneira qualitativa a transferência de energia por ressonância pode ser comparada ao comportamento de dois osciladores acoplados, sendo que a energia é facilmente transferida de um oscilador para o outro. Desta maneira pode uma excitação eletrônica dos constituintes ocorrer a partir da absorção de radiação, que pode ser transferida de um componente ao outro e é considerado um passo essencial em reações foto e radiobiológicas.

A transferência de energia pode provocar a formação de energia de excitação eletrônica, uma energia química, calor e energia luminosa e o processo mais simples é $D^* + A \rightarrow A^* + D$.

Dois mecanismos regem este processo de transferência: a radiativa e a não radiativa (ver item I).

i) mecanismo radiativo ou trivial se processa em duas etapas



Esquema 14.

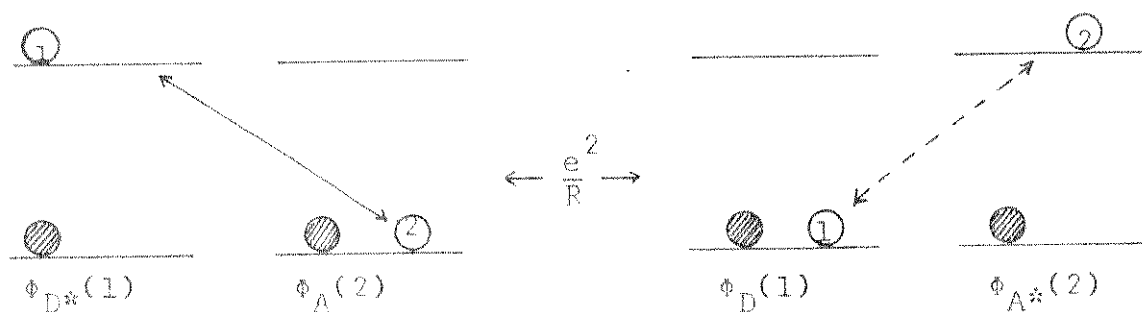
É denominado trivial pois segue um mecanismo simples em vista do processo físico que o envolve. Neste caso, a eficiência do doador (D^*) deve ser alta e a emissão ser feita no comprimento de onda onde o acceptor absorve mais fortemente e as concentrações do acceptor devem ser altas.

ii) mecanismo não radiativo

Pode ser colisional ou de transferência a longa distância. Estes dois processos estão relacionados com os dados de K_{ET} que por sua vez depende dos valores $a + b$ onde a é um valor da interação coulombica e b a interação por intercâmbio de elétrons.

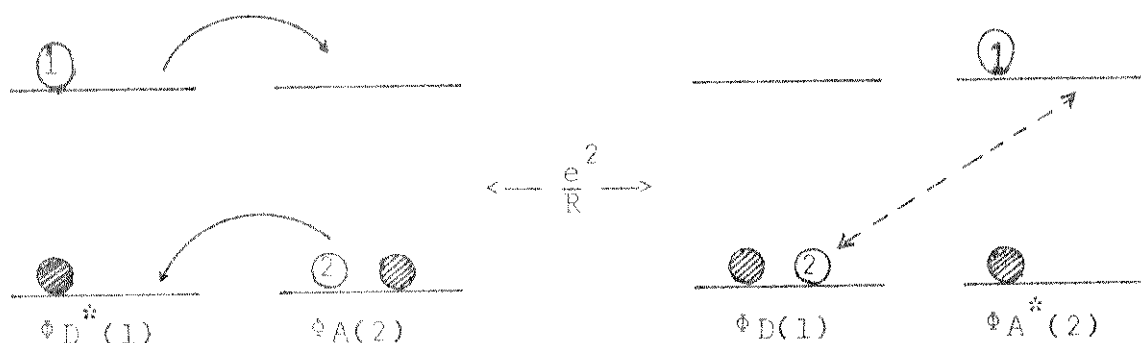
Dependendo dos valores de a e b podemos separar em dois processos distintos:

a) por interação coulombica



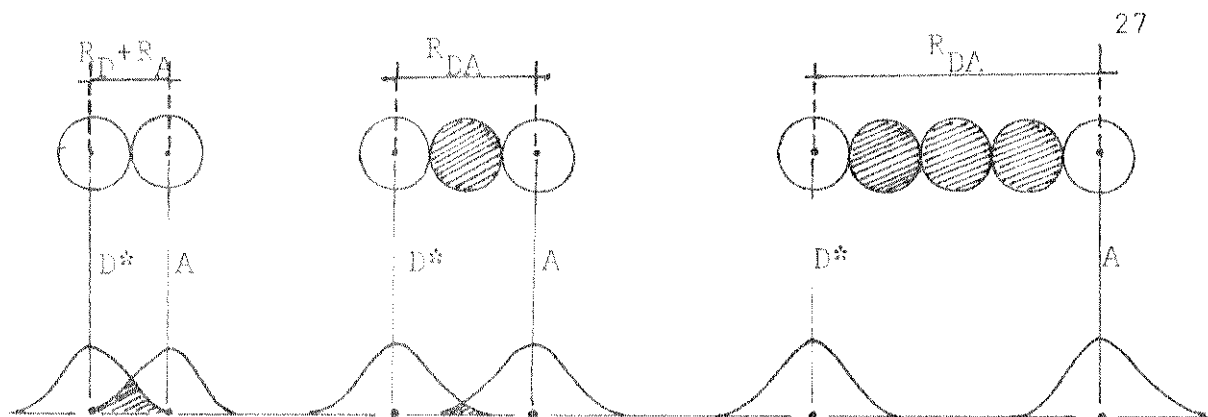
onde há interação do elétron 1 com elétron 2 que provoca a passagem do elétron 2 para o nível ϕA^* com a consequente queda de elétron 1 de ϕD^* para ϕD . Este tipo de transferência pode ocorrer à distância, sendo por isso, chamada de mecanismo de transferência à longa distância.

b) transformação por intercâmbio de elétrons



Neste caso ocorre recobrimento dos orbitais ϕD com ϕA . Há uma interação do tipo elétron-elétron que leva o elétron 1 do ϕD^* passar a ϕA^* e o elétron 2 de ϕA passar para ϕD . É necessário uma colisão entre D^* e A sendo que as distâncias máximas permitidas correspondem ao diâmetro molecular. Evidências experimentais indicam que este mecanismo é melhor explicado por uma interação de troca envolvendo "overlap" de nuvem eletrônica. Assim, o mecanismo de intercâmbio de elétrons é também conhecido como processo colisional de curta distância.

A situação pode ser visualizada através do esquema que se segue (26).

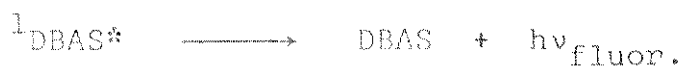


Quando D^* e A estão num estado de colisão "clássica" ($R_{DA} = R_D + R_A$), o recobrimento de nuvens eletrônicas de D^* e A é considerável. Quando D^* e A estão separados por uma pequena molécula de solvente (diâmetro $\sim 5 \text{ \AA}$) não é possível a colisão "clássica" entre D^* e A mas o "overlap" de suas nuvens eletrônicas deve ainda ser finito; para uma distância de separação da ordem de 15 \AA ou mais ($R_{DA} \gg R_D + R_A$), o recobrimento de nuvens eletrônicas torna-se completamente negligenciável.

iii) mecanismo de triplete-triplete excitônico

De acordo com Kasha (44) a excitação de por exemplo DBAS, por transferência de energia de acetona triplete no sistema 2-metilpropanal/HRP/ O_2 , poderia ser excitônica triplete-triplete de longa distância, dependente do efeito de átomos pesados. Kasha postulou uma interação ressonante excitônica entre a transição $T_{n,\pi^*} \leftarrow S_0$ da acetona e a transição de spin orbital perturbada de

$T_2 \leftarrow S_0$ de DBAS como o estado envolvido na interação excitônica triplete-triplete. Logo, o estudo fluorescente de DBAS poderia ser postulado do estado T_2

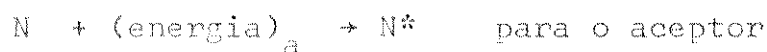
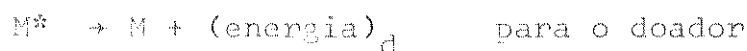


Este mecanismo poderia operar a distâncias de doador-aceptor de $10-20 \text{ \AA}$.

I.5.1 - FATORES QUE GOVERNAM A EFICIÊNCIA DE TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA

1) A probabilidade de transição

A transferência de energia pode ser estimada como uma ocorrência simultânea para duas transições eletrônicas.



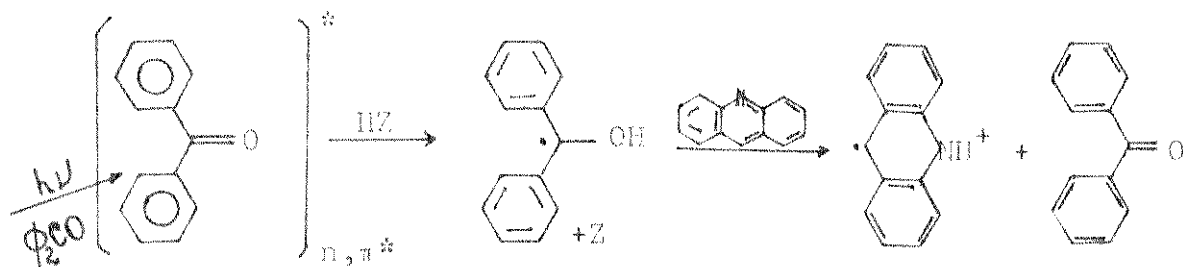
Obviamente a probabilidade de transição individual determinará a eficiência de um processo ligado, isto é, as transições $M^* \rightarrow M$ e $N \rightarrow N^*$ devem ser altamente permitidas para que a transferência de energia seja rápida. Quando as transições são de estado excitado singlete para o estado fundamental singlete, a transformação de energia pode ocorrer pelo mecanismo de ressonância à distância de 5 a 10 nm para moléculas com absorção intensa $S_0 \rightarrow S_1$ (tal como clorofila). Por outro lado, desde que as transições singlete-triplete são proibidas pela regra de spin, a eficiência de transferência de energia T-T é muito mais fraca que a transferência S-S.

2) Sensibilização e supressão

i) sensibilização

Uma reação fotoquímica, $M^* \rightarrow \text{Produtos}$, pode ocorrer pela irradiação direta ($M \rightarrow M^*$) ou pela sensibilização. O tipo mais importante de sensibilização é pela transferência de energia, o sensibilizador S absorvendo a luz irradiada e transferindo a energia de excitação para M . Existem outros tipos de sensibilização chamado de sensibilização química que é oposto à transferência de energia. Em processos químicos S absorve a luz e então sofre uma reação química a qual dá, por exemplo, radicais; estes radicais em turno reagem com M , regenerando S e, finalmente, dando o mesmo produto com uma ir-

radiação direta de M. Um exemplo: sensibilização química de redução de acridine pela benzofenona.



Esquema 15.

ii) supressão

É oposto de sensibilização. Pela adição de um supressor Q para os reagentes M^* é possível irradiar M sem observar uma mudança química, ou pelo menos reduzir rendimentos quânticos da reação comparado com a irradiação direta. Supressão pode ser aplicada somente quando a ação de Q não é meramente um filtro interno, absorvendo a luz irradiada sem sofrer modificações químicas. Pode ocorrer através da transferência de energia $M^* + Q \rightarrow M + Q^*$, ou pelo efeito químico. Um dos papéis mais importantes destes efeitos químicos é aniquilação de radicais livres.

Uma equação que permite uma caracterização

quantitativa de velocidade da eficiência de transferência de energia independente do mecanismo de transferência de energia e a de *Stern-Volmer*.

Sua forma é:

$$\frac{I_0}{I_q} = 1 + K_q \tau^0 |Q|$$

Onde I_0 é a intensidade de emissão de luz na ausência de supressores, I_q é a intensidade de emissão de luz na presença do supressor; $|Q|$ é a concentração correspondente do supressor; e K_q é a constante de velocidade de supressão. O coeficiente angular da reta é $K_q \tau^0$.

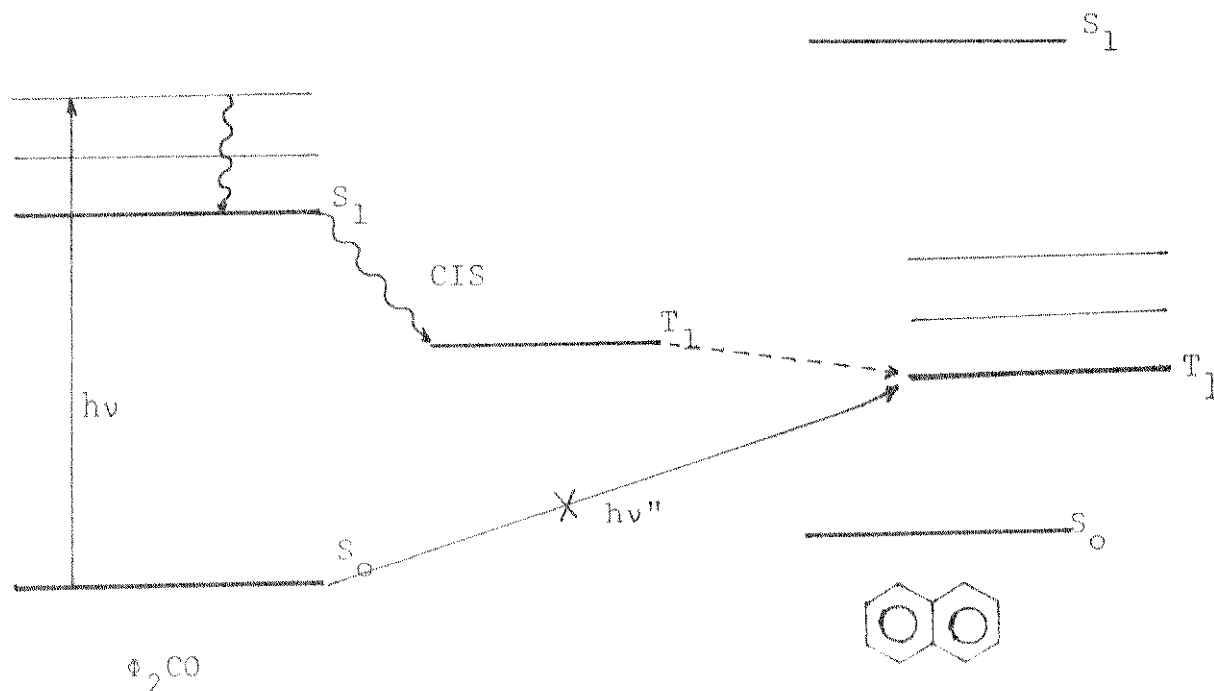
iii) uso de sensibilização e supressão na determinação de estados fotoreativos

Para que uma reação fotoquímica seja compreendida é essencial identificar o estado eletrônico (ou estados) o qual envolve o processo primário.

A identificação daria tres resultados: (i)- a multiplicidade de estado reativo (isto é, singlete ou triplete); (ii)- a energia do estado reativo deve também determinar a ordem deste estado, i.e., se é o estado excitado mais baixo desta multiplicidade ou um estado exci-

tado mais alto; (iii)- a propriedade física do estado reativo ($n - \pi^*$, $\pi - \pi^*$, transferência de carga (CT)).

Esquemáticamente temos:



Esquema 16.

O estado S_1 de naftaleno está bem acima da do benzofenona, portanto é possível irradiar a solução de benzofenona/naftaleno sem se preocupar em qualquer interferência vindo do naftaleno. O triplete T_1 de naftaleno é, entretanto, mais baixo em energia que T_2 de benzofenona, assim a transferência de energia triplete ocorre prontamente.

A energia de um estado triplete reativo ($E_{T(R)}$) pode ser obtido aproximadamente como uma função de uma energia triplete de *supressor* ($E_{T(Q)}$). A condição de eficiência é ter $E_{T(Q)} < E_{T(R)}$.

Os estados tripletes, como já visto, podem ser gerados via cruzamento intersistema e nunca pela irradiação direta devido à transição *proibida* pelo spin (ver Esquema 16 ($T_1 \leftarrow S_0$)).

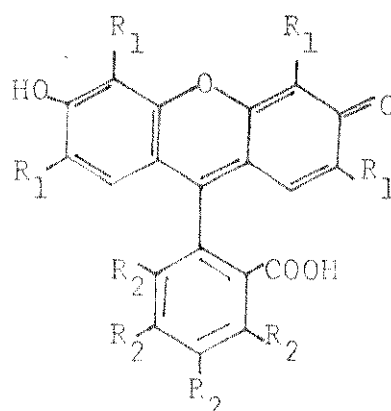
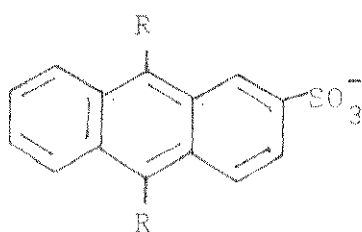
iv) aplicação de sensibilização e supressão em sistemas quimiluminescentes. Determinação de singlete e triplete.

Os estados gerados no sistema enzimático, singlete e triplete, são determinados pelo uso de aceptores emissivos apropriados tais como DEAS (II), DPAS (II), eosina (III), rosa bengala (IV), fluoresceína (V) e DABCO (VI).

Os aceptores emissivos dividem-se em:

antracênicos:

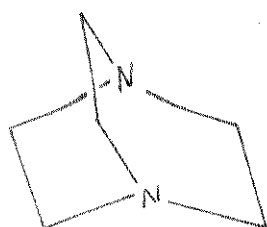
	R	Especificidade	Nome
I	Br	acetona triplete	DBAS
II	ϕ	singlete	DPAS



xantênicos:

	R ₁	R ₂	Especificidade	Nome
III	Br	H	triplete e singlete	eosina
IV	I	Cl	triplete e singlete	rosa bengala
V	H	H	- singlete	fluoresceína

e DABCO (VI) - 2,4-diazobiciclo (2,2,2) octano



O composto DABCO (45) é específico para a determinação de oxigênio singlete: ao mesmo tempo em que suprime a formação de oxigênio singlete excitado tem a capacidade de aumentar a micro bolha de ar (46), aumentando assim o efeito colisional de $^1\text{O}_2$. Este efeito produz maior quantidade de bimoléculas ($^1\text{O}_2$ $^1\text{O}_2$) que por sua vez emitem fótons em maior proporção, pois é sabido que a emissão de fótons das espécies excitadas processam-se na fase gasosa.

Se a análise do espectro de emissão de luz na presença de DPAS mostra um aumento em relação ao sistema controle, é indicativo de que existe carbonilo singlete excitado. Por outro lado, o estudo com DBAS e eosina possibilita a obtenção de dados para o cálculo aproximado do tempo de vida da espécie excitada tripletes formado pelo sistemas biológicos.

O tempo de vida (τ) de uma espécie excitada frequentemente definida em termos de um decaimento de primeira ordem, pode ser calculado pelo recíproco da constante de velocidade de decaimento (K_d)⁻¹ de tal estado (47).

Usando a equação de Wilson (16):

$$\frac{1}{I_{DBAS}} = \frac{K_d}{\phi_F^{DBAS} K_1 K_{TS}} \frac{1}{|D|} + \frac{K_{TS} + K_{TT} + K'_{TS}}{\phi_F^{DBAS} K_1 K_{TS}} \frac{1}{|D|}$$

onde:

I_{DBAS} = intensidade de emissão de luz na presença de DBAS.

