

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

"Este exemplar corresponde à redação final da Tese defendida por
Maria Cristina Marcucci e Aprovada pela Comissão Julgadora".

11/2/86

Nelson E. Durán
Prof. Dr. Nelson E. Durán

"EFEITOS DE OXIGÊNIO SINGLETE GERADO FOTOQUÍMICA
E ENZIMATICAMENTE SOBRE O ÁCIDO RIBONUCLEÍCO DE
TRANSFERÊNCIA DE E.coli".

Maria Cristina Marcucci

Prof. orientador Dr. Nelson E. Durán Caballero

TESE DE DOUTORADO

Campinas

- 1986 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

"A ciência e os estudos nos preparam para ganharmos a vida, mas a fé genuína nos ensina a viver sabiamente".

R. P. Nogueira

" Ao meu querido Júnior, pela ajuda indispensável e por ter acreditado em mim:
o meu amor".

" Aos meus pais: Wilson e Benedita,
pelo amor, dedicação e apoio.

to aos meus irmãos: Pedro, Lúcia
e Dani."

- Agradecimentos -

- Ao prof. Dr. Nelson Durán, pela orientação durante o trabalho e por ter me ensinado a ter uma "consciência científica".
- Ao prof. Dr. Giuseppe Cilento, da USP, por permitir o uso do seu laboratório e materiais necessários para o bom andamento do trabalho.
- A profa Dra Adelaide Falzoni-Aláio, da USP, pelo auxílio na obtenção dos espectros C.D.
- Ao Departamento de Bioquímica da Unicamp, por permitir o uso de sua aparelhagem, facilitando o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao prof. Dr. Hiroshi Aoyama, do departamento de Bioquímica, pela grande ajuda no trabalho com as colunas Sephadex e pelas idéias que deram certo.
- A profa Jilvia Gatti, do departamento de Microbiologia, pelo muito que me ajudou, e por ter me ensinado a trabalhar com as bactérias.
- Ao prof. Dr. Pill-S. Song, da Texas Tech. Univer., EUA, pelas valiosas sugestões.
- Ao prof. Dr. A. Favre, do Institute de Recherche en Biologie Moléculaire, Paris, pelas sugestões no trabalho com o fotoaduto.
- Ao prof. Dr. K.C. Smith, da Univ. de Stanford, EUA, pelo uso do laboratório, facilitando a obtenção dos resultados preliminares em bactérias.
- Ao prof. Dr. M.J. Peak, do Argonne Laboratory, Illinois, EUA por ter enviado as cepas de E. coli.
- A Marcilda, pela ajuda nos trabalhos com o fotoaduto.
- A Luciana, pelos resultados obtidos em plasmídeos, que muito ajudaram no estudo das curvas de sobrevivência.

- À Lúcia, por ser companheira sempre.
- À Lúcia, Sandra, Regina e Jônia, por terem me ajudado tanto no começo do trabalho.
- Ao Edgardo, pela ajuda nos cálculos matemáticos.
- Aos colegas: Raúl, Héctor e Jaime, pelo tempo que passaram juntos.
- À Cida, pela amizade e eficiência neste tempo todo.
- Ao pessoal da Biblioteca, pela simpatia e pronto atendimento.
- Ao Josué, pelos caprichosos desenhos.
- À Nairdes, pela correção do português.
- Ao pessoal das oficinas, pela camaradagem.
- À Rose e Eliete, da secretaria, por me ajudarem.
- Ao prof. Dr. K.E. Collins, pelas correções do inglês.
- Ao Waurindo, Ricardo e Paulo, pela grande ajuda no xerox.
- À FAPESP, CNPq, FINEP, OEA e UNESCO, pelo apoio financeiro.

"Enfim, a quem mais devo agradecer é a Deus, por ter me dado a inteligência, saúde e graça, para chegar até aqui".

E a todos que de uma forma ou de outra ajudaram, e cujos nomes não aparecem aqui, meus sinceros agradecimentos.

Lista das abreviaturas
e termos químicos

AL.....	Acridina laranja
C.D.....	Dicroísmo circular
Cyt.....	Citidina
DABCO.....	1, 4 - diazobíclico (2,2,2 - octano)
DBAS.....	9, 10 - dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio
DMSO.....	Dimetilssulfóxido
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
D ₂ O.....	Água deuterada
DPAS.....	9, 10 - difenilantraceno-2-sulfonato de sódio
<u>E.coli</u>	Escherichia coli
His.....	Histidina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HRP.....	Peroxidase do rabanete

IAA.....Ácido indol-3-acético
IAL.....Indol-3-aldeído
³IAL*.....Indol-3-aldeído triplete excitado
MA.....Malonaldeído
¹O₂*Oxigênio singlete
O₂⁻Superóxido ânion
*OH.....Radical hidroxila
SSB.....Quebras de fitas simples
SOD.....Superóxido dismutase
terc-BuOK.....Terc-butóxido de potássio
tRNA.....Ácido ribonucleico de transferência
4-TU.....4-Tiouridina
Ur.....Uridina
U.V.....Ultra-violeta

Resumo

O malonaldeído e o ácido indol-3-acético são oxidados aerobicamente pela peroxidase, produzindo oxigênio singlete em ambos os processos, e no último caso também indol-3-aldeído excitado. Estes processos são chamados de biofotoenergizados. Entretanto, existem outras vias de geração de oxigênio singlete como processos fotoquímicos, pelo uso de sensibilizadores. Foi comprovada a similaridade entre os efeitos de oxigênio singlete gerado fotoquímica e enzimaticamente sobre o ácido ribonucleico de transferência de Escherichia coli. Os métodos de luminescência, dicroísmo circular e absorção no ultra-violeta, foram utilizados neste estudo. Estes efeitos foram comprovados pela proteção por histidina, pelo aumento da fotodegradação na presença de água deuterada, e o uso de supressores específicos. A estrutura do ácido ribonucleico de transferência é protegida destas espécies pelos íons Mg^{+2} . A oxidação de 4-tiouridina nestes processos tanto por auto-sensibilização ou por transferência de energia de sistemas biofotoenergizados, produz uridina.

O indol-3-aldeído triplete transfere sua energia à 4-tiouridina no ácido ribonucleico. A 4-tiouridina excitada sofre dois processos importantes : a) transfere sua energia ao oxigênio, gerando oxigênio singlete, que volta a reagir com a 4-tiouridina formando uridina e b) interage com a citidina na posição 13 do ácido ribonucleico, formando um fotoaduto [8-13].

Estes processos descritos anteriormente no ácido ribonucleico de transferência e 4-tiouridina isolada foram

estudados em diferentes cepas de Escherichia coli. As linhagens de Escherichia coli deficientes em 4-tiouridina apresentaram maior sobrevivência do que o tipo selvagem, que contém a 4-tiouridina, quando submetidas ao tratamento com o indol-3-aldeído biofotoenergizado. Estes resultados sugerem que a energia de excitação do indol-3-aldeído triplete pode ser transferida do ácido ribonucleico de transferência ao ácido desoxirribonucleico, originando quebras de fitas simples.

A possibilidade de que estados excitados atuem em sistemas celulares indica o avanço das pesquisas nesta área para o esclarecimento de processos mutagênicos espontâneos.

Abstract

Both malonaldehyde and indole-3-acetic acid undergo aerobic peroxidase-catalysed oxidation to produce singlet oxygen, while in the second reaction, excited indole-3-aldehyde is also produced. These reactions occur by means of biophotoenergetic processes, another means to produce singlet oxygen is by use of sensitizers in a photochemical process. Singlet oxygen produced by both processes (namely the biophotoenergized and photochemical processes) interact similarly on transfer ribonucleic acid from Escherichia coli. In these studies, luminescence, circular dichroism and ultra-violet absorption techniques were used. The singlet oxygen effect on tRNA was shown by way of measurements:

- a) protection by histidine;
- b) observed increases in photodegradation in the presence of D_2O and
- c) influence of specific scavengers.

The tRNA is protected from these species by Mg^{+2} ions. The oxidation of 4-thiouridine, auto-sensitized, photo-sensitized or through energy transfer, produces uridine. Energy transfer from triplet indole-3-aldehyde to 4-thiouridine on tRNA was observed. The excited 4-thiouridine undergoes two important processes : (a) energy transfer to oxygen, generating singlet oxygen which may then reinitiate the 4-thiouridine transformation to uridine. (b) interaction with cytidine on the 13th position of tRNA resulting in [8-13] photoadduct formation. These processes, which occur in tRNA and in isolated 4-thiouridine, were studied in different strains of E.coli mutant. A mutant strain of E.coli deficient in 4-thiouridine exhibited a higher survival factor

than the wild type, when treated with biophotoenergized indole-3-aldehyde. These results suggest that the energy from excited triplet indole-3-aldehyde might be transferred to tRNA and then, to DNA, producing single strand breaks, with subsequent mortality. The possibility that these biophotonenergized processes participate in cellular species indicates an important step describing the processes of spontaneous mutagenesis.

ÍNDICE

	Pg
RESUMO	
ABSTRACT	
CAPÍTULO 1 - Introdução.....	1
I.1. ESTADOS EXCITADOS	2
I.1.1. Geração química de espécies excitadas	5
I.1.2. Geração biológica de espécies excitadas	8
I.1.2.1. Bioluminescência	8
I.1.2.2. Processos biofotoenergizados	11
I.1.3. Mecanismo via dioxetanos	12
I.1.3.1. Mecanismo da decomposição de dioxetanos .	13
I.1.4. Detecção de estados excitados em sistemas biológicos	14
I.1.5. Espécies excitadas geradas por enzimas	15
I.1.5.1. Oxidação de isobutanal a acetona e ácido fórmico	16
I.1.5.2. Oxidação de propanal a acetaldeído e ácido fórmico	17
I.1.5.3. Oxidação de compostos possuindo o grupo $\text{O}\overset{ }{\text{C}}\text{-CH}\overset{ }{\text{-CO}}$	18
I.1.5.4. Oxidação do ácido indol-3-acético a indol-3-carboxialdeído e CO_2	19
I.1.6. Transferência de energia para biomoléculas	20
II. ACIDO RIBONUCLEICO DE TRANSFERÊNCIA	23
II.1. ESTRUTURA	23

II.2. FUNÇÃO	27
II.3. BASES MODIFICADAS	29
II.3.1. 4-Thiouridina	29
II.4. EFEITO DE CATIONS NA CONFORMAÇÃO DO tRNA	30
II.5. REAÇÕES BIOFOTOENERGIZADAS E SUA INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS	31
II.6. IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS	33
II.6.1. Sistema : Isobutanal/HRP/O ₂	33
II.6.2. Oxidação de compostos como malonaldeído ...	34
II.6.3. Sistema : IAA/HRP/O ₂	35
III. OXIGÊNIO SINGLETE	37
III.1. GERAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE	39
III.1.1. Geração química de oxigênio singlete	39
III.1.2. Oxigênio singlete gerado fotoquimicamente	40
III.1.3. Oxigênio singlete gerado enzimaticamente	42
III.2. IDENTIFICAÇÃO	43
III.3. EFEITOS <i>in vivo</i>	45
IV. FOTOQUÍMICA DO tRNA	46
IV.1. FORMAÇÃO DO FOTOADUTO 4-TU-Cyt NO tRNA	46
IV.2. OXIDAÇÃO DE TIOCETONAS DO TIPO 4-TU	47
IV.3. AÇÃO FOTODINÂMICA SOBRE O tRNA	49
V. OBJETIVOS DA TESE	60

	p9
CAPÍTULO 2 - PARTE EXPERIMENTAL	62
I. PARTE EXPERIMENTAL	63
I.1. APARELHAGEM	63
I.2. MATERIAL	64
II. MÉTODOS	67
II.1. PREPARO DE SOLUÇÕES	67
Ácido indol-3-acético	67
Acridina laranja	68
Catalase	68
DABCO	68
Eosina Y	68
Fenol-clorofórmio	69
Histidina	69
Manitol	69
Peroxidase do rabanete	69
Sulfato de cobre-nitrito de potássio	69
Superóxido dismutase	69
Tampão	70
4-Thiouridina	70
tRNA	70
Uridina	71
Meios de cultura	71
II.2. MÉTODOS ANALÍTICOS	72
a) Extração do tRNA	72
b) Observações de possível diminuição do número de bactérias, inespecificamente	72

	pg
c) Filtração em gel	72
II.3. MÉTODOS SINTÉTICOS	74
a) Síntese do malonaldeído	74
b) Formação do fotoaduto 4-TU-Cyt no tRNA tratado com o sistema IAA/HRP/O ₂	75
III. CONCENTRAÇÕES DOS SISTEMAS	76
III.1. SISTEMAS FOTOQUÍMICOS	76
III.1.1. Irradiação direta	76
III.1.1.1. Após o tratamento com luz	76
III.1.1.2. Irradiação direta de tRNA na presença de íons Mg ⁺²	76
III.1.1.3. Irradiação direta de tRNA na presença de aniquiladores	77
III.1.2. Irradiação na presença de um sensibilizador	77
III.1.2.1. Irradiação na presença de AL..	77
III.1.2.2. Irradiação com AL na presença de aniquiladores	77
III.1.2.3. Estudo da ligação de AL ao tRNA	78
III.1.2.4. Irradiação com AL na presença de 4-TU	78
III.2. SISTEMAS BIOFOTOENERGIZADOS	79
III.2.1. Sistema : MA/HRP/Mn ⁺² /O ₂	79
III.2.1.1. Com tRNA	79
III.2.1.1. Com tRNA e íons Mg ⁺²	79

	P9
III.2.1.3. Com tRNA e AL	79
III.2.1.4. Supressão da espécie excitada por tRNA	80
III.2.1.5. Sistema com 4-TU	80
III.2.1.6. Efeito de histidina sobre o sistema	80
III.2.2. Sistema : IAA/HRP/O ₂	81
III.2.2.1. Com tRNA	81
III.2.2.2. Com 4-TU	81
III.2.2.3. Formação do fotoaduto 4-TU-Cyt no tRNA submetido ao tratamento com o sistema	81
III.2.2.4. Efeito do sistema na mortalidade das diferentes linhagens de E.coli	82
CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
ESTUDO DOS SISTEMAS FOTOQUÍMICOS	84
I. IRRADIAÇÃO DIRETA	84
I.1. IRRADIAÇÃO DIRETA DE tRNA	84
I.1.1. Irradiação direta de tRNA na presença de íons Mg ²⁺	84
I.1.2. Irradiação direta de tRNA na presença de aniquiladores	85
II. IRRADIAÇÃO NA PRESENÇA DE UM SENSIBILIZADOR	104
II.1. IRRADIAÇÃO COM tRNA e AL	104
II.2. IRRADIAÇÃO COM AL, NA PRESENÇA DE ANIQUILADORES	104

	pg
II.3. ESTUDO DA LIGAÇÃO DE AL AO tRNA	104
II.4. IRRADIAÇÃO COM AL NA PRESENÇA DE 4-TU	105
ESTUDO DOS SISTEMAS BIOFOTOENERGIZADOS	130
III. SISTEMA : MA/HRP/Mn ²⁺ /O ₂	130
III.1. COM tRNA	130
III.1.1. Com tRNA íons Mg ²⁺	130
III.1.2. Com tRNA e AL	130
III.2. SUPRESSÃO DA ESPÉCIE EXCITADA POR tRNA	131
III.3. COM 4-TU	131
III.4. Efeito de histidina sobre o sistema	131
IV. SISTEMA : IAA/HRP/O ₂	161
IV.1. COM tRNA	161
IV.2. COM 4-TU	161
IV.3. FORMAÇÃO DO FOTOADUTO 4-TU-Cyt [8-13] NO tRNA SUBMETIDO AO TRATAMENTO COM O SISTEMA	161
V . CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DE <u>E. coli</u> TRATADA COM O SISTEMA	162
 CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES, APÊNDICES E BIBLIOGRAFIA	 183
CONCLUSÕES	184
IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS:	185
1) Sistema com irradiação direta	185
2) Sistema com irradiação fotossensibilizada	185
3) Sistemas biofotoenergizados	186
a) MA/HRP/Mn ²⁺ /O ₂	186
b) IAA/HRP/O ₂	186

	pg
APÊNDICES	187
Apêndice I - Dicroísmo Circular	187
Apêndice II - Cromatografia	197
Apêndice III - Transferência de energia	199
Apêndice IV - Estrutura de compostos	207
BIBLIOGRAFIA	210
ATIVIDADES DURANTE O DOUTORAMENTO	

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Introdução

Devido ao caráter multidisciplinar deste trabalho, serão apontados os diferentes conceitos que foram utilizados.

As reações químicas que resultam da irradiação de sistemas químicos com luz, têm sido tradicionalmente chamadas de reações fotoquímicas. Pode-se dizer então, que uma reação química que começa com a absorção de luz e termina com a formação de um produto estável é chamada de reação fotoquímica (1). A fotoquímica permite resolver problemas relacionados com as mais diversas áreas da química (2). Entretanto há outros processos em que ocorre a geração de espécies eletronicamente excitadas, que são chamados de processos fotobiológicos ou biofotoenergizados. Estas espécies excitadas podem se formar durante as reações enzimáticas, nos seres vivos.

1.1) Estados excitados

A absorção de luz ultra-violeta ou de luz visível por uma molécula orgânica, causa a excitação de um elétron de um orbital ocupado, de baixa energia, para um orbital desocupado, de maior energia. O processo pode ser visualizado simplifadamente, como mostra a figura 1.1. A energia do fóton absorvido é usada para energizar um elétron, e por isso ele é promovido para um or-

bital de maior energia. Dois estados eletronicamente excitados são originados da configuração eletrônica do orbital, produzida por absorção de luz. Em um estado, os spins estão emparelhados (antiparalelos) e, no outro, estão desemparelhados (paralelos). Um estado onde os spins estão emparelhados é chamado singlete; quando os spins estão desemparelhados, o estado é chamado triplete (3).

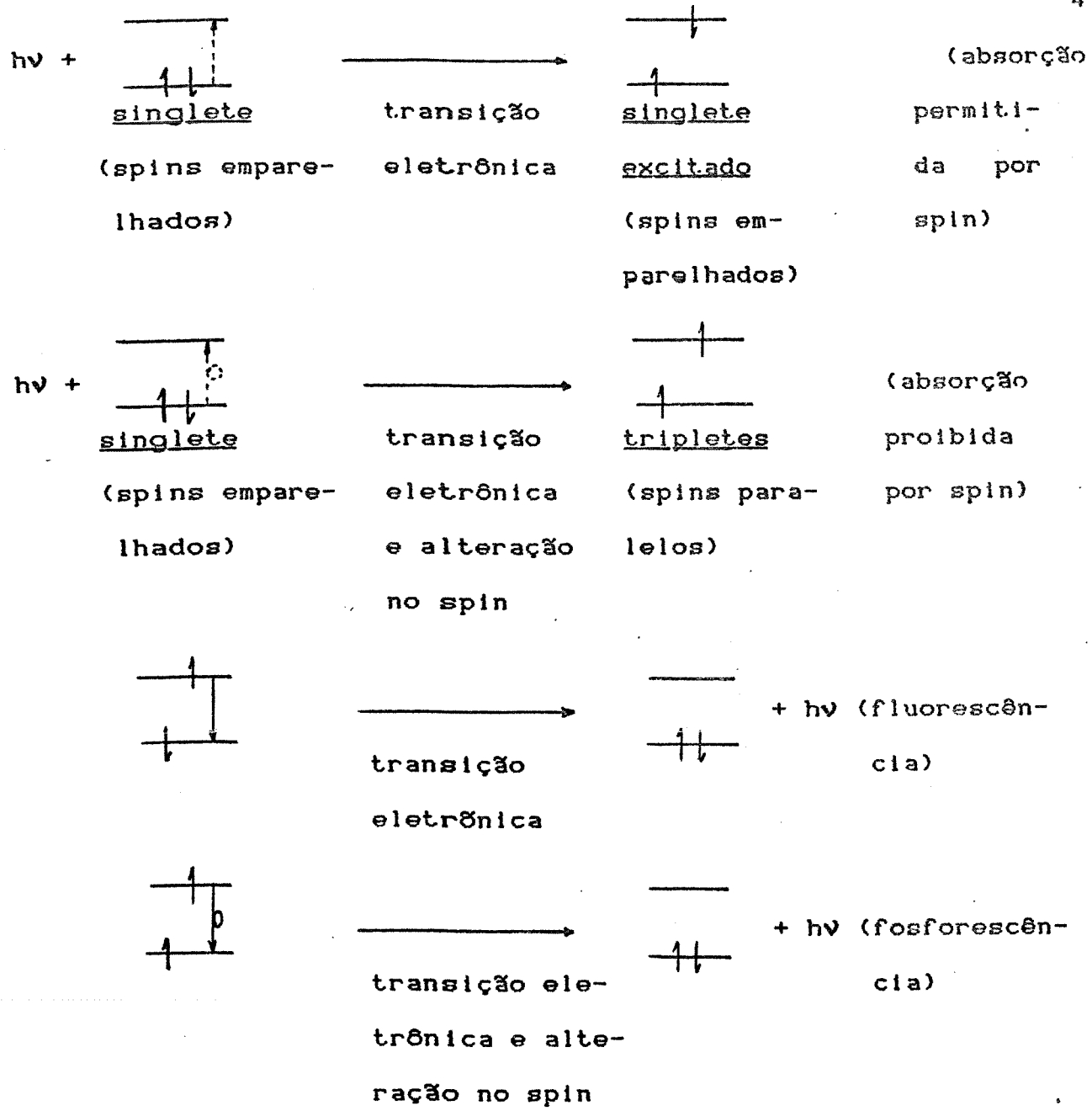
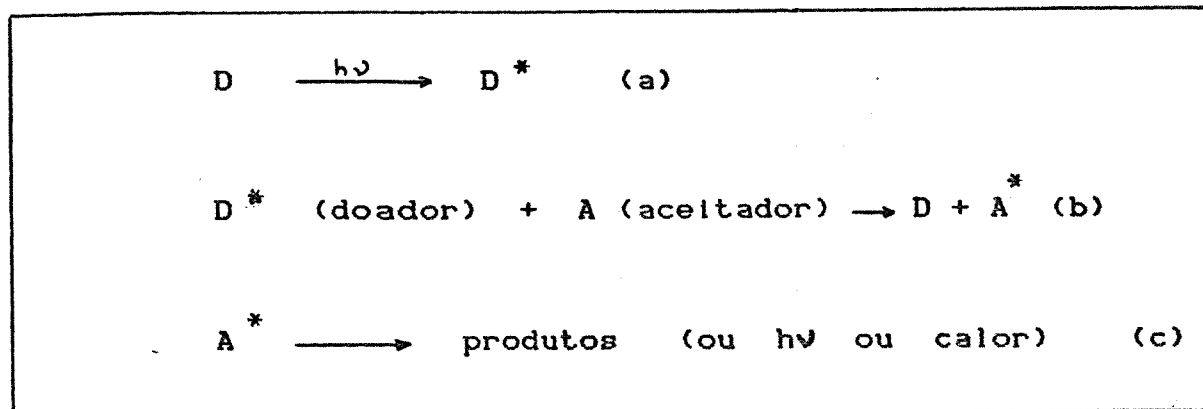


Figura 1.1.1: Descrição dos níveis de energia dos orbitais (absorção e emissão).

A formação dos estados excitados pode ser visualizada pela equação 1.1.1:



Eq. 1.1.1 : Formação de estados excitados

Os estados inicialmente produzidos por absorção de um fóton são quase sempre singlete. Isto porque a grande maioria das moléculas no estado fundamental têm os elétrons pareados (estado singlete, pois não há violação das regras de conservação de spin no processo de absorção de energia) (3).

1.1.1. Geração química de espécies excitadas

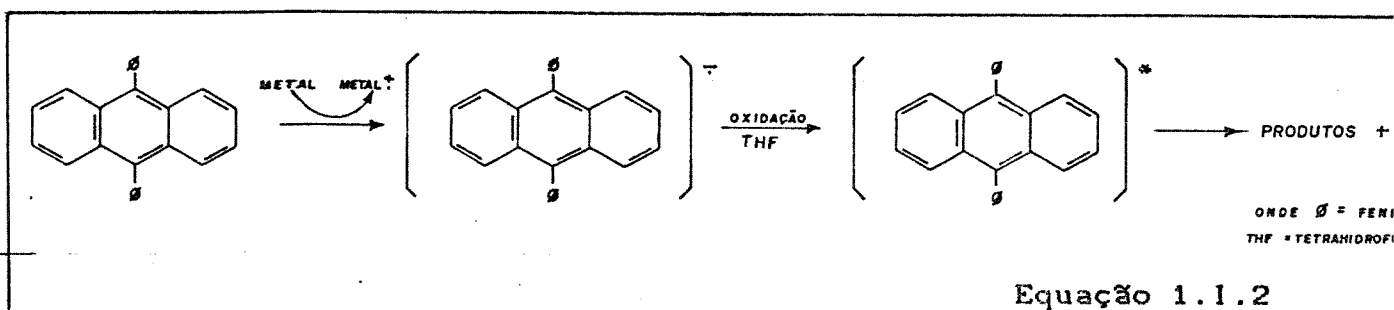
Os principais processos químicos que envolvem a produção de estados excitados, são: transferência de elétrons e clivagem de peróxidos cíclicos e lineares.

a) Reações de transferência de elétrons

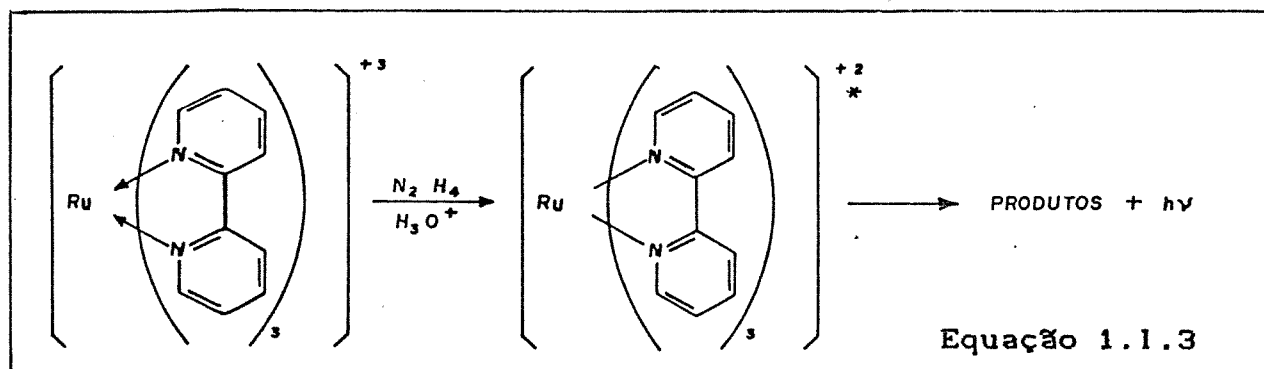
As espécies excitadas podem se formar pelos seguintes processos : remoção de um elétron (oxidação) de um ânion-radical

(eq.1.1.2), redução de um cátion-radical (eq.1.1.3), ou do aniquilamento cátion-ânion (eq.1.1.4) (4, 5).

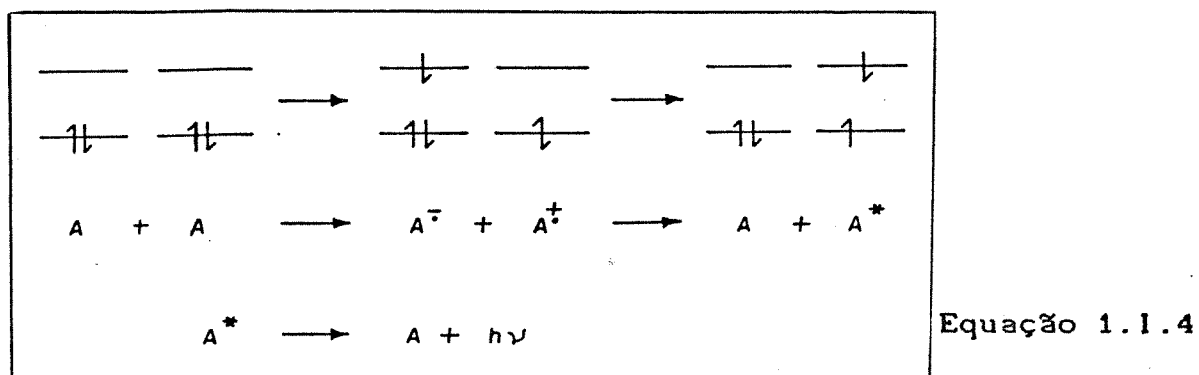
Remoção de um elétron formando um ânion-radical:



Redução de cátion-radical:

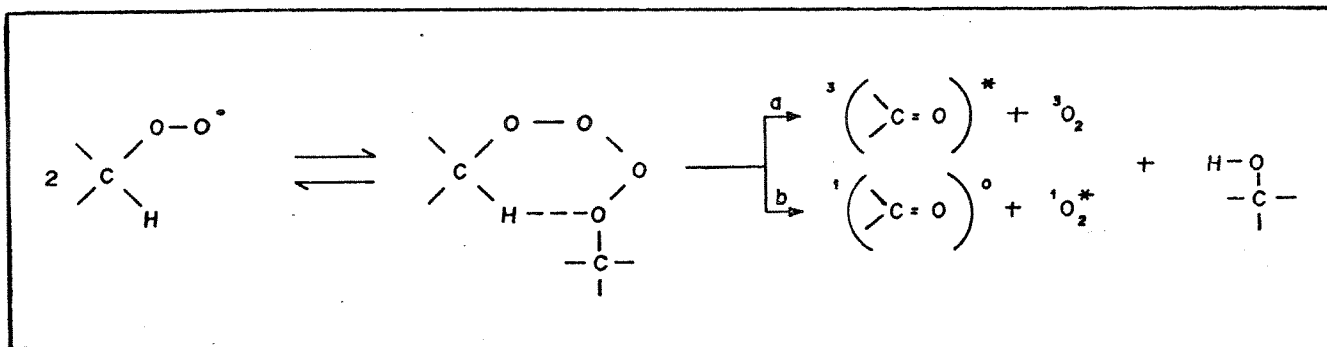


Aniquilamento cátion-ânion:



b) Reações de auto-oxidação envolvendo radicais peróxidos

As reações de auto-oxidação de hidrocarbonetos e polímeros, envolvendo radicais peróxidos estão descritas na literatura (6, 7) (Eq.1.1.5).



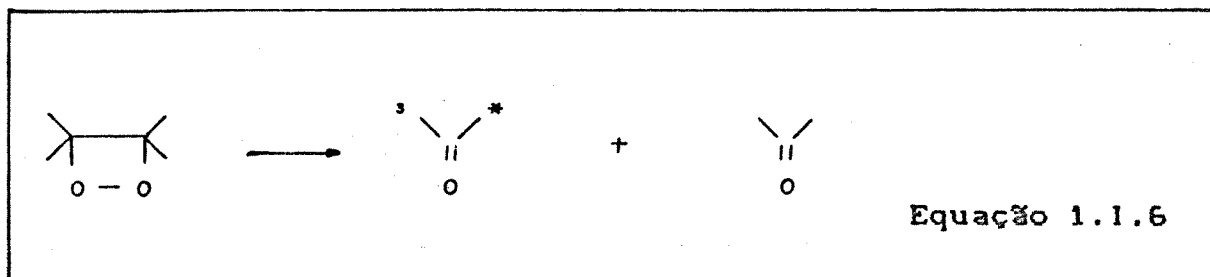
Equação 1.1.5

Pela regra de conservação de spin, a acetona formada no passo **a** deve estar no estado triplete, ou alternativamente, o oxigênio formado no passo **b**, no estado singlete (8).

c) Decomposição de estruturas do tipo 1, 2 dioxetanos

1, 2 - Dioxetanos estão entre as melhores substâncias químicas que geram espécies excitadas (9-12). Por clivagem, um dos fragmentos carbonílicos é formado em um estado eletronicamente excitado, principalmente o estado triplete (10, 13, 14, 16 e 17) (eq.1.1.6). Esta clivagem é catalisada por traços de metais,

aminas e sílica-gel, em forma não emissiva (15).



Em sistemas biológicos também pode ocorrer a formação de intermediários dioxetanos. Este fato será discutido mais adiante.

1.1.2) Geração biológica de espécies excitadas

1.1.2.1.) Bioluminescência

Para muitas pessoas, a bioluminescência é representada pela luz do vagalume ou pela "fosforescência" que ocorre pela agitação da superfície da água do oceano. Na verdade, devido à abundância do material, a reação de bioluminescência do vagalume foi motivo de vários estudos que resultaram num modelo original de vários processos enzimáticos, que ocorrem desde bactérias marinhas até grandes besouros luminosos da América do Sul (18).

A bioluminescência pode ser entendida como sendo a emissão de luz fria de alta eficiência, que é usada pelo organismo para algum propósito de sobrevivência, embora em alguns casos isto seja apenas hipotético. A emissão de luz tem sido detectada em um número cada vez maior de reações biológicas.

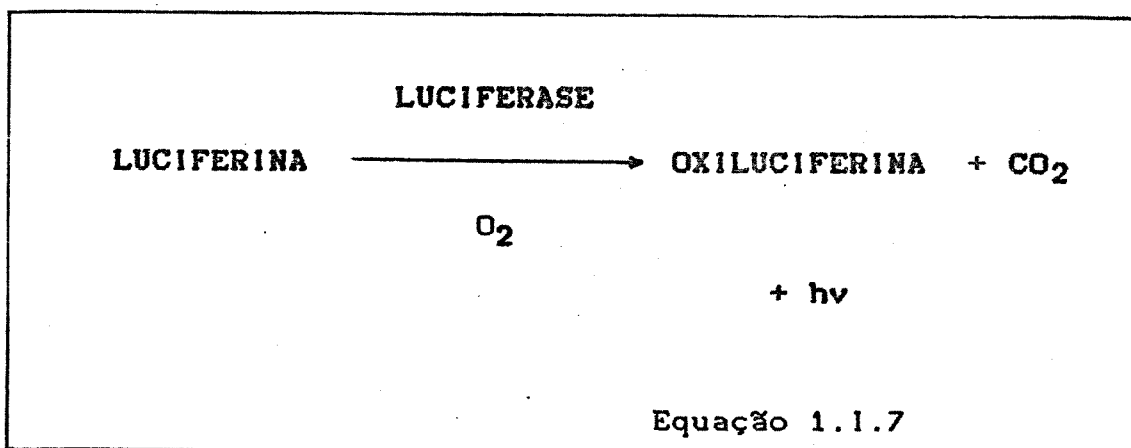
A bioluminescência ocorre em muitas formas de vida ter-

restre, entretanto é mais comum no mar, particularmente no profundo do oceano, onde quase todas as espécies são luminescentes. Além do vagalume, existem na terra fungos luminosos ("foxfire"), pirilampos e caramujos (*Latia*) encontrados somente na Nova Zelândia, um tipo de besouro (*Coleoptera*), as minhocas de estrada de ferro ("railroad worm"), encontrados na América do Sul, e as minhocas da terra ("earthworms"). No oceano, os protozoários são normalmente responsáveis pela chamada "fosforescência", mas o maior grupo bioluminescente é o dos celenterados, isto é, os corais "macios" (*Anthozoa*), água-viva (*Hydrozoa*) e outros. Há muitos tipos de peixes luminosos que têm sua luminescência derivada de uma cultura de bactérias simbióticas. Também alguns animais marinhos (*Chaetopterus*, *Balanoglossis*, *Odontosyllis*), crustáceos (*Cypridina*), lula (*Watasenia*), camarão (*Holophorus*) e equinodermas (estrela do mar e ouriço do mar), apresentam luminescência (18). A cor da luz emitida por estes organismos é variada (18).

Assim como a reação de quimiluminescência é aquela que procede com liberação de energia suficiente para produzir uma molécula no sistema em estado eletronicamente excitado; a bioluminescência pode ser visualizada como sendo uma reação quimiluminescente catalisada por enzima (18).

Boyle, no começo do século dezessete, descobriu que era necessária a presença de oxigênio para a bioluminescência de bactérias e fungos, e agora é sabido que o oxigênio de alguma forma está envolvido em todos os sistemas bioluminescentes (19). No fim do último século, Dubois (20) descobriu que dois componentes poderiam ser extraídos de um órgão de vagalume, um com água quente

e outro com água fria. Quando misturados, poderiam originar um rápido pulso de luz bioluminescente. O extrato de água fria, que era sensível ao calor, ele chamou de luciferase e o extrato de água quente, luciferina (20). Desta forma, a bioluminescência, ou emissão de luz, por seres vivos, resulta de uma reação oxidativa catalisada por enzima, em que o substrato recebe o nome genérico de luciferina e a enzima de luciferase (21). Estas reações, que são do tipo enzima-substrato, diferem em complexidade; algumas envolvem três ou quatro substratos; e outras mesmas requerem um sistema de três ou quatro enzimas. A reação pode ser esquematizada como se segue abaixo:



A cor da luz emitida (eq.1.1.7) pelos diversos organismos, vai desde o azul (λ 460 nm) de certos crustáceos, passando pelo verde (λ 530nm) de cogumelos, pelo amarelo-esverdeado até laranja (λ 540 - 580 nm) de vagalume até o vermelho (λ 600 nm) da forma larval do inseto *Diplocardia longa* (22). Isto porque provavelmente haja transferência de energia a diferentes tipos de receptores biológicos.

A luminescência destes sistemas enzimáticos provém de

estados excitados singletes, que se desativam emitindo luz fluorescente, com alto rendimento quântico (23).

Postulou-se que a espécie geradora de estados excitados em bioluminescência de vagalume Photinus (24), crustáceos Cypri-
dina (25), celenterado Renilla (26) e molusco Latia (27), cujas luciferinas já foram isoladas e sua estrutura determinada, seria um intermediário dioxetanona, que será discutido mais adiante.

1.1.2.2) Processos biofotoenergizados

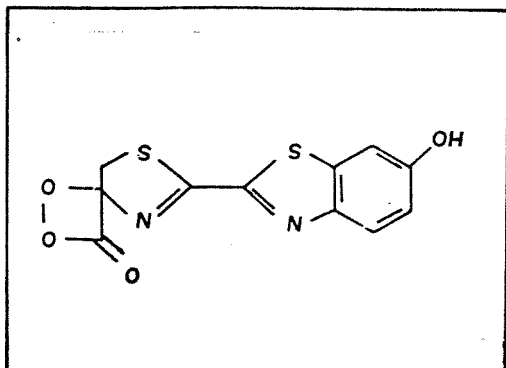
As espécies eletronicamente excitadas também podem se formar através de outros processos enzimáticos (que não os descritos acima). Todos estes processos são chamados de "fotoquímica no escuro" (28).

Os sistemas mais prováveis de gerar estados excitados são as reações catalisadas por hemoproteínas, principalmente a peroxidase (29a e 29b). Esta enzima (HRP - peroxidase do rabanete ou "horseradish peroxidase") catalisa diversas reações, como por exemplo: oxidação do isobutanal a acetona excitada, oxidação do propanaldeído a acetaldeído excitado, oxidação do ácido indol-3-acético a indol-3-aldeído excitado, degradação do malonaldeído a oxigênio singlete, e outras. Todas estas reações serão discutidas nos próximos itens.

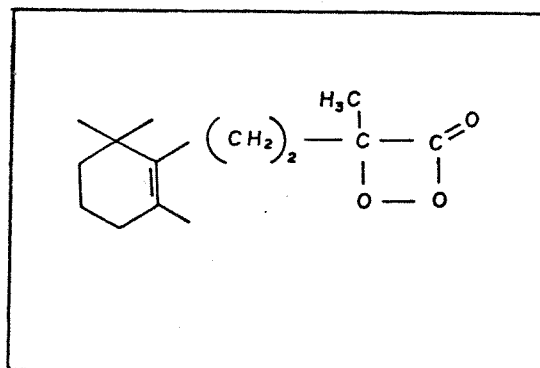
1.1.3. Mecanismo via dioxetanos

As reações bioquímicas já descritas anteriormente (ítems 1.1.2.1 e 1.1.2.2) produzem estados eletronicamente excitados. Tornou-se então necessário procurar modelos simples, baseado no que se sabe sobre quimiluminescência, para explicar a formação destes estados excitados. Desta forma, é dada uma consideração especial a reações que devem (pelo menos por via de regra) proceder através de um intermediário dioxetano ou do tipo dioxetano, como uma dioxetanona (α -peroxilactona). É sabido que a clivagem desses dioxetanos produz um derivado carbonílico num estado eletronicamente excitado, como pode ser visto pela equação 1.1.6 (9, 14, 30, 31).

Algumas luciferinas já foram isoladas de organismos vivos e suas estruturas determinadas. O intermediário formado seria do tipo dioxetanona, como se pode ver nas estruturas abaixo:

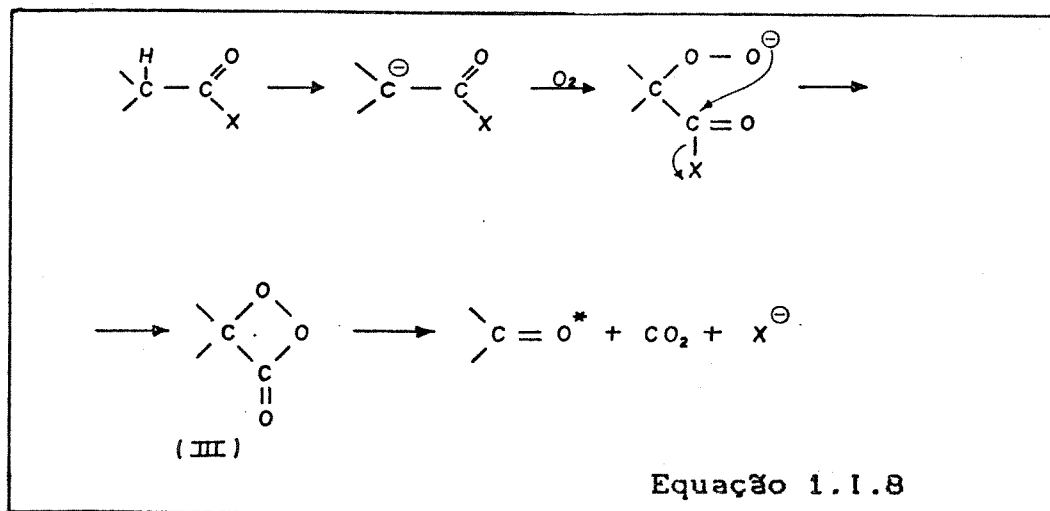


(I)



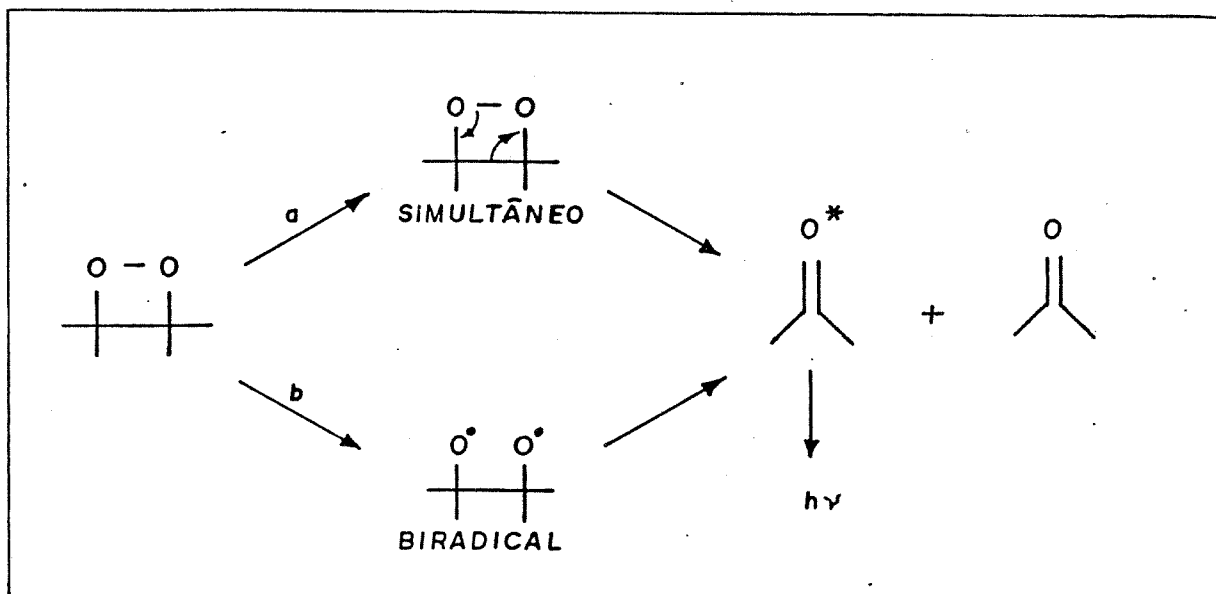
(II)

A formação do intermediário (III), a dioxetanona, pode ser vista no mecanismo proposto por McCapra e col. (27):



1.1.3.1. Mecanismo da decomposição de dioxetanos

Há dois mecanismos (extremos) para a decomposição de dioxetanos (ou dioxetanonas) (33a e 33b), como pode ser visto abaixo:



Esquema I : Mecanismo para a decomposição de dioxetanos.

O primeiro é o mecanismo simultâneo, no qual as ligações O-O e C-C se quebram, e as ligações C=O se formam simultaneamente. O segundo, é um mecanismo em duas etapas, no qual a clivagem da ligação O-O, mais fraca, ocorre primeiro, gerando um birradical de meia vida curta, que se quebra, dando os produtos. McCapra sugeriu o mecanismo simultâneo, onde pôde ser investigada a exotermicidade da reação (34). Um mecanismo aplicável a todos os dioxetanos deve ser compatível com as seguintes observações:

a) as espécies excitadas são produzidas eficientemente, mas a multiplicidade triplete predomina sobre a singlete, mesmo quando o singlete é disponível.

b) a estabilidade do dioxetano é influenciada por substituintes. Os mais estáveis são aqueles que contêm grupos volumosos, especialmente quando rígidos (35).

Muitos processos ocorrem via dioxetanos, mas, às vezes, o oxigênio singlete está envolvido neles (36).

1.1.4. Detecção de estados excitados em sistemas biológicos

A detecção de estados excitados em sistemas biológicos pode ser feita por via direta, ou seja, em um espectrofluorímetro convencional, ou num contador de fótons. Mesmo os estados tripletes (não emissivos em solução aerada) podem ser detectados em espectrofluorímetro normal, desde que protegidos da desativação por oxigênio. Outro meio de detecção de estados excitados seria por via indireta. A transferência de energia a "aceitadores"

apropriados é bastante útil. Assim, quando não se sabe se o estado excitado de uma carbonila é triplete ou singlete, costuma-se usar 9,10-difenilantraceno-2 sulfonato de sódio (DPAS), para singletes. Para espécies tripletes usa-se 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio (DBAS) e também eosina Y e rosa de bengala. Para se ter um mecanismo de Foster, tais reagentes fluorescentes devem absorver na região de fosforescência do doador, ou seja, a banda de fosforescência do doador deve sobrepôr-se ao espectro de absorção do aceitador (37).

Quando não se tem transferência de energia para um dado aceitador, não quer dizer que o estado excitado não tenha sido produzido. Assim, pode-se também procurar os "fotoprodutos" provenientes das modificações químicas de estados excitados, como rearranjo, isomerização, dimerização, clivagens, etc (37).

O emprego do sistema modelo é bastante útil. Nesses casos, a ação da enzima seria substituída por um solvente aprótico (p.e. dimetilssulfóxido) aerado na presença de base forte, tal como terc-butóxido de potássio. A ocorrência de emissão de luz no sistema modelo permite suspeitar que também no sistema enzimático há produção de espécies excitadas (37).

1.1.5. Espécies excitadas geradas por enzimas

Em todas as reações descritas, a enzima utilizada foi a HRP, agindo como uma peroxidase-oxidase.

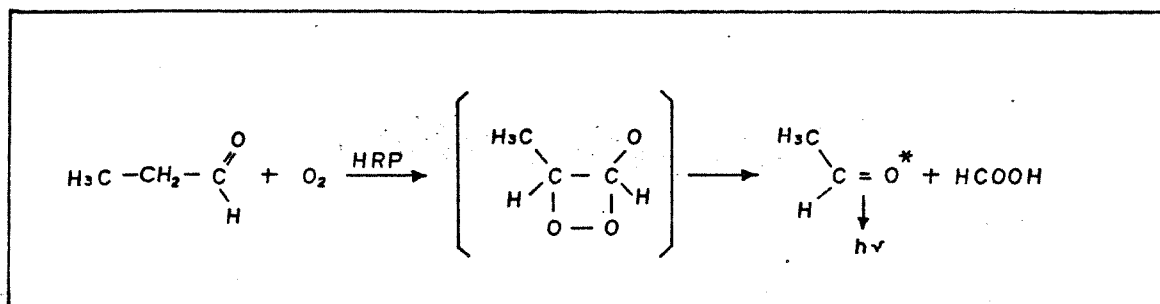
necessário para a mudança de spin. A acetona excitada é capaz de excitar alguns aceitadores como : corantes xantênicos ($K_{ET}\tau^{\circ} = 2 \times 10^4$ a $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) (41), flavinas ($K_{ET}\tau^{\circ} = 2 - 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (42), clorofila ($K_{ET}\tau^{\circ} = 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) e fitocromo ($K_{ET}\tau^{\circ} = 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (44) (para os cálculos de $K_{ET}\tau^{\circ}$ vide apêndice III).

b) Formação de isopropanol

O sistema isobutanal/HRP/O₂ também produz isopropanol em rendimentos superiores a 7%. Todos os controles feitos indicam que o isopropanol deve ser produzido pela redução da acetona excitada. O doador de prótons (H) deve ser o etanol presente no meio (adicionado para ajudar a solubilização do isobutanal), por isso que o acetaldeído também é formado (45).

1.1.5.2. Oxidação de propanal a acetaldeído e ácido fórmico

Esta reação foi estudada por Haun e col. (46), como um possível modelo de algum sistema de α -oxidação.



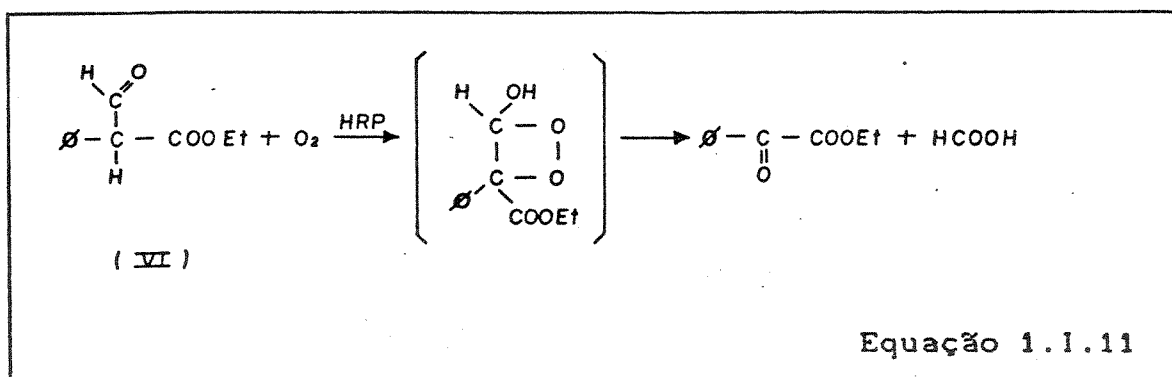
Equação 1.1:10

Embora esta reação seja fracamente emissiva, a formação de uma espécie triplete foi comprovada pelo comportamento similar com a emissão do sistema Isobutanal/HRP/O₂. A ocorrência desta reação foi de uma consequência importante para a estimativa exata das espécies produzidas neste sistema.

1.1.5.3. Oxidação de compostos possuindo o grupo $\text{OC}-\overset{\text{I}}{\text{CH}}-\text{CO}$

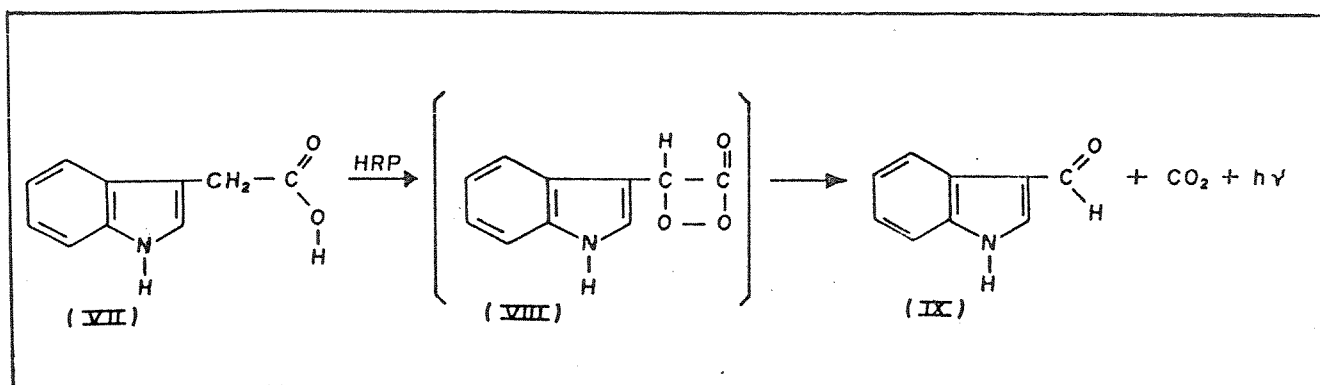
O malonaldeído é rapidamente oxidado por HRP/O₂, entretanto são necessários íons Mn⁺⁺. O espectro de emissão indica que quem emite é o $^1\text{O}_2 \cdot ^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g \cdot ^1\Delta_g$) (47). Este é o primeiro caso de uma emissão substancial de O₂ bimol em um sistema enzimático. Esta reação e seus efeitos foram estudados por Durán e col. (48).

Em Datura innoxia ocorre a reação de oxidação do éster (VI) à cetona (mostrada na equação 1.1.11), que é promovida pela HRP. Nesta reação, um intermediário dioxetano foi postulado (49):



1.1.5.4. Oxidação do ácido Indol-3-acético (IAA)
a Indol-3-carboxialdeído (IAL) e CO_2

Esta reação é muito importante pois o IAA (VII) é um hormônio de plantas. A reação procede, pelo menos formalmente, através de um intermediário dioxetanona (VIII, eq.1.1.12). As evidências circunstanciais para a formação do produto excitado incluem uma fraca emissão correlacionada com a formação do IAL (IX) (50) e uma alteração do tipo fotoquímica do grupo heme da enzima como resultado da reação (51).



Equação 1.1.12

Estudos modelo com um derivado de feniltioéster de IAA em DMSO/terc-BuOK mostraram que uma dioxetanona é formada ao lado da cadeia (52).

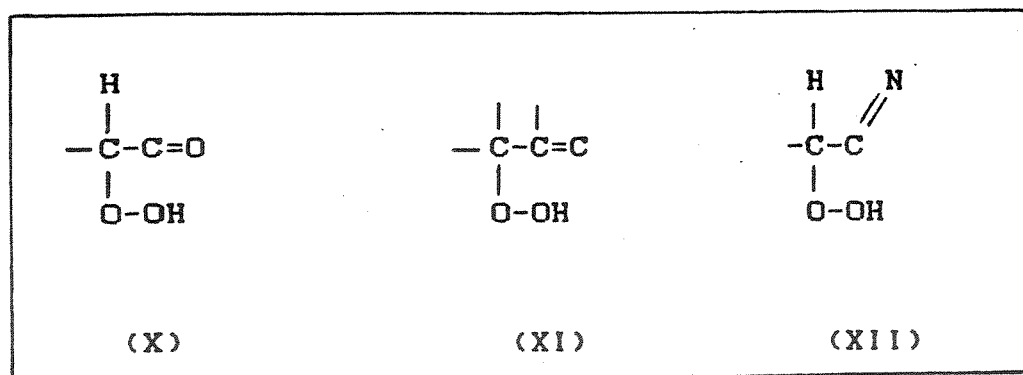
Além destas reações, algumas outras foram estudadas e seus produtos excitados detectados, como a oxidação do ácido indol-3-pirúvico, do indol-3-acetaldeído (53) e da hidrazida do ácido isonicotínico a piridina-4-carboxialdeído (54).

1.1.6. Transferência de energia para biomoléculas

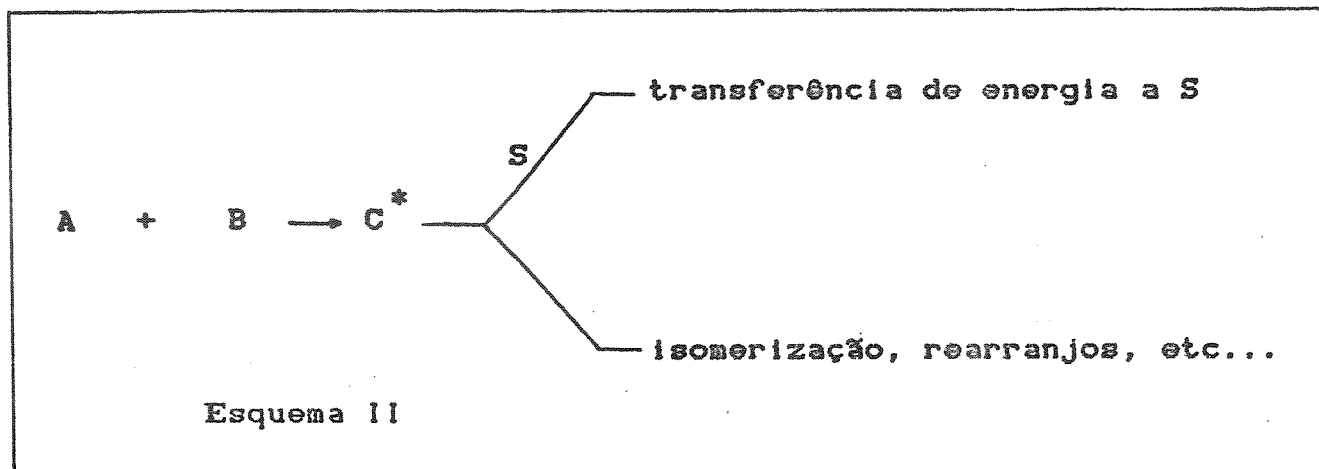
Como foi visto no ítem anterior, estados excitados podem ser formados quimicamente em sistemas biológicos, através de intermediários dioxetânicos, como evidenciado pelo fenômeno da bioluminescência. Muitos processos fotoquímicos têm sido induzidos no escuro, formando-se dioxetanos em estados excitados. Os dioxetanos podem também se formar em outros sistemas biológicos, porém não luminescentes (55 - 57).

Os sistemas mais prováveis de gerar tais estados excitados são as reações catalisadas por hemoproteínas, principalmente as peroxidases (um tipo de peroxidase, HRP, participa das reações citadas nos ítems anteriores). Foi importante também, o isolamento de um dioxetano como produto de uma oxidação catalisada por peroxidase (58).

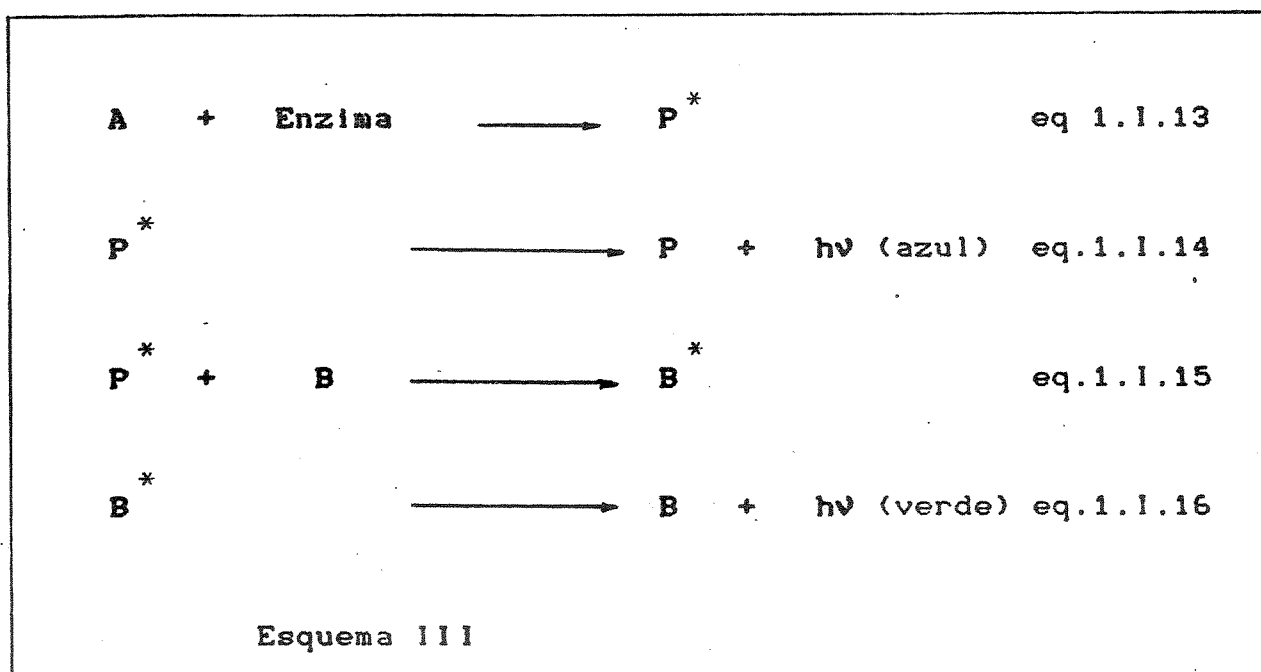
Alguns artigos de revisão tratam deste assunto, reforçando a hipótese de que estados excitados seriam formados em sistemas biológicos envolvendo as peroxidases, ou enzimas correlatas, entre eles os sistemas onde atuam as α -peroxidases (X), as lipoxidases (XI) (59, 60) e talvez as triptofano-oxigenases (XII) (61).



