

MAURO ALVAREZ

EFEITO DE AÇÚCARES SUBSTITUÍDOS SOBRE A FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA MITOCONDRIAL

Tese de Doutorado apresentada  
ao Departamento de Bioquímica da  
Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA - 1979

Tese Orientada Pelos

Prof. Dr. Anibal de Paiva Campello

Prof. Dr. José Hazencleve Duarte

Dedicatória.

Dedico este trabalho à minha família;  
pois a tudo que faço nela encontro eco.

PENSAMENTO ...

... "para o Cientista, o conhecimento sai da ignorância tal qual a luz sai das trevas. O cientista não vê que as trevas espirituais têm uma estrutura e que, nessas condições, toda experiência objetiva correta deve implicar sempre a correção de um erro subjetivo. Mas não é fácil destruir os erros um a um. Eles são coordenados. O espírito científico só se pode construir destruindo o espírito não científico. Muitas vezes o cientista entrega-se a uma pedagogia fracionada enquanto o espírito científico deveria ter em vista uma reforma subjetiva total. Todo o progresso real no pensamento científico necessita de uma conversão"...

BACHELARD: A filosofia do não.



## SUMÁRIO

- INTRODUÇÃO .....	03
- MATERIAL E MÉTODOS - 1. <sup>a</sup> PARTE - SÍNTESE .....	07
- 1:1 - METODOLOGIA GERAL .....	07
1:2 - SÍNTESE DOS AÇÚCARES SUBSTITUÍDOS .....	08
1:2:1 - Obtenção de 1,2:5,6-di-0-isopropilideno-D-glu- cefuranose e 1,2-isopropilideno-D-glucefurano- se .....	08
1:2:2 - Preparação de 1,2:5,6-di-0-isopropilideno-D - ribo-hexofuranos-3-ulose .....	10
1:2:3 - Preparação de 1,2:5,6-Di-0-isopropilideno-D - alofuranose .....	11
1:2:4 - Obtenção de 1,2-0-isopropilideno-D-alofuranose	13
1:2:5 - Preparação de 1,2-0-isopropilideno-D-ribofura- nose .....	14
1:2:6 - Preparação de 3,5-Di-0-benzil-1,2-0-isopropili- deno-D-ribofuranose .....	15
1:2:7 - Obtenção do metil 3,5-Di-0-benzil-D-ribofurano- sideo .....	16
1:2:8 - Obtenção do metil 3,5-Di-0-benzil-2-cloro-2 - desoxi-D-arabinofuranosideo .....	18
1:2:9 - Preparação do 1,2:5,6-Di-0-isopropilideno-3-0- p-toluenosulfenil-D-alofuranose .....	20
1:2:10 - Preparação do 1,2:5,6-Di-0-isopropilideno- 3- fluor-3-desoxi-α-D-glucofuranose .....	22
1:2:11 - Preparação do 3-desoxi-3-fluor-1,2-0-isopropi- lideno-α-D-glucofuranose .....	23

1:2:12	- Obtenção do 6-0-benzoil-3-desoxi-3-fluor- 1, 2-0-isopropilideno- $\alpha$ -D-glucofuranose .....	24
1:2:13	- Obtenção de benzil- $\beta$ -D-arabinofuranosídeo ..	25
1:2:14	- Preparação do Benzil 3,4-0-isopropilideno- $\beta$ - D-arabinopiranosídeo .....	26
1:2:15	- Preparação do Benzil-2-0-tosil-3,4-0-isopro- pilideno- $\beta$ -D-arabinofuranosídeo .....	27
1:2:16	- Preparação do benzil-2-0-tosil- $\beta$ -arabinosídeo	28
1:2:17	- Preparação de $\beta$ -tetracetil-L-arabinose .....	29
1:2:18	- Preparação do penta-0-acetil- $\beta$ -D-galactopira- nose .....	30
1:2:19	- Preparação do metil-4-cloro-4-desoxi- $\beta$ -L-ara- binopiranosídeo .....	32
1:2:20	- Obtenção do metil 2,3-Di-0-acetil-4-cloro-4- desoxi-L-arabinopiranosídeo .....	34
1:2:21	- Preparação do metil 3,4,6-tricloro-3,4,6-tri- desoxi- $\beta$ -D-alopiranosídeo .....	36
-	MATERIAL E MÉTODOS - 2. <sup>a</sup> PARTE .....	37
2:1	- Material .....	37
2:2	- Reagentes .....	37
2:3	- Métodos .....	38
2:3:1	- Determinação de proteínas .....	38
2:3:2	- Isolamento de Mitocôndrias para estudos em Eletródio de Oxigênio .....	38
2:3:3	- Isolamento de Mitocôndrias para "Swelling" controlado e Oscilatoria Mitochondrial .....	39
2:3:4	- Obtenção de Mitocôndrias Rompidas .....	39
2:3:5	- Obtenção de mitocôndrias de coração de boi .	39
2:3:6	- Isolamento de Partículas transportadoras de elétrons (EPl) .....	40

2:3:7 - Isolamento da Desidrogenase Succinica (E.E. 1.3.99.1) .....	40
2:3:8 - Determinação da atividade da NADH Desidrogenase .....	41
2:3:9 - Succinato Oxidase e NADH oxidase em Mitocôndrias rompidas .....	42
2:3:10 - Determinações polarográficas .....	42
2:3:11 - "Swelling" (Inchamento) controlado de Mitocôndrias .....	42
2:3:12 - Oscilatoria Mitochondrial .....	43
- RESULTADOS .....	44
1 - Valores de controle da fosforilação oxidativa obtidos em eletródio de Oxigênio com mitocôndrias isoladas de fígado de rato .....	44
2 - Efeito dos compostos sobre a velocidade de consumo de O <sub>2</sub> durante o processo de fosforilação oxidativa .....	44
3 - Efeito do metil 3,5-Di-O-benzil-2-cloro-2-desoxiarabinofuranosídeo (IX) sobre a fosforilação oxidativa .....	50
4 - Fontes de energia para "Swelling" controlado mitocôndrial. O Estado de Equilíbrio na Cadeia respiratória .....	53
5 - Efeito do Composto IX sobre o "Swelling" mitocôndrial induzido pelo ATP como fonte de energia ...	58
6 - Ação do composto IX sobre o sistema oscilatório do volume mitocôndrial .....	61
7 - Ação do Composto IX sobre partículas submitocôndriais .....	56
8 - Efeito do Composto IX sobre o sistema enzimático NADH desidrogenase em mitocôndrias rompidas .....	66
9 - Efeito da droga IX sobre a atividade do sistema	

succinato desidrogenase em mitocôndrias rompidas.	67
10 - Efeito da droga IX sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase isolada (E.E. 1.3.99.1)..	67
11 - Efeito da droga IX sobre o sistema NADH-oxidase e succino-oxidase em partículas submitocôndriais - EPl e em mitocôndrias rompidas .....	68
12 - Atividade do composto IX sobre o sistema enzimático citocromo C oxidase em partículas EPl e em mitocôndrias rompidas .....	70
13 - Efeito do metil 3,5-Di-O-benzil-D-ribofuranosídeo (VIII) sobre a velocidade de consumo de oxigênio durante o processo de fosforilação oxidativa ....	70
14 - Ação do composto VIII sobre a fosforilação oxidativa e sobre o efeito desacoplador do 2,4-dinitrofenol .....	73
15 - Efeito do composto VIII sobre as fontes de energia para "Swelling" controlado .....	75
16 - Efeito do composto VIII sobre o "Swelling" mitocondrial induzido por ATP .....	78
17 - Efeito do composto VIII sobre o sistema oscilatório do volume mitocondrial .....	78
18 - Ação do composto VIII sobre partículas submitocôndriais .....	80
19 - Efeito da droga VIII sobre o sistema enzimático - NADH desidrogenase .....	80
20 - Efeito da droga VIII sobre o sistema succinato desidrogenase .....	81
21 - Efeito da droga VIII sobre o sistema Succinato oxidase .....	81
22 - Efeito da droga VIII sobre o sistema NADH oxidase	81
- DISCUSSÃO .....	82
1 - Mecanismo de Ação do metil 3,5-Di-O-benzil-2-clo-	

ro-2-desoxi-D-arabinosídeo .....	83
2 - Mecanismo de ação do metil 3,5-Di-O-benzil-D-ribofuranosídeo (VIII) .....	89
3 - Interrelação entre estrutura e ação dos compostos VIII e IX .....	91
- CONCLUSÕES .....	93
- RESUMO .....	94
- REFERÊNCIAS .....	95
- AGRADECIMENTO .....	105

## INTRODUÇÃO

Os açúcares são substâncias suceptíveis a reações de substituição, e os produtos resultantes podem, em muitos casos, funcionar como análogos de substratos em sistemas enzimáticos. As reações de substituição em açúcares, muitas vezes não só bloqueiam, especificamente, grupos hidroxilas, como também acarretam alterações configuracionais, permitindo deste modo, verificar a influência do grupo substituído em reações biológicas. Apesar dos avanços nos processos de síntese dos açúcares substituídos, principalmente no que concerne aos derivados desoxi-halogenados, só mui recentemente houve um real interesse na utilização desses compostos como inibidores de vários processos biológicos.

A descoberta, por Liebecq e Peters, 1949, de que o ácido fluorcitríco é um poderoso inibidor da aconitase induziu muitos pesquisadores a utilizarem derivados de açúcares desoxi-halogenados como inibidores enzimáticos. Com esta finalidade o derivado 6-desoxi-6-fluor-D-glucose foi utilizado pela primeira vez por Blakley e Boyer, 1955. Este derivado mostrou ser um inibidor competitivo na utilização da D-frutose e D-glucose por células de levedura, mas tendo pouco efeito sobre preparações livres de células. Anteriormente, Gottschalk, 1950 havia utilizado vários açúcares desoxi-halogenados contendo como grupo substituinte o fluor, cloro, bromo ou o iodo, com a finalidade de correlacionar o tamanho do grupo substituinte com aquele do sítio enzimático.

Posteriormente, Barnett, 1967, revisando o assunto, ressaltou a influência de vários açúcares desoxi-halogenados sobre a atividade de alfa e beta glucosidases, da hexoquinase e sobre o transporte ativo e passivo de açúcares através da membrana intestinal de mamíferos.

Os derivados, 2-desoxi-D-glucose (Metzger et al, 1964,

Lipke, 1976) e o 3-desoxi-3-fluor-D-glucose (Taylor et al, 1965, Eisenthal et al, 1972 e Romaschin et al, 1976) também foram utilizados como análogos dos açúcares correspondentes nos estudos de inibição competitiva.

Ainda na década passada foi desenvolvida uma série de inibidores enzimáticos que tinham a capacidade de alquilar determinado grupo no centro ou próximo ao centro ativo de certas enzimas. Dentro desta linha encontram-se vários compostos como o 1-cloro-4-fenil-3-p-toluenosulfonamida-2-butanone (N-p-toluenosulfenilfenilalanina-clorometil-cetona) que inativa a quimiotripsina (Schoellmann e Shaw, 1963); e 7-amina-1-cloro-3-p-toluenosulfonamida-2-heptanona ( $\alpha$ -N-p-toluilsulfonil-lisina-clorometil-lisina) que inibe a tripsina (Shaw et al, 1965). Estes inibidores apresentaram uma característica em comum, qual seja de conterem um grupo halogênico adjacente a um grupo carbonila. O ácido N-acetil-3-fluorneuramínico e seus isômeros que inibem a enzima N-acetilneuramínico aldolase de maneira irreversível (Gantt et al, 1964), apresentam características estruturais semelhantes aos inibidores acima descritos.

Outros açúcares desoxi-halogenados como o 2-fluor-2-desoxi-D-glucose e o 2-fluor-2-desoxi-D-manose mostraram-se potentes inibidores da atividade biológica de glico-proteínas de cápsulas virais (Schmidt et al, 1975).

Os derivados como o metil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, 3-O-metil-D-glucose e o 2-desoxi-D-glucose inibem o transporte de D-galactose através das paredes serosa e mucosa de íleum de coelho (Helmann e Naftalin, 1975). O derivado 3-O-<sup>3</sup>H-metil-D-glucose mostrou-se ainda excelente rastreador isotópico nos estudos sobre o efeito do Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> na absorção de hexoses e de uridina por fibroblastos (Bowen-Pope e Rubin, 1977). Por outro lado o metil- $\beta$ -D-galactosídeo foi usado por Robbins e Rotmann (1974) em estudos genéticos sobre o transporte ativo envolvido a metil-D-galactose permease de E. coli. Ainda na série de derivados da D-galactose, três compostos (metil- $\beta$ -D-thiogalactopitanosídeo (TMG); isopropil-1-thio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (IPTG); 0-nitrofenil-1-thio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (TONPG) fo-

ram utilizados por Hogness, Cohn e Monod, 1955 como indutores. Em presença destes compostos as células de E. coli respondem com a formação de  $\beta$ -D-galactosidase e com os resultados obtidos os autores anunciaram a teoria da regulação da função genética bacteriana. Estes compostos, além de serem potentes indutores da produção de  $\beta$ -D-galactosidase são ainda utilizados de outras maneiras: como no caso de derivado IPTG, que é um indicador quantitativo do repressor do gem Lac (Gilbert e Hill, 1966). Já o derivado TONPG inibe o crescimento de células de E. coli Lac constitutivas, enquanto a Lac permease está ativa (Muller-Hill et al, 1968). O derivado TMG além de ter várias outras aplicações em estudos genéticos, (Prostidge e Pardee, 1965) é muito utilizado nas investigações de transporte de pequenas moléculas, principalmente cátions em vários microorganismos (Tokuda e Kaback, 1977; Tsuchiya et al, 1977).

Num extensivo estudo sobre açúcares furanosídicos e suas hidrazonas acetiladas Fuska et al, 1974, investigaram o efeito de 40 destes derivados sobre a incorporação de precursores da síntese de proteínas e de ácidos nucleicos em células de carcinoma de Ascite de Ehrlich (EAC). Dentre todos os derivados investigados, o mais efetivo foi o tri-O-acetil-D-eritrose-p-NPH, que mesmo em concentrações baixas (100 ug/ml) diminuiu significativamente a incorporação de adenina, timidina, uridina e l-valina. Esta substância, em concentrações de 3,6 a 10 ug/ml reprimiu a proliferação das células de carcinoma. Outras substâncias testadas, como o tri-O-acetil -D- trease-pNPH; tetra-O-acetil-D-arabinose-2,4-DNPH e penta-O- acetil-galactose-pNPH também inibiram, embora em menor intensidade a síntese de proteínas e de ácidos nucleicos em células de EAC.

Muito pouco tem sido investigado sobre a ação de derivados de açúcares no mecanismo funcional da respiração e fosforilação oxidativa, assim como no transporte em membrana mitocondrial. Somente açúcares não substituídos tem sido utilizados, como é o caso da sacarose e do manitol, para manter apenas a isotonicidade e proteção da membrana mitocondrial. Contudo, Massare e Azzone, 1972 utilizaram sacarose, D- glucose, L-arabinose, eritritol e glicerol, que apresentam raios mo-



leculares decrescentes, respectivamente, para avaliarem o raio equivalente da porosidade da membrana interna mitocondrial.

Em vista do exposto, se conclue que a aplicação dos derivados de açucares em sistemas biológicos é muito recente e a maioria dos trabalhos relatados, embora referidos a sistemas não mitocondriais, demonstram uma grande potencialidade de emprego nos vários campos de investigação da bioquímica e da farmacologia. Deste modo este trabalho visa estudar a provável ação destes derivados em sistemas mitocondriais.

Com esta finalidade 18 compostos foram sintetizados a partir de monossacárideos (hexoses e pentoses), incluindo derivados halogenados, acetilados, isopropilidênicos, benzilados, benzoilados e tosilados a fim de serem testados sobre a fosforilação oxidativa.

MATERIAL E MÉTODOS1.ª PARTE - SÍNTESE1:1 - Metodologia Geral

Os pontos de fusão foram determinados em um sistema de placa aquecida tipo Kofler, sem correção de temperatura. As rotações ópticas foram determinadas a  $\pm$  25°C em um polarímetro Perkin-Elmer modelo 141. Os espectros de  $^1\text{H-NMR}$ -60 MHz foram realizados em um espectrômetro Jeol modelo JNM - P.M.X.-60 à temperatura de 25°C. A monitorização de cada reação foi feita por cromatografia em camada delgada (C.C.D.) utilizando-se placas de sílica-gel (E.Merck-Darmstadt-Alemanha) segundo Stahl; a visualização foi feita com pulverização das placas com ácido sulfúrico-metanol (5:95) e aquecimento até 200°C. Os espectros de massa foram obtidos em um espectrômetro de massa de dupla focalização Jeol, modelo JMS-D100, acoplado a um cromatógrafo de gás Jeol, modelo JGS-20K. As energias de ionização para todas as amostras foi de 30 eV (300 uA). A câmara de ionização foi aquecida a 160°C. Para a análise das amostras sólidas, estas foram introduzidas diretamente na câmara de ionização e foram aquecidas de acordo com as respectivas temperaturas de maior volatilização. As soluções das reações de síntese foram concentradas sob pressão reduzida com temperatura controlada (-30°C). A destilação molecular, sob alto vácuo, foi realizada em equipamento Konte, modelo semi-micro.

1:2 - Síntese dos açúcares substituídos

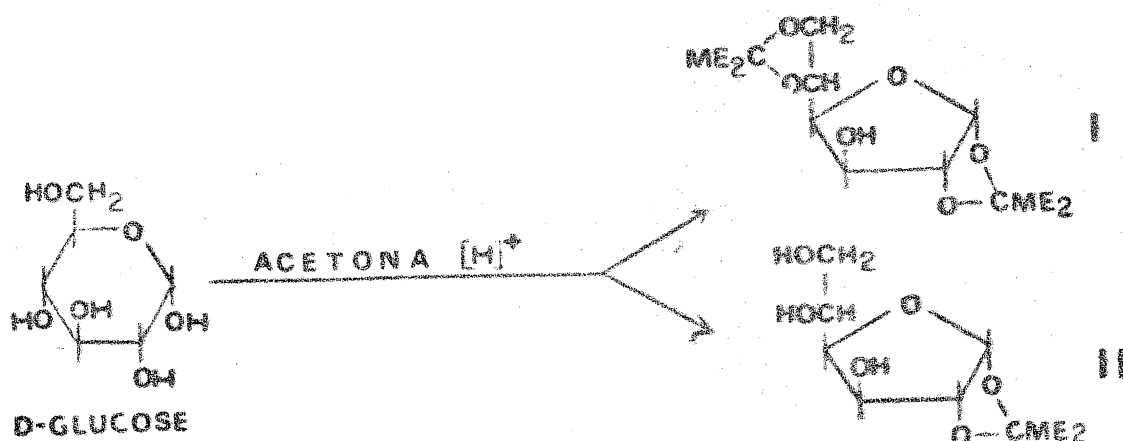
1:2:1 - Obtenção de 1,2,5,6-di-0-isopropilideno- $\alpha$ -D-glucofu-  
ranose (I)  
e 1,2-0-isopropilideno- $\alpha$ -D-glucofuranose (II)

Esses derivados foram preparados de acordo com o método descrito por Stevens, 1972, com ligeiras modificações.

A 2 litros de acetona anidra (preparada pelo tratamento com cloreto de Cálcio fundido seguido de destilação) foi adicionado ácido sulfúrico (80 ml d = 1,84) lentamente e sob agitação constante, mantendo-se a temperatura a 5°C. A solução assim obtida foi adicionada D-glucose monohidrato (100 g) lentamente, seguida de agitação constante, durante 10 horas à temperatura ambiente. Foi utilizada D-glucose monohidrato em virtude de baixo rendimento produzido quando se utilizou D-glucose anidra, como indicado na técnica original. O maior rendimento da reação deve-se, provavelmente, à grande solubilidade do monohidrato em acetona. Este foi preparado por cristalizações sucessivas de D-glucose em etanol a 70% (Hudson e Dale 1946). Em sequência, foi adicionada à solução cetônica, hidróxido de sódio (120 g/100 ml de água), lentamente, não permitindo à temperatura ultrapassar 20°C. Após a neutralização, os sais que precipitaram foram removidos por filtração (Funil de Buchener) e o resíduo foi lavado várias vezes com acetona e os filtrados foram reunidos. A solução foi então tratada com hidróxido de amônia para neutralizar os traços de ácido remanescente. A solução foi concentrada sob vácuo e ao concentrado, que solidifica rapidamente, foi adicionada água destilada (700 ml). A solução aquosa foi extraída com clorofórmio (3 vezes). A fração clorofórmica foi tratada com sulfato de sódio e o filtrado foi evaporado sob pressão reduzida até formar um xarope denso o qual cristaliza espontaneamente.

O composto I foi obtido por cristalizações em ciclohexano e em uma mistura de benzeno éter de petróleo (1:9 v/v) apresentando um rendimento de 40 g com P.F. 109°C e  $[\alpha]_D^{25} -12,59$  (L 1,0 clorofórmio); Bell, 1947 obteve para o mesmo composto P.F. 119°C e  $[\alpha]_D^{25} -11$  (clorofórmio).

A fração aquosa foi concentrada (evaporador rotativo) obtendo-se um resíduo, o qual cristalizado em acetato de etila produziu um rendimento de 24 g do composto II com ponto de fusão de 155°C e  $[\alpha]_D^{25} -139$ ; Schmidt, 1972 obteve valores semelhantes (P.F. 160°C e  $[\alpha]_D^{25} -129$  (água)-). A reação encontra-se resumida no esquema (1).



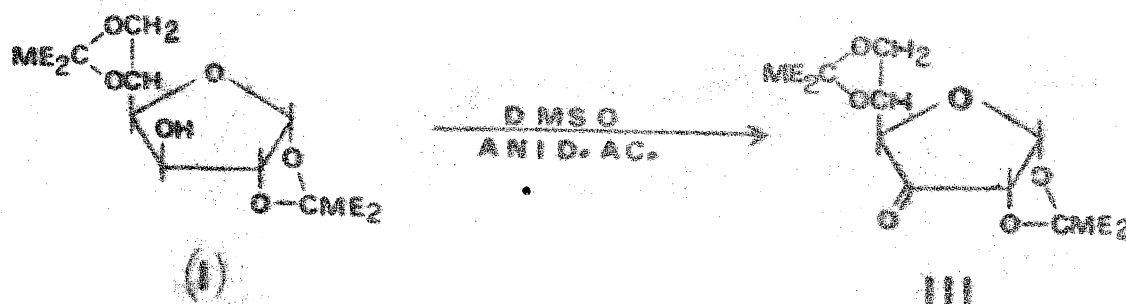
A análise por espectrometria de massa do composto I demonstrou uma série de picos primários e secundários ( $m/e$  245-187 - 159 - 127 - 101 - 85 - 69 - 59 - 43) os quais concordam com a estrutura proposta para o composto. Da mesma maneira para o composto II ( $m/e$  - 205 - 159 - 145 - 127 - 113 - 101 - 85 - 59 - 43). Conforme mecanismo de fragmentação proposto por Biemann et al, 1963.

A análise de H-RNM está em concordância com a estrutura proposta para o composto I; clorofórmio-D: 5,95 (1 H, d,  $J_{1,2}$  4 Hz, H-1); 4,0 - 4,60 (6H, m, H 2,3,4,5,6); 3,20 (1 H, d,  $J$  4 Hz, H-OH 3); 1,30 - 1,60 (12 H, m, H  $CH_3$  - isopropilideno). E para o composto II;  $D_2O$  : 6,50 (1 H, d,  $J_{1,2}$  4 Hz, H-1); 4,20 - 4,80 (9 H, m, H-2,3,4,5,6); 1,80 - 2,00 (6H, 2 S, H- $CH_3$  isopropilideno).

1:2:2 - Preparação de 1,2,5,6-Di-O-isopropilideno- $\alpha$ -D-ribo  
hexofuranos-3-ulose. (III)

O composto III foi preparado como descrito por Stevens, 1972.

A uma mistura de anidrido acético (100 ml) e Dimetil-sulfóxido a 97% (400 ml), foram adicionadas 50 g de 1,2:5,6-Di-O-isopropilideno- $\alpha$ -D-glucofuranose (I) em um balão de fundo redondo de 1000 ml e aquecido em banho maria a 70°C durante uma hora. A solução foi mantida à temperatura ambiente durante 12 horas e então concentrada sob vácuo (em evaporador rotativo) a 90°C. O xarope impuro assim produzido foi submetido a fracionamento por destilação a vácuo (0,01 Torr.) sendo que a fração principal foi coletada entre 104 e 113°C (composto III, 42 g). Parte do composto III (forma hidratada) foi recristalizada em éter etílico: éter de petróleo (1:1 v/v). Os cristais foram separados por filtração e secos ao ar, apresentando P.F. 103°C e  $[\alpha]_D^{25} +41^\circ$  (c 1,0 clorofórmio). Valores de P.F. 111-112°C e  $[\alpha]_D +44^\circ$  (Becker et al, 1972) e de P.F. 108-110°C e  $[\alpha]_D +40,2^\circ$  (Thean-der, 1964), foram obtidos para este composto. O esquema (2) resume a etapa principal da reação.

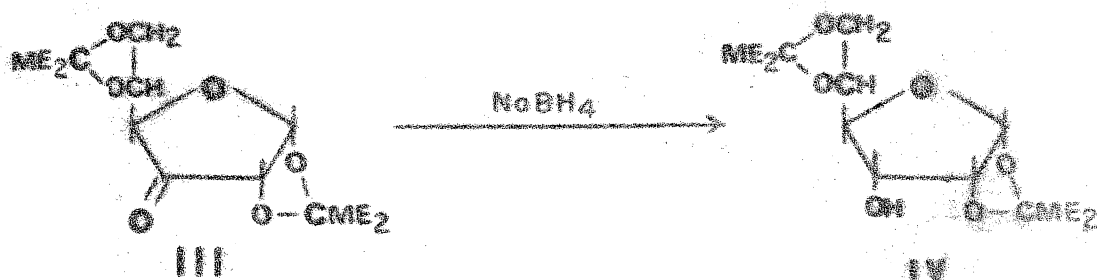


Esquema 2

1:2:3 - Preparação de 1,2:5,6-Di-O-isopropilideno- $\alpha$ -D-alofu-  
ranose (IV)

Este composto foi preparado como descrito por Stevens, 1972.