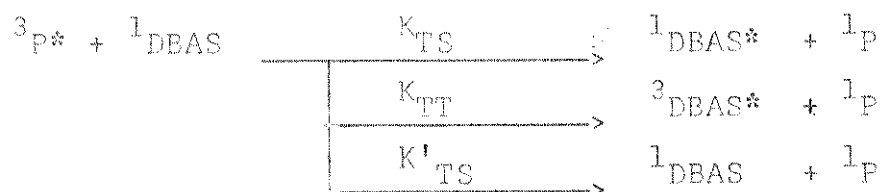
K_d = constante de velocidade de decaimento de $^3P^*$ (acetona) em solução na ausência de DBAS.

ϕ_F^{DBAS} = rendimento de fluorescência de DBAS no solvente e à temperatura do experimento.

K_1 = constante de velocidade de primeira ordem da decomposição do dioxetano.

$|D|$ = concentração do dioxetano e

$K_{TT} K_{TS} K'_{TS}$ = constantes de velocidade para os seguintes processos:



Do gráfico de recíproco duplo, a razão coeficiente linear da reta/coeficiente angular da reta correspondente a:

$$\frac{\text{coeficiente linear}}{\text{coeficiente angular}} = \frac{K_{TS} + K_{TT} + K'_{TS}}{K_d} = K_{ET} \tau$$

logo, pode-se estimar o valor de K_d , sem o conhecimento de ϕ^{DBAS} , K_1 , K_{TS} e $|D|$ desde que o valor da soma das constantes (K_{TS} , K_{TT} , K'_{TS}) seja conhecido.

Assumindo-se que a espécie excitada não seja protegida pelo enzima, e que o processo de transferência de energia seja controlada pela difusão, pode-se usar o valor aproximado de $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (48) para as somas das constantes de velocidade K_{TT} , K_{TS} e K'_{TS} .

Assim estima-se o valor de tempo de vida (τ) da espécie excitada pelo recíproco da constante de decaimento ($1/K_d$). Mas o mais interessante é o valor de $K_{ET}\tau$ que corresponde ao valor da relação de coeficiente linear da reta/coeficiente angular da reta. Para processos colisionais temos um valor de $K_{ET}\tau$ aproximado de $\leq 10^3 \text{ M}^{-1}$ e para o processo de longa distância $\geq 10^4 \text{ M}^{-1}$ (25).

TABELA I.1-

Valores de energia singlete e triplete de DBAS, DPAS, eosina, rosa bengala, acetona, $\lambda_{\text{máx.}}$ de emissão e de excitação.

	λ de excitação (nm)	λ de emissão fluorescente (nm)	Energia em Kcal/mol	
			TRIPLETE	SINGLETE
DBAS	403 ^a	435 ^a	40,2 ^c	70,2 ^c
EOSINA	513	565	43,0 ^c	53,3 ^c
DPAS ^a	403	440	40,6	70,1 ^d
ACETONA	280	435 ^b	80,0 ^e	88,8 ^e
ROSA BENGALA 560		618	39,5 ^c	46,0 ^f

a) O valor é referênte aos derivados sulfonados utilizados nos estudos.

b) λ de emissão fosforescente.

c) Referência (49).

d) Referência (50).

e) Referência (51).

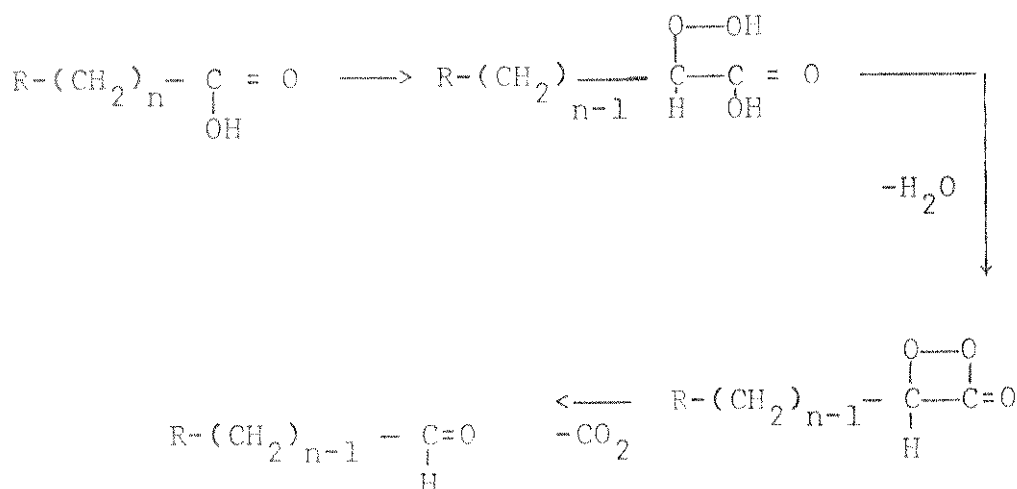
f) Referência (52).

I.6 - OBJETIVO DA TESE

Tem-se cada vez mais reforçado a existência de sistemas biológicos que geram produtos excitados sem, no entanto, emitirem a luz. Surgiu, então, a hipótese de que a energia está sendo utilizada em outros meios, que poderia ser a realização de *trabalhos fotoquímicos*, dado a grande reatividade química desta espécie excitada.

Essa energia de excitação então canalizada pelas reações fotoquímicas úteis, poderia também levar a induzir danos irreparáveis à célula. Seguramente, se essa hipótese for verdadeira, num decurso de tempo muitos processos biológicos tais como a fotossensibilização de alguns tecidos, que normalmente não estão expostos à luz poderão ser explicados dentro deste contexto (53).

Usando-se o sistema 2-metilpropanal/ Enzima/ O_2 (25, 34, 36, 38) constatou-se que a energia eletrônica de acetona triplete pode ser transferida para aceptores exógenos. Também estudou-se a transferência de energia gerada enzimaticamente para aceptores como flavina, clorpromazina e DNA. Usou-se também o sistema do propanal que mimetiza a α -oxidação que é observada em tecidos vegetais e animais (54).



Esquema 17.

Espera-se que o aldeído seja gerado eletronicamente excitado via intermediário dioxetânico.

Em vista da transferência de energia para um aceptor biológico CPZ, que é um composto da classe das fenotiazinas, um antipsicótico muito utilizado, surgiu um estímulo muito grande em estudar o seu comportamento perante as membranas biológicas.

Este interesse relaciona-se ao comportamento próprio do CPZ que produz efeitos fototóxicos e foto-alérgicos mesmo na ausência de luz o que torna um interessante aceptor de energia triplete gerada enzimaticamente(36).

Existem vários trabalhos referentes que mostram efeitos mutagênicos (55), teratogênicos em fetos de ratos (56) e também que CPZ não provoca câncer

mas por sua vez aumenta o número e tamanho dos tumores induzidos por outros agentes carcinogênicos (56).

Logo, para simplificar a compreensão do nosso trabalho em sistemas biológicos foi elaborado uma segunda introdução ligado agora à membrana de eritrócitos e a metodologia usual de estudo neste campo.

I.7 - ESTRUTURA E FUNCIONAMENTO DA MEMBRANA DE ERITRÓCITOS.

I.7.1- MORFOLOGIA E ULTRAESTRUTURA DA MEMBRANA DE ERI - TRÓCITOS.

O eritrócito humano, na ausência de *shearing stress*, tem uma estrutura discóide bicôncava, fig.1.

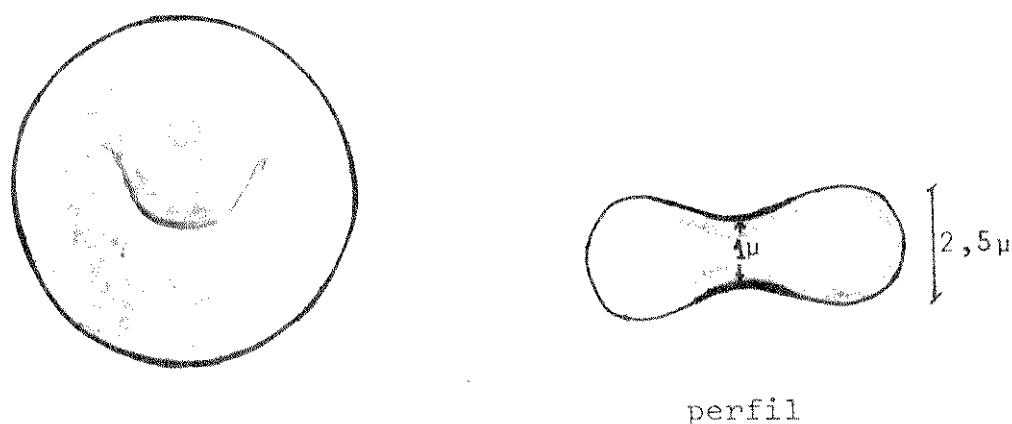


Fig.1

O volume médio corpuscular é aproximadamente $90 \mu^3$ e a área corpuscular média (A) é aproximadamente $140 \mu^2$ (57), mas variações consideráveis ocorrem entre a população numa dada amostra de sangue (58). O maior diâmetro do discóide é ca. $2,5 \mu$ de espessura e o centro é mais delgado e mede menos que 1μ . O índice da esfericidade ($4,84 v^{2/3} / A$) é aproximadamente 0,7. Uma esfera com o mesmo volume de $90 \mu^3$ tem uma área de su-

perfície de somente $97 \mu^2$. Portanto, o discóide normal de eritrócito tem um excesso de área da membrana, o qual permite a deformação para uma larga variedade de estruturas. A deformabilidade remarcável de eritrócitos é demonstrada pela sua habilidade em atravessar estreitos canais capilares que possuem um diâmetro de menos de 3μ (59).

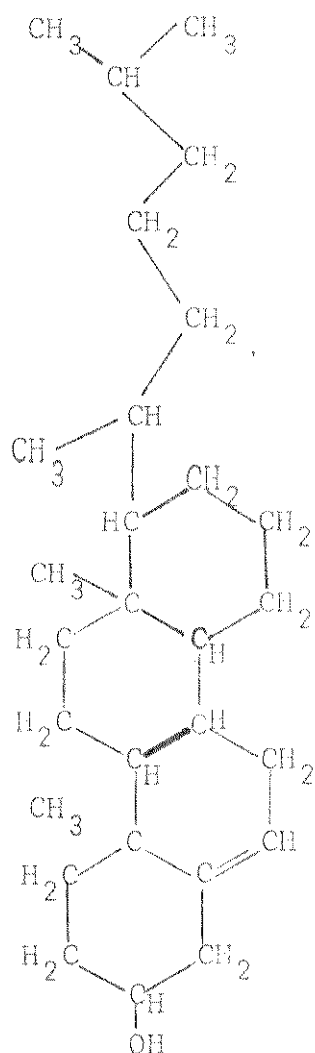
I.7.2- PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS.

A membrana de eritrócito humano é composta primariamente de lipídio e proteína, e os dois estão presentes em aproximadamente igual quantidades em peso.

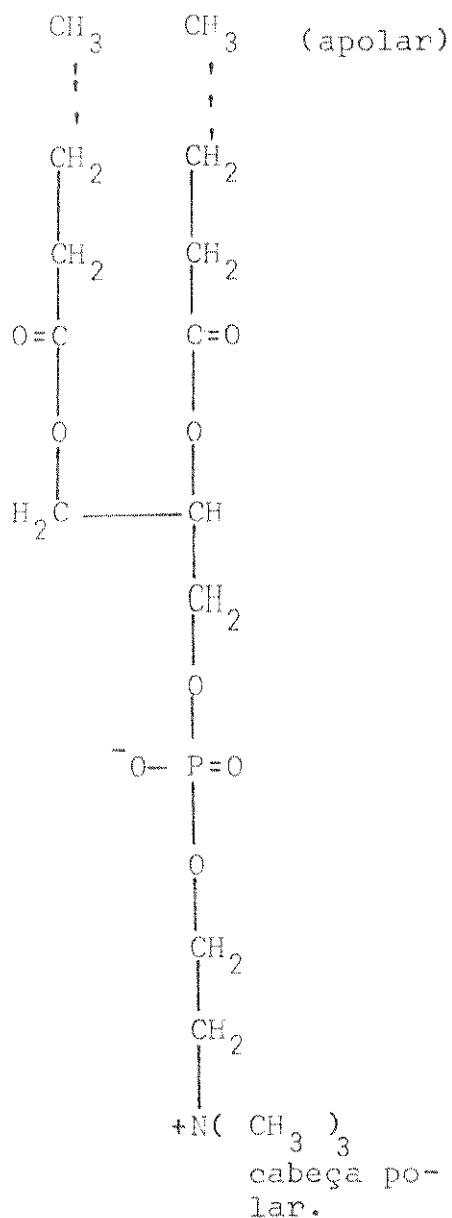
I.7.2.1- Membrana lipídica

Fosfolipídios e colesterol tem aproximadamente 95 % do lipídio total e eles co-existem em aproximadamente igual relação molar.

O colesterol (Fig.2a) em membrana de eritrócito sofre rápida troca com plasma, contendo anéis de átomos de carbono interconectados. Os fosfolipídios são geralmente compostos de um esqueleto de glicerol na qual o terceiro átomo de carbono está ligado em fosfo-diester para uma base. (Ex. colina, etanolamina, serina).



Colesterol (Fig. 2a)

Lecitina(um dos fos-
folipídios).

Os fosfolipídios e os esteróides são moléculas polares; as extremidades diferentes das moléculas possuem propriedades distintas. Uma delas é hidrófoba, tende a ser insolúvel em água. Contudo, grupamen-

tos tais como o grupamento de hidroxila (OH) encontrados numa extremidade de moléculas de colesterol, ou grupamentos nitrogenados ou fosforados carregados eletricamente em uma das extremidades da molécula de fosfolipídio, conferem propriedades hidrófilas às regiões das moléculas nas quais estão presentes.

Acredita-se que os lipídios nas membranas estão arranjados em bicamadas. Assim, a membrana contém duas camadas de fosfolipídios com caldas de hidrocarbonetos formando um centro e o polo ionizado voltado para as superfícies.

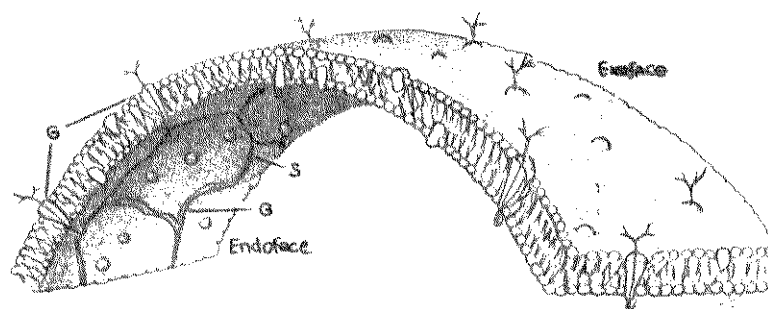


Fig.3 - Estrutura hipotética de membrana de eritrócitos

1.7.2.2 - Membrana proteica

A membrana proteica pode ser classificada em duas categorias: as proteínas periféricas que são encontradas na superfície da membrana com uma ligação livre, onde uma proteína *integral* penetra dentro da

membrana central e são firmemente ligadas ao lipídio. Existe outras proteínas que ocupam somente uma porção de espessura da membrana, mas suas propriedades bioquímicas não tem sido esclarecidas até então, como no caso de glicoforina (glycophorin).

Uma proteína periférica importante na membrana de eritrócitos é o espectrina (spectrin) que é encontrado na endoface e conta aproximadamente 1/4 de proteína total da membrana de eritrócito (59). Esta proteína pode ligar com a proteína de músculo miosina, e tem sido sugerido que possui uma função contractil.

I.7.2.3- Transporte de íons através da membrana

Anion tais como Cl^- e HCO_3^- penetram na membrana de eritrócitos com velocidade de cerca de 10^6 vezes mais rápido que o cátion de tamanho comparável (Na^+ , K^+). O modelo da membrana plasmática como uma membrana bimolecular de lipídios explica a capacidade das pequenas moléculas lipossolúveis de entrar na célula; estas substâncias devem passar, segundo gradiente de concentração, da solução externa à camadas lipídicas e, então, à solução interna. Mas nem sempre isto é possível para uma série de outras substâncias que não são facilmente solúveis em lipídios, atravessar a barreira de camadas lipídicas (59).

Algumas moléculas requerem atividade enzimática para atravessar a membrana. Para explicar a difusão passiva de algumas moléculas para dentro da célula e também para explicar algumas restrições sobre o tamanho da molécula que pode provavelmente entrar, estabelece-se frequentemente a hipótese de que canais especiais atravessam a membrana, interrompendo as camadas lipídicas(59).

I.7.3 - PROPRIEDADES BIOFÍSICAS DA MEMBRANA DE ERITRÓCITOS

Como a hemólise usualmente reflete uma falha mecânica da membrana de eritrócito, é razoável examinar a propriedade do material desta membrana. De fato, Seeman e col. (60) tem encontrado que o escape de K^+ celular depende da velocidade de intumescência (i. e., o gradiente osmótico inicial). O escape de K^+ antes da hemólise presumivelmente resulta da abertura dos canais de transmembrana para íons, como consequência da deformação mecânica sobre a membrana do eritrócito durante a intumescência da célula.

Esta saída de K^+ , junto com um aumento possível em pressão hidrostática dentro da célula, deve servir para retardar o influxo de água e manter um estado quase estacionário (~7 minutos o eritrócito permanece na estrutura esférica antes de ocorrer hemólises)(61).

I.7.4 - HÊMOLISES INDUZIDAS POR AGENTES QUÍMICOS

Algumas drogas e venenos podem induzir mudanças em composição molecular da membrana (59) provocando hemólises de eritrócitos normais. É conhecido que drogas neurolepticas como CPZ são extremamente solúveis na gordura. eles interagem com a membrana num caminho não específico e fluidizam todas as membranas visculares(59).

Uma moderada quantidade destas drogas serve para aumentar a área da membrana e então protege o eritrócito de hemólise osmótica. Porém, a presença de uma concentração muito grande, pode causar ruptura da membrana sucedendo-se a hemólise (62).

Concluindo, a hemólise resulta de um distúrbio do balanço da força na membrana de eritrócito. É que, a força atrativa intermolecular na membrana é excedida pela força físico-química intrínseca que tende a causar a separação de componentes da molécula. Um entendimento da organização molecular e o comportamento biofísico da membrana de eritrócito serve para elucidar o mecanismo patogênico de hemólise em muitas doenças.

I.7.5 - MÉTODOS PARA ESTUDAR HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS

a) medida de hemoglobina

Centrifuga-se a reação incubada por um de

terminado tempo (cinética) numa dada temperatura (37° C). Tira-se o espectro na banda correspondente à hemoglobina (575 nm) do sobrenadante num espectrofotométrico.

b) modificação da membrana

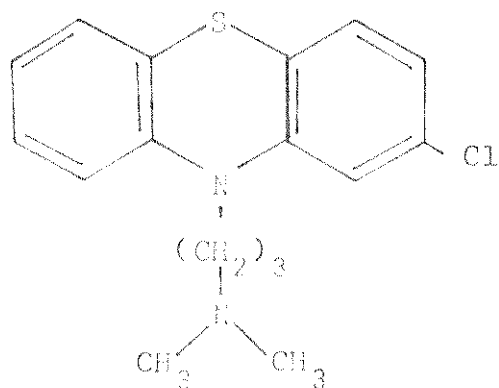
Numa cela de espectrofotometria adiciona-se o sistema de reação. A modificação da membrana é acompanhada a 656 nm (a temperatura constante) que corresponde à banda de absorção de espalhamento de luz de eritrócito não hemolizado.

c) saída de potássio

Verifica-se a saída de potássio do eritrócito utilizando um eletrodo com membrana específica para potássio (gradiente de concentração de potássio).