Se estes estados excitados gerados pelos sistemas de peroxidase não se destinam à emissão de luz, é natural supor que eles sejam utilizados para outros fins, ou seja, para realizarem trabalho, tal como em fotoquímica (é a chamada fotoquímica sem luz):



A idéia de transferência de energia é fortalecida por exemplos até mesmo em sistemas bioluminescentes:



Observou-se que em certos organismos vivos, a luz emitida era a mesma que a da reação realizada *in vitro*, correspondendo à transição na etapa da equação 1.1.14. Mas, em muitas outras espécies, a cor da luz emitida era verde, enquanto que a emissão da reação *in vitro* era azul. Isso indicaria que nos seres vivos estaria ocorrendo uma transferência de energia (eqs 1.1.15 e 1.1.16) de uma molécula no estado excitado (P^*) para outras espécies (B) não existentes na reação isolada, com emissão de seu estado excitado (B^*) (eq 1.1.16).

II. Ácido ribonucleico de transferência

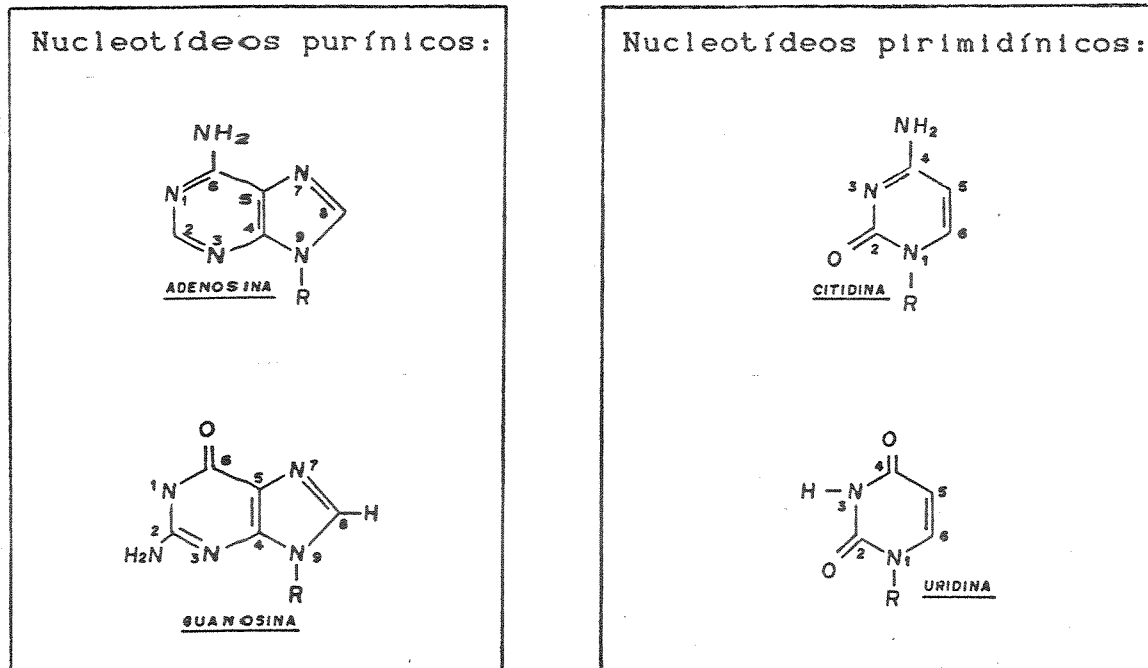
Para que se possa entender o papel das espécies excitadas (descritas anteriormente) sobre o tRNA, é necessário conhecer um pouco de sua estrutura e função.

II.1. Estrutura

O ácido ribonucleico de transferência (tRNA) pertence a uma classe de ácidos ribonucleicos de baixo peso molecular, aproximadamente 25 000 Daltons. Sabe-se que o tRNA desempenha vários papéis, que estão associados à biossíntese proteica. Há cerca de 55 diferentes espécies de tRNA em cada célula viva (62). Hoje em dia, a estrutura tridimensional do tRNA é conhecida e é importante se considerar as suas funções em termos da estrutura.

Os tRNAs desempenham vários papéis na síntese de proteínas, como ativação dos aminoácidos, regulação da síntese proteica, e outros. Atuam também na transferência de aminoácidos à estrutura da parede celular além de outros papéis também importantes (63).

O tRNA é formado por nucleotídeos purínicos e pirimidínicos (fig.1.II.1) além de alguns nucleotídeos modificados (64), cujas características já foram descritas na literatura (65). Ele apresenta bases modificadas, chamadas "raras", que não existem nos outros RNAs (63).



onde R é ribose.

fig.1.II.1 : Nucleotídeos normais presentes no tRNA

Obs.: Nucleotídeos são ésteres de ácido fosfórico, dos nucleosídeos (bases púricas ou pirimidínicas ligadas a um esqueleto de ribose) (63).

Os nucleotídeos ligam-se entre si através de uma molécula de fosfato alternada com uma unidade de ribose. A base é ligada ao C 1' da ribose. Esta estrutura é mostrada na fig.1.II.2.

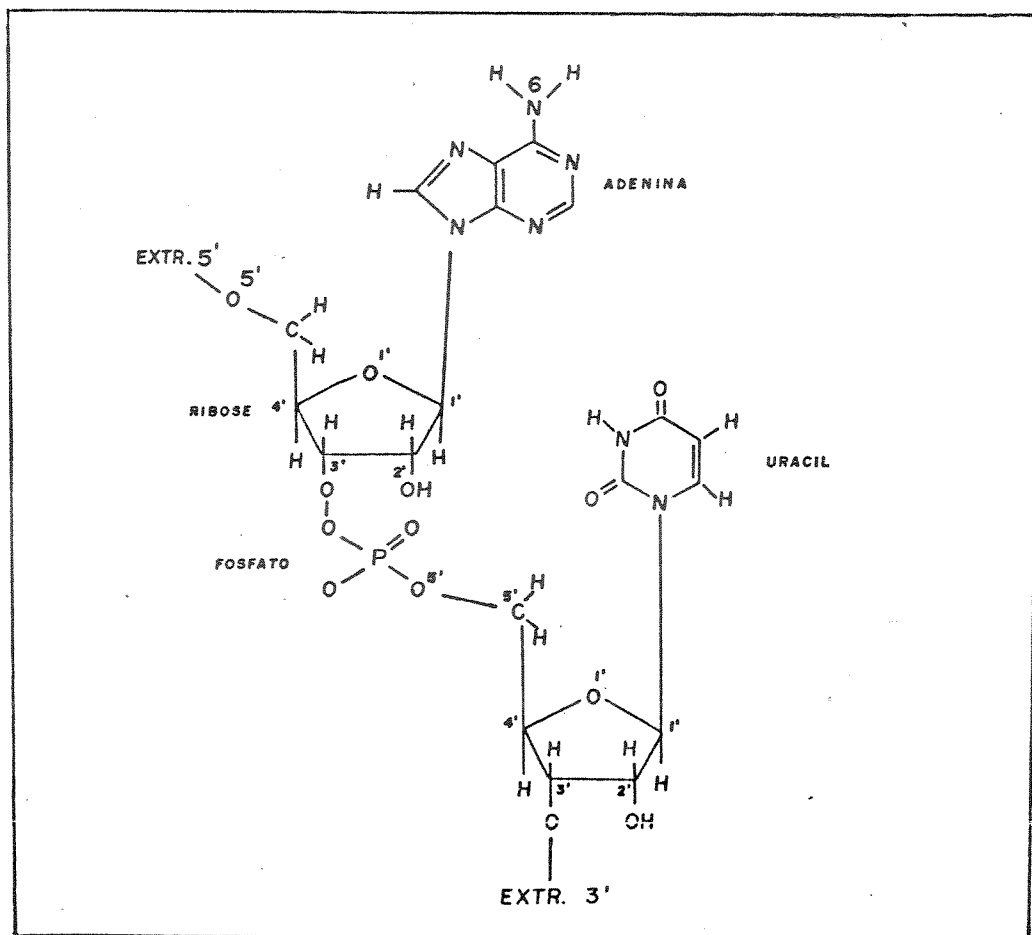


fig. 1.11.2 - Esqueleto de ligações fosfato que formam o tRNA (69).

A estrutura secundária em forma de "folha de trevo", do tRNA, foi proposta em 1965 por Holley e col. (66). O emparelhamento de bases do tipo "Watson-Crick" (67) foi tomado como modelo, para se propor este tipo de estrutura (fig.1.11.3). Mais tarde, estudos com cristalografia e raios X determinaram a estrutura terciária que se mantém através de ligações de hidrogênio (68, 69).

11.2. Função

O papel do tRNA na síntese de proteína é mostrado na figura 1.11.4, onde primeiramente, uma enzima chamada aminoacil-tRNA-sintetase, se liga a uma molécula de tRNA específico, com seu aminoácido correspondente, por uma ligação covalente. O tRNA com o aminoácido ligado se liga ao sítio A do ribossoma (organela onde os aminoácidos são ligados à cadeia polipeptídica da proteína). Esta interação requer hidrogênio se ligando entre as três bases do códon, na alça do m-RNA (mensageiro) que é específico para um aminoácido e as três bases do anti-códon do tRNA. Uma molécula de tRNA no sítio P adjacente, transfere então a cadeia polipeptídica crescente ao tRNA, no sítio A. O tRNA "vazio" sai do sítio P e o ribossomo se move ao longo do mRNA a distância de um códon; então, o tRNA muda a cadeia polipeptídica do sítio A para o sítio P, e o ciclo começa novamente (70).

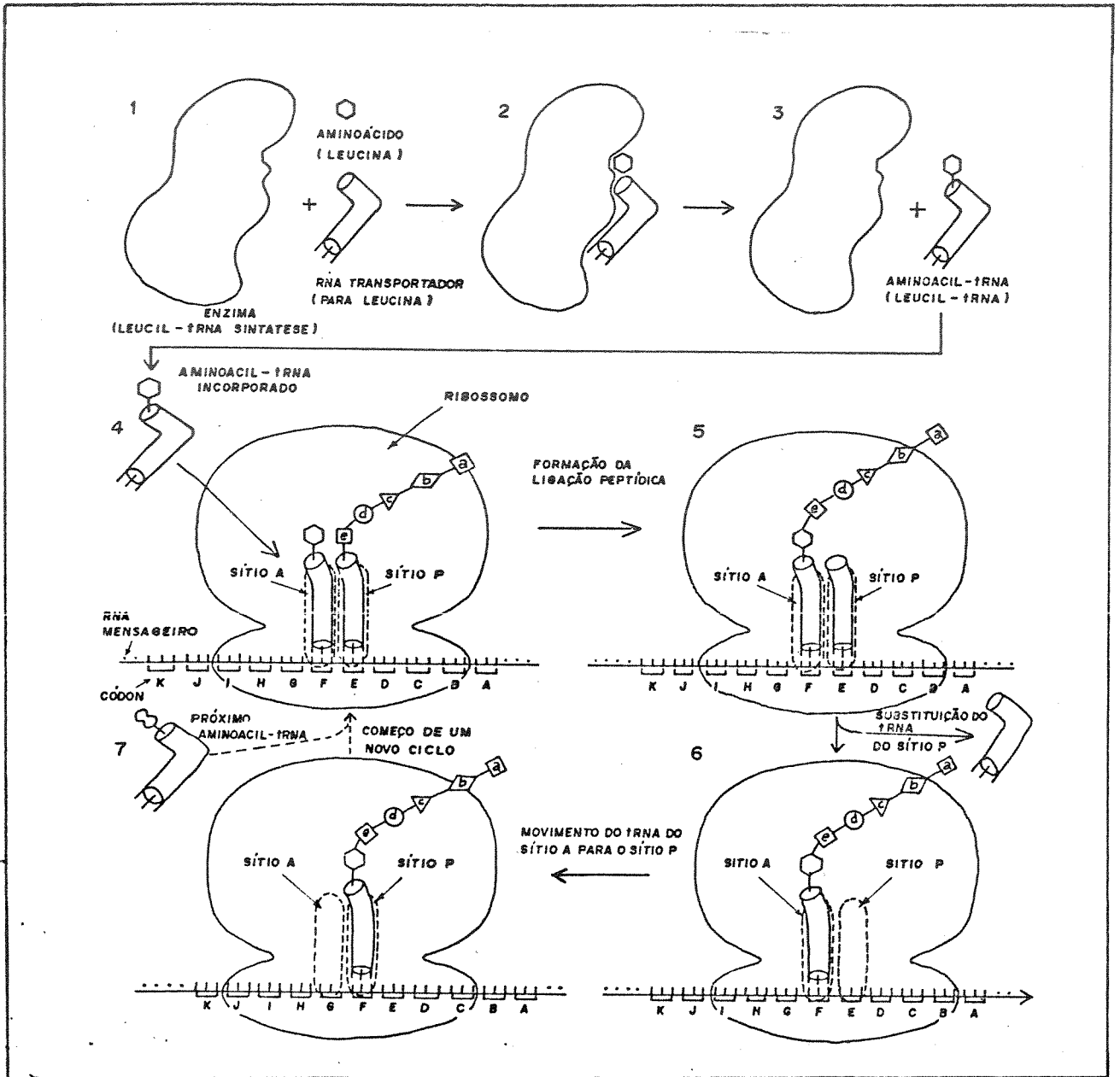


fig. 1.II.4 - Função do tRNA (70).

Obs. Códon é o emparelhamento de três bases.

Além desta importante função, o tRNA participa de mecanismos regulatórios. Por exemplo: Ames e Hartman (71) estudaram o controle da tradução por espécies moduladoras de tRNA. Sueoka e col. (72) verificaram a modificação de tRNA e o controle da tradução. Vários outros pesquisadores estudaram certos papéis também importantes do tRNA, como por exemplo, participação na síntese da parede celular, e atuação como "primer" para a transcriptase reversa na síntese direta do DNA (73 - 75).

11.3. Bases modificadas

A função específica das bases modificadas é ainda um pouco obscura. As bases modificadas mais conhecidas são a 4-Tiouridina e a base Y. A 4-Tiouridina é encontrada em tRNA de *E.coli* e a base Y, em tRNA de levedura (76). Estas bases são altamente luminescentes (71, 77, 78). Por exibirem estas propriedades, podem ser usadas como "sondas" luminescentes conformacionais (71).

11.3.1. 4-Tiouridina

A base 4-Tiouridina (4-TU) está presente em vários tRNAs obtidos de *E.coli* (79, 80) (fig. 1.II.5). Ela se localiza na posição 8 da extremidade 5' da molécula (81, 82) e ocupa uma localização estrategicamente importante na estrutura de folha de trevo do tRNA (fig.1. II.3).

As propriedades espectroscópicas da 4-TU são influenciadas por mudanças na estrutura secundária e terciária do tRNA. A

4-TU está muito bem protegida dentro da estrutura terciária do tRNA e quaisquer mudanças tanto da estrutura secundária como da terciária podem ser acompanhadas pela emissão característica do resíduo de 4-TU (78). A 4-TU tem uma banda de absorção característica em 335nm e à temperatura ambiente, uma emissão a 550nm (com λ de excitação em 335nm).

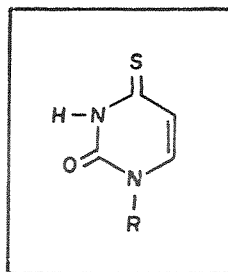


fig.1.II.5 - Estrutura da 4-TU

A intensidade de emissão aumenta com o decréscimo da temperatura e abaixo do ponto de congelamento (de etilenoglicol : H₂O 1:1) um pico adicional aparece em aproximadamente 475nm. Shalitin (71) determinou a meia vida da emissão em 550nm da 4-TU. Quando ligada ao tRNA, a 4-TU apresenta uma emissão em 510nm (82), cuja intensidade é grandemente afetada por íons magnésio (78).

II.4. Efeito de cátions na conformação do tRNA

Devido às fracas interações envolvidas na estrutura terciária dos tRNAs, tanto no de levedura como no de *E.coli*, pode haver modificações da sua conformação por influência do pH do meio (83). Tais modificações podem ser evitadas ou diminuídas por adição de cátions bivalentes como Mg⁺², pois este cátion aumenta o grau de ordem da molécula de tRNA (84).

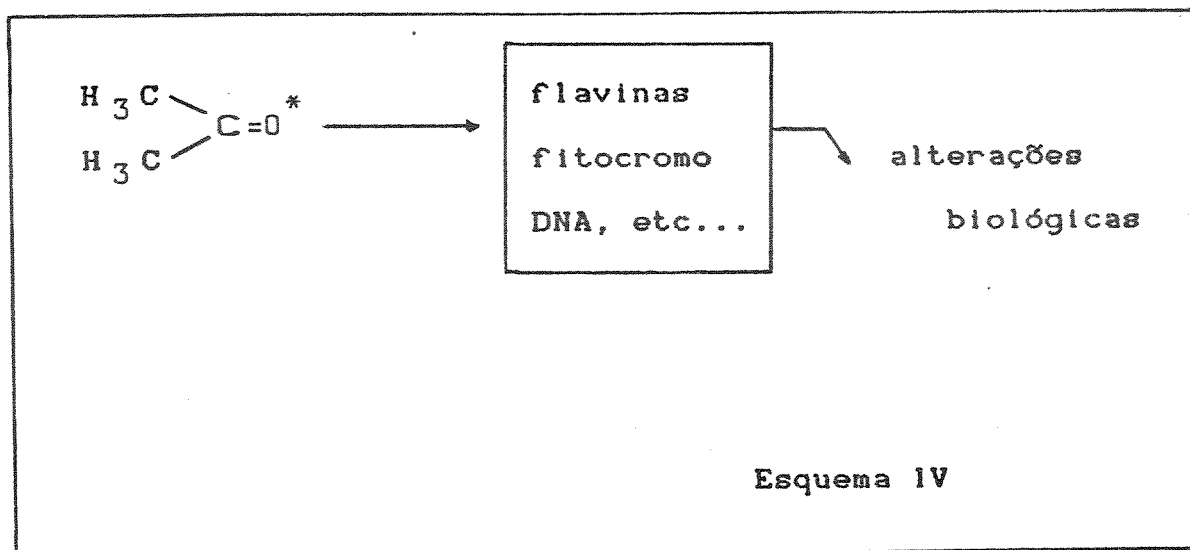
O estudo do efeito deste íon sobre o tRNA está se desenvolvendo já há algum tempo (85 - 87) indicando que existe na macromolécula um sítio especial para a ligação do Mg^{+2} (88).

As mudanças conformacionais são geralmente detectadas acompanhando-se as modificações na luminescência do tRNA (89) ou verificando-se o espectro C.D. de tRNA na ausência ou presença do íon (90).

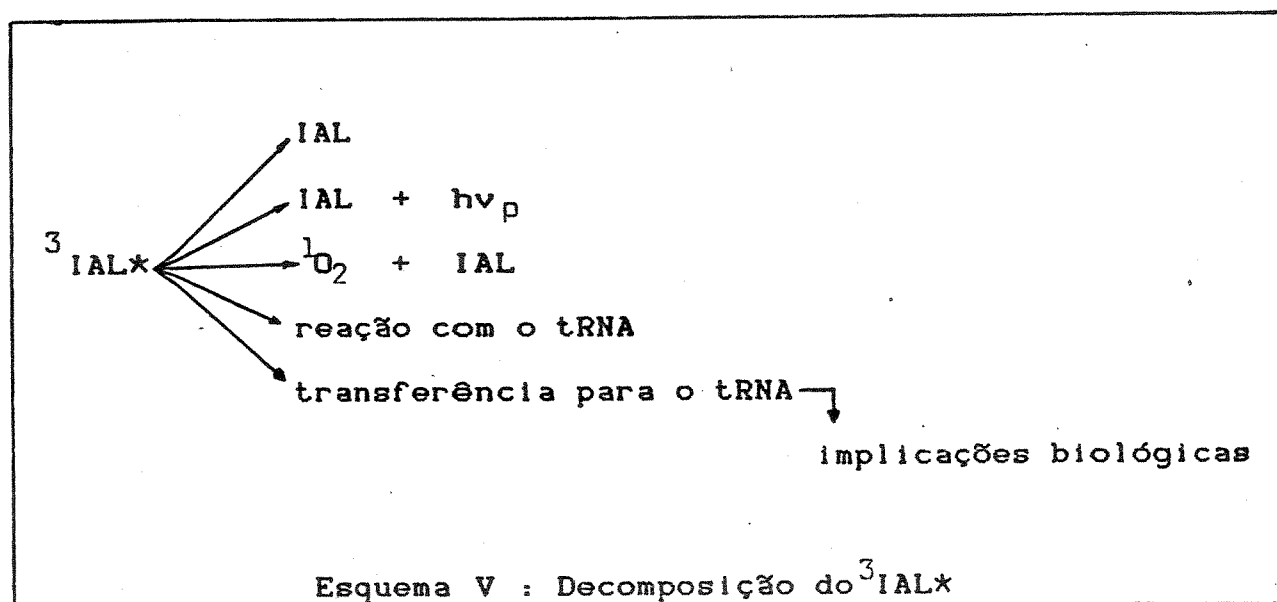
Outros cátions, trivalentes por exemplo, podem também interagir com o tRNA. Os íons Tb^{+3} (91) e Eu^{+3} (92) que são fluorescentes, se ligam ao ácido nucleico possibilitando o estudo conformacional através das modificações da luminescência do próprio íon ou por transferência de energia, e por isso são chamados de "sondas fluorescentes".

11.5. Reações biofotoenergizadas e sua interação com biomoléculas

Foi observada a transferência de energia de reações catalisadas por peroxidase (item 1.1.5), em particular a oxidação do composto isobutanal (IV) (eq.1.1.9) para flavinas, fitocromos, DNA e outras biomoléculas (45).



Outro exemplo análogo é a reação de IAA com HRP, em pH de 3,8 (ítem 1.1.5.4). IAL e CO_2 são produtos esperados da quebra de uma dioxetanona (51) e, sendo assim, o IAL deve ser gerado em estado excitado (vide eq.1.1.12):



O fato que o IAL é formado no estado excitado triplete é comprovado pela reação descrita na eq.1.11.1:

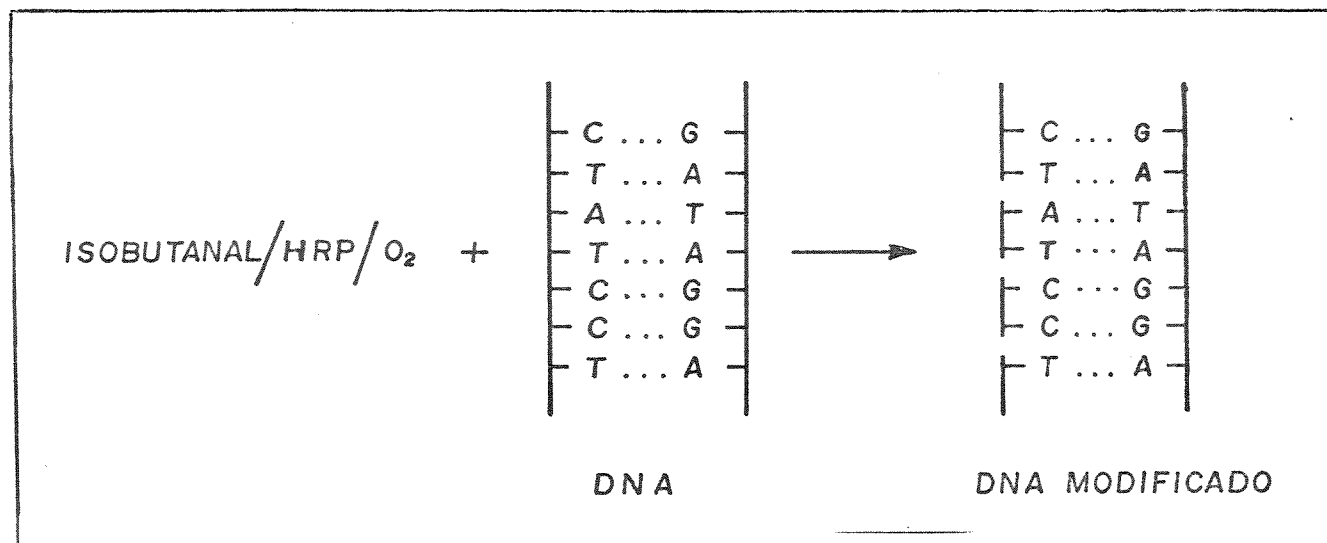


Equação 1.11.1

II.6. Implicações biológicas

II.6.1. Sistema : Isobutanal/HRP/O₂

Foi observado que ocorre transferência de energia da acetona gerada por este sistema para fitocromo, flavinas e DNA (I.1.5.1). Pode-se supor que as alterações que ocorrem com tais componentes celulares poderiam ocorrer in vivo, devido a processos de transferência de energia de espécies excitadas geradas pelos sistemas peroxidase-oxidase. Foi proposto que a acetona triplete gerada por este sistema (isobutanal/HRP/O₂) sobre o DNA induz a formação de adutos de pirimidina e de quebras de fitas simples, como pode ser visto a seguir (esq.VI)(40):

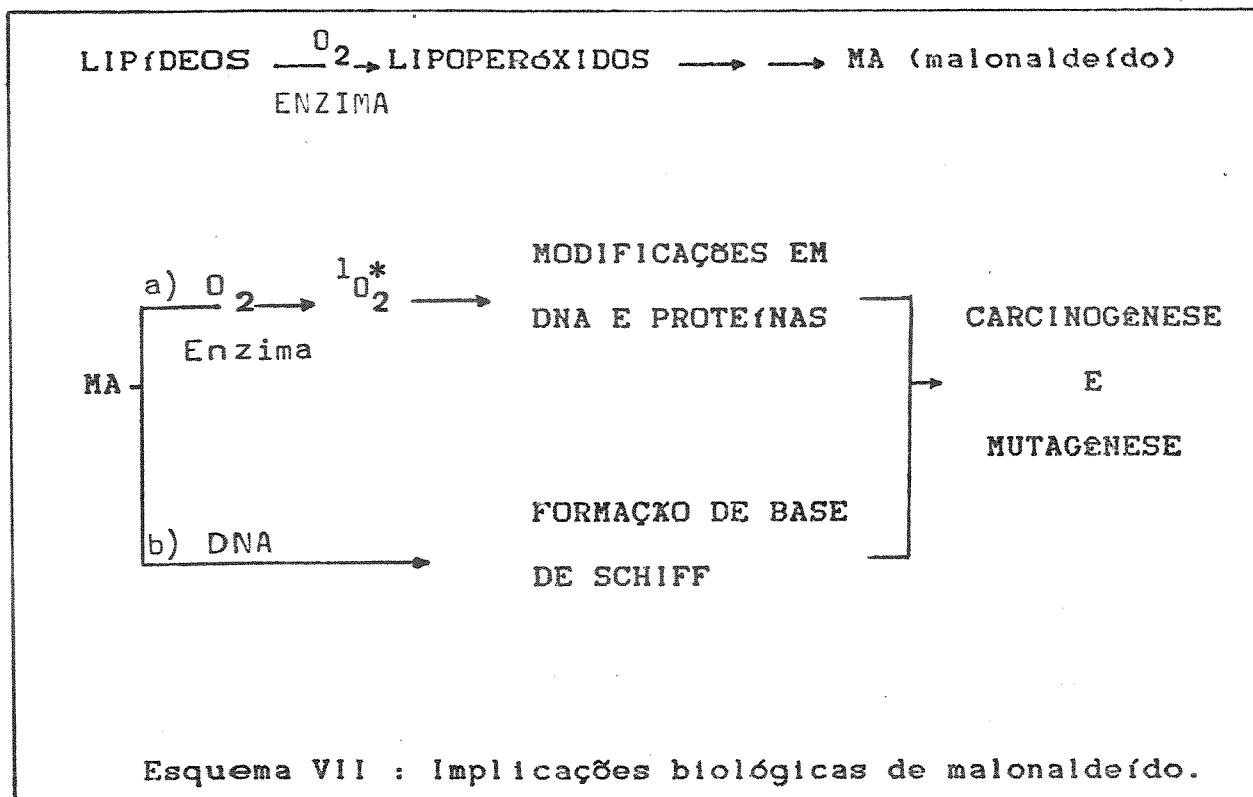


Esquema VI : Formação de quebras de fitas simples em DNA.

11.6.2. Oxidação de compostos como malonaldeído

Sistema : MA/HRP/Mn⁺⁺/O₂

O malonaldeído oxidado por O₂ na presença de HRP gera oxigênio singlete (47) e este, por sua vez, pode causar danos em DNA, tRNA e proteínas *in vitro*. Foi proposto por Durán e col. (48) que mutagênese e carcinogênese causada por malonaldeído, um produto da peroxidação lipídica, possa ser devido à somatória de dois efeitos : reticulação dos grupos amino de DNA, presumivelmente através da formação de bases de Schiff (93, 94) e ação de oxigênio singlete (capítulo 1, III.1) sobre as bases de DNA e proteínas que se encontram nas células.



Possivelmente o passo a (do esquema acima) seja mais rápido, pois *in vitro* a produção máxima de oxigênio singlete ocorre aproximadamente em dois minutos, enquanto que no passo b, a formação de base de Schiff foi detectada com um tempo de incubação de MA-DNA de duas horas (95).

11.6.3. Sistema IAA/HRP/ O_2

O controle da velocidade de crescimento de plantas e diferenciação de tipos específicos de células parecem estar relacionados com a quantidade de IAA e peroxidase presentes (eq.1.112) (96). Assim, a oxidação aeróbica de IAA por HRP deve ter grande importância nestes processos.

O tRNA participa de outros processos importantes como

controle da expressão genética, além do seu papel na síntese proteica (70). Em alguns sistemas, a função de controle exercida pelo ácido nucleico parece estar associada com um nucleotídeo modificado na molécula do tRNA. Na verdade, uma possibilidade para os reguladores em plantas é que eles modifiquem um sítio específico no tRNA, necessário para iniciar a síntese da enzima própria do processo (97, 98). Especulou-se então, por várias vezes, que a reação do tRNA com o IAL* gerado enzimaticamente possa ser um exemplo desta modificação. Uma outra mudança do tRNA pode ser provocada pela reação entre o grupo 4-TU excitado por transferência de energia do IAL triplete, com um grupo vizinho, semelhante à alteração de 4-TU com citidina na posição 13, que ocorre por irradiação do tRNA (74).

Alguns resultados discutidos por De Mello e col. (99) fornecem um possível mecanismo para a interação IAA-tRNA in vivo.

III. OXIGÊNIO SINGLETE

A descoberta do oxigênio singlete por Scheele e Priestly independentemente, há aproximadamente 200 anos atrás, tornou-se um ponto decisivo no desenvolvimento de conceitos químicos (100). O oxigênio singlete tem propriedades exclusivas em várias reações. É uma espécie reativa em muitos sistemas químicos e biológicos. Pode ser gerado por descarga de microondas (101), por reação de peróxido de hidrogênio com hipocloritos metálicos (102), por reação de átomos de hidrogênio com oxigênio molecular, através de fotolionização (103), por excitação direta de oxigênio à alta pressão por laser (104), por irradiação fotossensibilizada (105), por reações bioquímicas ou biofotoenergizadas (47, 48) e também é encontrado como poluente atmosférico reativo comum, gerado por radiação solar (106). O oxigênio singlete reage com uma variedade de materiais que não são afetados por oxigênio normal (105).

Os estados eletrônicos do oxigênio molecular podem ser visualizados na tabela 1.III.1.




Molécula de oxigênio	Configurações dos elétrons em orbitais moleculares mais altos ocupados	Energia relativa (Kcal/mol)
Segundo estado excitado O_2 ($^1\Sigma_g^+$)		37,5
Primeiro estado excitado O_2 ($^1\Delta_g$)		22,5
Estado fundamental O_2 ($^3\Sigma_g^-$)		0

Tabela 1.III.1 - Estado eletrônico do oxigênio molecular reproduzido de Bellus (107).

O oxigênio no estado fundamental, tem dois elétrons em orbitais separados, com momentos angulares opostos, mas com spins paralelos, indicados por $^3\Sigma$ (molécula no estado triplete) e pode atuar como um dirradical (105). No primeiro estado excitado, o oxigênio tem ambos os elétrons num mesmo orbital, com mesmo momento angular, indicado por $^1\Delta$. Como os dois elétrons têm spins opostos, a molécula está no estado singlete (pela regra de multi-

plicidade de spin, $2S + 1$), e tem um comportamento eletrofílico (88). O oxigênio no primeiro estado excitado tem uma meia vida de aproximadamente 2×10^{-6} seg (em água), enquanto que no segundo estado excitado, é de 10^{-11} seg (106).

III.1. Geração de oxigênio singlete

III.1.1. Geração química de oxigênio singlete

Vários métodos podem ser usados para gerar espécies químicas de oxigênio. Estes processos são, por exemplo: reação de H_2O_2 e um hipohaleto, como OCl^- , reação de H_2O_2 e o superóxido radical, O_2^- (108), considerada uma fonte de oxigênio singlete (109). A transferência de um elétron do O_2 para um aceitador adequado foi proposta como sendo um mecanismo através do qual o oxigênio singlete é gerado em cloroplastos iluminados (110). A dismutação espontânea de 2 moles de O_2 resulta na formação de oxigênio singlete, já descrita por vários autores (111, 112), mas ainda continua como um ponto a ser debatido. Os ozonídeos de estabíllidades variadas podem originar oxigênio singlete por decomposição espontânea (113). Ainda, o oxigênio singlete pode ser originado através de processos enzimáticos (114) e fotoquimicamente, através de um sensibilizador (115).

Logo, há três vias pelas quais o oxigênio singlete pode ser gerado. São elas: quimicamente (113), fotoquimicamente (105), e através de sistemas biológicos (114).

III.1.2. Oxigênio singlete gerado fotoquimicamente

A absorção de luz em organismos vivos por sensibilizadores, naturais ou não, na presença de oxigênio causa oxidação, a qual pode originar vários efeitos químicos e biológicos. Estes efeitos provocam, na maioria das vezes, danos celulares (36).

Os fotossensibilizadores são moléculas que podem absorver luz para produzir uma reação química, que não poderia ocorrer na sua ausência; o fotossensibilizador pode mudar ou não, neste processo (36).

Uma das espécies de meia vida curta, que tem se demonstrado existir nestes processos, é o oxigênio singlete, além de outras (114).

O mecanismo de fotooxidação pode ser descrito como : os fotossensibilizadores (S) têm dois tipos de estados eletronicamente excitados, o singlete (1S) e o triplete (3S). O estado triplete tem uma meia vida maior que o singlete. Com raras exceções, as reações fotossensibilizadas ocorrem por meio do sensibilizador triplete; muitos corantes (azul de metileno, rosa de bengala, eosina, acridina laranja, etc.), pigmentos (clorofila, hematoporfirinas, flavinas) e hidrocarbonetos aromáticos, são fotossensibilizadores eficientes (36).

Dois mecanismos de sensibilização já foram sugeridos (116 - 100). Ambos os mecanismos estão em concordância com os dois primeiros passos envolvendo a excitação do sensibilizador (S) para seu estado singlete (1S) por absorção de um fóton de luz ($h\nu$, normalmente na região do visível) e subsequente cruza-

pois não há violação da regra de conservação de spin (121).

III.1.3. Oxigênio singlete gerado enzimaticamente

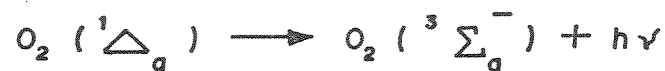
Sabe-se que o oxigênio singlete deve estar envolvido em muitos processos biológicos. Algumas destas informações são altamente especulativas, e algumas completamente improváveis.

Várias enzimas mediam reações oxidativas, as quais se assemelham às ocorridas quimicamente, produzindo oxigênio singlete. Exemplos dessas enzimas são : dioxigenase, que quebra vários derivados catecóis (122); lipoxidase, que produz hidroperóxidos alílicos de ácidos graxos (123); prostaglandina sintetase, que forma endoperóxidos (114), e outras. A analogia entre estas reações e algumas das ocorridas na química do oxigênio singlete, foi descrita repetidas vezes (124, 125).

Ainda há outras enzimas que catalisam a produção de oxigênio singlete ; entre elas, lipoxigenase (126, 127), peroxidase do rabanete (HRP) (127, 128), xantina oxidase (129, 130), enzimas microsossomais (130), lactoperoxidase (131) e outras, embora em algumas destas reações não tenha sido claramente demonstrada a sua presença (114).

III.2. Identificação

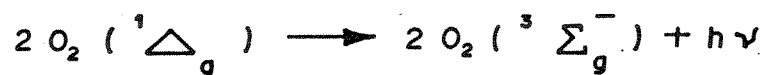
O oxigênio singlete tem uma meia vida relativamente longa para as espécies excitadas (vários μseg), e um meio de detectá-lo é medir a energia liberada, quando este decai para o estado fundamental, o estado triplete (132). Esta energia é liberada como fóton, de acordo com a equação 1.III.1:



Equação 1.III.1: Decaimento de oxigênio excitado para o estado fundamental com emissão de fóton.

Nesta reação, a luz emitida está na região de comprimento de onda de 1269nm, equivalente à diferença entre o primeiro estado excitado e o fundamental do oxigênio.

O oxigênio singlete pode sofrer um aumento energético ("energy pooling") por reação resultante de uma colisão de duas moléculas de oxigênio excitado, dando uma nova emissão "bimol", como mostra a equação 1.III.2:



Eq. III.2 - Decaimento "bimol" de oxigênio singlete para o estado fundamental com emissão de luz.

Neste caso, a emissão ocorre em 634nm e pode ser detecta-

da em reações que geram oxigênio singlete, como por exemplo, H_2O_2 / OCl^- (114).

Outro método de se detectar oxigênio singlete é através do uso de supressores específicos. Estes compostos podem inibir a oxidação iniciada por oxigênio singlete por processos físicos ou químicos. Dentre os primeiros compostos utilizados, estão os pigmentos carotenóides, que suprimem o oxigênio singlete fisicamente, sem alterar o pigmento. Esta habilidade dos carotenóides de suprimir o oxigênio singlete é a base do papel de proteção contra danos celulares iniciados por luz visível (132) e também serve como base para o tratamento de doenças fotossensíveis, usando-se grandes quantidades de β -caroteno (133).

Outros métodos e compostos que têm sido utilizados para diagnóstico de oxigênio singlete, são:

(a) análise de produtos (113):

- 1) difenilfurano \rightarrow dibenzoliletieno
- 2) colesterol \rightarrow 5- α -hidroxicolesterol(6-ona)
- 3) cis- β -caroteno \rightarrow trans- β -caroteno

(b) uso de água deuterada : proporciona um aumento da meia vida de oxigênio singlete de dez vezes, em comparação com a água (114). Isto se reflete no aumento da emissão do oxigênio singlete e aumento da reatividade.

(c) Inibição por supressão específica (113):

- 1) carotenóides
- 2) aminas terciárias
- 3) tocoferol
- 4) azoteto
- 5) histidina
- 6) guanosina

(d) quimiluminescência específica (113):

- 1) emissão monomolecular (1070 a 1269nm)
- 2) emissão bimol (634 a 703nm)

(e) quimiluminescência aumentada com DABCO (1, 4-diazobicyclo(2,2,2)octano (da emissão bimol)(113).

(f) método cinético (134, 135).

III.3. Efeitos in vivo

a) Efeitos de supressores de oxigênio singlete
in vivo

Os pigmentos carotenóides são substâncias que suprimem o oxigênio singlete (136). Estes pigmentos têm demonstrado ser efetivos em membranas lipossômicas (137, 138), e também são protetores contra ação fotodinâmica in vivo (139 - 142).

b) Efeitos de água deuterada in vivo

No sistema totalmente deuterado ($D_2O + CD_3OD$) a vida média de oxigênio singlete aumenta ao menos dez vezes, comparada com a vida média em solventes não deuterados (143). A água livre na célula pode ser substituída por água deuterada, simplesmente transferindo as células para água deuterada concentrada. Deutério não troca todos os hidrogênios, e somente 30% da concentração de água deuterada do meio pode ser incorporada na porção não intercambiável da célula, após uma exposição prolongada (144). Logo, pode-se antecipar que o efeito de água deuterada *in vivo* deve ser normalmente menor que *in vitro*.

IV. Fotoquímica do tRNA:

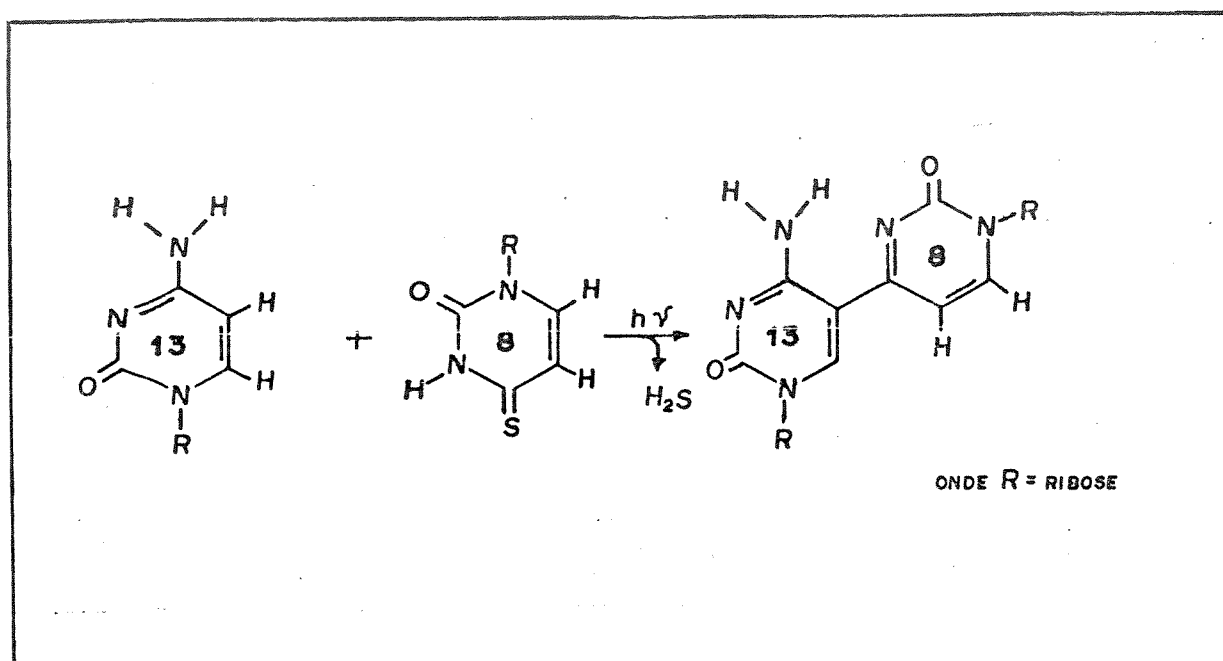
A fotoquímica de ácidos nucleicos foi estudada por vários pesquisadores (145 - 147).

Entre algumas reações fotoquímicas que ocorrem em tRNA, temos a formação do fotoaduto 4-TU-Cyt. Além desse efeito, serão descritos aqui os efeitos fotodinâmicos em tRNA.

IV.1. Formação do fotoaduto 4-TU-Cyt no tRNA

Recentemente foi proposto na literatura que a 4-TU de *E. coli* é o maior cromóforo que leva ao crescimento retardado da bactéria, induzido por luz UV (315-400nm) (145). Sob iluminação

no UV próximo, a 4-TU, encontrada na posição 8 do tRNA, fotorrea-ge com uma citidina na posição 13, resultando numa reticulação covalente 8-13 (esquema IX), em todas as espécies que têm estes resíduos em comum (146 - 151). No esquema IX, que descreve a formação da ligação 8 - 13, a orientação relativa da citidina - 13 e 4-TU -8 foi encontrada no cristal de tRNA de levedura (152 - 154).



Esquema IX : Formação da ligação 8-13.

IV.2. Oxidação de tiocetonas do tipo 4-TU

A estabilidade de várias tiocetonas em relação ao oxigênio na presença ou ausência de luz foi investigada por vários pesquisadores (155-160). Nestes relatos, têm-se encontrado como

produto distribuições de dialquil tiocetonas, diaril tiocetonas e o-alkil tioésteres. Em alguns casos, os produtos são cetona e sulfina (157), sendo que em outros, além dos compostos carbonílicos correspondentes, são encontrados enxofre elementar e dióxido de enxofre (158 - 160).

Recentemente, Ramnath e col. (161), Tamagaki e col. (162) e Ramesh e col. (163, 164) fizeram investigações sistemáticas em oxidações induzidas por luz, de uma série de tiocetonas cuidadosamente escolhidas. A oxidação de diaril, dialquil e aril alkil tiocetonas, por oxigênio singlete, produz as sulfinas e cetonas correspondentes. Um intermediário zwitteriônico, resultante da interação primária de oxigênio singlete com o grupo tio-carbonylico, foi encontrado como sendo o intermediário mais comum para a cetona e a sulfina, onde um 1,2,3-dioxatietano poderia levar exclusivamente à cetona (161).

Poucos relatos em oxidação fotoquímica de tiocetonas de interesse biológico têm sido publicados. A tiouréia é fotooxidada a uréia (165), e uma nova reação foi descrita envolvendo a foto-oxidação branda de 4-TU, na presença de t-butanol a um intermediário, provavelmente N-ribosil-2-oxipirimidina-4-sulfonato ou o sulfonato correspondente (166), o qual prontamente sofre hidrólise à uridina. A oxidação de tiopirimidinas a sulfonatos e sulfonatos correspondentes e a hidrólise desses intermediários à pirimidonas foi descrita anteriormente (167, 168). Os íons sulfito foram detectados confirmando a formação de sulfonatos e sulfonatos.

A eficiência de produção de oxigênio singlete por tiocet-

tonas foi medida pelo branqueamento de 1,3-difenilisobenzofurano em CHCl_3 (164). Isto sugere que tiocetonas tripletes transferem sua energia ao oxigênio triplete com alta eficiência.

Em um trabalho recentemente feito por Durán e col. (169) sobre a transferência de energia em processos biofotoenergizados em tRNA (170-172), foi encontrada uma eficiente transferência do IAL em seu estado triplete, gerado por oxidação catalisada por peroxidase, à 4-TU. Como esses processos são provavelmente importantes ao controle do crescimento de plantas, é interessante estudar as possíveis transformações de 4-TU a uridina no tRNA por processos biofotoenergizados e sua relação com o papel do tRNA.

IV.3. Ação fotodinâmica sobre o tRNA

Kuwano e col. (173) estudaram a modificação fotoquímica de tRNA, e o seu efeito na síntese de aminoacil-tRNA. O tRNA foi iluminado com luz visível, na presença de azul de metileno (vide esquema VIII) ou do carcinógeno 4-nitroquinolina-N-óxido. Este procedimento causa a perda de absorção por parte da guanina, mas não muda para as outras bases. Os mesmos pesquisadores concluíram que a habilidade aminoacceptora do tRNA é destruída com o tempo de iluminação. A velocidade de inativação varia para cada aminoácido. Um significativo decréscimo na atividade acceptora da prolina foi observado. Este resultado sustenta a hipótese de que a sequência do anticódon no tRNA seria a função do "reconhecimento" de uma aminoacil tRNA sintetase, bem como a tradução de um código do RNA mensageiro. Ainda, os mesmos pesquisadores fizeram uma

análise da composição das bases do tRNA. Observaram que, por cromatografia, a guanina, no cromatograma, vai desaparecendo com o tempo de irradiação. As observações espectroscópicas mostraram que o máximo na absorção muda para comprimentos de onda maiores, enquanto que o coeficiente de sedimentação permanece quase o mesmo, durante o curso da reação. Ainda, com o uso de um sensibilizador, Tsugita e col. (174) estudaram a inativação fotossensibilizada de ácidos nucleicos na presença de riboflavina, comprovando o que Kuwano e col. haviam descrito (173).

Tabela 1.IV.1- Efeito do pH na fotoinativação de TMV-RNA tratado com um corante (176).

Corante	Tampão	pH	Lesões (% do controle)
VN	0,01M glicina	3	102
AT	" "	3	105
AL	" "	3	95
VN	0,01M fosfato	6	61
AT	" "	6	98
AL	" "	6	97
VN	0,01M fosfato	7	72
AT	" "	7	58
AL	" "	7	64
VN	0,01M fosfato	8	92
AT	" "	8	52
VN	0,01M glicina	9	85
AT	" "	9	6
AL	" "	9	8
VN	0,01M glicina	11	103
AT	" "	11	101
AL	" "	11	98

VN - vermelho neutro; AT - azul de toluidina e
AL - acridina laranja .

Tsugita e col. (174) concluíram que irradiação por luz visível na ausência de riboflavina, não produz efeito na atividade de TMV-RNA (RNA de vírus de mosaico de tabaco). Sivarama e Gordon (175) utilizaram também TMV-RNA mudando o sensibilizador para acridina laranja, e acompanharam a inativação. Verificaram também que as guaninas são afetadas nesse processo. Orlob (176), utilizando também o TMV-RNA, comparou o efeito do pH na fotoinativação de TMV-RNA, tratado com diferentes corantes. Estes resultados estão na tabela IV.1.

Amagasa e col. (177), estudaram a perda da capacidade de aminoacilação de tRNA através da fotoinativação (fig.1.IV.1). Utilizando acridina laranja como sensibilizador, irradiaram uma solução de tRNA/tampão tris-HCl, e analisaram a perda da atividade da enzima aminoacil tRNA sintetase, a diferentes tempos de irradiação. Concluíram que para uma concentração ótima de íons magnésio, ocorre uma proteção do sistema contra a inativação.

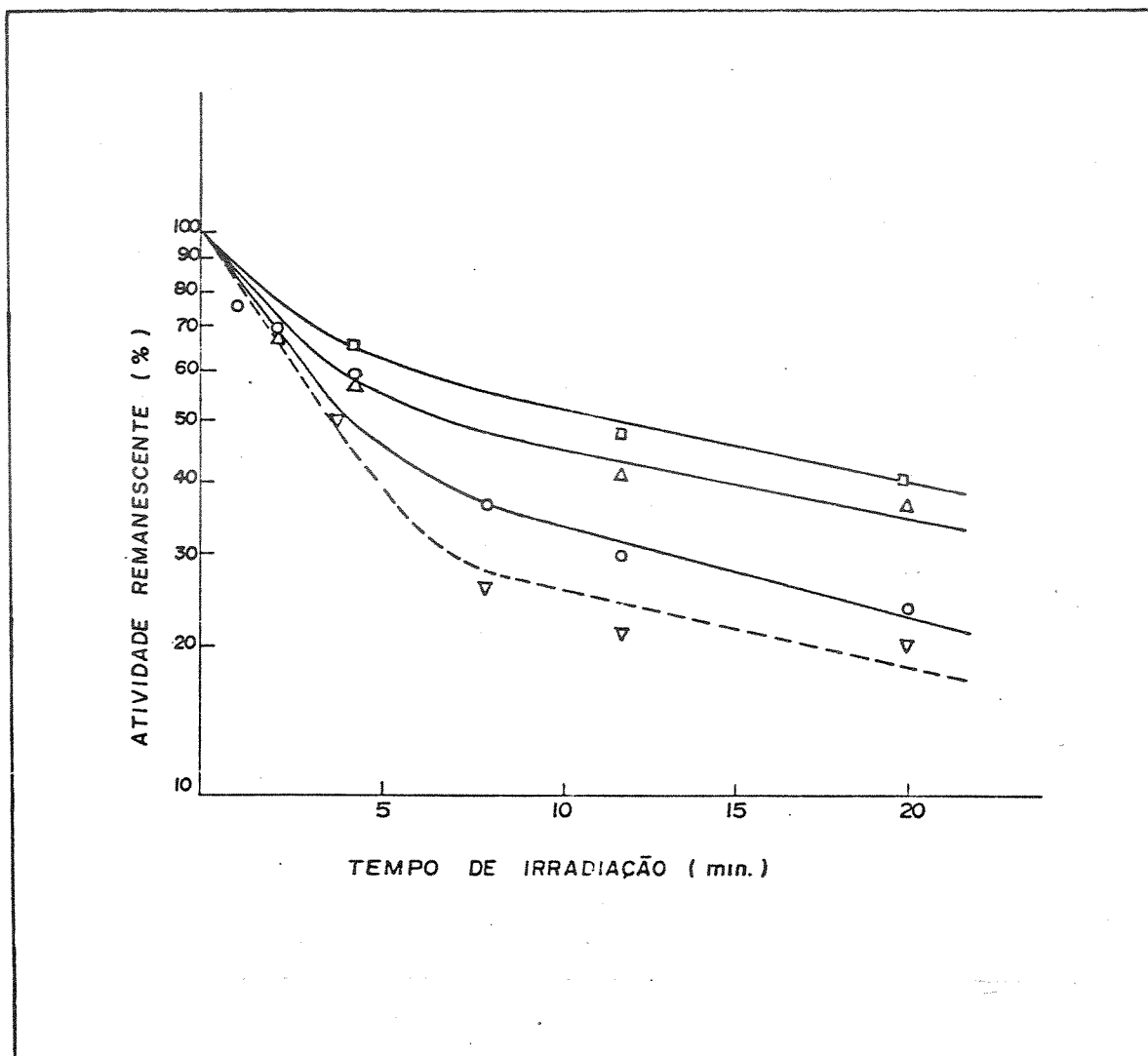


Fig.1.IV.1 : Efeito dos íons metálicos na fotoinativação do tRNA na presença de AL. Mistura de reação : 0,2μM de tRNA; 15,5μM de AL, em 0,05M de tampão tris-HCl, pH=7,6. Legenda : (-○-) sem íons metálicos; (-Δ-) 50μM de Mg⁺² ; (-□-) 0,25mM de Mg⁺² e (-▽-) 0,5mM de Mg⁺². Adaptado (177).

As células de *E. coli* quando tratadas com doses subletais de acridina mais luz U.V., sofrem danos. Os componentes celulares mais danificados são as membranas e o DNA (178).

Sabe-se que as acridinas se ligam seletivamente aos ácidos nucleicos (179). Com base em dados obtidos, T. Ito (178) postulou que a inativação celular através de corantes pode ser classificada de três formas (esquema X):

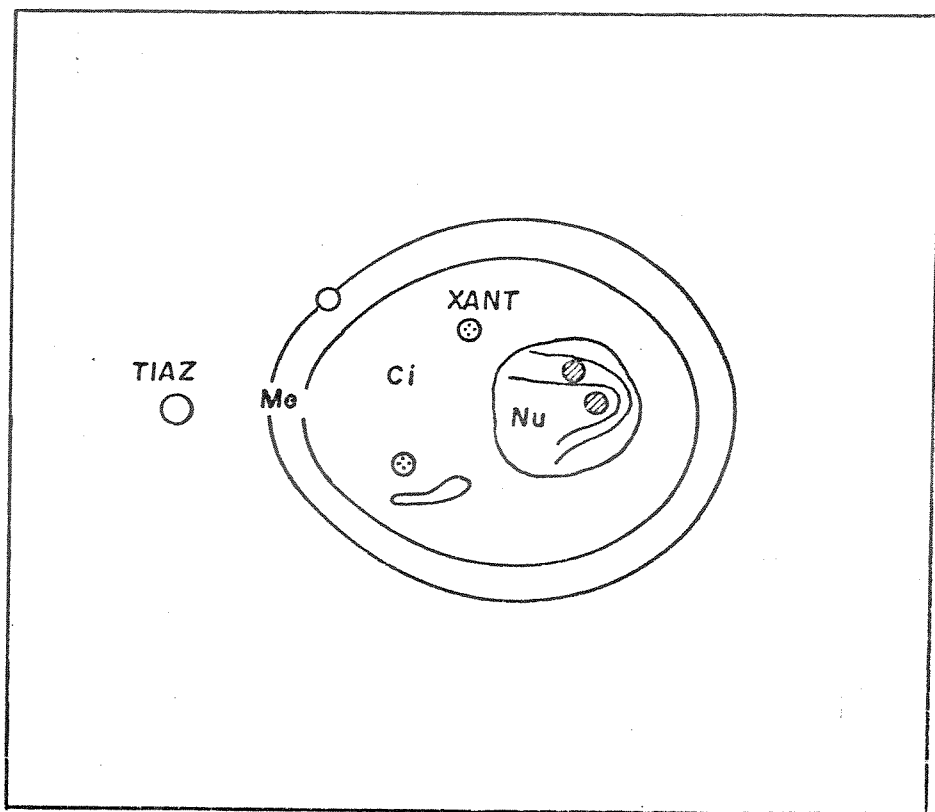
(1) Ataque fora da célula (os corantes permanecem fora da célula).

(2) Ataque dentro da célula (o sensibilizador no citoplasma) e

(3) Ataque dentro da célula (o sensibilizador se liga preferencialmente ao DNA).

Nestes três casos, os sítios de danos são provavelmente a superfície celular, o citoplasma e o DNA, respectivamente (180 a e b).

Os sensibilizadores e os sítios de danos



Esquema X : Representação esquemática da localização de corantes e os presumíveis sítios de danos.

Tiaz: tiazínicos (○); Xant.: xantênicos (⊙)

Acrid: acridínicos (⊗); Me: membrana;

Ci: citoplasma; Nu: núcleo (reproduzido (178)).

Além dos danos provocados por sensibilizadores se ligando a componentes celulares, outros efeitos podem ser observados em bactérias. Peak e col. (181) relataram que as linhagens de *E.coli* deficientes em 4-TU apresentam maior sobrevivência do que o tipo selvagem, que tem 4-TU, quando tratadas com luz UV a 334 nm. As quebras de fitas simples em DNA ocorrem 2 vezes mais efetivamente no tipo selvagem (com 4-TU) do que na deficiente em 4-TU, quando irradiadas (181), fig.1.IV.2. Isto prova que a energia de excitação a 334nm pode ser transferida do tRNA para o DNA, resultando em quebras de fitas simples (fig.1.IV.3).

As radiações da luz solar são mutagênicas (182) e carcinogênicas (183, 184). Os comprimentos de onda da luz solar mais efetivos na produção de mutações e tumores estão entre 290 e 320 nm (UVB) (182, 185, 186). Danos em DNA, expressos pelas mutações genéticas, mostraram estar envolvidos em fotocarcinogênese solar (187). A região espectral UVB tem sido alvo de vários estudos, principalmente na região de UVC (< 280nm) (onde a absorção de fótons pelo DNA resulta em fotoprodutos como dímeros de pirimidina e adutos) e UVA (> 320nm) (onde ocorrem fotossensibilizações do tipo fotodinâmico envolvendo espécies ativas de oxigênio molecular e sensibilizadores) (188 - 190).

Com irradiação por luz monocromática foi observada mutagênese em linhagens de *E.coli*: tipo selvagem, polA, uvrA e uvrApolA (são estirpes deficientes em reparos de danos celulares, portanto sofrem mutações), mas não em recA e lexA (têm processos mais eficientes de reparos de danos celulares, portanto, mutação reduzida em relação às primeiras). Em muitos destes sistemas foi

relatado que a presença do oxigênio é muito importante (191).