O Composto III (1,2:5,6-Di-O-isopropilideno- $\alpha$ -D-ribo-hexofuranos-3-ulose), 40 g, foi dissolvido em 300 ml de etanol (95% v/v) e a solução foi resfriada a 0°C. Borohidreto de sódio (3,0g) foi adicionado sob agitação constante (em capela). Após 10 minutos a solução foi levada à temperatura ambiente, assim permanecendo por mais uma hora. Completada a redução, a mistura foi concentrada a vácuo. Ao resíduo adicionou-se água destilada e a mistura foi extraída com clorofórmio. A fração clorofórmica foi tratada com água destilada (três vezes). Os resíduos de água da fração clorofórmica foram removidos com sulfato de sódio anidro e a solução foi concentrada a vácuo. O xarope formado cristalizou espontaneamente à temperatura ambiente. O composto IV recristalizado em ciclo-hexano apresentou valores de P.F. 75°C e  $[\alpha]_D^{25} +38^\circ$  (c 1,0 clorofórmio). Becker et al, 1972 apresentou resultados semelhante (P.F. 75-76°C e  $[\alpha]_D +38^\circ$ ). Um resumo da reação pode ser visto no esquema (3).



Esquema 3

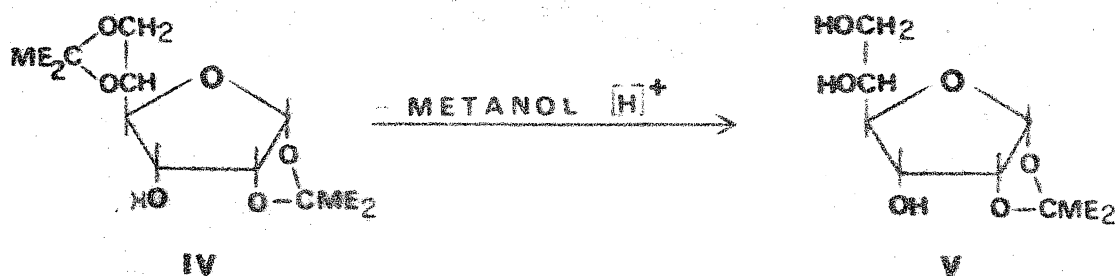
A análise por espectrometria de massa do composto IV apresentou uma série de picos primários e secundários ( $m/e$  - 245 - 187 - 159 - 127 - 101 - 85 - 69 - 59 - 43 os quais estão em concordância com a estrutura proposta para o composto.

A análise de H-RNM também resultou concordante com a estrutura proposta para o composto IV - clonofórmio-d- $\delta$  5,73 (1H - d.  $J_{1,2}$  4 Hz); 3,75 - 4,60 (6 H, m, H-2,3,4,5,6); 2,70 (1H, d,  $J$  8 Hz, H-OH3); 1,30 - 1,60 (12 H, m, H-CH<sub>3</sub>-isopropilídenos).

1:2:4 - Obtenção de 1,2-O-isopropilideno- $\alpha$ -D-alofuranose (V).

O composto V foi preparado segundo a técnica de Mofiti et al, 1971.

Uma solução de 1,2:5,6-Di-O-isopropilideno- $\alpha$ -D-alofuranose (20 g) em metanol/ $H_2SO_4$  a 7% (1:1 v/v) foi mantida à temperatura ambiente e sob agitação constante, durante 10 horas. A reação foi monitorada por TLC (solvente, benzeno:etanol 9:1 v/v) até o desaparecimento do composto original. Em seguida a mistura foi neutralizada com carbonato de bário e o filtrado foi concentrado, seguido de tratamentos sucessivos com benzeno e evaporações para eliminar resíduos de água. Obteve-se 15,5 g do composto V que cristalizado em acetato de etila produziu cristais com P.F. 117-121°C e  $[\alpha]_D^{25} +29,6^\circ$ . A reação encontra-se resumida no esquema (4).



Esquema 4

A análise por espectrometria de massa do composto V demonstrou uma série de picos primários e secundários ( $m/e$  - 205 - 159 - 145 - 127 - 101 - 85 - 69 - 59 - 43) os quais estão em concordância com a estrutura proposta para o composto, conforme Biemann, K. et al 1963.

A análise de H-NMR também resultou concordante com a estrutura proposta para o composto V - Clorofórmio- $d$ : -  $\delta$  6,30 (1H, d,  $J_{1,2}$  4 Hz, H-1); 4,20 - 4,60 (9 H, m, H-2,3,4,5,6); - 1,90 - 2,10 (6H, 2 s, H- $CH_3$ -isopropilideno).

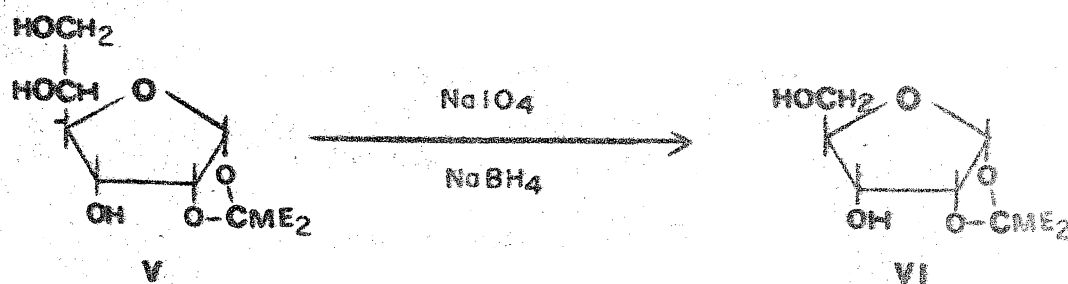


1:2:5 - Preparação de 1,2-0-isopropilideno- $\alpha$ -D-ribofuranose

(VI)

Este composto foi sintetizado de acordo com o método de Foster et al, 1967.

A uma solução de 1,2-0-isopropilideno- $\alpha$ -D- alofuranose (V), 14 g, bicarbonato de sódio, 4,3 g, em água, 110 ml, foram adicionadas 17 g de metaperiodato de sódio (em pequenas porções), sob agitação constante, durante uma hora. Após a adição de excesso de solução saturada de cloreto de bário e carbonato de bário, a solução foi filtrada e tratada com boro hidreto de sódio (21 g). Após 1 h de agitação, a mistura foi extraída com clorofórmio. O extrato clorofórmico foi tratado com sulfato de sódio anidro e concentrado sob vácuo. Após tratamentos sucessivos com benzeno e evaporação, obteve-se um xarope residual (composto VI) o qual foi utilizado na reação subsequente. Uma pequena parte foi cristalizada em benzeno: éter de petróleo (1:1 v/v) obtendo-se P.F. 132 - 135°C. A reação foi resumida no esquema (5).

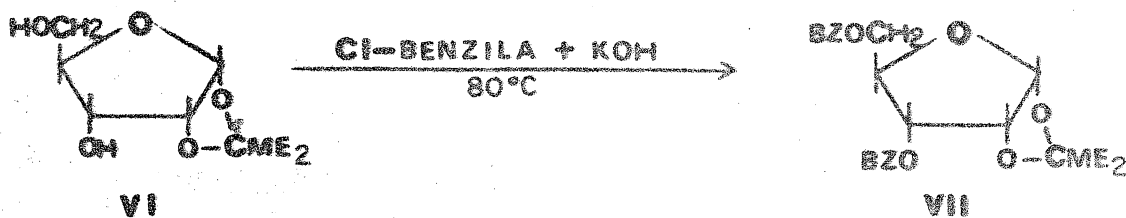


Esquema 5

1:2:6 - Preparação do 3,5-Di-O-benzil-1,2-O-isopropilideno- $\alpha$ -D-ribofuranose (VII)

O composto VII foi preparado de acordo com o método descrito por Ritzman et al, 1975.

A uma mistura de cloreto de benzila (67 ml) e hidróxido de sódio pulverizado (13,5 g), mantida a 80°C, sob constante agitação, foram adicionadas 8 g de 1,2-O-isopropilideno- $\alpha$ -D-ribofuranose. Os reagentes foram mantidos nessas condições por duas horas. A mistura de reação foi então resfriada até a temperatura ambiente e éter etílico (200 ml) foi adicionado. A mistura etérea foi lavada com água destilada várias vezes e a fração orgânica foi separada por decantação seguida por tratamento com sulfato de sódio anidro. O filtrado foi evaporado a vácuo até a obtenção de um xarope o qual submetido a destilação fracionada a vácuo (0,02 torr.). A fração principal foi destilada a 175-190°C produzindo um xarope que não cristalizou (composto VII). O esquema (6) mostra um resumo da reação descrita.



Esquema 6

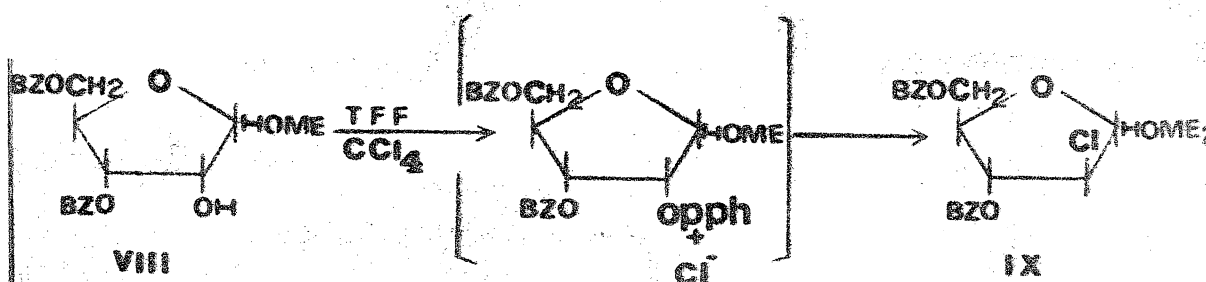


com a estrutura proposta para o composto VIII. Clorofórmio -  
d- $\delta$  7,30 (10 H, s, H-benzil); 4,81 (1H, s, H-1); 3,50-4,70  
(9H, m, H-2,3,4,5 e CH<sub>2</sub>-benzil); 3,28 (3H, s, H-O-CH<sub>3</sub>) 2,85  
(1H, s, pico largo, H-OH), conforme Ritzmann et al., 1975).

1:2:8 - Obtenção do metil 3,5-Di-O-benzil-2-cloro-2-desoxi-  
D-arabinofuranosídeo (IX)

Este composto foi obtido de acordo com o método de Ritzmann et al, 1975.

8 g de metil 3,5-Di-O-benzil-D-ribofuranosídeo (VIII) foram dissolvidos numa mistura de acetonitrilo (40 ml) e tetracloreto de carbono (8 ml), os quais foram previamente tratados com molecular Sieve 4A. Em seguida trifetilfosfina (16 g) foi adicionada e após a reação exotérmica inicial ter terminado, 11 ml de solvente foi eliminado por destilação. A mistura foi então colocada em aquecimento sob refluxo durante dois dias (48 h). Durante esse tempo a solução tornou-se escura. Após resfriamento da solução, à temperatura ambiente, foram adicionados metanol (16 ml) e uma mistura de água-acetona 3:2 v/v (160 ml). A solução foi então extraída, em funil de separação, com éter de petróleo (P.E. 30-60°) 3 vezes. Os filtrados foram reunidos e tratados com sulfato de sódio e evaporados a vácuo. Durante a evaporação do solvente o óxido de trifetil fosfina cristalizou e seus cristais, sendo insolúveis numa mistura de éter de petróleo: éter etílico (1:1 v/v) foram assim removidos por filtração. O composto IX (4,88 g) obtido cromatograficamente homogêneo por fracionamento em coluna de sílica gel (160 g) eluída com uma mistura de benzeno: acetato de etila 20:1 v/v). O composto IX, assim obtido, teve  $[\alpha]_D^{25} +46^\circ$  (c 1,0 clorofórmio). O esquema (8) apresenta um resumo da reação acima descrita.



Esquema 8

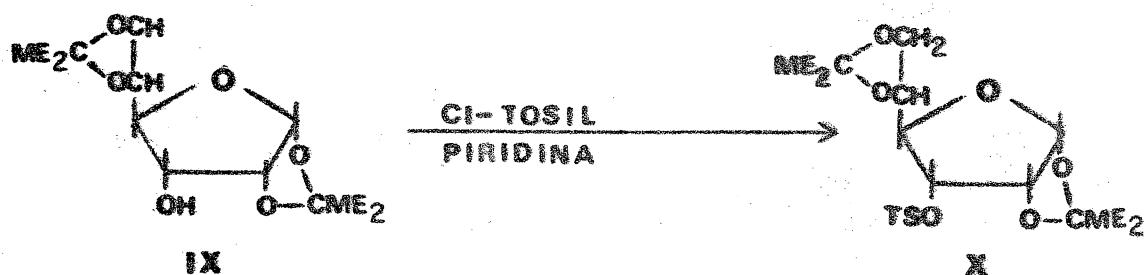
A análise por espectroscopia de massa do composto IX forneceu os seguintes picos primários e secundários ( $m/e$ -223-150 - 149 - 92 - 91 - 76 - 57 - 43 - 41) os quais estão em concordância com a estrutura proposta para o composto.

A análise por H-RNM produziu um espectro concordante com a estrutura proposta para o composto IX - clorofórmio -d-  
6,7,30 (10H, s, H-benzil); 4,91 (1H, s, H-1); 4,0 - 4,8 (7H, m, H-2,3,4 e  $\text{CH}_2$ - benzil); 3,6 (2H, d,  $J_{4,5}$  4 Hz, H-5); 3,30 (3H, s, H-O- $\text{CH}_3$ ), conforme Ritzmann et al 1975.

1:2:9 - Preparação do 1,2:5,6-Di-O-isopropilideno-3-O-p-tolueno-sulfonil- $\alpha$ -D-alofuranose (X)

O composto X foi obtido pelo método descrito por Foster et al, 1967.

O 1,2:5,6-Di-O-isopropilideno- $\alpha$ -D-alofuranose (40) g foi dissolvido em piridina anidra, a qual foi obtida por tratamento da piridina comercial com hidróxido de cálcio, seguido de destilação coletada sobre molecular Sieve 4A. A mistura de reação, após 21 h à temperatura ambiente, água gelada (0-2°C), 50 ml, foi adicionada à solução. Após 15 minutos, à mistura foram adicionados mais 3 litros de água gelada, sob agitação. Um resíduo amorfo e branco foi obtido. O precipitado foi separado por filtração e lavado várias vezes com água destilada. O resíduo foi seco ao ar e cristalizado numa mistura de etanol: hexano (1:1 v/v). Os cristais finos e alongados do composto X (45,0 g) apresentaram P.F. 119-120°C e  $\alpha_D^{25} + 88^\circ$  (c 1,0 clorofórmio). Foster et al, 1967, obteve valores de P.F. 120-121°C e  $\alpha_D + 87^\circ$ . O esquema (9) apresenta um resumo da reação.



Esquema 9

A análise por espectrometria de massa do composto X forneceu os seguintes picos primários e secundários (m/e-155 -113 - 101 - 91), concordantes com a estrutura proposta para o composto, segundo o mecanismo de fragmentação de Kochetkov e Chizhov, 1966.

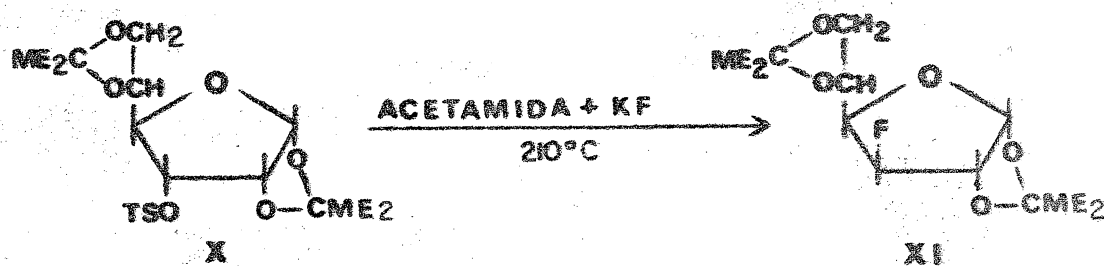
A análise por H-RNM produziu um espectro concordante com a estrutura proposta para o composto X - clorofórmio-d:  $\delta$  7,30 - 7,80 (4H, 2 d, J 8 Hz, H-tosil); 5,60 (1H, d,  $J_{1,2}$  4 Hz, H-1); 3,62 - 4,60 (6H, m, H-2,3,4,5); 2,40 (3H, s, CH<sub>3</sub>-tosil); 1,25 - 1,45 (12H, m, H-CH<sub>3</sub>-isopropilidenos).



1:2:10 - Preparação do 1,2:5,6-Di-O-isopropilideno-3-fluor-3-desoxi- $\alpha$ -D-glucofuranose (XI)

O composto XI foi preparado segundo o método descrito por Reichymann et al, 1975.

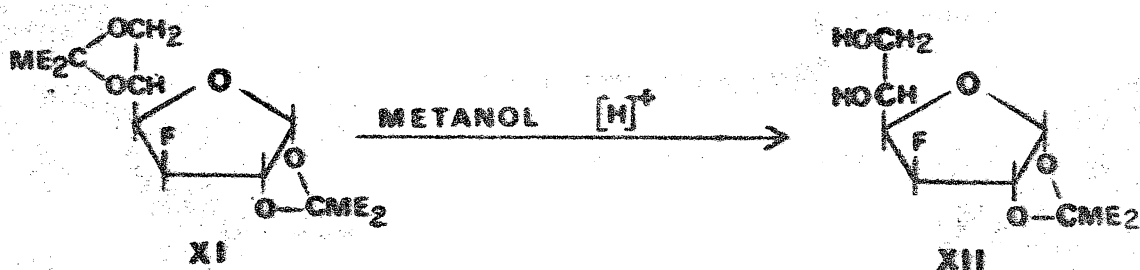
A uma mistura de acetamida anidra (220 g) e fluoreto de potássio anidro (40 g), fundida a 80°C, adicionou-se 1,2:5,6-Di-O-isopropilideno-3-O-p-toluenosulfonil- $\alpha$ -D-alofuranose (25 g) quando então a temperatura foi elevada a 210°C. A reação foi monitorada por TLC (benzeno:metanol 9:1 v/v) durante 4 horas. Mesmo durante esse tempo não houve completo desaparecimento de mancha cromatográfica do produto inicial. A mistura foi então resfriada até 90°C e adicionada a uma solução saturada de bicarbonato de sódio (380 ml). O produto insolúvel, foi separado por filtração. O resíduo e o filtrado foram extraídos com éter etílico (3 vezes). Os extratos foram reunidos, lavados com água destilada, tratados com sulfato de sódio e foram concentrados sob baixa pressão até um xarope. O concentrado foi cromatografado em coluna de sílica gel sendo eluído com uma mistura de benzeno éter, 9:1 v/v. Do eluato, após concentração sob baixa pressão, foi obtido o composto XI como um xarope amarelo esverdeado (7,2 g) que não cristalizou. Obteve-se o valor de  $[\alpha]_D^{25} -20^\circ$  que é muito próximo ao valor obtido por Reichymann et al, 1975 ( $[\alpha]_D -21^\circ$ ). O esquema (10) apresenta um resumo da reação.



1:2:11 - Preparação de 3-desoxi-3-fluor-1,2-O-isopropilideno-  
- $\alpha$ -D-glucofuranose (XII)

Para esta preparação foi utilizado o método descrito por Raichymann et al, 1975.

Uma solução de 3-desoxi-3-fluor-1,2:5,6-Di-O-isopropilideno- $\alpha$ -D-glucofuranose (6 g) em metanol/ácido sulfúrico a 7% aq. (1:1 v/v), 62 ml, foi agitada à temperatura ambiente. Após o desaparecimento do material inicial (aprox. 10 h, quando monitorado por TLC com benzeno:etanol, 9:1 v/v) a mistura foi neutralizada com carbonato de bário e filtrada. O filtrado foi concentrado a um xarope seco pela adição e evaporação consecutiva de benzeno. O resíduo (4,3 g) foi cromatografado em coluna de sílica gel tendo como eluente uma mistura de benzeno:etanol 9:1 v/v. O xarope obtido pela evaporação do solvente foi utilizado na reação subsequente, sem maiores purificações. O esquema 11 resume as principais etapas da reação.

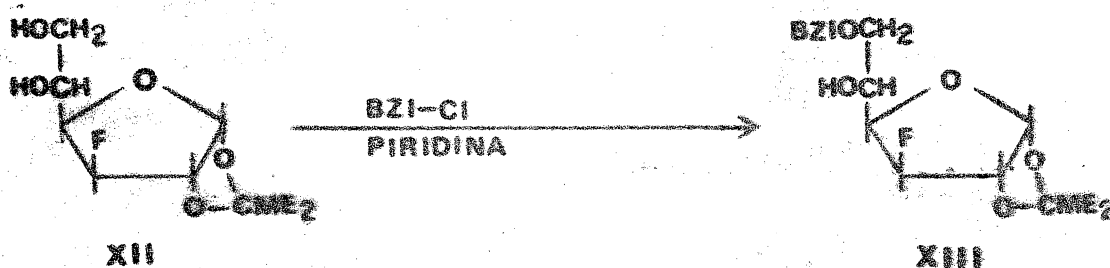


Esquema 11

1:2:12 - Obtenção de 6-O-benzoil-3-desoxi-3-fluor-1,2-O-isopropilideno- $\alpha$ -D-glucofuranose (XIII)

O composto XIII foi preparado seguindo-se o método descrito por Reichymann et al, 1975.

À solução de 3-desoxi-3-fluor-1,2-O-isopropilideno- $\alpha$ -D-glucofuranose (1,5 g) em piridina anidra (30 ml) foi adicionada, gota a gota, uma solução de cloreto de benzoila (0,85 g) em dicloro metano (6 ml). Durante todo o processo de reação (4 h) a temperatura foi mantida a  $-15^{\circ}\text{C}$ . Após a eliminação dos solventes, o residuo foi redissolvido em clorofórmio (15 ml). A solução clorofórmica foi então lavada com bicarbonato de sódio (sol. sat.), água destilada, tratada com sulfato de sódio anidro e evaporada até a um xarope claro que cristaliza espontaneamente. Por recristalização em etanol a  $0-2^{\circ}\text{C}$  obteve-se cristais longos do composto (XIII) com P.F.  $133-134$  e  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -7,8^{\circ}$  (c 0,5 clorofórmio), sendo estes dados concordantes com os de Reichymann et al, 1975 (P.F.  $132-133^{\circ}\text{C}$  e  $[\alpha]_{\text{D}} -7,8$  (clorofórmio). O esquema (12) resume as etapas principais da reação.



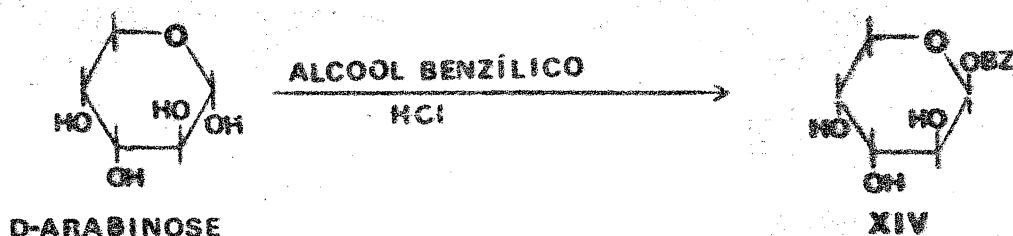
Esquema 12

A análise por espectrometria de massa resultou nos seguintes picos primários e secundários:  $m/e - 105 - 77 - 59 - 43$ , os quais estão de acordo com a estrutura proposta para o composto XIII.

1:2:13 - Obtenção do benzil-β-D-arabinofuranosídeo (XIV).

O composto XIV foi obtido segundo o método de Ballou, 1958.

Uma mistura de D-arabinose (15 g) em álcool benzílico (75 ml) à temperatura de 0-29°C, foi saturada com ácido clorídrico (gás anidro) por borbulhamento durante 20 minutos. O ácido clorídrico (gás anidro) foi gerado, gotejando-se ácido sulfúrico (d = 1,84) sobre cloreto de cálcio anidro em um pequeno aparelho de Kipp e fazendo-o atravessar um recipiente contendo ácido sulfúrico (d = 1,84) para retenção de vapores de água. A mistura de reação foi agitada mecanicamente durante 10 h à temperatura ambiente, em sistema fechado. Em seguida, éter etílico foi adicionado à mistura reagente, lentamente e com constante agitação. A mistura etérea foi mantida a 5°C durante 4 h para completa cristalização. Os cristais foram coletados por filtração da mistura resfriada a 0-29°C, lavados com éter e secos ao ar. O rendimento foi de 21g. A recristalização foi efetivada em etanol absoluto, dando o composto XIV com P.F. 167°C cujo valor é semelhante aquele descrito por Balleu 1958. O esquema (13) resume a etapa principal da reação.



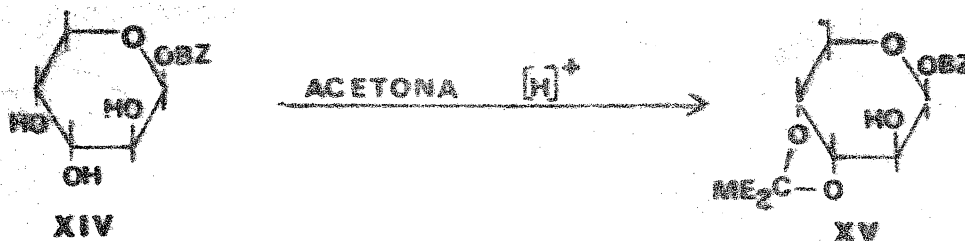
Esquema . 13

A análise por espectrometria de massa do composto XIV forneceu um espectro cujos picos primários e secundários foram (m/e - 163 - 149 - 131 - 103 - 92 - 91 - 77 - 61 - 57 - 43) os quais estão de acordo com a estrutura proposta para o composto.

1:2:14 - Preparação do Benzil 3,4-O-isopropilideno-β-D-arabinopiranosídeo (XV)

Este composto foi obtido segundo o método de Ballou, 1958.

Uma mistura de benzil-β-D-arabinopiranosídeo (15 g), acetona anidra (750 ml), sulfato de cobre anidro (45 g) e ácido sulfúrico (0,75 ml), foi agitada durante 18 horas. Gás de amônia foi então borbuhlado na mistura até neutralização. O material sólido formado foi eliminado por filtração e o filtrado foi concentrado a um xarope, o qual foi redissolvido em 150 ml de éter etílico; o arabinosídeo que não reagiu (insolúvel) foi separado por filtração. O filtrado foi evaporado até um xarope, o qual foi destilado sob baixa pressão (0,01 Torr.). Uma fração foi coletada entre 135-140°C (10 g, composto XV). A reação foi resumida no esquema (14).