I.7.6 - EFEITO FARMACOLÓGICO E FOTOQUÍMICO DE CLORPROMAZINA EM ERITRÓCITO HUMANO

Freeman e Spirtes (63) mostraram que CPZ (I) e proclorperazina, in vitro, possuem um forte efeito hemolítico a altas concentrações mas antihemolítico em baixas concentrações (64).



(I) 2-cloro-N-(3-dimetilamino propil) fenotiazina. (CPZ)

O mecanismo de efeito de proteção tem sido estudado e explica-se como uma expansão provocada na membrana ou aumento em volume crítico pela droga. Esta fase de estabilização tem sido descrita como uma fluidização reversível de membrana lipídica e existe evidência que tal fluidização pode ser induzida num modelo de membrana lipídica pelos anestésicos tais como: *halotone*, *tetracaine* e *butacaine*, provavelmente devido ao aumento de desordem da *estrutura lipídica*. Por outro lado é sugerido que a labilização de membrana celular a alta concentração parece não ser devido à denaturação da membrana proteica (64). Estas drogas, então, provocam um distúrbio no arranjo de fosfolipídios e na interação hidrofóbica entre lipídios e proteínas, alterando a permeabilidade da membrana que parece induzir a hemólise.

Em 1979, Naoi e col. (65) usando lipossomas como modelo de membranas verificaram que o halogênio

na posição C-2 da clorpromazina torna-o muito efetivo quanto à permeabilidade da membrana, comparativo à promazina que possui um hidrogênio na posição C-2, a baixas concentrações. Também, segundo Elferink (66) CPZ se liga em ambas as fases: *lipídicas* como também nas *proteicas*.

Pelos resultados obtidos de EPR com marcador de spin visto por Leterrier e Kersanti (67) sugeriram que o CPZ interage preferencialmente com a cabeça polar de fosfolipídios multilamelares arranjados em vesículas de lecitina ao passo que o CPZO (derivado oxidado de CPZ) é encontrado principalmente nas regiões hidrofóbicas de moléculas de lecitina.

Neste encontro, CPZ/membrana, produz uma conversão enzimática de CPZ para sulfóxido (68, 69, 70), como se tem visto in vivo e in vitro e, que é concernente à oxidação da droga pelo peróxido de hidrogênio na presença de peroxidase (HRP) ou catalase (68).

Vem há muito tempo, vários pesquisadores , sugerindo o mecanismo desta reação e principalmente a participação no efeito hemolítico e fototóxico, tais como , pela formação de oxigênio singlete (71) propondo o mecanismo que se segue:





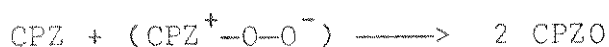
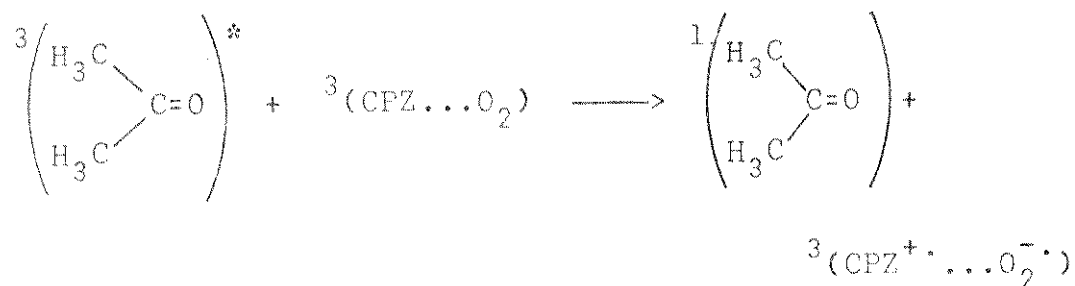
pelos produtos de reação H^+ , HCl e CPZO , e 2-hidroxipromazina (70) utilizado para explicar alguns efeitos colaterais que são observados em pacientes ministrados por clorpromazina.

Mais tarde Durán e col. (36) estudaram o comportamento de CPZ num sistema modelo HRP/CPZ/O_2 na presença de 2-metilpropanal. Neste sistema, um sistema enzimático estudado intensivamente em nosso laboratório, a acetona triplete gerada enzimaticamente via intermediário dioxetane transfere energia para CPZ como indicado:

i) supressão de energia de acetona quimi-fosforescente.

ii) concomitante formação de fotoprodutos de CPZ que é radical cation ($\text{CPZ}^{+\bullet}$) e sulfóxido (CPZO).

iii) inibição de formação de fotoprodutos pela competição eficiente da energia de carbonil triplete usando o sal de sódio 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato (DBAS), propondo o mecanismo similar ao proposto por Tsubomura e col. (72) para complexação de moléculas com o oxigênio formando um complexo de transferência de carga do tipo ($\text{CPZ} \dots \text{O}_2$).



Esquema 18.

I.7.7 - REAÇÃO DE ALDEIDOS COM A MEMBRANA PROTEICA DE ERI TRÓCITOS HUMANO

A anormalidade de eritrócitos associado ao alcoolismo crônico inclui a alteração na morfologia das células, aumentando a fragilidade osmótica e o decréscimo da filtrabilidade. Sugere-se que o acetaldeído, o primeiro produto de oxidação metabólica de etanol, é que provoca alterações de eritrócitos pela reação com espectrina e actina da membrana de eritrócitos.

Embora não exista ainda nenhuma evidência direta de que o acetaldeído liga para uma proteína do eri

trócito humano, mas métodos indiretos mostram que pode se ligar com a proteína e também alterar certas propriedades físicas do eritrócito (73).

Vassar e col. (74) fizeram um estudo sistemático utilizando tres aldeídos diferentes de cadeia curta (acetaldeído, glutaraldeído e formaldeído) verificando que há uma grande porcentagem de entrada de aldeídos dentro da célula onde reage com as proteínas intracelulares e principalmente com a hemoglobina.

Estudos mais recentes, porém, esclarecem a ligação de acetaldeído em eritrócitos de rato mas não do homem(75) focando a importância de hemoglobina no efeito de ligação. Proponha-se que a reação se dá com o grupo sulfidril, mas não se tem tido evidência de que exista na forma ligada in vivo.

II - PARTE EXPERIMENTAL

II.1 - MATERIAL

DROGAS	PROCEDÊNCIA
Peroxidase de rabanete	Sigma Chemical Co.
Superoxidismutase	Sigma Chemical Co.
Catalase	Sigma Chemical Co.
Eosina	E. Merck -D
Rosa Bengala	E. Merck -D
2-Metilpropanal	Aldrich Chemical Co.
Clorpromazina	Rhodia Chemical Co. (Bras)
Sangue Humano	Hemoclinica de Campinas (Bras)
Azida de Sódio	Aldrich Chemical Co.
Triton X-100	Sigma Chemical Co.
Ácido Fôrmico	J.T. Backer Chemical Co.
Bicarbonato de Sódio	
1,4-diazobiciclo(2,2,2)octano	Sigma Chemical Co.
Álcool Etílico	Aldrich Chemical Co.
Fosfato Monobásico de Potássio	Carlo Erba

DROGASPROCEDÊNCIA

Fosfato Dibásico
de Potássio

Carlo Erba

Pirofosfato de Sódio

E. Merck -D

Riboflavina

E. Merck -D

Cloreto de Sódio

Carlo Erba

II.2 - APARELHAGEM

O consumo de oxigênio foi medido num monitor biológico da Yellow Springs Instruments, modelo 53, termostatizado.

Os espectros na região ultra-violeta e visível foram obtidos num espectrofotômetro com registrador Zeiss DMR-21. Utilizou-se celas de 1cm de caminho óptico.

Para medidas de emissões débeis foi utilizado um contador de cintilação líquida da Beckman LS-250, com circuito de coincidência desligado.

A intensidade e distribuição espectral de quimiluminescência e fluorescência foram medidas no espectrofluorímetro Perkin-Elmer MPF-4, sem efetuar correção para o comprimento de onda ou flutuação de intensidade da fonte de excitação.

A detecção de fotoprodutos na mistura final da reação do sistema enzimático foi feita em cromatografia de camada delgada (76). Os valores de pH foram medidos num potenciômetro da Beckman e o efluxo de K^+ foi medido num eletrodo seletivo de potássio Modelo 92-14 (Orion Research).

II.3 - MÉTODOS

II.3.1 - PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO TAMPÃO

A solução tampão foi preparada segundo Gomori (77).

II.3.2 - SOLUÇÃO DE 2-METILPROPANAL

A solução de 2-metilpropanal foi preparada em etanol (1:4;V:V (2,2 M)) respectivamente, imediatamente antes de seu uso.

II.3.3 - SOLUÇÃO DE PEROXIDASE (HRP) DE RABANETE

As soluções estoque de HRP foram preparadas pela dissolução de massa adequada em meio aquoso ($2,5 \times 10^{-4}$ M) e o seu $\epsilon_{403} = 103.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

II.3.4 - PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO DE DBAS E DPAS

DBAS foi preparado pela sulfonação de DBA conforme descrito por Battergay e Brandt (78). O DPAS foi preparado pela sulfonação de DPA seguindo o método de Etienne e col.(79). Calculou-se as concentrações de DBAS e DPAS através de suas absortividades molares determinadas espectralmente $\epsilon_{382} = 8940 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, $\epsilon_{375} = 5040 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ respectivamente.

Essas soluções eram preparadas em água com 2% de etanol.

II.3.5 - SOLUÇÃO DE RIBOFLAVINA

As soluções estoque de riboflavina foram preparadas em NaOH a $1,0 \times 10^{-2} M$ mantidas no escuro. Utilizou-se somente até 12 horas após a preparação (fotosensível).

II.3.6 - SOLUÇÃO DE CLORPROMAZINA

As soluções estoque de clorpromazina foram feitas em água e mantidas no escuro. Usou-se absortividade molar ($\epsilon = 3.500$) a fim de verificar alguma alteração na concentração após alguns dias de preparo (fotosensível).

II.3.7 - SOLUÇÃO DE CATALASE E SUA DOSAGEM

A concentração de catalase foi determinada espectrofotometricamente através da medida de absorção a 405 nm ($\epsilon = 340 \text{ cm}^{-1} M^{-1}$) (80) e a atividade, determinada acompanhando a queda de absorbância de H_2O_2 a 240 nm.

II.3.8 - PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ERITRÓCITOS

Soluções estoque de eritrócitos, doado por um adulto normal, eram preparadas lavando e centrifugando a $1500 \times g$ por 15 minutos por tres vezes o hematocrito isento de soro com uma solução salina fisiológica. O eri-

trócito era mantido aproximadamente a 4° C a 40% de hematócrito na mesma solução salina usada para a lavagem.

II.3.9- PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS

As membranas de eritrócitos são preparadas pela hemólise com 30 ou 100 volumes de 10 mM de Tris, pH 7,4 a 4° C. Centrifuga-se.

Em seguida, lava-se por tres vezes com o mesmo tampão e a mesma temperatura. O volume de 0,1 ml da membrana foi dissolvido em 0,05 ml de 0,2% de Triton X-100 diluído em 1:10 com 10 mM Tris a pH 7,4 e deixa-se assim por doze horas a 0° C. Para a extração de proteína da membrana de eritrócito em meio ácido seguiu-se o método de Bragança e col. (81).

II.3.10 - SOLUÇÃO SALINA FISIOLÓGICA.

O tampão NaCl é preparado como se segue:

$$C_{\text{NaCl}} = 0,139 \text{ mol/l}$$

$$C_{\text{monofosfato de sódio}} = 0,0010 \text{ mol/l}$$

$$C_{\text{difosfato de sódio}} = 0,0088 \text{ mol/l}$$

$$\text{pH} = 7,4$$

segundo o método de Parpart e col. (82).

II.4 - IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE REAÇÃO

II.4.1 - ACETONA E ÁCIDO FÓRMICO

A acetona foi identificada através da formação do seu derivado 2,4-dinitrofenilhidrazona (76) detectada pelo método de cromatografia de camada delgada (sílica gel) comparando ao padrão através do seu Rf. O eluente utilizado foi a solução de Benzeno/Hexano (1:1).

O ácido fórmico por sua vez, foi identificado com o método de cloreto de mercúrio (83).

A mistura da reação foi deixada em recipiente hermêticamente fechado e no escuro a temperatura ambiente por 96 horas aproximadamente. Esse procedimento garante-nos uma quantidade razoável de fotoprodutos.

II.4.2 - CLORPROMAZINA E SEUS PRODUTOS DE REAÇÃO

Os fotoprodutos da reação enzimática esperados CPZO e CPZ⁺ foram detectados pelo método de espectrofluorimetria e densidade óptica respectivamente (36).

Seguem-se as especificações:

TABELA .II.2-

	λ de excitação nm	λ de emissão nm
CPZ	335	465
CPZO	335	380
CPZ ⁺		572 ^a

a) λ de absorção constante - acompanha-se a cinética do decaimento de radical cation.

III- RESULTADOS

III.1 - PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS DO SISTEMA
2-METILPROPANA/ERITRÓCITO/O₂

A determinação de condição ótima para a realização do experimento da oxidação aeróbica de 2-metilpropanal catalizada pela enzima da própria membrana de eritrócitos humano, foi feita em termos de temperatura (Fig.1.1) e concentração de substratos (Fig.1.2). Para este evento acompanhou-se o aparecimento da hemoglobina no meio reacional a 575 nm (banda de absorção de hemoglobina).

Notou-se alta sensibilidade do sistema enzimático em relação à variação de temperatura e às variações das concentrações de substratos. Portanto, após estes estudos, passamos a utilizar as condições experimentais padrões: 2-metilpropanal 84 mM, 0,27 mM de CPZ em tampão 1,0 M de fosfato e 0,1 M de pirofosfato a pH 7,4, sendo que as concentrações do tampão fosfato são referentes às concentrações iniciais para um volume final de 2,6 mL a 37° C. A estas concentrações e temperatura como pode ser visto nas Figuras 1.1 e 1.2, há ~50 % de hemólise num tempo de vinte minutos de reação. Após este período, a hemoglobina se decompõe com o próprio meio de reação.

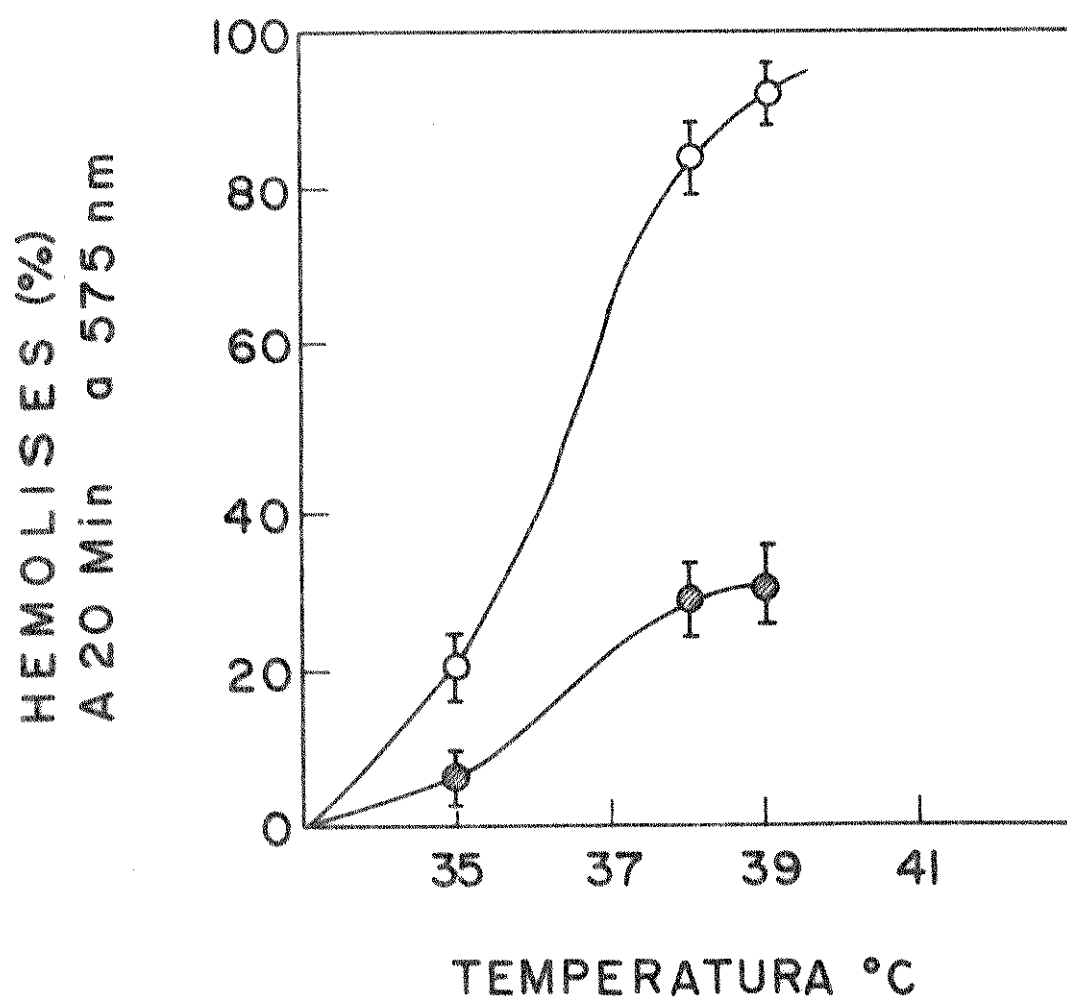


Fig.1.1 - Efeito de temperatura na hemolise de celula vermelha tratada com 0,27 mM de CPZ e 84 mM de 2-metil propanal. (a) CPZ (-O-) e (b) CPZ - 2-metil propanal (-●-). Em tampão PI 1,0 M PPI 0,1 M pH 7,4.