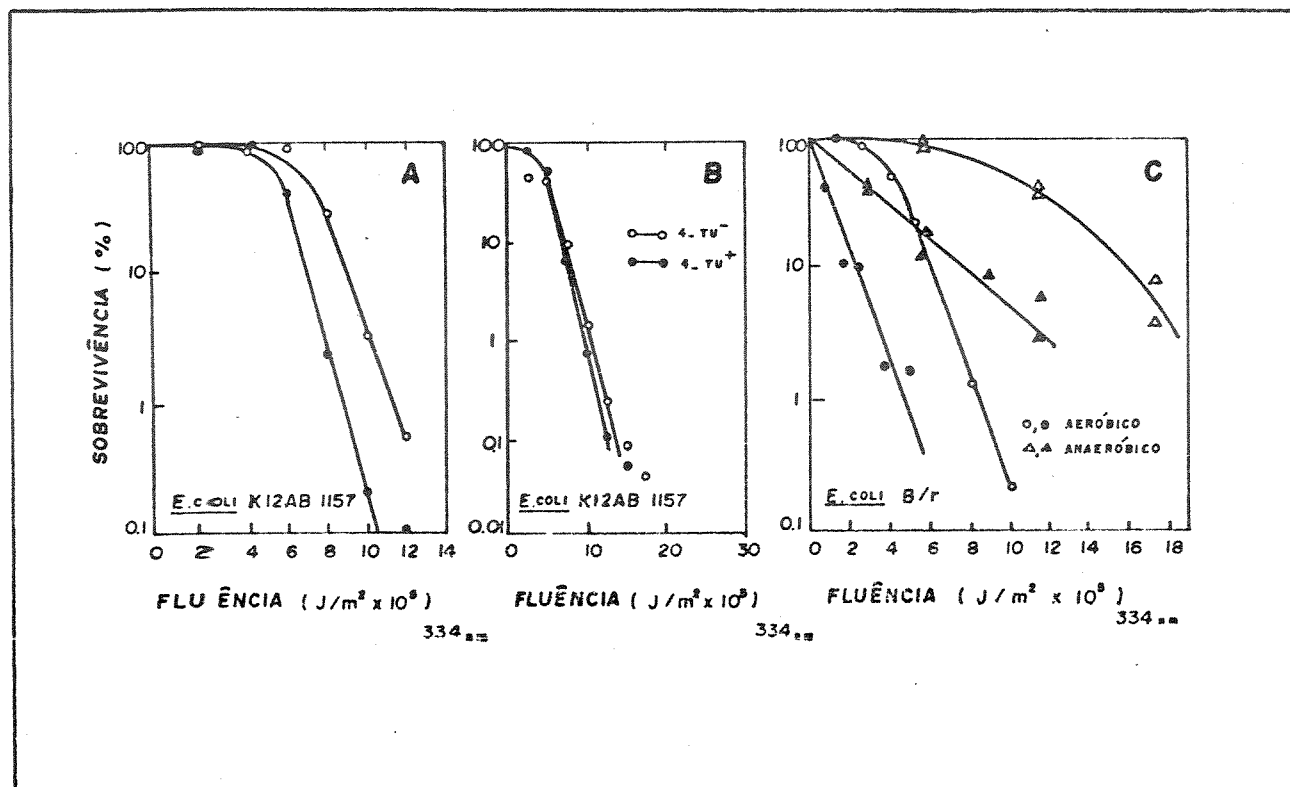


Fig. 1.IV.2 : Curvas de sobrevivência de linhagens de *E.coli* cujo tRNA não tem 4-TU (4-TU⁻), comparadas com o tipo selvagem (4-TU⁺) após a irradiação em 334nm em condições aeróbicas e anaeróbicas. A e B são *E.coli* K12 AB 1157 e C, *E.coli* B/r. Símbolos vazios: 4-TU⁻; símbolos cheios: 4-TU⁺. (o, ●) irradiação aeróbica; (Δ, ▲) irradiação anaeróbica.

Reproduzido (181).

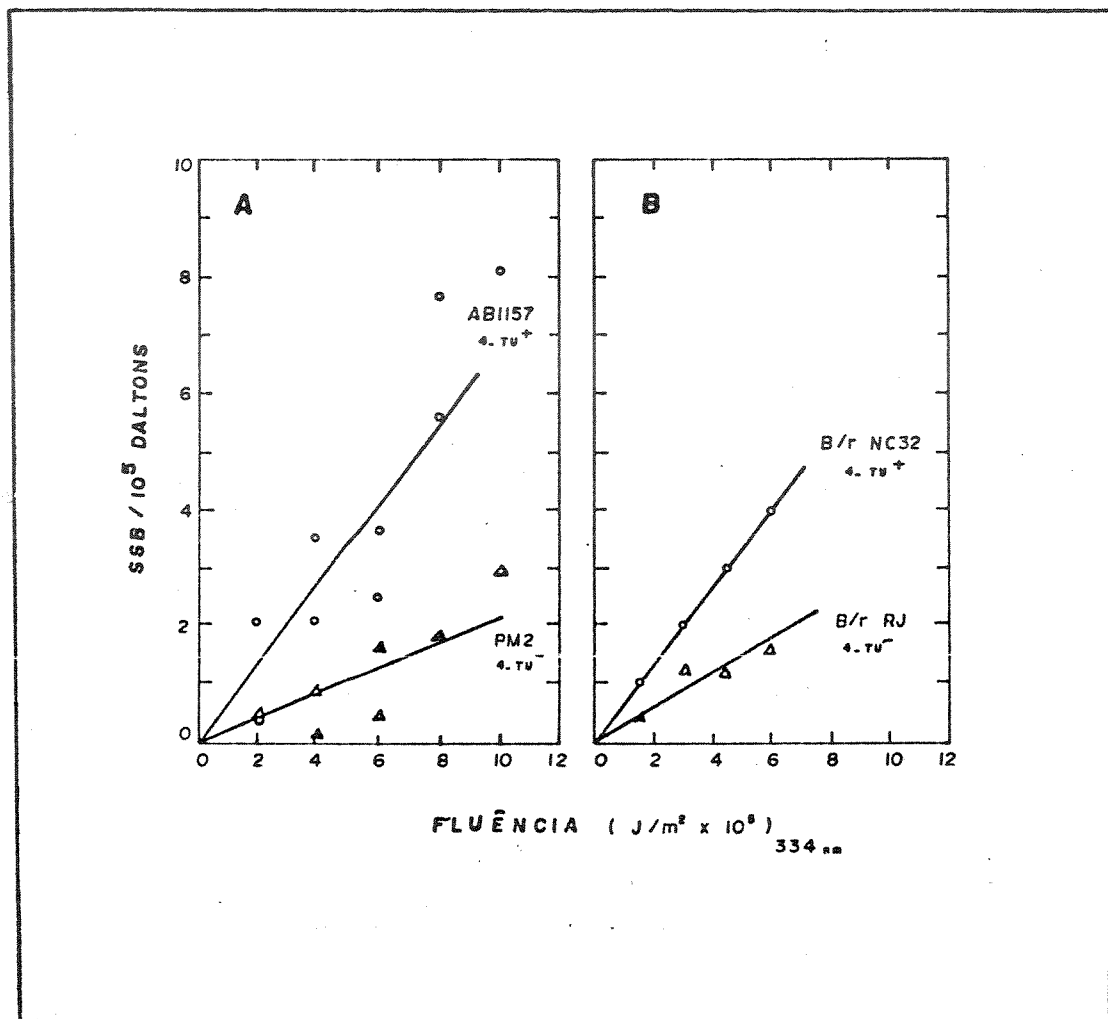


Fig.1.IV.3 : Indução de quebras de fitas simples *in vivo* por irradiação em 334nm em linhagens de *E. coli* com (●, ○) e sem (▲, △) 4-TU. Os símbolos vazios e cheios representam dois experimentos similares. (A) *E. coli* K12 AB1157; (B) *E. coli* B/r. Reproduzido (181).

As mutações espontâneas são processos que ocorrem por mecanismos ainda não identificados. Atualmente, é aceito que mecanismos intracelulares são os causadores de mutação espontânea. Até o presente momento, não se tem dados conclusivos sobre estas mutações (192).

V. Objetivos da tese

Os estudos sobre modelos em fotossensibilização em ácidos nucleicos e sua possível carcinogênese têm sido centralizados em DNA, e bem poucos deles em tRNA. O tRNA apresenta numerosas funções bioquímicas. Portanto, é interessante o estudo das suas fotomodificações biológicas.

É conhecido que, nos processos fotodinâmicos existem espécies ativas de oxigênio, tais como : superóxido ânion (O_2^-), radical hidroxila ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que potencialmente poderiam produzir danos nas bases de tRNA, mudando sua função, fato que não tem sido considerado nos trabalhos de efeitos fotodinâmicos em tRNA (1). Portanto, o objetivo deste trabalho é o de verificar a interação de oxigênio singlete (produzido fotoquimicamente através dos sistemas : irradiação direta no comprimento de absorção da 4-TU, e com sensibilizador externo) com tRNA, na presença e ausência de íons Mg^{+2} , já que este permite algumas conformações mais estáveis do tRNA, e aniquiladores de O_2^- , $\cdot OH$ e H_2O_2 , para avaliar o efeito das espécies ativas de oxigênio sobre o ácido nucleico. Estes estudos estão correlacionados com efeitos de oxigênio singlete gerado enzimaticamente (processos biofotoenergizados) pelos sistemas : MA/HRP/ Mn^{+2} / O_2 (4, 48) e IAA/HRP/ O_2 (169).

Uma outra meta do presente trabalho é verificar a intercalação de AL com tRNA no processo fotossensibilizado ($h\nu/AL$) e comparando estes resultados com uma possível ligação do corante em processos no escuro (sistema : MA/HRP/ Mn^{+2}/O_2).

Devido a que a 4-TU desempenha um papel importante na fotoproteção de bactérias e controla o crescimento destas (74, 77) se torna extremamente importante estudar em forma mais detalhada seu comportamento frente aos tratamentos fotoquímicos e biofotoenergizados. Para isto, será feito um estudo da 4-TU em H_2O e D_2O . Isto permitirá conhecer e avaliar a dupla emissão proveniente de 4-TU no tRNA, que tem sido sugerida como dois tipos de espécies tripletas emitindo (440 e 540nm), e também a reatividade de oxigênio singlete no sistema, já que D_2O aumenta sua vida média (239).

A 4-TU é uma base rara existente no tRNA de *E.coli* e a que emite luminescência mais eficientemente que as outras bases normais (135). Portanto, será dado um destaque especial ao estudo da 4-TU e sua interação principalmente com o oxigênio singlete (gerado fotoquimica e enzimaticamente), acompanhando suas mudanças por técnicas como : luminescência, absorção no U.V., C.D. e cromatografia.

Uma vez comprovado o efeito de oxigênio singlete em tRNA, torna-se importante o seu estudo em sistemas biológicos in vivo. Para isto, será feito um estudo de diferentes cepas de *E. coli* submetidas aos tratamentos com os sistemas biofotoenergizados (MA/HRP/ Mn^{+2}/O_2) e (IAA/HRP/ O_2) e comparados com os fotossensibilizados ($h\nu$ (335nm) e $h\nu/AL$). Será dado um destaque especial ao estudo de diferentes cepas de *E.coli* com e sem a 4-TU.

Capítulo 2

PARTE EXPERIMENTAL

I-Parte experimental

I.1. Aparelhagem

Para:

Espectros visíveis e U.V.

Espectrofotômetro DMR-21 da Zeiss.

Espectros de fluorescência:

Espectrofluorímetro Perkin-Elmer (Modelo MPF-44B).

Leitura de pH de solução tampão:

Potenciômetro Metrohm Herisau (Modelo E-512).

Fotólises:

Reator da Phillips com lâmpada de mercúrio (125W) sem filtro.

Pesagens:

Balança Mettler, modelo ME-22.

Centrifugações de tRNA:

Sorval Superspeed RC-2B, com rotor tipo SS-34 a 10 000g.

Consumo de oxigênio:

Monitor de oxigênio da Yellow Springs Instruments, modelo 53, com termostatização.

Espectros de dicroísmo circular:

Espectropolarímetro Cary-60, equipado com acessório de dicroísmo circular modelo 6002, utilizando-se celas circulares de quartzo.

Contagem de fótons:

Contador de cintilação líquida Beckman, modelo LS-100C, com circuito de coincidência desligado.

Revelação das placas:

Lâmpada Phillips modelo UVSL-25, multiband UV-254/366nm.

1.2. Material

<u>Drogas</u>	<u>Procedência</u>
Acetato de magnésio*	Merck
Acetato de sódio*	Dyme Prod.Quim.
Acetona*	Carlo Erba do Brasil
Ácido acético glacial*	J.T.Baker Lab.
Ácido clorídrico*	Merck
Ácido etilenodiaminotetra- cético (EDTA)*	Carlo Erba do Brasil
Ácido indol-3-acético*	Merck

<u>Drogas</u>	<u>Procedência</u>
Agar-agar*	Difco
Água deuterada 99,75% *	Carlo Erba do Brasil
Acridina laranja(purificada)	Sigma Chemical Company
Alcool isopropílico*	Carlo Erba do Brasil
Azoteto de sódio*	Carlo Erba do Brasil
BHI (Brain Heart Infusion)*	Difco
Boroidreto de sódio*	Fisher Scientific Co.
Cacodilato de sódio*	Fisher Scientific Co.
Catalase de fígado de boi(C40)	Sigma Chemical Co.
Carvão ativo	B.Herzog Com. e Ind. S/A
Cloreto de sódio*	Carlo Erba do Brasil
Clorofórmio*	Carlo Erba do Brasil
DABCO(1,4-diazobicyclo(2,2,2- octano)*	Merck
DNA de timo de bezerro (tipo I)*	Sigma Chemical Co.
Eosina Y*	Sigma Chemical Co.
Etanol*	Qeel - Ind.Quim.
éter etílico*	Carlo Erba do Brasil
Etilenoglicol*	Carlo Erba do Brasil
Extrato de carne*	Difco

<u>Drogas</u>	<u>Procedência</u>
Fenol (purificado por destilação)	Fisher Scientific Co.
Glicerol*	Sigma Chemical Co.
Hidróxido de amônio*	Carlo Erba do Brasil
Hidróxido de sódio*	Merck
Histidina (L)*	Sigma Chemical Co.
Isopropanol*	Merck
Manitol*	Merck
Metanol*	Carlo Erba do Brasil
Nitrito de potássio*	Carlo Erba do Brasil
Pepton*	Difco
Peroxidase do rabanete (tipo VI)*	Sigma Chemical Co.
Sephadex G-50-150 *	Sigma Chemical Co.
Sulfato de cobre pentahidratado*	Carlo Erba do Brasil
Sulfato de manganês hidratado*	BDH Company

DrogasProcedência

Superoxido dismutase (SOD)

(bovina) tipo I

Sigma Chemical Co.

TEP (1,1,3,3-tetraetoxipro-
pano)*

Merck

4-Thiouridina-5'-monofosfato*

Sigma Chemical Co.

Tris(hidroximetil)aminometano*

Merck

tRNA de E.coli (tipo XXI)*

Sigma Chemical Co.

Uridina 5'-monofosfato*

Sigma Chemical Co.

Cromatofolhas de alumínio com silicagel 60 F254 (agente fluorescente), para cromatografia em camada delgada (espessura da camada : 0,2mm), da Merck.

Cromatofolhas de alumínio sem F254, da Merck.

(*) substâncias com grau de pureza máximo.

II. Métodos

II.1. Preparo de soluções

Ácido indol-3-acético:

Dissolveu-se 1,75mg de IAA (PM 175,19g) em 1ml de solução em etanol, guardando-a a 0 °C protegida da luz para evitar

possível fotodecomposição. A solução estoque foi de 10^{-2} M.

Acridina laranja

Previamente, a acridina laranja (PM de 301,5) foi purificada segundo o método de Armstrong e col. (193). Em seguida, dissolveu-se aproximadamente 30mg em 0,05M de tampão tris-HCL, pH de 7,6, e o seu coeficiente de extinção molar em solução diluída (menor que 16 μ M) em 492nm, foi considerado $54\ 000\ M^{-1}\ cm^{-1}$, conforme dados da literatura (194).

Catalase

Dissolveu-se 2,0mg de catalase (PM 200 000; 15 000 unidades/mg de proteína) em 1ml de água bidestilada. A solução final foi de 3000 unidades/ml de solução. Para a desnaturação aqueceu-se uma alíquota (60° C) da solução estoque por 6 horas.

DABCO:

A solução estoque foi preparada pela dissolução de 0,112 g de DABCO (PM 112g) em 1ml de água bidestilada. A concentração estoque foi de 1M.

Eosina Y:

6,1mg de Eosina Y (PM 691,9g) foi dissolvida em 1ml de água destilada. A concentração da solução estoque foi de $8,8 \times 10^{-3}$ M. O valor de ϵ é $125\ 892\ M^{-1}\ cm^{-1}$, no comprimento de onda de absorção de 520nm.

Fenol-clorofórmio:

Cristais de fenol foram levemente aquecidos para se liquefazerem (P.F. 40,5°C). Volumes iguais de fenol e clorofórmio foram misturados, para se obter uma solução 1:1.

Histidina:

21mg de histidina (PM 209,6g) foi dissolvida em 1ml de água bidestilada. A solução estoque preparada foi de 10^{-1} M.

Manitol:

18,2mg de manitol (PM de 182,17g) foram dissolvidos em 1ml de água bidestilada, para dar uma solução estoque de 10^{-1} M.

Peroxidase do rabanete:

Dissolveu-se massa adequada de peroxidase (PM 40 000) em água destilada. A concentração estoque foi de $1,64 \times 10^{-4}$ M, que foi determinada experimentalmente, e o valor de \mathcal{E} é $102\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, no comprimento de onda de absorção de 404nm (195).

Sulfato de cobre-nitrito de potássio:

A solução filtro de sulfato de cobre-nitrito de potássio, para as fotólises, foi preparada segundo o método descrito por Calvert e col.(196).

Superóxido dismutase:

1,034mg de SOD (superóxido dismutase) (PM de 32 500;

30 000 unidades/11mg de proteína) foi dissolvida em 1ml de água bidestilada, para dar uma solução estoque de aproximadamente 3000 unidades/ml de solução. Esta solução foi desnaturada aquecendo-se uma alíquota da solução estoque por um período de 6 horas a 60°C.

Tampões:

A preparação dos tampões seguiu o método descrito por Gomori (198).

4-Thiouridina:

Dissolveu-se 5mg de 4-thiouridina-5'-monofosfato (PM 384,2g) em 5ml de água bidestilada. A concentração preparada foi de 1mg/ml.

tRNA:

A solução foi preparada dissolvendo-se o tRNA em água bidestilada deionizada, e calculada a concentração a partir de dados de absorbância (utilizando-se o cálculo: $1 \text{ DO}^* = 45 \mu\text{g/ml}$, em comprimento de onda máximo de absorção de 260nm) (198).

(*) onde DO = Densidade Óptica

Uridina:

5mg de uridina-5'-monofosfato (PM 307,2g) foi dissolvida em 5ml de água bidestilada. A solução estoque preparada foi de 1mg/ml.

Meios de cultura

Agar simples:

5g de extrato de carne, 5g de cloreto de sódio e 10g de peptona foram dissolvidos em um litro de água. A seguir foi acrescentado agar a 2%. O meio foi esterilizado e distribuído em placas de Petri.

BHI-agar:

36g de BHI e agar a 2% foram dissolvidos em um litro de água destilada. O meio foi esterilizado e colocado em tubos estéreis de 20ml inclinados, para o repique das bactérias.

11.2. Métodos analíticos

a) Extração de tRNA

A extração de tRNA seguiu o seguinte método: adicionou-se à mistura de reação gotas de fenol-clorofórmio para se retirar a HRP. Centrifugou-se e o sobrenadante foi retirado. A ele foi adicionado um volume de NaCl de concentração final 0,1M e dois volumes de etanol. Agitou-se a solução que foi deixada 2 horas no freezer. Em seguida, centrifugou-se a 10 000g por 15 minutos a 4 °C desprezando-se o sobrenadante (199).

b) Observações de possível diminuição do número de bactérias, inespecificamente:

Procedimento:

1) Cultivar E.coli (B/r NC 32 (4-TU+) e E.coli (B/r NC 32 RJ (4-TU-)).

2) Fazer suspensão em solução salina (NaCl) 0,15M estéril para a escala 3 de McFarland (To) (200). A escala de McFarland dá o número aproximado de células por com um padrão estabelecido.

3) Fazer diluições 10^{-1} a 10^{-8} .

3.1. Tomar 1ml do To e diluir em 9ml de salina esté-

ril(T1). Homogeneizar bem. Semear em duas placas de Petri 0,1ml e distribuir com alça de Drigalski.

1 ml + 9 ml de salina

$T_1 \longrightarrow T_2 \longrightarrow T_3 \dots$

4) Pegar 0,2ml da suspensão original (To) e colocar em tubos Khan. Acrescentar igual volume dos reativos (tampão acetato, IAA e HRP).

5) Após cada tempo de reação centrifugar as amostras.

6) Retirar o sobrenadante.

7) Ressuspender o pellet bacteriano em 0,5ml de salina estéril. Homogeneizar.

8) Semear 0,1ml em duas placas.

9) Diluir até 10^{-8} .

10) Incubar a 37°C por 18 horas.

11) Fazer a contagem das células (em contador apropriado)

c) Filtração em gel

As amostras descritas no ítem III.1.2.3 (cap.2), pg.78, sem irradiação, foram passadas através de uma coluna Sephadex G-50-150 (0,7x13cm) e eluídas com o tampão utilizado na reação. Foram coletadas frações de 0,5ml e lidas as absorbâncias a 260 e 492nm, após diluição de três vezes em água destilada. O mesmo procedimento foi feito para as amostras irradiadas (201).

II.3. Métodos sintéticos

a) Síntese do malonaldeído

Foi preparado o sal sódico (peso molecular de 94g), seguindo o método descrito por Grabowski e col. (202), com algumas modificações, conforme descrito abaixo. A massa a ser utilizada foi pesada adequadamente e dissolvida em água. A solução estoque foi de 2,2M (ou 206,8mg/ml). Utilizou-se imediatamente após o preparo.

Método de preparação: 3,3g de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (3,53ml) 1,22ml de HCl 1N e 1,63ml de água foram agitados vigorosamente por 1,25 h à temperatura ambiente. A solução homogênea final (amarela) foi resfriada em gelo e ajustado o pH = 10 com NaOH 5N. A solução vermelha final foi adicionada acetona (aproximadamente 500ml) e os cristais de pouca cor foram separados. O precipitado foi filtrado e seco à temperatura ambiente (15mm de pressão vácuo) por aproximadamente duas horas. O sal foi então dissolvido em metanol a quente (o mínimo necessário), tratado com carvão ativo e filtrado. Ao filtrado foi lentamente adicionado éter (aproximadamente 500ml). O precipitado foi filtrado e seco a 15mm de pressão por 4 horas. A pureza do sal foi demonstrada por seu espectro U.V. (em MeOH : 266nm; $\epsilon = 22\ 700\ M^{-1}cm^{-1}$).

b) Formação do fotoaduto 4-Thiouridina-citidina
(4-TU-Cyt)[8-13] no tRNA tratado com o sistema
IAA/HRP/O₂ :

Condições:

A redução do fotoaduto de tRNA a um produto altamente luminescente, foi feita segundo o método modificado de Favre e Yaniv (203) e Favre e Thomas (204), da seguinte maneira : para um volume final de 100µl, foi adicionado 6,5µg/ml de tRNA, 0,4mM de IAA, 30mM de EDTA e 2µM de HRP na ausência e presença de 6mM de íons magnésio, em 0,05M de tampão acetato, pH de 3,8, e incubada a mistura à temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, o tRNA tratado com o sistema IAA/HRP/O₂ e o tRNA irradiado a 335nm, foram ressuspensos em 500µl de tampão cacodilato (0,05M, pH=7,0) com 0,1M de NaCl e 5mM de MgCl₂ (solução I). A absorvância em 335nm foi medida e uma alíquota de 10µl foi diluída a 500µl no mesmo tampão cacodilato, e medida a absorvância a 260nm (solução II). A solução I foi dividida em duas frações (Ia e Ib). A fração Ia foi irradiada a 335nm durante 6 horas (densidade de potência de 8 J/m².s) para a produção fotoquímica do fotoaduto 4-TU-Cyt. As frações Ia e Ib foram ajustadas a pH=9,7 com NaOH diluído e tratadas com NaBH₄ por duas horas à temperatura ambiente e no escuro. A intensidade e luminescência foi medida a 440nm (λ exc.410nm) para Ia e Ib (Fa e Fb, respectivamente). Esta luminescência corresponde à forma reduzida do aduto 4-TU-Cyt.

III. Concentrações dos sistemas

III.1. Sistemas fotoquímicos

III.1.1. Irradiação direta

III.1.1.1. Após o tratamento com luz

(irradiação direta)

A mistura de reação consistiu de 1mg/ml de tRNA (40uM), em 0,05M de tampão cacodilato de sódio, pH=7,0, com 0,1M de NaCl e 5mM de $MgCl_2$, num volume final de 2,5ml. As irradiações foram feitas em 335nm (lâmpada de xenônio com dose de potência de $8 J/m^2.s$). Para cada intervalo de tempo de irradiação foram obtidos espectros de absorção no U.V. e de luminescência.

III.1.1.2. Irradiação direta de tRNA na presença de íons Mg^{+2}

O mesmo sistema descrito no ítem anterior foi utilizado na presença de 1,4mM de íons Mg^{+2} . Estes experimentos foram feitos em diferentes meios, como H_2O , D_2O , e em tampão acetato, obtendo-se os espectros de luminescência e C.D.

III.1.1.3. Irradiação direta de tRNA na presença de aniquiladores

As concentrações utilizadas dos aniquiladores foram as seguintes : 10mM de histidina, 10mM de manitol, 100 unidades de catalase e 100 unidades de SOD. A mistura de reação foi a mesma descrita no ítem III.1.1.1, sendo que para cada experimento foi utilizado um aniquilador. Cada reação foi feita em duplicata. O volume final utilizado foi de 2,5 ml.

III.1.2. Irradiação na presença de um sensibilizador

III.1.2.1. Irradiação na presença de acridina laranja

A mistura de reação consistiu de 2 μ M de tRNA, 15,5 μ M de AL, em 0,05M de tampão tris-HCl, pH=7,6, num volume final de 2,5 ml. As amostras foram irradiadas em diferentes intensidades (dose de potência de 8 J/m² .s). As concentrações de Hg⁺² utilizadas foram: 25 μ M, 0,25mM e 0,5mM.

III.1.2.2. Irradiação com acridina laranja, na presença de aniquiladores

As concentrações dos aniquiladores utilizadas foram :

10mM de histidina, 10mM de manitol, 150 unidades de catalase e 150 unidades de SOD. A mistura de reação foi : 40 μ M de tRNA, 15,5 μ M de AL e 0,05M de tampão tris-HCl, pH=7,6 num volume final de 2,5ml, com uma intensidade de 360 J/m².s (mesma dose de potência descrita anteriormente).

III.1.2.3. Estudo da ligação de acridina laranja ao tRNA

Soluções de 200 μ g/ml (8 μ M) de tRNA e 50 μ M de AL foram eluídos em uma coluna Sephadex G-50 (0,7x13cm) em 0,05M de tampão tris-HCl, pH=7,6. Foram eluídas amostras irradiadas e não irradiadas. O mesmo experimento foi feito utilizando-se 0,17mM de eosina Y, em vez de 50 μ M de AL.

III.1.2.4. Irradiação com acridina laranja. na presença de 4-tiouridina

As concentrações utilizadas foram : 15,5 μ M de AL e 0,26 mM de 4-TU (100 μ g/ml), em 0,05M de tampão tris-HCl, pH=7,6, num volume final de 300 μ l. As amostras foram irradiadas e aplicadas nas placas de cromatografia.^(*) Para a cromatografia preparativa foram utilizadas as mesmas concentrações descritas acima, num volume final de 150 μ l.

III.2. Sistemas biofotoenergizados

III.2.1. Sistema : NA/HRP/Mn /O₂

III.2.1.1. Com tRNA

A mistura a ser incubada consistiu de 0,2M de tampão acetato, pH=4,8; 3,1mM de manganês; 10,5mM de malonaldeído, 24µM de tRNA e 2,3µM de HRP, num volume final de 2,5ml. O tempo de incubação para a reação se processar completamente foi de 20 minutos. Foram obtidos espectros de absorção, C.D. e luminescência das amostras, à temperatura ambiente.

III.2.1.2. Com tRNA e íons Mg⁺²

As concentrações utilizadas neste experimento foram as mesmas descritas acima e 25mM de acetato de magnésio, num volume final de 2,5ml, com um tempo de incubação de 20 minutos, e posteriormente foram obtidos os espectros necessários.

III.2.1.3. Com tRNA e AL

As concentrações utilizadas são as mesmas descritas no ítem III.2.1.1 e 15,5µM de AL. Foram obtidos espectros C.D. das amostras.

III.2.1.4. Supressão da espécie excitada por tRNA

Foram utilizadas as seguintes concentrações : 0,2M de tampão acetato, pH=4,8; 3,1mM de Mn^{+2} ; 7,3mM de malonaldeído; 1,42 μ M de HRP e 5; 7,5; 10; 15 e 20 μ M de tRNA para o cálculo do K_s , (vide apêndice em anexo).

III.2.1.5. Sistema com 4-TU

As concentrações utilizadas foram : 0,2M de tampão acetato, pH=4,8; 3,1mM de Mn^{+2} ; 10,5mM de malonaldeído; 0,48mM de 4-TU e 2,3 μ M de HRP, num volume final de reação de 2,0ml. Foram obtidos espectros de absorção das amostras. Estas mesmas concentrações descritas acima foram utilizadas num volume final de 50 μ l e a mistura foi aplicada em placas de cromatografia.⁽⁴⁾ Para a cromatografia preparativa foram utilizadas as mesmas concentrações descritas anteriormente, num volume final de 150 μ l.

III.2.1.6. Efeito de histidina sobre o sistema

As concentrações utilizadas para se verificar o efeito de supressão por histidina, foram : 0,2M de tampão acetato, pH=4,8; 3,1mM de manganês; 7,3mM de malonaldeído; 1,42 μ M de HRP e 0,5; 0,75; 1,5; 4; 6 e 8mM de histidina, para o cálculo de K_{sv} (vide apêndice em anexo).

III.2.2. Sistema : IAA/HRP/O₂

III.2.2.1. Com tRNA

A mistura a ser incubada consistiu de 50mM de tampão acetato, pH=3,8, com 30 µM de EDTA, 0,2mM de IAA, 40µM de tRNA e 1µM de HRP, num volume final de 2,5ml. Foram registrados espectros de emissão de luminescência e C.D. de tRNA submetido ao tratamento com esse sistema enzimático, na ausência e presença de água deuterada.

III.2.2.2. Com 4-TU

Foram utilizadas as mesmas concentrações de IAA, HRP e tampão descritas no ítem anterior e 0,48mM de 4-TU, num volume final de 50µl. A mistura foi aplicada em placas de cromatografia. Para a cromatografia preparativa foram utilizadas as mesmas concentrações, num volume final de 150µl. As concentrações de DABCO e histidina foram 20mM e 1mM, respectivamente.

III.2.2.3. Formação do fotoaduto 4-TU-Cyt [8-13] no tRNA submetido ao tratamento com o sistema

O método descrito para a formação do fotoaduto está por-menorizado no ítem II.3 b, capítulo 2, pg 75.

III.2.2.4. Efeito do sistema na mortalidade das diferentes linhagens de E.coli

O método utilizado está descrito no ítem 11.2 b, capítulo 2, pg 72. As concentrações utilizadas foram : 50mM de tampão acetato, pH=5,2, com 30 μ M de EDTA e 0,1M de NaCl, 0,1mM de IAA , 1 μ M de HRP e 0,2ml de bactéria, num volume final de 1ml. Utilizou-se 1ml de 0,1M de tampão fosfato salino (PBS), para parar a reação. Os tempos de incubação foram : 15, 20 e 30 minutos.

(*) Todas as cromatografias foram ascendentes, utilizando-se como eluente a mistura : Isopropanol:NH₃ : H₂O (13:1:1).

Depois de corrido o solvente até o topo das placas, as mesmas eram secas e reveladas as manchas com lâmpada Phillips. Nas placas de cromatografia preparativa as manchas reveladas foram raspadas e misturadas com água. Em seguida foram agitadas e centrifugadas. Dos sobrenadantes foram obtidos os espectros de absorção.

(**) em todo o texto, onde está escrito fluência (principalmente nas figuras), o termo correto é intensidade de luz, e velocidade de fluência, o termo é densidade de potência.

A densidade de potência dá o valor de energia por unidade de área, por tempo (J/m² .s), e a intensidade de luz (fluência), o valor da energia por unidade de área, já multiplicado pelo tempo (J/m²).

Capítulo 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo dos sistemas fotoquímicos

I. Irradiação direta

I.1. Irradiação direta de tRNA

Das amostras cujas concentrações e condições experimentais estão descritas no ítem III.1.1.1 (cap.2), pg.76, foram obtidos espectros de absorção no U.V. (fig.3.1.1) e de luminescência (fig.3.1.2), para cada intervalo de tempo de irradiação. Foi feito também um estudo comparando-se os efeitos de irradiação de tRNA na ausência e presença de íons Mg^{+2} . Estes resultados, utilizando-se técnicas de luminescência e C.D., estão descritos a seguir.

I.1.1. Irradiação direta de tRNA na presença de íons Mg^{+2}

Os estudos do ítem anterior foram feitos na presença de íons Mg^{+2} cujas condições estão descritas no ítem III.1.1.2 (cap.2), pg. 76. Os resultados obtidos de luminescência e C.D., na ausência e presença de Mg^{+2} estão descritos a seguir. Estes experimentos foram feitos em diferentes meios, como H_2O (figs. 3.1.3 e 3.1.4), D_2O (figs.3.1.5 e 3.1.6), e em tampão acetato (figs. 3.1.7 e 3.1.8).

1.1.2. Irradiação direta de tRNA na presença
de aniquiladores

Os resultados dos estudos da irradiação de tRNA na presença de aniquiladores estão compilados na tabela 3.1.1. Os valores de concentração utilizados neste caso estão descritos no ítem III.1.1.3 (cap.2), pg.77.

A figura 3.1.1 mostra os espectros de absorção de tRNA em tampão cacodilato, em diferentes tempos de irradiação a 335nm. Os espectros de absorção de tRNA submetido a diferentes tempos de irradiação, análogos aos da figura 3.1.1, foram registrados na região de 260nm (absorção das bases normais), não sendo observada praticamente nenhuma alteração espectral. Isto significa que as bases normais provavelmente não sofrem modificações significativas, porém, na região de 335nm nota-se uma diminuição nos valores de absorbância com o aumento da intensidade (tempo de irradiação), indicando uma degradação da 4-TU ($\lambda_{\text{máx}}^{\text{abs.}}=335\text{nm}$), conforme mostra a figura 3.1.1. Este resultado concorda com o obtido por Favre e col. (74), que mostraram que a irradiação em 334nm de uma solução de tRNA^{VAL} (específico para o amino-ácido valina) em tampões neutros, induz a fotodegradação do resíduo de 4-TU. Yaniv e col. (64) relataram, através de uma análise detalhada do tRNA, que a 4-TU na posição 8 na sequência nucleotídica se liga covalentemente a um resíduo de citosina na posição 13, como foi discutido anteriormente, no capítulo 1. A formação deste fotoproduto 4-TU-Cyt pode ser acompanhada por subsequente redução com borohidreto de sódio, resultando num composto com novas características fluorescentes (146). Ainda analisando-se a figura 3.1.1, observa-se que devido a formação deste fotoproduto, a conformação do tRNA é alterada, fato este comprovado pelo espectro C.D., na figura 3.1.4, de uma solução de tRNA nativo e irradiado por 7 horas.

Em estudos sobre tRNAs deficientes em 4-TU, Thomas e col. (145) mostraram que esta base é o principal cromóforo que leva ao

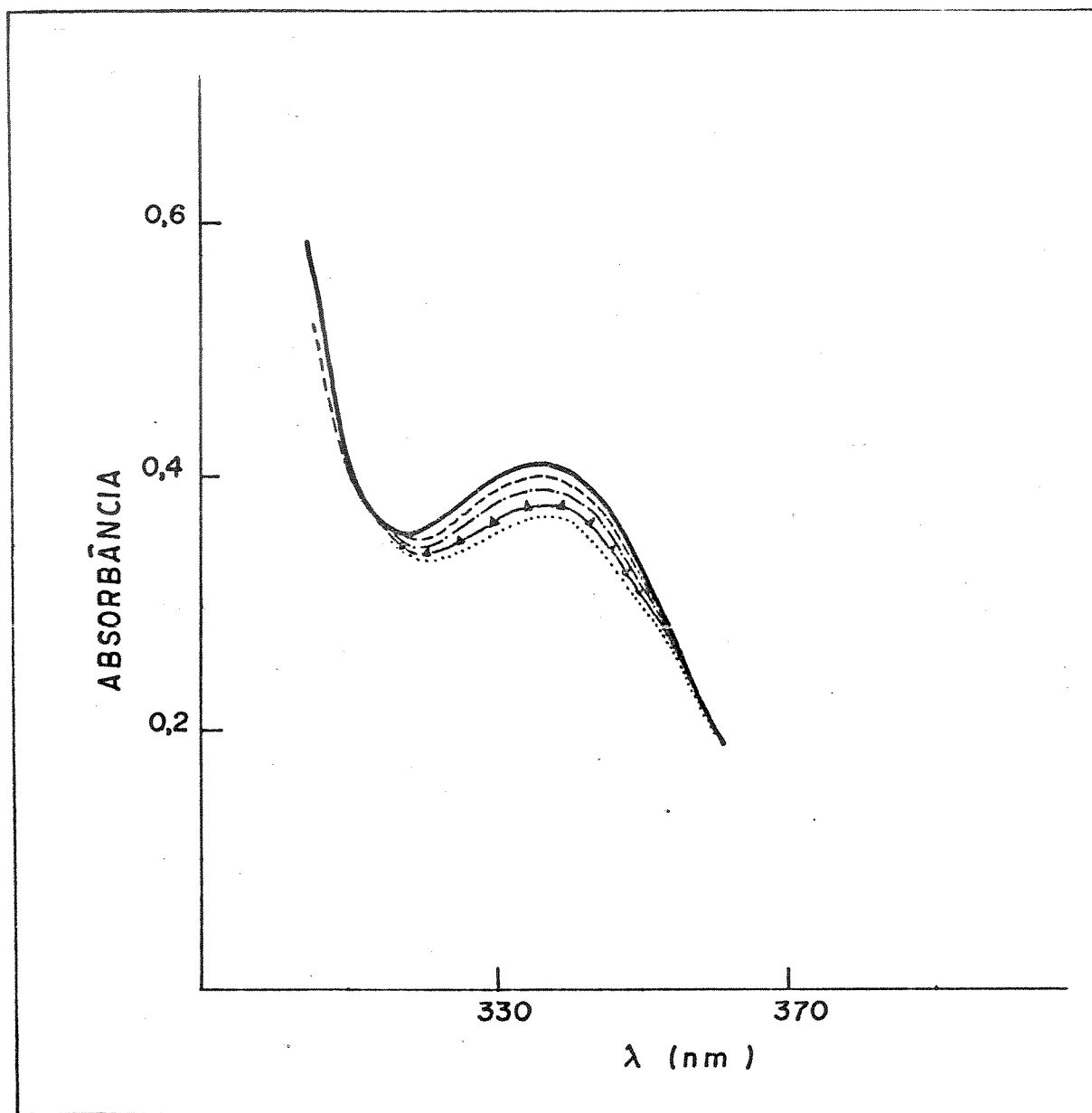


Fig.3.1.1.: Espectros de absorção de $30\mu\text{M}$ de tRNA, em $0,05\text{M}$ de tampão cacodilato, $\text{pH}=7,0$, com $0,1\text{M}$ de NaCl e 5mM de MgCl_2 . Legenda: tempo de irradiação zero (—); $t_i = 1\text{h}$ (---); $t_i = 2\text{h}$ (-·-·-); $t_i = 4\text{h}$ (-▲-) e $t_i = 6\text{h}$ (.....).

crescimento retardado da bactéria (por exemplo, E.coli, cujo tRNA tem a base 4-TU). Também, o grande aumento de resistência à irradiação a 254nm conferido por iluminação no U.V.próximo, isto é, fotoproteção, tem sido alvo de estudo de vários pesquisadores (146, 203). Alguns deles chegaram à conclusão que a 4-TU é o maior cromóforo que leva ao crescimento retardado e à fotoproteção.

A 4-TU é a base que apresenta maior eficiência de luminescência (145). Pode-se então observar mudanças em tRNA através da luminescência da 4-TU. A figura 3.1.2 mostra os espectros de luminescência de tRNA em tampão cacodilato, submetido à diferentes doses de irradiação a 335nm. Pode-se observar que com o aumento da fluência (maior tempo de irradiação) a banda de emissão a 510nm vai desaparecendo, aumentando gradativamente a emissão a 440nm, devido à formação do fotoproduto (4-TU-Cyt). Estes fatos comprovam os discutidos anteriormente (fig.3.1.1).

As figuras 3.1.3 e 3.1.4 mostram os espectros de luminescência e C.D. respectivamente, de tRNA irradiado em água, na ausência e presença de íons Mg^{+2} . Nestas figuras observa-se que o espectro de tRNA nativo na presença e ausência de Mg^{+2} não muda significativamente na região de 4-TU e sim na região de 300nm. Após a irradiação, observou-se perda da 4-TU em ambos os experimentos. Para se verificar o efeito de oxigênio singlete sobre as bases de tRNA, este mesmo estudo foi feito em água deuterada (figs.3.1.5 e 3.1.6) e em tampão acetato (figs.3.1.7 e 3.1.8), pois a mudança de pH pode mudar a conformação do tRNA, além dos efeitos observados com irradiação. Observando-se os gráficos das

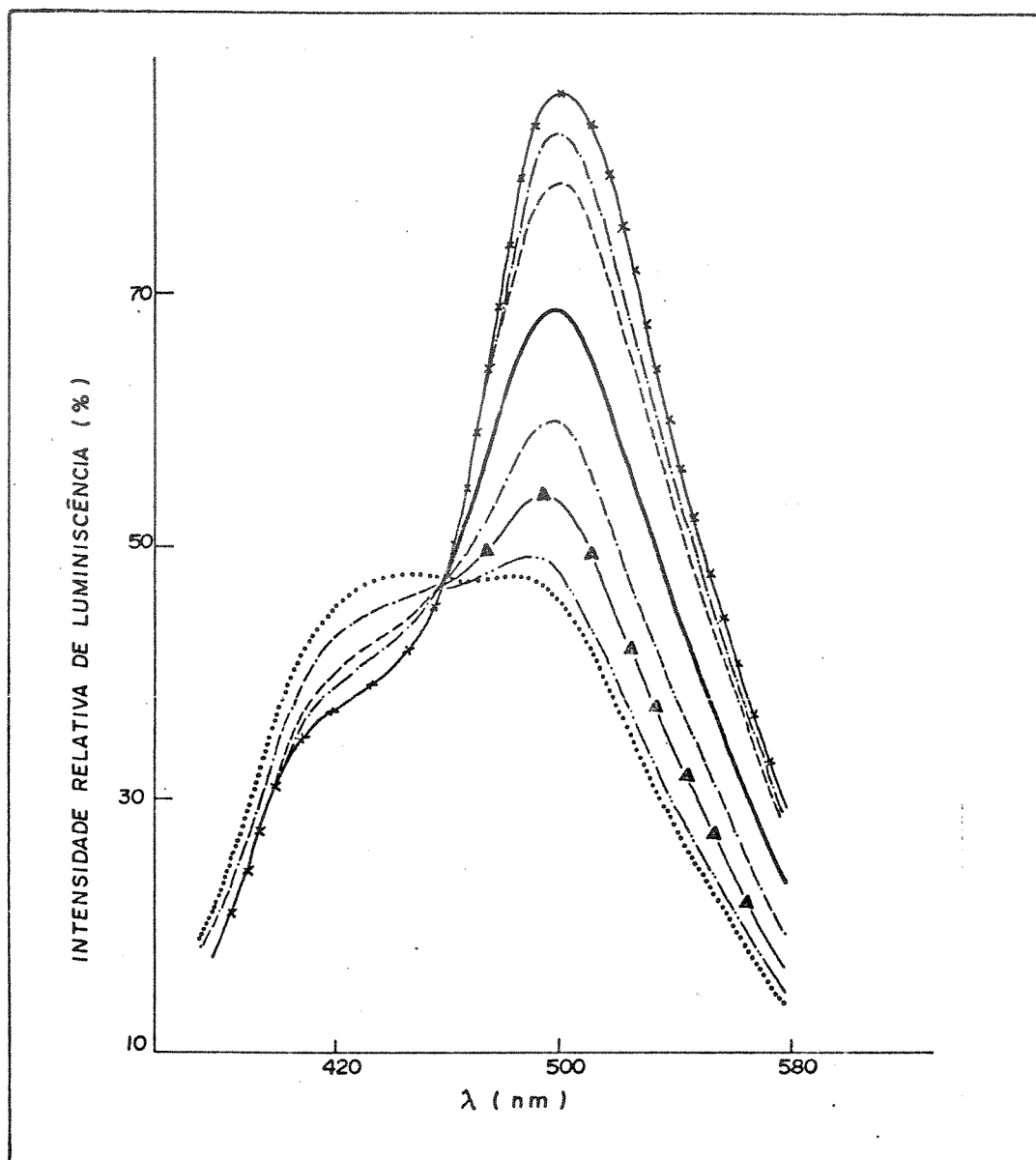


Fig.3.1.2. : Espectros de luminescência de 40 μ M de tRNA em 50mM de tampão cacodilato, pH=7,0 : controle (-x-); tempos de irradiação: 45min. (-o-); 1h(--); 2h(—); 3h(--o--); 4h (-▲-) 5h(··-··) e 6h (...). λ exc. =335nm.

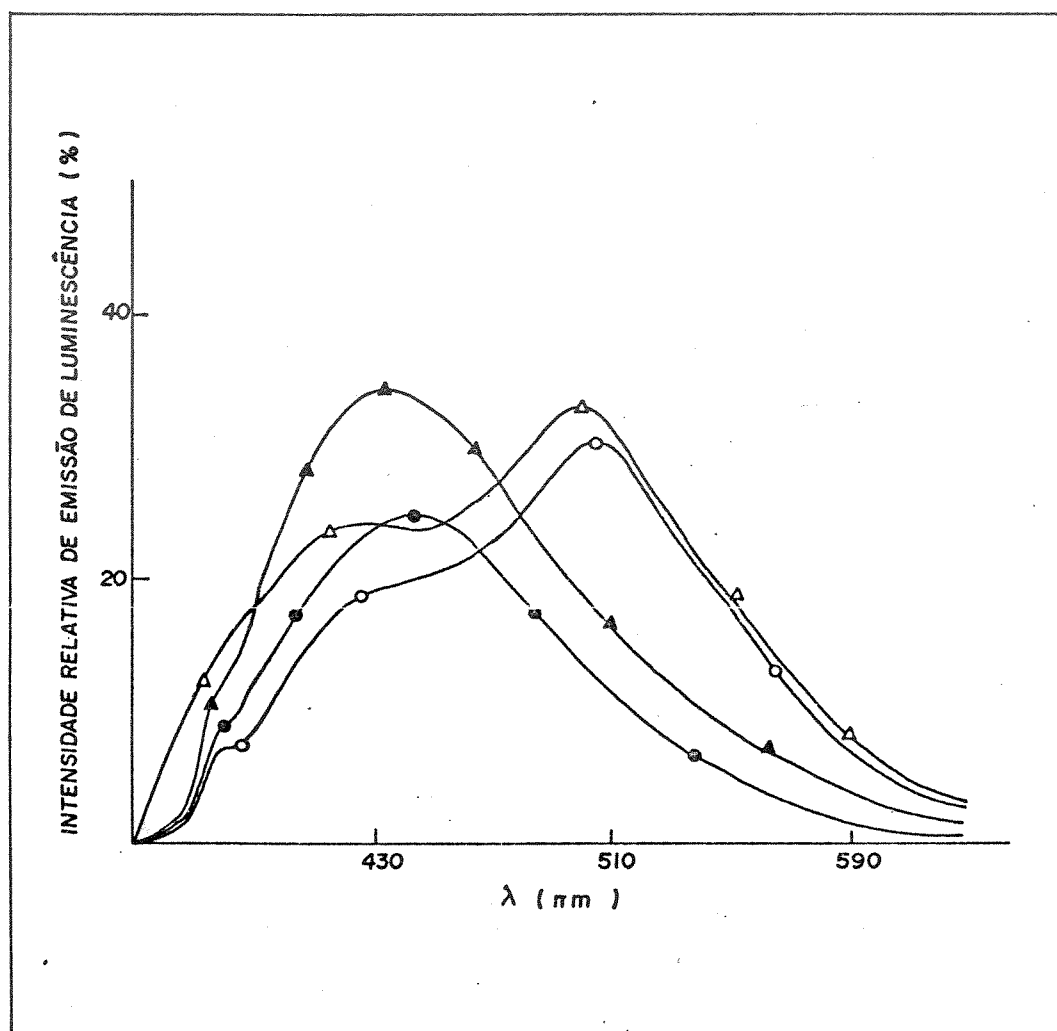


Fig.3.1.3 : Espectros de luminescência de $40\mu\text{M}$ de tRNA em água (λ irr. = 335nm e λ exc. = 335nm). Sem íons Mg^{2+} : (-O-) 0h de irradiação; (-●-) 7h de irradiação. Com $1,4\text{mM}$ de Mg^{2+} : 0h de irradiação (-△-); 7h de irradiação (-▲-), a temp. ambiente

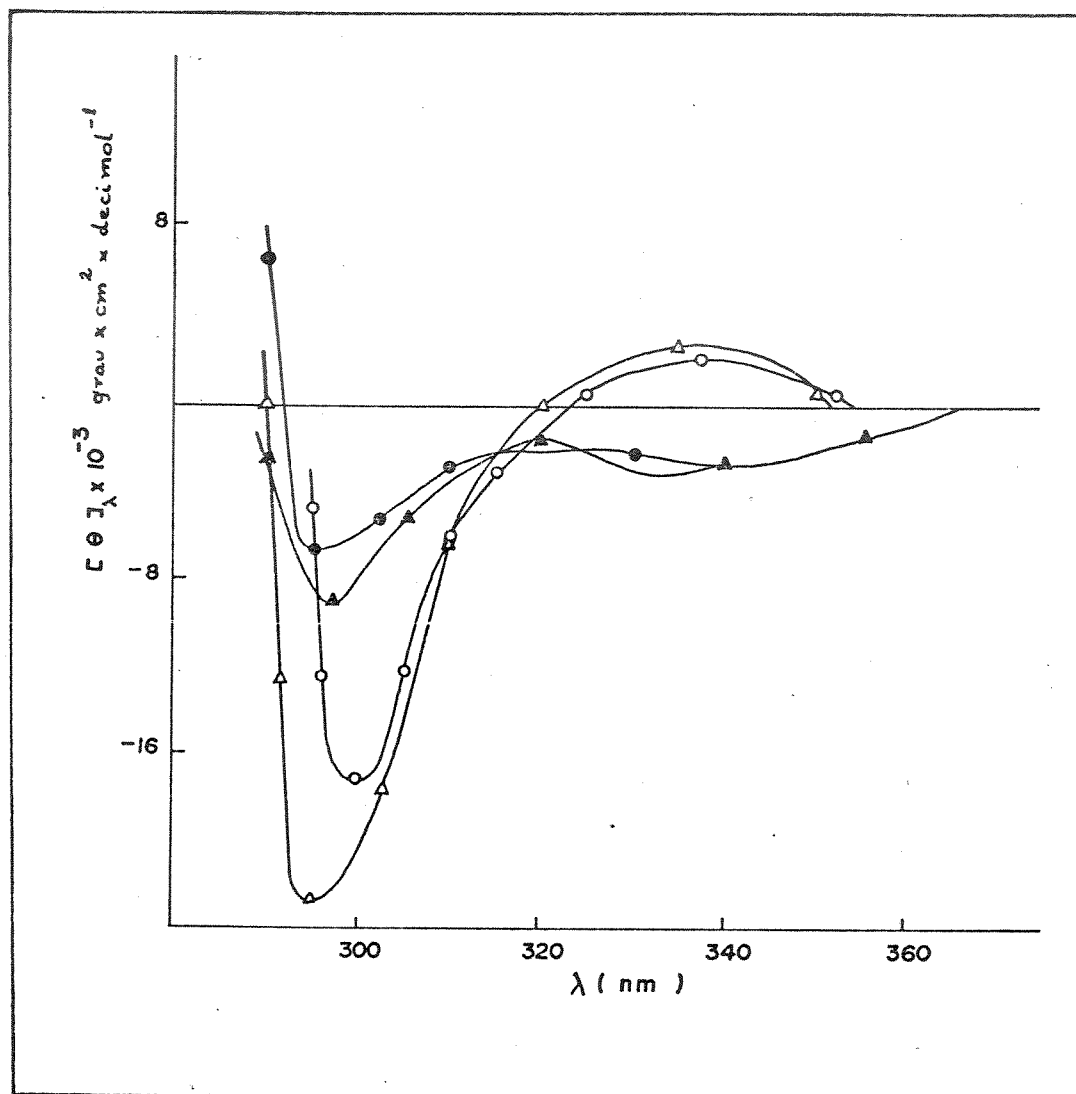


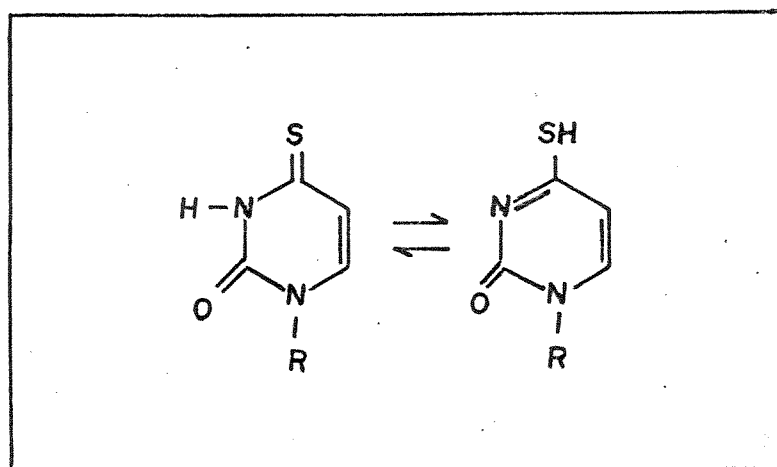
Fig.3.1.4 : Espectros C.D. de 40 μ M de tRNA em água.

(-o-) tRNA nativo; (-●-) tRNA/UV .Com
1,4mM de Mg⁺²; (-Δ-) tRNA/Mg⁺²; (-▲-)
tRNA/UV/Mg⁺².A irradiação foi feita a
335nm por 7 horas, a temp.ambiente.

figuras 3.1.3, 3.1.5 e 3.1.7, ao se irradiar o tRNA a 335nm, há a formação do fotoproduto que, conforme já visto, emite em 440nm. Isto foi discutido anteriormente ao se observar a figura 3.1.2. Quando o tRNA em meio deuterado é irradiado, observa-se, pela figura 3.1.5, que a intensidade de luminescência do fotoproduto é maior que em H₂O (fig.3.1.3) e tampão acetato (fig.3.1.7). Na ausência de íons Mg⁺², observa-se então (figs.3.1.3 e 3.1.5) que a relação Intensidade de emissão em D₂O = 1,2 vezes

Intensidade de emissão em H₂O

maior que em H₂O. Isto pode ser explicado observando-se a figura 3.1.9, onde é mostrado o espectro de luminescência de 4-TU à baixas temperaturas, em condições em que são observadas duas bandas de emissão. As explicações na literatura são conflitantes, o que levou a se analisar estes aspectos mais pormenorizadamente. Por sugestão do Dr.Pill-Soon Song (Texas Technol.Univ., USA) foi considerada a possibilidade de um equilíbrio tautomérico entre estas duas formas (esquema XI).



Esquema XI : Equilíbrio tautomérico de 4-TU em solução aquosa.

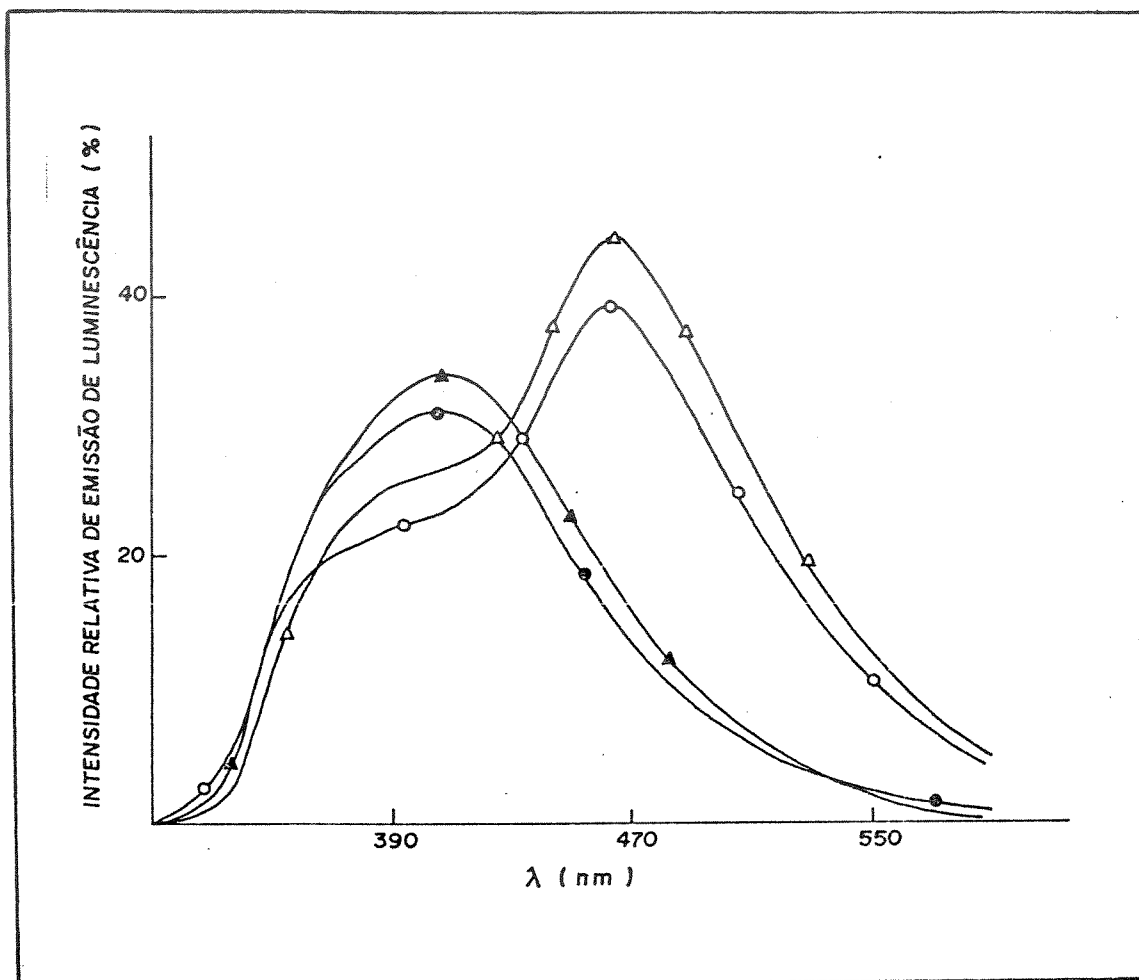


Fig.3.1.5 : Espectros de luminescência de $40\mu\text{M}$ de tRNA em D_2O ($\lambda_{\text{exc.}}=335\text{nm}$, $\lambda_{\text{irr.}}=335\text{nm}$). Sem íons Mg^{+2} : (-o-) 0h de irradiação; (-●-) 7h de irradiação. Com $1,4\text{mM}$ de Mg^{+2} : (-Δ-) 0h e (-▲-) 7h de irradiação.