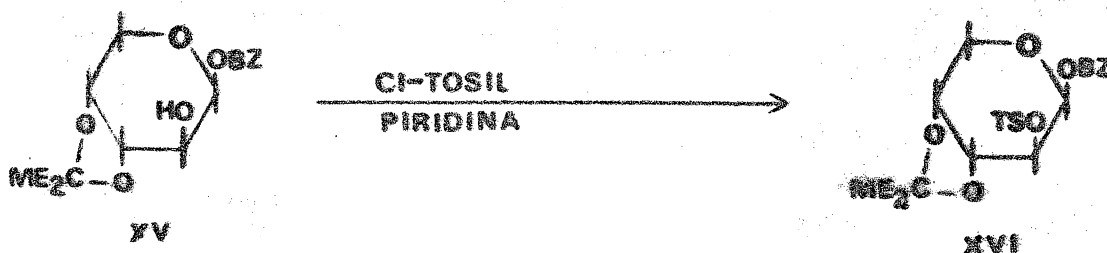


Esquema 14

1:2:15 - Preparação do benzil-2-O-tosil-3,4-O-isopropilideno-  
-β-D-arabinofuranosídeo (XVI)

A tosilação foi realizada por método convencional (Kent et al 1953; Levene e Stiller, 1933) como descrito abaixo.

A uma solução de benzil-3,4-O-isopropilideno-β-D-arabinosídeo (10,0 g) em piridina anidra (20 ml) foi adicionado cloreto de p-tolueno sulfonila (8,8 g; 1,3 equivalentes). A mistura foi deixada a 37°C durante aproximadamente 12 horas. Água destilada (0-2°C), 10 ml, foi adicionada à mistura de reação e após 15 minutos foram adicionados mais 300 ml de água (0-2°C), e subsequente extração com clorofórmio. O extrato clorofórmico foi lavado com solução diluída em ácido clorídrico, água destilada, tratado com sulfato de sódio anidro, filtrado e evaporado até a um xarope que solidificou lentamente. O composto XVI foi desta forma utilizado na reação subsequente. O esquema (15) resume a etapa principal da reação.

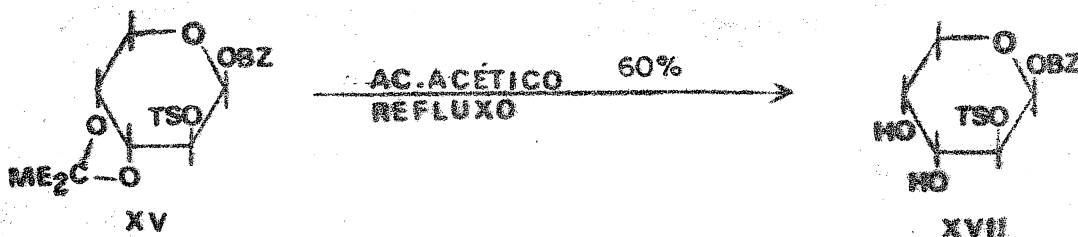


Esquema 15

1:2:16 - Preparação do benzil-2-0-tosil- $\beta$ -arabinosideo (XVII)

A obtenção do composto XVII foi feita seguindo-se a orientação dada pelo trabalho de Cohem e Bergman, 1964.

Uma mistura de benzil-2-0-tosil-3,4-0-isopropilideno- $\beta$ -D-arabinosídeo (8 g) e ácido acético 60% (50 ml) foi submetida a aquecimento sob refluxo por 16 horas. Findo este prazo, a solução foi adicionada a 350 ml de água gelada e agitada com um bastão de vidro por alguns minutos. O precipitado branco formado foi separado por filtração. Após ser lavado várias vezes com água gelada, o composto XVII foi recristalizado em benzeno:éter de petróleo (3:1 v/v) produzindo cristais longos com P.F. 123-126°C e  $[\alpha]_D^{25}$  -112° (c 0,5 clorofórmio). Estes dados concordam com os de Cohem e Bergman, 1964. (P.F. 126 e  $[\alpha]_D$  -109). O resumo da reação pode ser visto no esquema (16).

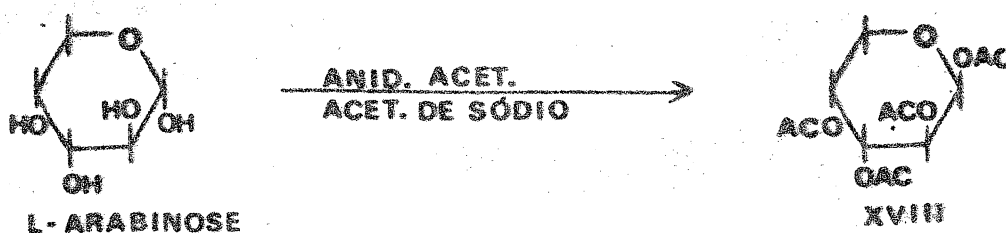


Esquema 16

1:2:17 - Preparação de  $\beta$ -tetracetil-L-arabinose (XVIII).

Este composto foi preparado de acordo com o método de Hudson e Dale, 1946.

A uma solução contendo acetato de sódio anidro (5 g) e anidrido acético (40 ml), previamente aquecida até a ebulição foram adicionadas gradualmente, 10 g de L-arabinose (seca sob pentóxido de fósforo) sob agitação constante. O sistema de reação permaneceu sob aquecimento por mais 1 hora. Após resfriamento à temperatura ambiente, a solução foi adicionada a 800 ml de água destilada (0-2°C). O sobrenadante ácido foi eliminado por decantação e o xarope residual, após ser lavado com água, foi dissolvido em etanol absoluto (20 ml), descolorido com carvão ativo e filtrado em celite. A cristalização do composto XVIII (2,5 g) ocorreu lentamente, durante aproximadamente um mês. Os cristais foram coletados por filtração e secos ao ar, dando valores de P.F. 96°C e  $\alpha_D^{25} +40^\circ$ , concordando com os dados de Hudson e Dale, 1946 (P.F. 95°C e  $\alpha_D +41^\circ$ . A reação foi resumida no esquema (17).



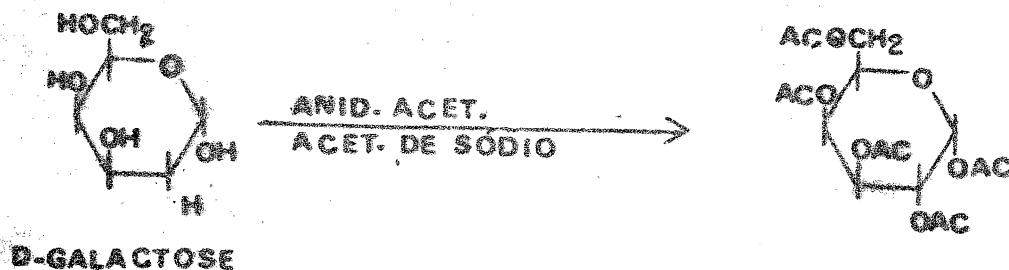
Esquema 17

A análise por espectrometria de massa do composto XVIII forneceu um espectro cujos picos primários e secundários foram ( $m/e$  - 170 - 157 - 145 - 139 - 129 - 115 - 103 - 97 - 86 - 69 - 68 - 43) os quais estão em concordância com a estrutura do composto, conforme Biemann et al, 1962 e com o mecanismo de fragmentação proposto por Lonngren e Suensson, 1973.



1:2:18 - Preparação de Penta-O-acetil-β-D-galactopiranosose(XIX)

No processo de acetilação foram utilizados 6 g de acetato de sódio e 50 ml de anidrido acético para cada 10 g de galactose anidra, de acordo com o método descrito por Hudson e Dale 1946; Wolform e Tompson, 1972. A solução, após esfriamento à temperatura ambiente, foi adicionada água (0-29), 400 ml, sendo o sobrenadante eliminado por decantação e o residuo obtido lavado 3 vezes com água (0-29C). O xarope residual foi dissolvido em etanol, descolorido com carvão ativo e filtrado em celite. A solução foi deixada em repouso, onde a cristalização se processou lentamente. Os cristais do composto XIX foram separados por filtração e deixados secar ao ar. Os valores de P.F. 1399-1439C e  $\alpha_D^{25} +259$  estão de acordo com Hudson e Dale 1946 (P.F. 1429 e  $\alpha_D +259$ ). A reação foi resumida no esquema (18).



Esquema 18

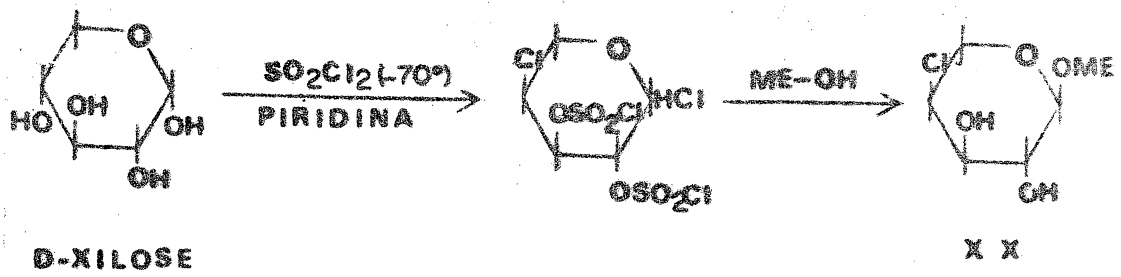
A análise por espectrometria de massa resultou num espectro cujos picos primários e secundários estão de acordo com a estrutura do composto XIX (m/e - 242 - 200 - 158 - 157 - 145 - 140 - 126 - 116 - 115 - 103 - 98 - 81 - 73 - 43), conforme Biemann et al. 1963.

A análise por H-RNM forneceu um espectro para o composto XVIII que está de acordo com a estrutura proposta para o mesmo. Clorofórmio-d:  $\delta$  5,60 (1H, d,  $J_{1,2}$  6,0 Hz, H-1) 5,25 (2H, d,  $J_{4,5}$  6,0 Hz, H-5); 3,80 -4,0 (3H, m, H-2,3,4); 2,05 -2,15 (12H, 2d,  $J$  1,0, H - CH<sub>3</sub> - acetil).

1:2:19 - Preparação do metil-4-cloro-4-desoxi- $\beta$ -L-arabinopiranosídeo (XX)

Este composto foi obtido seguindo-se o método de Jennings e Jones, 1962.

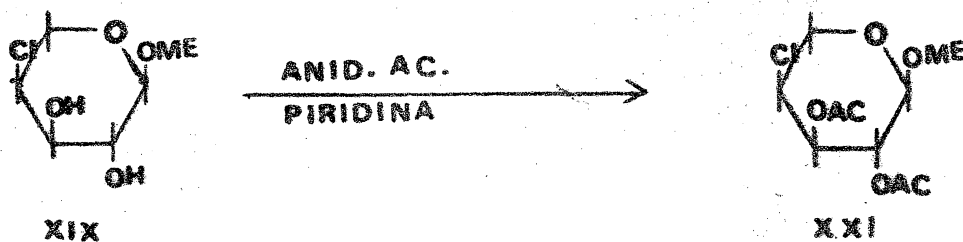
D-xilose (10 g), seca sob pentóxido de fósforo, foi parcialmente dissolvida em uma mistura de piridina anidra (40 ml) e clorofórmio (100 ml), seco com sulfato de sódio anidro. A mistura heterogênea foi resfriada a  $-70^{\circ}\text{C}$  (banho de gelo seco e acetona) e um excesso de cloreto de sulforila ( $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ ), bidestilado, (21 ml) foi adicionado, gota a gota, sob agitação constante. A reação foi ainda mantida por 2-3 h na mesma temperatura. Em seguida a temperatura da reação foi elevada lentamente à temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ) e assim permaneceu por mais 4 horas. O precipitado formado (sais de piridônio) foi eliminado por filtração e a solução clorofórmica foi lavada sucessivamente com ácido sulfúrico a 10%, solução saturada de bicarbonato de sódio e água destilada. A solução final de clorofórmio foi tratada com sulfato de sódio anidro e o filtrado foi concentrado sob baixa pressão. O xarope obtido (5,5 g) foi então dissolvido em metanol anidro (150 ml) e a solução foi agitada com óxido de prata (10g), drierite (5 g) e pequenas bolas de vidro, por 24 horas ao abrigo da luz. Em seguida o resíduo foi eliminado e o filtrado foi deionizado e concentrado. O xarope contendo enxofre foi dissolvido em clorofórmio e extraído com água destilada. A fração aquosa foi concentrada a um xarope que cristalizou parcialmente, e que foi recristalizado em acetato de etila. Os cristais em forma de agulha apresentaram P.F.  $153-155^{\circ}\text{C}$  e  $\alpha_D^{25} +234^{\circ}$  (c 0,5 clorofórmio). Estes dados estão de acordo com os de Jennings e Jones, 1962 (P.F.  $152^{\circ}$  e  $\alpha_D +237^{\circ}$  (metanol)). As etapas principais da reação estão resumida no esquema (19).



Esquema 19

1:2:20 - Obtenção de metil 2,3-Di-O-acetil-4-cloro-4-desoxi -  
-L-arabinopiranosídeo (XXI)

A obtenção do composto XXI foi realizada usando-se o método de acetilação em piridina/anidrido acético. Cristais de metil-4-cloro-4-desoxi- $\beta$ -L-arabinopiranosídeo (500 mg) foram dissolvidos em piridina anidra (5 ml) e anidrido acético (1 ml). A solução foi deixada durante 12 horas à temperatura ambiente. A mistura foi adicionada a 200 ml de água destilada (0-2°C). O sobrenadante foi separado por decantação e o xarope obtido (lavado com água destilada 3 vezes) foi dissolvido em clorofórmio, descolorido com carvão ativo, tratado com sulfato de sódio anidro e evaporado sob baixa pressão até um xarope que cristalizou espontaneamente. Os cristais do composto XXI apresentaram P.F. 95-98°C e tiveram comportamento homogêneo em cromatografia gasosa (coluna de 3% de V-225 sobre Chrom Q 100-120 mesh) com um tempo de retenção idêntica ao obtido por Murta, 1977. A reação de acetilação seguiu o esquema (20).



Esquema 20

A análise por Espectrometria de massa do composto XXI forneceu um espectro com picos primários e secundários ( $m/e$  - 146 - 129 - 104 - 103 - 102 - 74 - 69 - 62 - 61 - 43) que estão em concordância com a estrutura proposta para o composto.

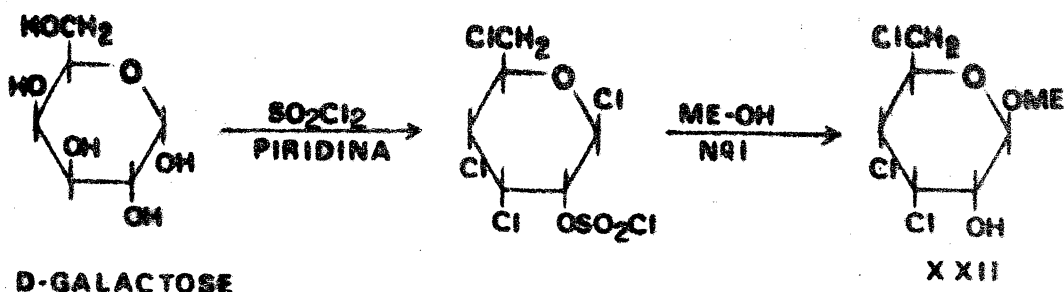
A análise por H-RNM forneceu um espectro concordante com a estrutura proposta para o composto XXI. Clorofórmio -d:

$\delta$  3,45-5,25 (6H, 6d, J 1, H-1,2,3,4,5); 3,10 (3H, s, H-OCH<sub>3</sub>);  
2,10 (6H, s, H-CH<sub>3</sub>-acetyl).

1:2:21 - Preparação de metil 3,4,6-tricloro-3,4,6-tridesoxi--β-D-alopiranosídeo (XXII)

O composto XXII foi obtido segundo o método de Jennings e Jones, 1962, modificado pelos mesmos autores em 1965.

D-galactose (10 g) (seca sob pentóxido de fósforo) foi tratada com cloreto de sulforila (26 ml), piridina 40 ml e clorofórmio (100 ml) a  $-70^{\circ}\text{C}$ . A solução clorofórmica, após ser completada a reação, foi neutralizada e concentrada a um xarope (9,5 g). O xarope foi dissolvido em metanol anidro e a solução foi colocada sob refluxo durante 12 h. O produto obtido foi declorossulfatado pelo tratamento com uma solução metanólica de iodeto de sódio (20 ml) (8 g de iodeto de sódio em metanol e água numa relação de 1:1). Houve produção imediata de iodo livre de  $\text{SO}_2$  (gás). A solução foi neutralizada com carbonato de bário, filtrada e concentrada até a formação de uma massa semi cristalina que solidificou rapidamente. O resíduo foi recristalizado em água dando cristais de composto XXII com P.F.  $116^{\circ}\text{C}$  e  $\alpha_{\text{D}}^{25} +157^{\circ}$ . Estes dados estão de acordo com os valores obtidos por Jennings e Jones, 1965 (P.F.  $116^{\circ}$  e  $\alpha_{\text{D}} +156^{\circ}$ ). A reação encontra-se resumida no esquema (21).



Esquema 21

MATERIAL E MÉTODOS2.<sup>a</sup> PARTE

Análise dos efeitos das substâncias sintetizadas sobre o sistema mitocondrial.

2:1 - Material

Todas as substâncias estudadas foram solubilizadas em N,N, Dimetilformamida (Merck) sendo que as soluções foram ajustadas, em suas concentrações, de maneira a não ultrapassarem a casa dos 20 microlitros adicionados a cada experimento onde contivesse 1,5 a 2,0 mg de proteína mitocondrial (ou quantidades proporcionais para outras quantidades de proteína). Esta margem de concentração foi escolhida por saber-se que a N,N, dimetilformamida, até 25 µl por mg de proteína, não causa efeitos colaterais de qualquer espécie.

2:2 - Reagentes

Os reagentes utilizados mantiveram as seguintes siglas e procedências:

ADP (adenosina 5'difosfato); ATP (adenosina 5'trifosfato); NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida); DCIP (2,6 diclorofenol-indofenol); TMPD (N,N,N',N', tetrametil-p-fenilenodiamino); Rt. (Retenone); Antm. (Antimicina); Olg. (oligomicina), todos de procedência da Sigma CO., PMS (fenazina metassulfaço); Mann Res.; EDTA (ácido etilenodiaminotetracético); KCN (cianeto de potássio); Az. (azida sô-



dica), todos de procedência Merck; DNP (2,4 dinitro fenol), Munchen-Al. Todas as substâncias utilizadas nos experimentos foram de mais alto grau de pureza para fins bioquímicos.

### 2:3 - Métodos

#### 2:3:1 - Determinação de proteína

As determinações de proteína foram feitas pelo método descrito por Kwry et al, 1951 usando-se como padrão a soroalbumina bovina cristalina (SIGMA Co.) sendo as leituras feitas 20 minutos após a adição de reagente de Folin, no comprimento de onda de 700 nm.

#### 2:3:2 - Isolamento de mitocôndrias para estudos em eletródio de oxigênio

As mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas pelo método descrito por Voss et al, 1961 usando o meio de extração manitol-sacarose. Este meio continha: manitol (0,2 M); Sacarose (0,07 M); tris (hidroximetil-amino-metano) 0,01 M; e EDTA (0,2 mM). O pH final, ajustado com HCL 0,1 N foi de 7,4.

Ratos brancos, Wistar, foram sacrificados por decapitação e seus fígados imediatamente removidos, lavados e dissecados em meio de extração manitol-sacarose a 0-4°C e homogenizados em homogenizador de Potter-Elvehjem. A seguir, a suspensão homogeneizada de tecido, foi centrifugada a 3.000 r.p.m. por 10 minutos em centrífuga refrigerada (Sorval Superspeed modelo RC2-B) a 0°C. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado a 10.000 r.p.m. por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso e centrifugado, duas vezes, a 8.000 r.p.m. As mitocôndrias assim lavadas, fo-

ram suspensas no meio de extração em concentração de 30 a 40 mg de proteína por mililitro.

2:3:3 - Isolamento de mitocôndrias para Swelling controlado e oscilatória mitocondrial

As mitocôndrias foram preparadas segundo o método descrito por Packer et al., 1966 utilizando o meio de extração contendo Sacarose 0,33 M, EDTA-tris (1,0 mM) e pH 7,5, ajustado com HCl 0,1 N. O procedimento geral de extração obedeceu a mesma sequência que no método anterior. A concentração final da suspensão de mitocôndrias foi de 15 a 20 mg por mililitro.

2:3:4 - Obtenção de mitocôndrias rompidas

Mitocôndrias intactas, obtidas pelo método de Voss et al., mantidas em meio de extração sacarose manitol, foram congeladas a  $-25^{\circ}\text{C}$  por mais de 24 horas e posteriormente descongeladas até a temperatura ambiente e então estocadas para uso a  $0^{\circ}\text{C}$ . Estas mitocôndrias apresentaram todos os componentes da cadeia respiratória em plena atividade.

2:3:5 - Obtenção de mitocôndrias de coração de boi

As mitocôndrias de coração de boi foram isoladas segundo o método de Crane et al., 1956.

Dois corações de boi foram obtidos logo após o abate e colocados sob gelo picado para o transporte ao laboratório. Foram então dissecados, cortados em pequenos pedaços de tecido muscular, homogenizados em um liquidificador de alta velocidade em meio de Sacarose (0,25 M)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,01 M). O liquidifi

cador foi operado durante 30 segundos em alta velocidade. O pH foi mantido entre 7,2 e 7,4, ajustado com NaOH (6 N). O homogenizado foi imediatamente centrifugado em centrífuga refrigerada por 10 minutos a 3.000 r.p.m. O sobrenadante foi filtrado em gase e centrifugado a 10.000 r.p.m. 10 minutos. O precipitado foi resuspenso em sacarose (0,25 M) e centrifugado a 8.000 r.p.m. por duas vezes. O precipitado foi finalmente suspenso em sacarose (0,25 M). Estas mitocôndrias foram utilizadas para extração de partículas submitocondriais (EPl) e para o isolamento da desidrogenase succinica.

2:3:6 - Isolamento de Partículas Transportadoras de Elêtrons-  
(EPl)

O isolamento de partículas EPl foi feito pelo método descrito por Kopaczyk, 1967 a partir de mitocôndria isoladas de músculo cardíaco de boi segundo Crane et al. 1956. As atividades enzimáticas da citocromo oxidase, NADH oxidase, e Succinato Oxidase foram determinadas polarograficamente em eletródio de oxigênio. O meio de reação empregado nesta técnica foi: tampão fosfato (50 mM) pH 7,4 e EDTA (2 mM). O consumo de oxigênio foi determinado medindo-se a inclinação da curva obtida pelo registro da reação. As atividades específicas obtidas na preparação foram ( $\mu$  atm. de O/min. mg de proteína): citocromo oxidase (0,23); NADH oxidase (0,46); succinato oxidase (0,10).

2:3:7 - Isolamento da Desidrogenase Succinica (E.E. 1.3.99.1)

A preparação da desidrogenase Succinica foi feita pelo método descrito por Kearney e Singer, 1956 a partir de mitocôndrias de coração de boi isoladas segundo o método de Crane et al, 1956. Sua atividade foi medida espectrofotometricamente.

te segundo a técnica de Singer, 1974, onde se utiliza DCIP e PMS como sistema receptor de elétrons. A atividade específica obtida ( $\mu$  mol de succinato/min. mg de proteína) foi de (8,9).

A atividade da desidrogenase succínica em mitocôndrias rompidas, foi determinada da mesma maneira. Ambas as preparações foram sensíveis ao malonato. O meio de reação empregado nos experimentos foi o seguinte: Tampão fosfato (50 mM) pH 7,4; EDTA (2 mM), azida sódica (3 mM), succinato de sódio (20 mM), DCIP (0,1 mM) e PMS (0,16 mM). A leitura foi feita a 600 nm em um espectro fotômetro Beckman UV, modelo DB. A atividade da enzima em mitocôndrias rompidas ( $\mu$  mol de succinato/min. mg de proteína) foi de (0,146).

#### 2:3:8 - Determinação da atividade da NADH desidrogenase.

Para determinação do efeito das drogas em estudo sobre a atividade da enzima NADH desidrogenase, foram utilizadas, como fonte da enzima, mitocôndrias rompidas. A atividade foi medida fotometricamente pelo método de Singer, 1974, utilizando o ferricianeto de potássio como receptor específico de elétrons. O meio de reação empregado foi o seguinte: tampão fosfato (50 mM) pH 7,4; KCN (1,0 mM), Ferricianeto de Potássio (0,6 mM) NADH (0,15 mM). A suspensão com mitocôndrias (0,156 mg de proteína) foi incubada por 10 minutos a 30°C antes da adição de NADH. A reação foi seguida pelo decaimento da absorção espectrofotométrica do Ferricianeto a 420 nm. A atividade específica medida ( $\mu$  mol de NADH oxidado/minuto mg de proteína) foi de (0,50).

#### 2:3:9 - Succinato oxidase a NADH oxidase em mitocôndrias rompidas

Estas enzimas, estudadas em mitocôndrias rompidas, tive

ram as suas atividades medidas polarograficamente. O método utilizado foi o de Singer, 1974, cujo meio de reação foi o seguinte: tampão fosfato (50 mM) pH 7,4; EDTA (2 mM); succinato de sódio (10 mM) para 3 mg de proteína e volume final de 3 ml. Para a NADH oxidase: tampão fosfato (50 mM) pH 7,4; NADH (60 mM) para 3 mg de proteína e volume final de 3 ml. As atividades específicas medidas foram ( $\mu$  atm. de  $O_2$ /min. mg de proteína): para o succinato oxidase (0,022) e para NADH oxidase (0,111).

#### 2:3:10 - Determinações Polarográficas.

As medidas polarográficas foram feitas em eletródio de oxigênio descrito por Voss et al, 1963. A velocidade de consumo de  $O_2$  foi calculada em  $\mu$  mol de oxigênio/segundo e a relação P/O foi calculada como ADP/O de acordo com o método de Estabrook, 1967, baseado no consumo de  $O_2$  em microátomos, durante o estado ativo da fosforilação oxidativa e na quantidade de micromoles de ADP adicionados ao sistema. O coeficiente de controle respiratório (RC) foi calculado relacionando-se a velocidade de respiração em presença de ADP (estado 3) e a velocidade após o controle respiratório (estado 4). O estado 2 da respiração foi considerado como sendo a velocidade de consumo de  $O_2$  após a adição do substrato correspondente antes da adição de ADP.