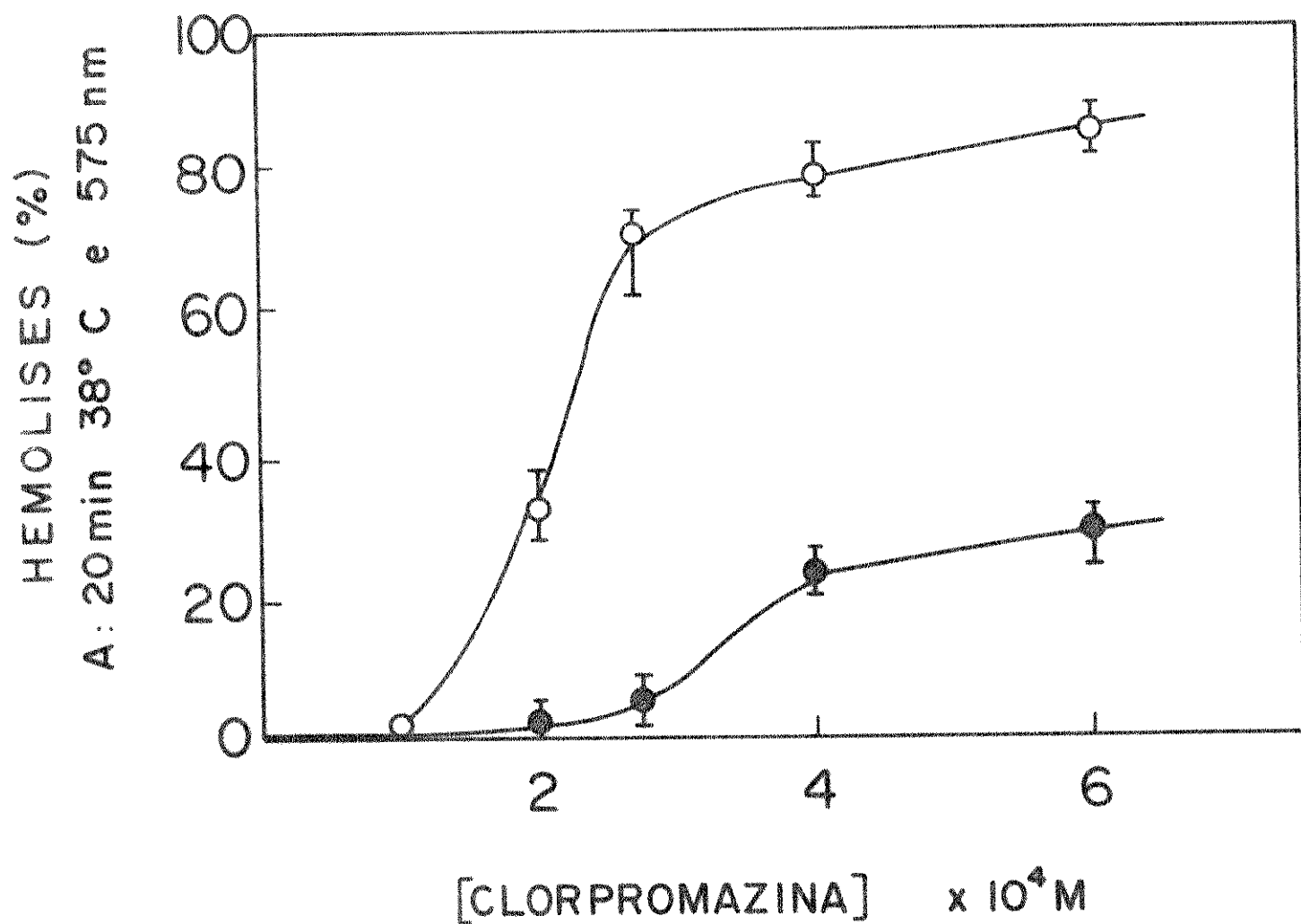


Fig.1.2 — Efeito hemolítico de CPZ e 84mM de 2-metil propanal sobre a célula vermelha medido a 20 minutos de incubação a 38° C. (a) CPZ (-o-) e (b) CPZ + 2-metil propanal (-•-). Em tampão Pi 1,0 M, PPi 0,1 M pH 7,4.

III.2 - REAÇÃO COM 2-METILPROPANAL/ERITRÓCITO/O₂

Quando são adicionados 84 mM de 2-metilpropanal para uma solução reacional nota-se 20% de clivagem da membrana acompanhando a absorbância a 656 nm, onde a absorção de hemoglobina é desprezível (Fig. 2.3).

Esta absorção aparentemente é devido ao alto espalhamento de células não hemolizadas. O mesmo estudo foi feito seguindo o aparecimento de hemoglobina na meio reacional acompanhando a banda de absorção a 575 nm.

Durante a interação de 2-metilpropanal com eritrócitos, observa-se o consumo de oxigênio e paralelamente emissão de fótons (Fig. 2.4). Estes vão acompanhados do efeito hemolítico (Fig. 2.3) que é dependente de oxigênio (Tabela III.3).

Dentro do erro experimental existe uma excelente correlação entre hemólise, consumo de oxigênio e emissão de fótons (Fig. 2.5).

III.2.1 - PRODUTOS DE REAÇÃO

Numa reação enzimática, onde supõe-se que o intermediário seja um dioxetano, o produto da reação acetona foi identificado por cromatografia de camada delgada (76) e o ácido fórmico pela reação com cloreto de

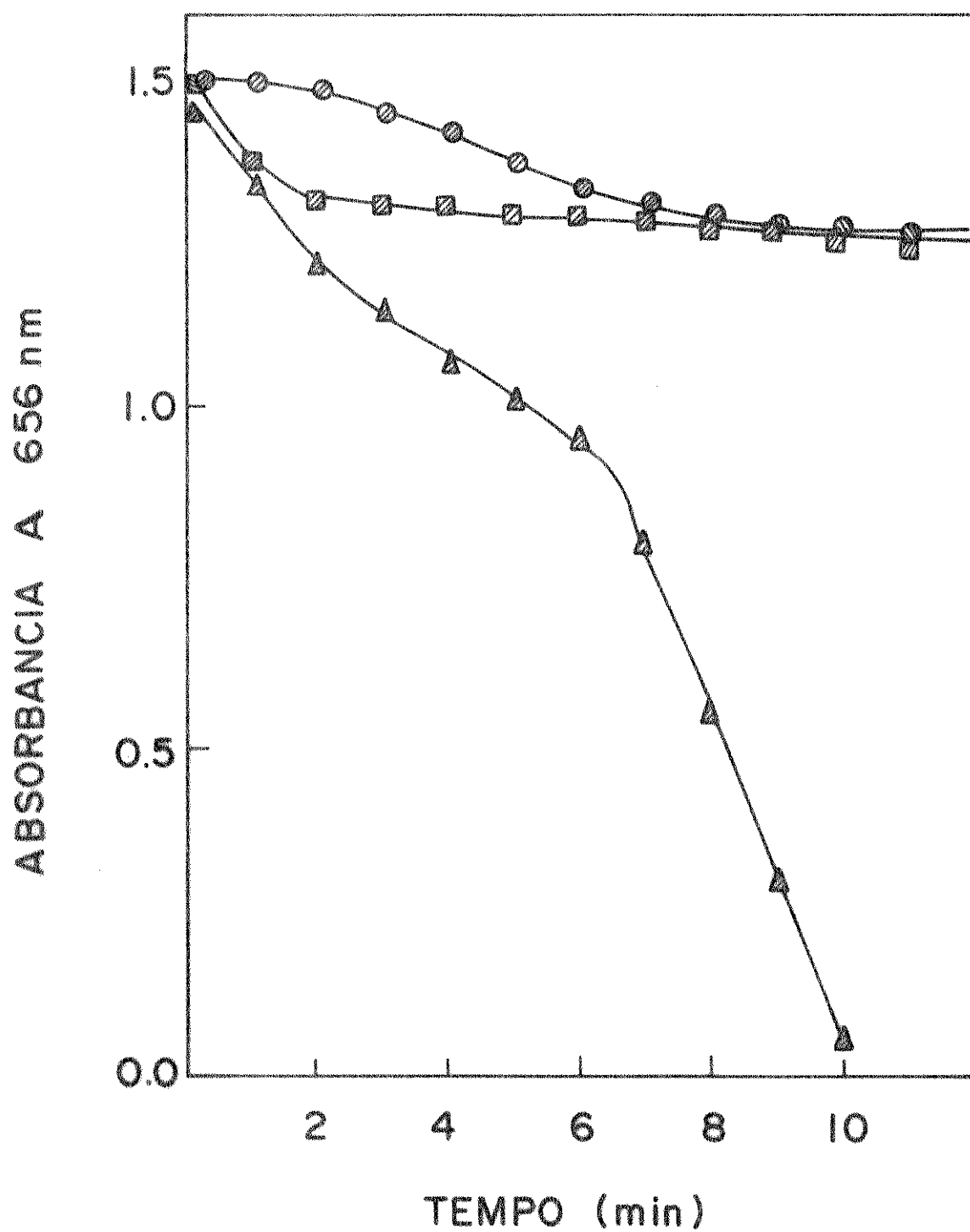


Fig.2.3 - Quebra de células vermelhas por 0,27 mM de CPZ e 84 mM de 2-metil propanal a 37°C. (a) CPZ (-●-); (b) 2-metil propanal; (-■-); (c) CPZ e 2-metil propanal (-▲-). Em tampão PI 1,0 M, PPI 0,1 M pH 7,4 a 37°C.

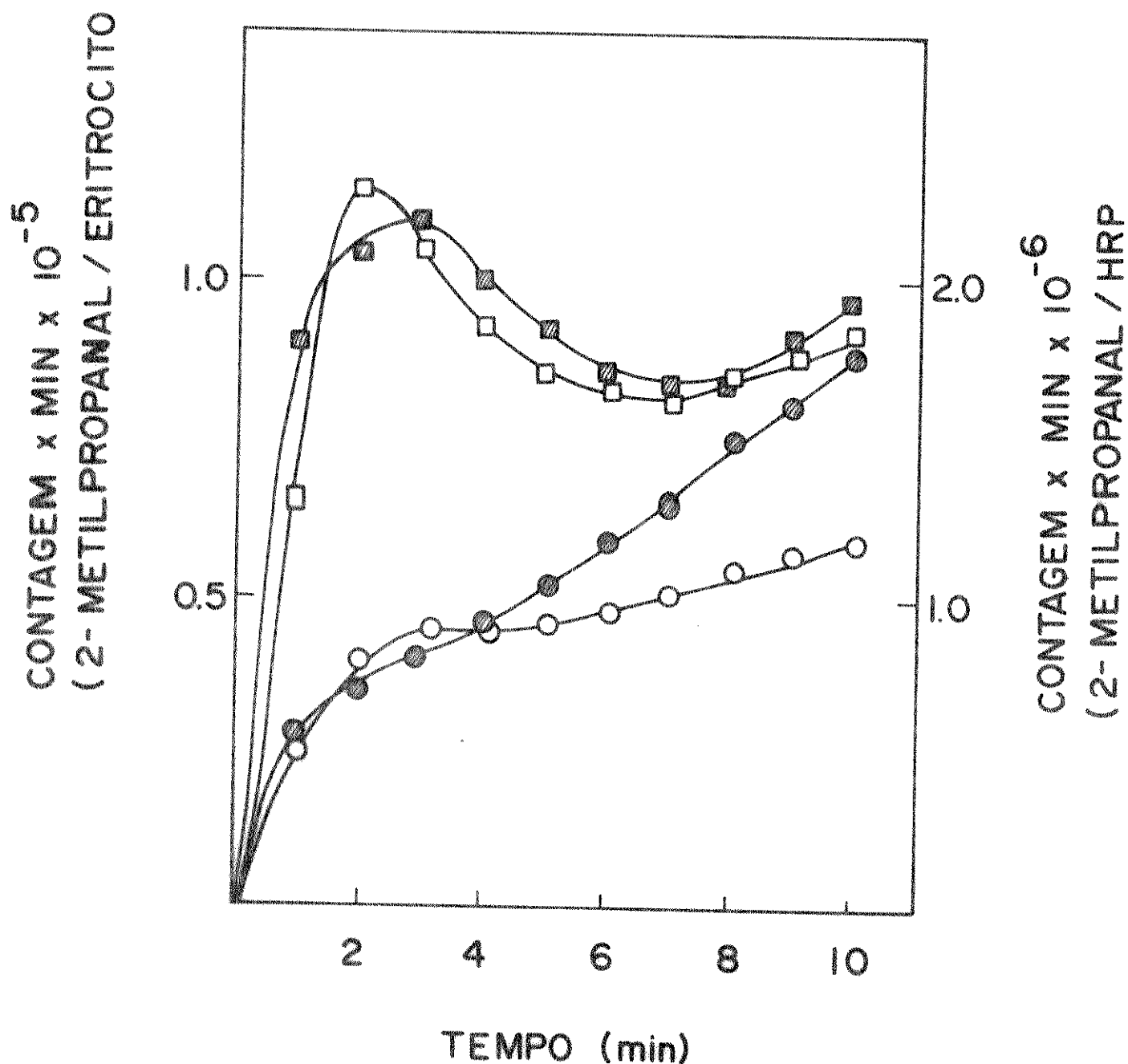


Fig. 2.4 — Efeito de DBAS sobre a velocidade de emissão de fótons pelos sistemas 2-metilpropanal/HRP/O₂ e 2-metilpropanal/ERITRÓCITO/O₂: (a) 2 μM de DBAS, 42 mM de 2-metilpropanal, 2 μM de HRP (Tipo VI) (—□—), e na ausência de DBAS (—○—); (b) 8,5 μM de DBAS, 84 mM de 2-metilpropanal e 50 μl de célula vermelha (40%) (—■—), e na ausência de DBAS (—●—), à condição padrão. Em tampão PI 1,0 M, PPI 0,1 M a pH 7,4.

TABELA III.3 -

Influência de várias substâncias sobre emissão de fótons integrado e hemólises durante a integração de 2-metilpropanal/eritrócito humano.

O meio de reação contém 50 μ l de eritrócito humano: (40% em tampão isotônico de cloreto de sódio) em tampão 1,0M de fosfato a pH 7,4 e tampão 0,1 M de pirofosfato a pH 7,4 , a 37° C.

	EMIÇÃO INTE GRADA A 6MIN. CONT.x 10 ⁻⁶	ABSORÇÃO MEMBRANAS GUINDO A BAN DA DE 656 nm A 6 MIN.	DE PORCENTAGEM DE HEMOLISE SEGUINDO A 6 MIN.	PORCENTAGEM DE PROTEÇÃO A A 6 MIN.
Eritrócito ^a	0,0	1,500	0,0	-
2-metilpropanal/ (84 mM)/eritrócito	12,3	1,395	20,0	-
+ DPAS (24 μ M)	15,2	1,370	23,0	-
+ DBAS (10 μ M)	40,0	1,415	16,0	20,0
+ Eosina (100 μ M)	44,0	1,450	5,3	53,0
+ Rosa Bengala (25 μ M)	42,0	1,430	16,6	17,0
+ Azida (10 mM)	8,0	1,422	15,0	25,0
+ DABCO (10 mM)	19,4	1,395	20,0	-
+ DABCO (20 mM)	21,7	1,395	20,0	-
+ HCO ₃ ⁻ (20 mM)	14,0	1,395	20,0	-
+ Benzoato (10,0 mM)	10,0	1,395	20,0	-
+ Ar	250,0 ^b	-	-	-
+ Oxigênio (5 min.)	329,2 ^b	-	-	-
+ Nitrogênio(5 min.)	248,9 ^b	-	-	-

a) Na ausência de aceptores. Bicarbonato, azida ou gas isoladamente não altera o eritrócito na condição da reação.

b) Tempo de contagem de 30 minutos.

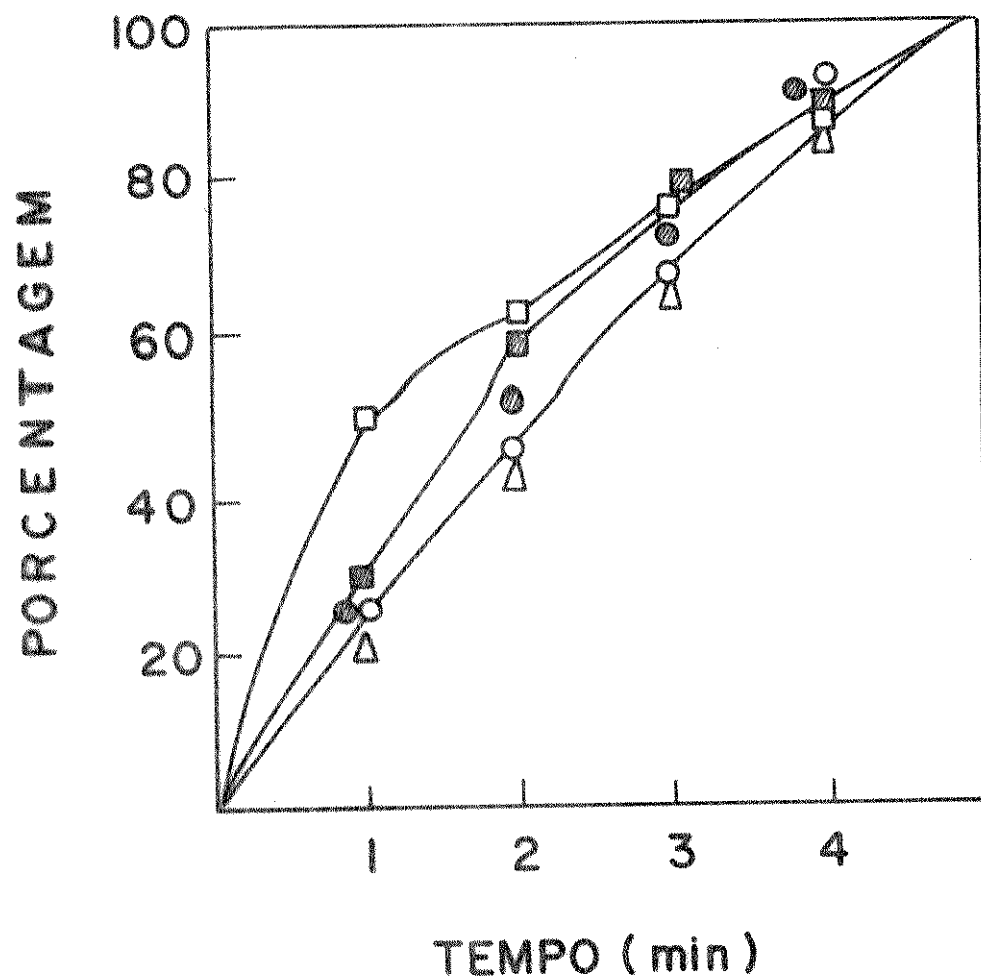


Fig. 2.5- Correlação entre consumo de oxigênio (—O—), emissão de luz (—Δ—), hemólise (segundo a banda de absorção de hemoglobina a 575 nm) (—■—), modificação de membrana (banda de absorção a 656 nm) (—●—), ion potássio extracelular (—□—) quando 50 μ l de célula vermelha era hemolisado a condição padrão na presença de 84 mM de 2-metil propanal. Em tampão Pi 1,0 M, PPI 0,1 M pH 7,4, a 37°C.

mercúrio (83).

III.2.2 - UTILIZAÇÃO DE ACCEPTORES EMISSIVOS

A figura 2.4 mostra a similaridade da velocidade de emissão entre os sistemas 2-metilpropanal/HRP/ O_2 e o 2-metilpropanal/ERITRÓCITO/ O_2 . Este sistema de 2-metilpropanal produz uma emissão bastante fraca que é aumentada quando adicionamos um acceptor emissivo halogenado.

Na Tabela III.3. sumarizamos os dados referentes ao comportamento do sistema perante os aceptores emissivos halogenados, aniquiladores de radicais e outros.

Obtém-se esses dados acima referidos a partir do espectro de emissão de luz total, num cintilador líquido e integrados a 6 minutos, confrontando com os demais tais como o espectro de espalhamento de luz de eritrócitos e aparecimento de hemoglobina no meio reacional por hemólise dos eritrócitos. Nenhum dos sistemas sensibilizados produziram efeito sobre o eritrócito na ausência de 2-metilpropanal.

III.2.3 - RESULTADOS DA REAÇÃO BIOENERGIZADA

Para os sistemas com DBAS e eosina foram graficadas duplas recíprocas de aumento de emissão de fó-

tons. As curvas mostraram ser lineares e os valores de $K_{ET}\tau$ foram calculados (Fig.2.6),

$$K_{ET}\tau_{DBAS}^O = 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$$

$$K_{ET}\tau_{eosina}^O = 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$$

apresentando ser maiores que o $K_{ET}\tau$ obtido para o ácido sórbico ($1,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) que é um valor para efeitos colisionais.

III.2.4 - ESTUDO DE ATIVIDADE PEROXIDÁTICA DOS ENZIMAS RE- TIDOS NA MEMBRANA DO ERITRÓCITO

Quando 0,1 ml de membrana solubilizada de eritrócito era usada (ver item II.3.9) encontrou-se uma atividade equivalente de peroxidase de rabanete de $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ /0,1 ml de membrana original (Fig.2.7).