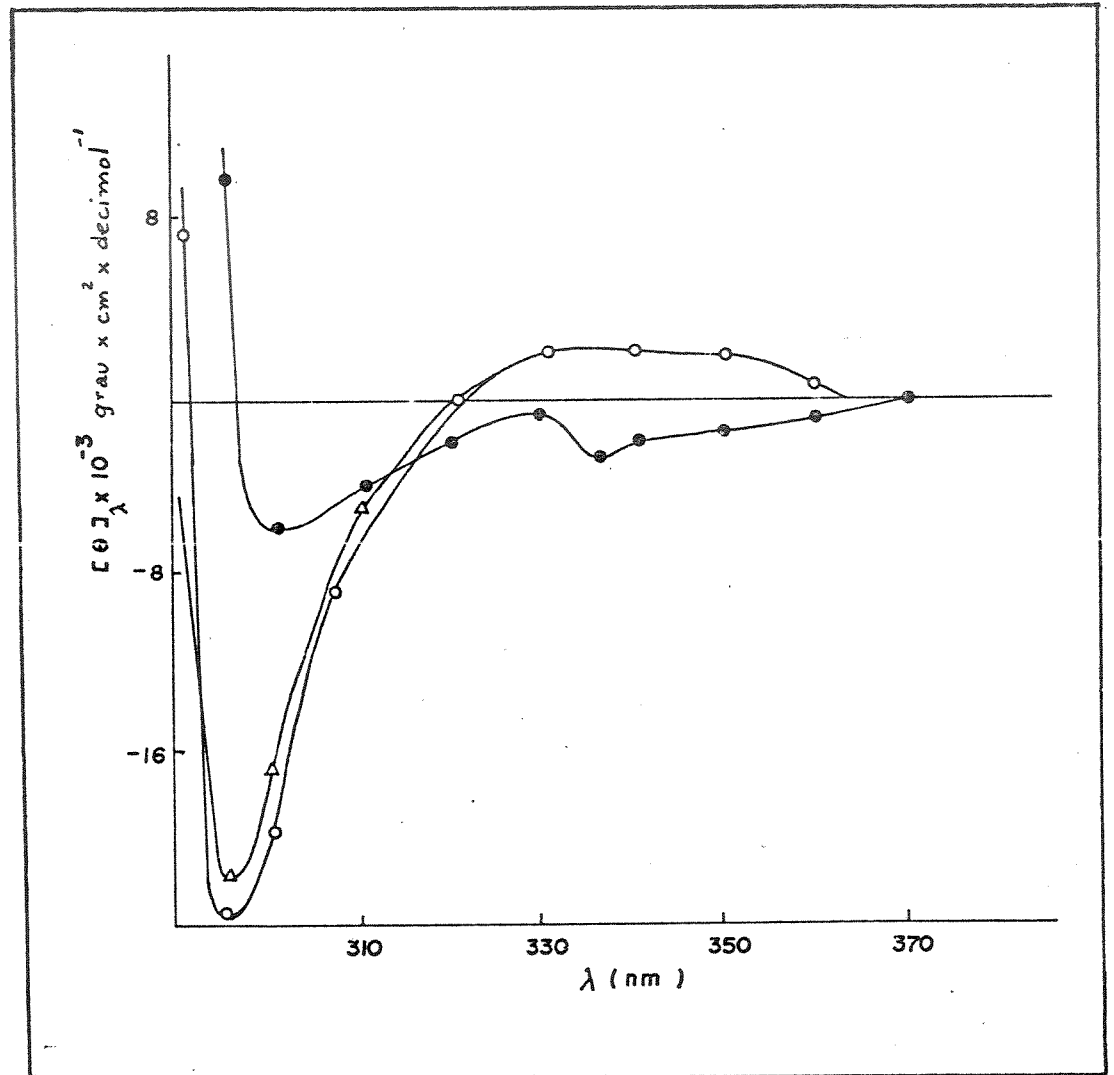


Fig.3.1.6 : Espectros C.D. de 40 μ M de tRNA em D₂O :

(-o-) tRNA nativo; (-●-) tRNA/UV (7h de irradiação a 335nm). Com 1,4mM de Mg⁺²;

(-Δ-) tRNA/Mg⁺²

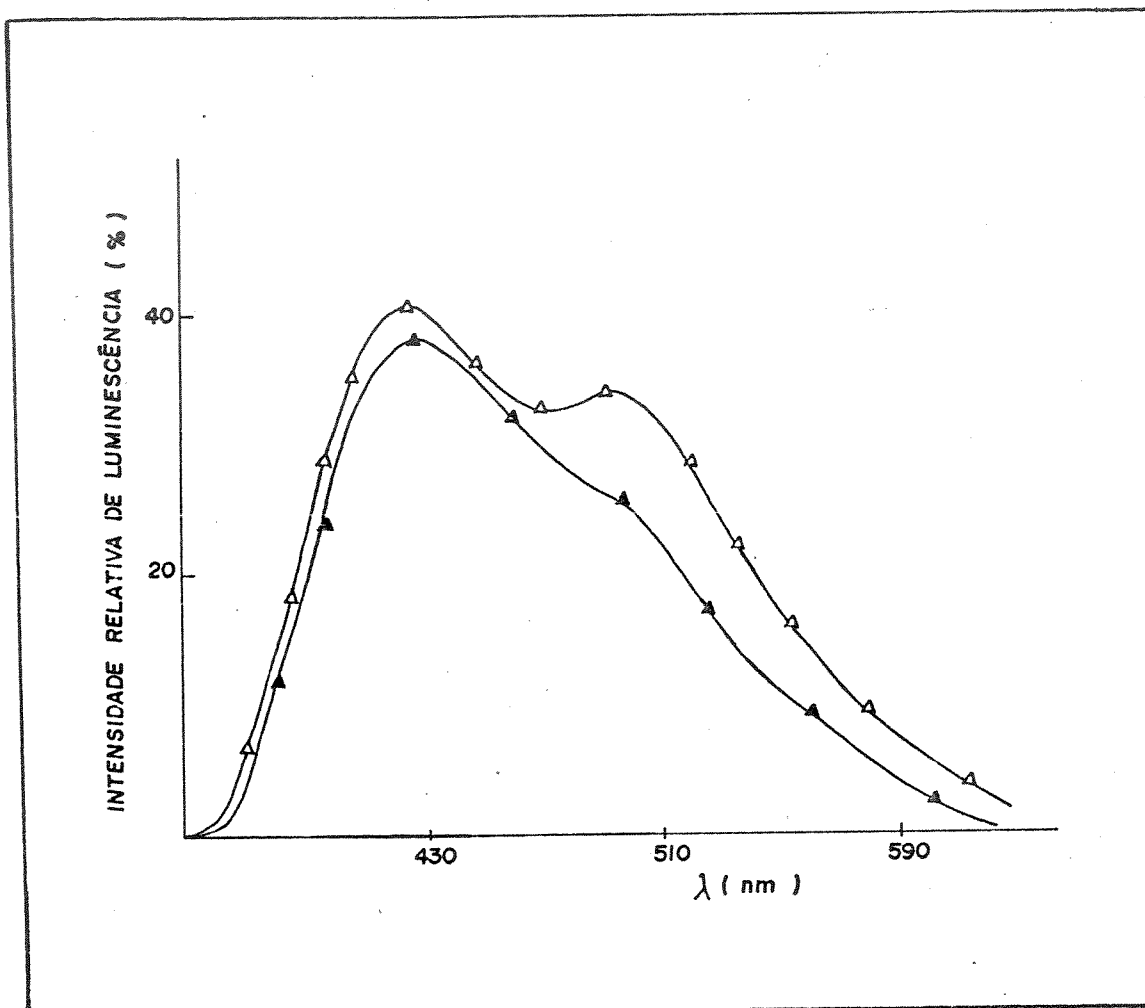


Fig.3.1.7 : Espectros de luminescência de 40 μ M de tRNA em 0,05M de tampão acetato, pH=3,8, com 30 μ M de EDTA (λ exc. e irr.=335nm). Com 1,4mM de Mg⁺² : (- Δ -) 0h de irradiação; (- \blacktriangle -) 7h de irradiação.

Este equilíbrio (esquema XI) poderia ser deslocado em D_2O , observando-se maior intensidade da banda em 510nm, na fig.3.1.9. Novamente, a fig.3.1.9 mostra de uma forma clara o deslocamento do equilíbrio através da existência de um ponto isobéstico em 490nm, onde não se observam mudanças conformacionais. Assim, pode-se supor que em H_2O ou em tampão este equilíbrio não seja alterado, mas que em D_2O ele possa ser deslocado para uma das duas formas, estabilizando-a. Esta forma pode ser mais reativa, portanto, observa-se um aumento na intensidade de emissão do fotoproduto (fig.3.1.5) quando se compara às obtidas em H_2O (fig.3.1.3) e em tampão acetato (fig.3.1.7). Pelos espectros C.D., observa-se modificação conformacional do tRNA quando se passa de H_2O (fig. 3.1.4) ou D_2O (fig.3.1.6) para o tampão acetato (fig.3.1.8). Assim, os efeitos observados na fig.3.1.8 são diferentes dos em H_2O ou D_2O (fig.3.1.6) para o o tampão acetato (fig.3.1.8). Assim, os efeitos observados na figura 3.1.8 são diferentes dos em H_2O e D_2O , por modificação na conformação do tRNA em tampão, devido ao valor de pH tão diferente (pH=3,8). Entre H_2O e D_2O as mudanças conformacionais não foram observadas no C.D..

Sabe-se que a conformação do tRNA na presença de íons Mg^{+2} se torna mais rígida (204). Estes íons são responsáveis pela estabilidade da molécula de tRNA. Quando este é irradiado (especialmente em meio aquoso, fig.3.1.3), na presença de íons Mg^{+2} , a intensidade de emissão de luminescência do fotoproduto formado durante a irradiação, é maior. Pode-se atribuir este fato à conformação adquirida pelo tRNA em presença de Mg^{+2} , o que favorece a formação do fotoproduto (figs.3.1.3 e 3.1.7). Esta hipótese po-

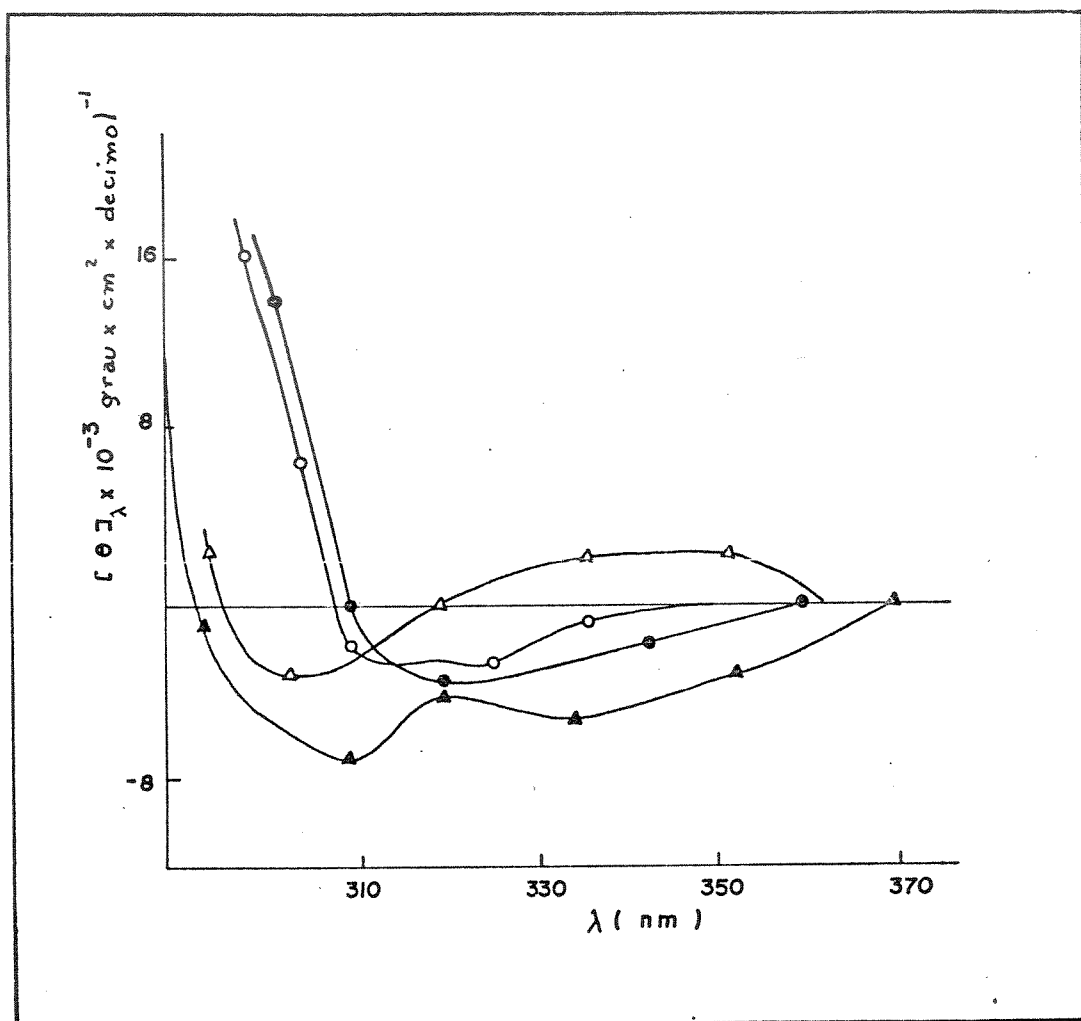


Fig.3.1.8 : Espectros C.D. de 40 μ M de tRNA em 0,05M de tampão acetato, pH=3,8. Sem íons Mg²⁺: (-o-) tRNA nativo; (-●-) tRNA/UV (7h a 335nm). Com 1,4mM de Mg²⁺: (-Δ-) tRNA/Mg²⁺; (-▲-) tRNA/UV/Mg²⁺ (7h a 335nm).

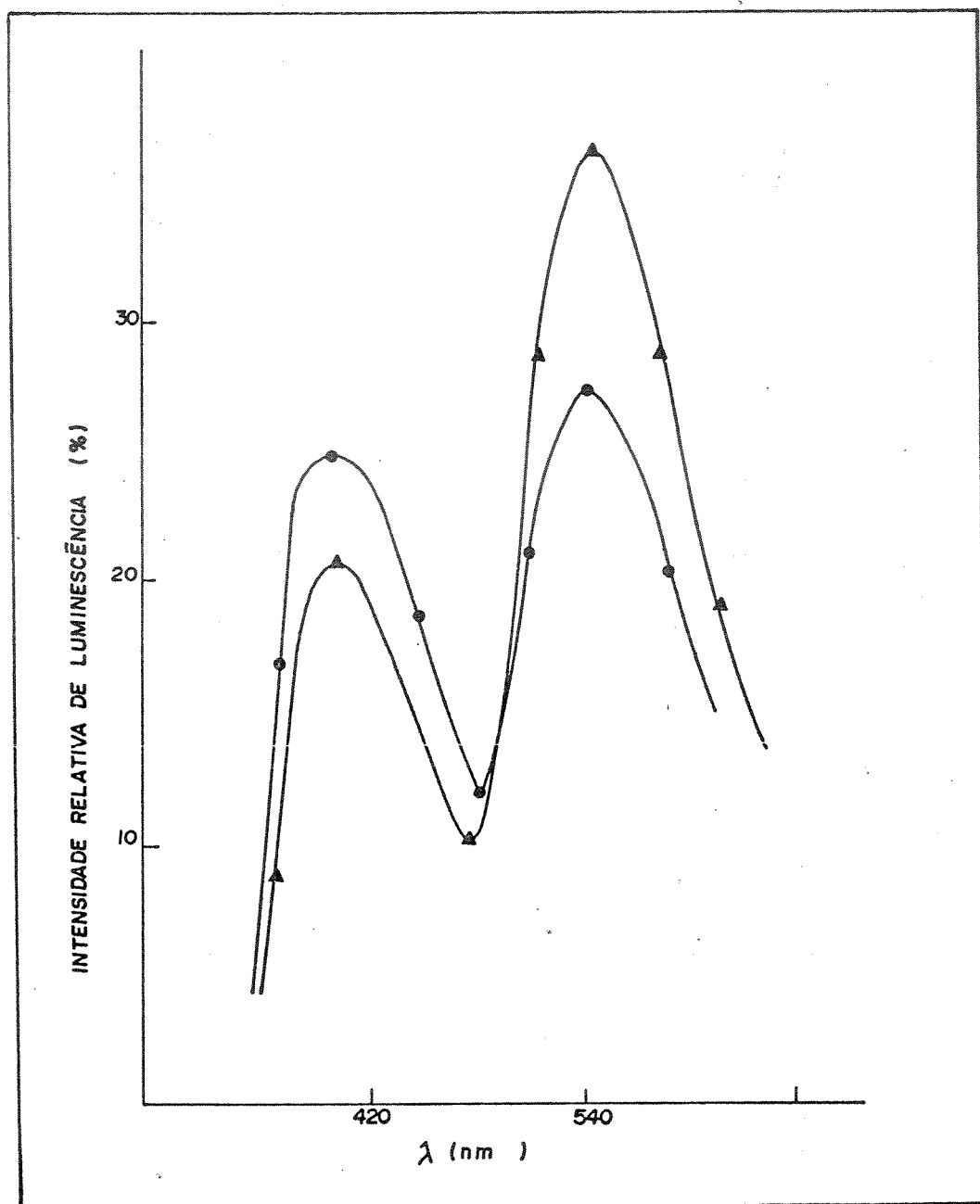


Fig.3.1.9 : Espectros de luminescência de 200µg/ml de 4-TU em diferentes meios à temperatura de 10^o C (λ exc.=335nm). Legenda: (-●-) 4-TU em H₂O : etilenoglicol (1:1); (-▲-)4-TU em D₂O : etilenoglicol (1:1).

de ser confirmada através dos espectros C.D. (figs.3.1.4 e 3.1.8), onde se observa que o sinal C.D. é alterado na região de absorção de 4-TU (335nm) quando em presença destes íons, e alterado ainda mais quando o tRNA é irradiado na presença de íons Mg^{+2} . Em meio deuterado, como se pode constatar pelos espectros C.D. (fig.3.1.6), a conformação do tRNA não sofre muita alteração quando em presença de Mg^{+2} , e também os efeitos observados em H_2 e D_2O de tRNA irradiado, não são muito diferentes um do outro.

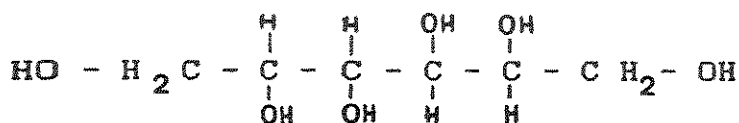
O espectro de emissão de tRNA em tampão cacodilato é mostrado na figura 3.11.2 (pg.108). Como no pH=7,0 (tampão cacodilato) a emissão do tRNA ($\lambda_{exc}=335nm$) é diferente da emissão em tampão tris-HCl, pH=7,6, e a irradiação direta foi feita na presença de tampão cacodilato, o efeito dos aniquiladores foi observado a 510nm, que é o comprimento de onda de emissão máxima do tRNA neste tampão, e os valores estão na tabela 3.1.1 (pg.100).

Observando-se a tabela 3.1.1, nota-se que a histidina foi um bom supressor. Diversos autores (107, 205, 206) demonstraram que a ação protetora de histina e guanosina, bem como de alguns amino-ácidos e proteínas, consiste de uma somatória de efeitos de supressão de oxigênio singlete. Até ao presente momento, não existe um mecanismo preciso de ação de histina e outros supressores de oxigênio singlete e de espécies ativas de oxigênio. Neste caso, os produtos de reação não foram identificados.

O manitol é um aniquilador de radicais hidroxila. Sua estrutura é mostrada no esquema a seguir.

Tabela 3.1.1 : Efeito dos aniquiladores no sistema fotoquímico. Mistura de reação : 40 μ M de tRNA em 0,05M de tampão cacodilato, pH=7,0. As concentrações utilizadas dos aniquiladores estão descritas no item III.1.1.3 (cap.2) pg.77. As amostras foram irradiadas por duas horas em $\lambda_{exc.} = 335nm$.

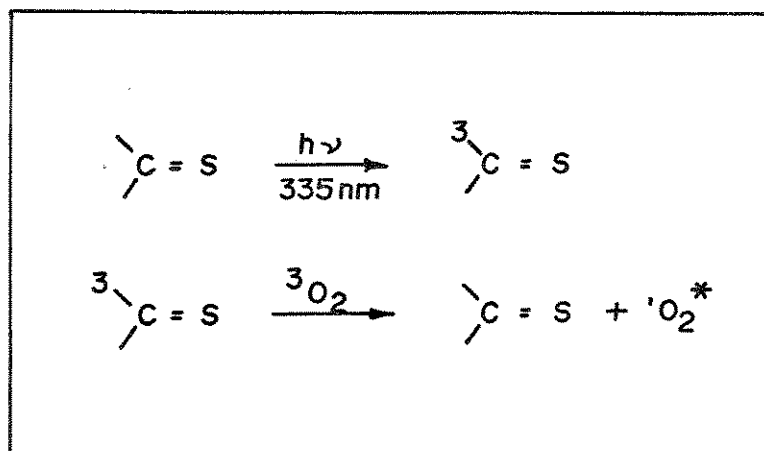
ANIQUILADOR	% DE DESTRUICAO	% DE PROTECCAO
-	100	0
Histidina (10mM)	65,5	34,5
Manitol (10mM)	100	0
Catalase (100u)	90,5	9,5
Catalase desnaturada	61,1	38,9
SOD (100u)	92	8
SOD desnaturada	13,5	86,5



Esquema XII : Estrutura do manitol.

Na reação estudada, o manitol não funcionou, indicando possivelmente que o $\cdot\text{OH}$ não é formado. Isto foi comprovado também pela ação de formiato (resultados não mostrados).

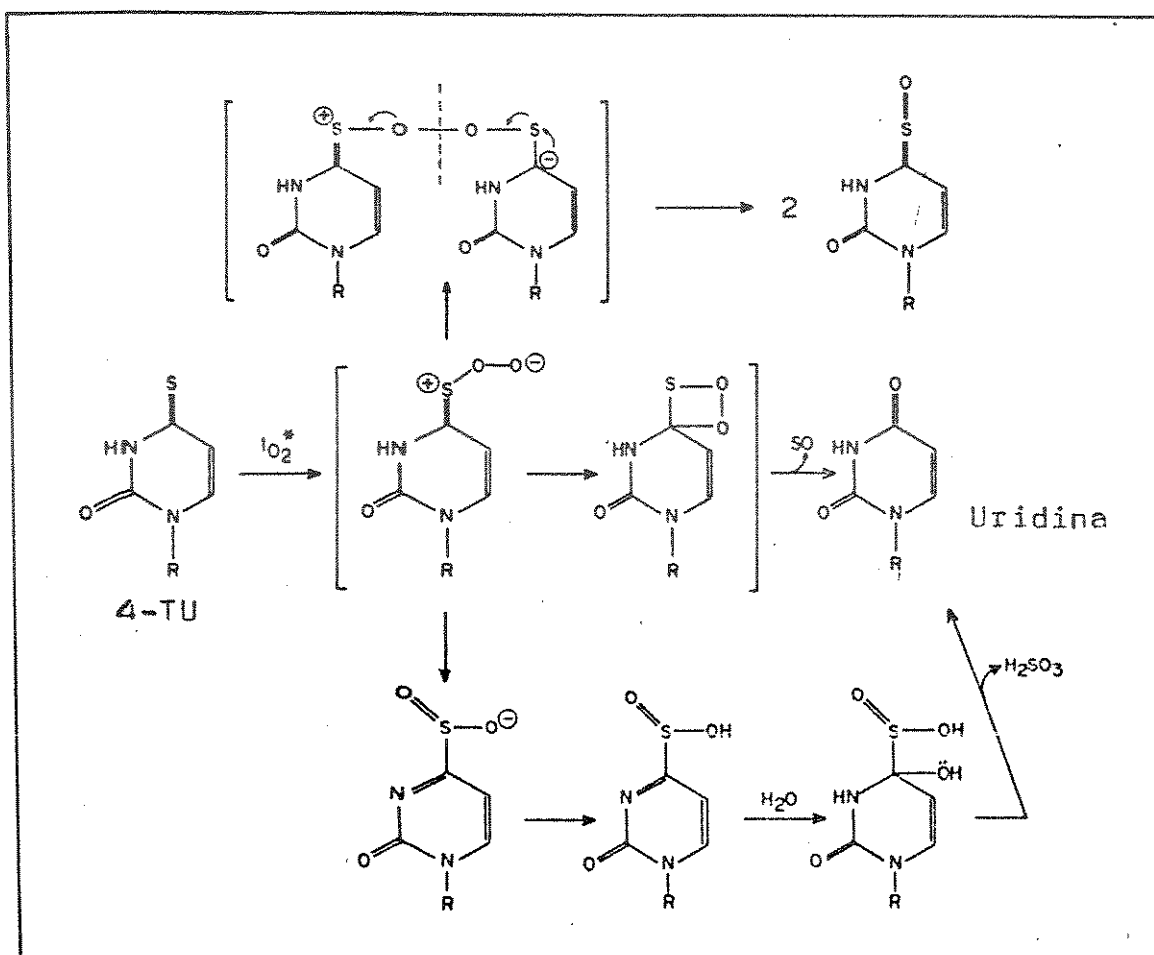
Os estudos com SOD e catalase foram feitos com o intuito de se analisar a presença de superóxido ânion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e H_2O_2 através de supressão enzimática. Observa-se que o caso da SOD aniquiladora de superóxido ânion, o efeito se dá inespecificamente através da proteína, pois após a desnaturação (processo no qual a atividade enzimática é perdida) a SOD produz um efeito muito maior de proteção que antes de ser desnaturada. O mesmo efeito ocorre com menor intensidade com a catalase (supressora de H_2O_2). Estas observações levam a supor que apenas o oxigênio singlete seja gerado durante o processo, isto é, a 4-TU atua como um sensibilizador, segundo o mecanismo descrito a seguir.



Esquema XIII : Mecanismo de sensibilização de 4-TU

Este fato de que a 4-TU age como um sensibilizador, é comprovado por Salet e col. (207). Há uma produção de oxigênio singlete no processo, com considerável rendimento. Salet e col. (207) ainda postularam que a 4-TU pode agir como um sensibilizador pelos dois processos fotodinâmicos : tipo I (radicais) ou tipo II (oxigênio singlete) (esquema XV, pg.120). A produção de oxigênio singlete por fotossensibilização de 4-TU pode ser comprovada pela fotooxidação de histidina, cujo processo se realiza inespecificamente pelo mecanismo tipo II (esq.XV) (vide tab. 3.1.1, pg.100)(208). Os resultados obtidos por Salet e col. (208) sugerem que uma molécula de oxigênio singlete reage com uma molécula de histidina. Os mesmos autores descrevem os parâmetros cinéticos para a desativação do estado triplete da 4-TU pelo oxigênio, $4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e pela histidina $4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (209).

Segundo os dados obtidos no presente trabalho, acredita-se que o oxigênio singlete reaja agora com a 4-TU, segundo o mecanismo descrito no esquema XIV.



Esquema XIV : Reação de 4-TU com oxigênio singlete.

Pleiss e col. mostraram que a fotooxidação de 4-TU (334nm) ocorre rapidamente, produzindo uridina, formando um intermediário uridina-4-sulfonato, o qual é extremamente susceptível ao ataque nucleofílico. O ataque no C-4 pela água leva a uridina (166).

Peak e col. (181, 190, 210) mostraram que a 4-TU age como um sensibilizador para quebras de fitas simples em DNA (212), como descrito anteriormente, no capítulo 1, pg. 56.

II. Irradiação na presença de um sensibilizador

II.1. Irradiação com tRNA e AL

Para se estudar a correlação entre o decréscimo da intensidade de luminescência do tRNA quando irradiado na presença de um sensibilizador e a perda da capacidade de aminoacilação (177), este experimento foi realizado, cujas concentrações utilizadas estão descritas no item III.1.2.1 (cap.2), pg.77. Os resultados obtidos em luminescência estão na fig.3.II.4 e 3.II.5, os espectros C.D.nas figuras 3.II.6 a 3.II.8.

II.2. Irradiação com AL, na presença de aniquiladores

O mesmo estudo já descrito no item anterior foi feito na presença de aniquiladores. As concentrações dos aniquiladores utilizadas estão descritas no item III.1.2.2 (cap.2), pg. 77. Os valores obtidos se encontram na tabela 3.II.1.

II.3. Estudo da ligação de AL ao tRNA

A fim de se verificar a interação de AL com o tRNA foi utilizada a técnica de cromatografia por filtração em gel. Foram eluídas amostras irradiadas e não irradiadas. As concentrações utilizadas estão descritas no item III.1.2.3 (cap.2), pg. 78. Os resultados obtidos estão nas figuras 3.II.10 a 3.II.12.

II.4. Irradiação com AL na
presença de 4-TU

Foi utilizada a base 4-TU no sistema fotossensibilizado. As amostras foram irradiadas nas condições descritas no ítem III. 1.2.4 (cap. 2), pg. 78 . Os resultados estão descritos na tabela 3.11.2.

O tRNA muda sua conformação dependendo do pH em que se encontra. Isto é observado na fig.3.II.1, que descreve as variações no comprimento de onda de absorção máxima do tRNA em função do pH. Tal efeito é observado tanto no seu espectro de absorção como no de emissão. No pH de 7,6, em que é realizada a reação fotoquímica $tRNA/AL/h\nu/O_2$, o espectro de luminescência do tRNA tem seu pico máximo de emissão deslocado para valores menores ($\approx 420nm$) do que o espectro obtido em tampão cacodilato, pH=7,0 cujo pico se dá a $\approx 500nm$. Este fato é registrado na fig.3.II.2 que mostra os espectros de emissão de luminescência de tRNA em tampão tris-HCl e cacodilato. Além do efeito do pH, o espectro de emissão do tRNA sofre a influência da forte emissão da AL, como se observa na fig.3.II.3, que descreve os espectros de emissão de luminescência de tRNA na ausência e presença de AL.

Como o pico de emissão máxima de luminescência de tRNA na presença de AL se dá a $\approx 420nm$ ($\lambda_{exc}=335nm$), os estudos subsequentes foram acompanhados neste comprimento de onda.

A figura 3.II.4 apresenta os gráficos de intensidade relativa de luminescência de tRNA submetido ao tratamento com diferentes intensidades de luz em 470nm (nesse comprimento de onda sensibilizador AL é excitado para promover a produção de espécies ativas de oxigênio - eq.VIII, cap.1, pg.41).

Analisando-se a figura 3.II.4, constata-se que a reação inicial é de primeira ordem, e é seguida por uma velocidade de reação mais lenta. O mesmo efeito é observado na fig. 1.IV.1, p. 53 (adaptada do trabalho de Amagasa e col.(177)) que mostra o efeito da irradiação na perda da capacidade de aminoacilação

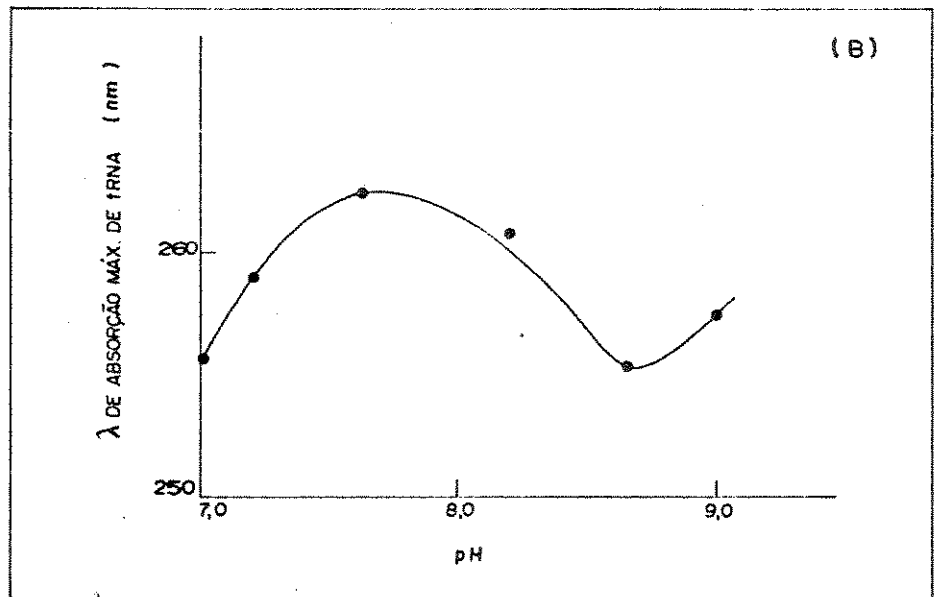
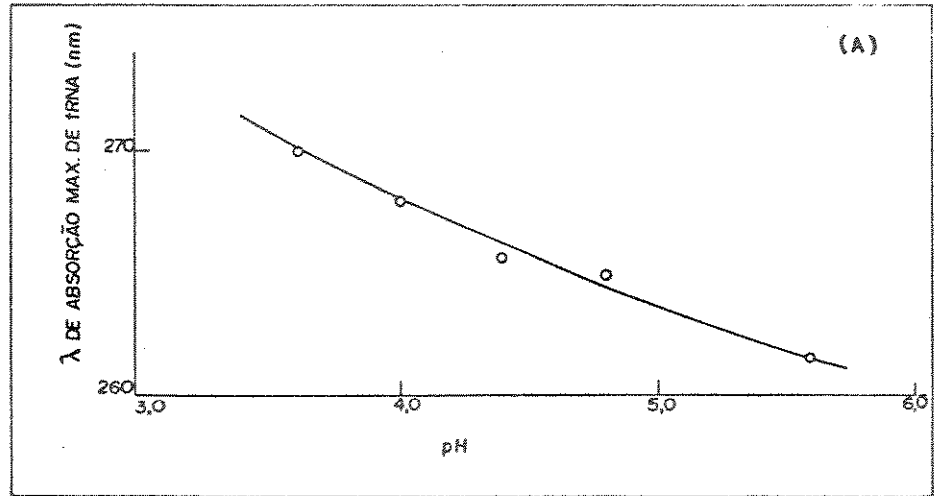


Fig. 3.11.1 : Espectros de absorção de $0,2\mu\text{M}$ de tRNA (no volume final de $2,5\text{ml}$) em função do pH.
 (a) $0,2\text{M}$ de tampão acetato; (b) $0,05\text{M}$ de tampão tris-HCl.

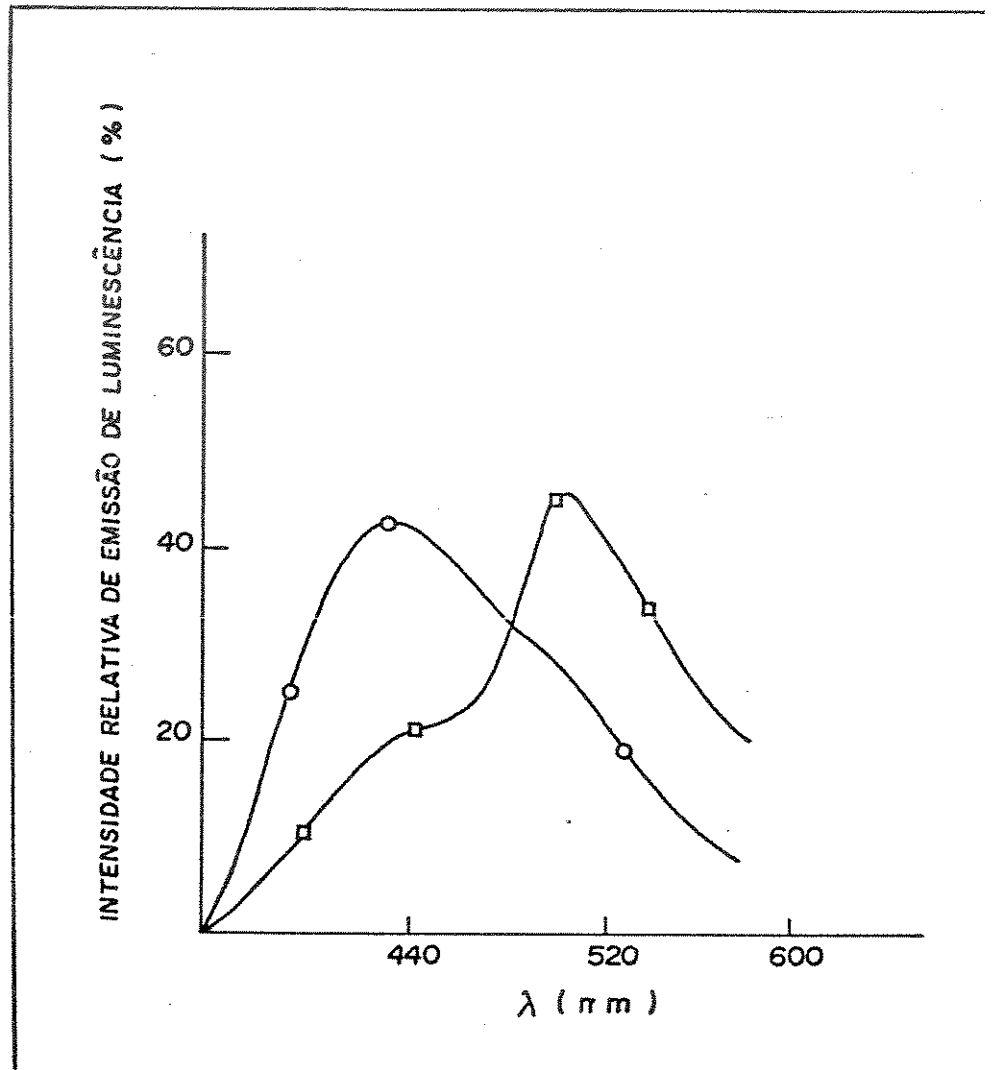


Fig.3.11.2 : Espectros de luminescência de 40 μ M de tRNA e diferentes meios ($\lambda_{exc}=335$ nm). Legenda: (-o-) tRNA em 0,05M de tampão tris-HCl, pH=7,6 (-□-) tRNA em 0,05M de tampão cacodilato pH=7,0, com 0,1M de NaCl e 5mM de MgCl₂.

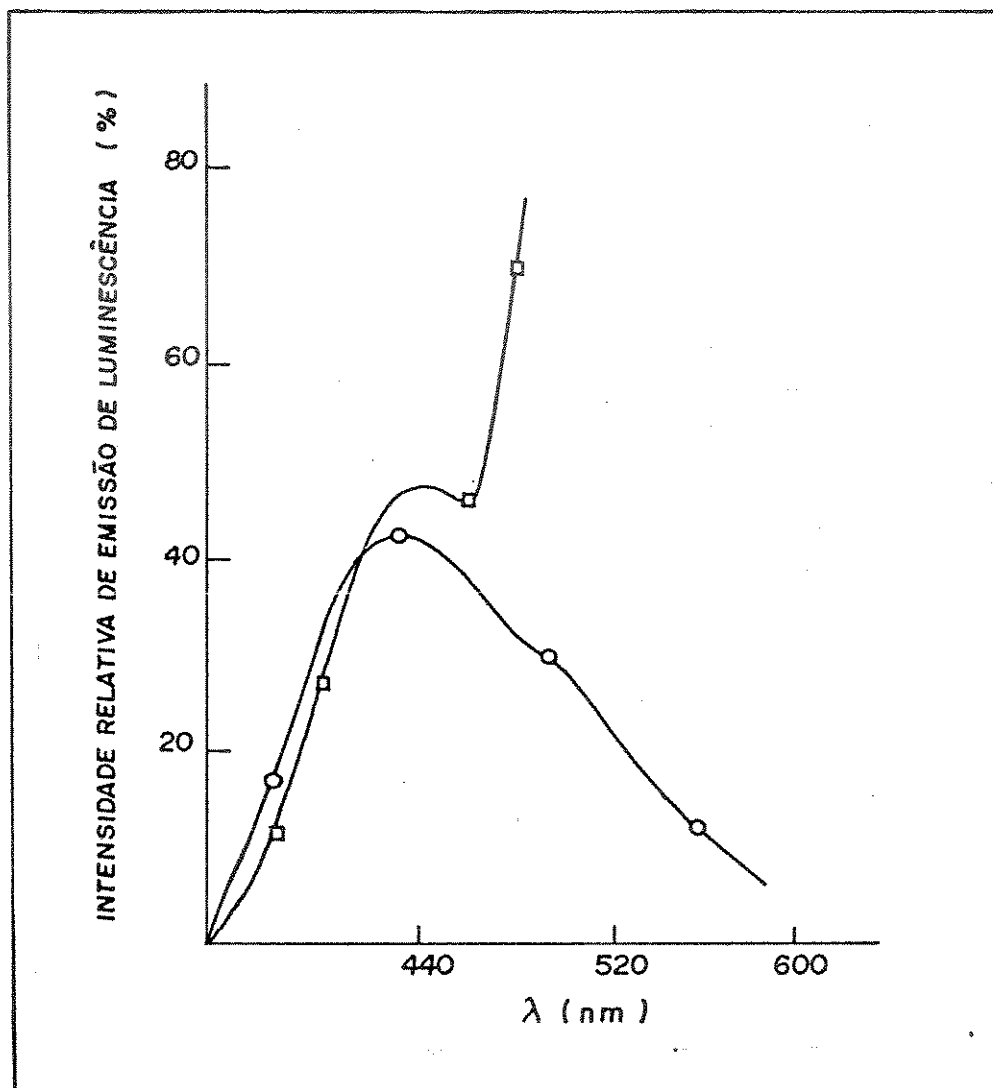


Fig. 3.11.3 : Espectros de luminescência de 40 μ M de tRNA em diferentes meios. Legenda: (-o-) tRNA em 0,05 M de tampão tris-HCl, pH=7,6; (-□-) tRNA 15,5 μ M de AL, em 0,05M de tampão tris-HCl pH=7,6 (λ exc = 335nm).

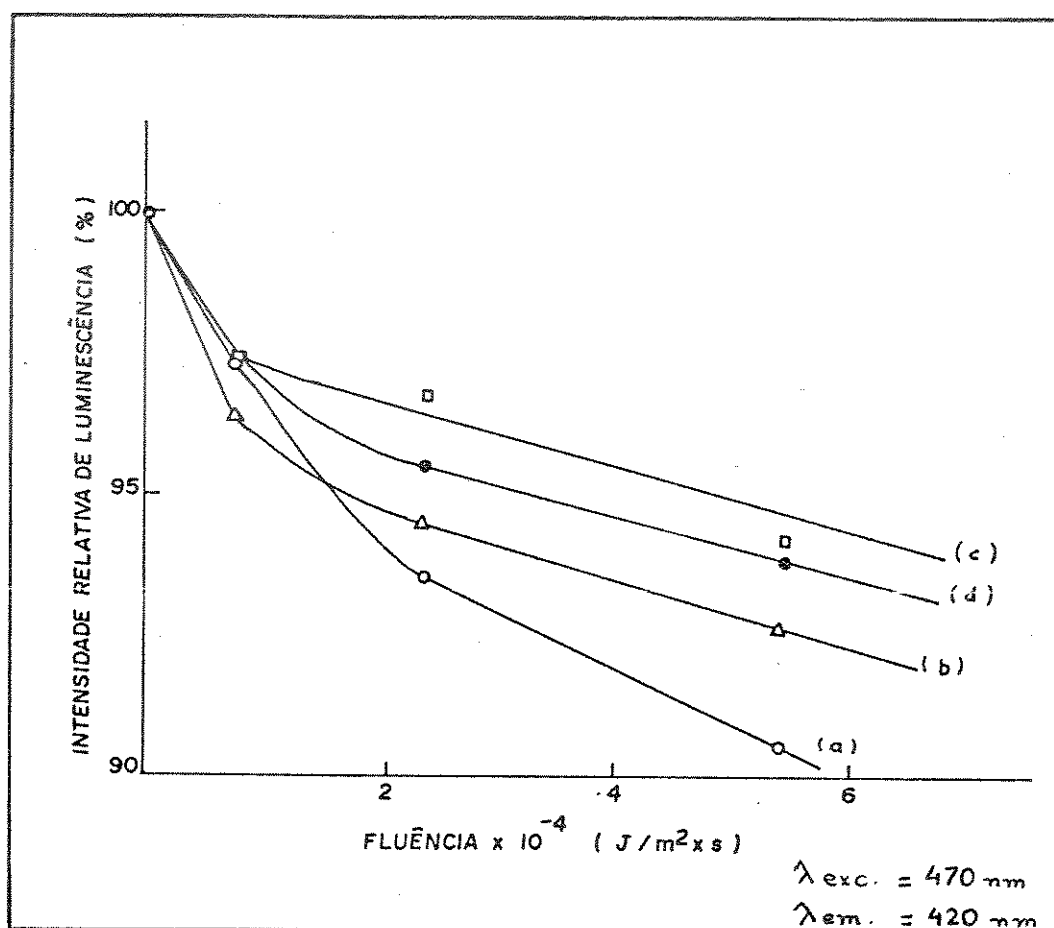


Fig. 3.11.4 : Gráfico de intensidade relativa de luminescência de tRNA com a fluência. As concentrações utilizadas foram : 0,2 μM de tRNA, 15,5 μM de AL em 0,05M de tampão tris-HCl, pH=7,6. Legenda: sem íons Mg^{+2} (-o-); com 25 μM de Mg^{+2} (- Δ -); 0,25mM de Mg^{+2} (- \square -) e 0,5mM de Mg^{+2} (- \bullet -).

tRNA. Comparando as figuras 3.II.4 e 1.IV.1 verifica-se que o efeito dos íons Mg^{+2} observado por Amagasa e col.(177) na fotoativação de tRNA (perda da capacidade de aminoacilação) (fig. 1.IV.1) concorda com o decréscimo na emissão do tRNA (fig. 3.II.4).

A figura 3.II.5 mostra os espectros de emissão de tRNA submetido ao tratamento com luz e AL. Nota-se que os efeitos observados nas figuras 3.II.4 e 1.IV.1 concordam com a diminuição na intensidade de luminescência do tRNA, verificada na fig. 3.II.5. Isto é, o tRNA ao ser irradiado na presença de AL vai perdendo gradativamente sua capacidade de aminoacilação (fig. 1.IV.1) e sua intensidade de luminescência também decresce com o tempo de irradiação (fig.3.II.4 e 3.II.5). Estes fatos são confirmados verificando-se os espectros C.D. encontrados nas figs. 3.II.6 e 3.II.7. Estes espectros dão a informação de que o tRNA após este tratamento com luz e sensibilizador, tem sua conformação alterada tanto na região de absorção das bases normais (fig. 3.II.6) como na região de absorção da 4-TU (fig.3.II.7).

Os íons Mg^{+2} se intercalam entre as bases do tRNA, estabilizando a estrutura terciária da macromolécula (213). Devido a esta característica, há uma concentração ideal de Mg^{+2} que confere ao tRNA uma certa proteção aos ataques das espécies excitadas. Um valor máximo de emissão no espectro de luminescência do tRNA significa maior proteção pelos íons Mg^{+2} e também que o tRNA sofreu pouca alteração (isto é verificado comparando-se o espectro de tRNA na ausência e presença de Mg^{+2}). Este fato é confirmado pelas figuras 3.II.8 e 3.II.9. A fig.3.II.8 descreve o espectro

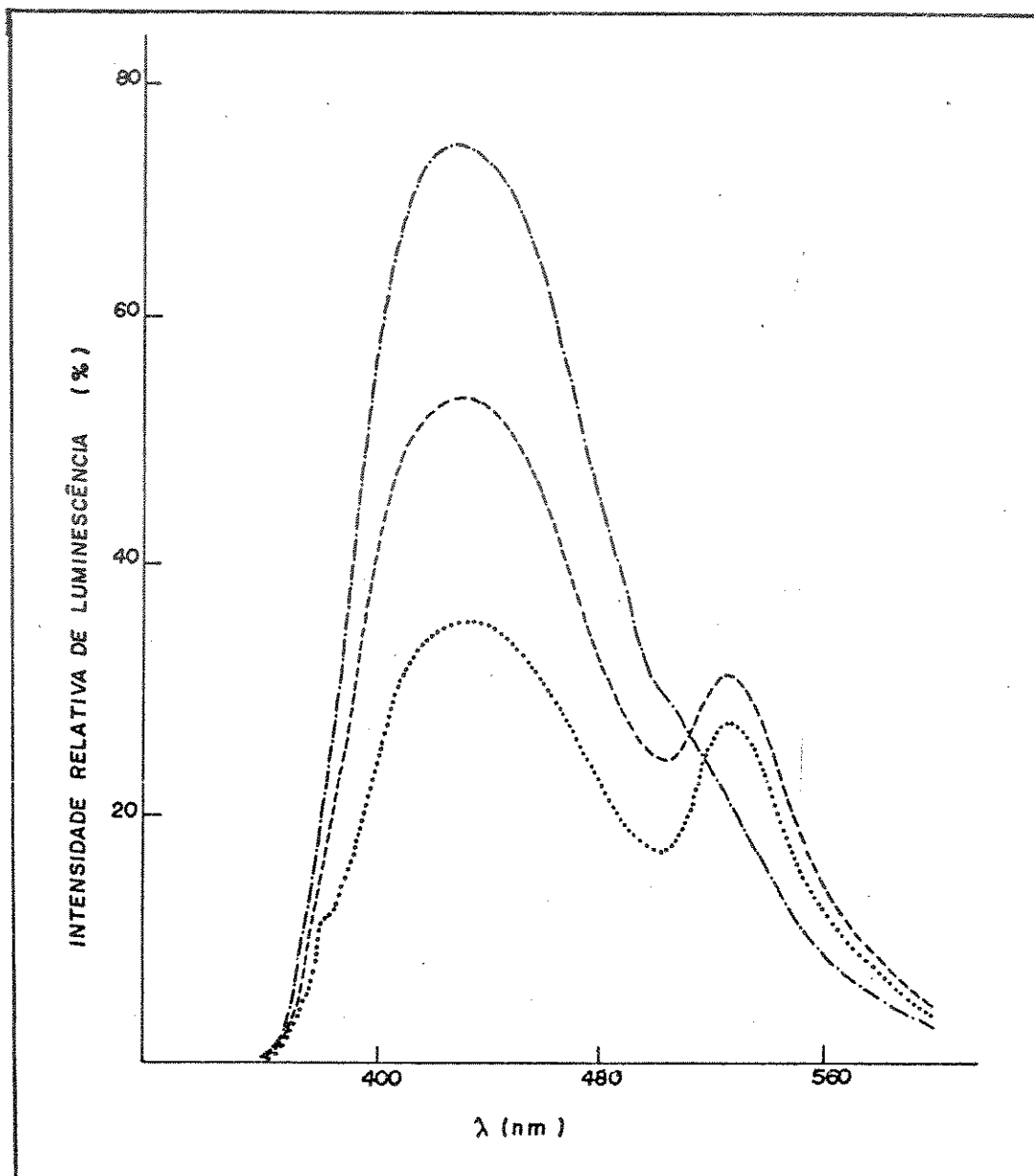


Fig. 3.11.5 : Espectros de emissão de $4\mu\text{M}$ de tRNA, λ_{exc} de 335nm (depois de 20 h de diálise e precipitado do meio reacional). Legenda: (-.-) tRNA nativo; (---) tRNA/AL (tempo de irradiação de 15 min); (...) tRNA/AL ($t_i = 30$ min). Fluência = 360 J/m^2 (conc.-item III.1.2.1, pg.7

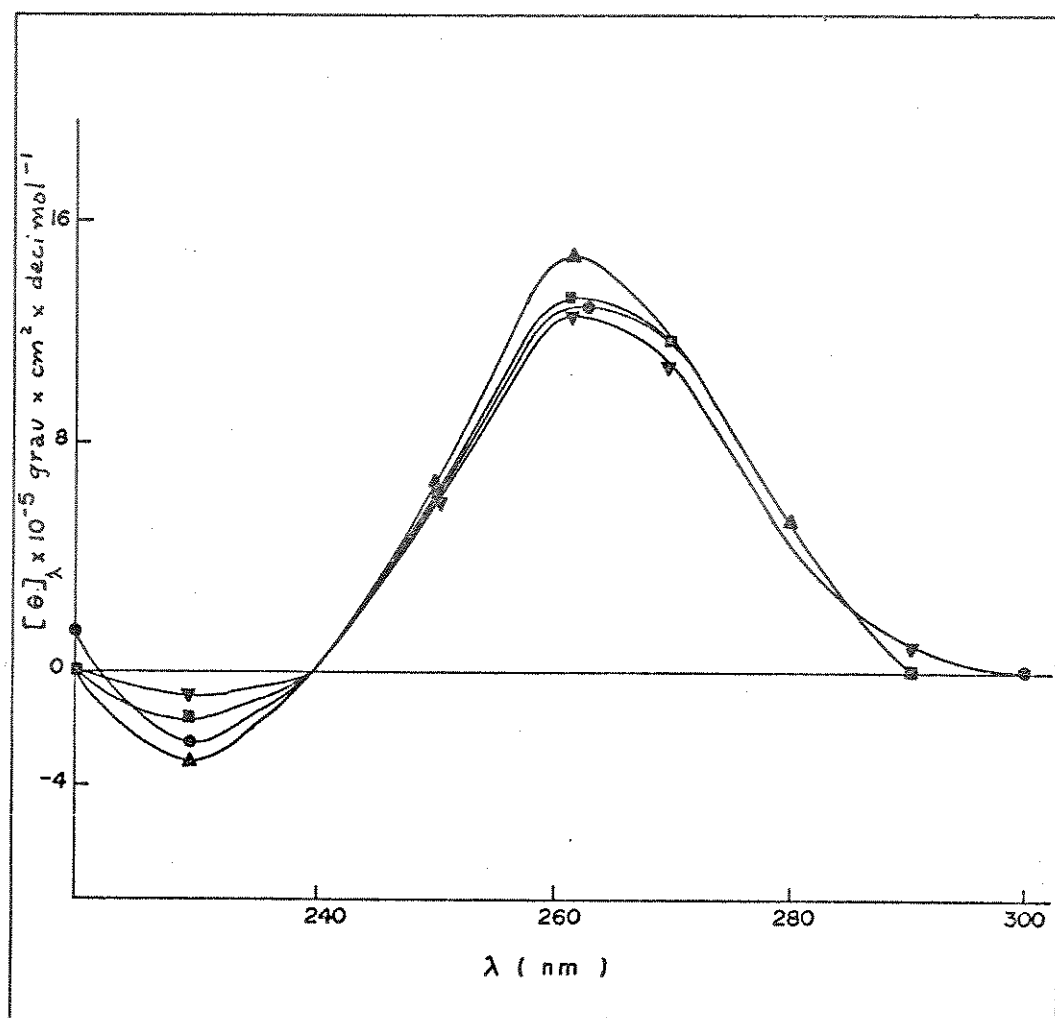


Fig. 3.11.6 : Espectros C.D. de 40 μ M de tRNA submetido ao tratamento com o sistema fotoquímico (40 μ M de tRNA, 15,5 μ M de AL, em 0,05M de tampão tris-HCl, pH=7,6). O tRNA foi precipitado do meio de reação e ressuspendido em água bi-distilada. Legenda: (- \blacktriangle -) t irradi. = 0min; (- \blacksquare -) t_i = 15min; (- \bullet -) t_i = 30min e (- \blacktriangledown -) t_i = 45min.

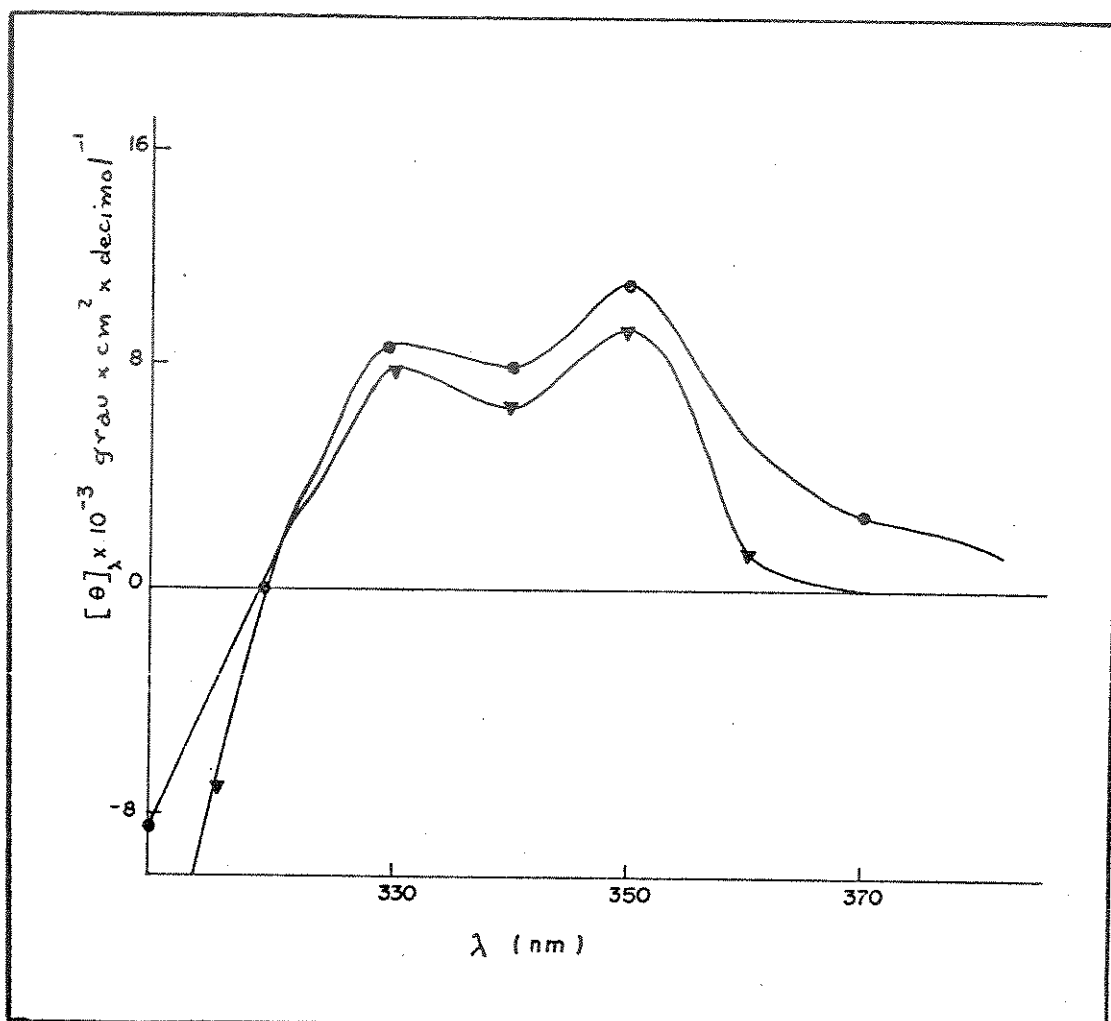


Fig. 3.11.7 : Espectros C.D. de 40 μ M de tRNA submetido ao tratamento com o sistema fotoquímico (as concentrações utilizadas estão descritas na fig3.11.6). O tRNA foi precipitado do meio de reação e ressuspendido em água bidestilada. (-●-) $t_i = 0\text{min}$ e (-▼-) $t_i = 45\text{min}$.

C.D. de tRNA submetido ao tratamento com o sistema fotossensibilizado na presença de Mg^{+2} . Observando-se as pequenas variações no espectro conclui-se que o tRNA sofreu poucas modificações. Há uma concentração ideal destes íons, na qual ocorre um efeito de proteção do tRNA aos ataques das espécies formadas durante o processo de sensibilização. Na fig.3.II.9, a intensidade relativa de luminescência do tRNA foi verificada em diferentes concentrações de Mg^{+2} . A concentração destes íons que confere maior estabilidade ao tRNA é a de 0,25mM, verificada pela maior intensidade de emissão. Este fato comprova as observações feitas por Amagasa e col.(177) nas quais os pesquisadores verificaram que nesta concentração ocorre uma menor perda da capacidade de aminoacilação do tRNA, ou maior atividade remanescente (da enzima aminoacil-tRNA-sintetase) (fig.1.IV.1). O mesmo efeito é observado na fig. 3.II.4, onde a intensidade de luminescência do tRNA é maior na presença de 0,25mM de Mg^{+2} (curva c). Quando se tem concentrações mais altas (curva d) que 0,25mM o efeito de proteção não é observado, e é bem pequeno (curva b) em concentrações menores que 0,25 mM.

A tabela 3.II.1 (pg.118) descreve o efeito dos aniquiladores no sistema fotossensibilizado. Observando-se a tabela verifica-se que a histidina foi efetiva na supressão de oxigênio singlete, pois o valor da porcentagem de destruição foi zero. Os efeitos de supressão por histidina e guanósina provêm de : supressão física, reativa de oxigênio singlete e supressão do estado triplete do sensibilizador (107, 205, 206).

