C E N A

BD-014

RADIOISÓTOPOS EM BIOQUÍMICA

O.J.Crocomo

L.C.Basso

18 de dezembro de 1 973

CENA
BIBLIOTECA
N.o 2970 ex. 1

BOLETIM DIDÁTICO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

USP-CNEN

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"

PIRACICABA-SP

- BRASIL -

CENA - BIBLIOTECA
Data 17 MAI 1974
Procedência
Preço
Doação CENA-Impunsa

ÍNDICE

página

1. INTRODUÇÃO 01

2. O CONCEITO DE TRAÇADOR 03

2.1. O átomo 03
2.2. Radioatividade 04
2.3. Isótopos estáveis 07
2.4. O traçador 08
2.5. Sensibilidade do método traçador 10

3. MEDIDA DE ISÓTOPOS RADIOATIVOS E ESTÁVEIS 11

3.1. A medida da radioatividade 11
3.1.1. Câmaras de ionização 11
3.1.2. Contadores proporcionais e Geiger-Muller . . 11
3.1.3. Contadores de cintilação para líquidos . . . 12
3.1.4. Contadores de cintilação de cristal 12

3.2. Unidades de radioatividade 13
3.2.1. A desintegração radioativa 13

3.3. A meia vida 14
3.4. O Curie 16
3.5. Atividade específica 17
3.6. Medida da concentração de isótopos estáveis 17

4. O MÉTODO DA DILUIÇÃO ISOTÓPICA 18

4.1. Análise de diluição com radioisótopos 18
4.1.1. O método direto 18
4.1.2. Método inverso 19
4.1.3. Método de derivado isotópico 20

4.2. Análise da diluição com isótopos estáveis 21

página

5. PROBLEMAS NA METODOLOGIA DOS TRAÇADORES 23

5.1. Efeitos químicos 23

5.1.1. Dose traçadora 23

5.1.2. Dose fisiológica 24

5.1.3. Dose massiva 24

5.2. Pureza radioquímica 24

5.3. Efeitos da radiação 26

5.4. Reações de troca 29

5.5. Efeito isotópico 30

6. APLICAÇÕES DA TÉCNICA ISOTÓPICA 34

6.1. Atividade específica por mol 34

6.2. Atividade específica por átomos de carbono 38

6.3. Cristalização até atividade específica constante . . 39

6.4. Interpretação dos resultados 40

7. CARACTERÍSTICAS BÁSICAS PARA A CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO. . 45

7.1. Escala de operações 46

A - Carater Geral dos problemas 47

B - Desenho experimental 48

a - Cálculo da atividade específica 48

b - Esquema de operações 48

8. RELAÇÕES PRECURSOR-PRODUTO 51

9. PROBLEMAS PRÁTICOS 59

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 71

APRESENTAÇÃO

A idéia da publicação deste Boletim nasceu há alguns anos quando fomos convidados a colaborar com o Curso de Introdução à Energia Nuclear na Agricultura do CENA. Naquela época iniciamos o lecionamento de "Bioquímica Quantitativa" com um capítulo dedicado à Aplicações de Radioisótopos em Bioquímica. Antes disso já havíamos oferecido um Curso Intensivo teórico-prático de "Fundamentos de Metodologia de Radioisótopos", com a colaboração de L.C. Basso e A. Barioni Gusman, do qual surgiu uma publicação em 3 volumes.

Com a vivência desses últimos anos, julgamos necessário uma publicação que incluisse não somente os fundamentos teóricos da Metodologia, como também as regras da condução de experimentos, e interpretação de resultados. O trabalho, se não fosse exaustivo, deveria pelo menos abordar com profundidade certos aspectos da problemática do Uso de Radioisótopos em Bioquímica.

Desse modo passamos às mãos do leitor este Boletim, esperando que lhe seja de alguma utilidade.