Observou-se também atividade na proteína extraída da membrana celular no meio ácido com o sistema de 2-metilpropanal (Fig.2.8). Esta reação requer uma sequência de adição de componentes numa ordem tal: tampão/2-metilpropanal/HRP/ O_2 ou tampão/2-metilpropanal/membrana dissolvida/ O_2 .

III.2.5 - REAÇÕES CONTROLES

Não foi observada nenhuma reação de 2-me-

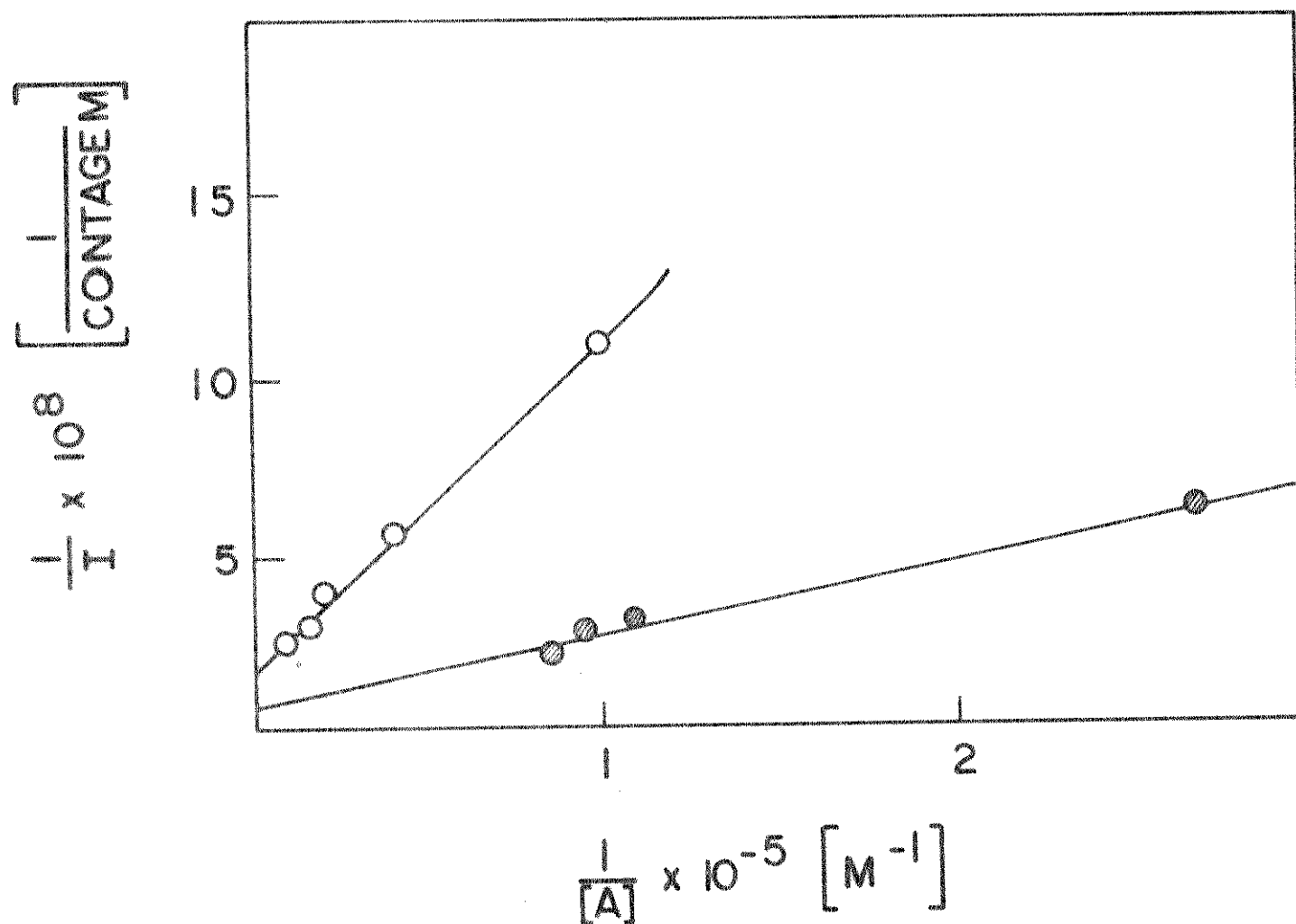


Fig.2.6 - Gráfico de dupla recíproca do efeito de DBAS (●) e eosina (O) no sistema de emissão de fótons à condição padrão, fig.2.4, em tampão PI 1,0M ,PPI 0,1 M pH 7,4.

tilpropanal com hemoglobina, metahemoglobina e catalase (componentes naturais de um eritrócito).

Não houve mudanças de reatividade do sistema 2-metilpropanal/Eritrócito/ O_2 na presença de bicarbonato e benzoato, indicando ausência de espécies reativas como radical OH^\cdot . Mas, a reação na presença de 10 mM de azida de sódio provocou uma proteção de 25% de hemólise de eritrócito. A azida é conhecida como inibidor de peroxidação.

O experimento com DABCO mostrou um aumento de emissão de fótons (a 6 min.) (Tab.III.3) indicando uma pequena presença de oxigênio singlete no sistema de reação.

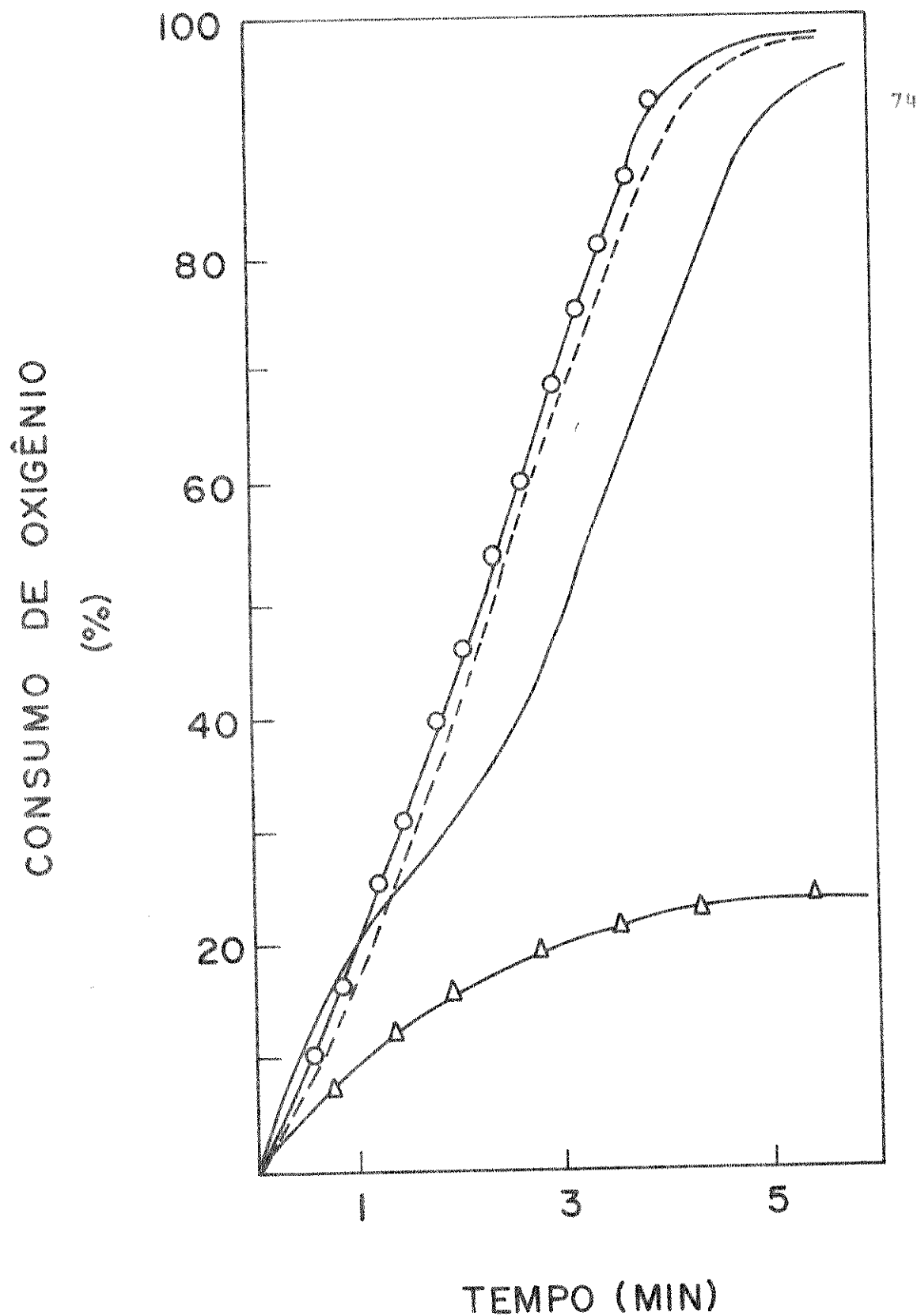


Fig. 2.7 - Consumo de oxigênio de 84 mM de 2-metil propanal na presença de : (a) HRP 2mM (Tipo VI) (---○---); (b) 0,1 ml de membrana dissolvida (----) e na ausência de enzima (Δ). Consumo de oxigênio de 0,1 ml membrana dissolvida + 84 mM de IBAL (—) à condição padrão. Em tampão Pi 1,0 M PPI 0,1 M pH 7,4 a 37°C.

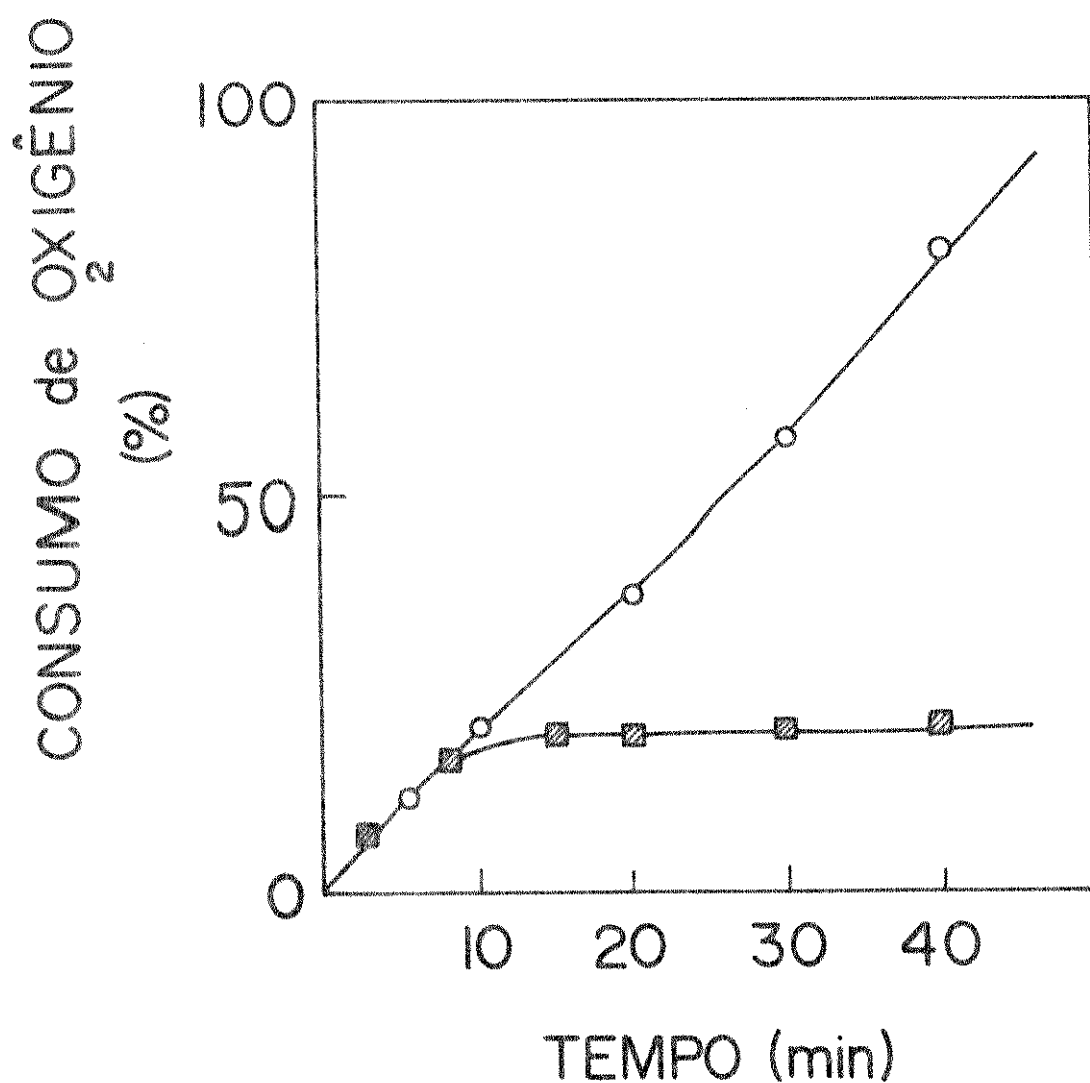


Fig. 2.8 - Consumo de oxigênio de 84 mM IBAL e proteína extraída de células vermelhas hemolisadas com ácido: (a) 0,2 ml de solução de proteína (0,06 mg/ml), 30 mM de Mn^{+2} (O); (b) 2-metil propanal e 30 mM de Mn^{+2} (■) a condição padrão, em tampão Pi 1,0 M PPI 0,1 M pH 7,4 à 37° C.

III.3 - EFEITO SINÉRGICO DE CLORPROMAZINA E 2-METILPROPANAL SOBRE A HEMÓLISE DE ERITRÓCITOS HUMANOS

Os compostos carbonílicos eletronicamente excitados e gerados num sistema enzimático, podem transferir suas energias de excitação para aceptores emissivos (38) como por exemplo CPZ. O que nos interessava a seguir era induzir um fotoproc^oss^o no escuro (84) com estas espécies excitadas.

III.3.1 - REAÇÃO NA PRESENÇA DE CLORPROMAZINA E 2-METILPROPANAL

Os eritrócitos são tratados com 2-metilpropanal e clorpromazina(CPZ) separadamente onde provocam um mínimo de hemólise do componente .

Observa-se, porém, um forte efeito sinérgico (Fig.2.3) quando estes dois substratos estão presentes numa mesma solução reacional.

III.3.2 - MODIFICAÇÃO NA ESTRUTURA DA MEMBRANA

O efluxo de íon K^+ de eritrócito após a exposição de 0,27 mM de CPZ e 84 mM de 2-metilpropanal separadamente mostrou um aumento gradativo com o tempo. Quando na solução reacional ambos eram adicionados simultaneamente, um efeito muito acentuado foi observado (Fig. 3.9), indicando que existe um aumento na permeabilidade da mem-

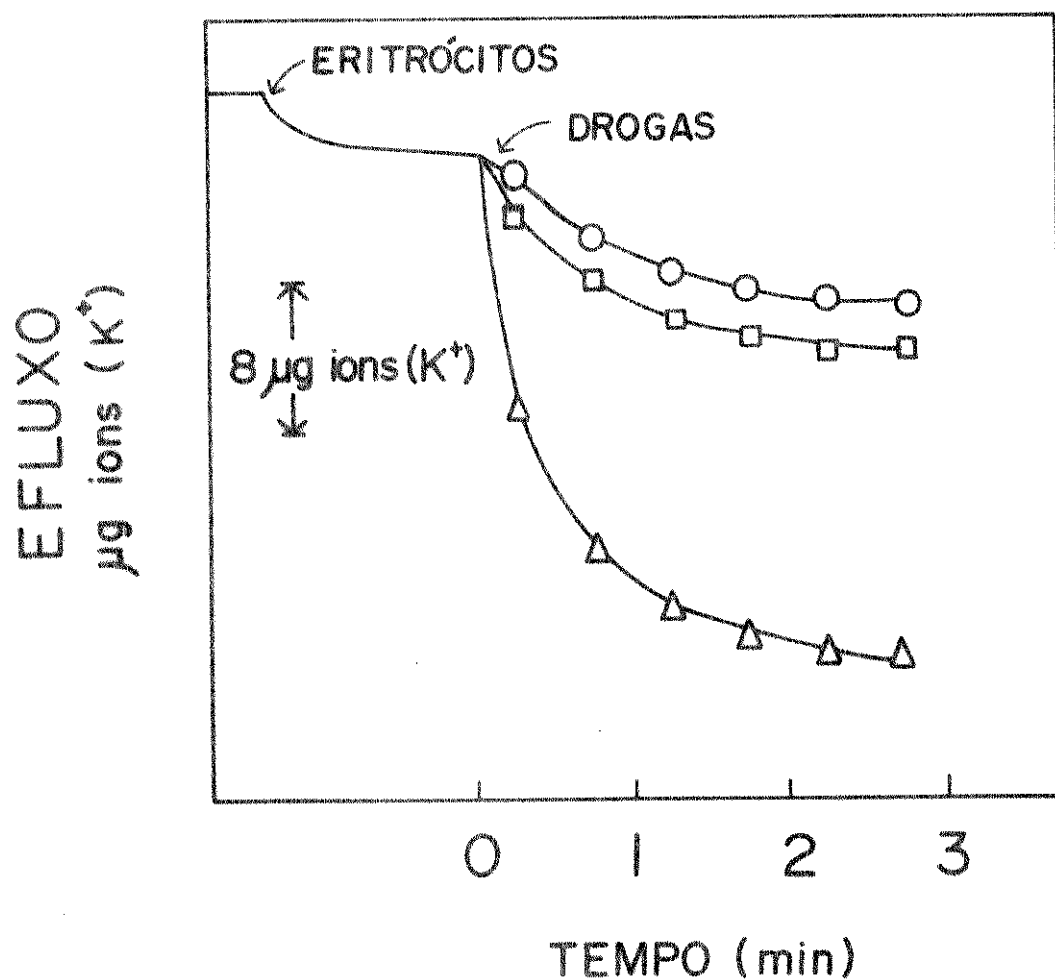


Fig. 3.9 - Efluxo de íon K^+ de células vermelhas após exposição de 0,27 mM de CPZ e 84 mM de IBAL: (a) CPZ (O); (b) 2-metil propanal (□) e (c) CPZ e 2-metil propanal (Δ) à condição padrão usando um eletrodo seletivo de potássio Modelo 92-14 (Orion Research). Em tampão PI 1,0 M PPI 0,1 M pH 7,4 à 37° C.

brana para estes elementos. O tempo gasto para o aparecimento de íon K^+ no meio reacional é muito rápido que para o aparecimento de hemoglobina, como pode ser visto na (Fig. 2.5).

III.3.3 - EFEITO DE ACCEPTOR EMISSIVO NA PRESENÇA DE CLOR-PROMAZINA

Desde que o CPZ é um excelente acceptor de energia triplete de acetona excitada, o qual é indicado pela supressão de emissão de fótons (36), podemos notar a proteção de hemólise na presença de um acceptor xantênico (Fig.3.10 e a Tabela III.4) . Nota-se também uma certa modificação no comportamento de membranas acompanhando a 656 nm quando adicionamos HRP externo, oxigênio, nitrogênio e riboflavina no sistema de reação. Os resultados mostraram maior efeito quando se adiciona o oxigênio, indicando que o processo é oxidativo. A peroxidase externa é um protetor parcial do eritrócito de hemólise por interagir com 2-metilpropanal antes do mesmo penetrar na membrana. A eosina também mostrou ser um protetor parcial da hemólise, interagindo com a acetona triplete gerada no sistema enzimático por transferência de energia.