#### 2:3:11 - "Swelling" (inchamento) controlado de mitocôndrias.

Esta técnica introduzida por Packer et al. em 1966 consiste na observação do aumento do volume mitocondrial, sustentado pelo sistema transferidor de elétrons em mitocôndrias de fígado sob condições de equilíbrio. As mitocôndrias foram isoladas como está descrito no item (2:2:3) de material e métodos. O meio de reação para o equilíbrio consistiu em: Sacaro-

se (100mM) tris-HCl (10 mM) pH 7,5; tris-EDTA (0,3 mM); mitocôndrias de fígado de rato (3 mg de proteína em um volume final de 3 ml). O "swelling" foi medido pela variação da densidade óptica do meio a 575 nm em espectrofotômetro registrador "Double Beam" Aminco Chance (Chance e Colowich, 1957). A densidade óptica inicial foi tomada como 100% e o "swelling" foi registrado como um decaimento do nível inicial. A velocidade de consumo de  $O_2$  foi acompanhada por polarografia em eletrodo de oxigênio em reação simultânea.

#### 2:3:12 - Oscilatória mitocondrial

Esta técnica consiste na observação de uma sequência de oscilações na variação de volume da mitocôndria e da velocidade respiratória. A técnica descrita por Mustafa et al., 1966; Gooch e Packer, 1974 utiliza as mesmas condições básicas de "swelling" controlado, exceto, que o pH é ajustado em 8,5 para o meio de reação. A oscilação de volume foi acompanhada espectrofotometricamente a 575 nm.

RESULTADOS

1 - VALORES DE CONTROLE DA FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA OBTIDOS EM  
ELETRÓDIO DE OXIGÊNIO COM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE  
FIGADO DE RATO

A tabela I mostra os valores de controle de diferentes parâmetros da fosforilação oxidativa obtidos em eletródio de oxigênio e calculados segundo Estabrook, 1967, vide material e métodos. A tabela é útil para demonstrar que as mitocôndrias utilizadas nos experimentos estavam em bom estado de acoplamento.

2 - EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE O<sub>2</sub>  
DURANTE O PROCESSO DE FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

Foi estudado o efeito da variação da concentração das drogas sobre a atividade mitocondrial, observando-se os desvios da velocidade de consumo de oxigênio em relação a um controle sem droga, registrado por eletródio de oxigênio (tabela II e III).

O estado II da respiração foi considerado como sendo a velocidade respiratória após a adição do substrato à mitocôndria incubada. O estado III foi considerado como sendo a velocidade respiratória após a adição de 0,5  $\mu$  moles de ADP (estado fosforilante). O estado IV considerou-se como sendo a velocidade respiratória após o controle da fosforilação. (Vide material e métodos). Nas tabelas II e III são mostrados os percentuais de desvio, onde o sinal (+) significa um estímulo da velocidade de consumo de O<sub>2</sub> e o sinal (-) indica uma inibi

Tabela I

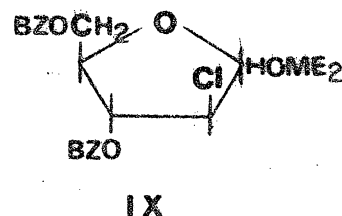
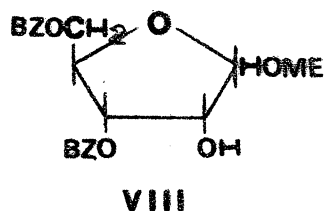
SUBSTRATO	Velocidade de Consumo de O <sub>2</sub> em μM/minuto			ADP/O	RC
	Est. II	Est. III	Est. IV		
α-Cetogluturato	0,22 <sup>±</sup> 0,07	0,86 <sup>±</sup> 0,16	0,34 <sup>±</sup> 0,09	2,90 <sup>±</sup> 0,30	2,70 <sup>±</sup> 0,60
Succinato	0,34 <sup>±</sup> 0,09	0,95 <sup>±</sup> 0,20	0,45 <sup>±</sup> 0,10	1,86 <sup>±</sup> 0,20	2,20 <sup>±</sup> 0,30

Os dados expressam a média de 37 experimentos para o α-cetogluturato e 47 experimentos para o succinato <sup>±</sup> o desvio Padrão. O sistema de reação é o mesmo descrito para os experimentos da tabela II.



ção. Cada dado das tabelas representa a média de três experimentos. Para cada experimento houve uma incubação prévia de droga com a mitocôndria de aproximadamente 10 minutos. Para maior precisão dos cálculos de desvio das velocidades foi utilizado um padrão médio diário, isto é entre os experimentos de eletródio utilizando droga, foram intercalados experimentos sem droga (4 ou 5 experimentos) dos quais foram tiradas as médias para comparação. Assim os erros de desvio reduziram-se a menos de 5%. As concentrações constantes nas tabelas (de 50 a 600  $\mu$  Mol/mg de proteína) foram escolhidas por se apresentarem em uma faixa considerada ótima de efeito para todas as substâncias estudadas.

Pode-se observar (tabelas II e III) que os compostos estudados, na sua grande maioria, apresentaram algum tipo de atividade, sendo que as substâncias de I a V, possuindo estruturas semelhantes, destacaram um efeito estimulador, principalmente com relação à oxidação do succinato, sendo a mais efetiva, a droga V, com efeito acentuado sobre o estudo II da respiração. Os compostos VIII e XIX, estruturas que diferem pela substituição de um grupo hidroxila por um grupo cloro da posição "ribo" para a posição "arabino" respectivamente, no carbono 2 do anel furanosídico apresentaram grande di-



ferença em seus efeitos sobre a atividade mitocondrial, embora essa diferença tenha sido apenas de natureza quantitativa. A droga IX foi muito mais ativa do que a droga VIII. Os compostos X e XI cujas estruturas também são semelhantes, diferindo quanto ao grupo substituinte do carbono 3, apresentam um efeito estimulador sobre a oxi

TABELA II

## EFEITO DE AÇUCARES SUBSTITUÍDOS SOBRE A OXIDAÇÃO MITOCONDRIAL

Nº	SUBSTÂNCIAS	ESTADO II (% desvio/controle)											
		α-Cetoglutarato						Succinato					
		Concentração das substâncias: nmol./mg proteína											
		50	100	200	300	400	600	50	100	200	300	400	600
I	1,2:5,6-Di-O-isopropylideno-α-D-Glucofuranose.	+31	+15	+15	+23	+23	+23	+30	+33	-	+21	+4	+16
II	1,2-O-isopropylideno-α-D-Glucofuranose	-5	+5	-5	+11	+27	-11	+24	+18	+24	+24	+12	+18
IV	1,2:5,6-Di-O-isopropylideno-α-D-Alofuranose	+25	+6	0	+43	+19	+19	-15	-6	+6	+12	+6	+7
V	1,2-O-isopropylideno-α-D-Alofuranose	-5	-5	0	+14	+6	+23	+36	+48	+55	+42	+27	+30
VIII	Metil-3,5-Di-O-benzil-D-ribofuranosídeo	+8	+73	+50	+34	+46	+75	+43	+52	+81	+65	+73	+52
IX	Metil-3,5-Di-O-benzil-2-Cloro-2-desoxi-D-Arabinofuranosídeo	+15	+46	+84	+8	-23	-25	-7	-3	+3	+3	-21	-31
X	1,2:5,6-Di-O-isopropylideno-3-O-p-toluenesulfonil-α-D-Alofuranose	+7	+3	-7	+7	-5	-5	+50	+77	+77	+70	+70	+63
XI	1,2:5,6-Di-O-isopropylideno-3-fluor-3-desoxi-α-D-Glucofuranose	-5	0	0	0	+5	+5	+38	+50	+64	+44	+40	+54
XIII	6-O-benzil-3-desoxi-3-fluor-1,2-O-isopropylideno-α-D-Glucofuranose	+24	+36	+44	+60	+100	+124	+32	+43	+68	+75	+111	+155
XIV	Benzil-β-D-Arabinosídeo	0	0	0	+1	0	+2	+5	0	0	-7	-5	-5
XVII	Benzil-2-O-p-toluenesulfonil-β-D-Arabinosídeo	+63	+74	+35	+126	+89	+73	+79	+90	+97	+129	+141	+152
XVIII	3-tetra-O-acetil-L-Arabinose	+24	+20	+39	+52	+48	+43	+61	+97	+67	+63	+79	+72
XIX	3-penta-O-acetil-D-Galactopiranosose	0	+5	+9	+13	+16	+16	+33	+93	+93	+90	+33	+62
XXI	Metil-2,3-O-acetil-4-cloro-4-desoxi-β-L-Arabinopiranosídeo	-4	0	0	+7	+7	+7	+23	+15	+8	+15	+23	+15
XXII	Metil-3,4,6-tricloro-3,4,6-tridesoxi-β-D-Alopiranosídeo	+17	+50	+72	+93	+130	+122	+56	+82	+95	+97	+146	+136

Sistema: meio de reação (manitol 0,25 M; tampão fosfato 5 mM, pH 7,4; tris-HCl 10 mM; KCl 10 mM; EDTA 0,2 mM; substratos 10 mM. A concentração de proteínas na suspensão mitocondrial foi de 3,0 mg para o α-cetoglutarato e 1,5 mg para o succinato em um volume final de 3 ml. Os dados estão expressos como a média de três diferentes experimentos. O sinal (+) significa um estímulo da velocidade de consumo de oxigênio e o sinal (-) significa uma inibição desse consumo. As concentrações das substâncias (50-600 nmol/mg de proteína) são referentes aos compostos I - XXII.

TABELA III

## EFEITO DE AÇUCARES SUBSTITUÍDOS SOBRE A OXIDAÇÃO MITOCONDRIAL

Subst. no.	ESTADO III (% desvio/controle)												ESTADO IV (% desvio/controle)											
	α-Cetogluturato						Succinato						α-Cetogluturato						Succinato					
	Concentração das substâncias: nmol./mg proteína																							
	50	100	200	300	400	600	50	100	200	300	400	600	50	100	200	300	400	600	50	100	200	300	400	600
I	-7	-20	-20	-19	-30	-25	+19	+20	+13	+7	-2	+2	+17	0	0	+8	-8	0	+25	+28	-	+22	+12	+12
II	-10	-2	-5	-2	+3	-13	+22	+9	+4	0	+9	+6	+4	+4	+4	+11	+4	+4	+4	+4	0	0	-4	+12
IV	+2	-6	+13	+8	+11	-6	-9	-4	+26	+27	+12	+25	+32	+23	+9	+23	+32	+9	-13	-11	+13	+24	+18	+5
V	-1	-5	-12	-8	-3	+8	+30	+38	+36	+36	+16	+24	+6	+9	+38	+28	+12	+36	+11	+26	+22	+17	+2	+15
VIII	+14	+54	+30	+14	+7	+4	+15	+29	+38	+34	+32	+23	+17	+56	+41	+47	+68	+77	+33	+27	+58	+38	+39	+38
IX	0	+6	+7	+31	-40	-45	-24	-32	-36	-42	-57	-62	+17	+27	+27	-5	-22	-23	-23	-14	-13	-13	-	-
X	+7	+2	-7	+7	-5	-5	+38	+43	+38	+33	+19	+18	-2	-2	-7	-7	-14	-24	+24	+33	+15	+11	+4	+11
XI	-2	0	+2	-3	-3	-8	+11	+33	+25	+25	+16	+11	0	+4	+7	0	+4	+7	+10	+14	+19	+10	+7	+7
XII	+26	+11	+5	+8	+24	+25	+28	+19	+56	+58	+78	+104	-7	-2	+4	+13	-7	+50	+21	+25	+39	+41	+36	+53
XIV	-6	-6	+18	0	-8	-2	+3	-3	-6	-7	-18	-5	+6	0	+9	+9	+3	+3	0	+2	+8	0	-4	+2
XVII	+14	+15	+6	-12	-5	-41	+26	+32	+45	+53	+45	+44	+35	+50	+51	+65	+59	+51	+48	+38	+56	+69	+60	+76
XVIII	+23	+20	+39	+52	+48	+44	+27	+36	+17	+9	+5	+5	+30	-2	+11	+10	+28	+11	+18	+17	+5	+12	+3	+2
XIX	+6	+11	-3	+6	+1	+5	+3	+7	+3	+7	+1	+29	+5	+4	+4	+5	+7	+3	+17	+10	+17	+19	+13	+9
XXI	+1	0	-6	-5	-2	-18	+10	+3	+2	+7	+20	+21	+8	+3	+3	+3	-8	-8	+2	-15	-12	-10	0	+2
XXII	+21	+47	+65	+71	+117	+88	+30	+39	+30	+61	+52	+32	+19	+42	+51	+51	+54	+56	+6	+18	+13	+24	+24	+21

Sistema: O mesmo mostrado na tabela II

dação do succinato, sendo a droga X mais ativa. O composto XIII apresentou efeito estimulador sobre a oxidação de substratos NAD e FAD dependentes, sendo este efeito acentuado em todos os estados da fosforilação oxidativa. O composto XIV não apresentou nenhuma ação significativa, mesmo quando, em alguns experimentos, foi ultrapassada em muito a concentração máxima dada nas tabelas. Tanto a substância XVII como a XIV, mostraram efeito estimulador sobre todos os estados da fosforilação oxidativa, também de maneira bastante acentuada. As drogas XVIII e XIX cujas estruturas se relacionam, diferindo no número de carbonos e na configuração do açúcar, apresentaram ação muito semelhante sobre a mitocôndria, estimulando principalmente a oxidação do succinato nos estados II e III, sendo este dado mais uniforme com a droga XIX. A substância XXI apresentou efeito muito pouco significativo, mesmo em concentrações maiores que as das tabelas. E finalmente a droga XXII mostrou uma atividade fortemente estimuladora da respiração mitocondrial, principalmente no estado II, tanto para o  $\alpha$ -cetogluturato como para o succinato.

Foram estudados ainda, sobre a fosforilação oxidativa, em experimentos de eletrodo de oxigênio, nas mesmas condições descritas para as tabelas II e III, os seguintes derivados desoxihalogenados de açúcares: metil 4-cloro-4-desoxi-D-arabinopiranosídeo (XXIII) que apresentou inibição da respiração nos estados II e III na oxidação do  $\alpha$ -cetogluturato, sem alteração significativa do ADP/O e da respiração com succinato; metil 2,3-di-O-acetil-4-cloro-4-desoxi-D-arabinopiranosídeo (XXIV) que na oxidação do  $\alpha$ -cetogluturato apresentou inibição dos estados II e III sem alterar a respiração do succinato e sem alterar o ADP/O; metil-2,3-di-O-acetil-4,6-dideoxi- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (XXV) que apresentou na respiração do  $\alpha$ -cetogluturato inibição dos estados II e III e leve inibição de todos os estados na respiração com o succinato.

Embora hajam sido verificados os efeitos dos derivados halogenados citados, estudos mais detalhados não foram realizados devido a que esses efeitos somente se manifestaram em concentrações acima de 3,0  $\mu$  mol/mg de proteína, fugindo

pois da faixa de interesse biológico.

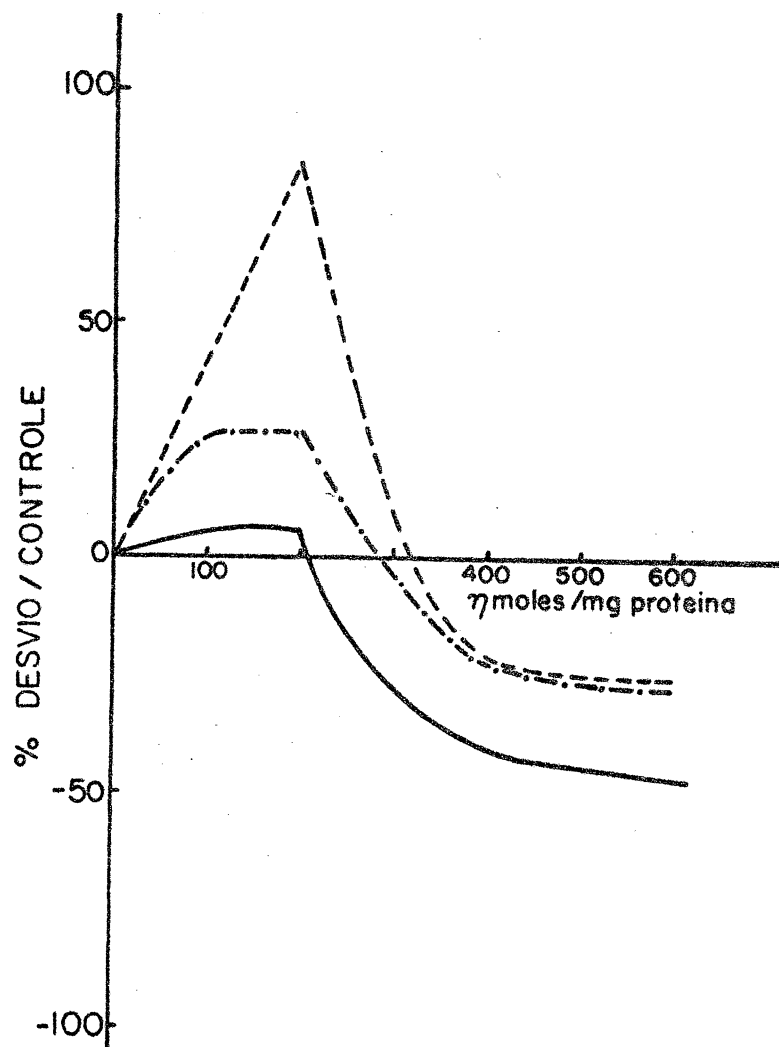
Nas figuras 1 e 2 estão transcritos, graficamente, os dados das tabelas I e II para a droga IX de maneira a podermos observar melhor o seu efeito. O gráfico I mostra que com o aumento da concentração da droga há um forte estímulo da respiração, sustentada pelo  $\alpha$ -cetogluturato, principalmente no estado II, até 200 nmol/mg de proteína e, dessa concentração em diante, ocorre uma queda abrupta indo até à inibição.

Com a respiração sustentada pela oxidação do succinato (fig. 2) não se observa nenhum efeito sobre o estado II até 300 nmol/mg de proteína, porém o estado III (fosforilante) encontra-se inibido já em baixa concentração e o estado IV comporta-se irregularmente frente ao crescente aumento da concentração do composto IX. Este tipo de efeito nos induz, embora remotamente, a considerar que a droga produz inibição da cadeia respiratória e ao mesmo tempo, razão do estímulo inicial dessa mesma respiração, um efeito desacoplador da fosforilação oxidativa. Fundamentado nisto, foram realizados os experimentos que se seguem, para melhor divisar estas deduções.

3 - EFEITO DO METIL 3,5-DI-O-BENZIL-2-CLORO-2-DESOXI-  
ARABINOFURANOSÍDEO (IX) SOBRE A FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA  
E SOBRE O EFEITO DESACOPLADOR DO 2,4-DINITROFENOL

Os resultados apresentados na fig. 3 mostram o efeito da droga IX sobre a fosforilação oxidativa em mitocôndria de fígado de rato quando o  $\alpha$ -ceto glutarato e o succinato são usados como substrato e quando é usado o 2,4-dinitro fenol como agente desacoplador. Podemos observar, que quando a mitocôndria foi incubada juntamente com a droga (fig. 3B) ocorreu uma inibição da respiração (comparando-se com o controle-fig. 3A), completa alteração do ADP/O e do RC e uma resposta muito fraca ao 2,4-DNP tanto para o  $\alpha$ -cetogluturato como para o succinato. Quando a droga foi adicionada após o substrato

Figura I



Sistema: o mesmo das tabelas II e III

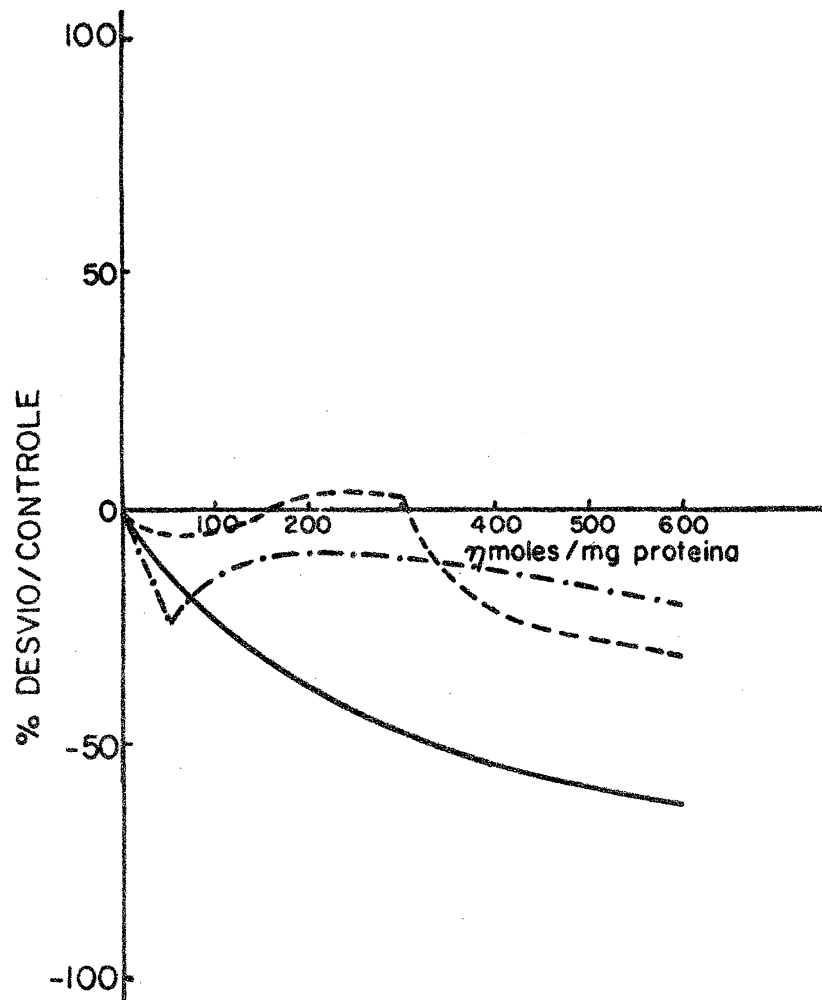
Substrato:  $\alpha$ -cetogluturato

----- Estado II

———— Estado III

-.-.-.-.- Estado IV

Figura II



Sistema: o mesmo das tabelas II E III

Substrato: Succinato

----- Estado II

———— Estado III

-.-.-.-.- Estado IV

(fig. 3C) houve pequena inibição da respiração para o  $\alpha$ -cetoglutarato, uma inibição maior para o succinato de uma fraca resposta ao 2,4-DNP em ambos. Ao ser adicionada a droga IX após a adição de 2,4-DNP (fig. 3D) pode-se observar a forte inibição da respiração com  $\alpha$ -cetoglutarato e uma inibição menor com o succinato. Parece, portanto, haver inibição da respiração tanto do substrato NAD dependente como do FAD dependente e um concomitante desacoplamento da fosforilação oxidativa, o que está de acordo com os dados dos experimentos das figuras 1 e 2.

#### 4 - FONTES DE ENERGIA PARA SWELLING CONTROLADO MITOCONDRIAL

##### O ESTADO DE EQUILÍBRIO NA CADEIA RESPIRATÓRIA

O "swelling" (inchamento) mitocondrial é um fenômeno que está intimamente relacionado ao transporte iônico em condições de equilíbrio, dependendo principalmente do livre fluxo de energia proveniente da rota de transferência de elétrons da mitocôndria (Chappell e Crofts 1965). Substâncias que interferem com o livre fluxo de energia da cadeia de elétrons inibem ambos os processos.

Oscilações amortecidas da respiração e do volume foram encontradas sob condições de energização do transporte de íons em mitocôndrias tratadas com EDTA (Azzi and Azzone, 1966). Uma grande oscilação do volume mitocondrial é observada, e parece ser consequência de um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial (Mustafa et al., 1966).

Os sistemas acima descritos são excelentes meios para o estudo de substâncias que possam vir a interferir nos processos mitocondriais sob condições de energização e de transporte de íons.

O "swelling" sustentado pela energia do sistema transferidor de elétrons em mitocôndria de fígado de rato sob condi



EFEITO DO COMPOSTO IX SOBRE A FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA E  
SOBRE A AÇÃO DESACOPLADORA DE 2,4-DNP

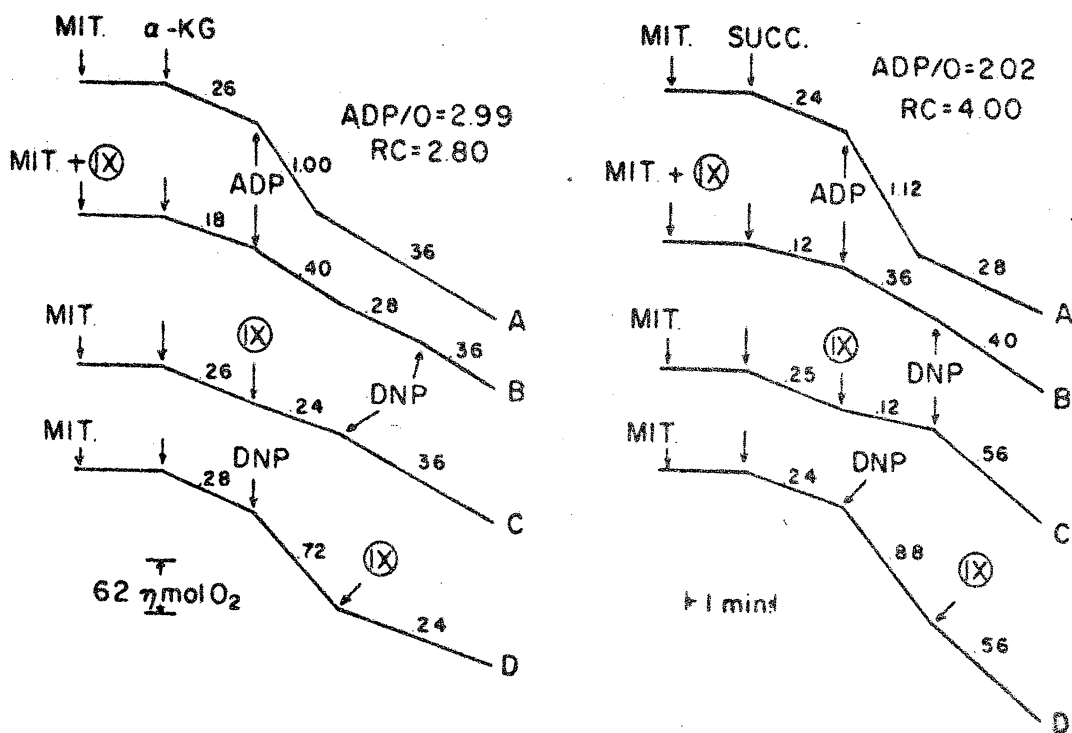


Fig. 3

Gráficos traçados por eletródio de oxigênio mostrando a oxidação mitocondrial do succinato (traçado à direita) e  $\alpha$ -cetoglutarato (traçado à esquerda) e o efeito desacoplador do 2,4-DNP na presença da droga VI. Sistema: meio de reação (Voss et al 1961); suspensão mitocondrial (3,0 mg de proteína para o  $\alpha$ -cetoglutarato e 1,5 mg para o succinato); concentração dos substratos (10 mM); 0,5  $\mu\text{moles}$  de ADP; 40 mM DNP; concentração da droga VI: 400  $\eta\text{mol/mg}$  de proteína para o  $\alpha$ -cetoglutarato e 900  $\eta\text{mol/mg}$  de proteína para o succinato. O volume final foi de 2,5 ml. A velocidade está expressa em  $\mu\text{MO}_2/\text{seg}$ .