Otto J. Crocomo

CENA
Biblioteca

RADIOISOTOPOS EM BIOQUIMICA

O.J.Crocomo - Depto.Química-ESALQ
L.C.Basso - Depto.Química-ESALQ

1. INTRODUÇÃO

A partir do momento em que a utilização de isótopos estáveis e radioativos artificiais tornou-se viável pela sua produção em escala industrial, a biologia experimental e especialmente a bioquímica sofreram um espetacular progresso. Algum dos grandes avanços da bioquímica nos últimos 30 anos têm suas raizes na aplicação de isótopos para a compreensão de processos metabólicos. Compostos têm sido "marcados" pela incorporação de isótopos radioativos ou estáveis em suas moléculas e administrados a animais, plantas e microrganismos. O aparecimento da marcação em algum outro produto isolado de uma sequência metabólica, e a determinação da posição da "marca" na molécula, tem dado evidência para a existência de certos esquemas metabólicos. Ainda mais: a incorporação de um composto marcado no corpo de um animal demonstra que os componentes celulares não são necessariamente inertes simplesmente porque sua concentração permanece constante. Desse modo, isótopos são também utilizados para determinar as velocidades de reações nos organismos vivos, onde, apesar da constância dos seus componentes, ocorre contínua atividade metabólica ("turnover") que pode ser medida por técnicas isotópicas.

Na pesquisa biológica os isótopos são somente um instrumento de trabalho e não o objetivo da pesquisa em si. A pergunta que sempre se deve ter em mente é: "qual é o problema biológico existente, e pode o uso de isótopos ajudar a resolvê-lo?". Nunca se deve perguntar:"como se pode adaptar o problema biológico a fim de se

Recebido para publicação em 17 de agosto de 1 973

usar isótopo para resolvê-lo ?".

Neste salutar sentido de instrumento de trabalho os isótopos tem sido comparados com o microscópio. O desenvolvimento do microscópio no século XVII determinou um grande progresso em biologia, levando à descoberta das células e de microrganismos. Nem por isso, os biólogos utilizariam o microscópio na resolução de todos os problemas. É o caso do uso dos isótopos.

Entretanto, os isótopos são mais poderosos do que muitos métodos existentes, como a própria microscopia e a espectrometria. Veremos no texto que a razão reside na alta sensibilidade do método.

As grandes possibilidades apresentadas pelo uso de "traçadores" nas pesquisas biológicas foram reconhecidas há mais de 50 anos quando Hevesy e seus colaboradores usaram isótopos naturais de chumbo, bismuto e tório para estudar a sua distribuição e metabolismo em plantas e animais. Quando os Curie descobriram a radioatividade artificial no início da década de 30, foi novamente Hevesy quem primeiro estudou a distribuição de fósforo marcado e de água enriquecida com deutério, em animais. O uso de deutério foi largamente usado por Schoenheimer, quem também utilizou nitrogênio pesado em seus trabalhos. Dessas pesquisas e das de Rittemberg resultou o conceito do "estado dinâmico" dos constituintes de tecidos animais e vegetais, revolucionando a bioquímica.

Nos finais da década de 30, três pesquisadores, Ruben, Hassid e Kamen usaram pela primeira vez em biologia um isótopo de carbono, o ^{11}C, de meia-vida curta. Esse radioisótopo serviu de traçador em estudos de absorção fotossintética de CO_2. O outro isótopo de carbono, hoje mais conhecido, o ^{14}C, foi também usado por Ruben e Kamen na década de 40, com os mesmos propósitos. Foram estas pesquisas pioneiras que abriram o caminho para o emprego de isótopos estáveis e radioativos na elucidação de intrincados processos metabólicos celulares. É para um encontro com essa metodologia e algumas de suas aplicações que convidamos os estudiosos de bioquímica e a eles oferecemos este texto.

2. O CONCEITO DE TRAÇADOR

2.1. O átomo

O núcleo dos átomos é formado por protons, que possuem carga elétrica positiva e por um número aproximadamente igual de neutrons, com a mesma massa do proton, porém sem carga elétrica. Os neutrons não contribuem para as propriedades químicas do átomo, mas participam do seu peso (massa). O número de protons mais o de neutrons determinam a massa total do átomo, que é chamada número de massa.