O manitol é um aniquilador de $\cdot OH$ (estrutura mostrada no

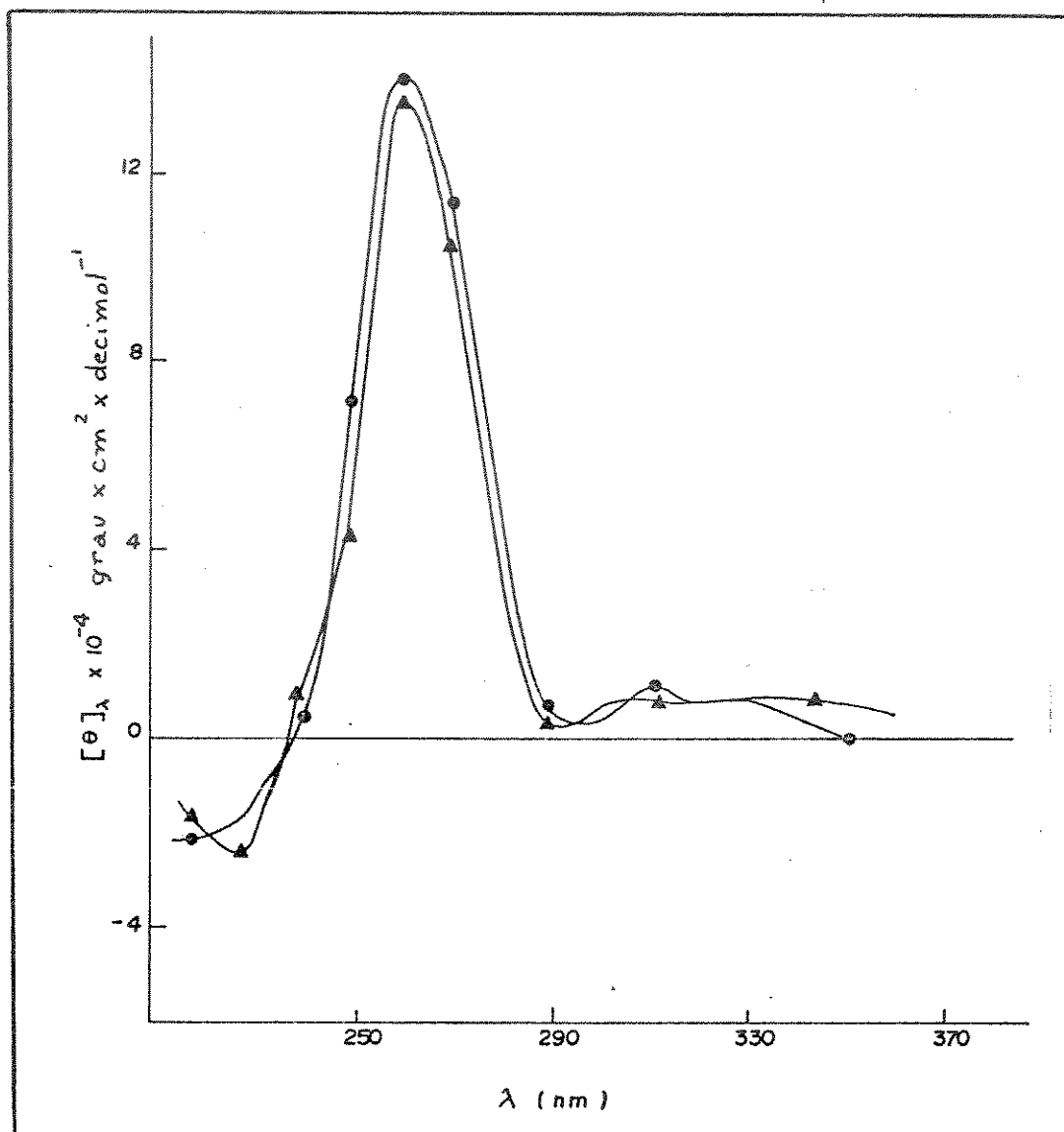


Fig. 3.11.8 : Espectros C.D. de $24\mu\text{M}$ de tRNA, em água bi-destilada. Legenda : (●) tRNA/AL/tampão/ Mg^{+2} ; (▲) tRNA/AL/tampão/ Mg^{+2} ($t_i = 45$ min). Mistura de reação : $40\mu\text{M}$ de tRNA; $15,5\mu\text{M}$ de AL; $0,25\text{mM}$ de Mg^{+2} , em $0,05\text{M}$ de tampão tris-HCl, $\text{pH}=7,6$.

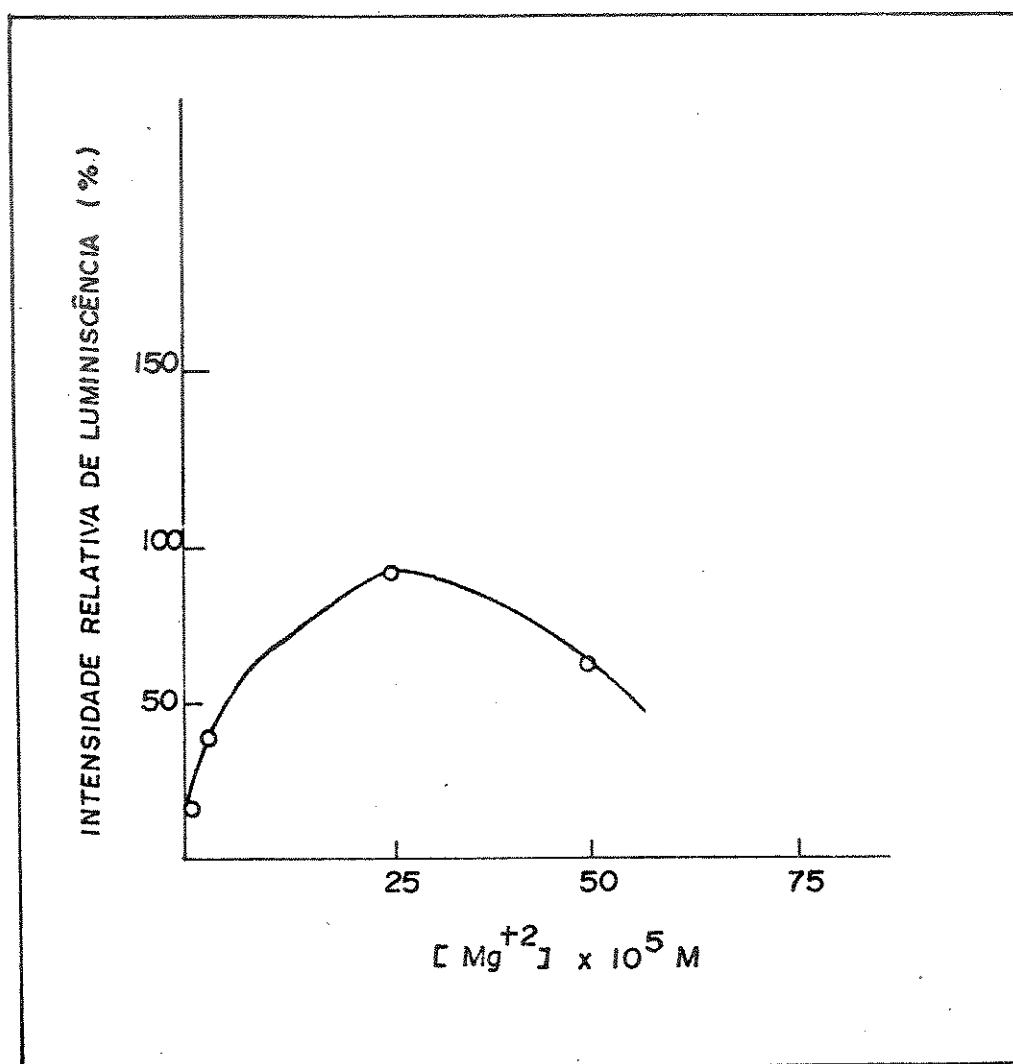


Fig.3.11.9 : Gráfico de intensidade relativa de emissão de luminescência de $2\mu M$ de tRNA e $15,5\mu M$ de Al, em $0,05M$ de tampão tris-HCl, $pH=7,6$, em função da $[Mg^{+2}]$. $t_l = 15min$.

Tabela 3.11.1. : Efeito dos aniquiladores no sistema fotosensibilizado. Mistura de reação : 40uM de tRNA; 15,5uM de AL, em 0,05M de tampão tris-HCl, pH=7,6. As concentrações dos aniquiladores utilizadas para este estudo estão descritas no ítem III.1.2.2(cap.2), pg.77. As amostras foram irradiadas por 45 minutos a $\lambda_{exc} = 470nm$.

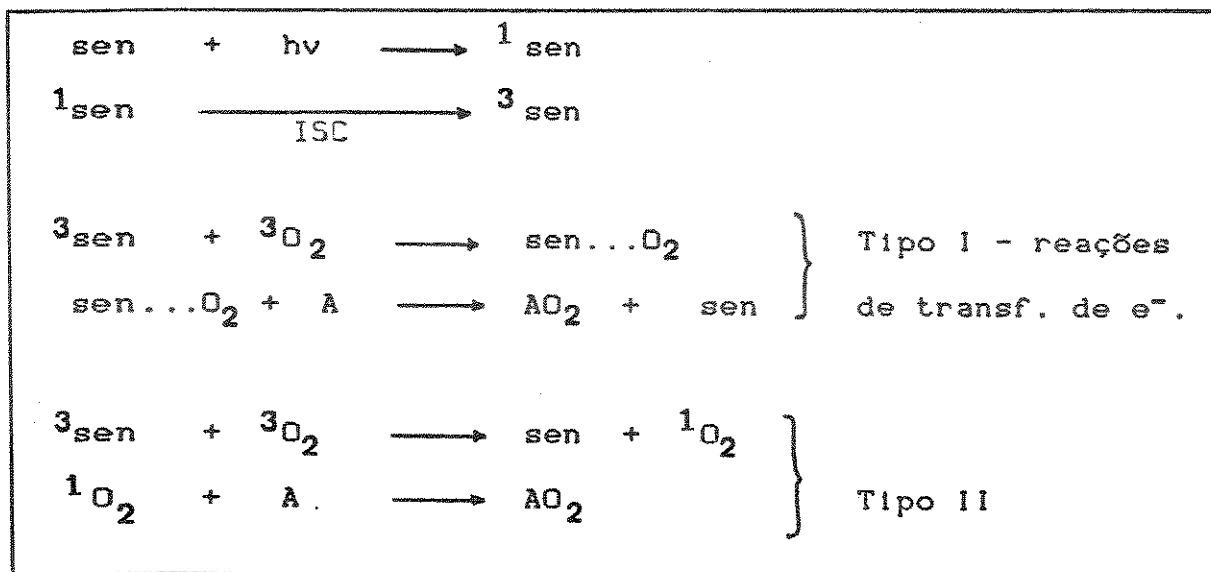
ANIQUILADOR	% DE DESTRUICAO	% DE PROTECAO
-	100	0
Histidina (10mM)	0	100
Manitol (10mM)	15,9	84,1
Catalase (150u)	0	100
Catalase des- naturada	42,5	57,5
SOD (150u)	34	66
SOD desna- turada	0	100

esq.XII, pg101). Na reação estudada ele não protegeu totalmente o tRNA, significando que além desta espécie formada ($\cdot\text{OH}$) existem outras espécies presentes, não suprimidas por manitol.

Como foi dito anteriormente (discussão do ítem I, cap.3, pg.101) os estudos com SOD e catalase foram feitos para se analisar a presença de superóxido ânion e H_2O_2 , através da supressão enzimática. Observa-se que no caso da SOD, aniquiladora do superóxido ânion, o efeito se dá inespecificamente através da proteína, pois após a desnaturação, a SOD produz um efeito muito maior de proteção que antes de ser desnaturada.

No caso da catalase, a diferença entre as porcentagens de proteção da enzima nativa e desnaturada, sugere uma ligeira produção de H_2O_2 e também uma inespecífica proteção por proteína.

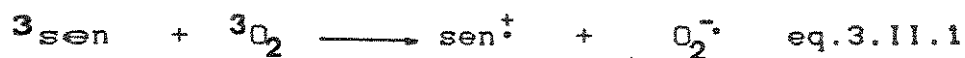
Uma fonte comum de danos celulares frequentemente mediados pela formação de oxigênio singlete, envolve reações fotossensibilizadas. Tais reações podem ocorrer pelos dois tipos mostrados no esquema XV (pg. seguinte).



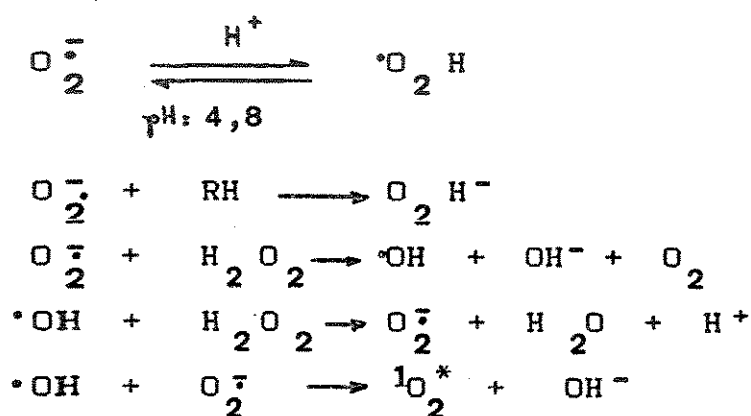
Esquema XV : Mecanismos de formação de espécies ativas de oxigênio. Onde A é o aceitador, sen é o sensibilizador e ISC é o cruzamento entre sistemas.

Como foi mencionado anteriormente (esq.X, cap.1, pg. 55) estes danos celulares podem se dar por : a) ataque fora da célula; b) ataque dentro da célula (citoplasma) e c) ataque dentro da célula (núcleo). No último caso (c) ocorre uma indução de mutação genética (178), e neste caso se enquadra a AL, que se liga ao DNA e tRNA (fato discutido mais adiante).

Os corantes podem participar de processos de transferência de energia, transferência de elétrons e/ou transferência de prótons ou de elétrons. No caso do azul de metileno, por exemplo, é sabido que devido ao seu potencial de ionização ser favorável (214) ele é um bom redutor de oxigênio, participando então de reações de transferência de elétrons (215):



O sensibilizador triplete pode também interagir com um substrato redutor (RH ou R), originando radicais que iniciam uma série de reações. Este processo, embora pouco eficiente em comparação com os processos de transferência de energia e de elétrons para o O_2 , pode levar inclusive à formação de superóxido ânion (216). Uma vez formado o superóxido ânion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), outras espécies ativas poderão se formar, através do ciclo de Harber-Weiss:



Esq. XVI : Ciclo de Harber-Weiss, onde $\cdot\text{OH}$ é o radical hidroxila; ${}^1\text{O}_2^*$ é o oxigênio singlete e $\text{O}_2^{\cdot-}$ é o superóxido ânion.

O oxigênio singlete formado neste processo reage com a 4-TU produzindo uridina (esq. XIV, pg. 103), conforme observado pelos valores da tabela 3.II.2, que mostra os R_f s da cromatografia da 4-TU submetida ao tratamento com o sistema fotossensibilizado. Pelos estudos anteriores (com aniquiladores), sabe-se que,

Tabela 3.11.2 : Valores de R_f de alguns compostos em estudo. As concentrações utilizadas estão descritas no ítem III.1.2.4 (cap.2), pg 78 .

SISTEMA	VALOR DO R_f
Acridina laranja	0,63
4-Tiouridina-5'- monofosfato	0,00
Sulfinas (*)	0,30
Uridina-5'-mono- fosfato	0,17
4-TU/AL/hv/O ₂	0,17; 0,30 e 0,63

(*) valores ao redor de 0,30 (157, 160).

do oxigênio singlete, outras espécies ativas de oxigênio são formadas no processo descrito no esquema XVI. Portanto, estas outras espécies podem estar interagindo não só com a 4-TU, mas com as bases normais. Foi calculado que há aproximadamente uma molécula de 4-TU-monofosfato por 140 nucleotídeos de tRNA (total) de E.coli (79), e no tRNA específico para valina há 0,45 moles de 4-TU/mol de tRNA (217). Com estes dados conclui-se que qualquer alteração na 4-TU pode ser detectada (por C.D., luminescência, etc...), enquanto que as alterações nas outras bases não são muito perceptíveis.

Fazendo-se uma comparação entre os processos de irradiação direta (tab.3.I.1) e fotossensibilização por AL (tab.3.II.1) de tRNA, fica claro que o efeito fotodinâmico (formação de $^1O_2^*$) na irradiação direta a 335nm é mais nítido, onde a 4-TU atua como um sensibilizador em vez de AL. Neste último caso, são também detectadas as espécies ativas de oxigênio. Isto torna difícil a caracterização a espécie que está atuando sobre o tRNA.

A interação entre moléculas pequenas e macromoléculas pode ser observada através de várias técnicas, como por exemplo, cromatografia por filtração em gel, diálise de equilíbrio, filtração em nitrocelulose, e outras.

A fim de se verificar se ocorre qualquer mudança na interação entre tRNA e AL, por irradiação, a mistura foi submetida a uma cromatografia por filtração em Sephadex G-50. A figura

3.II.10 mostra o perfil cromatográfico obtido por filtração em gel de uma mistura de AL e tRNA, sem nenhum tratamento prévio. Nas mesmas condições experimentais, DNA de timo de bezerro também interage com AL (resultado não apresentado). A figura 3.II.11 mostra que não existe uma diferença significativa na formação do complexo tRNA-AL (por filtração em Sephadex G-50) por irradiação prévia da mistura a 470nm por 45 minutos. Utilizando-se outro corante, a eosina Y, a figura 3.II.12 mostra que nas mesmas condições da fig.3.II.11 não ocorre nenhuma interação entre tRNA e eosina, quer irradiando ou não a mistura antes de aplicá-la à coluna Sephadex.

Apesar de ocorrer uma diferença do ponto de vista fotoquímico nas características de uma solução contendo tRNA e AL, com e sem irradiação, o mesmo não foi observado por filtração em gel (figs. 3.II.10 a 3.II.12). Qualquer modificação ocorrida no tRNA, por irradiação a 470nm por 45 minutos, em presença de AL, não foi suficiente para alterar a interação entre aquelas moléculas.

A AL se intercala entre bases de ácidos nucleicos, como mostra a figura 3.II.13. Este dado sobre a intercalação é muito importante, pois a AL é um sensibilizador de oxigênio singlete; então este é formado "in situ", isto é, dentro da estrutura do tRNA.

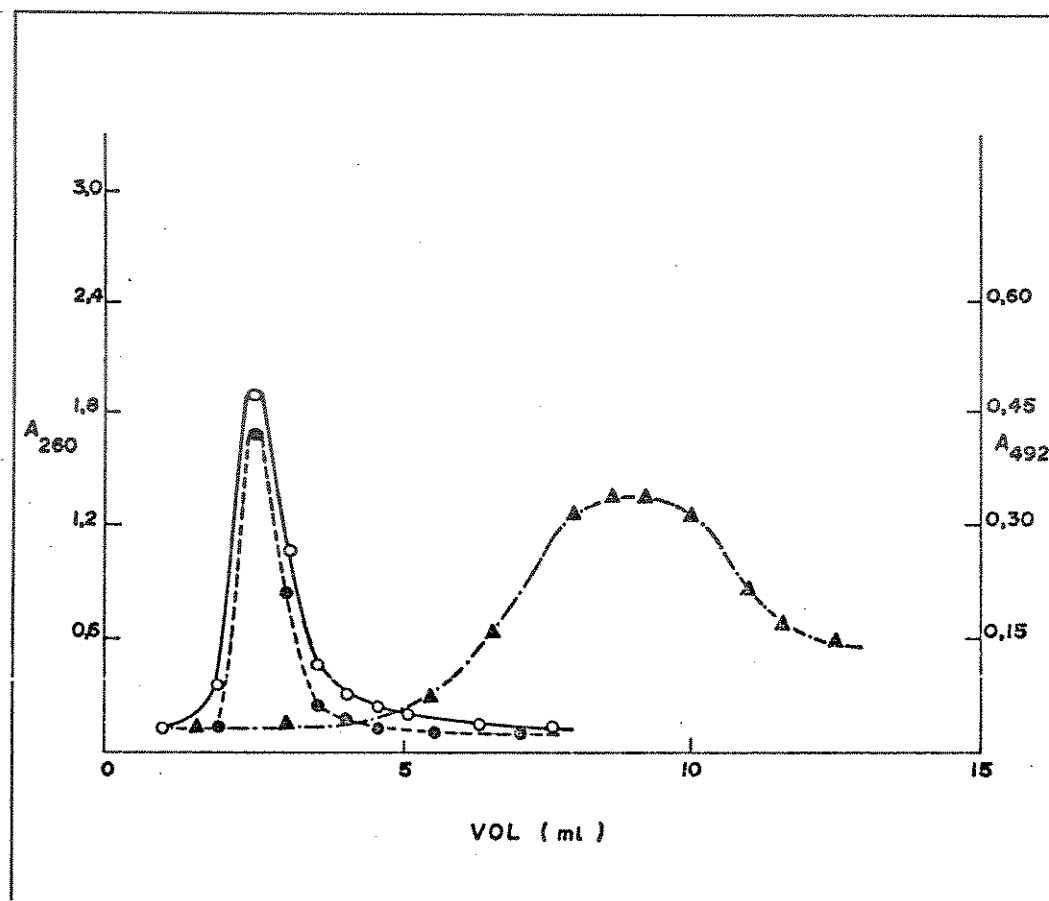


Fig. 3.II.10: Cromatografia por filtração em gel de tRNA e AL. Eluição de uma solução contendo $8\mu\text{M}$ de tRNA (-o-) e $50\mu\text{M}$ de AL (-●-) de uma coluna Sephadex G-50 (cap.2, pg. 78) em $0,05\text{M}$ de tampão tris-HCl, $\text{pH}=7,6$. Eluição, nas mesmas condições, de uma solução $50\mu\text{M}$ de AL (-▲-). A_{260} e A_{492} são as absorções de tRNA e AL, respectivamente.

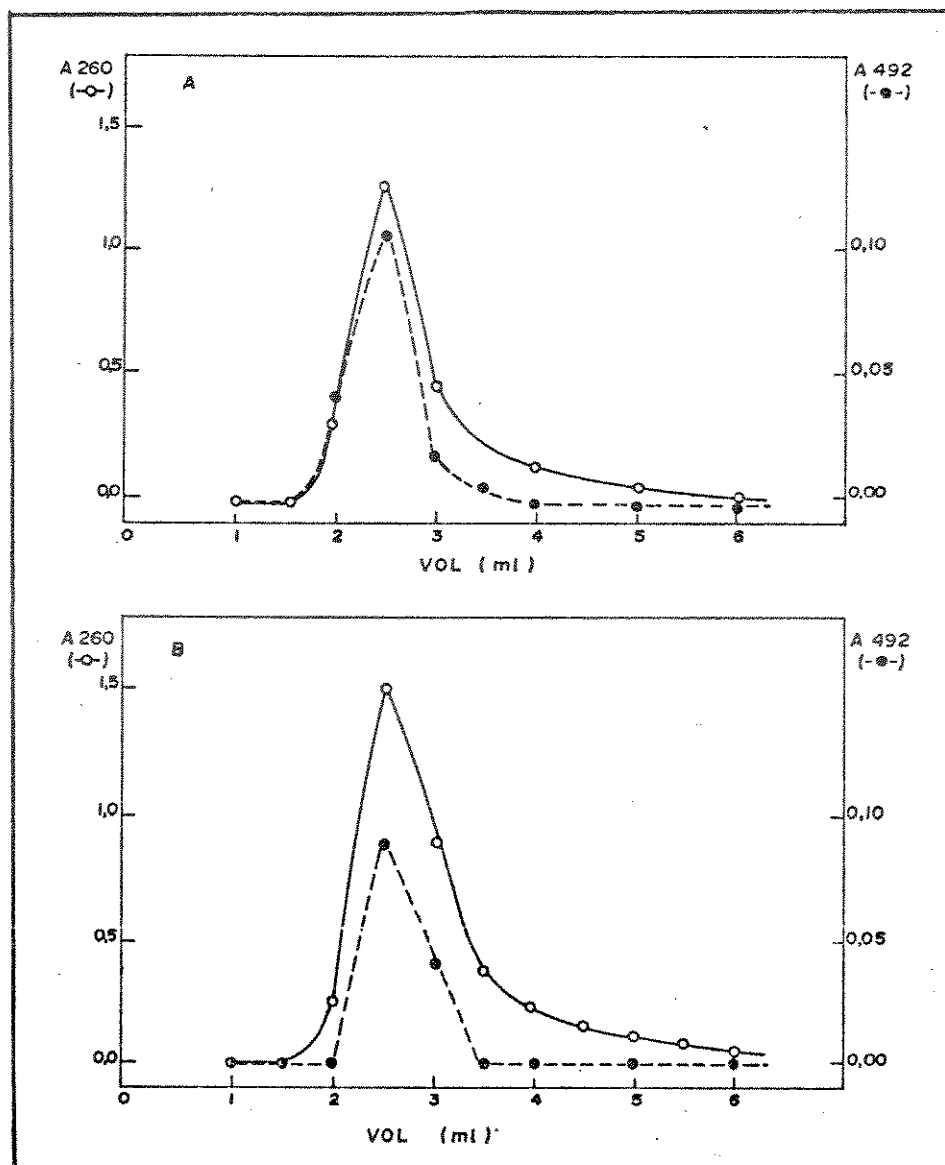


Fig. 3.II.11: Cromatografia por filtração em gel de tRNA e AL. O,5ml de uma solução contendo 8 μ M de tRNA e 50 μ M de AL foi aplicado a uma coluna Sephadex G-50, sem irradiação (A) e após irradiação em 470nm por 45min (B), como descrito em III.1.2.3 (cap.2), pg. 78 . As absorbâncias devido ao tRNA (-o-) e AL (-●-) foram lidas nas frações eluídas. A₂₆₀ e A₄₉₂ são as absorções de tRNA e AL, respectivamente.

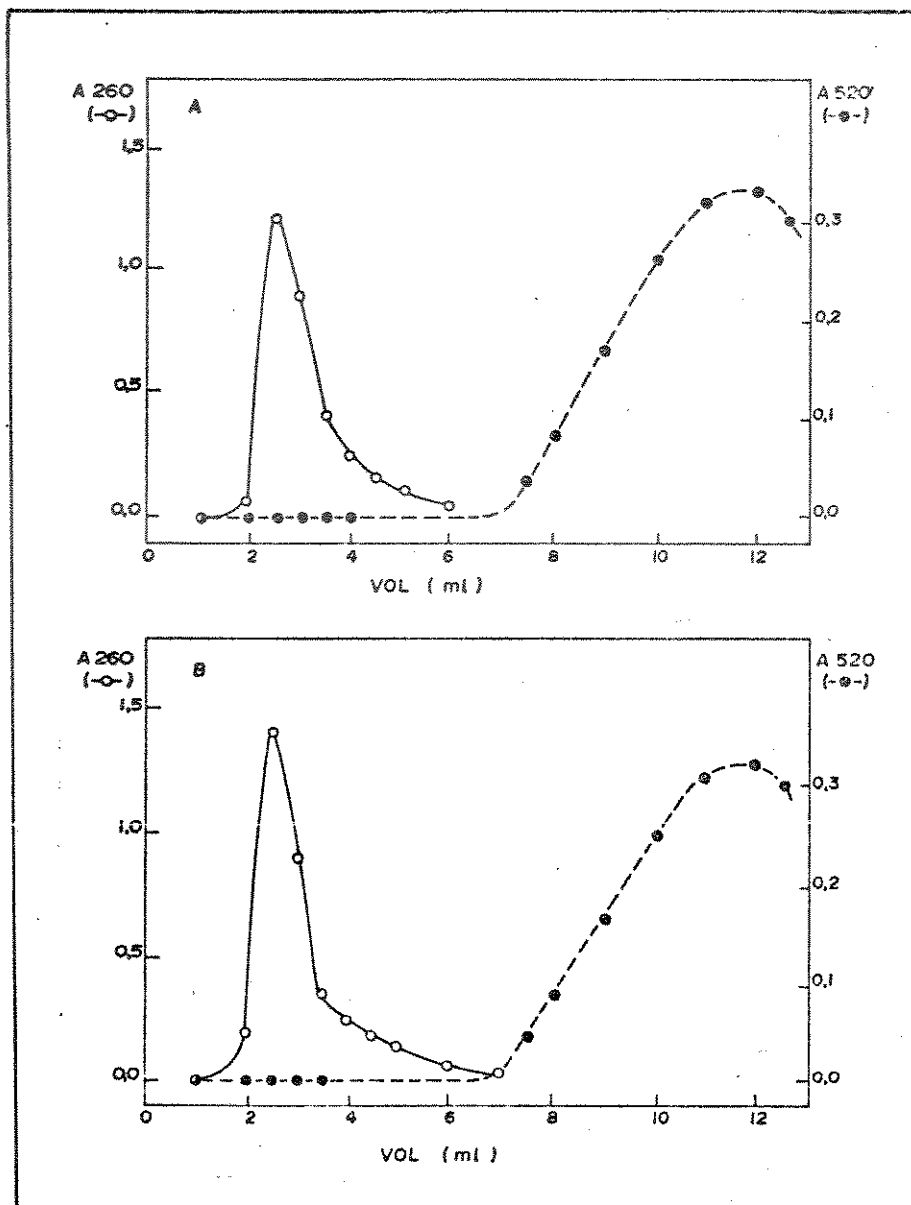


Fig.3.II.12: Cromatografia por filtração em gel de tRNA e eosina Y. Uma solução contendo tRNA (-o-) e eosina Y (-●-) foi aplicada a uma coluna Sephadex G-50, sem irradiação prévia (A), e após irradiação da mistura em 514nm por 45min (B), como descrito no item III.1.2.3 (cap.2) pg. 78. A_{260} e A_{520} são as absorções de tRNA e eosina Y, respectivamente.

Uma vez que não se observa qualquer diferença na intercalação entre tRNA e AL, por filtração em gel, seria interessante verificar se o ácido nucleico continua participando normalmente de outras reações. Após a irradiação, o corante pode ser removido em presença de um solvente orgânico, e o tRNA pode ser testado, por exemplo, quanto à sua capacidade de aminoacilação, em presença de aminoacil-tRNA-sintetases.

O estudo das interações de acridinas com ácidos nucleicos tem sido intensamente pesquisado (218-220). O modelo intercalativo proposto por Lerman (221), segundo o qual a molécula do corante se intercala entre dois pares de bases adjacentes de DNA (fig.3.11.13) e região de dupla fita em tRNA, dá uma idéia da maneira como este corante se situa nestas macromoléculas. Foi descoberto que a intensidade de luminescência de tais corantes pode variar de acordo com a maneira como se ligam, nos ácidos nucleicos. A luminescência de AL, por exemplo, aumenta quando ligada ao DNA, parecendo indicar que exista um só tipo de interação, não havendo portanto sítios supressores de emissão (222-225). Este aumento na luminescência também foi observado nos experimentos aqui relatados, quando a AL está em presença de tRNA. Isto significa que a AL poderia funcionar como uma "sonda" para possíveis alterações em tRNA, devido a esta importante característica.

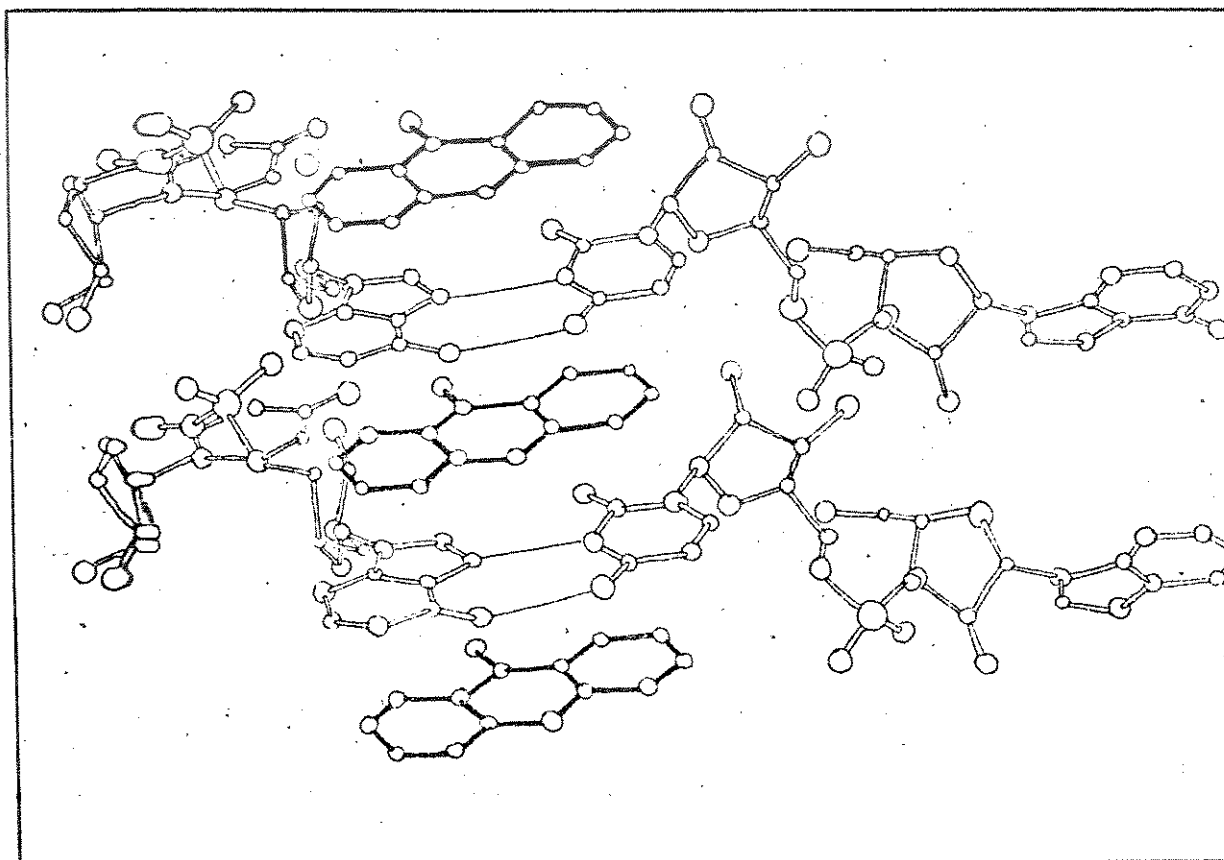


Fig. 3.11.13 : Modo da interação intercalativa de 9-aminoacridina com adenil-3'-5'-uridina. As moléculas de acridina têm suas ligações representadas em negrito (218).

Estudo dos sistemas biofotoenergizados

III. Sistema : MA/HRP/Mn⁺²/O₂

III.1. Com tRNA

Os espectros de absorção, C.D. e fluorescência obtidos deste experimento estão registrados nas figuras 3.III.1 a 3.III.5. Os valores utilizados de concentração estão descritos no item III.2.1.1, pg.79.

III.1.1. Com tRNA e íons Mg⁺²:

A reação foi feita obedecendo-se as mesmas concentrações descritas no item III.2.1.2, pg.79. Foi obtido o espectro C.D., descrito na figura 3.III.6.

III.1.2. Com tRNA e AL

Os espectros C.D. obtidos deste experimento se encontram nas figuras 3.III.7 a 3.III.9. As concentrações utilizadas estão descritas no item III.2.1.3, pg.79.

III.2. Supressão da espécie excitada por tRNA

Para se observar o efeito da supressão por concentrações de tRNA sobre a emissão do sistema, este experimento foi realizado. O K_{SV} foi calculado dos dados obtidos das figuras 3.III.10 e 3.III.11 (vide apêndice em anexo). As concentrações utilizadas estão descritas no ítem III.2.1.4, pg.80.

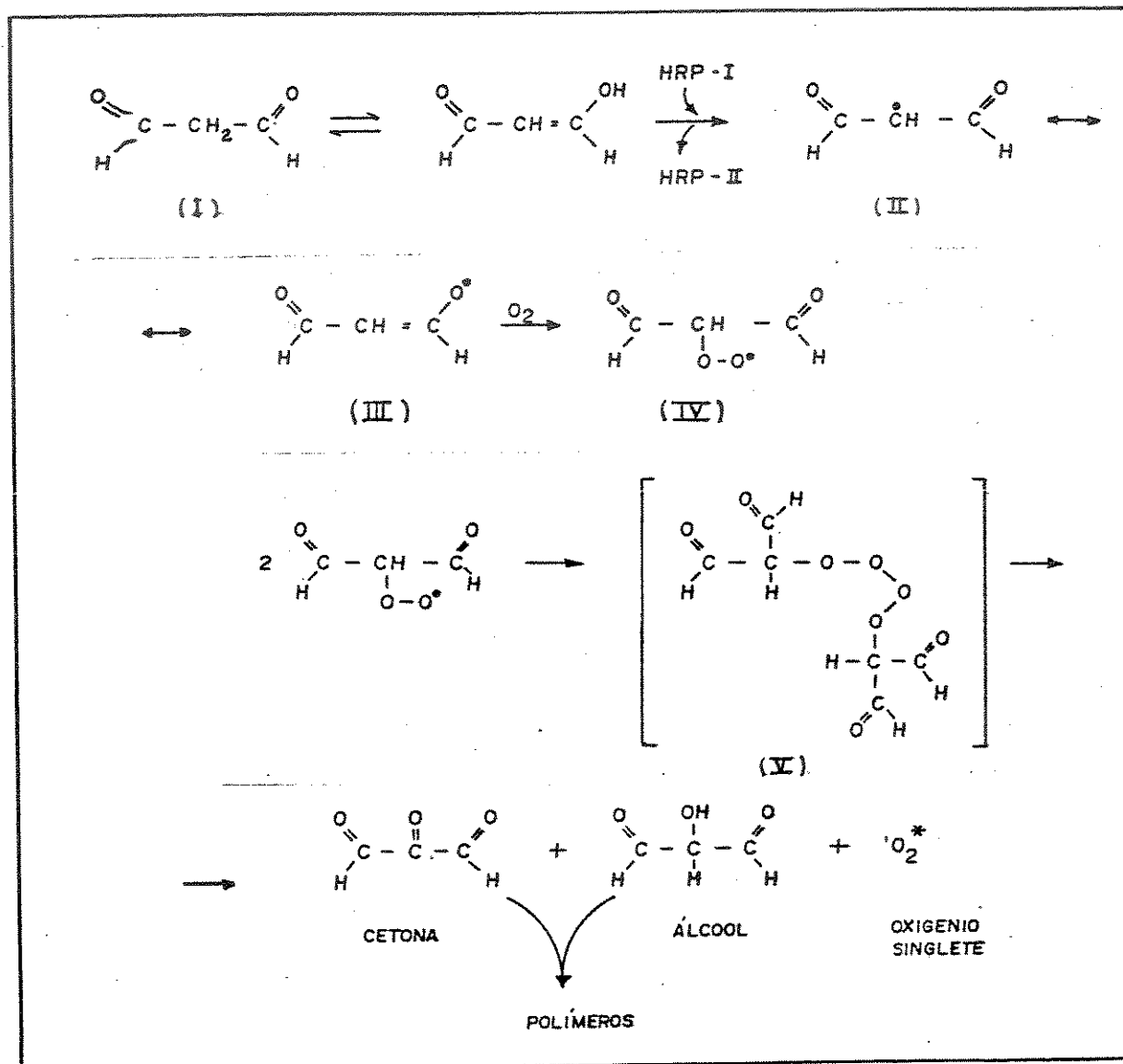
III.3. Com 4-TU

O espectro de absorção obtido com este sistema (concentrações descritas no ítem III.2.1.5, pg. 80) está registrado na fig.3.III.12. Os resultados obtidos na cromatografia e cromatografia preparativa se encontram nas tabelas 3.III.1 e 3.III.2, respectivamente. Os valores de R_f s de alguns compostos de interesse estão na tabela 3.III.3, e os espectros de absorção das manchas 1 e 2 da tabela 3.III.3 estão na fig. 3.III.14.

III.4. Efeito de histidina sobre o sistema

O efeito da supressão por concentrações de histidina (ítem III.2.1.6, pg. 80) foi verificado e os dados obtidos estão nas figuras 3.III.15 e 3.III.16.

O tempo suficiente para que a reação $\text{MA}/\text{HRP}/\text{Mn}^{+2}/\text{O}_2$ se processe com concomitante produção de oxigênio singlete (já verificada pelo estudo de supressores) é de 10 minutos (48). O MA é oxidado pelo HRP, produzindo oxigênio singlete segundo o esquema XVII. Foi verificado o consumo de oxigênio para a concentração de tRNA utilizada. A cinética do processo não é alterada.



Esq. XVII : Formação de $^1\text{O}_2^*$ pela oxidação de MA promovida por HRP. O composto V é degradado segundo o mecanismo de Russell (226).

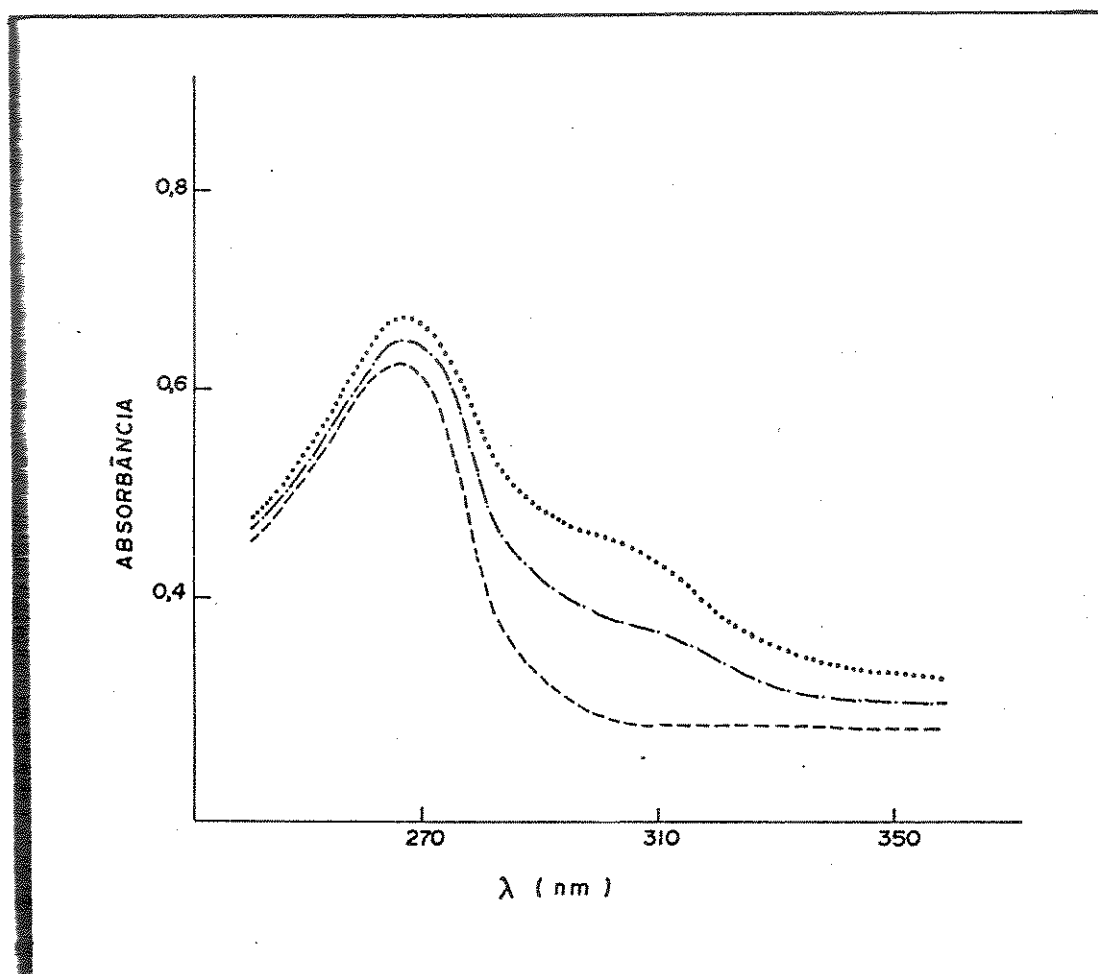


Fig. 3 .III.1 : Espectros de absorção de 24μM de tRNA, onde se observa a banda de 4-TU (λ 310nm).

Legenda: (...) tRNA nativo; (-.-)tRNA/MA;
(---)tRNA tratado com o sistema MA/HRP/Mn⁺⁺/O₂
descrito no item III.2.1.1.

O espectro de absorção que está registrado na fig. 3.III.1 mostra que com o tempo de incubação de 20 minutos há uma degradação da 4-TU ($\lambda_{\text{abs}}=335\text{nm}$) e também ocorre reação das bases normais ($\lambda_{\text{abs}}=260\text{nm}$) com o oxigênio singlete, pois há um decréscimo nos valores de absorbância. O tratamento do tRNA com este sistema foi então realizado a diferentes tempos de incubação para se acompanhar a cinética de alteração da 4-TU no processo. Este resultado é mostrado na fig.3.III.2, onde se observa que a absorbância do tRNA na região de 335nm diminui com o tempo de incubação. Estes dados dão uma boa indicação de que a 4-TU está sendo degradada no processo. As bases normais também sofrem danos no processo, verificados pelos espectros C.D. de tRNA submetido ao tratamento com o sistema enzimático (fig.3.III.3). Entretanto observa-se que na região de absorção da 4-TU (fig.3.III.4), o C.D. aparece muito mais alterado que na região de absorção de 260nm (bases normais) (fig. 3.III.3). Isto significa que a 4-TU é a base mais alterada no processo (como verificado nos estudos anteriores: tRNA/h ν e tRNA/AL/h ν).

Pelos espectros encontrados na fig.3.III.1, quando se tem tRNA/MA, a curva de absorção aparece alterada. Há relatos na literatura de que MA reage com aminoácidos e proteínas (227-228). O produto formado é atribuído à reticulação de aminoácido com malonaldeído, com a formação de uma estrutura amino-iminopreno ($\text{R-N}=\overset{\text{I}}{\text{C}}-\overset{\text{I}}{\text{C}}=\text{N-R}$). Estes produtos têm um pico máximo de emissão de luminescência a 465nm quando excitados a 390nm. Quando a enzima ribonuclease reage com malonaldeído, perde sua atividade rapi-

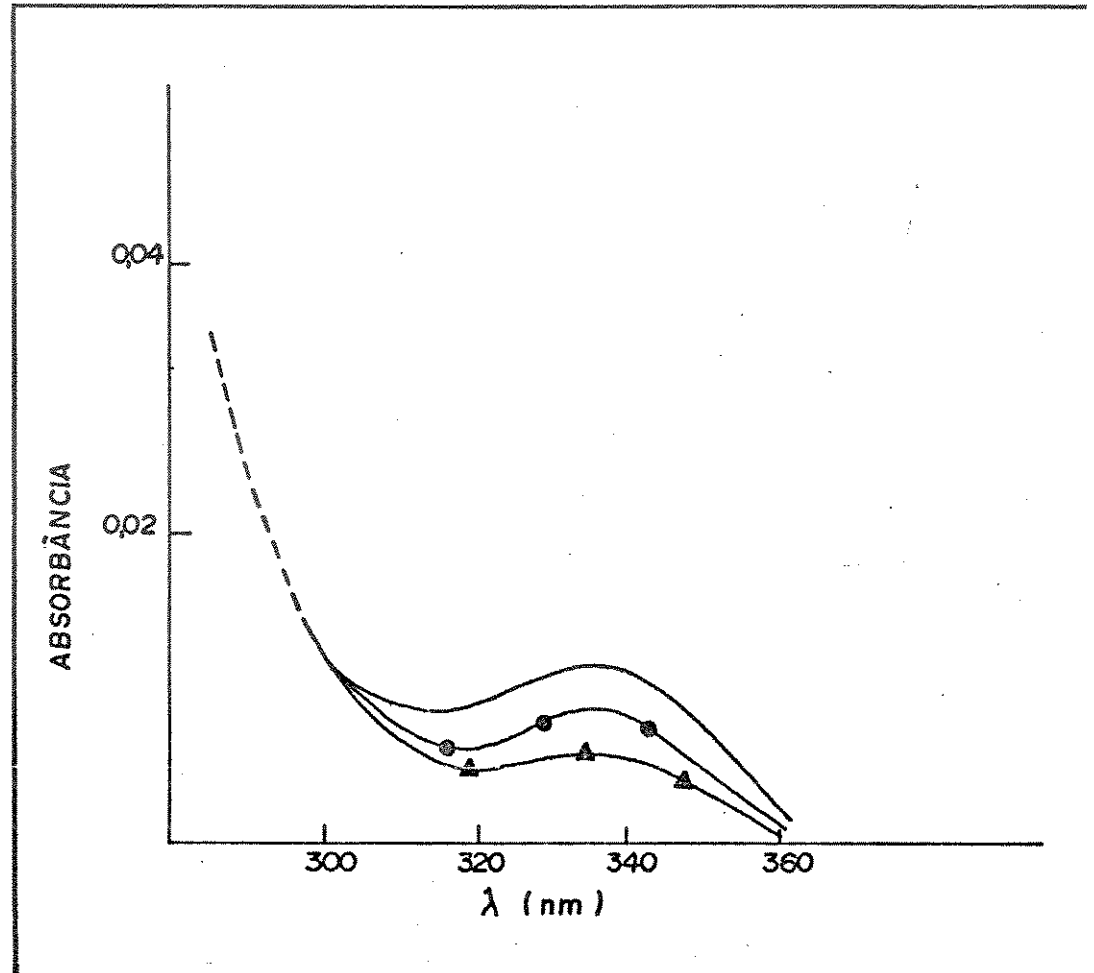


Fig.3. III.2 : Espectros de absorção de $24\mu\text{M}$ de tRNA, em $0,05\text{ M}$ de tampão cacodilato, $\text{pH}=7,0$; com $0,1\text{ M}$ de NaCl e 5mM de MgCl_2 . Legenda: (—) tRNA/tampão acetato; (-●-) tRNA/NA/HRP/ $\text{Mn}^{++}/\text{O}_2$ (tempo de incubação = 5min); (-▲-) idem, tempo de incubação=10min, nas condições padrões de reação (vide concentrações do sistema, III.2.1.1, pg. 79).

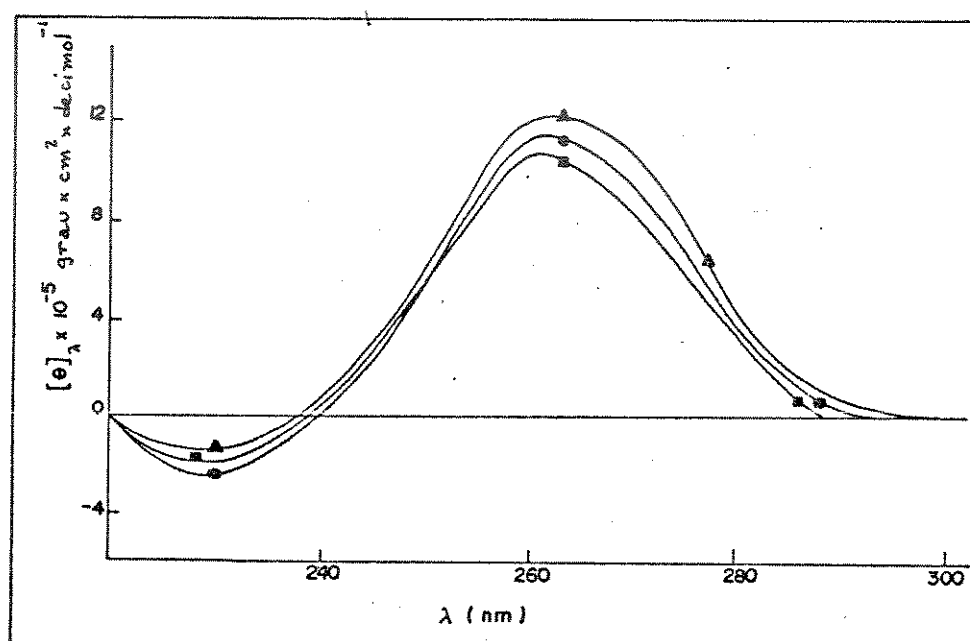


Fig - 3.III.3 : Espectros C.D. de $24\mu\text{M}$ de tRNA submetido tratamento com o sistema enzimático. concentrações estão descritas no item II 2.1.1, pg.79. Legenda: (-▲-) tRNA/tamp acetato, (-●-) tRNA/tampão/MA; (-■-) tRNA/tampão/MA/HRP/ $\text{Mn}^{++}/\text{O}_2$.

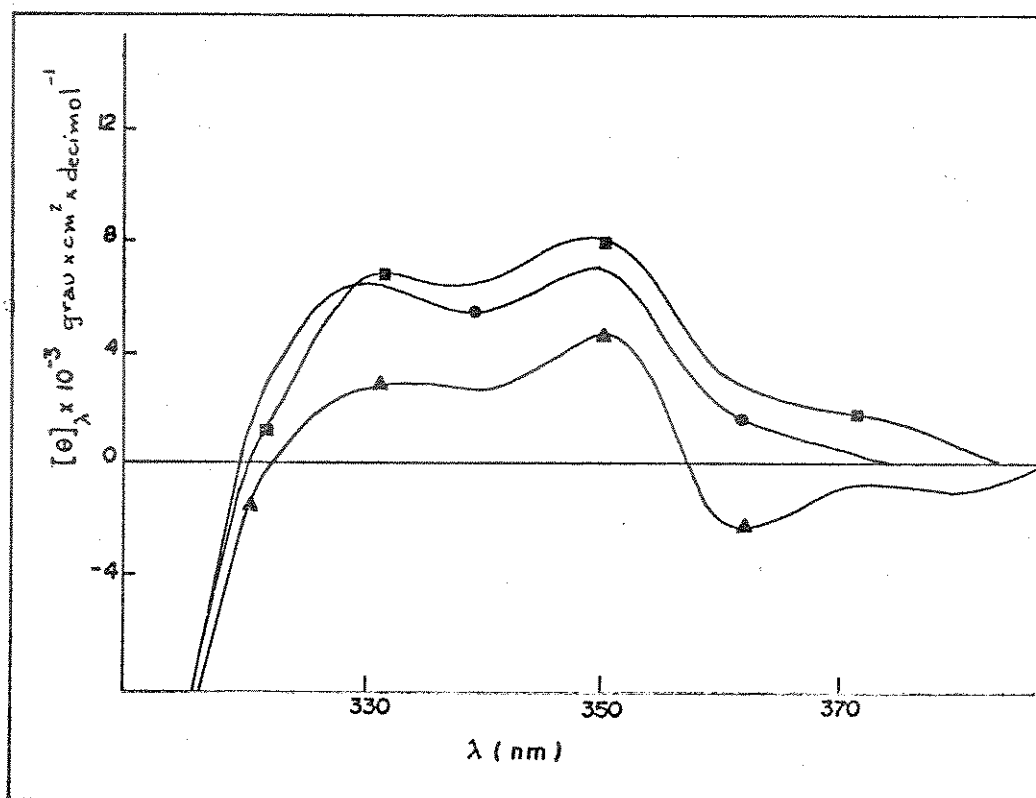


Fig.3. III.4 : Espectros C.D. de tRNA submetido ao tratamento com o sistema enzimático. As concentrações estão descritas no ítem III.2.1.1. O tRNA foi precipitado do meio de reação e ressuspendido em 0,2M de tampão acetato, pH=4,8. Legenda : (-■-) tampão acetato/tRNA; (-●-)tampão/tRNA, MA; (-▲-) tRNA/sistema enzimático.

damente e esta perda de atividade é correlacionada com a formação do produto luminescente (227).

O malonaldeído reage provavelmente por reticulação com guanosina, citidina e em menor escala com adenosina (229). Esta reação de reticulação é chamada de reação de formação de bases de Schiff.

O tRNA possui bases nitrogenadas que podem formar bases de Schiff com malonaldeído. Assim, o tRNA foi incubado com malonaldeído por 20 minutos, precipitado do meio de reação e ressuspendido em tampão cacodilato, pH=7,0. A amostra foi excitada a 390nm e foi obtido um pico de emissão a aproximadamente 460nm, sendo esta uma indicação da formação da base de Schiff. Os resultados são mostrados na fig.3.III.5.

A formação da base de Schiff é uma evidência de que ocorre a reticulação (também observada em DNA (228)), além dos efeitos de oxigênio singlete sobre o tRNA, quando submetido ao tratamento com o sistema biofotoenergizado.

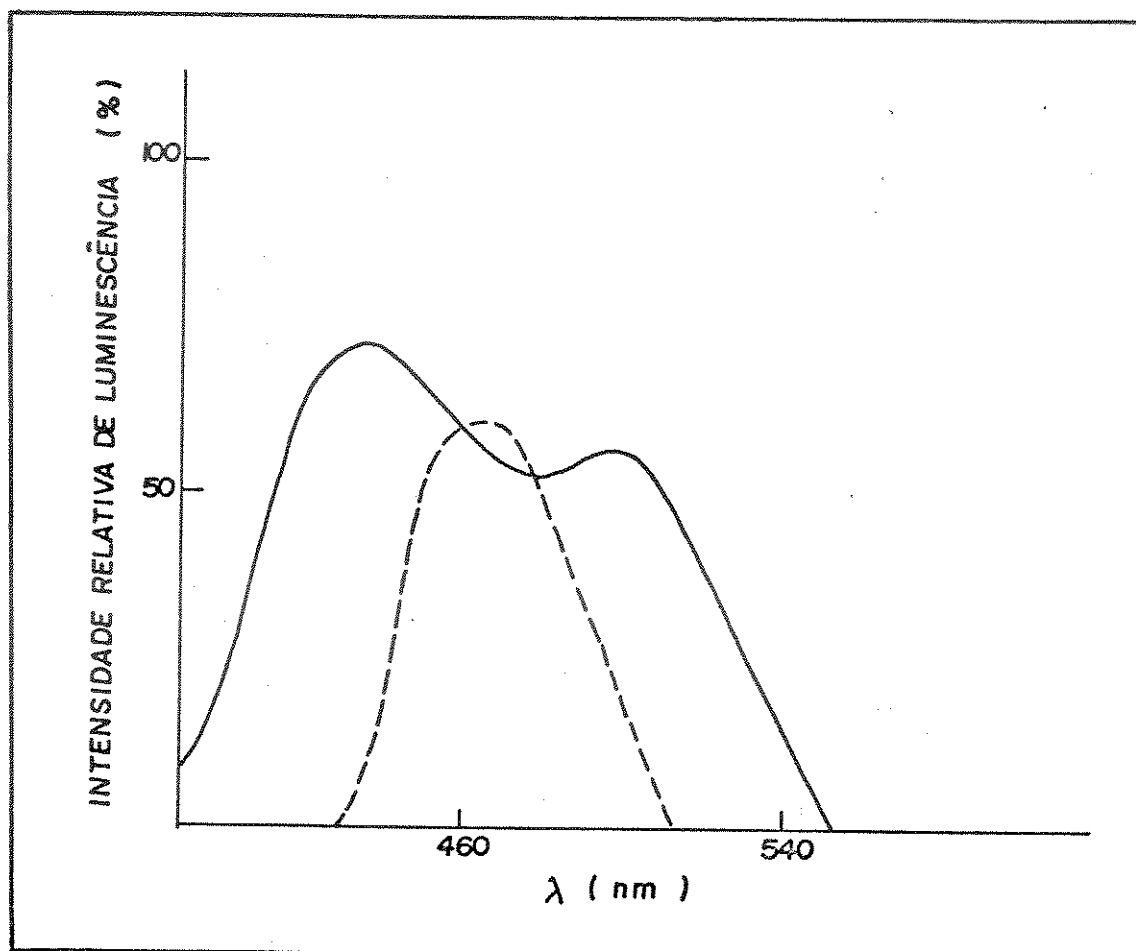


Fig. 3.III.5 : Espectros de luminescência de $40\mu\text{M}$ de tRNA incubado com MA. O tRNA foi precipitado do meio de reação e ressuspendido em $0,05\text{M}$ de tampão cacodilato, $\text{pH}=7,0$. Legenda: (—) tRNA/MA/tampão acetato; t incub.=0min, λ exc=335nm; (---) tRNA/MA/tampão, $t_i=20$ min, λ exc=390nm. O tRNA com $t_i=0$ min não apresenta luminescência quando λ exc=390nm. As concentrações estão descritas no item III.2.1.1. Quando $t_i=20$ min e λ exc=335nm a emissão do tRNA não muda.

Como nos sistemas com luz (irradiações direta e com sensibilizador), a influência dos íons Mg^{+2} no sistema biofotoenergizado, foi verificada. A cinética do consumo de oxigênio não é alterada na presença destes íons. Assim, os resultados obtidos com C.D. estão na fig.3.III.6. Comparando-se este espectro com o da fig.3.III.3, observa-se que os íons Mg^{+2} na concentração de 25 mM oferecem uma certa proteção ao tRNA frente aos ataques do oxigênio singlete. Pode-se verificar, pela fig.3.III.6, que a conformação do tRNA tratado quase não é alterada em comparação com o tRNA nativo, embora esta seja levemente alterada quando o ácido nucleico se encontra em presença de MA, devido ao fato explicado anteriormente (fig.3.III.5). Comparando-se a curva de tRNA/MA/ Mg^{+2} e tRNA/sistema enz./ Mg^{+2} , da fig. 3.III.6, verifica-se uma alteração muito pequena, quase que imperceptível. Talvez, ao se incubar o tRNA com o sistema enzimático na presença de Mg^{+2} , só ocorra o efeito de reticulação.

Ao sistema enzimático descrito anteriormente foi adicionada a AL, para se verificar se ela se liga ao tRNA num processo na ausência de luz. Nesta reação foi verificada que a concentração de AL utilizada não interfere na cinética do consumo de oxigênio.