ções de equilíbrio é ilustrado na figura 4, a qual representa um controle de comparação para os experimentos registrados da figura 5. Mitocôndrias de fígado de rato foram suspensas num meio contendo tris-sacarose-EDTA. A adição de acetato de sódio à suspensão mitocondrial fornece o ânion necessário para o processo de "swelling" (íon permeante). Então, a adição do glutamato como substrato, induz acentuado "swelling" o qual alcança um estado de equilíbrio em alguns minutos. O tratamento da oxidação aeróbica do glutamato pela rotenona inibe a respiração, porque inibe a fonte de energia causando reversão de "swelling". A adição de succinato reinicia o processo pois sobrepassa o sítio inibido da rotenona, como é mostrado pelo estímulo da transferência de elétrons, e induz o "swelling" (linha interrompida fig. 4 e 5). A transferência de elétrons induzida pelo succinato, se for inibida pela antimicina resulta em outra reversão do "swelling". Se os sítios de transferência de elétrons, inibidos pela rotenona e pela antimicina, forem sobrepassados pelo ascorbato-TMPD, o "swelling" é mais uma vez induzido, assim como o fluxo de elétrons restabelecido. A inibição do fluxo de elétrons através do sítio terminal pelo cianeto novamente reverte o "swelling". Podemos assim visualizar dois componentes importantes do processo mitocondrial; um componente químico (cadeia respiratória) dado pela linha tracejada (Fig. 4) e um componente osmótico (membrana interna) dado pela linha cheia, que caracteriza o "swelling". Devemos verificar que estes componentes são interdependentes.

A figura 5 mostra o efeito da droga IX sobre o sistema acima estabelecido. Pode-se observar que com o aumento da concentração do composto IX, incubado com a mitocôndria, o comportamento do "swelling" e do estado de equilíbrio foram completamente alterados. Quando a concentração da droga atinge 249 nmol/mg de proteína (fig. 5c) ocorre um "swelling" provocado pela simples adição do composto; provavelmente devido a alterações de permeabilidade da membrana mitocondrial. Concomitantemente observa-se (Fig. 5) que houve inibição da respiração mitocondrial para o glutamato e para o succinato e ainda, um estímulo para o ascorbato-TMPD. Observa-se, além do

## FONTES DE ENERGIA PARA SWELLING CONTROLADO MITOCONDRIAL

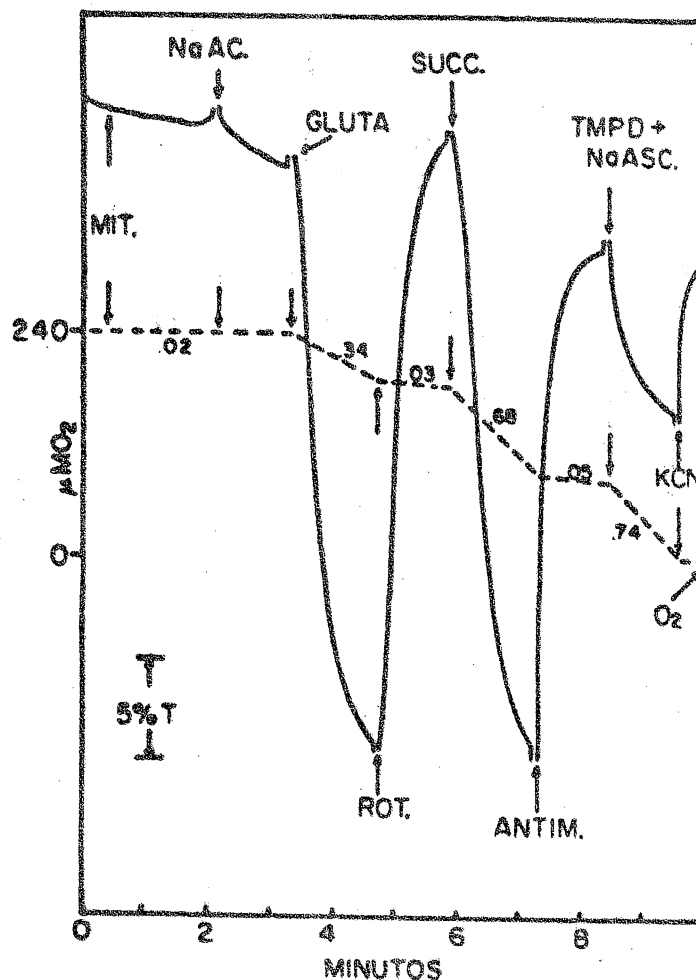


Fig. 4

Dependencia de energia para o Swelling controlado em mitocôndrias. O meio de reação continha sacarose (100 mM), Tris-HCl (10 mM, pH 7,5), Tris-EDTA (0,3 mM) e suspensão mitocondrial (2,5 mg de proteína em 3 ml de volume final). Outras adições indicadas consistem em: acetato (50 mM), glutamato (10 mM), succinato (10 mM), ascorbato (5 mM); TMPD (0,2 mM), rotenona (0,1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína), antimicina (0,2  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína); KCN (1 mM).

EFEITO DO COMPOSTO IX SOBRE AS FONTES DE ENERGIA PARA O SWELLING CONTROLADO

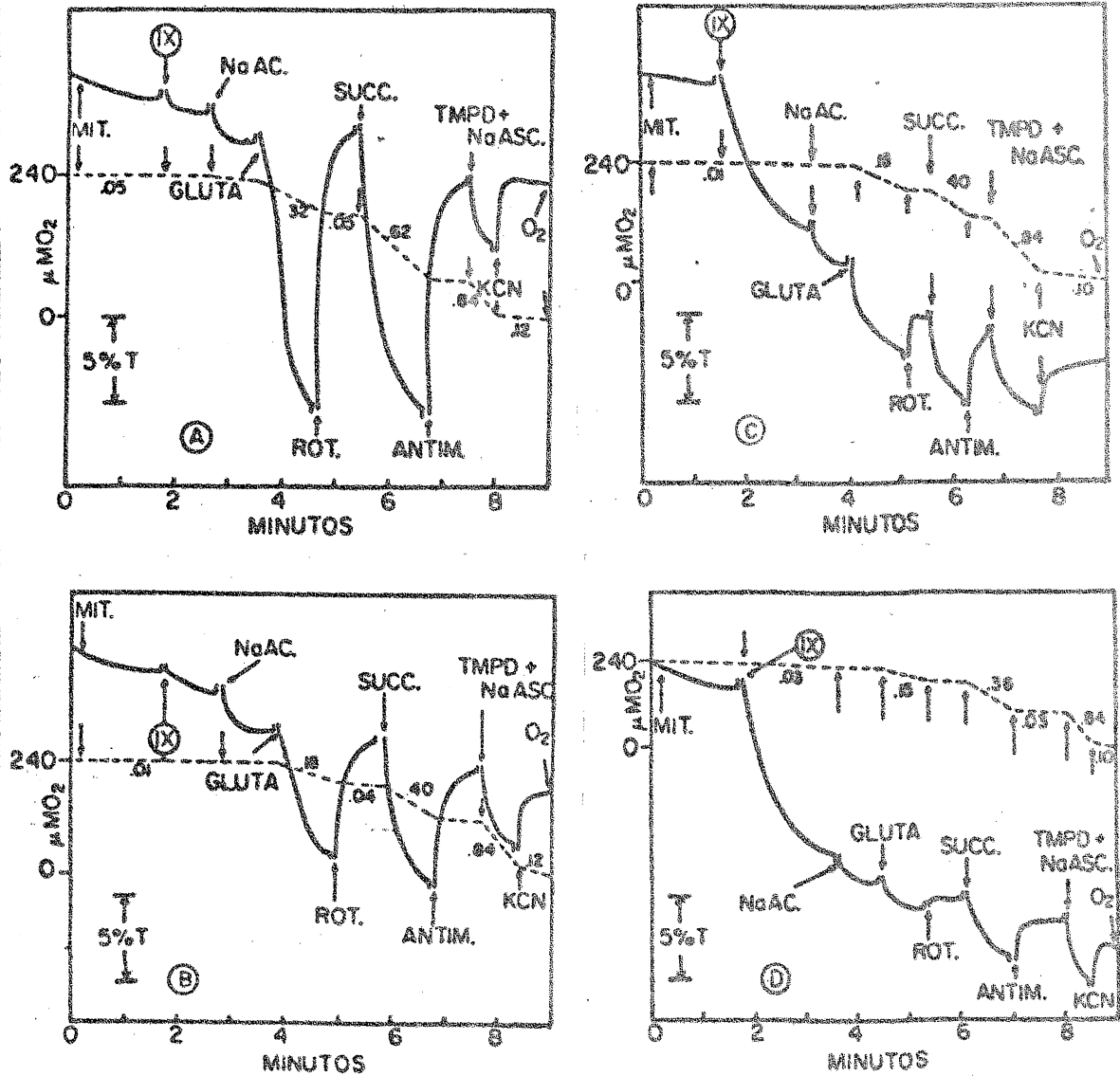


Fig. 5

O sistema foi o mesmo da fig. 4. A a concentração do composto IX adicionado foi de 60 nmol/mg de proteína; B 120 nmol/mg de proteína; C 240 nmol/mg de proteína; D 360 nmol/mg de proteína.

mais, que a inibição do "swelling" induzido pelo glutamato é muito mais efetiva do que para as demais fontes de energia. Na fig. 6, o mesmo experimento foi realizado, porém a droga IX foi adicionada após o "swelling" induzido pelo glutamato ter atingido o estado de equilíbrio, isto é, foi adicionado no mesmo ponto onde se adicionava a rotenona. Verifica-se que houve completa reversão do "swelling" e completa alteração do restante dos estímulos, bem como, inibição da cadeia respiratória, a partir da adição da droga, fortemente para o glutamato e menos efetivo para o succinato.

#### 5 - EFEITO DO COMPOSTO IX SOBRE O "SWELLING" MITOCONDRIAL

##### INDUZIDO PELO ATP COMO FONTE DE ENERGIA

Estando a cadeia de transferência de elétrons inibida por rotenona, antimicina e cianeto não é mais possível obter-se "swelling" a partir da oxidação de substratos. Entretanto, ATP pode ser empregado como fonte de energia para a indução de "swelling", sem que haja consumo de oxigênio do meio.

A figura 7 registra os experimentos realizados com o sistema ATPásico. As fig. 7a e 7b mostram os controles com e sem oligomicina, respectivamente. A oligomicina provoca a reversão de "swelling" ATP dirigido. Observa-se (fig. 7c) que também neste sistema, a droga IX, provocou alterações no comportamento da membrana da mitocôndria, promovendo uma quase completa inibição do "swelling" e também (fig. 7d), produzindo a reversão quando adicionada em lugar da oligomicina.

Com este experimento complementar fica demonstrado que a droga IX pode interferir com todos os sistemas transferidores de energia através de sua ação sobre a membrana mitocondrial.

EFEITO DO COMPOSTO IX SOBRE AS FONTES DE ENERGIA PARA  
SWELLING CONTROLADO

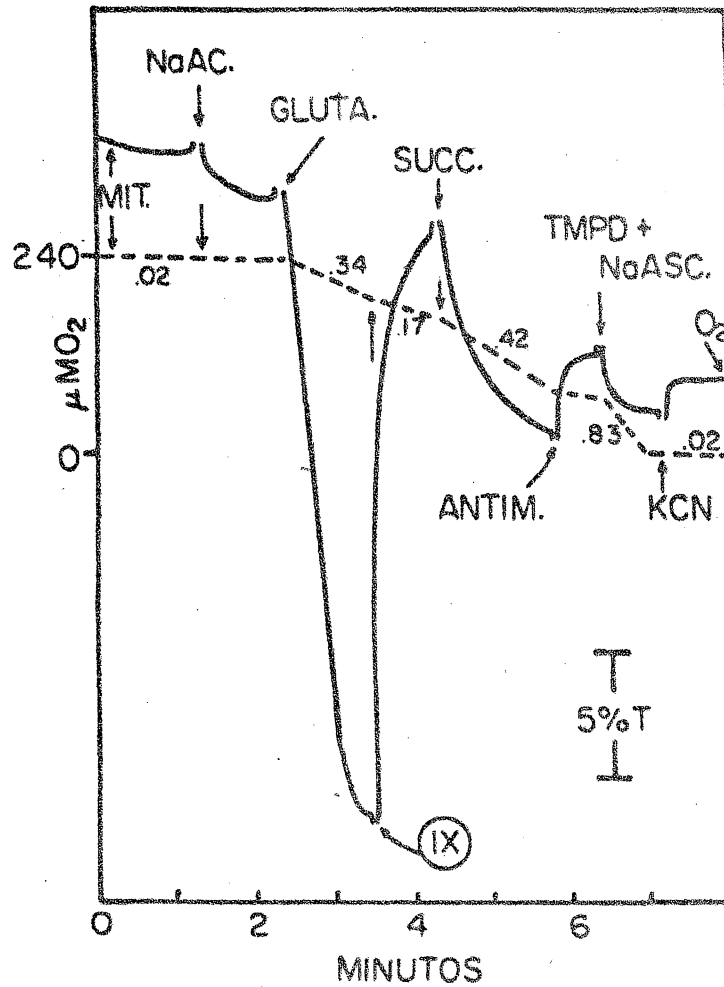


Fig. 6

O mesmo sistema da fig. 4 foi aqui utilizado, exceto que em lugar da rotenone foi adicionado o composto IX na concentração de: 120 nmol/mg de proteína.

EFEITO DO COMPOSTO IX SOBRE O SWELLING MITOCONDRIAL ATP  
DIRIGIDO

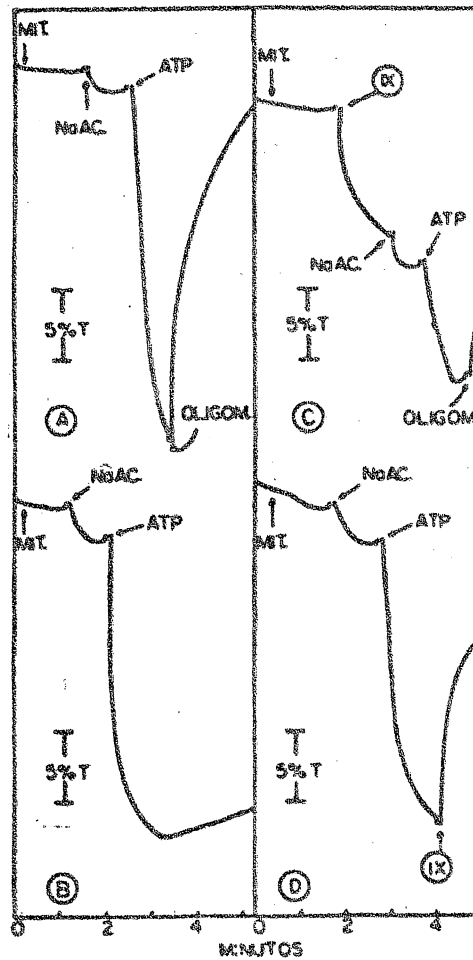


Fig. 7

Foi utilizado o mesmo sistema que na fig. 4, sendo que adicionou-se ATP (4mM), oligomicina (0,13  $\mu$ g/mg de proteína) A controle; B controle sem oligomicina; C adicionou-se 120 nmol/mg de proteína com a droga IX; D adicionou-se 120 nmol/mg de proteína da droga IX.

6 - AÇÃO DO COMPOSTO IX SOBRE O SISTEMA OSCILATÓRIO DO  
VOLUME MITOCONDRIAL

O valor dos dados obtidos de uma oscilação do volume mitocondrial é potencialmente muito alto, sendo que a amplitude, período, fase e forma dessa oscilação, refletem as propriedades de um sistema de controle bem estruturado. Uma oscilação é bastante sensível a qualquer mudança que afete o seu controle. Por exemplo, Stancliff et al. (1969) verificaram que o processo oscilatório é uma excelente prova para distinguir diferenças no conteúdo de ácidos graxos mitocondriais

Para que os dados de oscilação do volume mitocondrial possam ser avaliados é necessário conhecer as convenções adotadas e os termos específicos. Estes parâmetros foram estabelecidos por Gooch e Packer (1974). A figura 8 mostra um esquema da oscilação de volume de mitocôndrias de fígado de rato, registradas por espectrofotometria.

Convencionalmente, as oscilações mitocôndriais tem sido descritas de maneira que a primeira variação de volume seja registrada como um decaimento. Observa-se na fig. 8, que as oscilações comumente assumem a aparência de um oscilador harmônico amortecido. O valor do meio período é definido, como sendo o tempo requerido para ir desde uma depressão até um pico, ou vice-versa. Devido à tendência dos valores dos meios períodos serem constantes durante uma oscilação, a média de períodos pode ser acuradamente determinada. De maneira



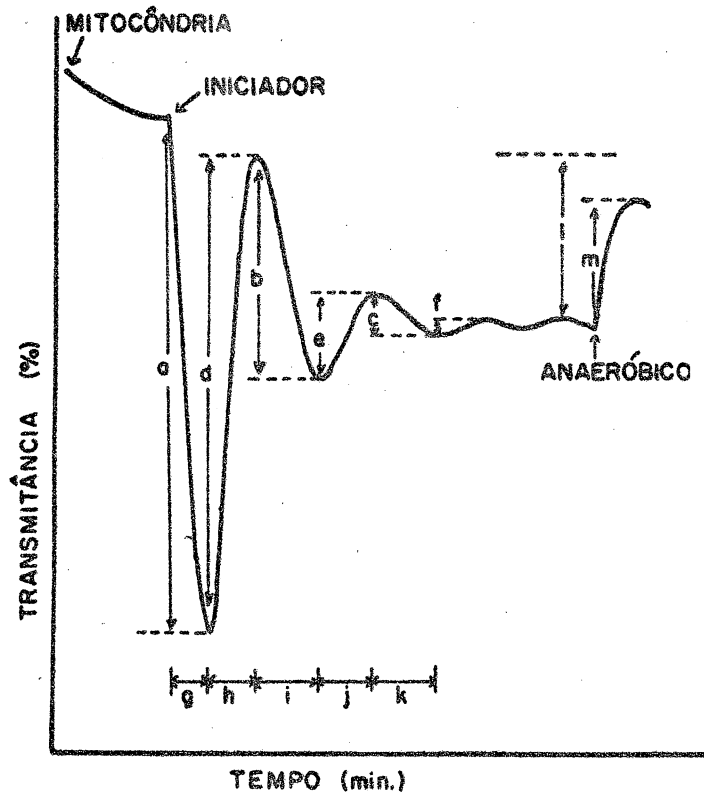


Fig. 8 - Exemplo de uma oscilação de mitocôndria de fígado de rato indicando o critério de avaliação: Amplitude: a,b,c,d,e,f; Período médio:  $2 \times (\text{soma de } n \text{ mensuráveis meio períodos})/n$ ; Fator de amortecimento: a/b, b/c, d/e, e/f; equilíbrio 1; Relaxamento: m.

similar a amplitude pode ser definida como a variação no parâmetro monitorado de um pico a uma depressão, ou vice e versa, e a relação subsequente das amplitudes é chamada de fator de

amortecimento ("damping factor). Está demonstrado que o fator de amortecimento tende a ser um valor constante durante uma dada oscilação mitocondrial. Normalmente uma oscilação acaba completamente amortecida; a diferença, no parâmetro monitorado, entre o ponto onde a oscilação teve início e o ponto onde houve completo amortecimento é designado de valor de "equilíbrio". O termo "relaxamento" é dado ao parâmetro medido quando ocorre repentinamente um colapso do gradiente iônico, que comumente ocorre quando a mitocôndria perde, também repentinamente, seu suprimento de energia, tal como acontece quando inibidores são aplicados ou o suprimento de oxigênio termina. O desacoplamento das fontes de energia do sistema funcional pode ser obtido por certos agentes químicos. Estes desacopladores, tal como o 2,4-dinitrofenol ou o FCCP (p-trifluormetoxycarbonil cynide phenylhydrazone), podem inibir totalmente as oscilações mitocondriais (Sepala et al, 1973). Quando se usam baixas concentrações de desacoplador, há um aumento das amplitudes, um decréscimo do período médio (indicativo da redução do fornecimento de energia) e também um aumento do fator de amortecimento (Gooch and Packer, 1974).

Nestes termos pode-se analisar com maior facilidade os dados das figuras (9) e (10) auxiliados pela tabela (IV).

A fig. (9) mostra o efeito da droga IX sobre a oscilação do volume mitocondrial succinato dirigida e a figura (10) demonstra o mesmo fenômeno ATP dirigido. Observa-se que em baixas concentrações da droga, há um aumento das amplitudes (tabela IV), e que, com o aumento gradativo da concentração, as amplitudes voltam ao normal, havendo diminuição do nº de períodos, tendendo a uma inibição total. Ocorreu também diminuição aguda dos períodos médios e acentuado crescimento dos fatores de amortecimento. O equilíbrio fica afetado com diminuição acentuada do parâmetro, possivelmente porque a droga IX também inibe o fluxo eletrônico da oxidação de succinato, enquanto que para o ATP o equilíbrio permanece quase constante.

EFEITO DO COMPOSTO IX SOBRE A OSCILAÇÃO DO VOLUME  
MITOCONDRIAL

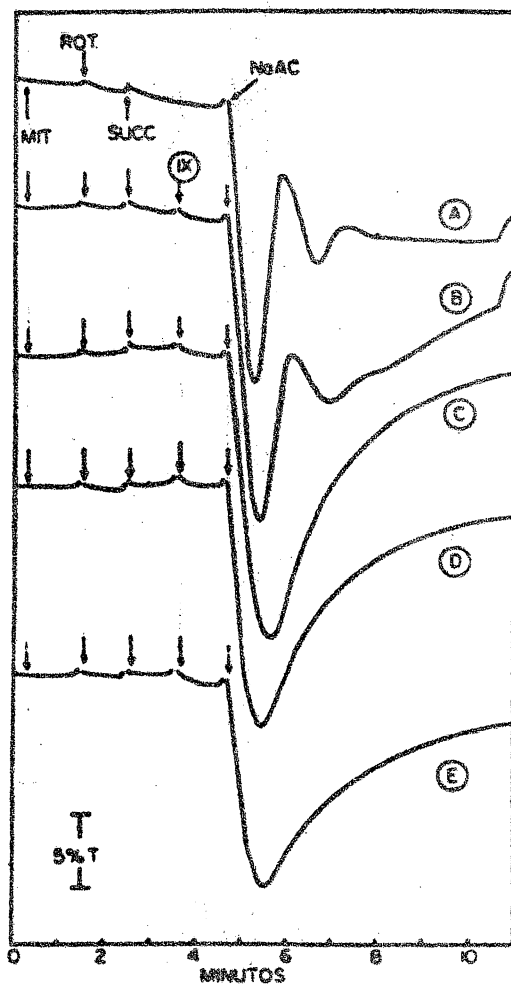


Fig. 9

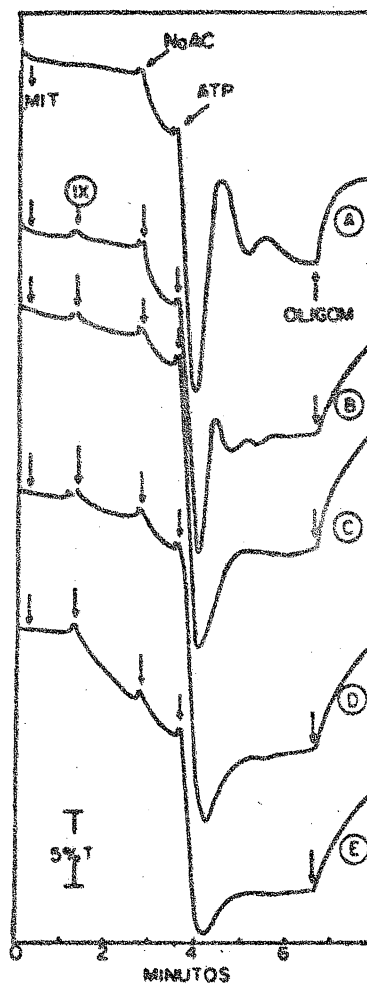


Fig. 10

As condições básicas são as mesmas da fig. 1, com excesso do pH = 8,2 e a suspensão mitocondrial foi de 3 mg em 3 ml de volume final. Acetato de sódio (50 mM), rotenone (0,1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína), succinato (fig. 5 - 10 mM); ATP (fig. 6 - mM). Oligonnicina (0,10  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína). A controle sem droga; B 10 nmol/mg de proteína; C 50 nmol/mg de proteína; D 100 nmol/mg de proteína; E 200 nmol/mg de proteína.

Tabela IV

Parâmetros das oscilações <u>succinato</u> dirigidas				
concentra- ções nmol/mg prot	Amplitudes a - b - c - d - e	Períodos médios seg.	Fator de Amorteci- mento	Equilí- brio
0	3,6-1,2-0,4-2,7-0,6	198	3	1,9
10	4,0-0,6-2,2- - -	110	7	1,3
50	3,7 - - - -	-	-	0,6
100	3,2 - - - -	-	-	0,6
200	2,6 - - - -	-	-	0,6
A T P dirigidas				
0	3,3-1,0-0,3-3,0-0,4	133	3	1,8
10	3,5-1,9-2,0 - -	110	17	2,0
50	4,0-1,3 - - -	73	-	2,3
100	3,7 - - - -	-	-	2,5
200	2,8 - - - -	-	-	2,4

Tabela IV - Parâmetros referentes às oscilações mitocondriais registradas nas figuras 9 e 10 maiores detalhes são dados no texto.

Com os dados obtidos dos experimentos mostrados (Fig. 1 a 7) e os das Fig. 9 e 10, torna-se possível sugerir, que a droga IX comporta-se como um tipo de desacoplador da fosforilação oxidativa.