Os eletrons que circundam o núcleo são carregados negativamente, e seu número é exatamente igual ao dos protons do núcleo = = número atômico fazendo com que o átomo total seja eletricamente neutro. Todas as propriedades químicas e biológicas dos elementos são devidas ao número de eletrons, e às orbitais que os mesmos descrevem em torno do núcleo.

Se o número de protons de um átomo permanece constante e o número de neutrons varia, o comportamento químico do elemento é o mesmo, mas o seu número de massa será diferente. Esses átomos são os isótopos.

Na natureza muitos elementos existem como uma mistura de isótopos, sendo que usualmente há predominância de um isótopo em particular. O oxigênio natural é uma mistura de $^{16}O_8$, $^{17}O_8$ e $^{18}O_8$. O subescrito 8 indica o número de protons do núcleo. O que está variando é o número de massa (16, 17 e 18, respectivamente). Carbono é uma mistura de $^{12}C_6$ com pequenas quantidades de $^{13}C_6$ e de $^{14}C_6$. O hidrogênio é uma mistura de $^{1}H_1$, $^{2}H_1$ e $^{3}H_1$. O hidrogênio de massa 2 é o deutério e o de massa 3 é o tritio. O deutério é o isótopo pesado do hidrogênio, onde 1 proton e 1 neutron do núcleo são balanceados por 1 eletron orbital. O processo para a sua formação é essencialmente a inclusão de 1 neutron no núcleo. É a fusão de um neutron com um proton, durante o fenômeno conhecido como captura.

Um neutron produzido em um reator atômico é capturado pelo núcleo do átomo de hidrogenio, formando um novo átomo, o isótopo pesado do hidrogênio, cujo núcleo é conhecido como deuteron (d). A energia liberada durante a captura está sob a forma de radiação gama, e é da ordem de 2,18 milhões de eletron-volts. Esta enorme quantidade de energia é equivalente à diferença na massa entre a soma das massas do neutron e do proton determinadas separadamente, e aquela do neutron e do proton medida após a combinação (o deuteron). O "neutron + o núcleo" antes da interação deveriam ter massa maior do que a do neutron + núcleo após a entrada do neutron o qual se combina com o núcleo. Mas, a soma das partes após a combinação tem um peso menor do que os constituintes separadamente. Essa diferença na massa é equivalente a energia de ligação, que é a força que une o neutron capturado com outras partículas do núcleo. Essa energia é liberada sob forma de radiação.

O núcleo formado após a captura de neutron pode ser estável ou instável. No primeiro caso, o novo isótopo pode ser diferenciado dos átomos normais pela sua massa atômica. Se instável, o novo núcleo emitirá radiação, e será detectável por causa dessa particularidade e também pelo seu diferente peso. Os primeiros são os isótopos estáveis ou pesados, e os segundos são os isótopos radioativos ou radioisótopos.

2.2. Radioatividade

No isótopo instável o núcleo tem mais neutrons em relação a protons, e então se desintegra,emitindo radiação. O radiocarbono $^{14}C_6$ tem 6 protons e 8 neutrons; por desintegração converte-se no isótopo estável de nitrogênio $^{14}N_7$, o qual possui 7 protons e 7 neutrons, uma configuração mais estável. A interação entre um igual número de protons e neutrons produz um arranjamento de partículas nucleares mais estável.

Quando um proton se converte em neutron, o núcleo atinge

uma configuração mais estável. Nessa conversão, há liberação de um eletron, praticamente sem peso, mas com carga elétrica negativa. Com ele sai a "energia de ligação". O eletron é chamado partícula beta e a radiação por ele formada é radiação beta.

Do mesmo modo, existem isótopos que possuem mais protons do que neutrons. A configuração mais estável é atingida pela liberação de uma partícula praticamente sem peso, o positron, que possui carga elétrica positiva.