O sistema enzimático MA/HRP/ Mn^{+2}/O_2 é capaz de gerar oxigênio singlete na ausência de luz (48) (esq.XVII), e este pode provocar alterações em tRNA de tal forma que favoreça a ligação de acridina laranja ao ácido nucleico. Pode também haver uma transferência de energia do oxigênio singlete para o corante, formando radicais que vão se ligar ao tRNA. O complexo é formado

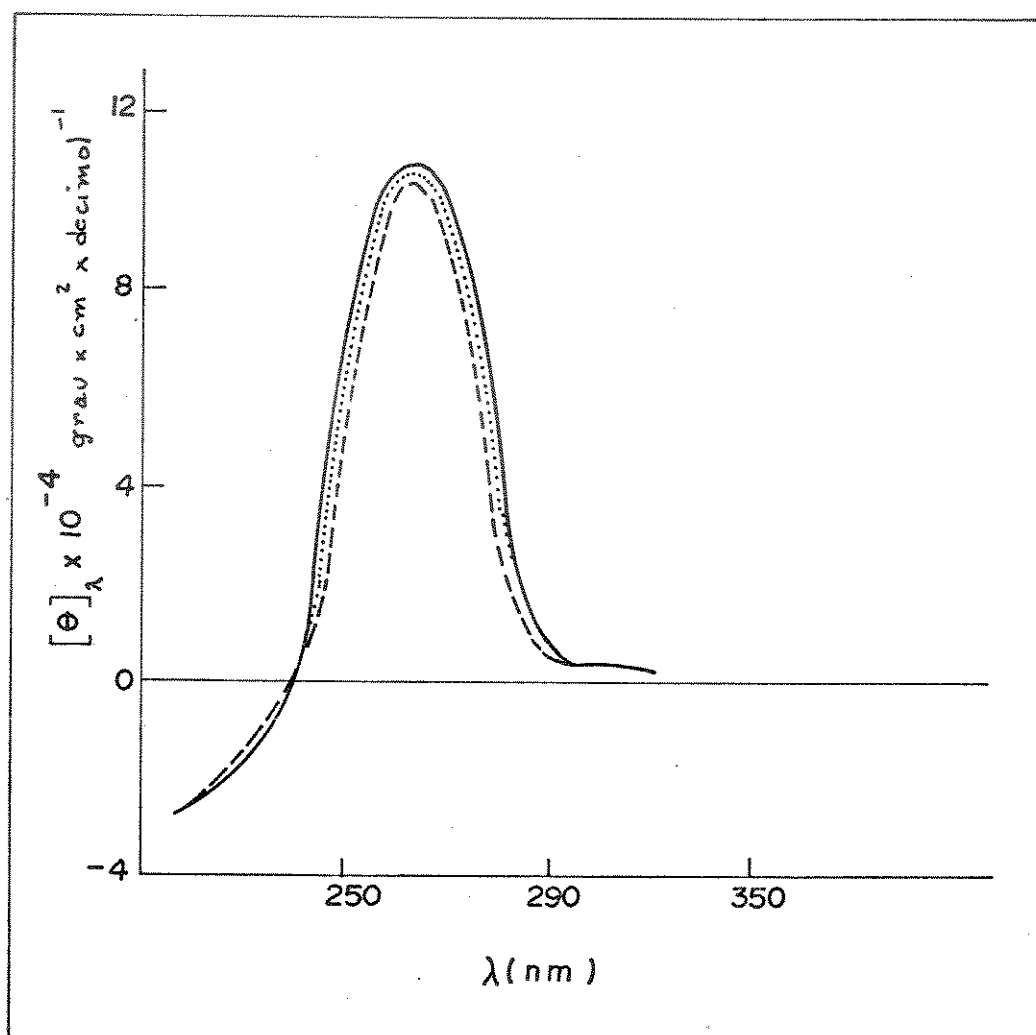


Fig.3. III.6 : Espectros C.D. de $24\mu\text{M}$ de tRNA em água bidestilada, quando tratado nas seguintes condições:
 (—) tRNA/tampão acetato/ Mg^{+2} ; (.....) tRNA/tampão acetato/ Mg^{+2} /MA; (---) tRNA/tampão acetato/ Mg^{+2} , sistema, com 20 minutos de incubação, nas condições descritas no ítem III.2.1.2, pg. 79.

entre tRNA e AL (vide discussão ítem II, pg.124). Este fato discutido acima é observado nas figs. 3.III.7 e 3.III.8 que mostram os espectros C.D. de tRNA submetido ao tratamento com o sistema enzimático e AL. Comparando-se a fig.3.III.3 com a 3.III.7, verifica-se a veracidade dos fatos discutidos acima, uma vez que os espectros C.D. de tRNA tratado com o sistema enzimático e AL são mais alterados (fig.3.III.7) do que os mesmos na ausência de AL (fig.3.III.3), na região de absorção das bases normais, e pode ser que estas bases estejam se ligando à AL. Na região de absorção da 4-TU este efeito não é observado (figs.3.III.4 e 3.III.8).

Um processo análogo de transferência de energia ocorre quando riboflavina se liga à lisozima. A transferência de energia responsável pela formação deste complexo é proveniente da acetona triplete gerada no sistema : 2-Metilpropanal/HRP/O₂ (230). Um processo semelhante pode estar ocorrendo entre tRNA e AL, na presença de luz ou do sistema : MA/HRP/Mn⁺⁺/O₂ .

Comparando-se os efeitos dos sistemas tRNA/AL/hv e tRNA/MA/HRP/Mn⁺⁺/O₂ verifica-se pelos espectros C.D. (fig.3.III.9) que o sistema enzimático com 20 minutos de incubação é cerca de 10% mais efetivo que o sistema fotoquímico com 45 minutos de irradiação. Estes processos no escuro (sistemas enzimáticos produtores de espécies excitadas) são geralmente mais eficientes do que processos fotoquímicos normais.

Uma das maneiras de se estudar a interação de oxigênio singlete com macromoléculas, é analisar a capacidade destas em anular o oxigênio singlete através da supressão da sua fotoemissão. Para isto, pode ser calculado o K_{SV} .

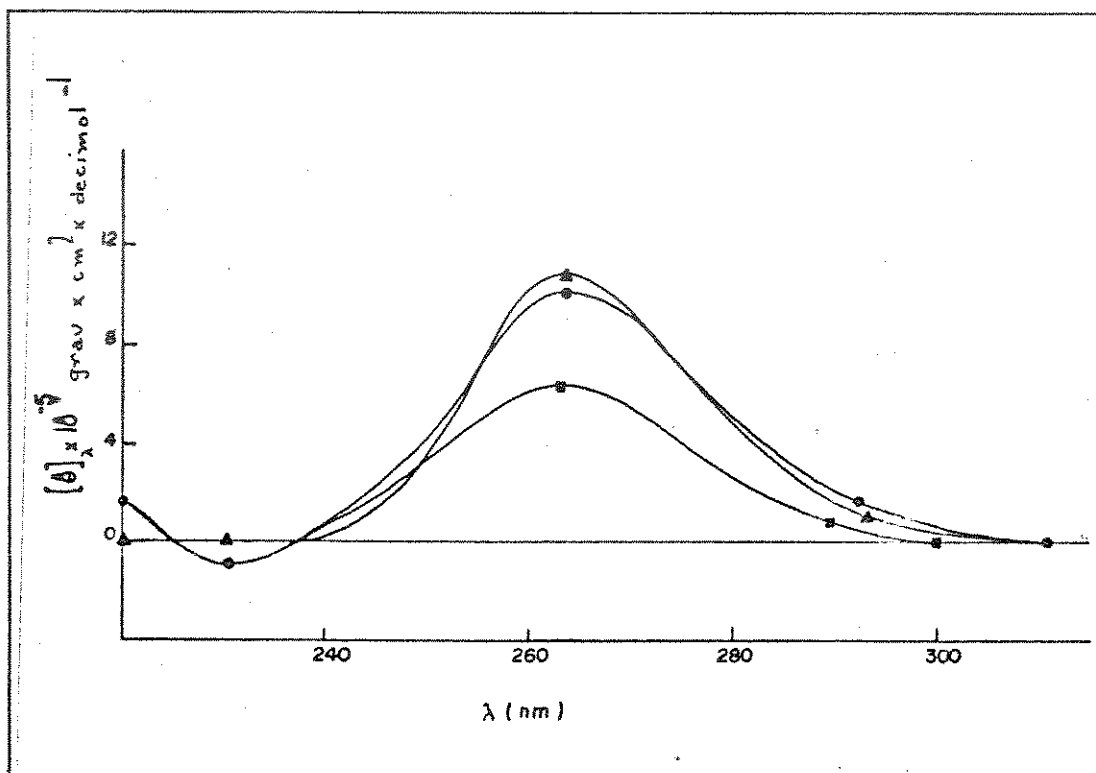


Fig. 3.III.7 : Espectros C.D. de 24 μ M de tRNA submetido a tratamento com o sistema enzimático com AL. As concentrações usadas estão no ítem III.2 1.3, pg. 79. Legenda : (-▲-) tRNA/tampão/AL (-●-) tRNA/tampão/AL/MA; (-■-) tRNA/tampão/MA/HRP/Mn⁺²/O₂/AL. Abs.: bases normais.

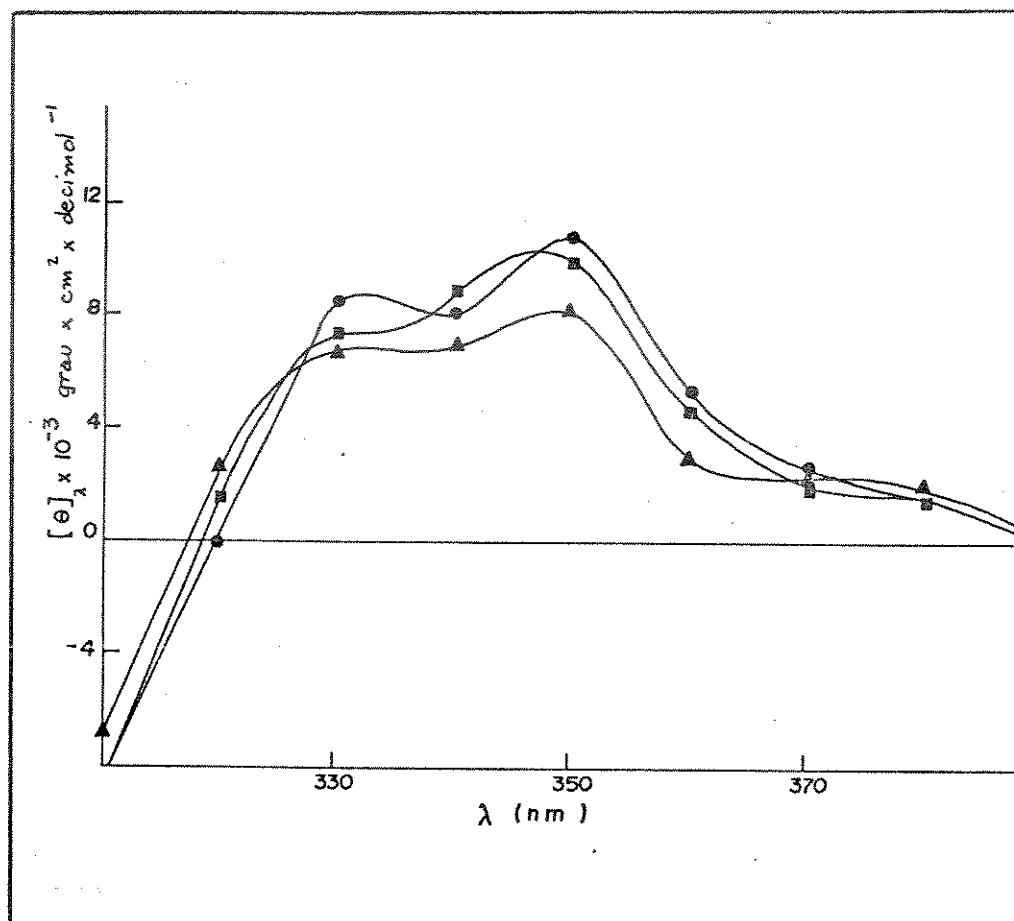


Fig - 3.III.8 : Espectros C.D. de $24\mu\text{M}$ de tRNA submetido tratamento com o sistema enzimático e A Concentrações:vide ítem III.2.1.3, pg.79
 Legenda : (-●-) tRNA/tampão/AL; (-■-) tRNA/tampão/MA/AL; (-▲-) tRNA/tampão/MA/HRP/ O_2 /AL. Este espectro é na região de absorção da 4-TU.

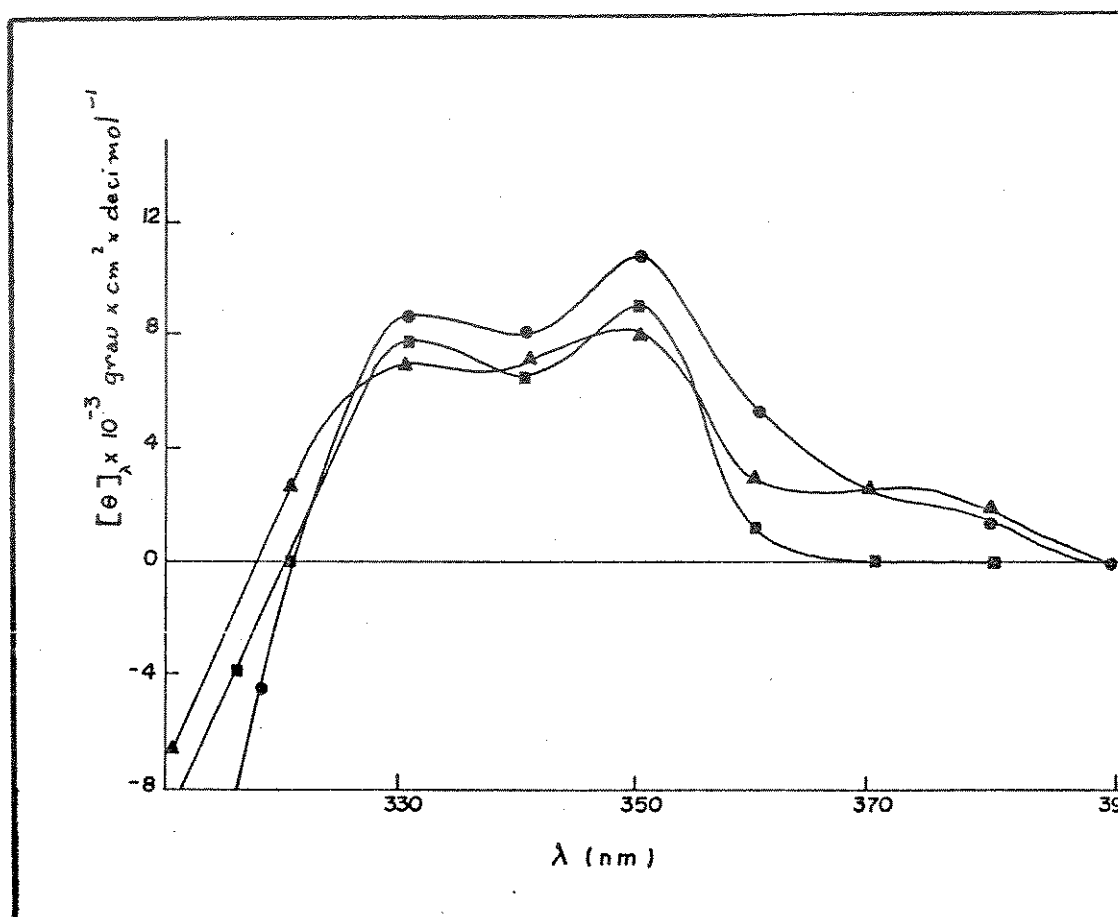


Fig. 3.III.9 : Espectros C.D. de 24 μ M de tRNA submetido a tratamento com os sistemas fotoquímico (Ítem III.1.2.1) e enzimático (III.2.1.3).
 Legenda: (-●-) tRNA/tampão/AL; (-▲-) tRNA/tampão/MA/HRP/Mn²⁺/O₂/AL; (-■-) tRNA/AL/irrad. (t irrad.=45min)(t incubação = 20 min).

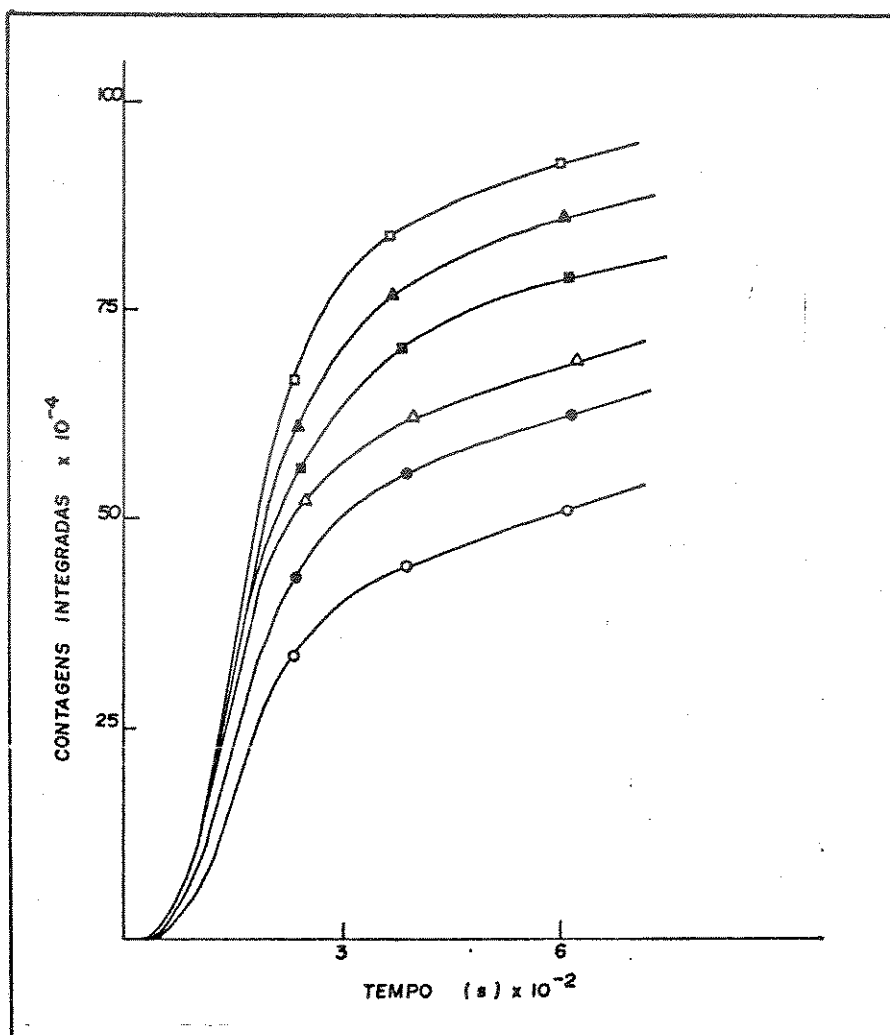


Fig. 3. III.10: Gráfico do efeito de supressão por concentrações de tRNA sobre a emissão do sistema: MA/HRF Mn^{+2}/O_2 , em tampão acetato à temperatura ambiente. A curva (-□-) é o controle; e (-▲-) 5μ, (-■-) 7,5μM, (-△-) 10μM; (-●-) 15μM e (-○-) 20μM de tRNA. As concentrações estão no ítem III.2.1 4, pg.80 .

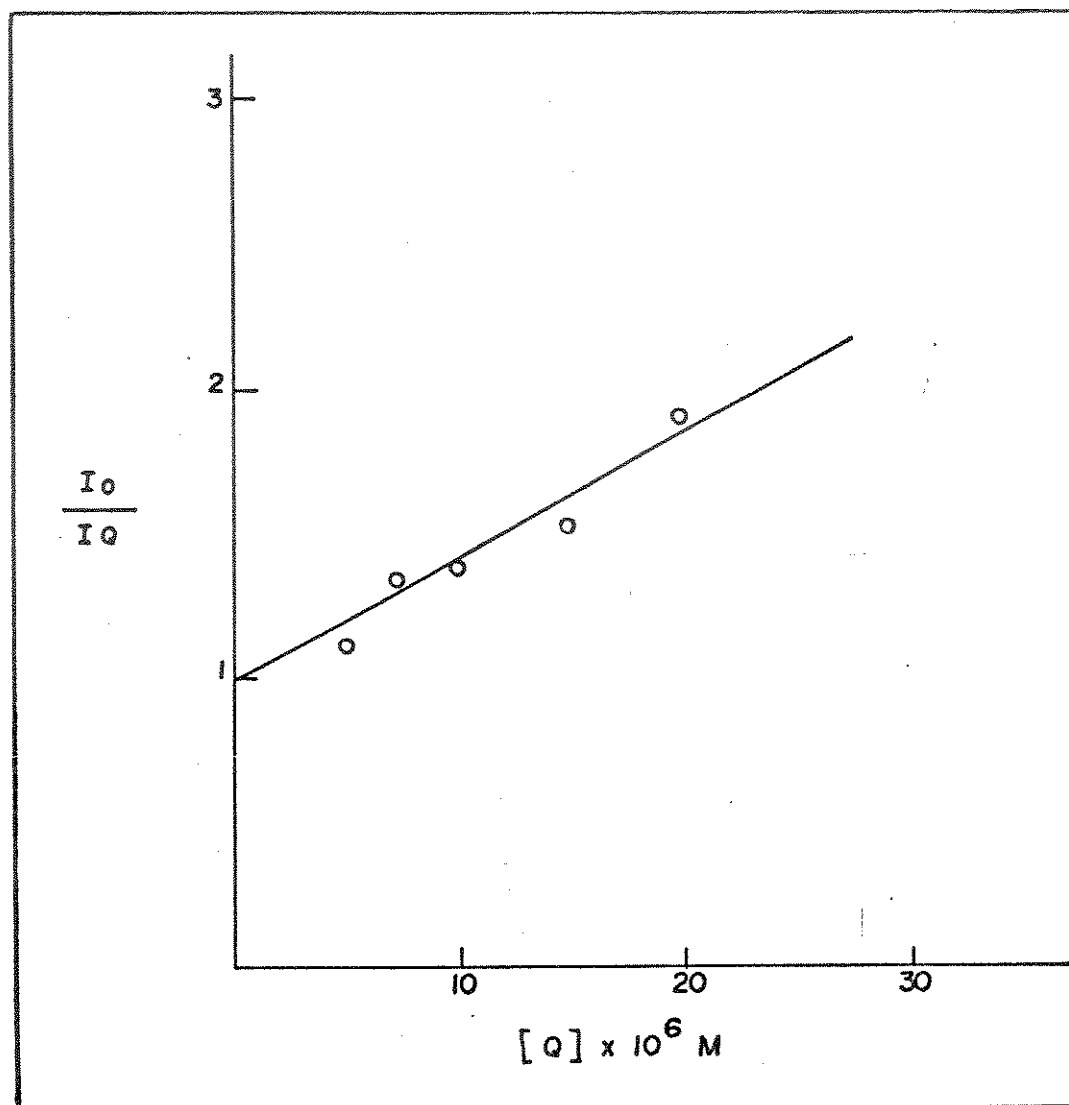


Fig.3. III.11: Gráfico de Stern-Volmer para o efeito da supressão por tRNA sobre o sistema:MA/HRP/Mn⁺⁺/C em tampão acetato. [Q] é a concentração do supressor, no caso, tRNA. As concentrações utilizadas estão descritas no ítem III.2.1.4 pg. 80, e os experimentos feitos em duplicata.

Para o cálculo do K_{sv} (vide apêndice a seguir) foi verificado o consumo de oxigênio na reação com tRNA. Até 25 μ M de tRNA a cinética do consumo de oxigênio não é alterada. Acima desta concentração já está ocorrendo outro tipo de interação, de tal forma que o consumo de oxigênio é inibido (resultados não mostrados).

Foram obtidas as contagens de fótons para as diferentes concentrações de tRNA no sistema biofotoenergizado. As concentrações utilizadas suprimem a emissão do sistema gradativamente. A figura 3.III.10 mostra este efeito. Com estes dados, foi construído o gráfico de $I_0/I_q \times [Q]$ (Stern-Volmer), onde Q é o supressor utilizado (tRNA) (fig.3.III.11). O valor do K_{sv} obtido foi de $1,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (vide apêndice III).

A figura 3.III.12 descreve os espectros de absorção de 4-TU tratada com o sistema enzimático. Estes espectros de absorção mostram que houve pouca alteração na absorção da 4-TU, o mesmo não ocorrendo quando ela se encontra na estrutura do tRNA (fig. 3.III.13) cuja absorção característica a 335nm desaparece com o tratamento com o sistema biofotoenergizado. Isto se deve, talvez, a que a 4-TU esteja numa posição mais favorável aos ataques do $^1O_2^*$ quando ligada ao tRNA do que quando livre.

Vários autores (231) estudaram e afirmam que a eficiência da reação de oxigênio singlete com olefinas depende da geometria adequada da aproximação dos reagentes. Por exemplo, Inagaki e col. (232, 233) sugeriram que dependendo da estrutura das moléculas envolvidas, há a formação de um peróxido :

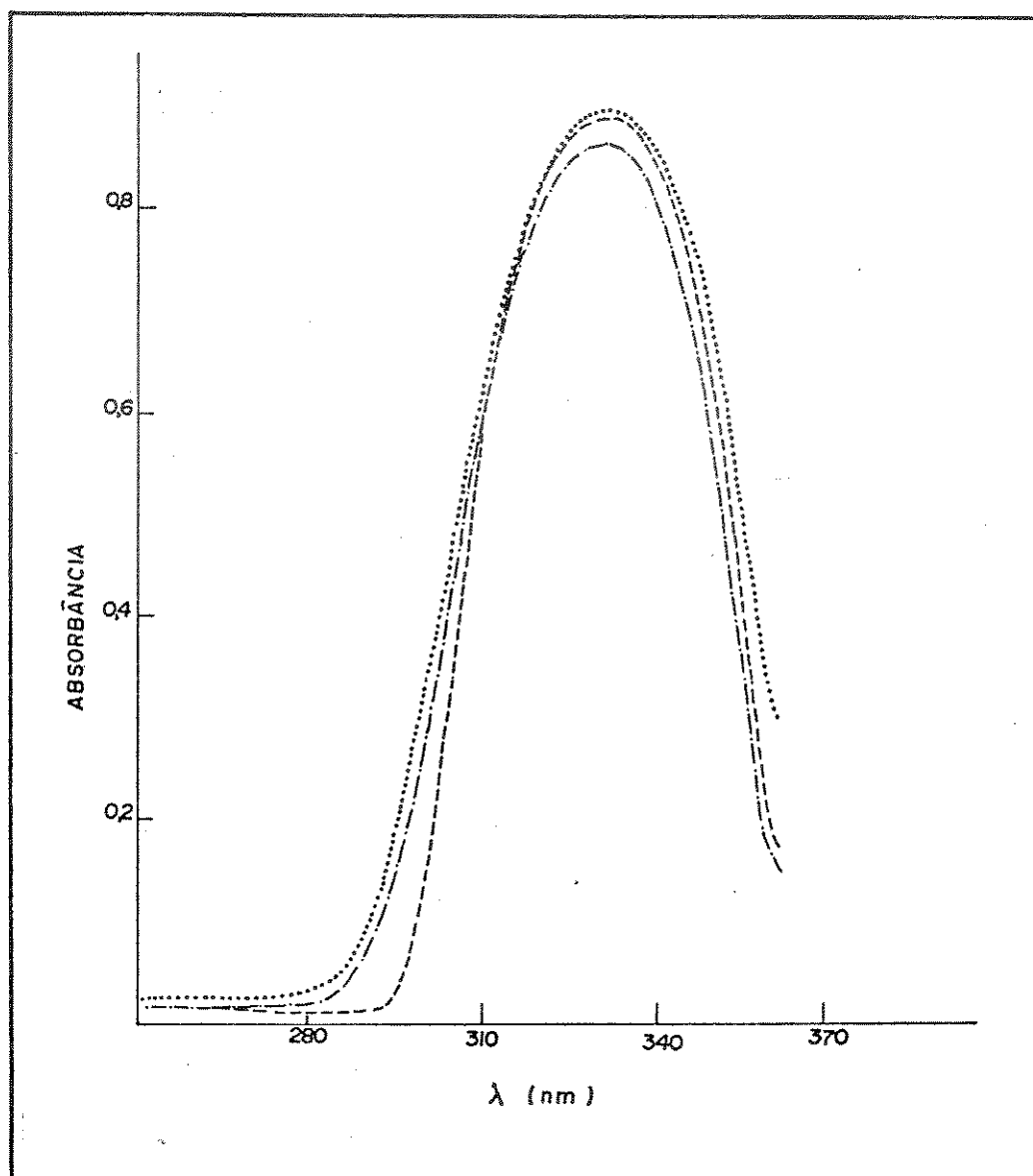
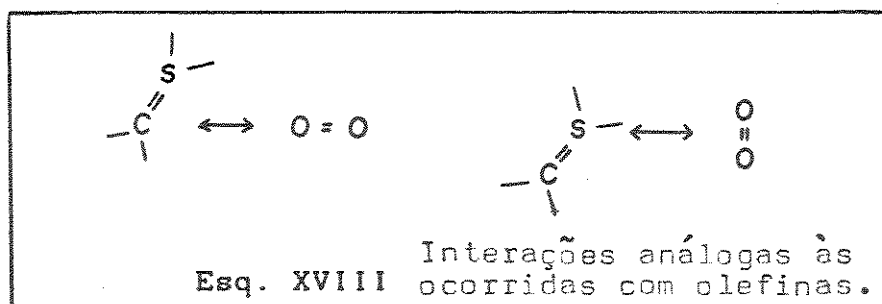


Fig. 3. ■ II.12: Espectros de absorção de 200µg/ml de 4-TU. Onde (---) 4-TU em tampão acetato; (...) 4-TU/tp/MA; (- · -) 4-TU/tp/MA/HRP/Mn⁺⁺/O₂. As concentrações utilizadas estão descritas no ítem III.2.1.5, Pg. 80 (tp = tampão, e t incubação = 20min).



Portanto, deve ser ressaltado que a geometria das moléculas que participam da reação é muito importante, e não somente o fato de haver maior probabilidade de colisão de 4-TU livre com oxigênio singlete do que quando esta se encontra fixa na estrutura do tRNA. Estes fatores descritos anteriormente explicam o porquê da 4-TU ligada ao tRNA reagir mais facilmente com oxigênio singlete do que quando se encontra livre, pois no tRNA ela deve exibir uma geometria favorável a uma reação mais eficiente.

A tabela 3.III.1 descreve os valores de R_f e comprimentos de onda de alguns compostos de interesse e a tab.3.III.2 os valores de R_f e comprimentos de onda das respectivas manchas da 4-TU tratada com o sistema enzimático. Analisando-se minuciosamente estas tabelas e comparando-as com a tabela 3.III.3 que dá os valores de R_f e comprimentos de onda máximos de absorção dos compostos extraídos das placas de cromatografia preparativa, conclui-se que : ao se incubar a 4-TU com MA/HRP/ Mn^{+2} / O_2 , aparece uma mancha na cromatografia com R_f ao redor de 0,16 (supostamente uridina). Esta mancha não foi possível de ser analisada por U.V., devido à pequena concentração do produto. Uma vez adicionado HRP ao sistema enzimático, se produz um aumento de rápido de emissão (acúmulo de espécies excitadas) nos três primei-

Tab. 3.III.1 : Valores de R_f e comprimentos de onda máximos de absorção de alguns compostos de interesse.

Composto	R_f	$\lambda_{\text{máx}}$ de absorção (nm)
4-TU	0,0	315, \approx 260
MA	0,4 a 0,6	\approx 270
Ur	0,16	264, 209
Sulfinas*	0,26 a 0,31	336 a 263

Abreviações : 4-TU: 4-Tiouridina; MA: malonaldeído;

Ur: uridina. * (161).

Tab. 3.III.2 : Valores de R_f e comprimentos de onda máximos de absorção de compostos extraídos das placas de cromatografia. As concentrações utilizadas estão descritas no item III.2.1.5, pg. 80.

SISTEMA	R_f	λ (nm)* máx.	ATRIBUIÇÕES
4-TU/MA	0,0	315, 271	4-Tiouridina
	0,41	271	Malonaldeído
	0,0	317, 271	4-Tiouridina
4-TU/MA/	0,16	-	
HRP/Mn ⁺⁺ /O ₂	0,26	-	
	0,41	271	Malonaldeído
	0,0	315, 269	4-Tiouridina
4-TU/MA/	0,16	260	Uridina
HRP/Mn ⁺⁺ /O ₂	0,26	280	Sulfina
recarregado	0,41 a		
com HRP	0,66	270	Malonaldeído
	0,0	320, 270	4-Tiouridina
Sistema an-	0,16	260	Uridina
terior re-	0,26	280	Sulfina
carregado	0,40 a		
com MA	0,66	271	Malonaldeído

* Valores aproximados.

Tab. 3.III.3 : Valores de R_f e comprimentos de onda máximos de absorção de compostos extraídos das placas de cromatografia preparativa. As concentrações utilizadas estão descritas no ítem III.2.1.5, pg. 80.

Nº da MANCHA	R_f	λ (nm) máx.	ATRIBUIÇÃO
1	0,16	258	Uridina
2	0,25	264	Sulfina
3	0,49	272	Malonaldeído
4	0,73	265	?

ros minutos e logo um decaimento também rápido desta emissão até chegar a um platô estacionário de produção de estados excitados. Tem sido mostrado em vários sistemas biológicos (234) que na fase que se tem acúmulo de espécies excitadas a eficiência de transferência de energia é maior que na fase estacionária. Logo, recarregando-se o sistema, trata-se o alvo biológico duas vezes ou mais, com a espécie excitada, para se observar nitidamente os resultados obtidos por efeito somatório. Assim, quando o sistema é recarregado, torna-se possível a caracterização das manchas por U.V., sendo que para a de $R_f \approx 0,16$ obtém-se um pico ao redor de 280nm. Por se trabalhar com uma quantidade muito pequena de produto, foi preciso obter os espectros na faixa de 0,0 - 0,1 de absorvância, o que dificulta o cálculo do comprimento de onda máximo de absorção pois as curvas não são muito definidas. O composto de $R_f = 0,26$ tem uma absorção máxima a ≈ 280 nm, que poderia ser uma sulfina. Alguns valores de absorção de sulfinas são dados na tabela 3.III.4. Embora esta tabela indique para sulfinas aromáticas um comprimento de onda máximo de absorção ao redor de 270 nm não se tem antecedentes para se afirmar que o composto com $R_f = 0,26$ seja a sulfina esperada da 4-TU. Além disso, existe a possibilidade de haver formação do ácido sulfínico derivado da 4-TU, que, em alguns casos ^{relatados na} literatura, têm sido encontrados neste tipo de reação. Portanto, parece lógico não fixar a estrutura da sulfina obtida neste sistema. Ainda vale ressaltar que o espectro de absorção da sulfina da 4-TU não é conhecido, pois não se pode precisar se ela é estável ou não, ou se na mancha da cromatografia se observa um produto de decomposição da referida sulfina.

daí o valor do comprimento de onda máximo de absorção não ser igual a nenhum da tabela 3.III.4.

Tabela 3.III.4 : Características espectrais de S-óxidos (161).

S-óxido (sulfina)	UV (CHCl ₃)	$\lambda_{\text{máx}}$, nm (ϵ)
*p-clorotio benzofenona-S-óxido (a) [1]		
*p,p'-diclorotio benzofenona-S-óxido [2]	269 (15 500),	336 (14 500)
*tio pivalofenona-S-óxido [3]	265 (6 900),	308 (SH, 2 050)
*p-metoxitio pivalofenona-S-óxido [4]	263 (6 100),	306 (SH, 2 500)
*tio cânfora-S-óxido [5]	270 (5 150),	310 (SH, 500)
*tio canfenilona-S-óxido [6]	273 (5 700),	315 (SH, 600)
* (3,3-dimetil) tio cânfora S-óxido [7]	270 (5 100),	310 (SH, 550)

(a) instável para análise elementar.

Os S-óxidos [1] a [7] são derivados das estruturas dadas a seguir.

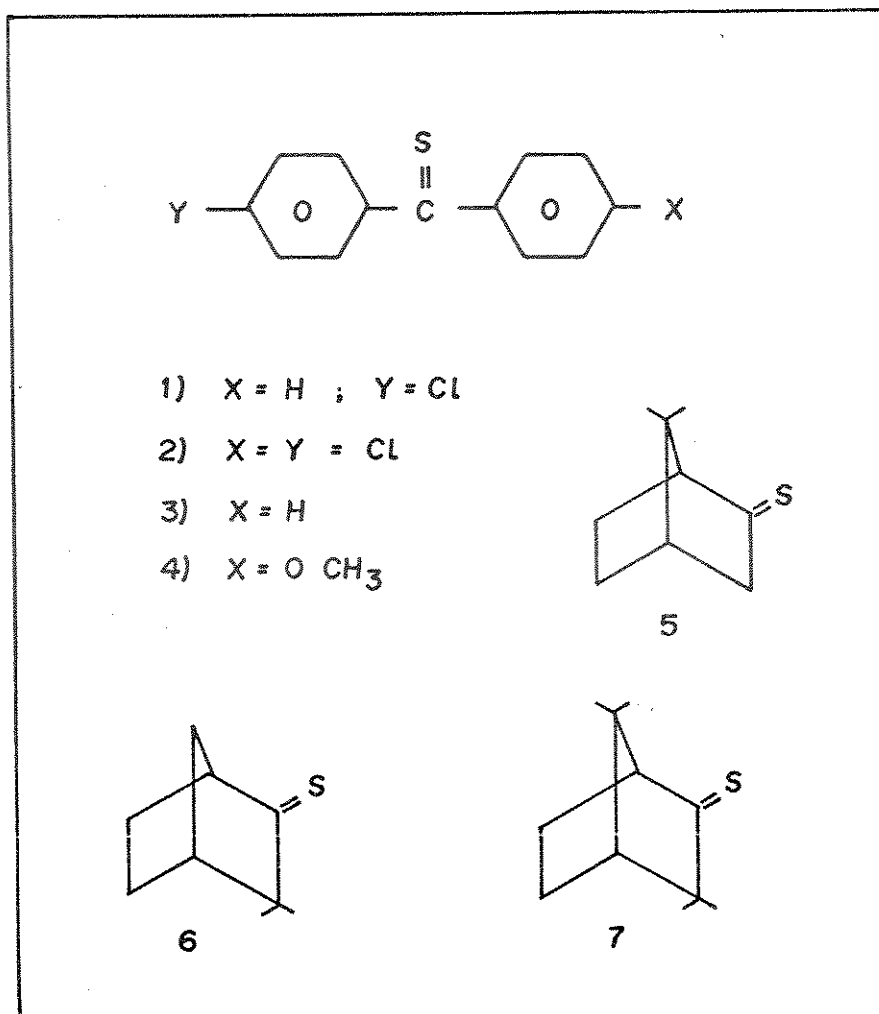


Fig.3.III.13 : Os S-óxidos da tab.3.III.4 são derivados das estruturas acima [1 a 7].

Comparando-se os valores de R_f s contidos na tabela 3.III.3 com os encontrados na tab.3.II.2, pg.122, verifica-se que a 4-TU é transformada em uridina, tanto fotoquímica como enzimaticamente. O mecanismo de degradação da 4-TU por oxigênio single te produzindo uridina está no esquema XIV, pg.103.

Para se ter certeza de que o composto de R_f ao redor d 0,16 é de fato uridina, foi feita uma cromatografia preparativa onde, ao se utilizar quantidades maiores dos compostos de parti

da, a detecção é melhor. Verifica-se pela tabela 3.III.3 que os valores de comprimento de onda máximo de absorção são próximos aos da tabela 3.III.2, para este sistema enzimático. Pela fig. 3.III.14 pode se ver os espectros de absorção das manchas 1 e 2 correspondentes à uridina e supostamente sulfina, que foram encontradas como produto de reação de tRNA, com o sistema enzimático. Estes espectros da fig.3.III.14 somados aos obtidos em luminescência, C.D. e cromatografia, indicam que de fato a 4-TU reage com o oxigênio singlete, produzindo uridina.

Como foi dito anteriormente (item II, pg.102) a histidina é um supressor de oxigênio singlete. Para esta reação enzimática, diferentes concentrações de histidina foram testadas na cinética do consumo de oxigênio e para os valores de concentração de histidina utilizados a cinética da reação não é alterada. Com isso, foi obtido o gráfico de contagens integradas da emissão de luminescência proveniente da reação enzimática, com diferentes concentrações de histidina, que é mostrado na fig.3.III.15. O gráfico de Stern-Volmer da fig.3.III.16 foi utilizado no cálculo de K_{SV} (vide apêndice).

Portanto, no sistema enzimático há a produção de oxigênio singlete que reage preferencialmente com 4-TU, muito mais eficientemente (menor tempo de reação) do que os sistemas fotoquímicos que também produzem oxigênio singlete no processo.

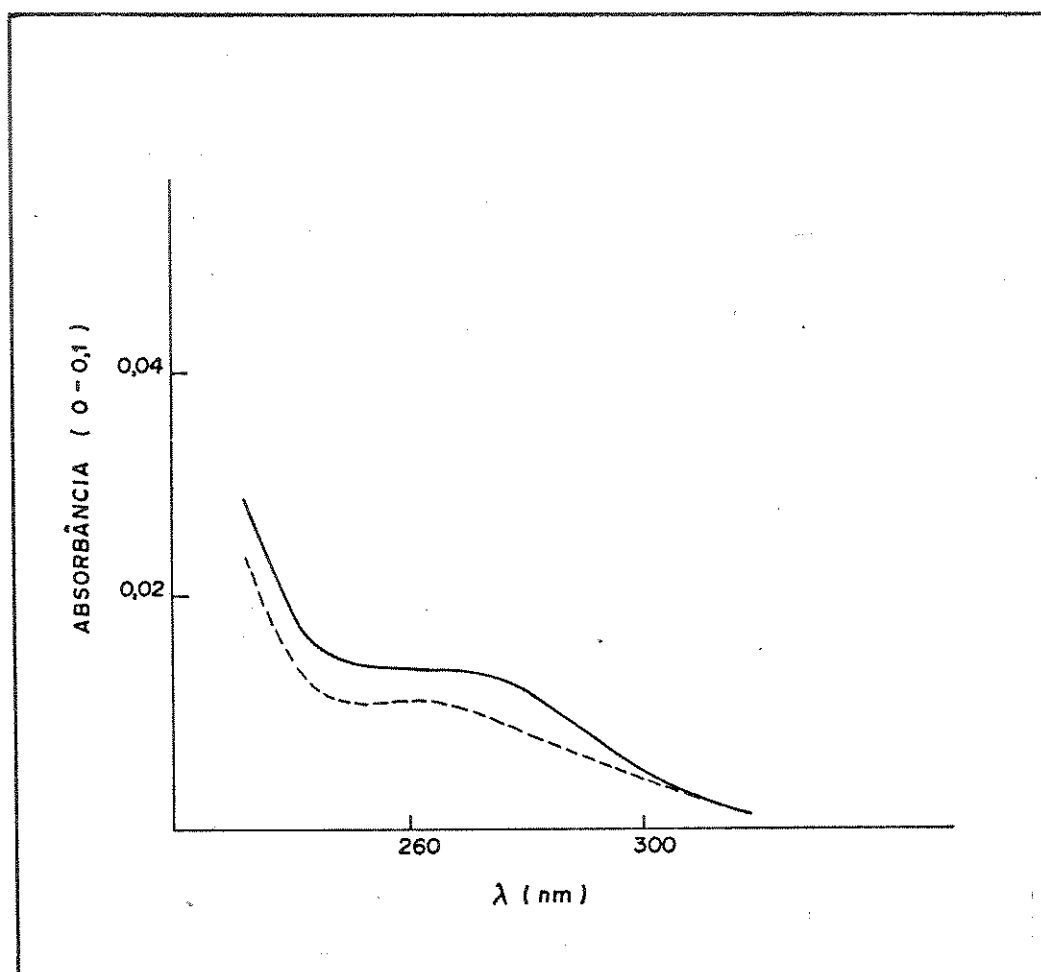


Fig. 3.III.14 : Espectros de absorção das manchas 1 e (tab.3.III.3) correspondentes a uridina (- - -) e supostamente uma sulfina (—).

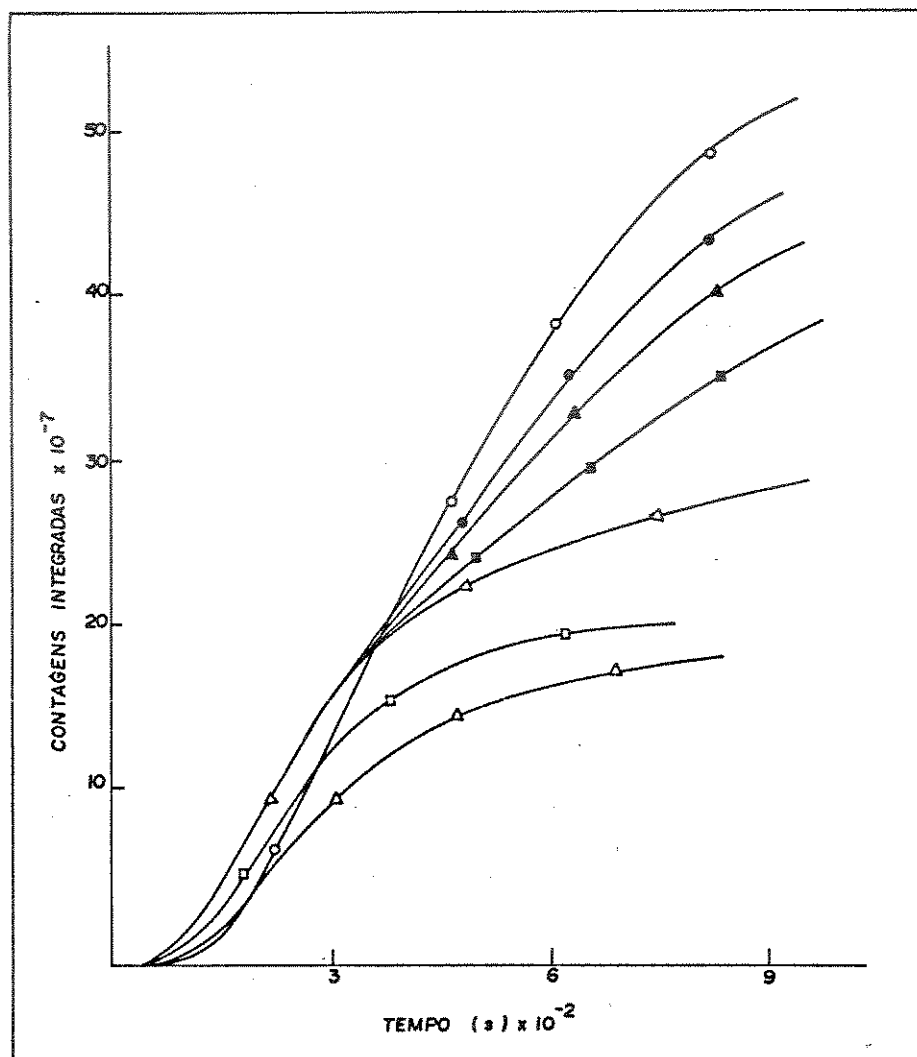


Fig 3.III.15: Gráfico do efeito de supressão por concentrações de histidina sobre a emissão do sistema: MA/HRP/Mn⁺/O₂, em tampão acetato à temperatura ambiente. A curva (-o-) é o controle, e (-●-) 0,5mM; (-▲-) 0,75mM; (-■-) 1,5mM (-◄-) 4mM; (-□-) 6mM e (-△-) 8mM de histidina. As concentrações utilizadas estão descritas no ítem III.2.1.6, pg. 80.

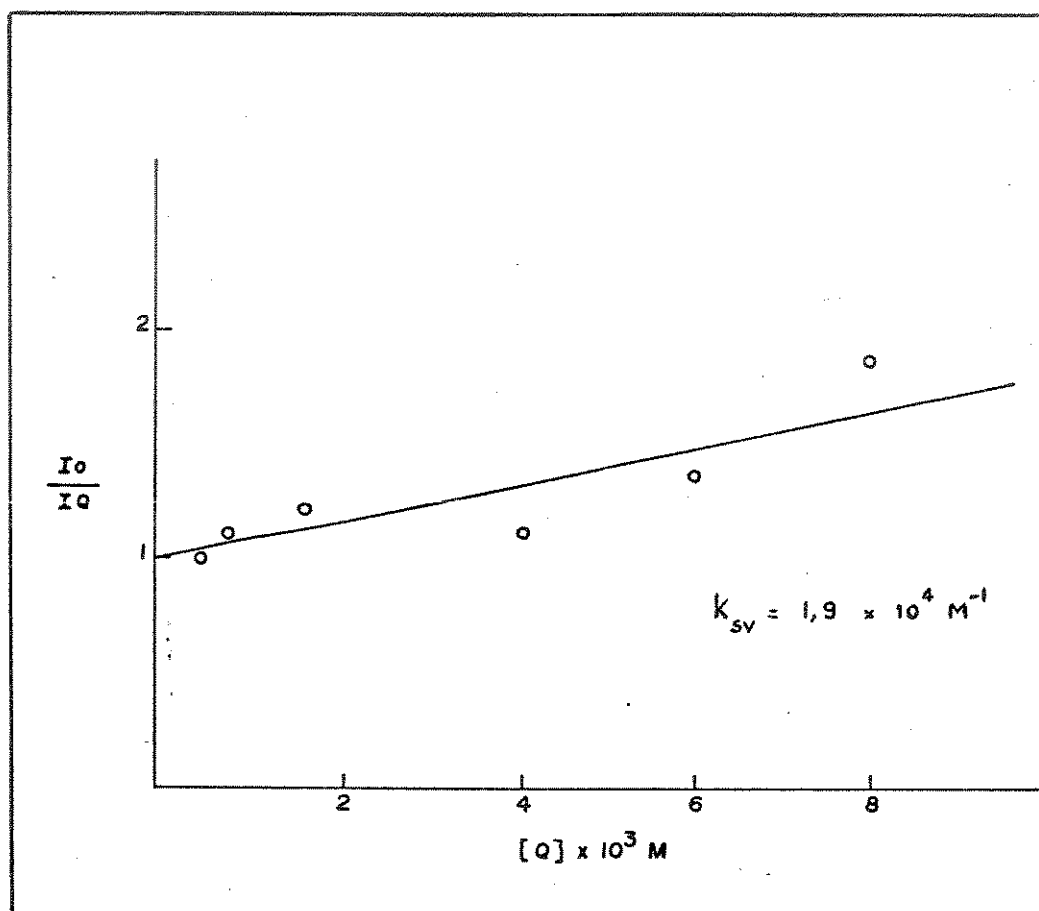


Fig. 3.III.16 : Gráfico Stern-Volmer para o efeito de supressão sobre o sistema:MA/HRP/Mn⁺⁺/O₂, em tampão acetato. [Q] é a concentração do supressor, no caso, histidina. As concentrações usadas estão descritas no item III.2.1.6, pg.80, e os experimentos feitos em duplicata.

IV. Sistema : IAA/HRP/O₂

IV.1 . Com tRNA

Foram registrados os espectros de emissão de luminescência e C.D. de tRNA submetido ao tratamento com este sistema enzimático, na ausência e presença de água deuterada, e os resultados se encontram nas figs. 3.IV.1 e 3.IV.2. O tRNA foi submetido a tratamentos com os sistemas fotoquímicos e enzimáticos (nas concentrações descritas anteriormente, ítems III.1.1, III.1.2, III.2.1, III.2.2, cap.2, pg.81) e foi verificado o seu comportamento na emissão do sistema IAA/HRP/O₂ . Os resultados estão na figura 3.IV.3.

IV.2 . Com 4-TU

As concentrações utilizadas neste experimento estão descritas no ítem III.2.2.2, cap.2, pg.81 . A mistura foi aplicada em placas de cromatografia e os resultados estão descritos na tabela 3.IV.1. Os resultados com a cromatografia preparativa estão na tabela 3.IV.2.

IV.3. Formação do fotoaduto 4-TU-Cyt [8-13] no tRNA submetido ao tratamento com o sistema

O método descrito para a formação do fotoaduto está por ser minorizado no ítem II.3.b (cap.2, pg.75). Os efeitos observados

estão registrados na fig.3.IV.4 e tabela 3.IV.3.

V. Curvas de sobrevivência de E.coli tratada
com o sistema : IAA/HRP/O₂ :

As cepas de bactérias foram tratadas com o sistema IAA/HRP/O₂ (item III.2.2.4, cap.2, pg. 82) e semeadas (II.2.b, cap. 2, pg. 72). Foram construídas curvas de sobrevivência que estão descritas na figura 3.V.1.

A figura 3.IV.1 mostra os espectros de emissão de luminescência de tRNA ($\lambda_{exc} = 335\text{nm}$) em 0,05M de tampão cacodilato na ausência e presença de 5mM de íons Mg^{+2} . Em tampão deuterado na ausência de íons Mg^{+2} o desaparecimento da banda de 4-TU é mais rápido comparado com a reação em tampão não deuterado. A presença de íons Mg^{+2} mascara o efeito de D_2O e a concentração do produto que emite a 440nm é aumentada. Surpreendentemente, o mesmo tipo de efeito com D_2O foi observado na fotoirradiação de tRNA a 335nm por 8 horas, nas condições em que o fotoaduto 4-TU-Cyt [8-13] é formado (152). Também, neste caso, D_2O exerce um efeito na produção do fotoproduto a 440nm na ausência de íons Mg^{+2} .

Este tratamento com o sistema enzimático foi estudado também através da espectroscopia C.D. na região de absorção de 4-TU. A figura 3.IV.2 mostra o espectro C.D. de tRNA submetido a tratamento com o sistema enzimático IAA/HRP/ O_2 . É evidente que D_2O exerce um forte efeito em 4-TU. Foi encontrado através do espectro C.D. que a conformação do tRNA não muda sob as condições da reação enzimática, então é presumível que o efeito de D_2O é devido a uma grande fotodegradação da 4-TU. Então, não só o fotoaduto 4-TU-Cyt [8-13] (explicações mais adiante) é formado nestas condições (234), mas ocorre uma concomitante fotodegradação da 4-TU. Para se verificar este efeito de fotodegradação da 4-TU foi feita uma ^{placa} cromatográfica, cujos valores de R_f encontrados estão na tabela 3.IV.1 e 3.IV.2 (cromatografia preparativa). O valor de $\lambda_{m\acute{a}x}$ encontrado para a mancha de $R_f = 0,16$ é o mesmo que está descrito na tabela 3.III.2, pg.152. Isto quer dizer que em ambos os processos biofotoenergizados (IAA/HRP/ Mn^{+2} / O_2 e IAA/

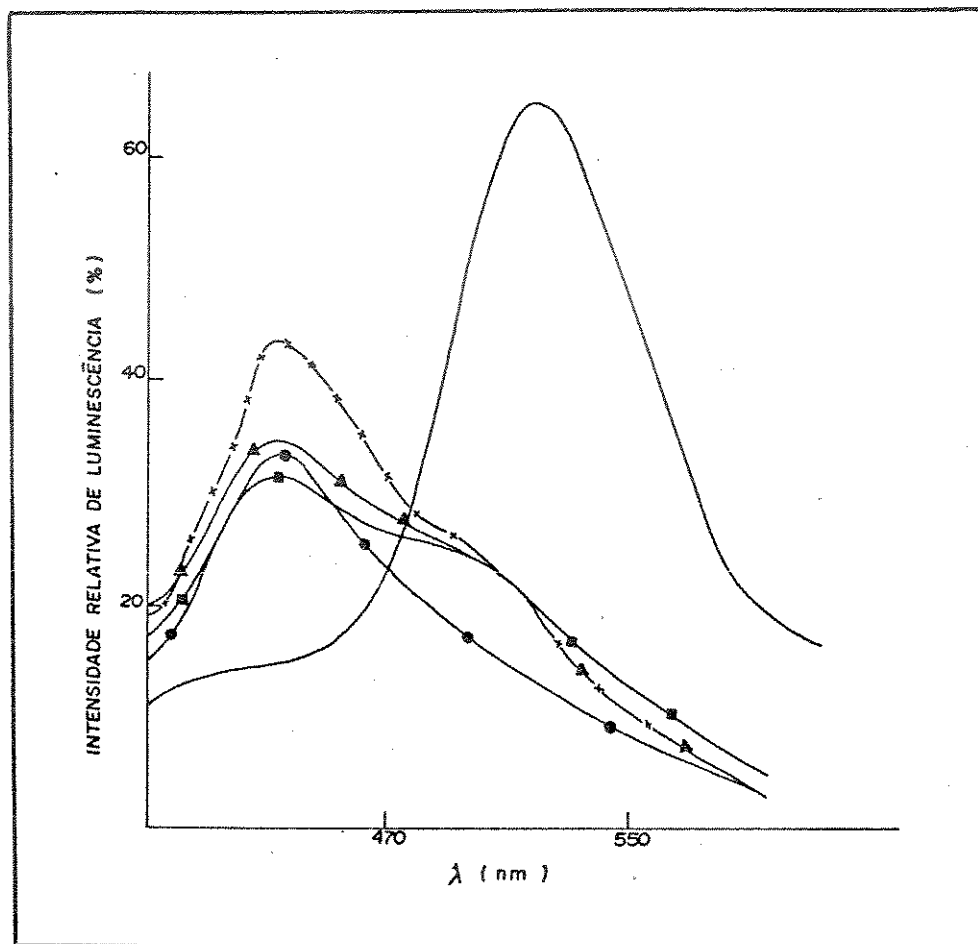


Fig -3.IV.1 : Espectro de emissão de $40\mu\text{M}$ de tRNA, nas concentrações descritas no ítem III.2.2.1, pg. 81 . Legenda: (—) tRNA nativo; (-▲-) tRNA/IAA/HRP/ O_2 ; (-■-) tRNA/IAA/HRP/ $\text{Mg}^{++}/\text{O}_2$; (-●-) tRNA/IAA/HRP/tampão deuterado/ O_2 e (-x-) tRNA/IAA/HRP/ $\text{Mg}^{++}/\text{O}_2$ /tampão deuterado.

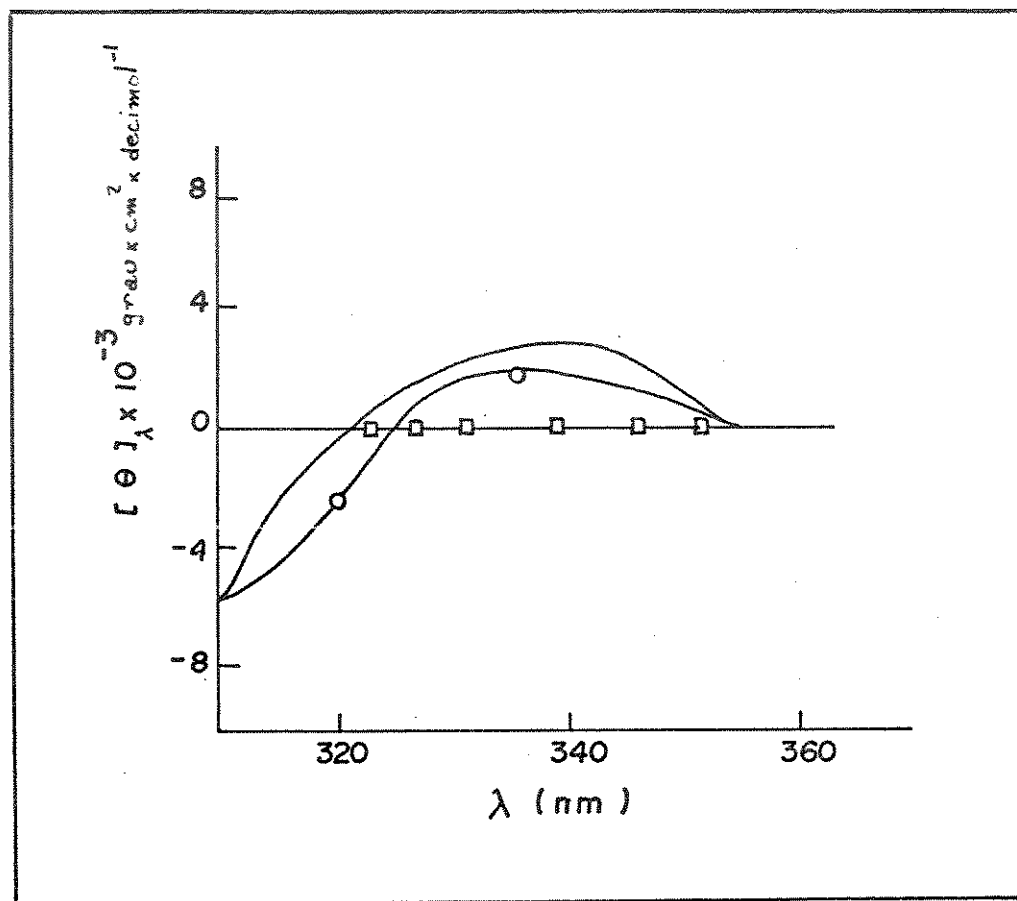


Fig. 3.IV.2 : Espectos C.D. de 40 μ M de tRNA em 0,05M d
 tampão acetato, pH=3,8. Legenda : (———)
 tRNA com e sem 1,4mM Mg²⁺ ; (-o-) tRNA/IAA
 HRP/O₂ e (-□-) tRNA/IAA/HRP/O₂ /tampão deu
 terado. As concentrações estão descritas n
 ítem III.2.2.1, pg.81 .