#### 7 - AÇÃO DO COMPOSTO IX SOBRE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIAS

Devido ao fato da droga IX apresentar um efeito inibidor sobre a cadeia respiratória (fig. 1,2 e 3), em mitocôndrias íntegras, não ficando clara a extensão dessa inibição, procurou-se estudar o efeito desse composto sobre o sistema enzimático em partículas submitocondriais (partículas invertidas) com a finalidade de determinar os parâmetros reais dessa ação sem a interferência do efeito desacoplador. Outro enfoque é a localização do ponto de ação da droga sobre a cadeia transferidora de elétrons.

#### 8 - EFEITO DO COMPOSTO IX SOBRE O SISTEMA ENZIMÁTICO NADH-

##### DESIDROGENASE EM MITOCÔNDRIAS ROMPIDAS

A droga IX não apresentou nenhuma atividade sobre a NADH-desidrogenase, mesmo em altas concentrações (3,84 nmol/mg de proteína), tendo como receptor de elétrons o ferricianeto de potássio ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^-$ ).

9-EFEITO DA DROGA IX SOBRE A ATIVIDADE DO SISTEMA SUCCINATO

DESIDROGENASE EM MITOCÔNDRIAS ROMPIDAS

Tabela V

concentração da droga IX ( $\mu$ mol/mg prot.)	% de inibição
0	-
0,15	16
0,30	16
0,60	24
1,50	30
3,00	30
6,00	30

Tabela V - O meio de reação utilizado foi: Tampão fosfato 50 mM, pH 7,4; EDTA, 2 mM; azida sódica, 3mM; Succinato, 20 mM; DCIP, 0,1 mM; PMS, 0,16 mM; Proteína, 0,05 mg; Volume final, 1 ml. A leitura foi feita a 600 nm à temperatura de 27°C.

Pode-se verificar pela tabela V que houve um leve efeito inibidor sobre a enzima o qual se tornou constante em apenas 30% mesmo elevando-se em excesso a concentração da droga.

10-EFEITO DA DROGA IX SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA SUCCINATO

DESIDROGENASE ISOLADA (E.E.1.3.99.1).

Nenhum efeito foi notado sobre a atividade da enzima

isolada, mesmo em concentrações elevadas da droga (10  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína) tendo como receptor de elétrons o sistema PMS/DCIP. As condições foram as mesmas da tabela V.

## II-EFEITO DA DROGA IX SOBRE O SISTEMA NADH-OXIDASE E SUCCINO

### OXIDASE EM PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIAIS EPI E EM

#### MITOCÔNDRIAS ROMPIDAS

A fig. (11) mostra o efeito obtido com a droga IX sobre o equipamento enzimático NADH oxidase e succino oxidase em partículas submitocondriais transferidoras de elétrons (EPI) e em mitocôndrias rompidas. Podemos observar que a efetividade da droga sobre o sistema NADH oxidase é extremamente mais eficiente do que para o sistema succino oxidase, visto que já na concentração de 100  $\text{nmol}/\text{mg}$  de proteína obteve-se uma inibição em torno de 70% do primeiro sistema, enquanto que, praticamente nenhuma inibição foi observada sobre o segundo sistema. Verifica-se também, que para a NADH desidrogenase não há diferença entre a inibição em mitocôndrias rompidas e em partículas EPI, demonstrando um efeito caracteristicamente enzimático, isto é, a droga IX atua diretamente sobre o componente enzimático. Contrariamente aconteceu com o sistema succino oxidase; quando se compara a ação da droga sobre mitocôndrias íntegras (fig. 3 dir.), verifica-se que com concentração de 900  $\text{nmol}/\text{mg}$  de proteína, a inibição já alcançava 50% da atividade, a despeito do efeito desacoplador, enquanto que em mitocôndrias rompidas e partículas EPI, mesmo com o dobro dessa concentração, não se obtém os 50% de inibição. Observa-se ainda que, em partículas EPI, a droga em baixa concentração, não teve nenhuma atividade, passando a demonstrá-la após a concentração de 600  $\text{nmol}/\text{mg}$  de proteína e indo alcançar a mesma percentagem de inibição que em mitocôndrias rompidas em concentrações muito altas.

EFEITO DA DROGA IX SOBRE OS SISTEMAS NADH OXIDASE E  
SUCCINOXIDASE EM PARTÍCULAS EPI E MITOCONDRIAS  
ROMPIDAS

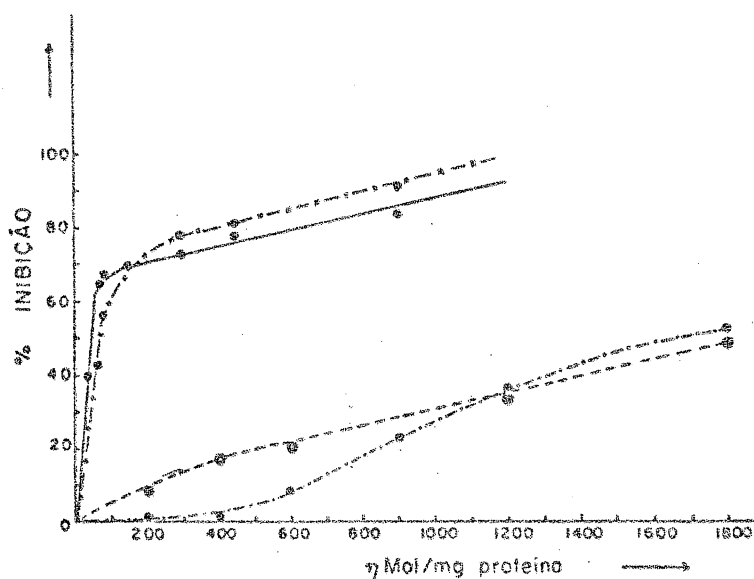


Fig. 11

- X — X — X — : Partículas EPI (NADH-oxidase)  
 ————— : Mitochondrias rompidas (NADH-oxidase)  
 - - - - - : Mitochondrias rompidas (succinoxidase)  
 — . — . — . — : Partículas EPI (succinoxidase)

Efeito da droga IX sobre a atividade da NADH-oxidase e succinatoxidase em mitochondrias rompidas e partículas EPI. O consumo de oxigênio foi medido por polarografia. As condições básicas estão descritas em material e métodos.



Esta sequência de eventos sugere que a inibição provocada pela droga IX sobre a cadeia eletrônica FAD dependente está condicionada ao grau de integridade da membrana mitocondrial.

## 12- ATIVIDADE DO COMPOSTO IX SOBRE O SISTEMA ENZIMÁTICO

### CITOCROMO C OXIDASE EM PARTÍCULAS EPI E EM

#### MITOCÔNDRIAS ROMPIDAS

Nenhum efeito do composto em estudo foi verificado sobre a citocromo C oxidase, mesmo em altas concentrações (2,5  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína), quando estudada a partir da velocidade de consumo de oxigênio medida polarograficamente, tendo como substrato o sistema TMPD + ascorbato.

## 13-EFEITO DO METIL 3,5-DI-O-BENZIL-D-RIBOFURANOSÍDEO (VIII)

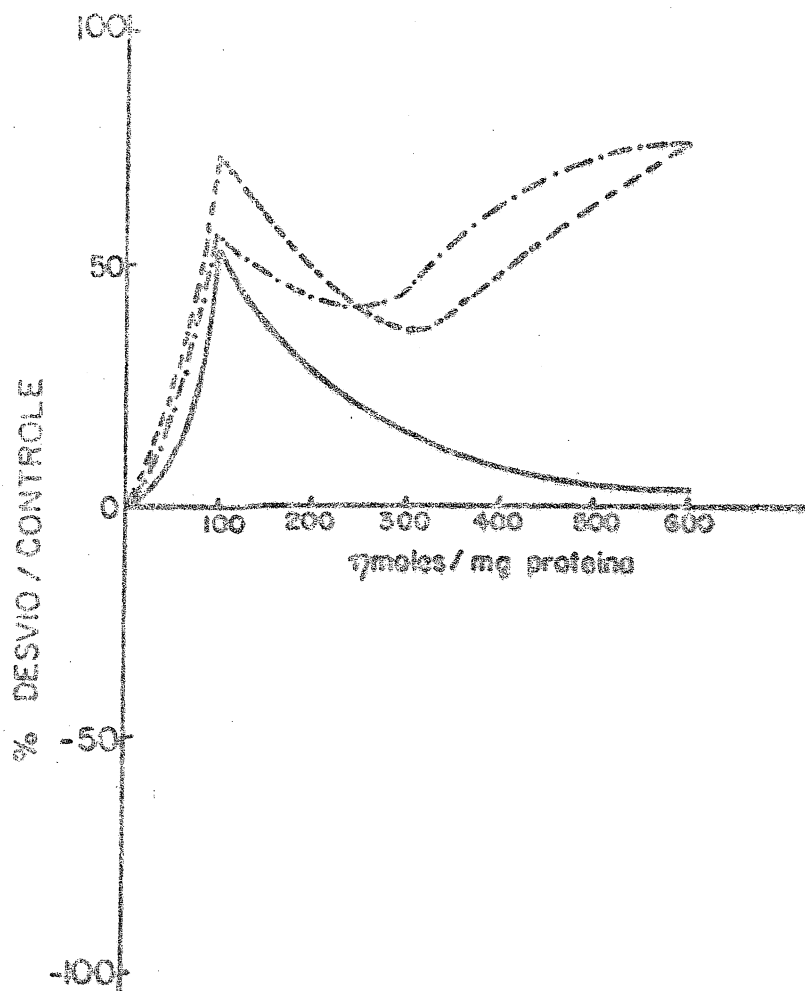
### SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO DURANTE O

#### PROCESSO DE FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

A fig. (12) mostra o efeito da droga VIII, em função da sua concentração, sobre a velocidade de consumo de oxigênio, sustentada pelo  $\alpha$ -cetoglutarato. Verifica-se que há um forte estímulo na respiração mitocondrial até à concentração de 100  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína, principalmente no estado II. Este estímulo é mantido, embora irregularmente, para os estados II e IV, enquanto que para o estado III (estado fosforilativo) a velocidade respiratória volta ao normal.

A fig. (13) demonstra o efeito da droga VIII, em função de sua concentração, sobre a fosforilação oxidativa tendo o

Figura 12



Sistema: o mesmo das tabelas II e III

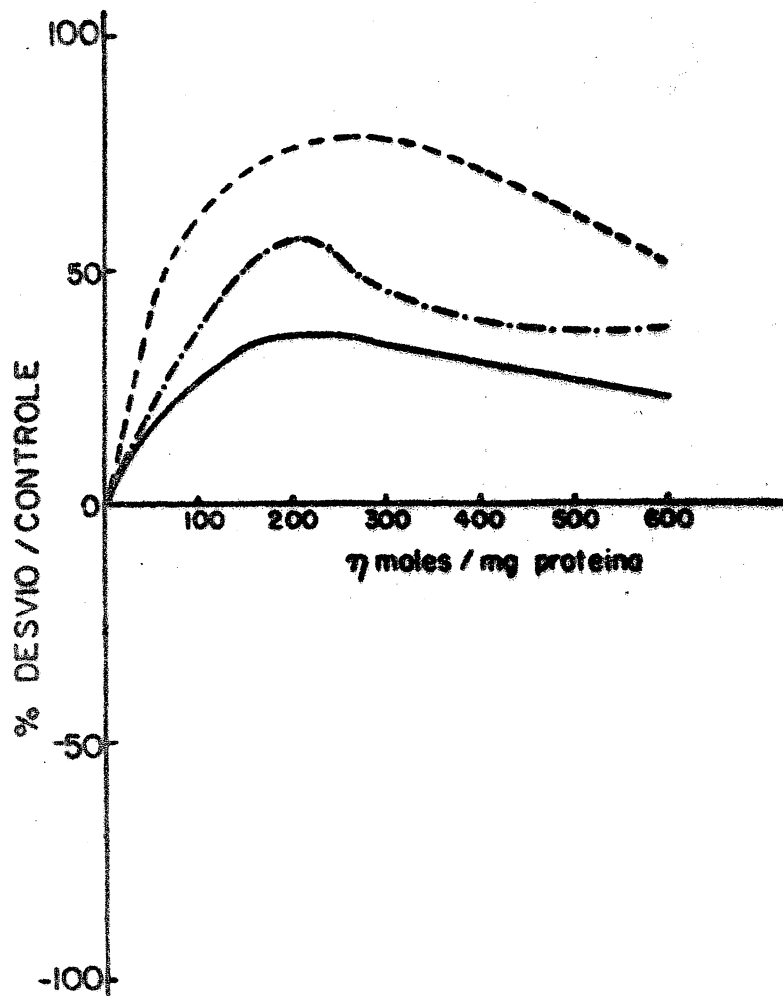
Substrato:  $\alpha$ -cetogluturato

----- Estado II

———— Estado III

..... Estado IV

Figura 13



Sistema: o mesmo das tabelas II e III

Substrato: Succinato

----- Estado II

———— Estado III

..... Estado IV

succinato como substrato. Observa-se um estímulo mais uniforme em todos os estados da respiração, o qual atinge um máximo em 200 nmol/mg de proteína, com posterior decréscimo que com concentrações maiores tende a uma inibição, isto pode ser verificado em experimentos que não foram aqui registrados.

14 - AÇÃO DO COMPOSTO VIII SOBRE A FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA E  
SOBRE O EFEITO DESACOPLADOR DO 2,4-DINITROFENOL

A figura (14) mostra a ação do composto VIII sobre a fosforilação oxidativa em mitocôndrias de fígado de rato quando o  $\alpha$ -cetogluturato (fig. 14 esq.) e o succinato (fig. 14 dir.) foram usados como substrato e quando foi usado o 2,4-dinitro fenol como agente desacoplador. Verifica-se que, quando a suspensão mitocondrial foi incubada com a droga (fig. 14b) e o  $\alpha$ -cetogluturato foi usado como substrato, houve um estímulo inicial do estado II, uma resposta muito baixa ao ADP com conseqüente diminuição do ADP/O e do RC e uma resposta baixa também ao 2,4-DNP. Quando o succinato foi o substrato aconteceu fenômeno semelhante, porém menos intenso. Quando a droga foi adicionada após o substrato (fig. 14c), houve um estímulo na primeira adição da droga, uma leve diminuição desse estímulo na segunda adição, atingindo a concentração de 1,2  $\mu$ mol/mg de proteína. Nessa concentração a resposta ao 2,4-DNP foi quase nula com o substrato  $\alpha$ -cetogluturato. Com o succinato os estímulos foram maiores, sendo a resposta ao 2,4-DNP uma complementação do estímulo. Quando a droga foi adicionada após a adição do 2,4-DNP (fig. 14d), com o  $\alpha$ -cetogluturato como substrato, verificou-se que na primeira adição da droga (0,6  $\mu$ mol/mg de proteína) houve pequena inibição da velocidade respiratória e com a segunda adição (completando 1,2  $\mu$ mol/mg de proteína) houve um considerável aumento dessa inibição. Com o succinato como substrato nenhum efeito foi observado.

EFEITO DO COMPOSTO VIII SOBRE A FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA  
E SOBRE A AÇÃO DESACOPLADORA DE 2,4 - DNP

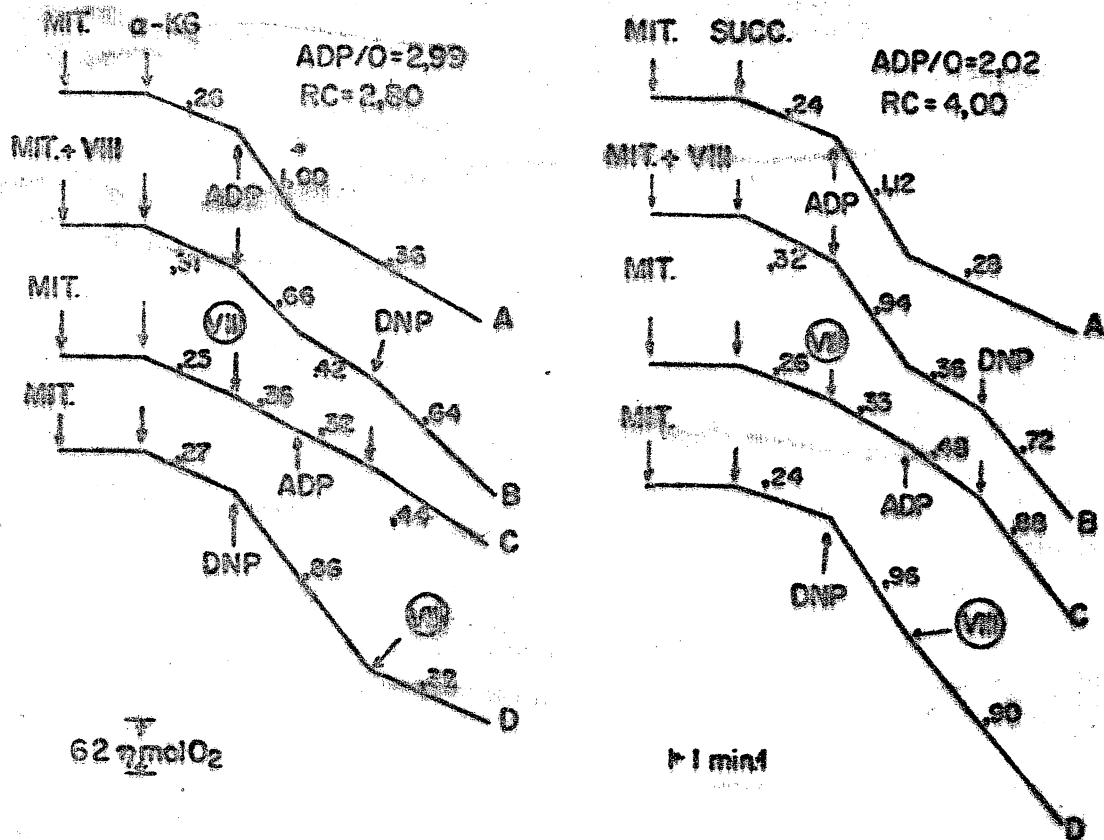


Fig. 14

Gráficos traçados por eletródio de oxigênio mostrando a fosforilação oxidativa, tendo como substratos o succinato (traçado à direita) e o  $\alpha$ -cetoglutarato (traçado à esquerda) e o efeito desacoplador do 2,4-DNP na presença da droga VIII. O sistema é o mesmo da fig. 3. Concentração da droga VIII com ambos os substratos: B 0,6  $\mu\text{mol/mg}$  proteína; C aplicação de duas porções iguais de droga totalizando 1,2  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína; D o mesmo que em C.

Diante do efeito estimulador apresentado pela droga VIII em função de sua concentração (fig. 12-13) e da sequência de efeitos acima verificados, pode-se considerar que a droga apresenta efeito desacoplador e efeito inibidor, este com relação aos substratos NAD dependentes. Observa-se também que estes efeitos competem entre si na sua manifestação sobre a respiração em mitocôndrias íntegras..

#### 15 - EFEITO DO COMPOSTO VIII SOBRE AS FONTES DE ENERGIA

##### PARA "SWELLING" CONTROLADO

A figura (15) mostra os experimentos realizados com a droga VIII sobre o sistema de "swelling" controlado, cujo controle de comparação (fig. 4) é o mesmo utilizado para o composto IX.

Observa-se na fig. (15) que com o aumento da concentração, também ocorrem alterações do padrão de comportamento da membrana frente ao "swelling". Porém, embora o efeito seja similar ao do composto IX, as concentrações exigidas da droga VIII são pelo menos 10 vezes maiores. Verifica-se que neste sistema o efeito inibidor da respiração (linha interrompida) já se manifesta em baixas concentrações, principalmente com relação ao substrato NAD dependente, e bem mais fracamente com o substrato FAD dependente. Com o substrato artificial TMPD+ascorbato verifica-se um forte aumento da velocidade respiratória da fração terminal do sistema transferidor de elétrons. Como a mitocôndria utilizada no experimento está em estado íntegro, isto pode significar um processo de desacoplamento acentuado.

EFEITO DO COMPOSTO VIII SOBRE AS FONTES DE ENERGIA PARA SWELLING CONTROLADO

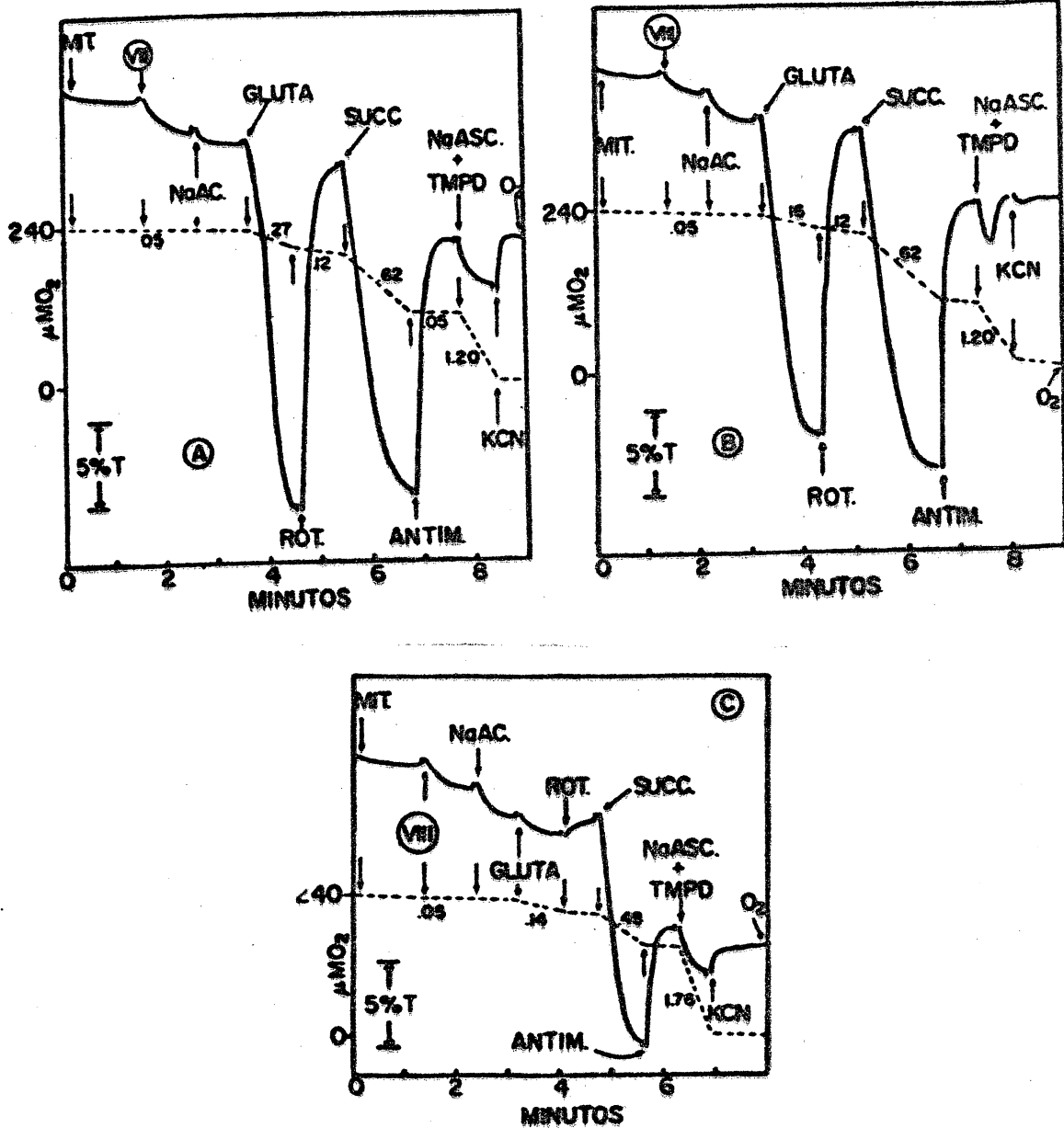


Fig. 15

O sistema utilizado foi o mesmo do experimento da fig. 4, a concentração da droga em A foi de 0,3  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína, em B 0,6  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína e em C foi de 1,5  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína.

EFEITO DO COMPOSTO VIII SOBRE O SWELLING MITOCONDRIAL ATP  
DIRIGIDO

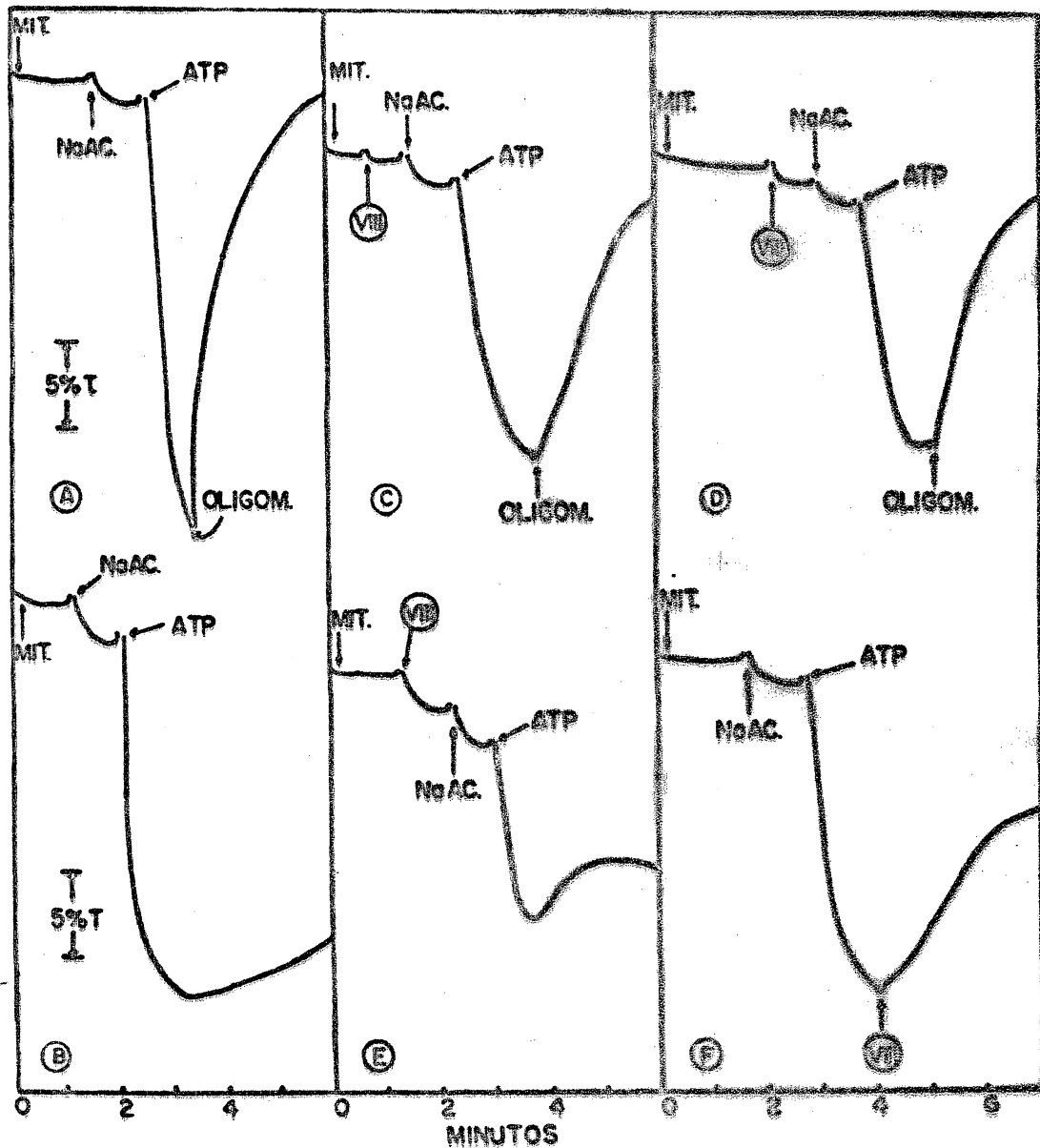


Fig. 16

Foi utilizado o mesmo sistema que na figura 7. A e B são controles com oligomicina e sem oligomicina respectivamente, em C adicionou-se 0,48  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína, em D 0,96  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína, em E 1,5  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína e em F 0,96  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína.