A radioatividade dos isótopos se caracteriza, portanto, por instabilidade nuclear; o núcleo ao procurar um estado mais estável, emite energia sob forma de radiação. Algumas vezes o núcleo que resulta da emissão de radiação β não atingiu ainda o nível mais estável de energia. Para alcançá-lo o núcleo libera mais energia, semelhante aos raios x, chamada radiação γ e desse modo as partículas nucleares passam de um nível de energia mais elevado para um mais baixo. É a desintegração do núcleo: uma sequência de eventos durante os quais o núcleo se desintegra, com emissão de radiação β ou γ ou de ambas, e liberação de energia, a qual varia com os diferentes isótopos, e é expressa em milhões de eletrons volts (Mev). A Tabela 1 mostra alguns radioisótopos de interesse biológico, com algumas de suas características. Nessa Tabela pode-se notar que o ^{14}C emite partículas cujo nível máximo de energia é de ordem de 0,155 Mev. Por sua vez, ^{3}H emite as mesmas partículas com nível de energia bastante baixo (0,019 Mev). Ambos são muito utilizados em pesquisas bioquímicas. Porém, em certos experimentos, como na "marcação" de cromossomos, deve-se escolher aquele que permite uma melhor resolução fotográfica. Cada desintegração do radiocarbono enegrecerá muitos grãos de prata da emulsão fotográfica, devido a sua energia relativamente alta. Entretanto, cada desintegração do tritio enegrecerá só um grão de prata. Consequentemente, a resolução de cromossomos "marcados" com tritio será muito maior do que usando-se ^{14}C.

Tabela 1 - Radioisótopos de uso comum em pesquisa biológica. Baseado em *KAMEN, 1951* e *SEGEL, 1968*.

Radioisótopo	Meia-Vida	Características da radiação (Mev)	
		Beta	Gama
$^{3}H_{1}$	12,3 anos	0,0179 0,019	
$^{14}C_{6}$	5700 anos	0,155	
$^{24}Na_{11}$	15,06 horas	1,39	1,38 2,758
$^{32}P_{15}$	14,3 dias	1,718	
$^{35}S_{16}$	87,1 dias	0,1670	
$^{42}K_{19}$	12,4 horas	1,98 3,58	1,51
$^{45}Ca_{20}$	163 dias	0,254	
$^{59}Fe_{26}$	45,1 dias	0,29 0,46 1,56	0,19 1,10 1,29
$^{60}Co_{27}$	5,3 anos	0,31	1,17 1,33
$^{65}Zn_{30}$	250 dias	captura K;B^{+} 0,32	1,11
$^{90}Sr_{38}$	25 anos	0,61	
$^{131}I_{53}$	8 dias	0,250 0,31 0,608	0,080 0,284 0,364 0,638

As partículas β são eletrons que se movem com alta velocidade. Quando colidem com a matéria produzem pares de íons. É através dessa produção de íons que a radiação β pode ser detectada. Após a colisão, as partículas sofrem uma deflexão, espalham-se e caminham ao acaso através da matéria até que sua energia é totalmente dissipada.

A radiação γ é formada por fotons, que são quanta de radiação eletromagnética, de alta energia. Movem-se com a velocidade da luz, não possuem cargas e não interagem facilmente com a matéria. Essa propriedade faz com que tenham um maior poder de penetração do que a radiação β. Colidem também com a matéria, produzindo íons, possibilitando a sua detecção.

Quanto maior a instabilidade de um núcleo de um radioisótopo, mais rápida é a sua desintegração. A radioatividade, entretanto, "decai" a medida que o núcleo vai se transformando em configuração mais estável. Este decaimento se dá ao acaso. Não se prevê qual átomo radioativo se desintegrará antes de um outro qualquer.