III.3.4 - ESTUDO COMPARATIVO DOS SISTEMAS: 2-METILPROPANAL/HRP/CPZ/ O_2 (SISTEMA MODELO) E 2-METILPROPANAL/ERITRÓCITO/CPZ/ O_2 EM CONSUMO DE OXIGÊNIO

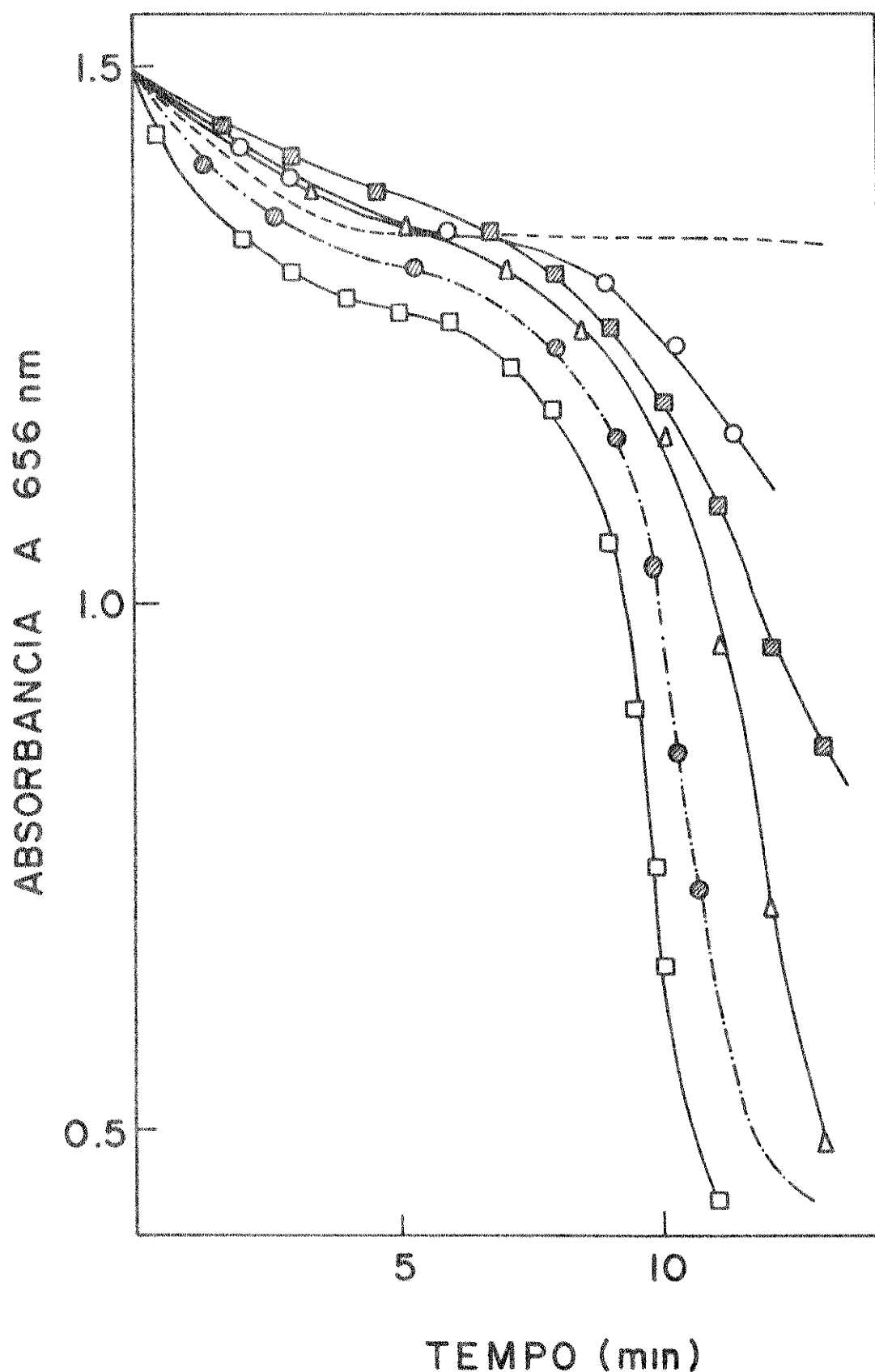


Fig. 3.10— Quebra de eritrócitos por 0,27 mM de CPZ e 84 mM de 2-metil propanal a 37° C. (a) suspensão de eritrócito (----); e 2-metil propanal (-----); e CPZ (----); (b) suspensão de eritrócito, 2-metil propanal e CPZ; na presença de : ar (●); oxigênio (□); nitrogênio (Δ); 2 μM de HRP (○); 25 μM de eosina (■). Em tampão Pi 1,0 M PPI 0,1 M pH 7,4, acompanhando a 656 nm.

TABELA III.4-

Influência de CPZ e corantes xantênicos na emissão de fótons integrada durante a interação de 2-metilpropanal e eritrócitos humano.

O meio da reação contém 50 µl de eritrócito humano (40% de hematócrito tamponado com cloreto de sódio) em 1,0 M de tampão fosfato a pH 7,4 e 0,1 M de tampão pirofosfato a pH 7,4, a 37⁰ C.

EMISSION INTEGRADA A 10 MIN. CONT. x 10 ⁻⁶		EMISSION INTEGRADA A 10 MIN. CONT. x 10 ⁻⁶	
Eritrócito	0,0		
+ 2-metilpropanal(84 mM)	25,1	+ 2-metilpropanal, eosina (25 µM), e CPZ(0,27 mM)	28,7
+ 2-metilpropanal e CPZ (0,27 mM)	18,0	+ 2-metilpropanal e rosa bengala(25 µM)	79,4
+ CPZ (0,27mM)	0,0		
+ 2-metilpropanal e eosina (25 µM)	62,5	+ 2-metilpropanal, rosa bengala(25 µM) e CPZ(0,27 mM)	13,7

Este estudo feito com o método de consumo de oxigênio (Fig.3.11) mostra uma similaridade notável de comportamento, a não ser em relação ao tempo de duração da reação. O sistema modelo apresenta um período de aproximadamente tres a quatro minutos para atingir equilíbrio, mas o nosso sistema necessita mais que doze minutos, o que é de se esperar pois o enzima de eritrócitos está menos exposto que a peroxidase de rabanete.

III.3.5 - PRODUTO DE REAÇÃO BIOENERGIZADA

O mesmo sistema, estudado num fluorímetro, apresenta o espectro de CPZ e a formação de seu derivado CPZO que é o produto de oxidação de CPZ. Fez-se uma comparação do sistema 2-metilpropanal/Eritrócito/CPZ/O₂ com o sistema 2-metilpropanal/HRP/CPZ/O₂ (Fig.3.12). Esta comparação indica que os dois sistemas possuem comportamentos muito semelhantes.

III.3.6 - ESPÉCIES ATIVAS QUE PODEM SER GERADAS NO SISTEMA NA PRESENÇA DE CLORPROMAZINA

A fim de averiguar a participação de prováveis espécies derivadas de oxigênio que atuam como um dos efetores de hemólise, fez-se estudos de fluorescência na presença de captadores destas espécies reativas (O₂^{-•}, OH[•], H₂O₂) com superóxido dismutase (SOD), benzoato e bicarbonato, e com catalase respectivamente, no sistema de 2-metilpropanal/Eritrócito/CPZ/O₂. O gráfico resul-

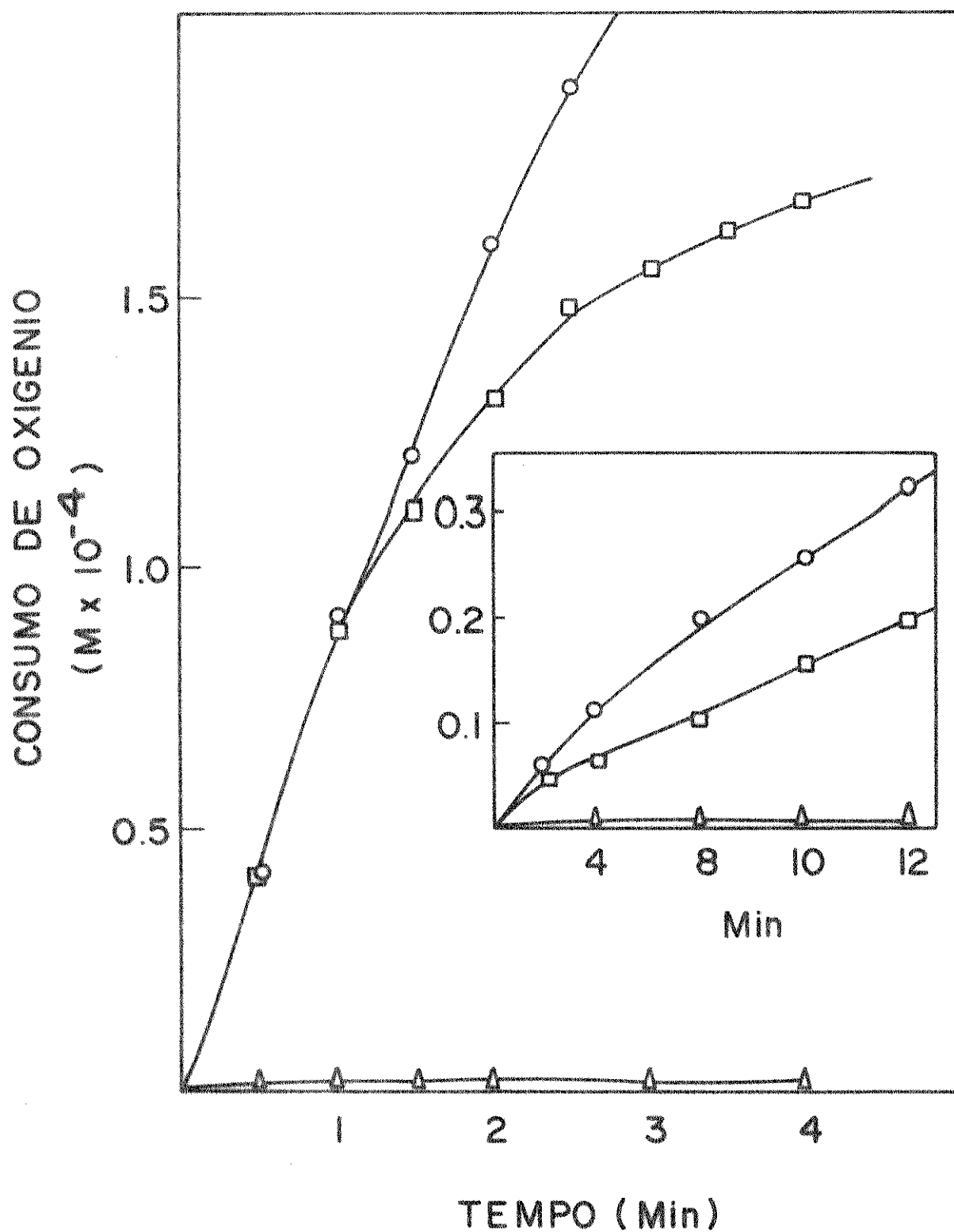


Fig. 3.11 — Consumo de oxigênio de 84 mM de 2-metil propanol na presença de : (a) $2 \mu M$ de HRP (O), (b) $2 \mu M$ de HRP e $1,0 mM$ de CPZ (\square), (c) Os símbolos (\square) e (O), representam o consumo de oxigênio com e sem CPZ respectivamente, na presença de eritrócito na condição padrão CPZ e 2-metil propanol na ausência de HRP (Δ).

INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCENCIA

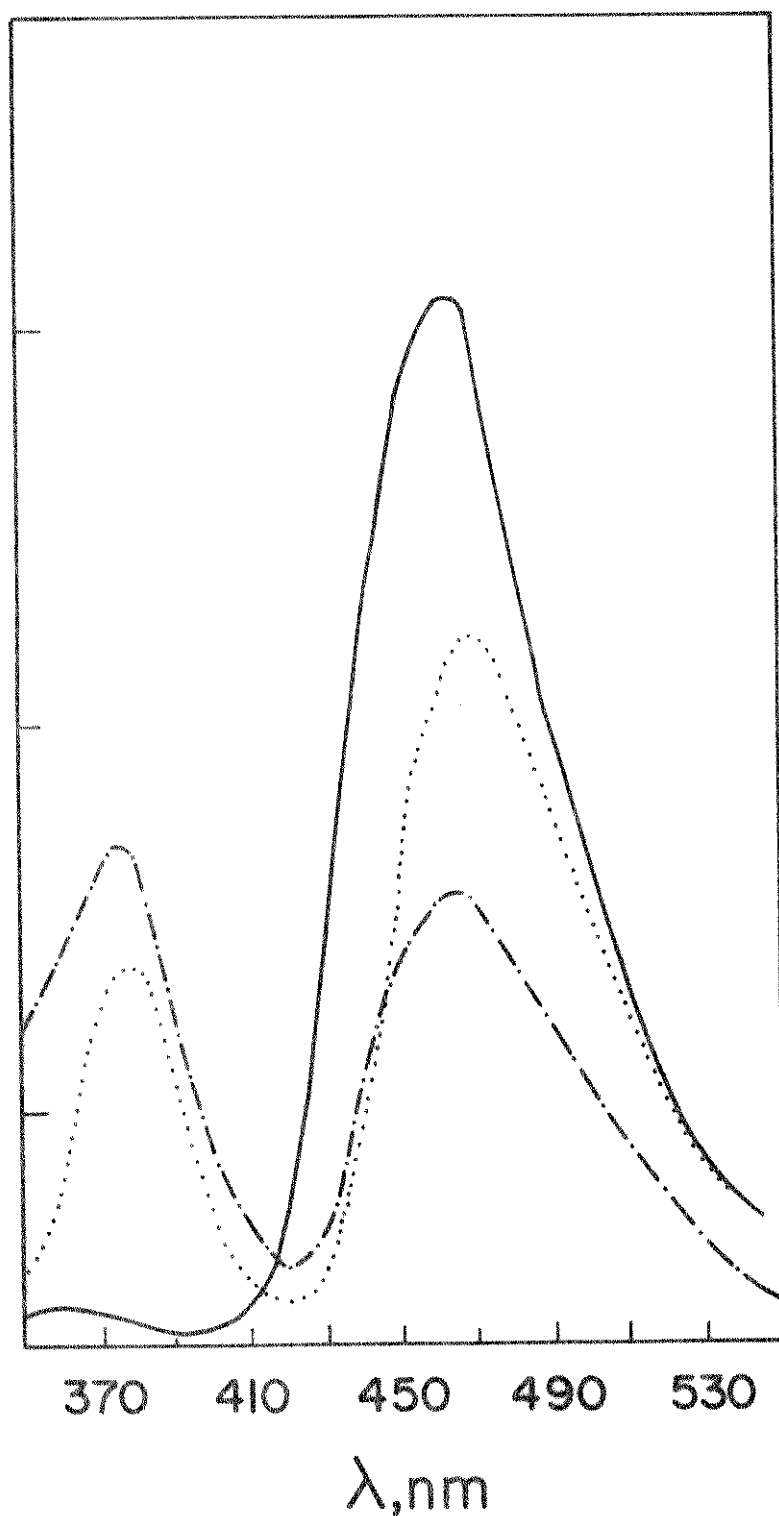


Fig. 3.12 - Espectro de fluorescência após 30 segundos de interação de 0,27 mM de CPZ e 84 mM de 2-metilpropanal (—), e após adição de 2 μ M de HRP (---), e após a adição de 50 μ l (40% do valor de hematócrito) de eritócitos (.....), em tampão Pi 1,0 M PPI 0,1 M pH 7,4 à 37°C.

tante deste procedimento, aqui não apresentado, mostrou a não interferência destas espécies no fator hemolítico. Porém, no sistema modelo 2-metilpropanal/HRP/CPZ/O₂ (Fig. 3.13) na presença de SOD observa-se um aumento na formação do produto de oxidação de CPZ relativa ao controle. Catalase por sua vez, mostrou um efeito redutivo na formação de CPZO. A riboflavina apresentou um maior efeito de redução porque ela interfere na transferência de energia de acetona triplete para CPZ (35).

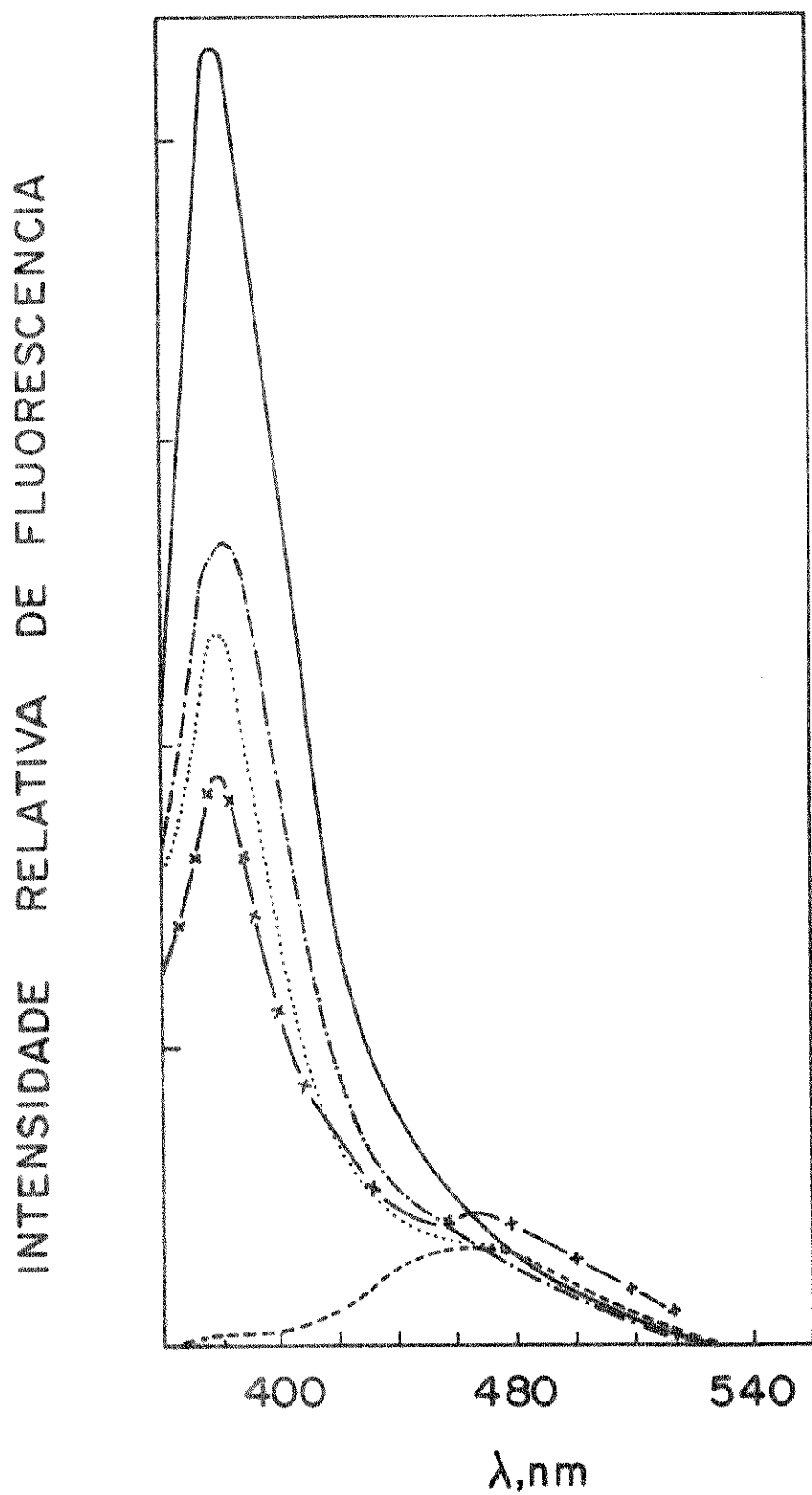


Fig. 3.13- Espectro de fluorescência de 0,27 mM de CPZ (----) e CPZO (-----) após a adição de: SOD (350 unidades) (— · —), catalase (150 unidades) (.....), e riboflavina (25 μ M) (x). Em tampão Pi 1,0 PPI 0,1 M pH 7,4 à 37° C.