16 - EFEITO DO COMPOSTO VIII SOBRE O "SWELLING"

MITOCONDRIAL INDUZIDO POR ATP

A fig. (16) representa o efeito do composto VIII sobre o "swelling" ATP dirigido, onde com o aumento da concentração do composto (fig. 16c,d,e) ocorreu um corte quase completo do "swelling", demonstrando grande diminuição da efetividade da fonte de energia. A fig. 16f demonstra a capacidade da droga em produzir a reversão quase completa do "swelling" da mesma maneira que a oligomicina.

17 - EFEITO DO COMPOSTO VIII SOBRE O SISTEMA OSCILATÓRIO

DO VOLUME MITOCONDRIAL

Tabela VI - Parâmetros referentes às oscilações mitocondriais registradas na figura 17.

Parâmetros das oscilações succinato dirigidos

Concentra- ções nmol/mg prot.	Amplitude					Períodos médios seg.	Fator de amorteci- mento	Equilí- brio
	a	b	c	d	e			
0	4,7	1,2	0,3	2,6	0,6	193	4,0	2,5
50	4,5	0,6	-	-	-	214	7,5	2,4
100	4,0	0,2	-	-	-	248	20,0	2,0
200	3,8	-	-	-	-	-	-	1,7

EFEITO DO COMPOSTO VIII SOBRE A OSCILAÇÃO DO  
VOLUME MITOCONDRIAL

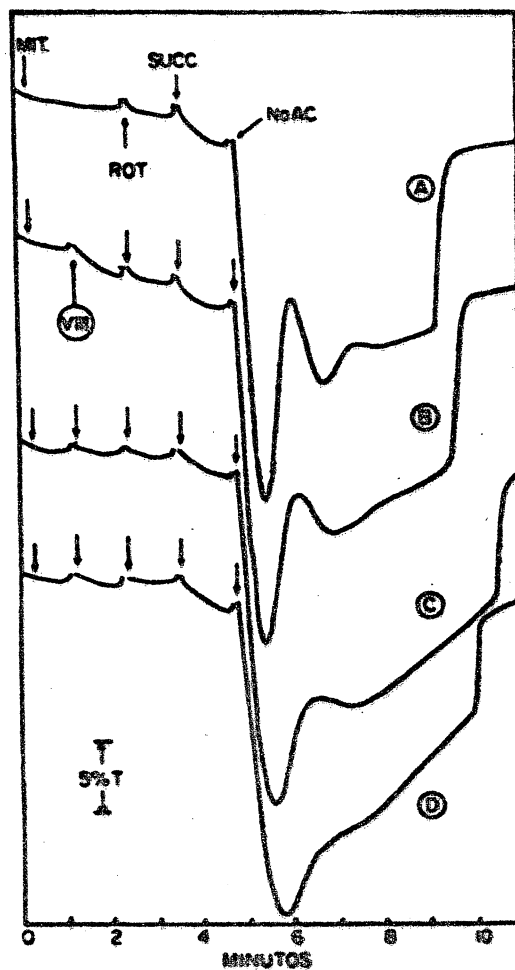


Fig. 17

O sistema utilizado foi o mesmo das figuras 8 e 9. As concentrações do composto VIII utilizadas foram: A controle, B 50 nmol/mg de proteína, C 100 nmol, D 200 nmol.

A fig. 17 mostra o efeito das concentrações crescentes da droga VIII sobre o sistema de oscilações do volume mitocondrial. Observa-se que a droga promoveu a inibição das oscilações, o encurtamento das amplitudes e aumentou acentuadamente o fator de amortecimento (tabela VI), dados indicativos da diminuição da efetividade da fonte de energia. Observa-se ainda, na tabela VI que os períodos médios foram aumentados e o equilíbrio tendeu à uma diminuição, isto é indicativo da inibição da velocidade de consumo de oxigênio, consequência da inibição da cadeia respiratória.

Nota-se que, similarmente à droga IX, a droga VIII interfere com todas as fontes de energia. Estes resultados, coadjuvados pelas observações anteriores (fig. 12, 13 e 14), permitem sugerir que o composto VIII também se comporta como um tipo de desacoplador da fosforilação oxidativa.

#### 18-AÇÃO DO COMPOSTO VIII SOBRE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIAIS

Como a droga VIII apresentou efeito inibidor sobre a cadeia respiratória em mitocôndrias íntegras (fig. 14), não ficando claros a extensão e os pontos da ação da mesma, passou-se a estudá-la sobre o sistema enzimático da cadeia transferidora de elétrons em partículas submitocondriais (partículas invertidas).

#### 19-EFEITO DA DROGA VIII SOBRE O SISTEMA ANZIMÁTICO - NADH

##### DESIDROGENASE

Nenhum efeito foi verificado sobre a atividade da NADH desidrogenase, mesmo em altas concentrações (2,8  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína), quando estudada espectrofotometricamente, tendo como receptor artificial de elétrons o ferricianeto de potássio ( $\text{Fe}(\text{CN})^-$ ).

20 - EFEITO DA DROGA VIII SOBRE O SISTEMA SUCCINATO

DESIDROGENASE

Nenhum efeito foi verificado com relação à succinato desidrogenase, mesmo em altas concentrações (5,0  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína) estudada em mitocôndrias rompidas e enzima isolada, tendo como sistema receptor de elétrons o PMS/DCIP.

21 - EFEITO DA DROGA VIII SOBRE O SISTEMA SUCCINATO

OXIDASE

O efeito da droga VIII sobre o sistema succinato oxidase, estudada em mitocôndrias rompidas mostrou um efeito muito irregular de inibição (máximo de 30%) quando em concentrações de até 2,5  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína; em partículas EP1 nenhum efeito foi verificado. Isto também sugere haver uma dependência da integridade da membrana para se verificar efeito da droga sobre a oxidação de substratos FAD dependentes.

22 - EFEITO DA DROGA VIII SOBRE O SISTEMA NADH OXIDASE

A tabela VII mostra o efeito do composto VIII, em função da sua concentração, sobre o equipamento enzimático NADH oxidase em mitocôndrias rompidas e em partículas submitocondrais transferidoras de elétrons (EP1). Na tabela VII verifica-se que a droga inibe fortemente o processo em ambas as partículas, sendo mais efetiva com a partícula EP1, possivelmente porque nesse sistema a enzima esteja mais exposta à ação da droga.

## DISCUSSÃO

Foram sintetizados 18 derivados de monossacarídeos e caracterizados por espectrometria de massa, H-RNM, ponto de fusão e rotação óptica, obtendo-se resultados coincidentes com a literatura, o que indica que as amostras apresentaram um bom grau de pureza. Estes compostos foram estudados sistematicamente, em relação às suas concentrações, sobre a fosforilação oxidativa em mitocôndrias de fígado de rato perfeitamente acopladas (tabela I). Dos resultados apresentados nas tabelas II e III verifica-se que 12 derivados apresentaram efeitos significativos. Dentre essas substâncias, foram escolhidas o metil 3,5-di-O-benzil-D-ribofuranosídeo (VIII) e o metil 3,5-di-O-benzil-2-cloro-2-desoxi-D-arabinofuranosídeo (IX) para, neste trabalho, serem estudados os seus mecanismos de ação sobre o processo de fosforilação oxidativa.

Algumas das demais substâncias estão sendo estudadas neste laboratório, com resultados animadores até o presente.

O composto 1,2:5,6-di-O-isopropilideno-3-fluor-3-desoxi-D-glucofuranose (XI) sendo estudado por Kreisel, 1979 (comunicação pessoal), apresentou um efeito de inibição no mesmo sítio de ação da rotenona e um efeito desacoplador moderado devido a um processo de dispersão da membrana interna mitocondrial.

O 6-O-benzil-3-desoxi-3-fluor-1,2-isopropilideno-D-glucofuranose apresenta, segundo Toews 1979 (comunicação pessoal), fortes evidências de inibição sobre o complexo I e um acentuado efeito desacoplador devido a uma ação sobre a membrana ainda não muito clara.

Os compostos  $\beta$ -tetra-O-acetil-1-arabinose (XVIII) e o  $\beta$ -penta-O-acetil-D-galactopiranosose (XIX) apresentaram, de acordo com Chagas, 1979, efeito de estimular, especificamente, a oxidação do succinato pela mitocôndria intacta. Verificou-se que ambas as drogas inibem o efluxo de cálcio da mitocôndria,

mantendo conseqüentemente, um nível de concentração intramitocondrial maior, desse íon. Considerando os resultados obtidos por Ezawa e Ogata, 1977 que observaram ser o  $\text{Ca}^{2+}$  um efector positivo do succinato desidrogenase, é possível que o efeito estimulador desses compostos sobre a oxidação do succinato se ja também através do  $\text{Ca}^{2+}$ .

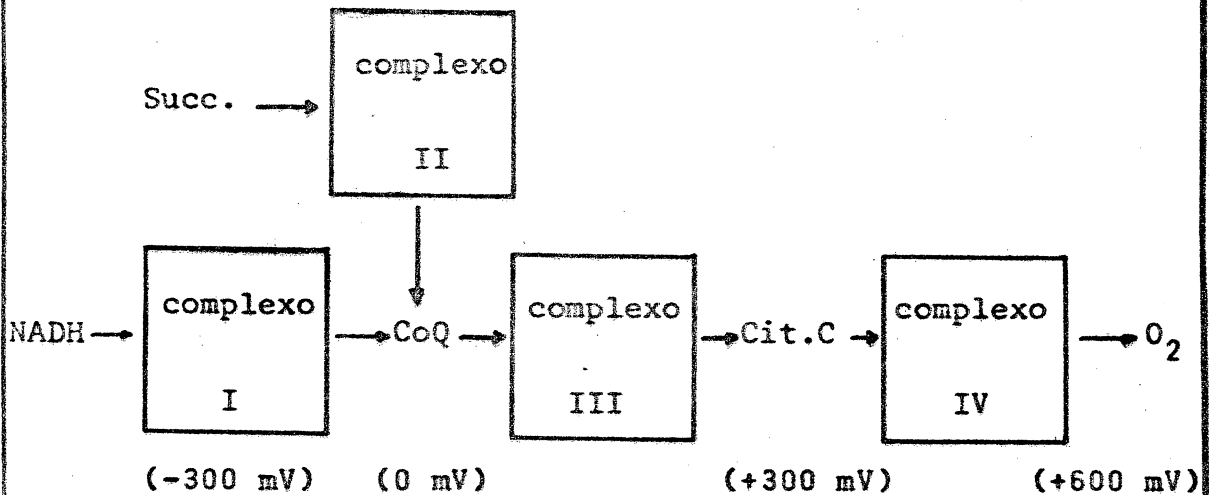
1 - MECANISMO DE AÇÃO DO METIL-3,5-DI-O-BENZIL-2-CLORO-2-DESOXI-D-ARABINOSIDEO. (Alvarez et al., 1979).

A mitocôndria é geralmente descrita como tendo uma membrana externa, um espaço intermembranas, uma membrana interna constituída de uma bicapa fosfolipídica altamente impermeável a prótons (Mitchell 1976) e uma região interna denominada matriz. A membrana interna é extensivamente dobrada, formando vilosidades que comumente são chamadas cristas mitocondriais. Com essas cristas a área da membrana interna fica altamente aumentada em relação ao volume mitocondrial. Diversos aspectos da topologia das membranas mitocondriais foram descritos em uma série de revisões recentes (Vanderkooi, 1974; Harmon et al, 1974; Mitchell 1976; De Pierre e Ernster, 1977).

Especificamente, diversos sistemas enzimáticos (Hatefi et al, 1975) localizados na membrana interna mitocondrial, catalizam a fosforilação oxidativa; uma verdadeira rede de reações pelas quais ocorre a oxidação dos substratos, acopladas com a síntese de ATP a partir de ADP e Pi. A primeira parte do sistema, responsável pela oxidação do substrato, denominada cadeia respiratória ou cadeia transferidora de elétrons, - foi extensivamente estudada por diversos pesquisadores, entre os quais Chance e Williams, 1956 que estudaram a relação molar entre os componentes da cadeia transferidora de elétrons em diversos tecidos e espécies; Brierley et al. 1962; Green e Warton, 1963, Ernster e Lee, 1964 que, com estudos bioquímicos, identificaram unidades as quais permanecem associadas

após uma sequência de purificações bioquímicas; elas formam a base da classificação de Green. De acordo com esse autor, a cadeia respiratória consiste de quatro componentes fixos, vizinhos, que são: NADH-CoQ redutase (complexo I) Succinato-CoQ redutase (complexo II), CoQH<sub>2</sub>-citocromo e redutase (complexo III), citocromo e oxidase (complexo IV) e dois componentes móveis, vizinhos, a CoQ e o citocromo c. Os componentes fixos não são catalizadores simples, são complexos lipoproteicos contendo diversos subcomponentes. A proliferação de subcomponentes de cada complexo se deve a refinados estudos ópticos (Dutton e Wilson, 1974) e magnéticos (Ohnishi, 1973) da cadeia equilibrada em vários potenciais. Assim sendo o complexo I com um peso molecular de 550.000 contém FNM como grupo prostético e sete centros Fe-S e é sensível ao inibidor rotenona. O complexo II consiste de três centros Fe-S e um grupo prostético FAD. O complexo III tem um peso molecular de 300.000 e contém uma molécula de citocromo C<sub>1</sub>, duas moléculas de citocromo b (b<sub>562</sub> e b<sub>566</sub>), dois centros Fe-S associados com proteínas simples e uma pequena quantidade de ubiquinona (Papa, 1976). O complexo IV com peso molecular entre 140.000 e 280.000 cuja unidade mínima possui dois grupos heme, os citocromos a e a<sub>3</sub> e dois átomos de cobre. O transporte de elétrons é realizado pela cadeia por diferença de potencial eletroquímico entre os seus componentes que, para propósitos mais simples, podemos reuni-los em quatro níveis de potenciais médios (fig. 18), de maneira que ficam mais claramente identificáveis os degraus de energia disponíveis para reações acopladas, ou seja, os sítios de acoplamento.

A eficiência termodinâmica do mecanismo de acoplamento de energia requer reações de transferência de elétrons, estrutural e quimicamente específicas, evitando o "curto circuito" dos degraus entre os grupos de isopotencial por carreadores incapazes de produzir acoplamento de energia (Chance, 1977). Portanto, uma sequência ordenada de reações de transferência de elétrons parece ser uma regra para os grupos de isopotencial; por exemplo o citocromo C<sub>1</sub> não é diretamente oxidado pe



(Fig. 18) Diagrama esquemático da cadeia respiratória descrevendo os grupos isotenciais.

lo citocromo a, etc. Mesmo a Ubiquinona, a qual, *in vitro*, é capaz de ceder ou aceitar elétrons indiscriminadamente, especialmente em sua forma de semiquinona, está confinada a reações específicas de transferência de elétrons. A estrutura da membrana é importante para realçar esta especificidade.

Está, atualmente, firmemente estabelecido (Beyer et al., 1977) que a oxidação aeróbica de uma molécula de NADH através da cadeia respiratória mitocondrial dá origem à síntese de 3 moléculas de ATP, provenientes de ADP e Pi. Os complexos NADH-CoQ redutase, QH<sub>2</sub>-citocromo C redutase e citocromo C oxidase, contêm, cada qual, um dos três sítios de acoplamento de síntese de ATP (complexo ATPasico). Além disso os três sítios de acoplamento podem transferir energia di-



retamente entre si, sem a mediação do sistema ATP sintetase (Ernster e Lee, 1964). Verifica-se ainda, que ambos os sistemas, o da cadeia respiratória e do sistema de síntese de ATP, podem servir como fonte de força para a reação, também acoplada energeticamente, da nicotinamida nucleotídeo transidrogenase (Ernster e Lee, 1964; Rydstrom, 1977; Skulachev, 1975) como também para diversos translocadores de íons presentes na membrana interna mitocondrial (Ernster e Lee 1964; Azzone e Massari, 1973). Portanto o sistema mitocondrial de transdução de energia, consiste em numerosas unidades transdutoras nas quais a energia é conservada em várias formas: Potencial redox, ligações de alta energia, gradiente de concentração; que podem ser transferidos de maneira reversível. Um esquema geral do processo pode ser visto na fig. 19.

Em princípio, existem dois tipos de mecanismos que tem sido propostos para o sistema transferidor de energia entre o transporte de elétrons e o sistema de síntese de ATP. Um envolve interações estruturais diretas, através de intermediários que se constituem de catalizadores quimicamente modificados, de sistema transferidor de elétrons, por ligações covalentes de alta energia, como proposto por Slater, 1953, ou por um estado conformacional energizado, como visto por Boyer (ver Boyer et al 1975). O outro tipo de mecanismo, envolve uma interação entre o transporte de elétrons e o sistema ATPasico através de um fluxo de prótons, dentro da membrana como proposto por Williams (Williams, 1969; Mitchell 1977) ou através da membrana de acordo com a teoria quimiosmótica de Mitchell (ver Mitchell, 1976).

Há, agora, evidências (Mitchell, 1976a), provenientes de estudos com mitocôndrias e partículas submitocondriais, tanto como com proteolipossomos (Skulachev, 1975; Racker, 1975), que (a) muitos, senão todos, os vários tipos de unidades transdutoras de energia podem gerar um gradiente de prótons e/ou potencial de membrana, através da membrana onde estão localizados; (b) a geração de um gradiente de prótons e/ou um potencial de membrana pelas diversas unidades transdutoras de

energia é reversível (c) a transferência de energia entre as unidades transdutoras, localizadas na mesma membrana, tem lugar via um gradiente de prótons e/ou um potencial de membrana; (d) agentes que abolem o gradiente de prótons e/ou o potencial de membrana, desacoplam a transferência de energia entre as unidades transdutoras. Estes fatos, que se pode estender aos sistemas transdutores de energia associados às membranas dos cloroplastos (Jagendorf, 1975) e dos procariotes, consistem em forte suporte para os postulados básicos da teoria quimiosmótica de Mitchell, ou seja, é um forte apoio para a ocorrência de uma translação de prótons, reversível, dirigida pelo transporte de elétrons, pelo complexo ATPasico e pelo sistema transportador de solutos, localizados numa mesma membrana impermeável a íons.

Considerando-se o esquema acima apresentado, resumido na fig. 19 e os resultados observados do efeito do composto IX sobre o "swelling" controlado (figs. 5 e 6) e sobre a oscilatória mitocondrial (figs. 9 e 10) verifica-se uma ação desenergizante da membrana mitocondrial com relação a todas as fontes de energia, seja da cadeia respiratória, seja da hidrólise do ATP. Parece, portanto, que o composto IX exerce, sobre a membrana mitocondrial, uma ação semelhante aos desacopladores. A formulação de P. Mitchell (Greville, 1969) explica a ação dos desacopladores com base na hipótese de translocação de prótons através da membrana interna mitocondrial. Com economia de idéias: os desacopladores diminuem o gradiente de pH e/ou o potencial de membrana, decrescendo desta forma a força próton-motriz disponível para dirigir-se através da ATPase reversível. Muitos desacopladores transportam prótons, outros (por exemplo o  $\text{NH}_3$ ) ligam prótons neutralizando-os e ainda outros causam "Swelling" alterando a estrutura da membrana interna mitocondrial. O composto IX, (conforme fig. 5) parece pois classificar-se entre os desacopladores que provocam alterações da estrutura da membrana.

Considerando-se ainda os experimentos da fig. 11, onde subministrou-se elétrons à cadeia respiratória via complexo I

## UNIDADES DE TRANSDUÇÃO DE ENERGIA MITOCONDRIAL

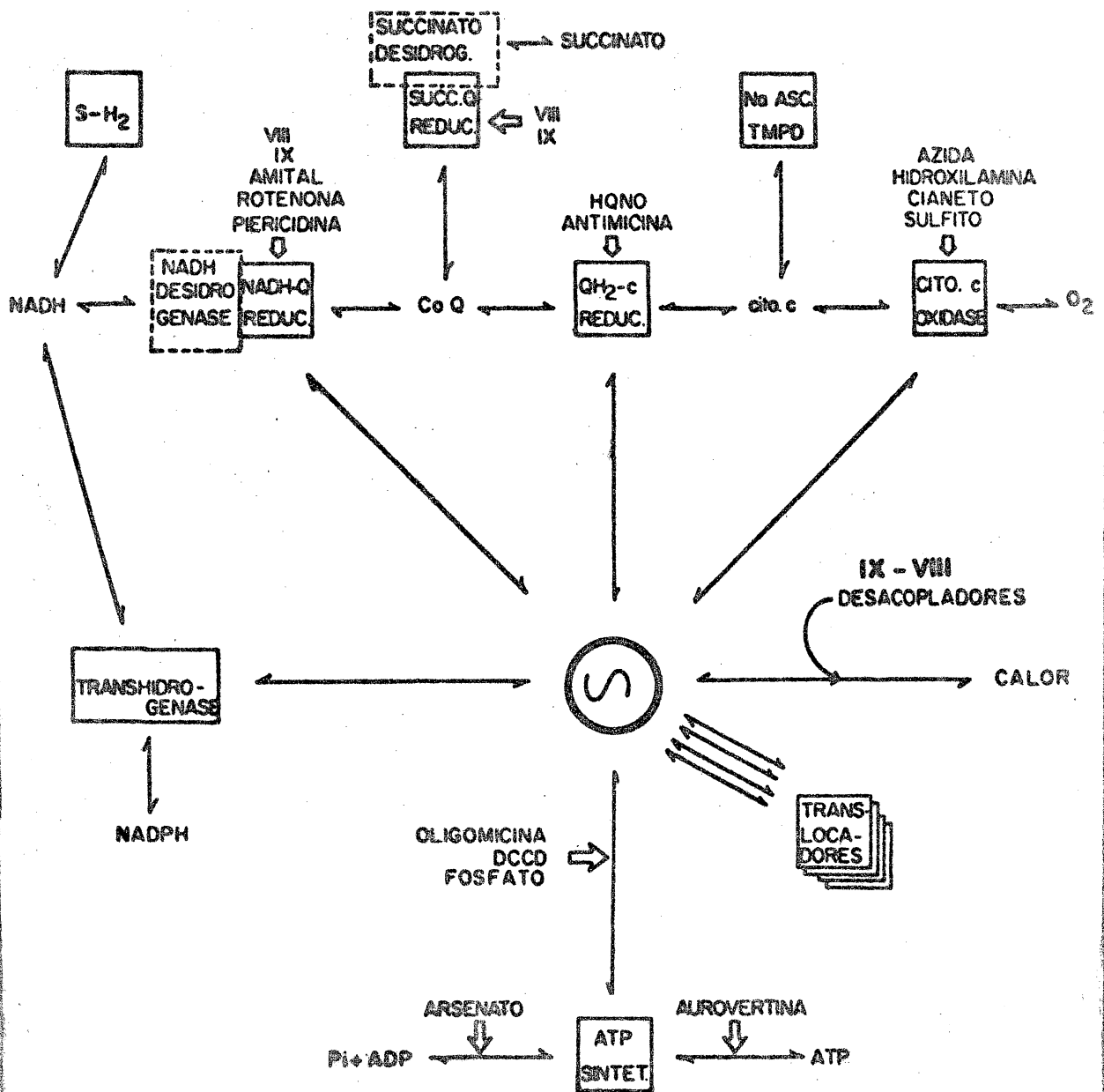


Fig. 19

O esquema representa a organização enzimática e acoplamento energético da fosforilação oxidativa, os translocadores iônicos e os inibidores específicos do sistema (indicados com flexas largas).

DCCD = diclorohexil - carbodiimida.

HQNO = 2 - heptil - 4 - hidroxiquinolina - n - óxido

analisando-se o efeito da droga IX sobre o sistema NADH-oxidase em mitocôndrias rompidas, e partículas transportadoras de elétrons (EPl), verificou-se um efeito inibidor em torno de 80% quando a concentração da droga estava em 100 nmol/mg de proteína, enquanto que quando se subministrou elétrons via complexo II, analisando-se o efeito da droga IX sobre o sistema succinato-oxidase, observou-se inibição somente em altas concentrações. Isto, em vista do esquema apresentado na fig. 18, induz a sugerir que o sítio de ação da droga sobre a cadeia transportadora de elétrons se encontra antes do sítio da CoQ. Como a droga IX não apresenta nenhuma ação sobre a enzima NADH-desidrogenase, provavelmente o sítio de ação da droga é a parte terminal do complexo I, ou seja, o mesmo sítio da rotenona, Fig. (19).

A ação inibidora da droga IX sobre o processo de oxidação do succinato parece ser dependente da estrutura da membrana mitocondrial, pois esse efeito decresce da mitocôndria íntegra (fig. 3) para mitocôndrias rompidas e partículas EPl (fig. 11). O sítio de ação, que podemos chamar de sítio secundário, parece localizar-se sobre o complexo II, em virtude de que a droga apresentou uma ação inibidora sobre a succinato desidrogenase (em torno de 30%) e o efeito observado sobre o sistema succinato oxidase parece não interferir sobre o efeito inibidor da droga na NADH-oxidase (Fig. 11).