2.3. Isótopos estáveis

Os isótopos que não são radioativos são chamados "isótopos estáveis". Eles contêm um maior número de neutrons do que a forma mais comum do elemento, e por isso são chamados "isótopos pesados". Em pesquisa bioquímica os isótopos estáveis de maior uso são: ^{68}Zn, ^{66}Zn, ^{57}Fe, ^{54}Fe, ^{44}Ca, ^{34}S, ^{18}O, ^{17}O, ^{15}N, ^{13}C e ^{2}H. O grau de "marcação" de um composto com um isótopo estável é expresso em termos de "átomos por cento em excesso", que representa a proporção de isótopo estável acima daquela que normalmente existe na natureza. Assim, se A_n é a abundância normal (%) de um isótopo na natureza, e A_e é a abundância (%) em um composto enriquecido, então $A_e - A_n$ é "átomos por cento em excesso".

2.4. O traçador

Imaginemos que alguém deseja acompanhar o movimento de peixes nas águas de um rio, com vistas ao estudo de migração. Bastaria "marcar" alguns peixes com pequenas fitas metálicas, libertá-los na corrente de água, e esperar os resultados da pesca em pontos e tempos diferentes. Do mesmo modo, pode-se estudar o movimento das moléculas de água de um rio, a elas adicionando uma "marca" especial. Nesse caso particular, substitui-se o átomo de hidrogênio ou o de oxigênio por seus respectivos isótopos. Moléculas contendo um desses isótopos se comportarão como moléculas de água e na verdade serão água. Esta água especial constitui um "traçador isotópico",que indicará o comportamento de moléculas de água em determinados tempos e localização, inclusive profundidade.

Os isótopos são "marcas" que, quando adicionadas aos átomos normais, fazem-nos detectáveis e por conseguinte são traçadores que revelam o curso que seguem em reações químicas e bioquímicas. Assim um açúcar-^{14}C pode ser utilizado como "marca" na determinação da localização e da quantidade de açúcar não radioativo em um sistema biológico. O açúcar radioativo se misturará completamente com o não radioativo no corpo de um animal em estudo, uma vez que ambos são indistinguíveis. Através da detecção da radioatividade de biópsias do tecido pode-se determinar tanto a quantidade como a localização desse açúcar.

As naturezas físicas e química do composto em estudo devem ser conhecidas a fim de se obter informações precisas: a "marca" deve estar no lugar próprio na molécula ensaiada. Os aminoácidos por exemplo, podem ser marcados com ^{15}N, ^{14}C, ^{3}H, ^{18}O, mas, quando se deseja o destino do seu esqueleto carbônico, o melhor meio é marcá-lo com ^{14}C; por outro lado, o ^{15}N será utilizado na medida do "pool" do N amínico. Por sua vez,num estudo de cinética da formação de peptídeo, ^{18}O ou ^{3}H serão os isótopos escolhidos. A molécula química do aminoácido deverá ser sintetizada com cada um dos traçadores

conforme o caso o exigir.

A molécula química pode ter um ou mais átomos de um mesmo elemento; quando se apresentam todos marcados, a molécula está "totalmente marcada" em relação ao elemento. Ainda mais: se a atividade é a mesma em cada átomo radioativo, o composto é também "uniformemente marcado". Ácido acético-U-^{14}C é o ácido em cujas moléculas ambos os átomos de carbono se apresentam radioativos, com igual atividade específica. Esse ácido, $^{14}CH_3$-$^{14}COOH$ deverá ser sintetizado a partir de $^{14}CH_3$ MgI e $^{14}CO_2$ na reação de Grignard.

Querendo-se ácido acético-1-^{14}C, somente $^{14}CO_2$ deverá ser utilizado na reação de síntese; por outro lado, somente o composto de Grignard será marcado com radiocarbono quando se desejar ácido acético-2-^{14}C.

Compostos "duplamente marcados" são preparados quando duas diferentes espécies de átomos radioativos são empregados em sua síntese. Ácido fórmico pode ser marcado com ^{14}C e ^{3}H se a reação de sua síntese for realizada a partir de $K^{14}CN$ e $^{3}H_2O$ em presença de HCl:

$$K^{14}CN + 2\ ^{3}H_2O + 2\ HCl \rightarrow\ ^{3}H\ ^{14}COOH + KCl + NH_4Cl$$

Ácido acético e ácido fórmico são dois bons exemplos de compostos que apresentam grande atividade biológica. O primeiro é fonte de acetil-CoA e o segundo é parte integrante do metabolismo dos compostos em "C_1".