Tabela 3.IV.1 : Valores de R_f e comprimentos de onda máximos de absorção de compostos extraídos das placas de cromatografia.

Sistema	R_f	λ máx(nm)*	Atribuições
4-TU/IAA	0,0	318, 270	4-TU
[**]	0,25	290, 260 e 240	IAA
4-TU/IAA/ HRP/O ₂	0,0	318, 270	4-TU
[**]	0,16	268	Uridina
	0,60 a	290, \approx 250	
	0,66	e 240	IAL
4-TU/IAA/ HRP/O ₂ re-	0,0	320, 275	4-TU
carregado com	0,16	270	Uridina
HRP [**]	0,34		?
	0,50		?
Sistema ante-	0,0	319, 273	4-TU
rior recarre-	0,16	270	Uridina
gado com IAA	0,31	240	Sulfina
[**]	0,62	292, \approx 250 e 240	IAL
His/4-TU	0,0	317, 276	4-TU
	0,49	\approx 280	His
DABCO/4-TU	0,0	317, 277	4-TU

Continuação da tab.3.IV.1:

Sistema	R _f	λ máx(nm)*	Atribuições
4-TU/IAA/	0,0	317, 278	4-TU
HRP/O ₂ +	0,47	280	His
His [**]	0,63	292, 256 e 240	IAL
4-TU/IAA/	0,0	317, 275	4-TU
HRP/O ₂ +	0,26	290, ≈240	IAA
DABCO [**]	0,63		IAL (?)

* Valores aproximados ; ** placas que foram repetidas

Table 3.IV.2 : Valores de R_f e comprimentos de onda máximos de absorção de compostos extraídos das placas de cromatografia.

Nº da mancha	R_f	$\lambda_{\text{máx}}(\text{nm})$	Atribuição
1	0,16	263	Uridina
2	0,30	?	Sulfina (?)
3	0,64	290, 250 e 240	IAL

HRP/O₂) uma mesma espécie pode estar atuando, isto é, o oxigênio singlete. Comparando-se estes valores (tab.3.IV.1 e 3.III.2) com os obtidos na tab. 3.II.2, pg.122, verifica-se que a 4-TU transformada em uridina, tanto fotoquimicamente como enzimaticamente. É provável que o composto com R_f ao redor de 0,31 seja uma sulfina (tab.3.III.4) ou algum intermediário de fotooxidação. Devido ao pressuposto de que o oxigênio singlete é quem reage com 4-TU (esq.XIV, pg103), utilizou-se supressores, como DABCO e histidina. Como se pode ver pela tabela 3.IV.1, a histidina foi um excelente supressor, pois as manchas de R_f = 0,16 e 0,31 não aparecem na cromatografia, significando com isso que o oxigênio singlete foi suprimido pela histidina, sem reagir com 4-TU. Com DABCO ocorreu a mesma coisa, pois novamente não aparecem as manchas características de que não ocorreu a reação de 4-TU com oxigênio singlete. Pela cromatografia preparativa (tab.3.IV.2) verifica-se que a 4-TU é degradada e se forma uridina e uma sulfina.

Os estudos feitos em oxidação de nucleotídeos tiopirimidínicos em tRNA de E.coli (235) não dão nenhuma informação conclusiva sobre o papel funcional desses componentes menores. O tRNA modificado pelo oxigênio singlete oriundo dos processos enzimáticos (MA e IAA) e fotoquímicos (hv e hv/AL), foi testado em relação à eficiência de transferência de energia de IAL a 4-TU. O ³IAL* é um produto da oxidação de IAA por HRP (1.1.5.4, cap.1 pg. 19).

A figura 3.IV.3 mostra a emissão do sistema controlado (tRNA/IAA/HRP/O₂) com um máximo a 6 minutos, sendo mostrado anteriormente que, neste tempo ocorre a emissão da 4-TU que está cen-

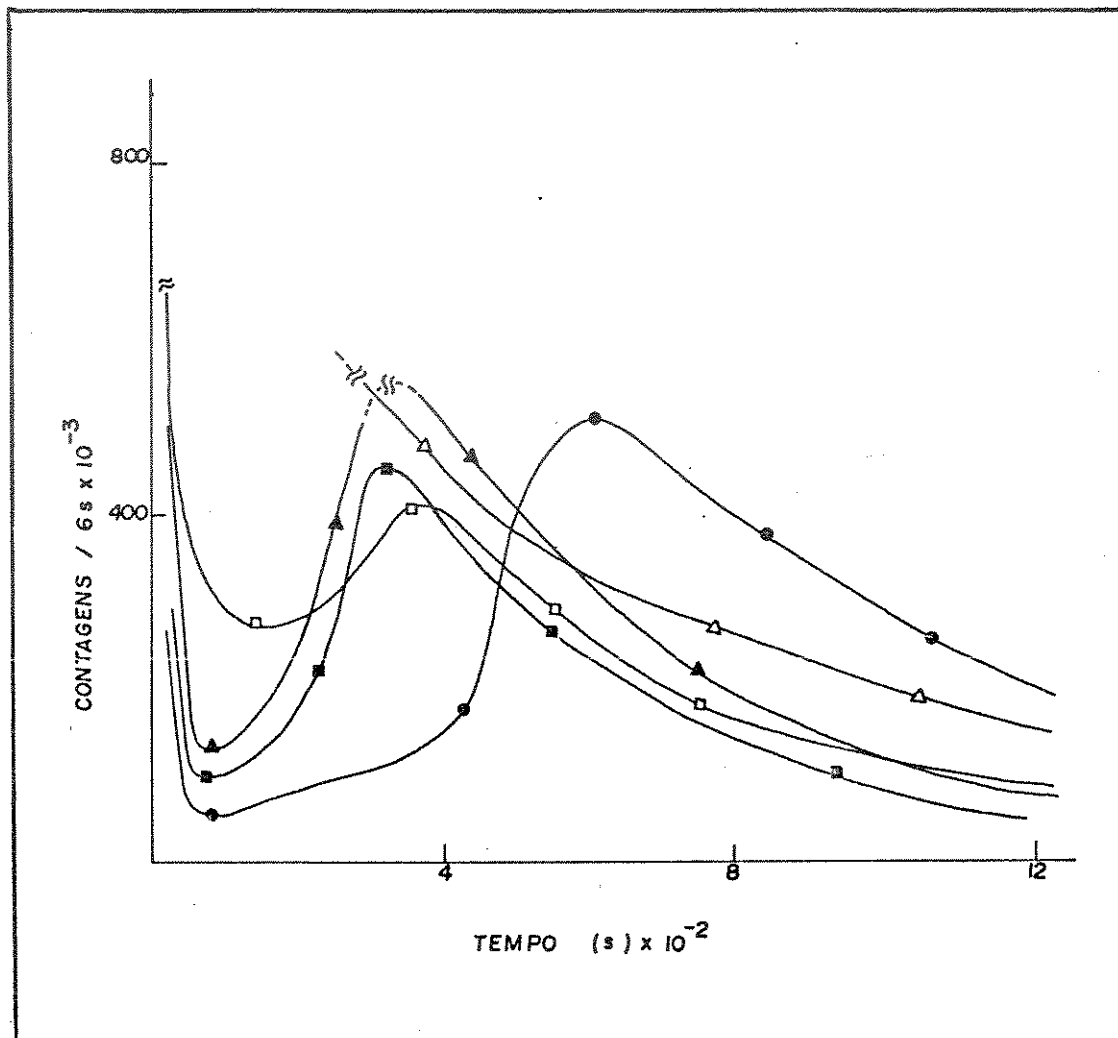
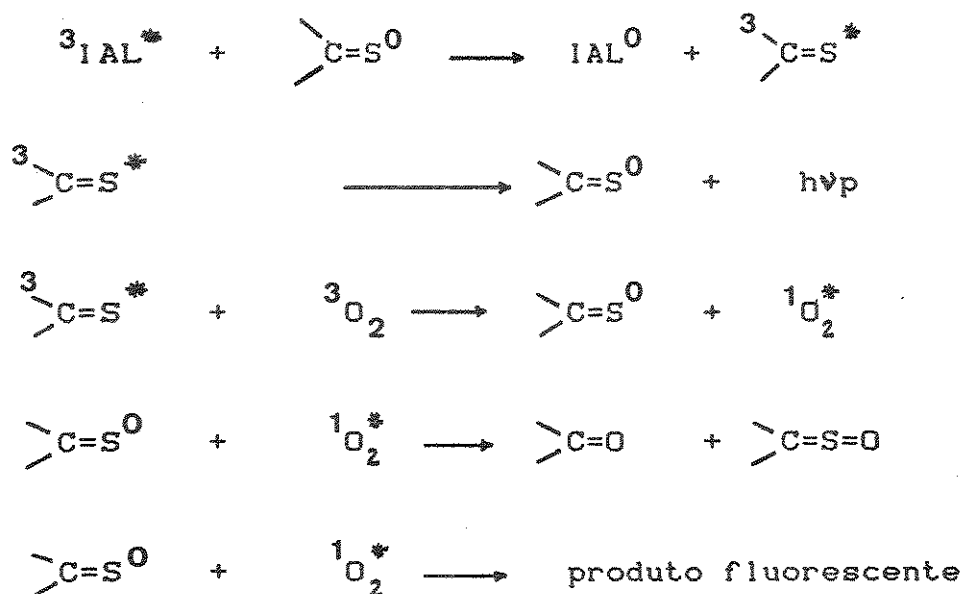


Fig. 3.IV.3 : Comportamento temporal de $35\mu\text{M}$ de tRNA na emissão do sistema IAA/HRP/ O_2 . Legenda: (-●-, intensidade x1) Controle; (-△-, int. x2) tRNA/MA/HRP/ Mn^{2+} / O_2 ; (-□-, int.x2) tRNA/AL/hν; (-■-, int.x2) tRNA/hν(6 h) e (-▲-, int.x2) tRNA/IAA/HRP/ O_2 .

trada em 540nm. Quando o mesmo tRNA da reação anterior foi precipitado e ressuspendido em tampão e novamente tratado com o sistema IAA/HRP/O₂, observou-se que o máximo foi a 3 minutos. O aumento a 3 minutos provavelmente corresponde a uma transferência de energia a um produto que emite a 440nm. Foram obtidos resultados similares (máximo ao redor de 3 min) quando foi utilizado tRNA pré-tratado com irradiação direta a 335nm ou irradiação fotossensibilizada com AL ($\lambda_{exc}=470nm$), e em seguida tratado com sistema IAA/HRP/O₂. Isto mostra a semelhança entre os efeitos biofotoenergizados e os fotoquímicos no tRNA. Entretanto, quando o tRNA foi pré-tratado com o sistema MA/HRP/Mn⁺²/O₂ não foi observado máximo a 3 minutos, indicando neste caso que não existe formação do mesmo cromóforo observado nos outros casos. Provavelmente, na interação prévia de tRNA com MA foram formadas bases Schiff que possivelmente reagem no sistema IAA/HRP/O₂.

Uma outra possibilidade para os sistemas anteriores seria a formação de um dioxatietano que se quebraria formando uridina. Um processo similar foi observado por Suzuki e col. (236)

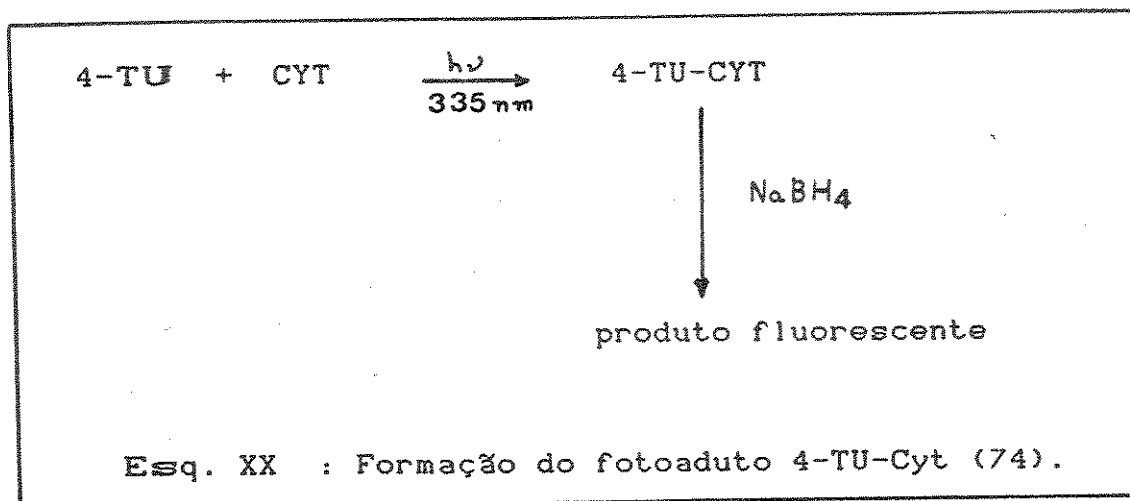
Então, o esquema cinético geral proposto neste trabalho para a oxidação de 4-TU no tRNA, é o seguinte:



Esq.XIX : Oxidação de 4-TU no tRNA através do sistema enzimático IAA/HRP/O₂.

Este método de transformação de tRNA leva uma rápida modificação de 4-TU sem afetar a capacidade aminoceptora do tR (169).

Foi mostrado que as modificações fotoquímicas em tR seguidas por mudanças espectrais indicam a formação de um foto duto entre a 4-TU na posição 8 e citidina na posição 13 (14 (esq.IX, pg.47), o qual é possível de ser reduzido com NaBH₄ para resultar num produto altamente fluorescente. Esta emissão dá a 440nm ($\lambda_{exc}=387\text{nm}$) (74).



Este fotoaduto é formado por irradiação direta de tRNA (147). Na oxidação de IAA por HRP há a produção de $^3\text{IAL}^*$ que pode transferir sua energia para promover a ligação da 4-TU com a citidina, formando o fotoaduto. Os resultados obtidos com o sistema IAA/HRP/O₂ estão descritos na tab.3.IV.3, que mostra a média dos valores para a formação do fotoaduto e degradação da 4-TU através de diferentes caminhos (esq. V, cap.1, pg. 32). Os sistemas tRNA/HRP e tRNA/IAA mostraram os mesmos valores que o tRNA nativo (tab.3.IV.3). Desta tabela, a porcentagem de fotoaduto formado é de aproximadamente 15% (sistema enzimático). Os íons Mg⁺² aumentam a formação do fotoaduto em 10% (* 8 *) e também contribuem para uma maior degradação da 4-TU em outros produtos, como observado pelo decréscimo nos valores de Fa/A (260nm) em diferentes condições.

A fig.3.IV.4 mostra os espectros de emissão do fotoaduto formado por irradiação em 335nm ($\lambda \text{ exc}=387\text{nm}$). Esta excitação foi selecionada pois é neste comprimento de onda que o fotoaduto emite eficientemente (74). Portanto, conclui-se, pela fig.3.IV.4, que o sistema enzimático interage com 4-TU não somente produzindo

Tab. 3.IV.3 : Porcentagem de formação do fotoaduto 4-TU-
Cyt [8-13] no tRNA: *1*

Sistema	Fa/A(260nm) *2*	Fb/A(260nm) *3*	Fb/Fa *4* x 1000	Fotoaduto (%) *5*	Perda da 4-TU(%) *6*
tRNA	6444 ± 1095	446,5 ± 61,4	69,3	85 *7*	---
+ Sist. enzimático	4736 ± 805	522,4 ± 53,1	81,1	14 ± 3	27
+ Sist. enzimático e Mg ⁺² *8*	3466 ± 589	574,5 ± 71,9	89,2	24 ± 4	46

1 Valor médio de quatro medidas independentes. *2* Fa corresponde à luminescência de tRNA irradiado na presença de íons Mg⁺² e então reduzido, como descrito anteriormente. *3* Fb corresponde à luminescência do tRNA tratado previamente com IAA/HRP/O₂, exceto o controle, e então reduzido como em *2*. *4* relaciona-se à Fa de 6444 ± 1095. *5* calculada de $\left\{ \frac{Fb}{Fa} \left(\frac{IAA}{HRP/O_2} \right) \right\} - \left[\frac{Fb}{Fa} (tRNA) \right] \times 85 \right\} / \left[\frac{Fb}{Fa} (tRNA) \right]$. *6* transformação parcial de 4-TU à uridina (169) e outros fotoprodutos (não identificados) e calculado de $\left[\frac{Fa}{A(260nm)} (tRNA) \right] / \left[\frac{Fa}{A(260nm)} (IAA/HRP/O_2) \right]$. *7* (74). *8* concentração de íons Mg⁺² de 6mM.

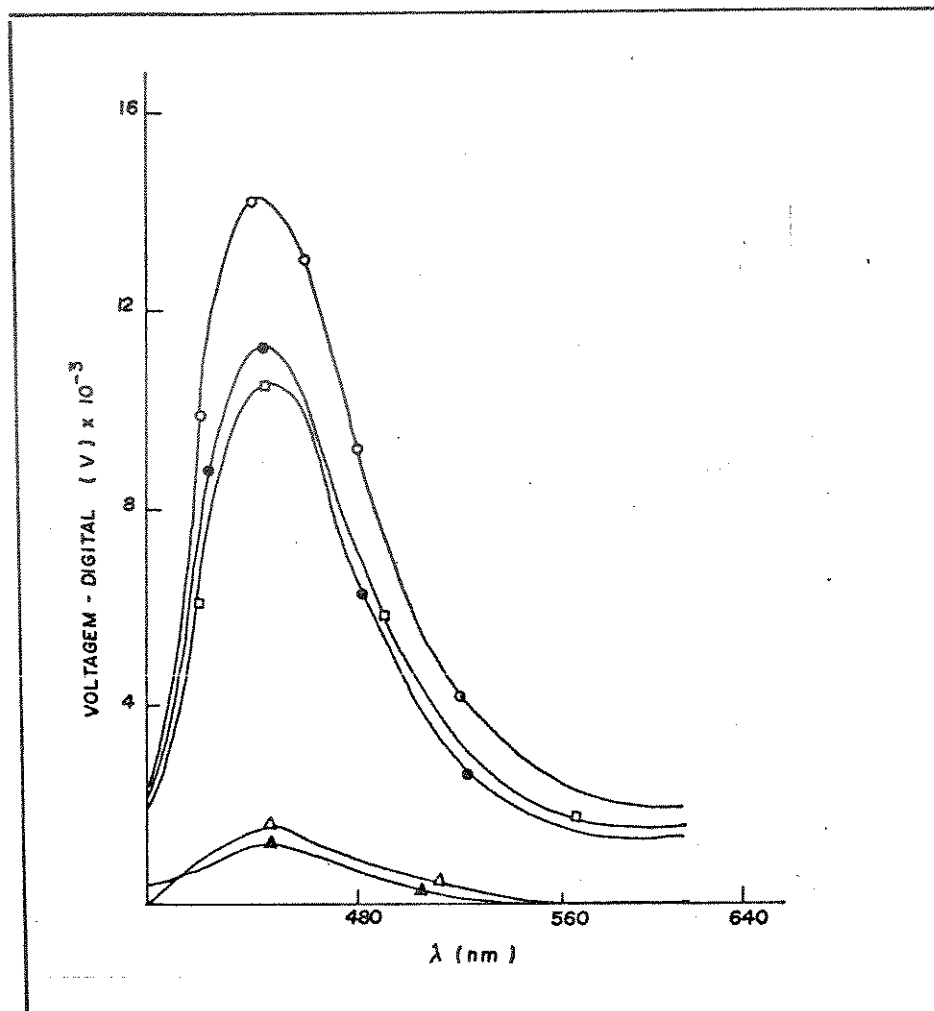


Fig. 3.IV.4 : Espectros de emissão ($\lambda_{exc}=387nm$) de tRNAs tratados com $NaBH_4$, anteriormente irradiados ($exc=335nm$) por 6,15h. Legenda: (-o-) tRNA nativo; (-□-) tRNA/IAA/HRP/ O_2 ; (-●-) tRNA/IAA/HRP/ O_2 /Mg²⁺; (-Δ-) tRNA/IAA/HRP/ O_2 /tampão deuterado e (-▲-) tRNA/IAA/HRP/Mg²⁺/ O_2 /tampão deuterado. Conc: ítem 11.3.b (cap.2).

o fotoaduto 4-TU-Cyt, mas parte da 4-TU é degradada em outros produtos. A figura mostra o mesmo comportamento observado na tal 3.IV.3 onde Fa/A (260nm) decresce com o tratamento com o sistema enzimático.

Como se pode observar, confirmando os dados da tal 3.IV.3, a maior porcentagem de fotoaduto formado é no tRNA nativo, quando irradiado. Isto quer dizer que quando o tRNA é tratado com o sistema enzimático, além do fato da 4-TU receber parte da energia proveniente do $^3IAL^*$ para a formação do fotoaduto, ocorrem, como descrito no esquema V (cap.1, pg. 32) outras reações envolvendo o tRNA e o $^3IAL^*$. Uma delas é a formação de oxigênio singlete, que, como foi visto anteriormente, reage com a 4-TU formando uridina (esq.XIV, pg.103). Isto quer dizer que a 4-TU não é totalmente utilizada para a reação de formação do fotoaduto, e sim na reação com o oxigênio singlete. Em meio deuterado ocorre apenas uma fraca emissão, sendo indicação de que pouco fotoaduto foi formado. Sabe-se que a vida média do oxigênio singlete é aumentada na presença de D_2O (237). Portanto, os danos provocados por esta espécie (quando gerada através da reação $IA + HRP/O_2$, em tampão deuterado) em 4-TU são maiores, uma porcentagem maior dessa base reage, formando uridina, impedindo com isto a formação do fotoaduto.

V. Curvas de sobrevivência de E.coli tratadas com diferentes sistemas

O fato de que ocorre degradação da 4-TU em tRNA de E.coli foi confirmado submetendo-se as diferentes linhagens de bactéria ao tratamento com o sistema enzimático e construindo-se as curvas de sobrevivência mostradas na fig.3.V.1. A cepa de E.coli deficiente em 4-TU (B/r NC 32 RJ) tem maior % de sobrevivência que a B/r NC 32, cujo tRNA possui a base 4-TU. Isto significa claramente que a bactéria cujo tRNA possui a 4-TU está sofrendo alterações que provocam a morte celular. A 4-TU, com foi dito anteriormente, reage neste processo enzimático formando uridina, e ainda o fotoaduto 4-TU-Cyt. Com isso, as características bioquímicas do tRNA podem estar sendo alteradas, e ainda mais, a energia proveniente do IAL é transferida à 4-TU, que por sua vez transfere ao DNA provocando quebras de fitas simples, e induzindo a morte celular. Este fato foi também observado por outros pesquisadores, irradiando-se as mesmas cepas de bactérias a 334nm em uma fluência de $12 \times 10^5 \text{ J/m}^2$ (181).

A E.coli B/r NC 32 RJ (4-TU -) também morre quando exposta ao sistema enzimático. Mas, verifica-se pela fig.3.V.1 que esta morte celular é muito menos eficiente do que a que acontece na B/r NC 32 (4-TU +). Portanto, além da 4-TU, outras bases recebem a energia do ³IAL* e acabam reagindo, provocando danos em tRNA e conseqüentemente morte da bactéria. Mas, observa-se que este efeito é muito menos pronunciado do que o efeito de transferência de energia de 4-TU ao DNA, induzindo a formação de quebras

e fitas simples.

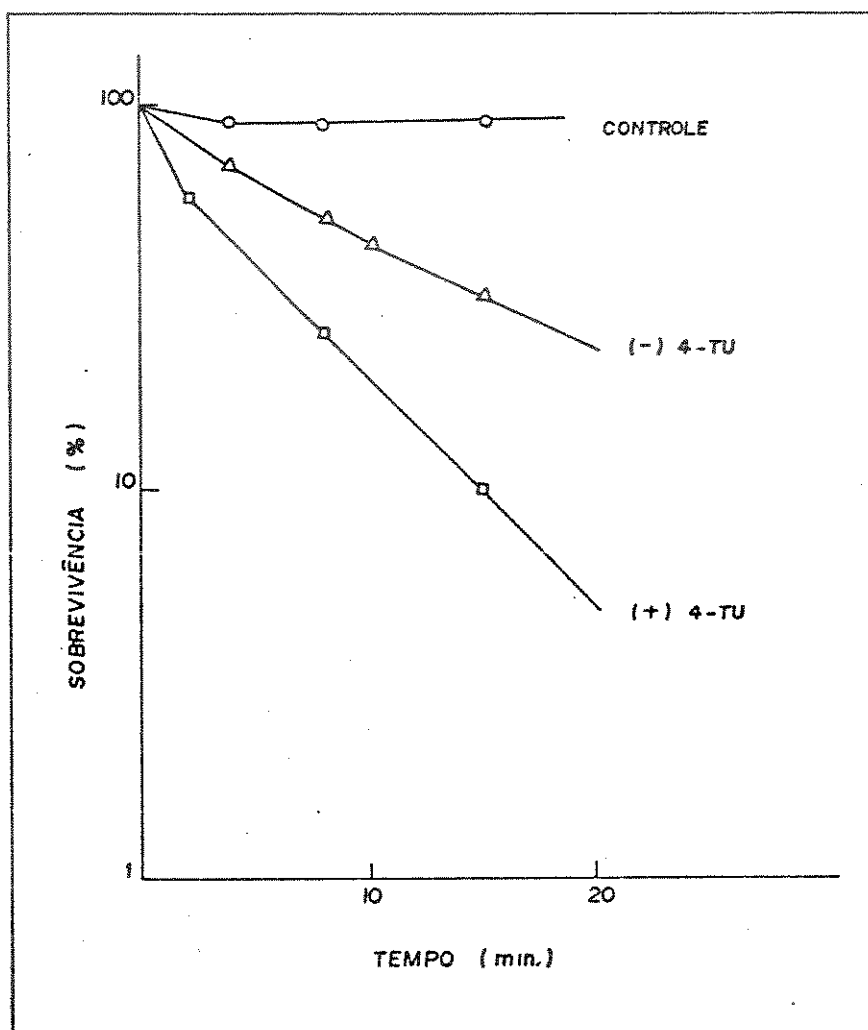


Fig. 3.V.1 : Curvas de sobrevivência de *E. coli* (B/r NC 32 - 4-TU(+) e B/r NC 32 RJ - 4-TU(-)) tratadas com o sistema IAA/HRP/O₂ nas condições descritas no ítem III.2.2.4, cap.2, pg. 82 .

Marcucci e col. (238) observaram os mesmos efeitos anteriores tratando as cepas de *E.coli* 1088WT (tipo selvagem) e 1089 UVrB com o sistema biofotoenergizado IAA/HRP/O₂, verificando que o tipo selvagem (1088 WT) é resistente aos danos provocados pelo sistema, enquanto que a 1089 UVrB, não (esta tem deficiência em reparos de danos celulares). Isto pode ser observado pela fig. 3.V.2 :

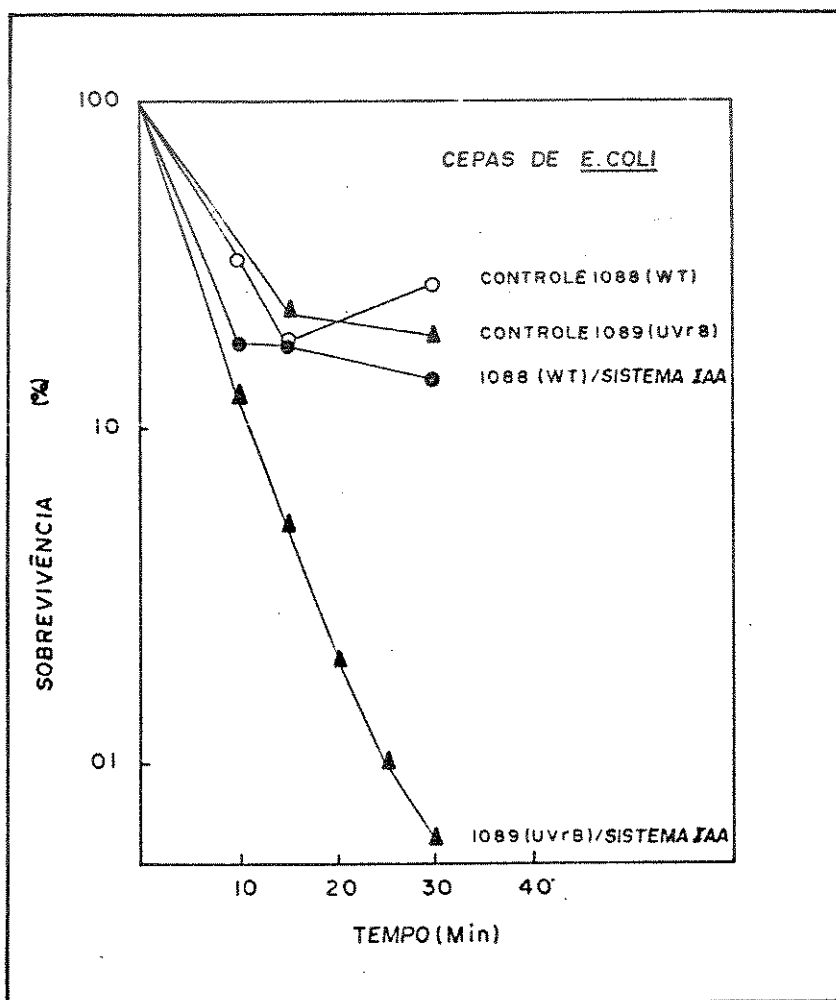


Fig. 3.V.2 : Curvas de sobrevivência de diferentes cepas de *E.coli* tratadas com o sistema IAA/HRP/O₂ cujas concentrações estão descritas no item III.2.2.4, cap.2, pg. 82 .

Outras linhagens de *E. coli* (248 WT, 871 recA, 1089 UvrB e 877 polA) foram submetidas a tratamento com o sistema biofotoenergizado (IAA/HRP/O₂) (238), onde se observou que a 877 polA e também a 1089 UvrB (deficientes em reparos de danos) morrem mais eficientemente que o tipo 871 recA e 248 WT (esta última resistente aos danos provocados por espécies excitadas).

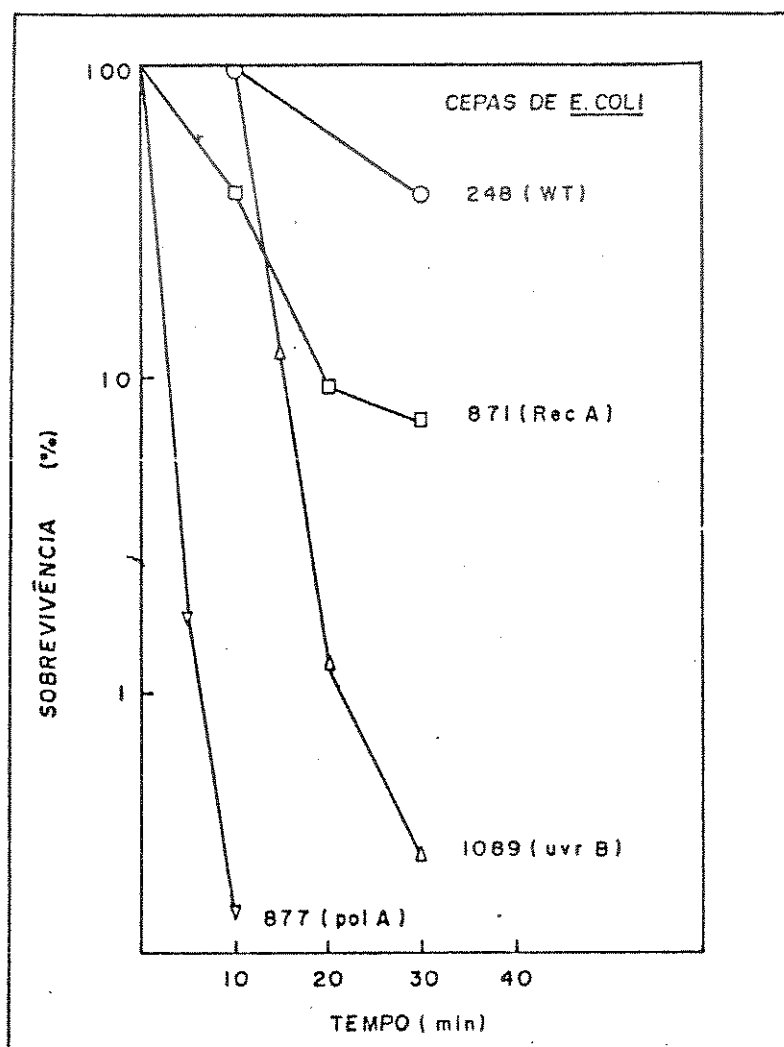


Fig. 3.V.3 : Curvas de sobrevivência de cepas de *E. coli* tratadas com o sistema biofotoenergizado (IAA/HRP/O₂), cujas concentrações estão descritas no ítem III.2.2.4, pg. 82.

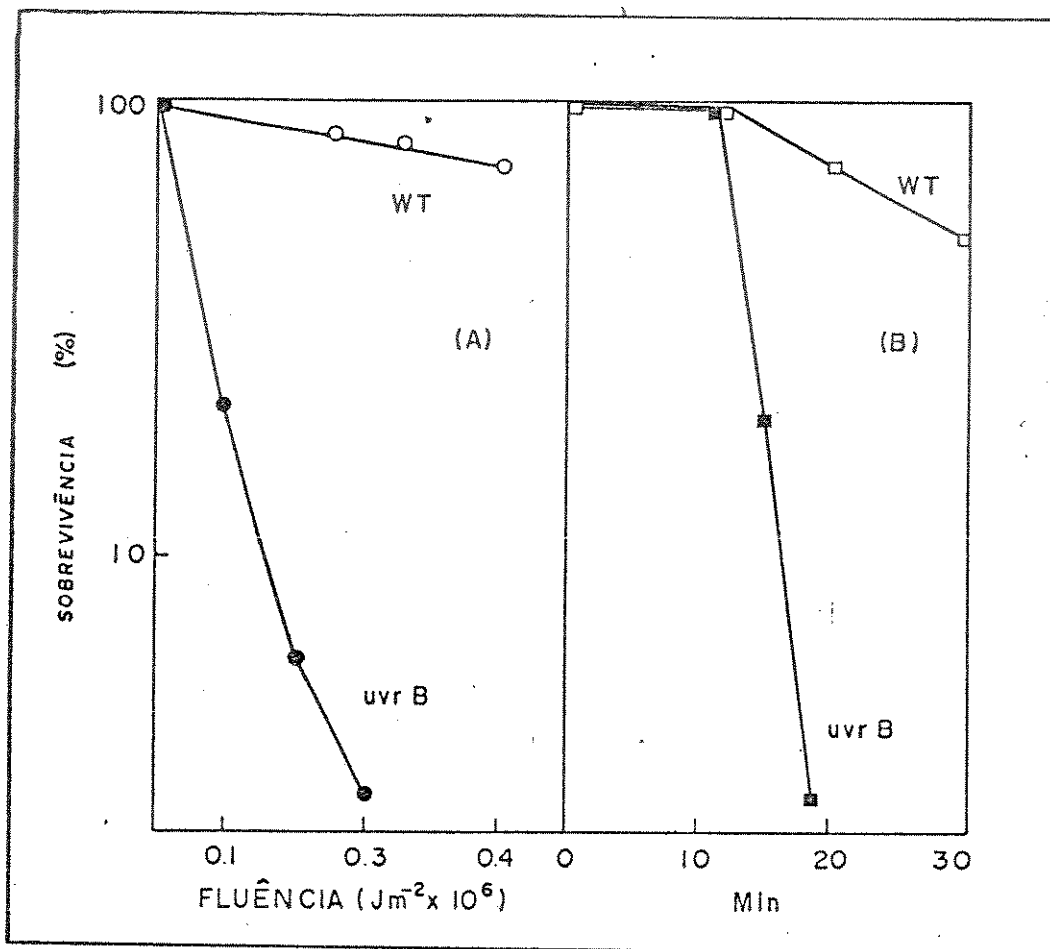


Fig. 3.V.4 : Curvas de sobrevivência de cepas de *E. coli* submetidas ao tratamento com o sistema fotossensibilizado a 500nm (com 2 μ M de AL 0,05M de tampão tris-HCL, pH=7,6), fig (239) e biofotoenergizado (IAA/HRP/O₂), fl B (conc. utilizadas vide pg.82).

Portanto, verifica-se que o estudo das diferentes linhagens de *E. coli* é importante para se observar os danos que os sistemas com luz (irradiação direta (181) (fig.1.IV.2, pg.57) fotossensibilizado (fig.3.V.4 (A)) (239) e biofotoenergizados (IAA/HRF /O₂) (figs. 3.V.1 a 3.V.3 e 3.V.4 (B)), podem provocar em bactérias, isto é, sistemas *in vivo*, levando-as à morte celular.

Capítulo 4

CONCLUSÕES, APÊNDICES E BIBLIOGRAFIA

Conclusões

Com os resultados apresentados neste trabalho, tentou-se verificar se os danos produzidos em tRNA tanto fotoquímica com enzimaticamente podem provocar mudanças a nível celular. Alterando-se as bases ou destruindo-as, o tRNA pode perder algumas de suas funções, fato que não se tornou bem claro. Além disto, o estudo da 4-TU foi importante pois esta base serve como sonda interna para se verificar os danos produzidos por espécies nocivas como oxigênio singleto, em tRNA.

As observações feitas com as diferentes cepas de E.col mostraram que o tRNA induz o aparecimento de quebras de fita simples em DNA, por transferência de energia. Isto leva a processos de mutações espontâneas em bactérias. Estes sistemas anteriormente estudados serviram como modelos para se verificar a influência de espécies excitadas in vivo.

Implicações biológicas

1) Sistema com irradiação direta

Peak e col. (181) demonstraram que cepas de *E.coli* deficientes em 4-TU apresentaram maior sobrevivência que o tipo selvagem (4-TU +) quando irradiadas por luz U.V monocromática a 33 nm. No tipo selvagem foi encontrado um número maior de quebras de fitas simples do que no deficiente em 4-TU. Estes resultados sugerem que a 4-TU é um cromóforo importante em alguns efeitos letais provocados por luz U.V. Além disso, a energia de excitação pode ser transferida do tRNA ao DNA, provocando quebras de fita simples.

O presente trabalho mostra estes mesmos efeitos produzidos pelas moléculas eletronicamente excitadas produzidas enzimaticamente.

2) Sistema com irradiação fotossensibilizada

Hass e col. (239) verificaram os efeitos letais de AL luz monocromática a 460 ou 500nm, em cepas de *E.coli* que diferem umas das outras em reparos de danos. Algumas cepas apresentaram resistência frente ao tratamento com luz e AL, enquanto que outras foram mais sensíveis. Os mesmos autores postularam que estes sistemas sensibilizados com luz e AL provocam lesões em DNA. Efeitos semelhantes foram conseguidos na interação de várias cepas de *E.coli* com oxigênio singlete gerado enzimaticamente (238).

3) Sistemas biofotoenergizados

a) MA/HRP/Mn⁺²/O₂

Durán e col. (48) comprovaram a presença e o papel do oxigênio singlete neste sistema. O oxigênio singlete formado reage especialmente com a 4-TU no tRNA de *E. coli*, o que resulta em alterações conformacionais do ácido nucleico. Foi relatado também que a espécie excitada gerada no processo reage com bases de DN e proteínas, levando a mutagênese e carcinogênese (95). Isto corrobora os resultados mencionados em 2) (238).

b) IAA/HRP/O₂

A mudança de tRNA de *E. coli* pode ser provocada pela reação entre a 4-TU excitada por transferência de energia do ³IAA triplete com um grupo vizinho, semelhante à alteração de 4-TU com citidina na posição 13 [8-13], que ocorre por irradiação do tRNA (95), além dos efeitos já discutidos em oxigênio singlete.

Alguns resultados discutidos por De Mello e col. (95) fornecem um possível mecanismo para interação de ³IAA*-tRNA *in vivo*.

Aqui também foram observados os efeitos das espécies excitadas em diferentes cepas de *E. coli* e foi comprovado que a porcentagem de sobrevivência nas deficientes em 4-TU é maior que o tipo selvagem (4-TU+).

APÊNDICE I

O uso do "Dicroísmo Circular" (CD) no estudo da conformação de macromoléculas

As macromoléculas (como proteínas, ácidos nucleicos etc...) são opticamente ativas e a correlação entre suas atividades ópticas e suas conformações, é de grande interesse. As mudanças de atividade óptica fornecem informações não somente sobre a estruturas dessas macromoléculas, como também as alterações localizadas. A atividade óptica pode manifestar-se através de dois fenômenos : o dicroísmo circular, CD, e a dispersão óptica rotatória, ORD. Numa banda de absorção opticamente ativa, o espectro de dicroísmo circular e o seu correspondente espectro de dispersão óptica rotatória, são conhecidos como "efeito Cotton". É importante frisar que o CD é observado apenas nas regiões de comprimento de onda onde a substância absorve enquanto que a ORD por ser um fenômeno de dispersão, se apresenta também em comprimentos de onda afastados da banda de absorção.

Tanto a forma como a magnitude dos espectros ORD e CD são bastante sensíveis à mudanças conformacionais de macromoléculas (240).

Na química de macromoléculas, o termo "conformação" refere-se à sua estrutura global. A determinação da conformação tem um importante papel no estudo da relação entre as estruturas e as funções dessas macromoléculas. É de especial interesse o estudo das possíveis alterações que acompanham as interações dessas ma

cromoléculas com outros constituintes celulares.

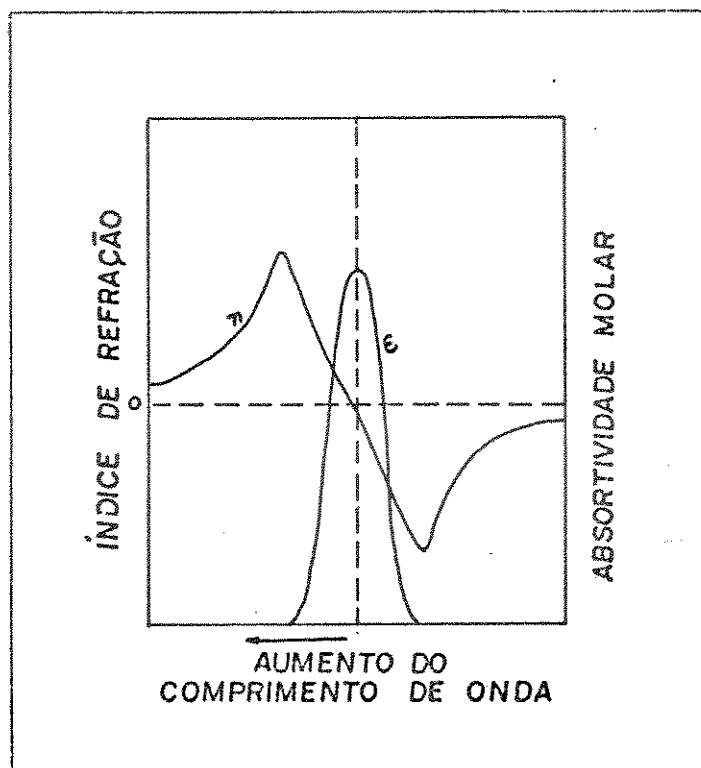


Fig.A.1.1: Curvas teóricas de absorção e dispersão.

A assimetria nessas moléculas é produzida por um arranjo espiral (hélice) ou por um outro tipo de dobramento. Devido à assimetria, são opticamente ativas e a correlação entre suas atividades ópticas e conformações, é muito importante. As mudanças de atividades ópticas dão informações sobre as estruturas e também sobre alterações localizadas, tais como em sítios ativos enzimáticos.

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

- 1) Estrutura primária assimétrica.
- 2) Estrutura secundária helicoidal.
- 3) Estrutura terciária.

As medidas de ORD e CD têm sido muito úteis para a investigação da conformação de macromoléculas (241).

Os efeitos de dicroísmo circular resultam do fato de que a luz circularmente polarizada à direita é diferentemente absorvida que a luz circularmente polarizada à esquerda (242).

A absorção, no dicroísmo circular, é definida pela equação A.1.1 :

$$\Delta \epsilon = \epsilon_D - \epsilon_E \quad \text{Eq. A.1.1}$$

onde ϵ_D e ϵ_E são os coeficientes de extinção molar para os raios da direita e da esquerda, respectivamente.

A unidade comumente usada em CD é a elipticidade molar, $[\theta]$, que está relacionada com a absorção no dicroísmo, $\Delta \epsilon$ pela equação :

$$[\theta] = 3300 \cdot \Delta \epsilon \quad \text{Eq. A.1.2}$$

A equação mais usada para calcular o valor de $[\theta]_\lambda$ é:

$$[\theta]_\lambda = \frac{[\theta]_0}{10} \times \frac{M}{l \times c} \quad \text{Eq. A.1.3}$$

onde: M é o peso molecular da substância analisada.

c é a concentração utilizada para se obter o espectro.

l é o caminho óptico.

$[\theta]_0$ é obtido no próprio gráfico.

Dicroísmo circular de tRNA

O dicroísmo circular é uma técnica muito importante útil para se obter informações estruturais sobre o tRNA.

Blum e col. (243) estudaram a conformação de nove espécies diferentes de tRNAs, através de CD. Embora as características de todos os espectros CD fossem similares, diferentes espécies de tRNAs tinham espectros distintos. Por exemplo, a posição do máximo da banda larga variou de 262nm até 267nm, e seis do tRNAs estudados tinham uma pequena banda negativa em 295nm.

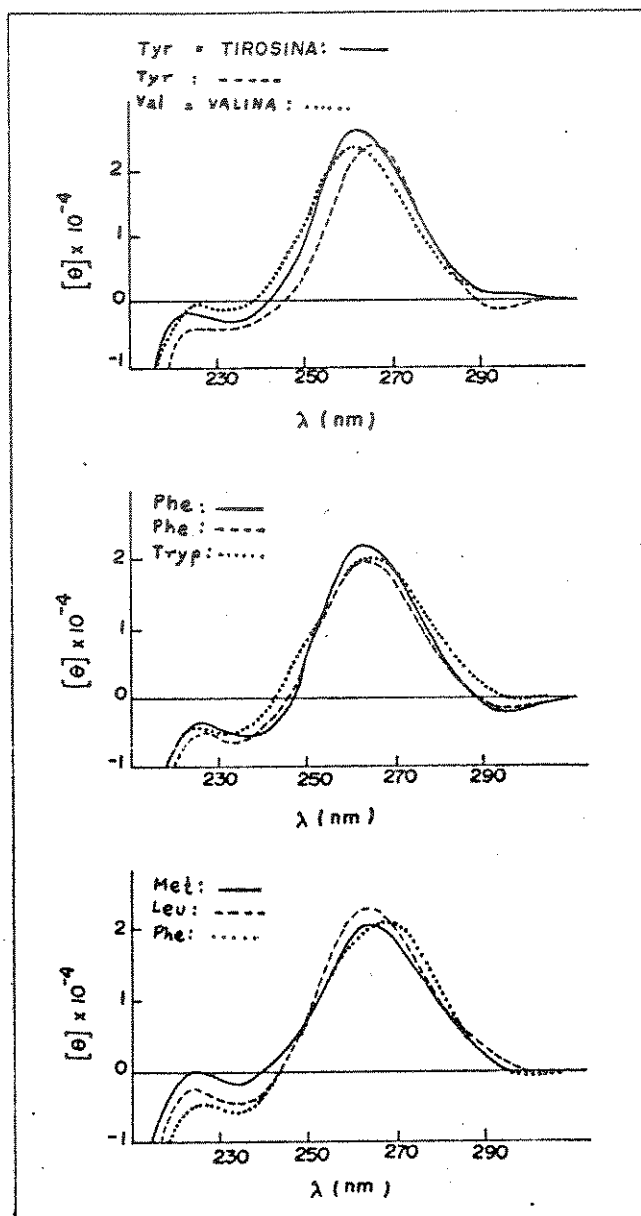


Fig. A.1.2 : Espectros CD de nove espécies de tRNAs em 10mM de Tris-HCl (pH=7,5) e 1mM de $MgCl_2$ a $25^\circ C$. Todos são tRNAs nativos (243).

Ainda na literatura são encontrados outros trabalhos e tRNA, onde foi utilizada a técnica de CD. Por exemplo : Watanab (244) estudou as reações de 2-Tioribotimidina e 4-Tiouridina co peróxido de hidrogênio em tRNAs de Thermus thermophilus e E.coli por CD. Neste caso, foi observado que a 4-tiouridina reage co H_2O_2 dando uridina, enquanto que na reação de 2-tioribotimidin com H_2O_2 , o produto não pode ser identificado. As mudanças con formacionais de 4-TU com o reagente descrito acima, podem ser vi sualizadas na fig. A.I.3. O tratamento de 2-tioribotimidina com H_2O_2 foi acompanhado também por CD, cujos resultados se encontra na fig. A.I.4.

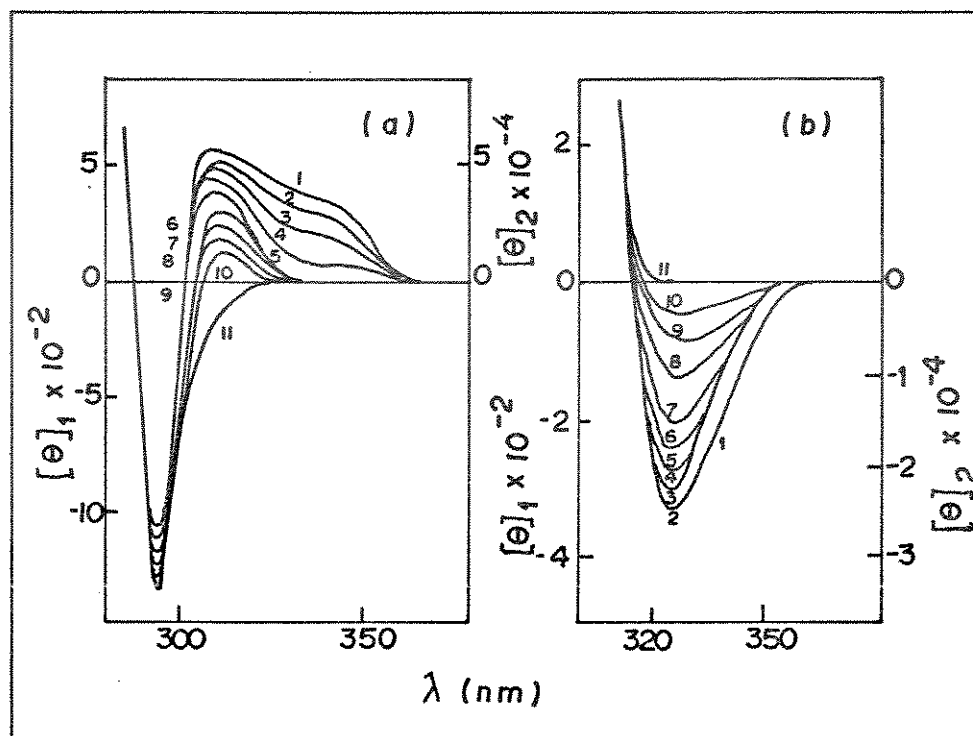


Fig. A.1.3 : Espectros CD de tRNA de *T.thermophilus* na reação com H_2O_2 . A reação de tRNA em tampão fosfato (0,05M, pH=8,0) com 1mM de EDTA, foi monitorada pelo valor de $[\theta]$ a 310nm, e c tempos de reação foram : 0min [curva1], 9min [2], 24min [3], 51min [4], 3,4h [5], 30,5h [6], 53,1h [7], 150,5h [8], 360h [9] e 500h [10]. a curva 11 mostra o espectro CD de tRNA sem 4-TU ou s^2T (2-tioribotimidina) (244).

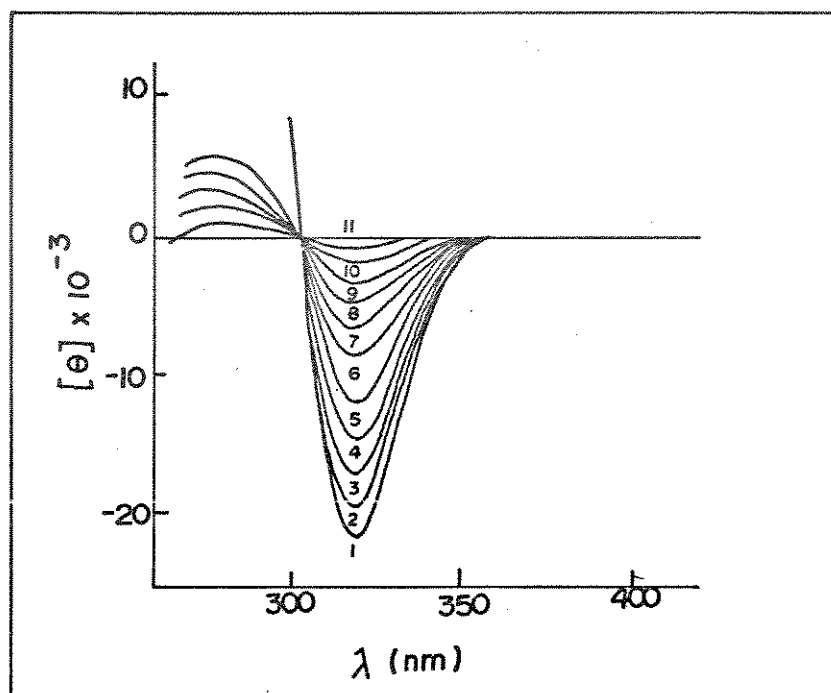


Fig. A.1.4 : Espectros CD de s^2T na reação com H_2O_2 . s^2T ($54\mu M$) na presença de $40\mu M$ de guanosina reagiu com H_2O_2 a $20^\circ C$. Os espectros obtidos são : antes da reação [curva 1], e a 10 [2], 21 [3], 36 [4], 55 [5], 88 [6], 104 [7], 151 [8], 183 [9], 236 [10] e 300 [11] min de reação (244).

Willick e col. (245) estudaram as mudanças conformacionais de E. coli induzidas por Mg^{+2} , por CD. Os resultados mostram que uma pequena concentração de Mg^{+2} provoca uma mudança conformacional no tRNA. Isto pode ser visualizado na fig. A.I.5. Este mesmo autor discute os espectros CD que obteve, da 4-TU. Essa base (4-TU) absorve luz diferentemente das outras, existentes em tRNA. 4-TU absorve luz a 335nm enquanto que as outras bases absorvem a 260nm. Esta informação é muito importante, pois no CD se observa a banda de 4-TU também em diferente comprimento de onda das bases normais de tRNA.

Willick (245) discute que os espectros CD de alguns tRNAs purificados, na presença de Mg^{+2} , variam bastante na região de 4-TU. Realmente, o efeito dos íons Mg^{+2} é mais pronunciado na região do espectro C.D. de 4-TU, do que na região de $\lambda = 260nm$ (absorção das bases normais).

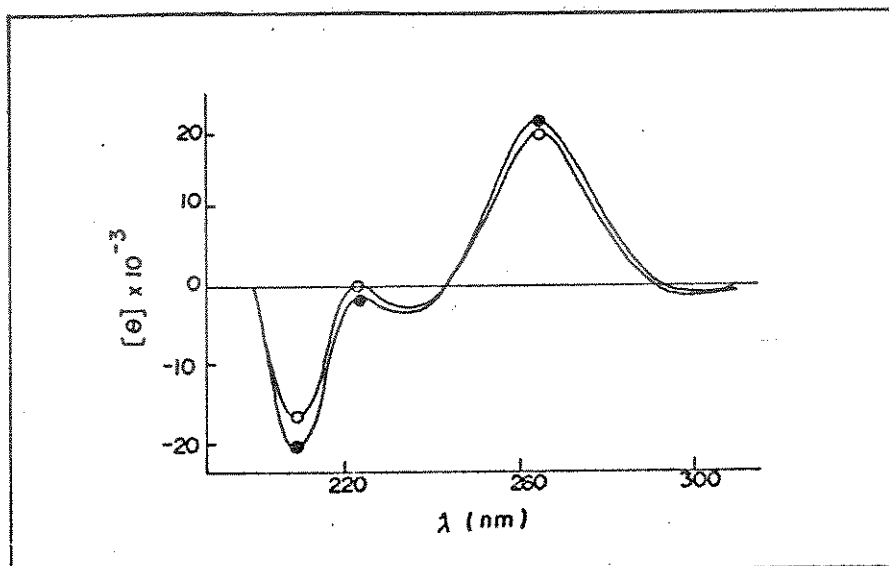


Fig. A.1.5 : CD de tRNA de E.coli com 15mM de Mg^{+2} (●) e sem Mg^{+2} (○) (245).

Todos estes experimentos comprovam que o CD é uma ferramenta muito útil no estudo de ácidos nucleicos.

Além do dicroísmo circular, outra técnica para se verificar alterações em tRNA, é a cromatografia em camada delgada.

APÊNDICE II

Aplicação da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) em ácidos nucleicos

Randerath e col. (246) fizeram experimentos utilizando CCD. Excelentes separações de tioálcoois de nucleosídeos marcado com trítio, derivados de RNA por digestão enzimática e incorporação química de trítio, foram obtidos em camadas delgadas de celulose fibrosa. Uma comparação mostrou que este procedimento é superior à separação destes compostos em camada delgada de celulose microcristalina, com respeito à resolução e precisão dessas análises quantitativas. Estes autores fizeram uma análise da composição das bases de tRNA pela técnica descrita acima. Primeiro foi feita uma digestão enzimática do polinucleotídeo, para dar uma mistura de nucleosídeos, e o trítio foi incorporado aos componentes da digestão pelo tratamento com NaIO_4 (periodato de sódio) $[\text{}^3\text{H}] \text{KBH}_4$ (boridreto de potássio tritiado), convertendo os nucleosídeos em tioálcoois de nucleosídeos marcados com trítio. Depois disto foi feita a cromatografia em camada delgada de celulose, e a composição da mistura foi verificada por contagem de cintilação líquida.

Os autores concluíram que este método foi muito útil pois obtiveram uma boa análise da composição das bases.

Thomas e col. (145) estudaram a distribuição de tiorucleotídeos em estirpes de E.coli normal (AB 1157) e mutant (PM2). O tRNA (de E.coli) foi marcado com ^{35}S segundo o método c

Brownlee (247). 0,15 unidades de ^{35}S tRNA ($A_{260\text{nm}}$) de AB 1157 ou PM2 foram digeridos com RNAase T₂ e cromatografados em polietilenoimina-celulose, de acordo com Gupta e col. (248). Os resultados estão na figura A.II.1. Pela análise cromatográfica, um mutante exibindo uma completa falta de 4-TU em seu tRNA, pode ser caracterizado.

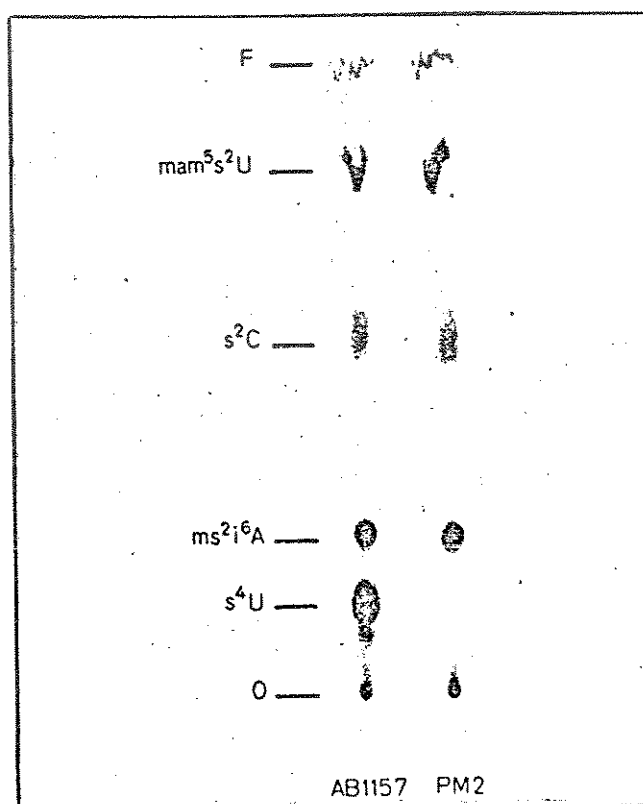


Fig. A.II.1 : Distribuição de tionucleotídeos em estirpes de *E. coli*, normal (AB1157) e mutante (PM2). O:origem; F:solvente frontal. As abreviaturas se referem a nucleotídeo-3'-fosfato : ms^2i^6A , ácido 2-metiltio-6-isopentenil adenílico; s^4U , ácido 4-tiouridílico; s^2C , ácido 2-tiocitidílico; mam^5s^2U , ácido 5-metilaminometil-2-tiouridílico. Eluente: isopropanol/HCl conc./água (70:15:15) (145).