IV - DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Quando adicionamos 84 mM de 2-metilpropanal no sistema de Eritrócito/ O_2 observa-se uma mudança no comportamento da membrana acompanhando a banda a 656 nm (Fig.2.3). A absorção nesta região é devida ao espalhamento de luz de células intactas. Fez-se o mesmo estudo acompanhando o aparecimento de hemoglobina a 575 nm.

O aumento de hemoglobina com o tempo, no sistema, indica que existem agentes tóxicos que causam modificações no comportamento físico natural da membrana de eritrócitos (Fig.1.1 e 1.2). Estudos prévios de alquilaldeídos (73) mostram que eles penetram na membrana de eritrócitos e causam um aumento na fluidez da camada lipídica que compõe essa membrana. Com a saída de íons tal como K^+ (60) e as moléculas como hemoglobina (Fig.2.9 e 1.1) respectivamente, no sistema de reação, comprova este efeito. Canham e Parkinson (61) propuseram que o tempo gasto para a saída de hemoglobina é de aproximadamente sete minutos, o que corresponde perfeitamente com o nosso sistema. O íon potássio por ter um tamanho menor que a molécula de hemoglobina o tempo gasto também se reduz (Fig.2.9).

Num sistema modelo de 2-metilpropanal/HRP/ O_2 o enzima peroxidase é que ativa o substrato 2-metilpropanal para dar um intermediário dioxetano (36, 25, 38)

e que fornece o produto acetona excitada com concomitante emissão de luz. Porém, num sistema biológico usando o eritrócito, o que poderia ativar este sistema de 2-metilpropanal?

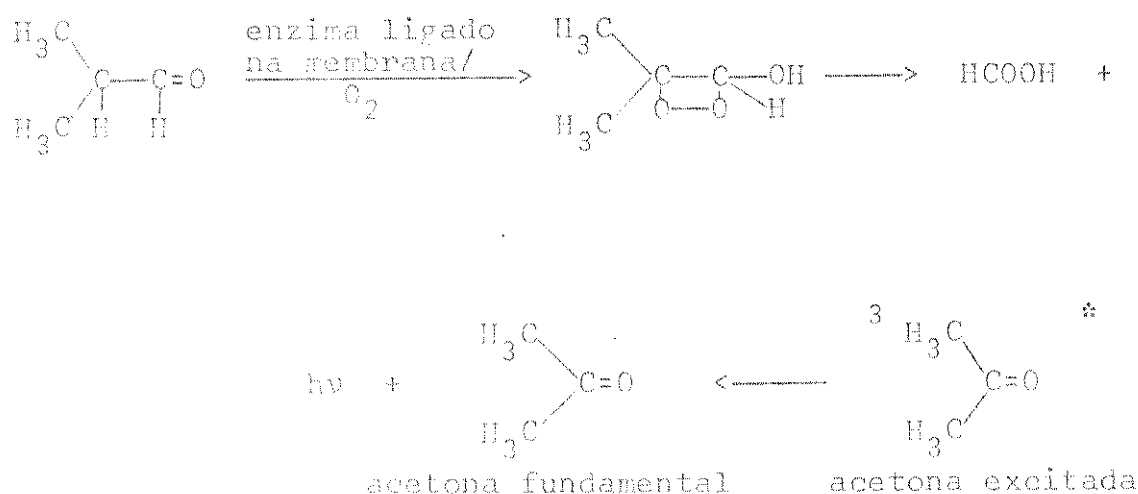
Sabe-se de antemão que os eritrócitos possuem a catalase, superóxido dismutase e glutational peroxidase em quantidade suficiente para protegê-los dos elementos tóxicos à integridade da célula em geral.

Tomando 10 mM de azida de sódio ou de cianeto observou-se a proteção da membrana de efeito hemolítico em 25% (ver Tabela III.3). Provavelmente existe uma participação de hemoproteína na ativação deste substrato 2-metilpropanal (85). Posteriormente Snyder e col. (86) informaram que uma pequena quantidade de catalase (1,6%) era retida na membrana de células lavadas (ver Método). A catalase ligada à membrana parece ter maior atividade de peroxidase que a fração solubilizada (87).

Quando usou-se 0,1 ml de membrana solubilizada de eritrócito no sistema 2-metilpropanal/Membrana solubilizada/ O_2 encontrou-se uma atividade de peroxidase equivalente a 2×10^{-9} M/0,1 ml de membrana de eritrócito original. Portanto, o efeito hemolítico observado pode ser devido ao 2-metilpropanal ativado por catalase ligado na membrana (na sua possível forma monomérica pois, a forma tetramérica não apresenta atividade de peroxidase) (88).

Neste modo, fez-se um interessante estudo comparativo ativando o substrato 2-metilpropanal com diferentes hemoproteínas. Com os resultados obtidos concluiu-se que a proteína ligada na membrana mostra um comportamento similar ao peroxidase de rabanete mas não observou nenhuma reação com hemoglobina, metahemoglobina e catalase externa em condição padrão. Este resultado é de suma importância porque, nessa instância, podemos eliminar a possível idéia de suas participações como outra proteína atuando paralelamente com a catalase ligada na membrana.

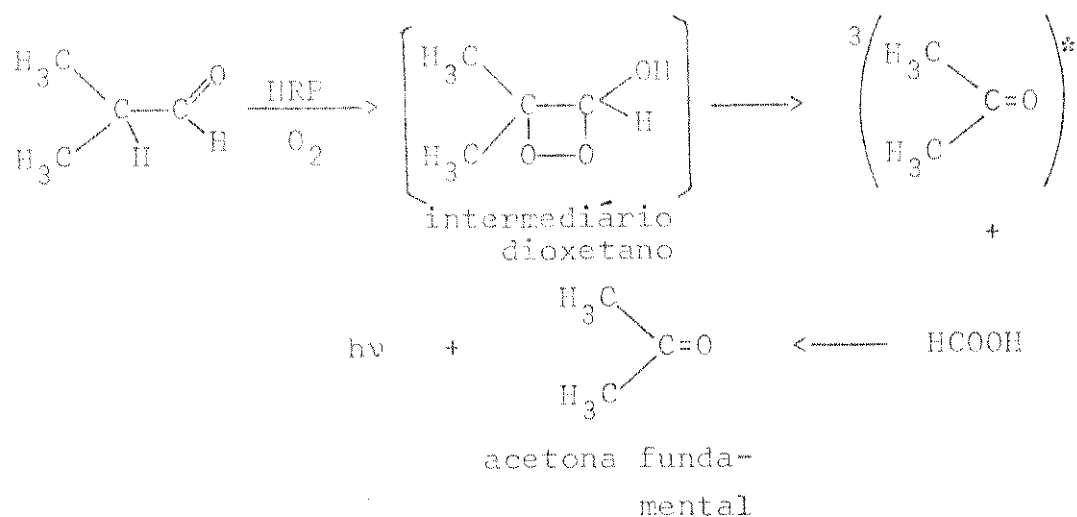
A reação de acetona triplete excitada ativada com enzima ligada na membrana de eritrócito foi confirmada através de: (i) aumento drástico de emissão de luz com aceptores halogenados (Fig.2.5); (ii) fotoprodutos da reação esperados, isto é, a acetona caracterizada pelo método de cromatografia de camada delgada e o ácido fórmico, pelo método de cloreto de mercúrio:



Esquema 19.

e (iii) proteção de hemólise ou modificação de membrana na presença de aceptores emissivos halogenados. A eosina, rosa bengala e DEAS protegem de 53%, 17%, e 20% respectivamente, a membrana de eritrócito de hemólise, indicando que existe uma competição de energia de acetona triplete excitada (ver Tabela III.3).

Desde que o enzima ativante do sistema de eritrócito é um hemeproteína com características semelhantes de peroxidase de rabanete e os fotoprodutos esperados são os mesmos, os argumentos levantados estão completamente dentro do nosso propósito. O sistema modelo se segue o esquema:



Esquema 19a.

Este modelo mostra que a geração de acetona triplete excitada é responsável pela emissão de fótons observada. Porém poderia se pensar na possibilidade de que pelo menos uma maior parte dessa emissão é devida

à participação de acetona singlete e oxigênio singlete, na ausência de aceptores emissivos específicos, mas pode-se eliminar esta hipótese devido ao estudo prévio feito com aceptores respectivos como DPAS e DABCO, que mostrou uma interferência insignificante relativa ao efeito intenso observado pelos aceptores específicos de espécies triplete (ver Tabela III.3).

Sabendo-se que enzima ligado na membrana tem uma atividade maior que catalase solubilizada, e sabendo que o mecanismo regente é similar, e ainda que o espectro de emissão de luz é semelhante ao sistema modelo (2-metilpropanal/HEP/O₂), fez-se uma averiguação no sentido mais profundo utilizando enzimas extraídos da membrana de eritrócitos numa solução ácida (ver Métodos). O espectro de consumo de oxigênio (Fig.2.8) mostra a atividade desta proteína e o espectro de absorção feito paralelamente a 400 nm comprova ser realmente uma espécie HEME, mas, além disso, nada se pode afirmar. Atualmente este ponto está sendo aprofundado.

Usando os aceptores emissivos como DBAS e eosina e calculados os valores de $K_{ET}\tau$ pelo método de duplas recíprocas (Fig.2.6) de $3,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e $2,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectivamente, nota-se que esses valores são maiores que $1,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ obtido de ácido sórbico em sistema de 2-metilpropanal/HEP/O₂ para o qual o ato de suprimir a energia é efetuado pelo contacto íntimo de doador e accep-

tor (38), isto é, um efeito colisional. Este supressor estudado, o ácido sórbico, mostrou que os valores K_{SV} dependem da viscosidade e da solubilidade de oxigênio do solvente. Os valores de $K_{ET}\tau$, entretanto, são similares aos valores de $7,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e $3,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ obtido para transferência de energia no sistema modelo 2-metilpropa - nal/HRP/ O_2 (25, 34). Estes aceptores DBAS e eosina são conhecidos que transferem a sua energia a longa distância e não um contato íntimo (34).

Essa emissão de luz observada, em parte é devido a uma proteção de alguma forma, da espécie excitada, pois é sabido que o oxigênio no seu estado fundamental é um excelente supressor dessa energia. Pensa-se que o corpo da estrutura da proteína do enzima é que atua como protetor da acetona excitada. Isto comprova o resultado obtido de $K_{ET}\tau$ que é próprio de uma transferência a longa distância.

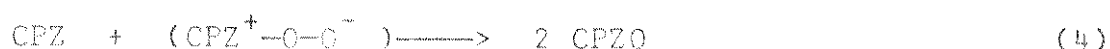
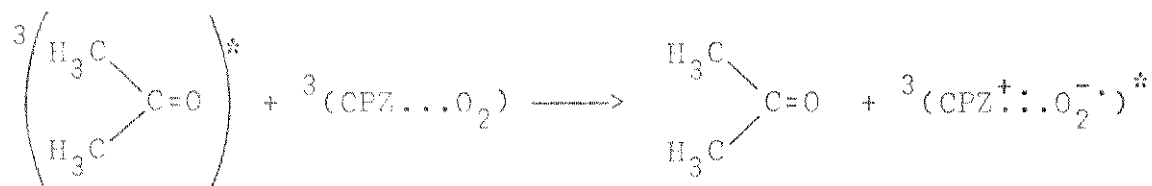
Portanto, o fato de DBAS, eosina e rosa bengala protegerem a hemólise de eritrócito, é mais um indicativo de que a hemólise é provocada pela transferência de energia de acetona excitada para algum componente da membrana. O gráfico de correlação (Fig.2.9) entre emissão de fótons, saída de potássio, hemólise e consumo de oxigênio e justifica a participação de espécies excitadas na reação.

Quando adicionamos CPZ no sistema de 2-metilpropanal isento de outros aceptores a modificação da membrana é notável. Este efeito pode ser concluído através das reações comparativas dos sistemas 2-metilpropanal/HRP/CPZ/O₂ e 2-metilpropanal/Eritrócito/CPZ/O₂, como resultado da formação de radical cátion (CPZ^{+.·}), consequência da transferência de energia de acetona excitada triplete gerada enzimaticamente para o CPZ. O CPZ é conhecido como um eficiente acceptor desta energia triplete(36) sendo um supressor em potencial e além disso o radical cátion (CPZ^{+.·}) é conhecido como um dos produtos da fotoxidação de CPZ e o CPZO como resultante da reação aeróbica (69).

Este radical é altamente tóxico e provoca uma mudança drástica na membrana de eritrócito in vitro e possivelmente in vivo que pode ser acompanhado a 656 nm. O resultado desta fotoreação no escuro serve como argumento para explicar o sinergismo da reação quando a clorpromazina é adicionada ao sistema de 2-metilpropanal/Eritrócito/CPZ/O₂ provoca uma redução de velocidade inicial (Fig.3.10), o que indica que o efeito hemolítico de CPZ é devido ao processo catalizado por um sistema enzimático interno. Em outras palavras, a formação de CPZ^{+.·} ativado externamente (isto é, fora da membrana de eritrócito) possui pequeno efeito hemolítico contrastando com que provém da ativação com enzima ligado na membrana.

Estudo de consumo de oxigênio do sistema modelo 2-metilpropanal/HRP/CPZ/O₂ (Fig.3.11) confirma a similaridade de comportamento com o nosso sistema e o espectro de fluorescência de CPZ confirma a formação de CPZO (Fig.3.13). O CPZO é o metabolito de CPZ in vivo e também é gerado no meio reacional em eritrócito como produto de oxidação via radical cátion (Fig.3.12).

Experimento com sistema modelo 2-metilpropanal/HRP/CPZ/O₂ adicionando catalase mostrou uma modificação pouco acentuada mas observa-se uma mudança drástica com SOD nesta reação de oxidação (Fig.3.13). Provavelmente isso é devido à proteção de peroxidase da inativação com O₂^{-•} correspondendo ao mecanismo proposto:



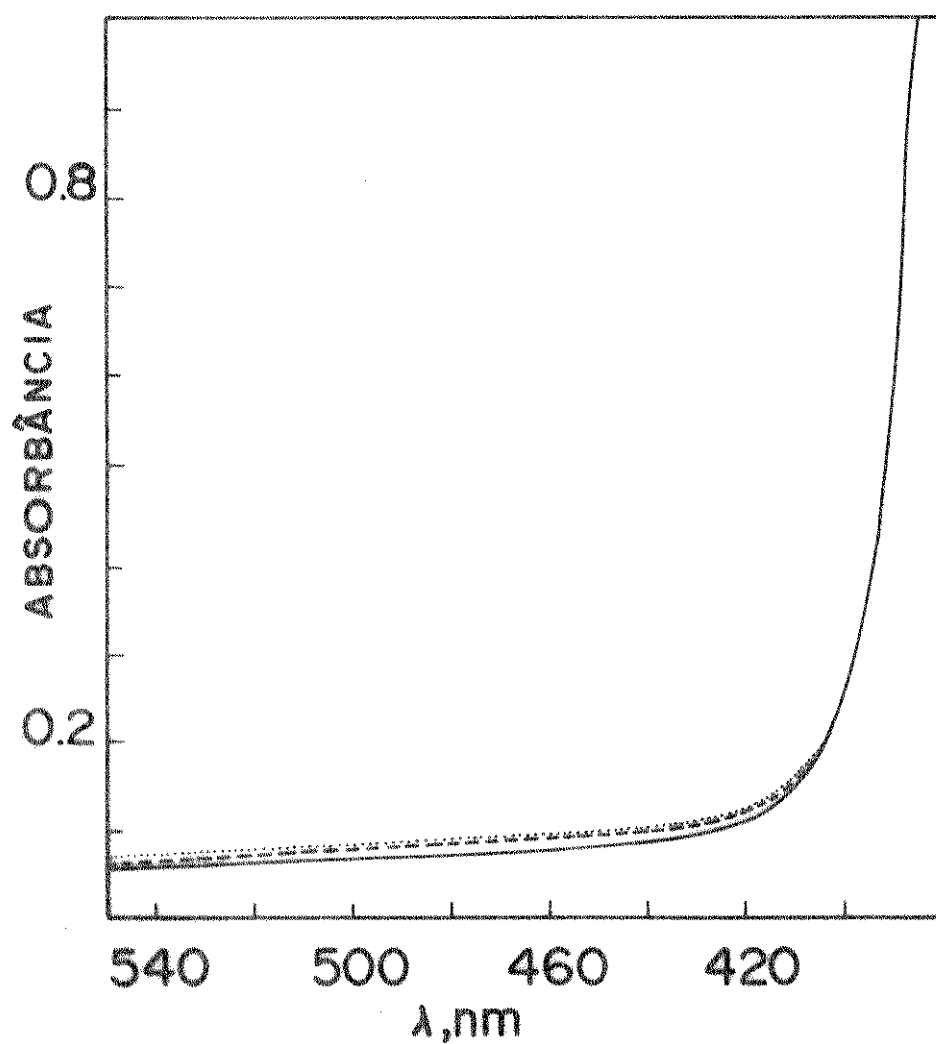


Fig. 3.14 - Espectro de absorção na região do visível de transferência de carga do complexo de CPZ com oxigênio. A curva do meio (----) representa o espectro da solução de 14 mM de CPZ na água. A curva de cima (.....) com inserção de oxigênio e a curva de baixo (—) a redeterminação do espectro com inserção de nitrogênio

A variação ocorrida, com a inserção de O_2 e N_2 no sistema de reação 2-metilpropanal/Eritrócito/CPZ/ O_2 , no espectro de absorção a 656 nm, (Fig.3.10), indica que a reação é dependente da concentração de oxigênio no solvente devido ao complexo de clorpromazina (complexo de transferência de carga) que deve ser formado para então funcionar como um acceptor de energia triplete (ver passo 1 do Esquema 20) (71). Este complexo de clorpromazina formado (CPZ... O_2) que absorve a 550 nm (Fig.3.14) só pode existir se a clorpromazina atuasse como um bom doador de elétrons e o oxigênio um bom acceptor de elétrons(36).

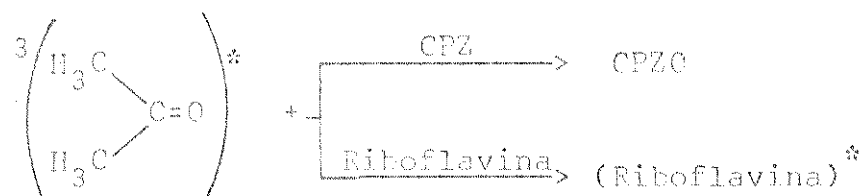
Embora o mecanismo através do complexo de transferência de carga seja viável, existiria também a possibilidade de que ocorresse um mecanismo excitônico triplete-triplete. O CPZ poderia ter um nível triplete em ressonância com o triplete n,π da acetona triplete (44).