Administrados a um organismo, êsses compostos marcados, igual a todos os outros, tornam-se parte do "pool" metabólico da célula e sofrem reações que são características do metabolismo desse particular organismo. Dos compostos originais em estudo, podem formar-se outros compostos em que aparece o traçador, os quais podem ser isolados e identificados quimicamente, mesmo que sua quantidade

seja extremamente pequena.

2.5. Sensibilidade do método traçador

O método traçador é bastante sensível. Assim, misturando-se 1 milimol (180 mg) de glicose-^{14}C, com atividade igual a 1 milicurie, com 4.000 quilos de glicose não radioativa, em 10 mg dessa mistura se consegue detectar cêrca de 500 cpm. Este é um exemplo comum, e se baseia no fato de que os aparelhos usados são de grande precisão. Porém, há ainda mais: considere-se que o peso de ^{14}C que possui a atividade de 1 milicurie é 0,218 mg, e que os compostos marcados com ^{14}C possuem todos os seus átomos de carbono radioativos. Isso significa que a atividade de ^{14}C puro é de 64 mc/mol e que, desejando-se expressar a atividade de um composto completamente marcado com ^{14}C em milimol, deve-se multiplicar o seu número de átomos de carbono por 64. Assim para $^{14}C_6H_{12}O_6$ (glucose-U-^{14}C), a máxima atividade possível é de 64 x 6 = 384 mc/mmol; ou seja, a atividade de glucose seria de 384 mc/m mol se cada átomo de carbono em cada molécula do glucose fosse radioativo (^{14}C). Entretanto, nem sempre se consegue a máxima atividade possível em compostos marcados. Geralmente no comércio encontram-se embalagens com atividade específica muito menor. No caso do exemplo acima uma embalagem de atividade específica igual a 10 mc/m mol indica que de cada 6,4 moléculas de glucose somente 1 é radioativa, ou que a relação é de 1 átomo radioativo para cada 38,4 átomos de carbono.

3. MEDIDA DE ISÓTOPOS RADIOATIVOS E ESTÁVEIS

Uma discussão detalhada dos instrumentos usados para a medida de radioatividade, ou da concentração de isótopos estáveis em uma amostra biológica está além dos limites deste boletim. Entretanto, uma breve menção dos mais importantes tipos de aparelhos deve ser feita.

3.1. A medida da radioatividade

De acordo com o tipo de material para os quais eles são usados, os aparelhos para a medida da radioatividade de uma amostra podem ser agrupados nas seguintes categorias gerais.

3.1.1. Câmaras de ionização

Nessas câmaras de ionização, o gás radioativo ao colidir com as moléculas do gás produz íons que são coletados em eletrodos de baixo potencial. A corrente produzida é amplificada por um eletrometro de vibração, e sua intensidade lida em um galvanômetro. A corrente produzida é proporcional à intensidade média de produção de íons e portanto proporcional à radioatividade do gás.

3.1.2. Contadores proporcionais e Geiger-Muller

Uma amostra sólida colocada próxima a esses contadores, emitirá radiação que determinará a ionização do gás (hélio ou butano) que está no contador. Os íons são coletados nos eletrodos do contador e, devido à alta voltagem aí aplicada, são multiplicados várias centenas de vezes. Finalmente, determinam uma descarga de potencial que é registrada como uma "contagem" em um escalímetro. A grandeza da descarga produzida no contador proporcional é proporcional à energia da radiação que o atinge.

Esses tipos de detectores medem cada partícula beta ou raio

gama que neles entra separadamente.

3.1.3. Contadores de cintilação para líquidos

Nesses contadores, o material é perfeitamente misturado com um composto orgânico que tem a propriedade de emitir "flashes" de luz quando interage com a radiação. A luz assim produzida é "vista" por uma célula fotoelétrica e os eletrons que saem dessa célula são amplificados e registrados em um escalímetro.