APENDICE III

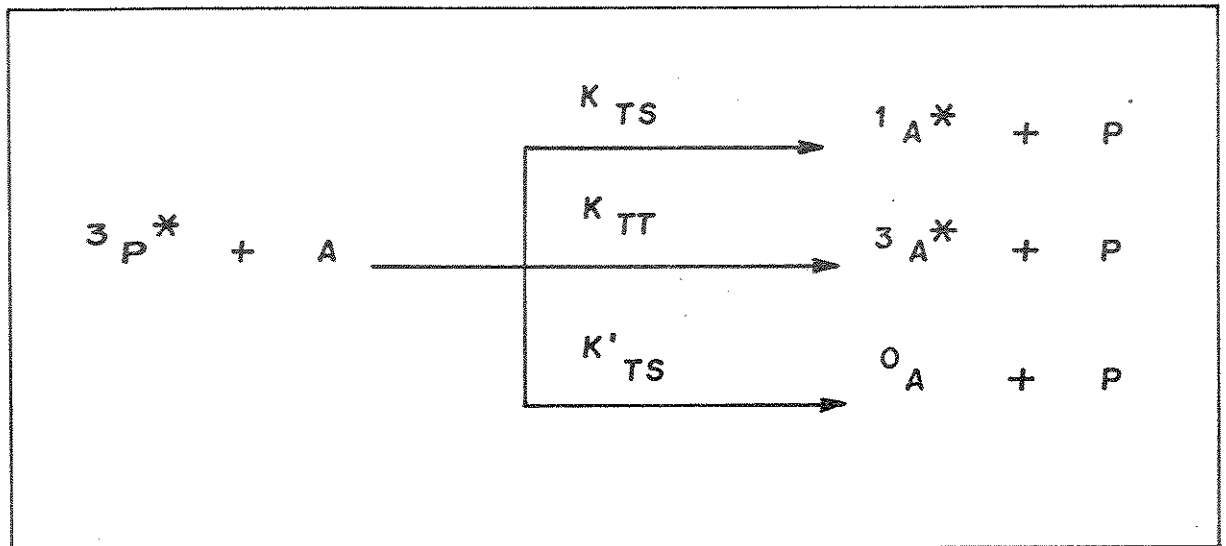
Métodos utilizados no estudos da transferência de energia em sistemas biofotoenergizados

Sistemas biofotoenergizados são aqueles formados por reações enzimáticas nas quais há formação de produtos em estado eletronicamente excitado. Esta energia pode sofrer vários processos de desativação, como emissão de luz (fosforescência ou fluorescência), reação e/ou transferência de energia.

A transferência de energia se tornou uma ferramenta muito útil para elucidar mecanismos de reações biofotoenergizadas para se obter informações de estados excitados moleculares que não podem ser obtidas por métodos espectroscópicos comuns. Assim é descrito a seguir o método que tem sido utilizado em estudos de transferência de energia em sistemas biofotoenergizados.

III.1. Cálculo do $K_{ET} \tau^0$

Neste estudo são empregadas substâncias chamadas "aceptadores emissivos" que cumprem o papel de receber a energia do doador e emitir sua própria luminescência com maior eficiência. Assim, podemos representar este processo no esquema I a seguir.



Esquema A.I:

onde k_{TS} é a constante de velocidade de transferência de energia do estado triplete do doador para o singlete do aceitador; k_{TT} é a constante para transferência do estado triplete do doador para o triplete do aceitador; e k'_{TS} é aquela para a transferência do triplete do doador para o singlete fundamental do aceitador.

Da equação do estado estacionário para este processo,

temos:

$$\frac{1}{I_A} = \frac{k_d}{\phi_F^A k_1 k_{TS} [D]} \cdot \frac{1}{[A]} + \frac{k_{TS} + k_{TI} + k'_{TS}}{\phi_F^A k_1 k_{TS} [D]}$$

eq. A.III.1

Eq.A.III.1 : onde k_d é a constante de decaimento da espécie excitada; k_1 é a constante de formação do estado excitado do doador; e ϕ_F^A é o rendimento quântico de fluorescência do aceitador.

Se for feito um estudo da cinética de emissão do sistema adicionando-se concentrações crescentes do aceitador, será obtido um gráfico do tipo mostrado abaixo:

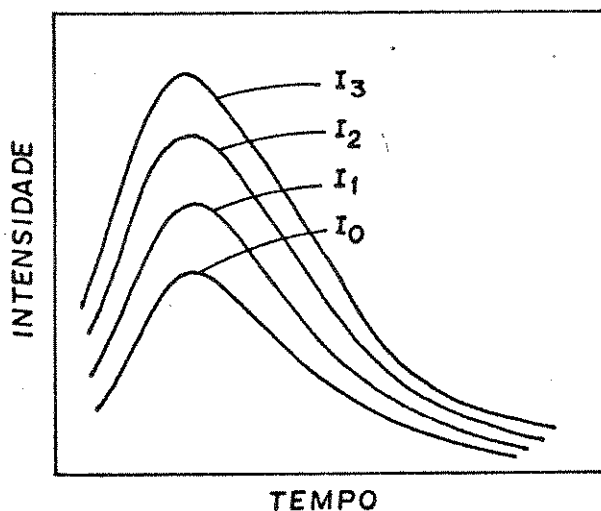


Fig. A.III.1 : Gráfico da cinética de emissão na presença de aceitadores emissivos.

Onde, no gráfico da fig.A.III.1, I_0 é a intensidade máxima de emissão do sistema sem aceltador, e I_1 , I_2 e I_3 são as intensidades máximas de emissão do sistema na presença de quantidades crescentes A_1 , A_2 e A_3 do aceltador, respectivamente. Nestas medidas tem-se sempre um erro de 3-5%.

Tendo se estes dados, pode-se fazer, segundo a equação III.1, um gráfico duplo recíproco de $1/I$ (*) em função de $1/[A]$, mostrado na figura A.III.2:

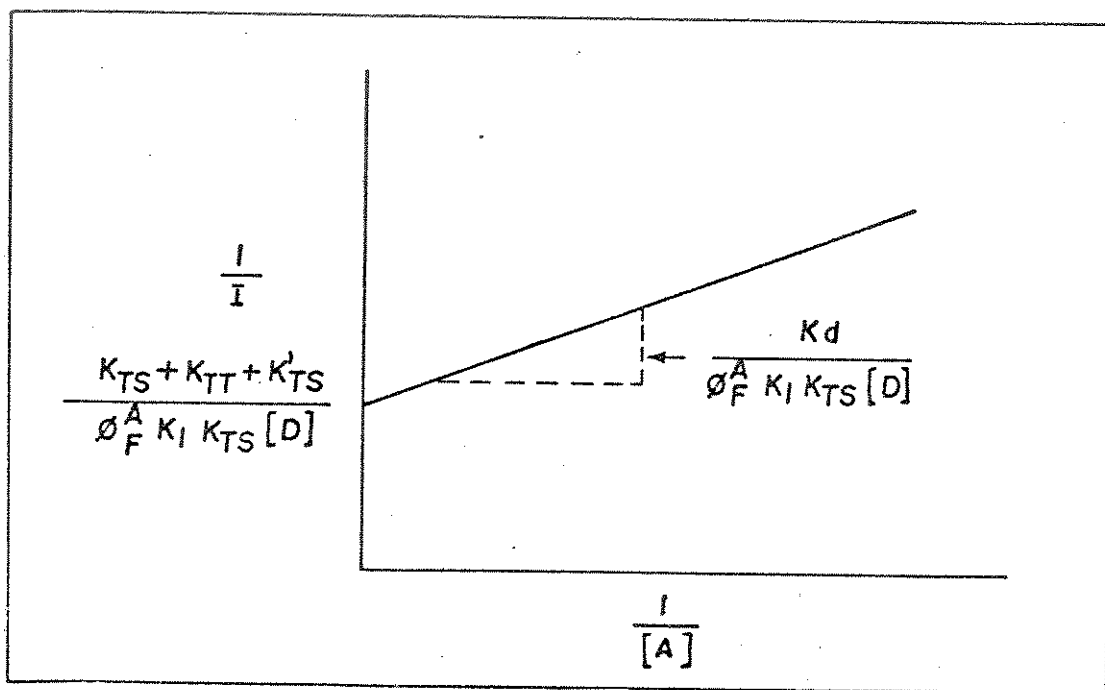


Fig. A.III.2 : Gráfico duplo recíproco para o efeito de aumento de emissão por ação de aceltadores emissivos. Onde o coeficiente angular é $K_d / \phi_F^A k_1 k_{TS} [D]$ e o coeficiente linear, $K_{TS} + K_{TT} + K'_{TS} / \phi_F^A k_1 k_{TS} [D]$.

(*) Quando o gráfico da cinética é simétrico pode-se usar a intensidade máxima, caso contrário usa-se a intensidade integrada a um determinado tempo.

Da relação coeficiente linear/coeficiente angular pode-se obter $[k_{TS} + k_{TT} + k'_{TS}] / k_d$. Sabendo-se que a vida média da espécie excitada (τ^0) é $1/k_d$ e, chamando de K_{ET} a soma das constantes k_{TS} , k_{TT} e k'_{TS} , temos que o quociente coeficiente linear/coeficiente angular dá o valor $K_{ET}\tau^0$, o qual serve de parâmetro comparativo entre os vários sistemas. Além disso, considera-se que para os valores de $K_{ET}\tau^0$ menores que 10^3 M^{-1} , o mecanismo envolvido na transferência é colisional, e valores maiores que 10^3 M^{-1} indica um processo a longa distancia, embora atualmente se saiba que estes extremos não são totalmente válidos.

III.2. Cálculo de K_{SV} ou $k_q\tau^0$

Para este estudo são empregadas substâncias chamadas supressores, que recebem energia do doador e consomem-na através de processos não emissivos. Assim, ao ser feita a cinética de emissão de um sistema e se for adicionada a cada medida uma concentração maior do supressor, será obtido um gráfico do tipo mostrado na figura A.III.3.

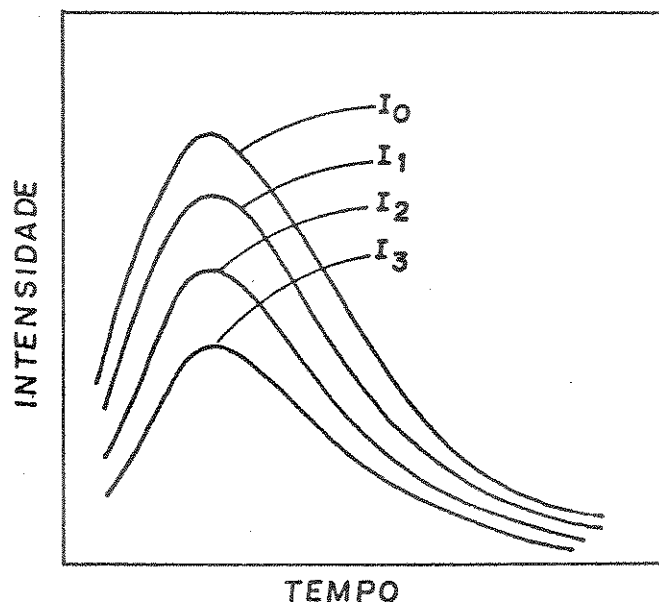


Fig. A.III.3 : Gráfico da cinética de emissão na presença de supressores.

onde I_0 , I_1 , I_2 e I_3 são as intensidades máximas de emissão sem supressor e com quantidades Q_1 , Q_2 e Q_3 respectivamente , sendo $Q_1 < Q_2 < Q_3$.

Conhecendo-se a equação de Stern-Volmer para um supressor:

$$I_0/I_q = 1 + k_q \tau^0 [Q] \quad \text{Eq.A.III.2}$$

onde k_q é a constante de supressão e τ^0 é a vida média da espécie emissora; pode se fazer um gráfico chamado Stern-Volmer de I_0 / I_q em função de $[Q]$ (fig.A.III.4).

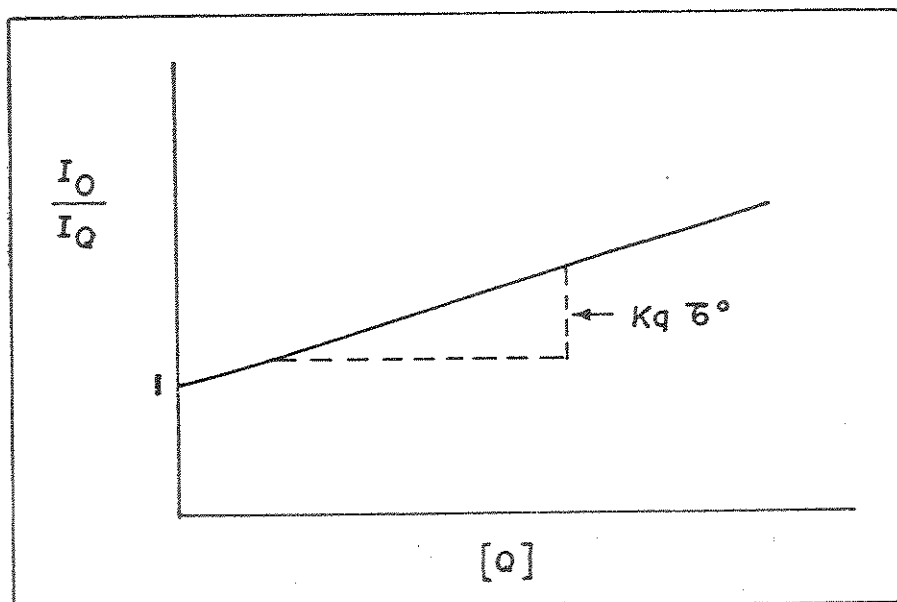
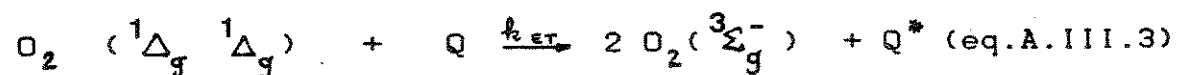


Fig. A.III.4 : Gráfico de Stern-Volmer para o efeito de supressão de emissão.

Neste gráfico, o coeficiente linear é 1 e o coeficiente angular é $k_q \tau^0$ ou K_{sv} o qual serve também como parâmetro de comparação entre os vários sistemas estudados.

No presente estudo foi utilizada a histidina (36), um supressor de oxigênio singlete.

Para o caso do oxigênio singlete cuja emissão é bimol:



Então, para concentrações baixas de Q , o gráfico é linear (249). Portanto, a equação A.III.2, fica:

$$I_0/I_q = 1 + 2 K_{sv} [Q] \quad \text{eq.A.III.4}$$

e o valor do K_{sv} (48):

$$K_{sv} = k_q \tau^{\circ} / 2 \quad \text{eq.A.III.5}$$

III.3. Cálculo de β

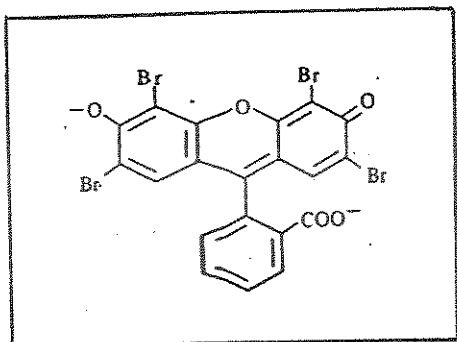
Nos sistemas onde há efeito de supressores de oxigênio singlete, pode-se calcular o valor de β que é a concentração de supressor necessária para aniquilar 50% do oxigênio singlete formado (216).

Considerando-se a equação A.III.2 e fazendo-se $I_q = I_0/2$ e $[Q] = \beta$, tem-se o valor de β igual ao valor recíproco da constante de Stern-Volmer ($1/k_q \tau^{\circ}$).

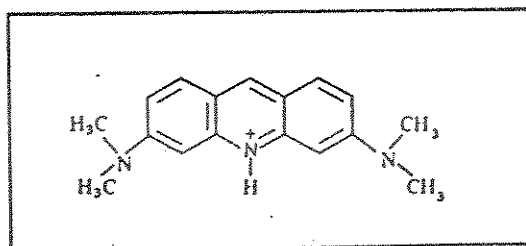
APENDICE IV

Estrutura de alguns compostos utilizados neste trabalho

Corantes

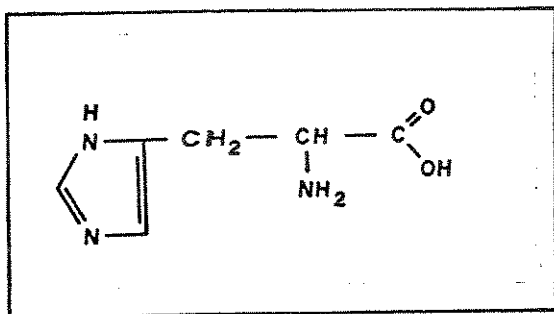


eosina

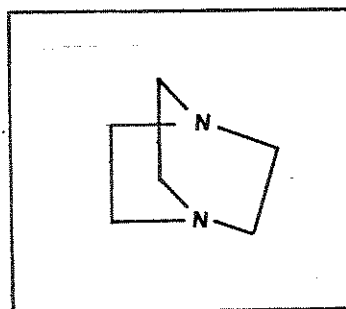


acridina laranja

Supressores:

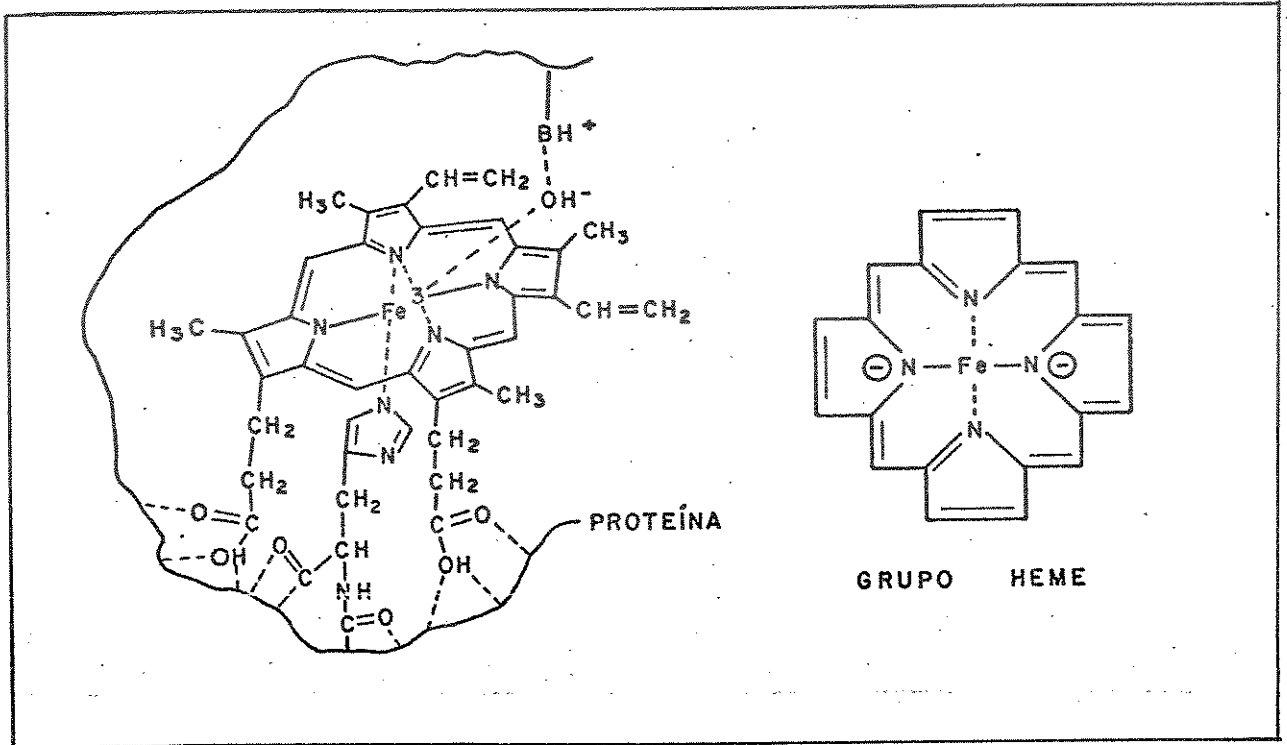


histidina



DABCO

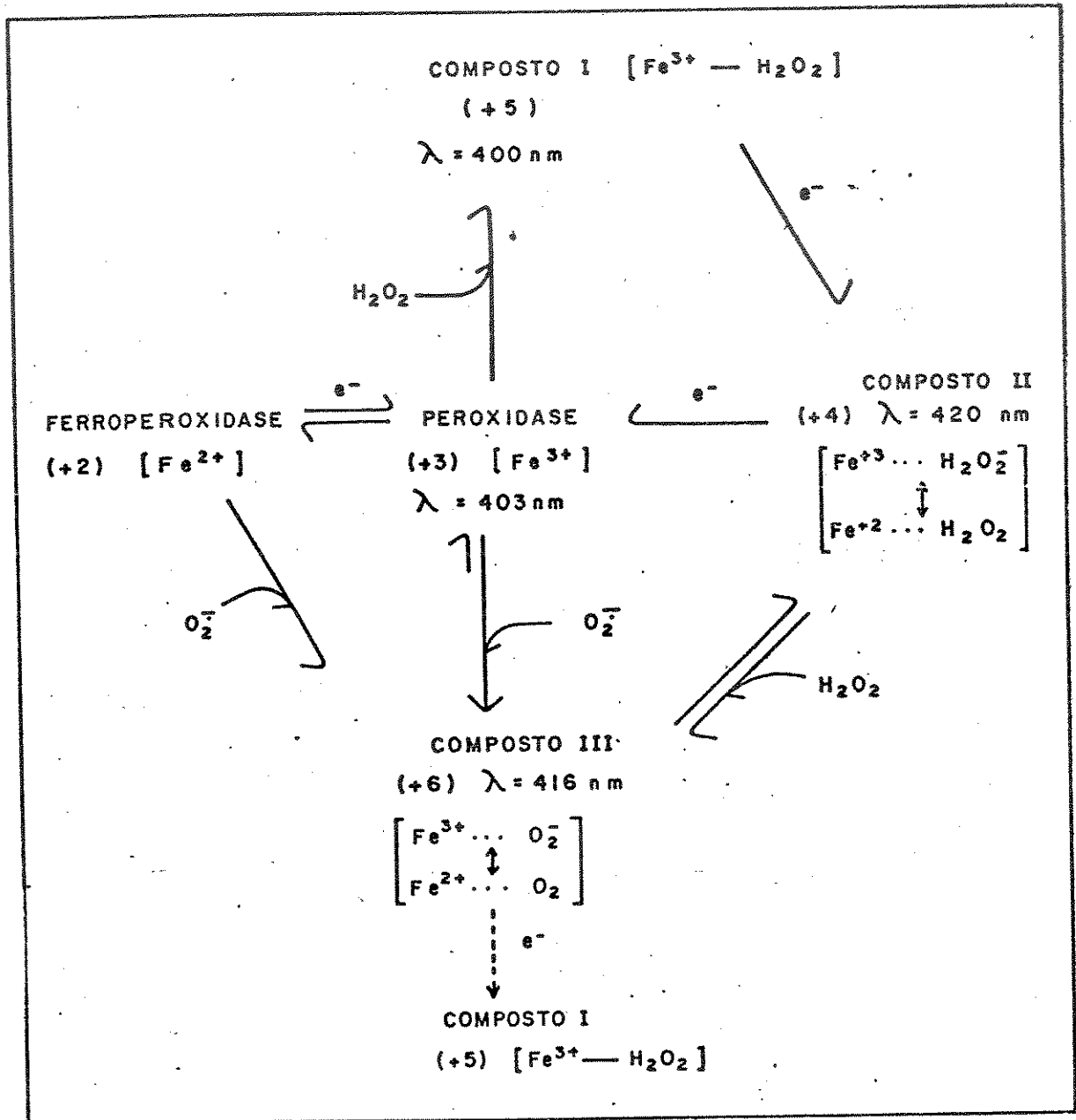
Enzima:



onde BH = grupo imidazólico de um resíduo de histidina

HRP (peroxidase do rabanete)

Ciclo da peroxidase



Bibliografia

- (1) N.J.Turro e A.A.Lamola, em "The Science of Photobiology" K.C.Smith, Ed) Benjamin/Cummings Co.Inc., California, p.63 (1977).
- (2) P.A.Leemakers, "Fundamental Concepts - Energy Transfer and Organic Photochemistry", Interscience Publishing, N.Y., 14, 9, (1969).
- (3) N.J.Turro, "Modern Molecular Photochemistry", Benjamin / Cummings Publishing Co.Inc., California, p.3 (1978).
- (4) G.Cilento, K.Zinner, E.J.H.Bechara, N.Durán, R.Casadel de Baptista, Y.Shimizu, O.Augusto, A.Faljoni, C.C.C.Vidigal, O.M.M.Faria Oliveira e M.Haun, Ciência e Cultura, 31, 290 (1979).
- (5) D.M.Hercules, Acc.Chem.Res., 2, 301 (1969).
- (6) R.F.Vassil'ev, Prog.React.Kinet., 4, 305 (1967).
- (7) J.A.Howard e K.U.Ingold, J.Am.Chem.Soc., 90, 1056 (1968).
- (8) R.E.Kellog, J.Am.Chem.Soc., 91, 5433 (1969).
- (9) K.R.Kopecky e C.Mumford, Can.J.Chem., 47, 709 (1969).
- (10) F.McCapra, Prog.Org.Chem., 8, 231 (1973).
- (11) W.Adam, Adv.Heter.Chem., 21, 437 (1977).
- (12) K.A.Horn, J.-Y.Koo, S.P.Schmidt e G.B.Schuster, Mol.Photochem., 9, 1 (1973).
- (13) T.Wilson, J.Am.Chem.Soc., 93, 4126 (1976).
- (14) E.J.H.Bechara, A.L.Baumstark e T.Wilson, J.Am.Chem.Soc. 98, 4648 (1976).
- (15) T.Wilson, em "Chemical Kinetic" (MPT, Ed.) Int.Rev.Sci., Butherworth, Londres, p.265 (1976).
- (16) W.Adam, N.Durán e G.A.Simpson, J.Am.Chem.Soc., 97, 5464 (1975).
- (17) G.Cilento, Photochem.Photobiol.Rev., 5, 199 (1980).
- (18) J.Lee, em "The Science of Photobiology" (K.C.Smith, Ed.) Benjamin/Cummings Publishing Co.Inc., N.Y., p.371 (1977).
- (19) O.Shimomura, em "Chemical and Biological Generation of Excited States" (W.Adam e G.Cilento, Eds.) Academic Press,

- N.Y., p.250 (1982).
- (20) R.Dubois, C.R.Séanc.Soc.Biol.Fr., 39, 564 (1887).
- (21) J.W.Hastings, Curr.Top.Bioenerg., 1, 133 (1966).
- (22) J.W.Hastings, "Energy Transformations in Biological Systems", CIBA Foundation Symposium, Elsevier, Amsterdam, 31, 125 (1975).
- (23) H.H.Seliger e W.D.McElroy, Arch.Biochem.Biophys., 88, 136 (1960).
- (24) T.H.Hopkins, H.H.Seliger, E.H.White e M.W.Cass, J.Am. Chem.Soc., 89, 7148 (1967).
- (25) Y.Kishi, T.Goto, S.Inone, S.Sugiura e H.Kishimoto, Tetrahedron Lett., 3445 (1966).
- (26) K.Hori, J.C.Wampler, J.C.Mathews e M.J.Cormier, Biochemistry, 12, 4463 (1973).
- (27) F.McCapra e R.Wrigglesworth, J.Chem.Soc.Commun., 91, (1966).
- (28) N.Durán, J.E.Brunet e H.Gallardo, Biochem.Ed., 12, 173 (1984).
- (29) a:M.J.Cormier e J.R.Totler, Ann.Rev.Biol.Chem., 33, 431 (1964); b:E.Cadenas, em "Oxidative Stress" (H.Sies, Ed.) Academic Press, Londres, p.311 (1985).
- (30) F.McCapra, Acc.Chem.Res., 9, 201 (1976).
- (31) G.Cilento, Acc.Chem.Res., 13, 225 (1980).
- (32) W.H.Richardson, M.B.Yalvington e H.F.O'Neal, J.Am. Chem.Soc., 94, 1619 (1972).
- (33) a:W.Adam e G.Cilento, Angew.Chem.Int.Ed.Engl., 22, 529 (1983); b:G.Cilento, Pure Appl.Chem., 56, 1179 (1984).
- (34) F.McCapra, Chem.Commun., 155 (1968).
- (35) G.B.Schuster e K.A.Horn, em "Chemical and Biological Generation of Excited States" (W.Adam e G.Cilento, Eds.) Academic Press, N.Y., p.229 (1982).
- (36) C.S.Foote, em "Free Radicals in Biology" (W.A.Pryor, Ed.) Academic Press, N.Y., 2, 85 (1976).
- (37) I.L.Brunetti, G.Cilento e L.Nassi, Photochem.Photobiol., 38, 511 (1983).
- (38) R.H.Kenten, Biochem.J., 55, 350 (1953).

- (39) N.Durán, O.M.M.Faria Oliveira, M.Haun e G.Cilento, J.Chem Soc., Chem.Comm., 442 (1977).
- (40) L.A.Guillo, S.M.De Toledo e N.Durán, Photobiochem. Photobiophys., 6, 177 (1983).
- (41) N.Durán e G.Cilento, Photochem.Photobiol., 32, 113 (1980).
- (42) M.Haun, N.Durán e G.Cilento, Biochem.Biophys.Res. Commun., 81, 779 (1978).
- (43) O.Augusto e G.Cilento, Photochem.Photobiol., 30, 191 (1979).
- (44) O.Augusto, G.Cilento, J.Jung e P.-S.Song, Biochem. Biophys.Res.Comm., 83, 963 (1978).
- (45) G.Cilento, em "Chemical and Biological Generation of Excited States" (W.Adam e G.Cilento, Eds.) Academic Press, N.Y., p.278 (1982).
- (46) M.Haun, N.Durán, O.Augusto e G.Cilento, Arch.Biochem. Biophys., 200, 245 (1980).
- (47) C.Vidigal-Martinelli, K.Zinner, B.Kachar, N.Durán e G.Cilento, FEBS Lett., 108, 266 (1979).
- (48) N.Durán, S.T.Farias-Furtado, A.Faljoni-Alário, A.Campa, J.E.Brunet e J.Freer, J.Photochem., 25, 285 (1984).
- (49) V.S.Kalyanaraman, S.Mahdevan e S.A.Kumar, Biochem.J., 149, 565 (1975).
- (50) C.C.C.Vidigal, A.Faljoni-Alário, N.Durán, K.Zinner, Y. Shimizu e G.Cilento, Photochem.Photobiol., 30, 195 (1979).
- (51) C.C.C.Vidigal, K.Zinner, N.Durán, E.J.H.Bechara e G.Cilento, Biochem.Biophys.Res.Comm., 65, 138 (1975).
- (52) N.Durán, K.Zinner, R.Casadel de Baptista, C.C.C.Vidigal e G.Cilento, Photochem.Photobiol., 24, 383 (1976).
- (53) K.Zinner, C.C.C.Vidigal-Martinelli, N.Durán, A.J.Marsalotti e G.cilento, Biochem.Biophys.Res.Comm., 92, 32 (1980).
- (54) K.Zinner, C.C.C.Vidigal, N.Durán e G.Cilento, Arch.Biochem.Biophys., 180, 452 (1977).
- (55) G.Cilento, Quant.Rev.Biophys., 6, 485 (1973).
- (56) A.A.Lamola, Biochem.Biophys.Res.Comm., 43, 893 (1971).

- (57) G.Cilento, M.Nakano, H.Fukuyama, K.Suwa e I.Kamiya, Biochem.Biophys.Res.Commun., 58, 296 (1974).
- (58) E.Wong e J.M.Wilson, Phytochemistry, 15, 1325 (1976).
- (59) T.Galliard e J.A.Mathew, Phytochemistry, 16, 339 (1977).
- (60) T.Galliard e J.A.Mathew, Biochim.Biophys.Acta, 424, 26 (1976).
- (61) O.Augusto e G.Cilento, Biochem.Biophys.Res.Commun, 79, 1238 (1977).
- (62) E.H.Allen e R.S.Schweet, Biochim.Biophys.Acta, 39, 185 (1960).
- (63) M.Y.Feldman, Prog.Biophys.Molec.Biol., 32, 83 (1977).
- (64) B.F.C.Clark, Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol., 20, 1 (1977).
- (65) K.Beadsley, T.Tao e C.R.Cantor, Biochemistry, 18, 3254 (1979).
- (66) R.W.Holley, J.Apgar, G.A.Everett, J.T.Madison, M.Marquisee, S.H.Merrill, J.R.Penswick e A.Zamir, Science, 174, 1462 (1965).
- (67) J.D.Watson e F.C.Crick, Nature (Lond.), 171, 737 (1953).
- (68) J.D.Robertus, J.E.Ladner, J.T.Finch, D.Rhodes, R.S.Brown, B.F.C.Clarck e A.Klug, Nature, 250, 546 (1974).
- (69) S.-H.Kim, F.L.Suddath, G.J.Quigley, A.McPherson, J.L.Sussman, A.H.J.Wang, N.C.Seeman e A.Rich, Science, 185, 435 (1974).
- (70) A.Rich e S.-H.Kim, Sci.Am., 238, 52 (1978).
- (71) B.N.Ames e P.E.Hartman, Col.Spring Harbor Symp.Quant. Biol., 28, 349 (1963).
- (72) N.Sueoka e T.Kano-Sueoka, Proc.Nat.Acad.Sci., US, 52, 1535 (1964).
- (73) D.S.Letham, em "The Ribonucleic Acids" (P.R.Stewart e D.S.Letham, Eds.) Springer-Verlag, N.Y., p.81 (1973).
- (74) A.Favre, A.M.Michelson e M.Yaniv, J.Mol.Biol., 58, 367 (1971).
- (75) J.P.Goddard, Prog.Biophys.Mol.Biol., 32, 83 (1977).
- (76) D.Yoshikami, G.Katz, E.B.Keller e B.S.Dudock, Biochem. Biophys.Res.Commun., 166, 714 (1968).

- (77) N. Shalitin, J.Chem.Phys., 59, 1045 (1973).
- (78) N. Shalitin e J. Feltelson, Biochemistry, 15, 2092 (1976).
- (79) M. N. Lipset, J. Biol. Chem., 240, 3975 (1965).
- (80) M. N. Lipset, Biochem. Biophys. Res. Commun., 20, 244 (1965).
- (81) R. H. Griffey, D. Davis, Z. Yamazumi, S. Nishimura, A. Bax, B. Hawkins e C. D. Poulter, J. Biol. Chem., 260, 9374 (1985).
- (82) F. Pochon, C. Balny, K. H. Schelt e A. M. Michelson, Biochim. Biophys. Acta, 228, 9 (1971).
- (83) P. Sarkar e J. T. Yang, Arch. Biochem. Biophys., 112, 512 (1965).
- (84) J. T. Penniston e P. Doty, Biopolymers, 1, 145 (1963).
- (85) M. Cohn, A. Danchin e M. Grunberg-Manago, J. Mol. Biol., 39, 199 (1968).
- (86) A. Danchin e M. Guernón, Eur. J. Biochem., 16, 532 (1970).
- (87) D. Labuda, K. Nicoghosian e R. Cedergren, J. Biol. Chem., 260, 1103 (1985).
- (88) G. Rialdi, J. Levy e R. Biltonen, Biochemistry, 11, 2472 (1972).
- (89) R. Romer e R. Hach, Eur. J. Biochem., 55, 271 (1975).
- (90) R. H. Reeves, C. R. Cantor e R. W. Chambers, Biochemistry, 9, 3993 (1970).
- (91) D. P. Ringer, B. A. Howell e D. E. Kizer, Anal. Biochem., 103, 337 (1980).
- (92) J. M. Wolfson e D. R. Kearns, Biochemistry, 14, 1436 (1975).
- (93) B. R. Brooks e D. L. Klammerth, Eur. J. Biochem., 5, 178 (1968).
- (94) V. Reiss, A. L. Tappel e K. S. Chio, Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 921 (1972).
- (95) S. T. Farias-Furtado, Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas, 1982.
- (96) K. E. Wolter e J. C. Gordon, Physiol. Plant., 33, 219 (1975).
- (97) D. J. Armstrong, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 65, 39 (1966).
- (98) M. Szabo, P. V. Scarpino e C. Rogers, J. Agric. Food Chem., 23, 212 (1975).

- (99) M. P. De Mello, S. M. De Toledo, H. Aoyama, H. K. Sarkar, G. Cilento e N. Durán, Photochem. Photobiol., 36, 21 (1982).
- (100) S. J. Arnold e E. A. Ogryzlo, Can. J. Phys., 45, 2053 (1967).
- (101) J. Cadet e R. Teoule, Photochem. Photobiol., 28, 66 (1978).
- (102) C. S. Foote, Acc. Chem. Res., 1, 104 (1968).
- (103) N. Washida, H. Akimoto e M. Okuda, J. Phys. Chem., 82, 18 (1978).
- (104) D. F. Evans e J. Tucker, J. Chem. Soc. Faraday Trans. II, 72, 1661 (1976).
- (105) I. R. Politzer, G. W. Griffin e J. L. Laseter, Chem. Biol. Interact., 3, 73 (1971).
- (106) N. V. Shinkarenko e V. B. Aleskovskii, Russ. Chem. Rev., 51, 407 (1982).
- (107) D. Bellus, Adv. Photochem., 17, 105 (1979).
- (108) F. Harber e J. Weiss, Proc. R. Soc. London Ser. A, 147, 332 (1934).
- (109) E. F. Kellog, III e J. Fridovich, J. Biol. Chem., 250, 8812 (1975).
- (110) V. Takahama e M. Nishimura, Plant. Cell. Physiol., 16, 737 (1975).
- (111) H. R. Rawls e P. J. Van Santen, J. Am. Oil Chem. Soc., 47, 121 (1970).
- (112) R. M. Arneson, Arch. Biochem. Biophys., 136, 352 (1970).
- (113) N. I. Krinsky, Trends Biochem. Sci., 2, 35 (1977).
- (114) N. Durán, em "Chemical and Biological Generation of Excited States" (W. Adam e G. Cilento, Eds.) Academic Press N. Y., p. 345 (1982).
- (115) C. S. Foote, em "Biochemical and Clinical Aspects of Oxygen" (E. W. S. Coughy, Ed.) Academic Press, N. Y., p. 603 (1979).
- (116) K. Gollnick e G. D. Schenk, Pure Appl. Chem., 9, 23 (1963).
- (117) E. J. Bowen, Advan. Photochem., 1, 23 (1963).
- (118) R. Livingston e V. Subba Rao, J. Phys. Chem., 63, 794 (1959).
- (119) T. Wilson, J. Am. Chem. Soc., 88, 2898 (1966).

- (120) H.Kautsky, Biochem.Z., 291, 271 (1937).
- (121) J.A.Howard e K.U.Ingold, J.Am.Chem.Soc., 90, 1056 (1968).
- (122) O.Hayaishi e M.Nozaki, Science, 164, 389 (1969).
- (123) a: A.L.Tappel, P.D.Boyer e W.O.Lundberg, J.Biol.Chem., 199, 267 (1952); b: L.L.Ingraham, em "Comprehensive Biochemistry" (M.Florkin e E.H.Stolz, Eds.) Elsevier, Amsterdam, 14, 424 (1966).
- (124) C.S.Foote, Pure Appl.Chem., 27, 635 (1971).
- (125) a: T.Matsuura, H.Matsushima e H.Sakamoto, J.Am.Chem.Soc., 89, 6370 (1970); b: T.Matsuura, H.Nishinaga, N.Yoshimura, T.Arai, K.Omura, H.Matsushima e R.Nakashima, Tetrahedron, 26, 435 (1970).
- (126) H.W.-S.Chan, J.Am.Chem.Soc., 93, 2357 (1971).
- (127) A.Finazzi Agro, P.De Sole, G.Rotilio e B.Mondon, Ital.J. Biochem., 22, 217 (1973).
- (128) H.W.-S.Chan J.Am.Chem.Soc., 93, 4632 (1971).
- (129) T.C.Pederson e S.D.Aust, Biochem.Biophys.Res.Commun., 52, 1071 (1973).
- (130) M.M.King, E.F.Lai e P.McCay, J.Biol.Chem., 250, 6496 (1975).
- (131) J.F.Platt, A.S.Cheema e P.J.O'Brien, FEBS Lett., 74, 251 (1977).
- (132) N.I.Krinsky, em "Survival of Vegetative Microbes" (T.R.G. Gray e J.R.Postage, Eds.) Cambridge, Londres, p.209 (1976).
- (133) M.M.Mathews-Roth, M.A.Pathak, T.B.Fitzpatrick, L.C.Harber e E.J.Kass, J.Am.Med.Assoc., 228, 1004 (1974).
- (134) C.S.Foote e M.P.Easton, em "VII Inter.Congress on Photobiology", Abstr., August, Roma, Itália, p.136 (1976).
- (135) M.J.Thomas e C.S.Foote, Photochem.Photobiol., 27, 683 (1978).
- (136) N.I.Krinsky, Photophysiology, 3, 123 (1968).
- (137) S.M.Anderson e N.I.Krinsky, Photochem.Photobiol., 18, 403 (1973).
- (138) S.M.Anderson, N.I.Krinsky, M.J.Stone e D.C.Clagett, Photochem.Photobiol., 20, 65 (1974).

- (139) W.A.Maxwell, J.D.McMillan e C.O.Chichester, Photochem. Photobiol., 5, 567 (1966).
- (140) M.M.Mathews-Roth e N.I.Krinsky, Photochem.Photobiol., 11, 419 (1970).
- (141) M.M.Mathews-Roth e N.I.Krinsky, Photochem.Photobiol., 11, 555 (1970).
- (142) J.Bland, J.Chem.Ed., 53, 274 (1976).
- (143) P.B.Merkel, R.Nilsson e D.R.Kearns, J.Am.Chem.Soc., 94, 1030 (1972).
- (144) O.Reitz e K.F.Bonhoeffer, Z.Phys.Chem.A., 172, 369 (1935).
- (145) G.Thomas e A.Favre, Eur.J.Biochem., 113, 67 (1980).
- (146) A.Favre, M.Yaniv e A.M.Michelson, Biochem.Biophys.Res. Commun., 37, 266 (1969).
- (147) M.Yaniv, A.Favre e B.G.Barrel, Nature (Lond.), 223, 1331 (1969).
- (148) A.Favre, R.Buckingham e G.Thomas, Nucleic Acids Res., 2, 1421 (1975).
- (149) D.S.Carré, G.Thomas e A.Favre, Biochimie (Paris), 56, 1089 (1974).
- (150) P.Delanay, J.Bierbaum e J.Ofegand, Arch.Biochem.Biophys., 161, 260 (1974).
- (151) T.V.Ramabhadram, T.Fossum e J.Jagger, Photochem.Photobiol., 23, 315 (1976).
- (152) A.Favre, em "Trends in Photobiology" (C.Helene, M.Charlier, Th.Montenay-Garestier e G.Laustriat, Eds.), Plenum Publishing Co., N.Y., p.413 (1982).
- (153) D.E.Bergstrom e N.J.Leonard, Biochemistry, 11, 1 (1972).
- (154) A.Favre, B.Roques e J.L.Fourrey, FEBS Lett., 17, 236 (1972).
- (155) L.Gatterman e H.Schulze, Ber., 29, 2944 (1896).
- (156) L.Carlsen, J.Org.Chem., 41, 2971 (1976).
- (157) R.Rajee e V.Ramamurthy, Tetrahedron Lett., 3463 (1978).
- (158) A.Schonberg e A.Mostafa, J.Chem.Soc., 275 (1943).
- (159) J.E.Gano e S.Atik, Tetrahedron Lett., 4635 (1979).

- (160) V. Jayathertha-Rao e V. Ramamurthy, Indian J. Chem. Sect. B, 143 (1980).
- (161) N. Ramnath, V. Ramesh e V. Ramamurthy, J. Org. Chem., 48, 214 (1983).
- (162) S. Tamagaki, R. Akatsuka M. Nakamura e S. Ozuka, Tetrahedron Lett., 3665 (1979).
- (163) V. Ramesh, N. Ramnath, V. Jayathertha-Rao e V. Ramamurthy, J. Photochem., 18, 109 (1982).
- (164) V. Ramesh, N. Ramnath e V. Ramamurthy, J. Photochem., 18, 293 (1982).
- (165) S. Tamagaki, R. Akatsuka e Z. Kozuka, Mem. Fac. Eng. Ozaka City Univer., 20, 97 (1979).
- (166) M. Pleiss, H. Ochiai e P. A. Cerutti, Biochem. Biophys. Res. Commun., 34, 70 (1969).
- (167) D. J. Brown, "The Pyrimidines", Interscience Publishing, N. Y., p. 243, 277 (1962).
- (168) E. C. Taylor e C. C. Cheng, J. Org. Chem., 25, 148 (1960).
- (169) N. Durán, M. C. Marcucci, M. P. De Mello e A. Faljoni-Alário, Biochem. Biophys. Res. Commun., 117, 923 (1983).
- (170) M. P. De Mello, S. M. De Toledo e N. Durán, Acta Sud. Am. Quim., 1, 135 (1981).
- (171) M. P. De Mello, S. M. De Toledo, M. Haun, G. Cilento e N. Durán, Biochemistry, 19, 5270 (1980).
- (172) N. Durán, M. C. Marcucci, M. P. De Mello, L. C. C. Leite e A. Faljoni-Alário, Photochem. Photobiol., 39, 80s (1982).
- (173) M. Kuwano, Y. Hayashi, H. Hayashi e K. Miura, J. Mol. Biol., 32 659 (1968).
- (174) A. Tsugita, Y. Okada e K. Uehara, Biochim. Biophys. Acta, 103, 360 (1965).
- (175) K. Sivarama e M. P. Gordon, Biochim. Biophys. Acta, 129, 32 (1966).
- (176) G. B. Orlob, Virology, 31, 402 (1967).
- (177) J. Amagasa e T. Ito, Radiat. Res., 43, 45 (1970).
- (178) T. Ito, Photochem. Photobiol., 28, 493 (1978).
- (179) K. Kobayashi e T. Ito, Photochem. Photobiol., 25, 385 (1977).

- (180) a: G.D.Sprott, W.G.Martin e H.Schneider, Photochem.Photobiol., 24, 21 (1976); b: S.Matsumoto, Jap.J.Genet., 49, 275 (1974).
- (181) M.J.Peak, J.G.Peak e L.Nerad, Photochem.Photobiol., 37, 169 (1983).
- (182) A.Hollaender e C.M.Emmons, Cold Spring Harbor Symp.Biol., 11, 78 (1946).
- (183) H.F.Blum, em "Carcinogenesis by Ultraviolet Light", Princeton University Press, Princeton, N.J. (1959).
- (184) J.H.Epstein, em "Photophysiology" (A.C.Giese, Ed.) Academic Press, N.Y., p.235 (1970).
- (185) A.H.Roffo, Bull.Cancer (Paris) 23, 590 (1934).
- (186) R.G.Freeman, J.Nat.Cancer Inst., 55, 1119 (1975).
- (187) R.Setlow, Proc.Nat.Acad.Sci., USA, 71, 3363 (1974).
- (188) R.B.Webb, Photochem.Photobiol.Rev., 2, 169 (1977).
- (189) J.G.Peak, M.J.Peak e R.W.Tuveson, Photochem.Photobiol., 38, 541 (1983).
- (190) J.G.Peak, M.J.Peak e M.McCoss, Photochem.Photobiol., 39, 713 (1984).
- (191) R.B.Webb e M.S.Brown, Photochem.Photobiol., 29, 407 (1979).
- (192) N.J.Sargentini e K.C.Smith, Mutat.Res., 154, 1 (1985).
- (193) R.W.Armstrong, T.Kurucsev e N.P.Strauss, J.Am.Chem.Soc., 20, 3174 (1970).
- (194) S.Ichimura, M.Zama, H.Fujita e T.Ito, Biochim.Biophys. Acta, 190, 116 (1969).
- (195) H.B.Dunford e J.S.Stilman, Coord.Chem.Rev., 19, 187 (1976).
- (196) J.G.Calvert e J.N.Pitts Jr., "Photochemistry", John Wiley & Sons, Inc., N.Y., p.737 (1966).
- (197) G.Gomori, Methods Enzymol., 1, 144 (1965).
- (198) B.N.Ames e T.Dubin, J.Biol.Chem., 235, 769 (1970).
- (199) A.D.Kelmers, C.W.Hancher, E.S.Phares e G.D.Novelli, Methods Enzymol., 20, 3 (1971).
- (200) O.Bier, "Bacteriologia e Imunologia", Ed. da USP, SP,

p.786 (1975).

- (201) J.Reiland, Methods Enzymol., 22, 287 (1971).
- (202) E.J.J.Grabowski e R.L.Autrey, Tetrahedron, 25, 4315 (1969).
- (203) M.Saneyoshi e S.Nishimura, Biochem.Biophys.Res.Commun., 37, 266 (1969).
- (204) J.T.Penniston e P.Doty, Biopolymers, 1, 145 (1963).
- (205) A.McHale, H.Grimes e M.P.Coughlan, Int.J.Biochem., 10, 317 (1979).
- (206) I.B.C.Matheson, R.D.Etheridge, N.R.Kratowich e J.Lee, Photochem.Photobiol., 21, 165 (1975).
- (207) C.Salet, M.Bazin, G.Moreno e A.Favre, Photochem.Photobiol., 41, 617 (1985).
- (208) R.Nilsson, P.B.Merkel e D.R.Kearns, Photochem.Photobiol., 16, 117 (1972).
- (209) C.Salet, R.V.Bensasson e A.Favre, Photochem.Photobiol., 38, 521 (1983).
- (210) J.G.Peak, M.J.Peak e M.McCoss, 11th Annual Meeting, Am. Soc.Biol., Madison, WI, June (1983).
- (211) A.Blanchetot, E.Hanjsdorf e A.Favre, Eur.J.Biochem., 139, 547 (1984).
- (212) N.Durán e E.Cadenas, Rev.Chem.Intermediates, no prelo.
- (213) R.Romer e R.Hach, Eur.J.Biochem., 55, 271 (1975).
- (214) H.R.Mahler e H.Cordes, "Biological Chemistry", Harper Inter.Ed., N.Y., p.13 (1971).
- (215) R.P.F.R.Gomes, "Tese de Mestrado", UNICAMP (1982).
- (216) C.S.Foote, em "Singlet Oxygen - Reactions with Organic Compounds and Polymers" (B.Ranby e J.F.Rabek, Eds.), Wiley Interscience Publishing, N.Y., p.140 (1978).
- (217) E.B.Ziff e J.R.Fresco, Biochemistry, 8, 3242 (1969).
- (218) A.R.Peacocke, em "Acridines" (R.M.Archeson, Ed.), 2ª Ed. Interscience, N.Y., p.723 (1973).
- (219) C.R.Cantor e T.Tao, em "Procedures in Nucleic Acid Research" (G.L.Cantoni e D.R.Davies Eds.), Harper & Row N.Y., 2, 31 (1971).

- (220) E.R.Lochman e A.Micheler, em "Physico-Chemical Properties of Nucleic Acids" (J.Duchesne, Ed.), Academic Press, N.Y. 1, 223 (1973).
- (221) L.S.Lerman, J.Mol.Biol., 3, 18 (1961).
- (222) Y.Kubota, Chem.Lett., 299 (1973).
- (223) J.P.Scheiber e M.P.Daune, J.Mol.Biol., 38, 487 (1974).
- (224) G.Weill e M.Calvin, Biopolymers, 1, 401 (1963).
- (225) E.Fredericq e C.Houssier, Biopolymers, 11, 2281 (1972).
- (226) G.A.Russell, J.Am.Chem.Soc., 79, 3871 (1957).
- (227) K.S.Chio e A.L.Tappel, Biochemistry, 8, 2821 (1969).
- (228) K.S.Chio e A.L.Tappel, Biochemistry, 8, 2827 (1969).
- (229) V.Reiss, A.L.Tappel e K.S.Chio, Biochem.Biophys.Res. Commun., 48, 921 (1972).
- (230) N.Durán, M.Haun, S.M.De Toledo, G.Cilento e E.Silva, Photochem.Photobiol., 37, 247 (1983).
- (231) A.P.Schaap e K.A.Zaklika, em "Singlet Oxygen" (H.H.Wasserman e R.W.Murray, Eds.), Academic Press, N.Y., p. 173 (1979).
- (232) S. Inagaki e K.Fukui, Bull.Chem.Soc.Jpn., 46, 2240 (1973).
- (233) S. Inagaki e K.Fukui, J.Am.Chem.Soc., 97, 7480 (1975).
- (234) N.Durán e M.P.De Mello, Photochem.Photobiol., 37, S11 (1983).
- (235) M.N.Lipsett, Cold.Spr.Harb.Symp.Quant.Biol., 31, 449 (1966).
- (236) N.Suzuki, K.Sano, S.Wakatsuki, N.Tani e Y.Izawa, Bull.Chem.Soc.Jpn., 55, 3351 (1982).
- (237) C.Franco e N.Durán, Pest.Biochem.Biophys., 16, 136 (1981).
- (238) M.C.Marcucci, M.S.V.Gatti, L.C.C.Leite e N.Durán, Arg. Biol.Tecnol., 29, 116 (1986).
- (239) B.S.Hass e R.B.Webb, Mutation Res., 51, 279 (1978).
- (240) F.G.Foss, J.Chem.Ed., 40, 592 (1963).
- (241) S.Beychok, Science, 154, 1288 (1966).

- (242) P. Crabé, "ORD and CD in Chemistry and Biochemistry", Academic Press, N.Y., p.7 (1972).
- (243) A.D.Blum, O.C.Uhlenbeck e I.Tinoco, Jr., Biochemistry, 11, 3248 (1972).
- (244) K.Watanabe, Biochemistry, 19, 5542 (1980).
- (245) E.Willick e C.M.Kay, Biochemistry, 10, 2216 (1971).
- (246) K.Randerath, E.Randerath, L.S.Y.Choi e B.Nowak, Anal. Biochem., 59, 263 (1974).
- (247) G.G.Brownlee, em "Determination of Sequences in RNA", North Holland Publishing Co., p.250 (1972).
- (248) R.C.Grupta E.Randerath e K.Randerath, Nucleic Acids Res., 3, 2915 (1976).
- (249) L.H.I.Mei, Tese de Doutorado, UNICAMP (1986).

Atividades durante o Doutorado

A) PARTICIPACAO EM CONGRESSOS

1. M.C.Marcucci e N.Durán, "Ação de Oxigênio Singlete e Acetona Triplete Gerados Enzimaticamente sobre o tRNA", 3a Reunião Regional da Soc.Bras.de Química, Outubro, 1981, Ribeirão Preto, SP, Brasil.
2. M.C.Marcucci e N.Durán, "Bioenergized Singlet Oxygen Acting on tRNA", VI Reunião Anual da Soc.Bras.de Biofísica, Dezembro, 1981, São Paulo, SP, Brasil.
3. M.C.Marcucci e N.Durán, "Alterações de 4-Tiouridina no tRNA de E.coli por Oxigênio Singlete", XI Reunião Anual da Soc. Bras.de Bioquímica (SBBQ), Abril, 1982, Caxambú, MG, Brasil.
4. M.C.Marcucci e N.Durán, "Efeitos de Oxigênio Singlete sobre as Bases Normais e Modificadas no tRNA de E.coli", XXXIV Reunião Anual da Soc.Bras. para o Progresso da Ciência (SBPC), Julho, 1982, Campinas, SP, Brasil.
5. M.C.Marcucci, M.P.De Mello, S.M.De Toledo, N.Durán e A.Faljo-
ni-Alário, "Fotoquímica de tRNA", 4a Reunião Regional de Química da SBQ, Novembro, 1982, São Carlos, SP, Brasil.

6. M.C.Marcucci, M.P.De Mello, A.Faljoni-Alário e N.Durán, "Estudos Fotoquímicos e Bioenergizados de tRNA de E.coli : Modificação na Região de 4-Tiouridina Acompanhada por CD", XII Reunião Anual da SBBq, Abril, 1983, Caxambú, MG, Brasil.
7. N.Durán, M.C.Marcucci, M.P.De Mello e A.Faljoni-Alário, "Transformações de 4-Tiouridina Induzidas por Estados Eletronicamente Excitados Gerados Enzimaticamente", 2o Encontro Informal de Fotoquímica e Fotobiologia, Agosto, 1983, São Paulo, SP, Brasil.
8. M.C.Marcucci, M.P.De Mello, A.Faljoni-Alário e N.Durán, "Efeitos de Espécies Eletronicamente Excitadas na Transformação de 4-Tiouridina a Uridina", 5o Encontro Regional de Química, SBQ, Outubro, 1983, Araraquara, SP, Brasil.
9. M.C.Marcucci, M.P.De Mello, A.Faljoni-Alário, L.C.C.Leite e N.Durán, "Variações Estruturais e Possíveis Funções de tRNA", VIII Reunião Anual da Soc.Bras.de Biofísica, Dezembro, 1983, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
10. N.Durán, M.C.Marcucci, M.P.De Mello, L.C.C.Leite e A.Faljoni-Alário, "DNA Modifications Through Biophotoenergized Processes on tRNA", Ninth International Congress on Photobiology, Julho, 1984, Philadelphia, PA.USA.
11. M.C.Marcucci, M.S.V.Gatti, L.C.C.Leite e N.Durán, "Lethal

Effect and DNA Breakage Caused by Biophotoenergized Indole-3-Aldehyde in E.coli", International Symposium "Free Radicals and Excited States in Biological Systems", Março, 1986, Buenos Aires, Argentina.

12. M.C.Marcucci, M.S.V.Gatti, L.C.C.Leite e N.Durán, "Role of 4-Thiouridine in E.coli Lethality", XV Reunião Anual da SBBq, Maio, 1986, Caxambú, MG, Brasil.

B) PUBLICAÇÕES

1. N.Durán, M.C.Marcucci, M.P.De Mello e A.Faljoní-Alário, "Enzymatically Generated Electronically Excited Molecules Induce Transformation of 4-Thiouridine", Biochem.Biophys.Res.Commun. 117, 923 (1983).
2. M.C.Marcucci e N.Durán, "Alterações de 4-Thiouridina e Guanosina no tRNA de E.coli por Oxigênio Singlete" Arq.Biol.Tecnol. 25, 147 (1982) (resumo).
3. M.C.Marcucci e N.Durán, "Efeitos de Oxigênio Singlete e Acetona Triplete sobre o tRNA, Gerados Fotoquímica e Enzimaticamente", Química Nova, 5, 18 (1982) (resumo).

4. M.C.Marcucci e N.Durán, "Bioenergized Singlet Oxygen Acting on tRNA", Brazilian J.Med.Biol.Res., 15, 100 (1982) (resumo).
5. M.C.Marcucci e N.Durán, "Efeitos de Oxigênio Singlete sobre as Bases Normais e Modificadas no tRNA de E.coli", Ciência e Cultura, 34, 452 (1982)(resumo).
6. M.C.Marcucci, M.P.De Mello, A.Faljoni-Alário e N.Durán, "Estudos Fotoquímicos e Bioenergizados de tRNA de E.coli : Modificação na Região de 4-Thouridina Acompanhada por CD", Arq. Biol.Tecnol., 26, 218 (1983) (resumo).
7. N.Durán, M.C.Marcucci, M.P.De Mello, L.C.C.Leite e A.Faljoni-Alário, "DNA Modification Through Biophotoenergized Processes on tRNA", Photochem.Photobiol., 39, 80s (1984) (resumo).
8. N.Durán, M.P.De Mello, M.C.Marcucci, L.H.I.Mei, L.C.C.Leite e A.Faljoni-Alário, "tRNA and DNA Transformations by Biophotoenergized Molecules Generated by HRP Catalysed Oxidation of Indole-3-aldehyde", J.Biol.Chem., em preparação.
9. M.C.Marcucci, M.S.V.Gatti, L.C.C.Leite e N.Durán, Arq.Biol.Tecnol., 29, 116 (1986) (resumo).

C) CURSOS INTERNACIONAIS

Curso de Bionergética, em outubro de 1982, na Faculdade de Química da Pontificia Universidad Catolica de Chile, Santiago, Chile.

Curso de "Tópicos em Bioorgânica, em dezembro de 1984, na Universidade de São Paulo, SP, Brasil. Curso financiado pela OEA e UNESCO.