## 2 - MECANISMO DE AÇÃO DO METIL 3,5-DI-O-BENZIL-D-RIBOFURANO - SÍDEO (VIII)

Similarmente ao composto IX, a ação inibidora da droga VIII sobre a cadeia respiratória, restringe-se principalmente sobre a parte terminal do complexo I (mesmo sítio de ação da rotenona) em função de que, verificou-se inibição do sistema NADH oxidase (tabela VII) sem haver nenhum efeito sobre o sistema succinato oxidase e NADH desidrogenase. A inibição da

EFEITO DA DROGA VIII SOBRE OS SISTEMAS NADH OXIDASE

E SUCCINOXIDASE

Tabela VII

Concentração da droga $\mu\text{mol/mg prot.}$	% de inibição	
	Part. EPl	Mitoc. rompida
0,2	8	-
0,3	10	5
0,6	50	25
1,2	83	-
1,3	-	65
2,6	-	70

As condições básicas do sistema estão descritas em  
Material e Métodos.

cadeia de elétrons, sustentada pela oxidação do succinato, somente se verificou em mitocôndria íntegras (fig. 14), em altas concentrações, e que sugere também uma dependência da integridade da membrana mitocondrial para produzir a inibição.

Os experimentos das figuras 11, 12 e 13 sugerem uma ação desacopladora da fosforilação oxidativa, executada pela droga VIII, o que é confirmado pelo sistema de "Swelling" controlado o qual é afetado em todas as fontes de energia (cadeia de elétrons e hidrólise do ATP) fig. 15, embora a manifestação nítida de desacoplamento só foi verificada em altas concentrações da droga.

Na figura 19 estão indicados os possíveis pontos de ação do metil 3,5-di-O-benzil-arabinofuranosídeo (VIII).

### 3 - INTERRELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA E AÇÃO DOS COMPOSTOS VIII E

#### IX

Verifica-se que as ações dos compostos VIII e IX, sobre a fosforilação oxidativa parecem ser idênticas, diferindo somente quantitativamente. Se tomarmos por base as concentrações de inibição do sistema NADH oxidase (fig. 11 e tabela VII) das duas drogas, podemos avaliar que o composto IX é aproximadamente 20 vezes mais potente do que o composto VIII. A única diferença existente entre as estruturas das duas moléculas é o grupo cloro na posição "arabino" no carbono 2 do composto IX. Possivelmente esta substituição de grupos, potencializou o efeito do composto. A lipofilicidade das drogas em estudo, possivelmente condicionada pelos dois grupos benzil, é passiva de facilitar a incorporação das moléculas às regiões hidrofóbicas da membrana interna mitocondrial provocando uma alteração estrutural da mesma. Consequentemente isto afetará a organização da cadeia transportadora de elétrons, principalmente do complexo I, que por seu maior volume e número de com

ponentes (S. Papa, 1976) é mais susceptível. Afetará ainda a permeabilidade da membrana, pois o anel furanosídico do açúcar, com seus grupos oxigênio eletronegativamente expostos (Barnett, 1967) podem funcionar como ponte de íons intra membrana. No composto IX o grupo cloro substituinte, tendo uma nuvem eletrônica mais volumosa portanto mais exposta do que o grupo hidroxila, apresenta maior capacidade de ligar-se a prótons ( $H^+$ ) e outros íons, ou ainda ligar-se a grupos carregados positivamente componentes da membrana o que, eventualmente irá provocar um maior desarranjo na membrana alterando ainda mais a permeabilidade da mesma. Este aumento da permeabilidade pode ser observado pelo "swelling" provocado espontaneamente pela droga IX nos experimentos da fig. 5.

## CONCLUSÕES

- 1 - Os compostos VIII e IX são inibidores da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, ao nível do complexo I, em baixas concentrações, e em concentrações mais altas também a inibem do nível do complexo II, principalmente em mitocôndrias intactas.
- 2 - Os compostos VIII e IX são desacopladores da fosforilação oxidativa em função da alteração da permeabilidade da membrana interna mitocondrial que eles provocam.
- 3 - Os prováveis sítios de ação de ambos os compostos estão citados na figura 19.
- 4 - A substituição do grupo hidroxila do carbono 2 em posição "ribo" da droga VIII pelo grupo cloro na posição "arabino" da droga IX, potencializou este composto 20 vezes em relação ao primeiro.



- RESUMO -

O efeito de 18 derivados de açúcares, sintetizados em nosso laboratório, seguindo-se técnicas estabelecidas na literatura, foram testados sobre o consumo de oxigênio e sobre a fosforilação oxidativa em mitocôndrias de fígado de rato. Desses derivados, dez apresentaram efeito significativo, alterando a velocidade de consumo de oxigênio e o padrão da fosforilação oxidativa mitocondrial. Dos derivados efetivos, dois compostos foram estudados em detalhes neste trabalho. Foram eles: o metil 3,5-di-O-benzil-2-cloro-2-desoxi-D-arabinofuranosídeo (IX) e o metil 3,5-di-O-benzil-D-ribofuranosídeo (VIII). Ambas as substâncias parecem atuar de maneira semelhante como inibidores do transporte de elétrons; fortemente ao nível do complexo enzimático NADH CoQ redutase e mais fracamente ao nível do complexo succinato CoQ redutase, neste, a inibição parece ser dependente do grau de integridade da membrana mitocondrial. Ambos os compostos apresentaram também um efeito de desacoplamento da fosforilação oxidativa. A diferença molecular entre as duas drogas (no composto IX a hidroxila do carbono 2 foi substituída por um grupo cloro em posição "arabino") promoveu apenas uma diferença de natureza quantitativa sobre a atividade mitocondrial. Desta maneira o composto IX apresentou-se 20 vezes mais efetivo em inibir e desacoplar a fosforilação oxidativa mitocondrial.

## REFERÊNCIAS

- Alvarez, M., Duarte, J.H. e Campello, A.P. (1979). Sugar Derivatives and Liver Mitochondria. I - Effect of Methyl-3,5-di-O-benzyl-2-chloro-2-deoxy-D-arabinofuranoside. Res. Comm. in Pathol. and Pharmacol. (em publicação).
- Azzi, A. and Azzone, G. (1966). Swelling and Shrinkage Phenomenon in Liver Mitochondria - IV Reversible Swelling Change Linkage to transport of monovalent cation Stimulated by Valinomycin. Biochim. Biophys. Acta. 113, 445-456.
- Azzone, G.F., and Massari, S. (1973). Active Transporte and Binding in Mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 301, 195-226.
- Backer, D.C., Horton, D. and Tindall, C.G. (1972). Large-Scale preparation of D-allose: Observations on the stereoselectivity of the reduction of 1,2:5,6-di-O-isopropylidene- $\alpha$ -D-ribo-hexofuranos-3-ulose hydrate. Carbohyd. Res., 24, 192-197.
- Ballou, C.E. (1958). A new Synthesis of D-Erythrose Derivatives from D-arabinose. J. Am. Chem. Soc., 79, 165-166.
- Barnett, J.E.G. (1967). Halogenated Carbohydrates. In: Wolfrom, M.L. and Tipson, R.S. (Eds.) Adv. Carbohyd. Chem. Academic Press. New York. Vol. 22, pp. 177-227.
- Bell, D.J. (1947). The Separation of D-Fructose from Other Natural Sugars as its 2,3:4,5-Diacetone and 1:2-monoacetone Derivatives: Observations on the Behavior of acetone Derivatives of Monosaccharides towards Cold Decinormal Sulphuric Acid. J. Chem. Soc. 1461.
- Biemann, K., Dejongh, D.C. and Schnoes, H.K. (1963). Application of Mass Spectrometry to Structure Problems. XIII. Acetates of Pentoses and Hexones. J. Am. Chem. Soc., 85, 1763-1770.

- Biemann, K., Schnoes, H.K. and MacCloskey, J.A. (1963). Application of Mass Spectrometry to Structure Problems. Carbohydrates and they Derivatives. Chemistry and Industry, 448-449.
- Blakley, E.R. and Boyer, P.D. (1955). The Effect of 6-deoxy-6-fluoro-D-glucose en Yeast Fermentation and on Hexokinase. Biochem. Biophys. Acta. 16, 576-582.
- Boyer, P.D. (1977). Coupling Mechanisms in Capture, Transmission and Use of Energy. In: Boyer, P.D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E. and Slater, C. Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation-Ann. Rev. Biochem. 46, 955 - 1026.
- Boyer. P.D., Stokes, O.B., Walcott, R.G. and Degani, C. (1975) Coupling of "high-energy" phosphate bonds to energy tranductions. Fed. Proc. 34, 1711-1717.
- Bowen-Pope, D.F., and Rubin, H. (1977). Magnesiun and Calciun effects on uptake of hexoses and uridine by chick ambryo fibroblasts.
- Brierley, G.P., Merola, A.J. and Fleischer, S. (1962). Studies of the Electron-transfer System XLIX. Sites of Phospholipid involvement in the Electron-transfer Chain. Biochim. Biophys. Acta. 64, 218-228.
- Bimacombe, J.S., and Mofti, A.M., (1971). Nucleophilic Displacement Reations in Carbohydrates. Part XVI. Syntheses of 3,5-diacetamido-3,5-dideoxy-D-ribose and 3,5-diacetamido-3,5-didroxy-D-xylose derivatives. Carbohydr. Res. 16, 167-176.
- Chance, B. (1977). Electron Transfer: Pathwais, Mechanisms and Controls. In: Boyer, P.D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E. and Slater, E.C. - Oxidative Phosphorylation and photophosphorylation - Ann. Rev. Biochem. 46, 955 - 1076.
- Chance, B. and Williams, G.R., (1956). The Respiratiry Chain and Oxidative Phosphorylation. In: Nord, F.F.

(Ed.) Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry. Inters. Pub. Inc. New York and London. Vol. XVII, pp. 65-134.

- Chappell, J.B., and Crofts, A. (1965). Gramicidin and Ion Transport in Isolated Liver Mitochondria. *Biochem. J.* 95, 393 - 402. (1965).
  
- Chagas, M.G., Alvarez, M., Duarte, J.H., Campello, A.P., (1979). Sugar Derivatives and Liver Mitochondria. II - Effect of Tetracetyl-D-galactopiranosose. *Res. Comm. in Phatoll and Pharmacell.* (em publicação).
  
- Cohen, S., Levy, D. and Bergmann, E.D. (1964). Studies in the 3-Deoxy-3-Fluoropentose Series. *Chemistry and Industry*, 43, 1802 - 1803.
  
- Crane, F.L., Glenn, J.L., and Green, D.E. (1956). Studies on the Electron Transfer System IV. The Electron Transfer Particle. *Biochim. Biophys. Acta.* 22, 475-487.
  
- DePierre, J.W., and Ernster, L. (1977). Enzyme Topology of Intracellular Membranes. *Ann. Rev. Biochem.* 46, 201-262.
  
- Dutton, P.L. and Wilson D.F., (1974). Redox Potentiometry in Mitochondrial and Photosynthetic Bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta.* 346, 165-212.
  
- Eisenthal, R., Harrison, R., Lloyd, W.J. and Taylor, N.F. (1972). Activity of Fluoro and Deoxy Analogues of Glycerol as Substrates and Inhibitors of Glicerol Kinase. *Biochem. J.* 130, 199-205.
  
- Ernster, L. and Lee, C. (1964) Biological Oxidoreductions. *Ann. Rev. Biochem.* 33, 729-788.
  
- Estabrook, R.W. (1967). Mitochondrial Respiratory Control and the Polarographic Measurement of ADP: O Ratios.

- Foster, A.B. Hems, R. and Webber, J.M. (1967). Fluorinated Carbohydrates. Part I. 3-deoxy-3-fluore-D-glucose. Carbohyd. Res., 5, 292-301.
- Fuska, J., Linek, K. and Buzinkay, S. (1974). In Vitro Cytotoxic Effect of some Saccharide Phenylhydrazosone Derivatives. Naoplasma 21, 561-568.
- Gantt, R., Millner, S. and Binkley, S.B. (1964). Inhibition of N-Acetylneuraminic Acid Aldolase by 3- Fluorosialic Acid. Biochemistry, 3, 1952-1960.
- Ezawa, I., Ogata, E. (1977).  $Ca^{++}$  Requirement in ATP Induced Activation of Uncoupled Oxidation of Succinate in Isolated Liver Mitochondria. J. Europ. Biochem. 77, 427 - 435.
- Gooch, V.D. and Packer, L. (1974). Oscillatory Systems in Mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 346, 245 - 260.
- Gottschalk, A. (1950). Principles Underlying Enzyme Specificity in the Domain of Carbohydrates. In: Wolfrom, M.L. and Tipson, R.S. (Eds.) Adv. Carbohyd. Chem., Academic Press. New York. vol. 5, pp. 49-78.
- Green, D.E. and Wharton, D.C. (1963). Stoichiometry of Fixed Oxidation-Reduction Components of the Electron Transfer Chain of Beef Heart Mitochondria. Biochemische Zeitschrift, 338, 335-348.
- Greville, G.D. (1969). A Scrutiny of Mitchell's Chemiosmotic Hypothesis of Respiratory Chain and Photosynthetic Phosphorylation. In: Sanadi, D.R. (Ed.). Current Topics in Bioenergetics. Vol. 3, pp. 1 - 78.
- Harmon, H.J., Hall, J.D. and F.L. Crane (1974). Structure of Mitochondrial Cristas Membranes. Biochim. Biophys. Acta. 344, 119-155.

- Hatefi, Y., Hastein, W.G., Galante, Y. and Stiggall, D.L. (1975). Mitochondrial ATP-Pi Exchange Complex and the Site of Uncoupling of Oxidative Phosphorylation. Fed. Proc. 34, 1699-1706.
- Hogness, D.S., Cohn, M., and Monod, J. (1955) Studies on The Induced Synthesis of  $\beta$ -Galactosidase in *Scherichia coli*: The Kinetics and Mechanism of Sulfur Incorporation. Biochim. Biophys. Acta. 16, 99-116.
- Holman, G.D., and Natfalin, R.J. (1975). Galactose Transport Across the Serosal Border of Rabitt Ileum and Its Role in Intracellular Accumulation. Biochim. Biophys. Acta. 382, 230-245.
- Hudson, C.S., and Dale, J.K. (1946). The isomeric tetracetates of L-arabinose and  $\beta$ -triacetyl-1-arabinoside. In: Hann, R.M. and richtmyer, N.K. (Eds.). The Collected Papers of C.S. Hudson. Academic Press., N. York, vol. I, pp. 567-571.
- Hudson, C.S. and Dale, J.K. (1946a). Conversion of Galactose Pentacetate to an isomeric form. In: Hann, R.M. and Richtmyer, N.K. (Eds.). The Collected Papers of C.S. Hudson. Academic Press., N. York, vol. I, pp. 508-509.
- Jagendorf, A.T. (1975). Mechanism of Photophosphorilation. in: Govindjee (Ed.) Bioenergetics of Photosynthesis. Academic Press N. York, San Francisco, London. pp. 414 - 485.
- Jennings, H.J., and Jones, J.K.N. (1962). The Reaction of Sulphuryl Chloride With Reducing Sugars. Part I. Can. J. Chem. 40, 1408 - 1414.
- Jennings, H.J. and Jones, J.K.N. (1965). Reactions of Sugar Chlorosulfates Part V. The Synthesis of Chloredeoxy Sugars. Can. J. Chem. 43, 2372 - 2386.
- Jennings, H.J., and Jones, J.K.N. (1963). The Reactions of Chlorosulphate Esters of Sugars With Pyridine. Can.

- J. Chem. 41, 1151 - 1159.
- Kearney, E.B., and Singer, T.P. (1956). Studies on Succinic Dehydrogenase. I - Preparation and Assay of the soluble dehydrogenase. J. Biol. Chem. 219, 963 - 975.
  - Kent, P.W. and Ward, P.F. (1953). Synthesis of 4-deoxy- L-ribose from D-lyxose. J. Chem. Sec. 416, - 419.
  - Kochetkov, N.K. and Chizov, O.S. (1966). Mass Spectrometry of Carbohydrate Derivatives. In: Wolfrom, M.L. and Tipson, R.S. (Eds.) Adv. Carbohyd. Chem. Academic Press. N. York vol. 21, pp. 39 - 93.
  - Kreisel, U. (1979) - Comunicação Pessoal.
  - Kopaczyk, K. C. (1967). Preparations and Properties of the Heart Mitochondrial Electron Transport Particles (Inner Membrane). In: Kollowick, S.P. and Kaplan, N.O. (Eds.), Methods in Enzymology vol. 10, pp 253 - 258.
  - Levene, P.A., and Eric T. Stiller (1933). Acetone Derivatives of D-Ribose. J. Biol. Chem. 102, 187 - 200.
  - Liebecq, C. and Peters, R.A. (1949). The Toxicity of Fluoroacetato and the Tricarboyclic Acid Cycle. Biophys. Acta. 3, 215 - 230.
  - Lipke, P. N., Taylor, A. and Ballou, C.E. (1976). Morphogenic Effects of  $\alpha$ -Factor on Saccharomyces Cerevisiae a Cells. J. Bacteriol. 127, 610 - 618.
  - Lonngren, J. and Svensson, S. (1973). Mass Spectrometry in Structural Analysis of Natural Carbohydrates. In: Wolfrom, M.L. and Tipson, R.S. (Eds.) Adv. Carbohyd. Chem. Academic Press. N. York, vol. 31, pp. 41 - 105.
  - Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275.
  - Massari, S. and Azzone, G.F. (1972). The Equivalent Pore Radius of Intact and Damaged Mitochondria and The Mechanis of Active Shrinkage. Biochim. Biophys. Acta. 283,

23 - 29.

- Metzger, R.P., Wilcox, S.S. and Wick, A.N. (1964). Studies With Rat Liver Glucose Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 239, 1769 - 1772.
- Mitchell, P. (1976). Vectorial Chemistry and the Molecular Mechanics of chemiosmotic Coupling: Power Transmission by proticity. *Biochem. Soc. Trans.* 4, 399 - 430.
- Mitchell, P. (1977). Vectorial Chemiosmotic Processes. In: Boyer, P.D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker E. and Slater, E.C. - Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. - *Ann. Rev. Biochem.* 46, 955-1026.
- Mitchell, P. (1977). A commentary on Alternative Hypotheses of Protonic Coupling in The Membrane Systems Catalyzing Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation. *FEBS Letters*, 78, 1 - 20.
- Muller-Hill, B., Crapo, L. and Gilbert W. (1968). Mutants That Make Lac Repressor. *Proc. Nat. Acadm. Sci.* 59, 1259 - 1264.
- Murta, A. (1977) Tese de Mestrado.
- Mustafa, M.G., Utsumi, K. and Packer, L. (1966). Damped Oscillatory control of Mitochondrial Respiration and Volume. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 24, 381 - 385.
- Onishi, T. (1973). Mechanism of Electron Transport and Energy Conservation in The Site I Region Of The Respiratory Chain. *Biochem. Biophys. Acta.* 301, 105 - 128.
- Packer, L., Utsumi, K. and Mustafa, M.G. (1966). Oscillatory States Of Mitochondria I - Electron and Energy Transfer Pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* 117, 381 - 393.
- Papa, S. (1976). Proton Translocation Reactions in The Respiratory Chains. *Biochim. Biophys. Acta.*, 456, 39-84.
- Prestidge, L.S. and Pardee, A.B. (1965). A second Permease



- for Methyl-thio- $\beta$ -D-galactosideo in *Escherichia coli*.  
 Biochim. Biophys. Acta. 100, 591 - 593.
- Racker, E. (1975). Control of Energy Transducing Systems.  
 In: Kornberg, H.L. and Phillips, D.C. (Eds.), Energy  
 Transducing Mechanisms. MTP Internacional Review of  
 Science. Biochemistry Series one. Butterworths Universi-  
 ty Park Press. vol. 3, pp. 163 - 183.
  - Reichman, U. Watanabe, K.A. and Fox, J.J. (1975). A practi-  
 cal Synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-D-arabinofuranose De-  
 rivatives. Carbohyd. Res. 42, 234 - 240.
  - Ritzmann, G., Klein, R.S., Hollenberg, D.H. and Fox, J.J.  
 (1975). Nucleosides LXXXIX. Synthesis of 1-(2-chloro-2-  
 deoxy- $\alpha$  and  $\beta$ -D-Arabinofuranosyl) cytosines. Car-  
 bohyd. Res., 39, 228 - 236.
  - Robbins, A.R. and Rotman, B. (1975). Evidence for binding  
 protein-Independent substrate translocation by the Me-  
 thylgalactoside Transport System of *Escherichia coli*  
 K 12. Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 423-427.
  - Romaschin, A., Taylor, N.F., Smith, D.A. and Lopes, D.  
 (1977). The Metabolism of 3-deoxy-3-fluoro-D- glucose  
 by *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. Can.  
 J. Biochem. 55, 369 - 375.
  - Rydstrom, J. (1977). Energy-Linked Nicotinamide Nucleoti-  
 de Transhydrogenases. Biochim. Biophys. Acta. 463, 155-  
 184.
  - Schmidt, D.T. (1958). Isopropylidene Derivatives. In:  
 Whistler, R.L. and Bemiller, J.N. (Eds.). Methods in  
 Carbohydrate Chemistry. Academic Press, N. York. Vol 2,  
 pp. 318 - 325.
  - Schoellmann, G. and Shaw, E. (1962). Direct Evidence for  
 the Presence of Histidine in the Active Center of Chy-  
 motrypsin. Biochem., 2, 252 - 255.
  - Seppala, A.J., Wikstrom, M.K.F. and Saris, N.E.L. (1973).  
 Damping of Mitochondrial Volume Oscilations by Propano-

- lol and Related Compounds. In: Chance, B., Pye, E.K., Ghosh, A. K. and Hese, B. (Eds.), Biological and Biochemical Oscillators. Academic Press. N. York, pp. 115 - 124.
- Shaw, E., Mares-Guia, M. and Cohen, W. (1965). Evidence for an Active-Center Histidine in Trypsin through Use of a Specific Reagent, 1-chloro-3-tosylamido-7-amino - 2-heptanone, the Chloromethyl Ketone Derived from N-Tosyl-L-Lysine. *Biochem.* 4, 2219 - 2224.
  - Skulachev, V.P. (1975). Energy Coupling in Biological Membranes: Current State and Perspectives. In: Kornberg, H.L. and Phillips, D.C. (Eds.) *Energy Transducing Mechanisms*; MTP International Review of Science. Biochemistry Series I Butterwoths University Park Press. vol. 3, pp. 31 - 73.
  - Singer, T.P. (1974). Determination of the Activity of Succinate, NADH, Choline, and  $\alpha$ -Glycerophosphate Dehydrogenases. In: Glick, D. (Ed.). *Methods of Biochemical Analysis*. John Wiley & Sons - N. York - London - Toronto. An Interscience Publication. vol. 22, pp. 124-175.
  - Slater, E.C. (1953). Mechanism of Phosphorylation in the Respiratory Chain. *Nature*, 172, 975 - 978.
  - Stancliff, R.C., Williams, M.A., Utsumi, K. and Packer, L. (1969). Essential Fatty Acid Deficiency and Mitochondrial Function. *Arch. Biochem. Biophys.* 131, 629 - 642.
  - Schmidt, F.G., Schwartz, R.T., and Ludwig, H. (1976). Fluorosugars Inhibit Biological Properties of Different Enveloped Viruses. *J. Virol.* 18, 819 - 823.
  - Stevens, J.N. (1972). Monosaccharides. In: Whistler, R.L. and Bemiller, J.N. (Eds.). *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Academic Press. New York. vol. 1, pp. 123-128.
  - Taylor, N.F., Hill, L. and Eisenthal, R. (1975) The Specificity of Oxidase and Kinase Preparations from *Pseudomonas fluorescens* towards Deoxyfluoromonosaccharides. *Can.*

- J. Biochem. 53, 57 - 64.
- Theander, O. (1964). 1,2:5,6-Di-O-isopropylideno Derivatives of D-gluco-hexodialose and D-Ribo-hexos-3-ulose. Acta. Chem. Scand. 18, 2209 - 2216.
  - Tokuda, H. and Kaback, H.R. (1977). Sodium-dependent Methyl-1-thio- $\beta$ -galactopyranoside Transport in Membrane Vesicles Isolated from Salmonella typhimurium. Biochem. 16, 2130 - 2136.
  - Tsuchiya, Y., Raven, J. and Wilson, H. (1977). Co-transport of Na<sup>+</sup> and Methyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside Mediated by the Melibiose Transport System of Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Comm. 76, 26 - 31.
  - Vanderkooi, G. (1974). Organisation of Proteins in Membranes with Special Reference to the Cytochrome Oxidase System. Biochim. Biophys. Acta. 344, 307 - 345.
  - Voss, D.O., Campello, A.P. and Bacila, M. (1961). The Respiratory Chain and the Oxidative Phosphorylation of Rat Brains Mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Comm. 4, 48 - 51.
  - Voss, D.O., Cowles, J.C. and Bacila, M. (1963). A New Oxygen Electrode Model for the Polarographic Assay of Cellular and Mitochondrial Respiration. Anal. Biochem. 6, 211 - 222.
  - Williams, R.J.P. (1969). Electron Transfer and Energy Conservation. In: Sanadi, D.R. (Ed.) Current Topics in Bioenergetics. Academic Press. N. York - London. Vol. 3, pp. 79 - 156.
  - Wolfrom, M.L. and Thompson, A. (1972). Acetylation. In: Whistler, R.L. and Bemiller, J.N. (Eds.). Methods in Carbohydrate Chemistry. Academic Press. N. York. Vol. 1, pp. 211 - 215.

## AGRADECIMENTOS

Aos Drs. ANIBAL DE PAÍVA CAMPELO e JOSÉ HAZENCLEVE DUARTE pela excelente orientação na execução e publicação deste trabalho.

A Dr.<sup>a</sup> GLACI TEREZINHA ZANCAN pelo incentivo e excelente coordenação do Curso de Pós-Graduação.

Aos prezados colegas MANOEL GENEROSO CHAGAS, URSULA WREISEL e ANITA TOEWS pelo árduo trabalho realizado em suas teses, que muito colaborou para a realização desta.

Ao prezado colega CAETANO FORTES pela colaboração técnica na execução de muitos experimentos deste trabalho.

Ao Dr. W. A. SZAREK (Dept<sup>o</sup> of. Chemistry, Queen's University, Kingston, Ontario, Canadá) pela doação de alguns padrões de derivados halogenados de açúcares.

Aos prezados professores componentes do corpo docente do Curso de Pós-Graduação pelo apoio durante os cursos teóricos.

Aos queridos colegas MARCELO IACOMINI e GISELIA H. DUARTE pela amizade, incentivo e colaboração a mim deferido.

Aos caríssimos colegas BASÍLIO BACARIN e ALFREDO BELTRAME pela confiança em mim depositada.

Ao Dept<sup>o</sup> de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade concedida.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde pelo apoio financeiro prestado para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. (CNPq).

Ao Plano Integrado de Capacitação de Docentes (PICD) pela bolsa de estudos fornecida.