Num estudo de complementação utilizou-se os aniquiladores de radicais (OH^\bullet) com benzoato; ($O_2^{\bullet -}$) com SOD e (H_2O_2) com catalase na emissão de fótons do sistema 2-metilpropanal/Eritrócito/CPZ/ O_2 similarmente ao sistema de 2-metilpropanal/Eritrócito/ O_2 (Tab.III.3) e desde que não foi visto nenhum efeito sobre a hemólise podemos esperar que essas espécies, se gerados no sistema da reação, não interferem no processo hemolítico (89).

A adição de riboflavina (50 μM) acelera ligeiramente a velocidade inicial de hemólise, presumivel-

mente devido à geração de riboflavina singlete excitado pela transferência de energia de acetona triplete, como foi visto por Haun e col. (38), para produzir riboflavina triplete pelo cruzamento intersistema, e, subsequente geração de OH^{\cdot} radical ou oxigênio singlete, como foi observado por Michelson e Durosay (89).

A diminuição da oxidação de CPZ que compete a energia de acetona excitada com a riboflavina, pode ser vista no esquema que se segue:



Esquema 21.

Visto que a função de peroxidase é a de formar uma espécie eletronicamente excitada via α -oxidação de substratos convenientes, poder-se-ia supor que num sistema biológico não luminescente também formaríamos estas espécies. Deste modo, confrontando com o sistema fotosensível de CPZ, uma droga utilizada como tranquilizante em alta escala, tem-se conhecimento da formação de clorpromazina para espécie $\text{CPZ}^{+\cdot}$ e CPZO (69) via complexo de clorpromazina (72) pela transferência de carga ou pela transferência excitônica triplete-triplete (44).

Essas mudanças de estruturas, induzidas pela transferência de energia e a produção de fotohemólise no escuro, é que podem explicar o efeito hemolítico e tóxico de clorpromazina in vivo , indicando, claramente , ser uma reação fotoquímica no escuro.

V - SUMÁRIO

A presença de acetona triplete gerada enzimaticamente em eritrócito e a transferência de energia para eosina, rosa bengala e 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato foi indicado por: (i) distribuição de produtos; (ii) K_{ET} similar com o sistema 2-metilpropanal/HRP/ O_2 ; (iii) correlação entre hemólise, consumo de oxigênio e emissão de fótons; (iv) proteção de membranas pelos aceptores e-emissivos; e (v) pela comparação de sistemas 2-metilpropanal/HRP/ O_2 , 2-metilpropanal/Eritrócito/ O_2 e 2-metilpropanal/Proteína extraída da membrana de eritrócitos com ácido/ O_2 que mostrou ter uma atividade alta de peroxidase. Este resultado é de suma importância pois é o primeiro trabalho de um sistema biológico produzindo um efeito fotohemolítico no escuro.

Quando acoplado neste sistema de 2-metilpropanal/Eritrócito/ O_2 um composto altamente fotosensitivo e fototóxico como clorpromazina observa-se uma decomposição de CPZ para clorpromazina-5-óxido (CPZO) com concomitante forte efeito hemolítico utilizando o método de fluorimetria e espectrofotometria, respectivamente. A experiência com superóxido dismutase, catalase, benzoato e bicarbonato externo elimina a eventual participação de radicais como OH^\cdot , $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 no efeito hemolítico de eritrócitos.

Comparação entre sistemas de 2-metilpropanal/HRP/O₂ e 2-acetilpropanal/Eritrócito/O₂ na presença de clorpromazina indica que o mecanismo que envolve a reação é essencialmente do mesmo tipo. Este resultado poderia explicar o efeito hemolítico e tóxico de clorpromazina in vivo no escuro.

VI - SUMMARY

The presence of enzymically generated triplet acetone in red cells and energy transfer to eosin, rose bengal and 9,10-dibromoanthracene-2-sulfonate was indicated by: (i) product distribution; (ii) $K_{ET}\tau$, similar to the 2-methylpropanal/Peroxidase/ O_2 system; (iii) correlation between hemolysis, oxygen uptake and photon emission; (iv) membrane protection by energy acceptors, and (v) by comparison of the 2-methylpropanal/Peroxidase / O_2 system with 2-methylpropanal/Red cells membranes/ O_2 and 2-methylpropanal/Acid extractable protein from red cells membrane/ O_2 systems, which have a high peroxidase activity. This is the first report of a biological system producing a photohemolysis effect in the dark.

Chlorpromazine is decomposed when it is treated with bioenergized triplet acetone from the 2-methylpropanal/Red cells/ O_2 system, forming chlorpromazine-5-oxide, with a concomitant strong hemolytic effect observed by a spectrophotometric method. Experiments with external superoxide dismutase, catalase, benzoate and bicarbonate indicate the absence of $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 and OH^{\cdot} species as the precursor of the hemolytic effect.

Comparison between the 2-methylpropanal/ Peroxidase/ O_2 system and the 2-methylpropanal/Red cells/ O_2 system in the presence of chlorpromazine, indicate

that essentially the same type of mechanism occurs in both cases.

These results could explain the in vivo hemolytic and toxic effect of chlorpromazine in the dark.

VII - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. D.O. Cowan, e D.L. Drisko (1976) "Element of Organic Photochemistry", Plenum Press, New York.
2. J.G. Calvert, e J.H. Pitts (1966) "Photochemistry" Wiley, New York.
3. Th. Förster (1946) Naturwiss 33, 166-175.
4. F. McCapra (1968) Chem. Commun. 155-156.
5. K.A. Kopecky, e C. Mumford (1969) Can. J. Chem. 47, 709-711.
6. W. Adam, e J.C. Liu (1972) J. Amer. Chem. Soc. 92, 2894-2895.
7. Y. Kishi, T. Coto, S. Inoue, S. Sugiura, e H. Kishimoto (1966) Tetrahedron Lett. 3445-3450.
8. K. Hori, J.C. Wampler, J.C. Matthews, e M.J. Cornier (1973) Biochemistry 12 (22), 4463-4468.
9. O. Shimomura, T. Oriso, e F.H. Johnson (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2799-2802.
10. M. DeLuca, M.E. Dempsey, K. Hori, J.E. Wampler, e M. J. Cornier (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1658-1660.
11. O. Shimomura, F.H. Johnson, e Y. Kohama (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2086-2089.
12. H. Ohtsuka, N. Rudie, e J.E. Wampler (1976) Biochemistry 15, 1001-1004.

13. D.R. Kearns (1969) J. Amer. Chem. Soc. 91, 6554-6563.
14. F. McCapra (1970) Pure Appl. Chem. 24, 611-629.
15. D. Chia-sen Lee, e T. Wilson (1973) "Chemiluminescence and Bioluminescence" (M.J. Cormier, D.M. Hercules, e J. Lee, Eds.) pp.265, Plenum Press, New York.
16. T. Wilson, D.E. Golan, M.S. Harris, e A.L. Baumstark (1976) J. Amer. Chem. Soc. 98, 1086-1091.
17. P.D. Bartlett (1976) Chem. Soc. Rev. 5, 149-163.
18. T.R. Darling, e C.J. Foote (1974) J. Amer. Chem. Soc. 96, 1625-1627.
19. E.J.H. Bechara, A.L. Baumstark, e T. Wilson (1976) J. Amer. Chem. Soc. 98, 4648-4649.
20. K.W. Lee, L.A. Singer, e K.D. Leeg (1976) J. Org. Chem. 41, 2685-2688.
21. F. McCapra (1977) J. Chem. Soc. Chem. Commun. 24, 946-948.
22. G.B. Schuster, e L.A. Bryant (1978) J. Org. Chem. 43, 521-522.
23. G. Cilento, N. Durán, K. Zinner, C.C.C. Vidigal, O.M.M. Faria Oliveira, M. Haun, A. Faljoni, O. Augusto, R. Casadei de Baptista , e E.J. H. Bechara (1978) Photochem. Photobiol. 28, 445-451.
24. M.L. Saviotti, e W.C. Galley (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 71, 4154-4158.

25. O.M.M. Faria Oliveira, M. Haun, N. Durán, P.J. O'Brien, C.R. O'Brien, E.J.H. Bechara, e G. Cilento (1978) J. Biol. Chem. 253, 4707-4712.
26. N.J. Turro (1977) Pure Appl. Chem. 49, 405-429.
27. C.C.C. Vidigal, K. Zinner, N. Durán, E.J.H. Bechara, e G. Cilento (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 138-145.
28. N. Durán, K. Zinner, R. Casadei de baptista, C.C.C. Vidigal, e G. Cilento (1976) Photochem. Photobiol. 24, 383-388.
29. C.C.C. Vidigal, A. Faljoni-Alário, N. Durán, K. Zinner, Y. Shimizu, e G. Cilento (1979) Photochem. Photobiol. 30, 195-198.
30. N. Durán, K. Zinner, C.C.C. Vidigal e G. Cilento (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 1146-1153.
31. H. Ishikawa, W.J. Schubert, e F.F. Nord (1963) Biochem. Z. 338, 153-163.
32. K. Zinner, N. Durán, C.C.C. Vidigal e G. Cilento (1976) Arch. Biochem. Biophys. 173, 58-65.
33. K. Zinner, R. Casadei de Baptista, e G. Cilento (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 889-898.
34. E.J.H. Bechara, O.M.M. Faria Oliveira, N. Durán, R. Casadei de Baptista, e G. Cilento (1979) Photochem. Photobiol. 30, 101-110.
35. A. Faljoni, M. Haun, M.E. Hoffmann, R. Meneghini, N. Durán, e G. Cilento (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 490-495.

36. N. Durán, M. Haun, A. Faljoni, e G. Cilento (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 785-790.
37. O. Augusto, G. Cilento, J. Jung, e P. S. Song (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 963-969.
38. M. Haun, N. Durán, e G. Cilento (1978) Biochem.
Biophys. Res. Commun. 81, 779-784.
39. C. Franco (1980) Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.
40. N. Durán, M.P. Mello, S.M. de Toledo, M. Haun, A. Faljoni, e G. Cilento (1979) Arch. Biol. Med. Expt. (Chile) 12, 266.
41. N. Durán, M. Haun, G. Cilento, e E. Silva, Photochem. Photobiol., submetido.
42. E.M. Sutterland, A. Faljoni-Alario, e G. Cilento, Photochem. Photobiol., submetido.
43. O. Augusto, e G. Cilento (1979) Photochem. Photobiol. 30, 191-193.
44. M. Kasha (1979) Photochem. Photobiol. 30, 185-186.
45. R.H. Young, e R.L. Martin (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94, 5183-5185.
46. C.F. Deneke, e N.I. Krinsky (1976) J. Amer. Chem. Soc. 98, 3041-3042.
47. N.J. Turro (1967) "Molecular Photochemistry" W.A. Benjamin inc. , New York.
48. V.M. Berenfelld, E.V. Chumaevskii, M.P. Grinev, Yu. I. Kuryatnikov, E.T. Arseniev, e R.V. Dzhahtspanvan

- (1970) Bull. Acad. Sci. USSR, Ser. Phys. 3, 597-601.
49. F.S. Engel, F.M. Monroe (1971) Adv. Photochem. 8, 245-313.
50. I. Berlman (1965) "Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules" Academic Press, London.
51. R.F. Borkman, E.R. Kearns (1966) J. Chem. Phys. 44, 945-949.
52. M. Haun (1979) Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
53. E.H. White, J.D. Miano, e M. Umbreit (1974) J. Amer.Chem. Soc. 97, 198-200.
54. M. Haun, N. Durán, O. Augusto, e G. Cilento (1980) Arch. Biochem. Biophys. , no prelo.
55. F. Kelly-Galvert, e M.S. Legator (1973) Mutat. Res. 21, 101-105.
56. S. Sing, e R. Padmanabham (1978) Indian J. Med. Res. 67, 300-309.
57. E. Evans, e Y.C. Fung (1972) Microvasc. Res. 4, 335-347.
58. F.C.Y. Chen, e Y.C. Fung (1973) Microvasc. Res. 6, 32-43.
59. S. Chen (1976) "Cardivascular Flow Dynamic and Measurements" University Park Press, Baltimore (N.H.C. Hwang Ed.) pp. 757-780.

60. P. Seeman, W.O. Kwant, M. Goldberg, e M. Chau-Wong
(1971) Biochem. Biophys. Acta 241, 349-355.
61. P.B. Canham, e D.R. Parkinson (1970) Can. J. Physiol.
Pharmacol. 48, 369-376.
62. T. Ogiso, S. Imai, R. Hozumi, M. Kurobe, e Y. Kato
(1976) Chem. Pharmacol. Bull. 24, 479-486.
63. A.R. Freeman, e M.A. Spirtes (1962) Biochem. Pharmacol.
11, 161-
64. T. Ogiso (1977) Chem. Pharm. Bull. 25, 1078-1088.
65. M. Naoi, T. Suzuki, e K. Yagi (1979) Biochem. Pharmacol.
28, 295-299.
66. J.G.R. Elferink (1977) Biochem. Pharmacol. 26, 2411-
-2416.
67. F. Leterrier, e E. Kersanti (1975) Biochem. Biophys.
Res. Commun. 63, 515-521.
68. D.J. Cavanaugh (1957) Science 125, 1040-1041.
69. T. Iwaoka, e M. Kondo (1974) Bull. Chem. Soc. Japan
47, 980-986.
70. M. Nejme, e N. Pippel (1973) J. Pharm. Pharmacol. 30,
748-753.
71. A.K. Davies, S. Navaratnam, e G.O. Philips (1976) J.
Chem. Soc. Perkin II, pp. 25-29.
72. H. Tsubomura, e R.S. Mulliken (1960) J. Amer. Chem. Soc.
82, 5966-5974.
73. K.C. Gaines, J.M. Salhany, D.J. Tuma, e M.F. Sorrel

- (1977) FEBS Lett. 75, 115-119.
74. P.S. Vassar, J.M. Hards, D.F. Brooks, B. Hagenberger, e G.V.F. Seaman (1972) J. Cell. Biol. 53, 809-818.
75. C.J.P. Eriksson, H.W. Sippel, e O.A. Forsander (1977) FEBS Lett. 75, 205-208.
76. R.L. Shriner, R.C. Fuson, e D.Y. Curtin (1956) "Systematic Identification of Organic Compounds" J. Wiley e Sons inc. Eds. pp. 227-254.
77. C. Comori (1965) "Methods Enzymology" 1, 138-146.
78. M. Battergoy, e Ph. Brandt (1923) Bull. Soc. Chim. Fr. 33, 1667-1678.
79. A. Etienne, J. E. Lapeley, e P. Heymes (1949) Bull. Soc. Chim. Fr. , 835-840.
80. M.L. Kremer (1970) Biochem. Biophys. Acta 198, 199-209.
81. E.M. Bragança, I. Aravindakshan, e D.S. Ghanekar (1957) Arch. Biochem. Biophys. 25, 623-634.
82. A.K. Parpart, P.B. Lorenz, E.R. Parpart, J.R. Gregg, e A.M. Chase (1947) J. Clin. Invest. 26, 636-640.
83. F. Feigl (1954) "Spot Tests" v.II, Elsevier, Amsterdam, pp. 246-247.
84. G. Cilento (1973) Quart. Rev. Biophys. 6, 485-501.
85. Y. Makita, e N. Durán (1978) Abstr. VII Reunião Anual Soc. Bras. Biochem. ,Caxambu, Abril, Brasil.

86. L.M. Snyder, S.C. Liu, J. Palat, P. Bulat, L. Edelstein, S.K. Skivastava , e N.L. Fortier (1978) Biochem. Biophys. Acta 471, 290-302.
87. N. Weliky, F.S. Brown, e E.C. Dale (1969) Arch. Biochem. Biophys. 131, 1-8.
88. W.W.C. Chan (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1198-1204.
89. A.M. Michelson , e D. Durosay (1977) Photochem. Photobiol. 25, 55-63.
90. N. Durán, O.M.M. Faria Oliveira , M. Haun, e G. Cilento (1977) Chem. Commun. 442.

VIII - COMENTÁRIO

O fato de que o sistema de reação de 2-metilpropanal/Eritrócito/ O_2 na presença ou não de CPZ não necessita enzimas externas e por sua vez tende a diminuir a reatividade global na sua presença leva a concluir que:

- i) O enzima ativante do sistema de 2-metilpropanal se localiza na própria membrana da célula.
- ii) A penetração de 2-metilpropanal na membrana de eritrócitos é permitido.
- iii) A lipossolubilidade de fenotiazinas garante a presença de CPZ dentro da membrana e a transferência de energia se efetua à longa distância desde que a acetona excitada está protegida pelo enzima da desativação e consequente decaimento pela colisão.
- iv) A não reatividade de catalase externa indica que a ação peroxidática de catalase ligada na membrana está na forma monomérica, pois é sabido que a forma tetramérica não exibe atividade.
- v) O produto da fotoreação : acetona e ácido fórmico indica que o possível mecanismo é por via intermediário dioxetano.

O TRABALHO DA TISE FOI APRESENTADO PARCIALMENTE EM:

I- COMUNICAÇÕES:

- 1- Y. Makita, e N. Durán "Fototoxidade de Clorpromazina sobre Eritrócitos no Escuro" VII Reunião Anual, Sociedade Brasileira de Bioquímica, Abril de 1978, Caxambu, Brasil.
- 2- Y. Makita, A. Vercesi, e N. Durán "Efeitos sinérgicos de Clorpromazina e 2-metilpropanal na Hemólise de Eritrócitos Humanos", III Reunião Anual de Sociedade Brasileira de Biofísica (1978), Ouro Preto, M.G., Brasil.
- 3- N. Durán, e Y. Makita "Geração de Energia Bioeletônica em Eritrócitos e sua possível relação com a Hemólise" , III Reunião Anual de Sociedade Brasileira de Biofísica (1978) Ouro Preto, M.G., Brasil.
- 4- Y. Makita, A. Vercesi, e N. Durán "Estudos em Fotobioquímica: Sistema Gerador de Energia Bioeletrônica em Eritrócitos Humanos" VIII Reunião Anual de Sociedade Brasileira de Bioquímica, Abril de 1979, Caxambu, Brasil.
- 5- N. Durán, Y. Makita, e L.H. Innocentini "Peroxidase Activity in Human Red Cells: A 2-Methylpropanal

and Folic Acid Oxidase", XI Internatinal Con -
gress of Biochemistry, julho de 1979, Toronto ,
Canada.

- 6- Y. Makita, e N. Durán "Photobiochemistry: Photohemolysis
of Red Cells Sensitized by Chlorpromazine-
Bioenergized Triplet Acetone Sistem", II Reunion
Regional PAABS: cono Sur y III Reunion Anual de
la Sociedad de Bioquímica de Chile, Outubro de
1979, Chile.

II- PUBLICAÇÕES PARCIAIS

- 1- N. Durán, Y. Makita, e L.H. Innocentini (1979) "
Peroxidase Activity in Human Red Cell Membranes:
A Biological Model for Excited States Generation",
Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 642-648.
- 2- Y. Makita, e N. Durán (1979) "Photobiochemistry in the
dark: Photohemolysis of Red Cells Sensitized by
Chlorpromazine-Bioenergized Triplet Acetone
Sistem", Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 427-
-434.
- 3- Y. Makita, A. Vercesi, e N. Durán (1979) "Synergistic
Effect of Chlorpromazine and 2-Methylpropanal on
the Hemolysis of Human Red Cells" Rev. Bras.
Pesq. Biol. Med. ,submetido.

III- SEMINÁRIOS DE GRUPO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

- 1- Y. Makita " Aplicação de Processos Bioenergizados em
Sistemas Biológicos" junho de 1979.
- 2- Y. Makita " Interação de produtos químicos em Eritró-
citos" setembro de 1979.