Cada "flash" de luz, e consequentemente, cada descarga, corresponde à desintegração de um radioisótopo. A sua intensidade é proporcional à energia do raio emitido. Esse tipo de contador é utilizado principalmente para medir radiações beta fracas, como a do tritio.

3.1.4. Contadores de cintilação de cristal

Esses contadores operam sob o mesmo princípio dos contadores apresentados acima. Aqui, entretanto, a radiação emitida pela amostra colide com um cristal de iodeto de sódio que contém traços de iodeto de tálio. O cristal emite "flashes" de luz correspondentes à radiação que o atinge. Esses contadores são utilizados principalmente para determinar radiação gama, como a emitida pelo ^{131}I.

Além desses quatro tipos gerais, há os "rate meters", ou medidores da intensidade de radiação - são Geiger-Muller que registram a intensidade da desintegração de um radioisótopo. Servem para medidas rápidas da radioatividade de amostras, inclusive como monitores de laboratório. Há também os "scanners", que são contadores Geiger-Muller modificados, e que servem a vários propósitos, incluindo medidas de radioatividade de regiões do corpo animal e humano, e de radioatividade de manchas em cromatogramas de papel e outros. Finalmente, há todo um equipamento eletrônico necessário para proporcionar a alta voltagem aos contadores e registradores.

3.2. Unidades de radioatividade

3.2.1. A desintegração radioativa

Devido ao processo de desintegração, muitos isótopos desapareceram há muito da natureza. É o caso de ^{23}Mg e ^{27}Mg, os quais não entram em proporções mensuráveis de magnésio na natureza. Esses dois isótopos, entretanto, podem ser produzidos através de reações nucleares e usados em pesquisa.

A desintegração de radioisótopos é um processo exponencial, representado por uma equação de primeira-ordem:

$$-\frac{dN}{dt} = \lambda N$$

onde:

$-\frac{dN}{dt}$ = número de átomos desintegrando-se na unidade de tempo (a intensidade de contagem).

N = número total de átomos radioativos presentes em um dado tempo.

λ = constante de desintegração, diferente para cada isótopo.

O sinal negativo indica que o número de átomos radioativos decresce com o tempo.

Pode-se visualizar o significado físico da constante de proporcionalidade λ, rearranjando a equação acima:

$$\lambda = -\frac{dN}{dtN}$$

e então:

$$= \frac{-dN/N}{dt}$$

CENA
Biblioteca

Nota-se assim que λ é uma fração de átomos radioativos que se desintegram em um pequeno aumento de tempo. Essa equação diferencial pode ser integrada, obtendo-se:

$$\frac{dN}{dt} = -\lambda N; \quad \frac{dN}{N} = -\lambda dt; \quad \int_{No}^{N} \frac{dN}{N} = -\lambda \int_{t=0}^{t} dt$$

A integração é realizada entre os limites de N_o, que é o número original de átomos radioativos, e N, o número atual de átomos radioativos; e entre os limites de tempo zero e outro qualquer tempo. Segue-se então:

$$\ln \frac{N}{N_o} = -\lambda t$$

$$\ln \frac{N_o}{N} = \lambda t$$

o que nos leva a:

$$2{,}303 \log \frac{N_o}{N} = \lambda t$$

Na sua forma exponencial a equação se torna:

$$N = N_o e^{-\lambda t}$$

Como se pode observar, esta relação é idêntica às outras equações de primeira-ordem.

3.3. A meia vida

A meia vida de um radioisótopo, representada por $t_{1/2}$, é o tempo exigido para que metade do número original de átomos sofra

desintegração. Ela se relaciona com a constante de desintegração λ da seguinte maneira:

$$\ln \frac{N_o}{N} = \lambda t$$

ou

$$2{,}303 \log \frac{N_o}{N} = \lambda t$$

segue-se então que:

$$\ln \frac{1}{0{,}5} = \ln 2 = \lambda t_{1/2}$$

ou

$$2{,}303 \log 2 = \lambda t_{1/2}$$

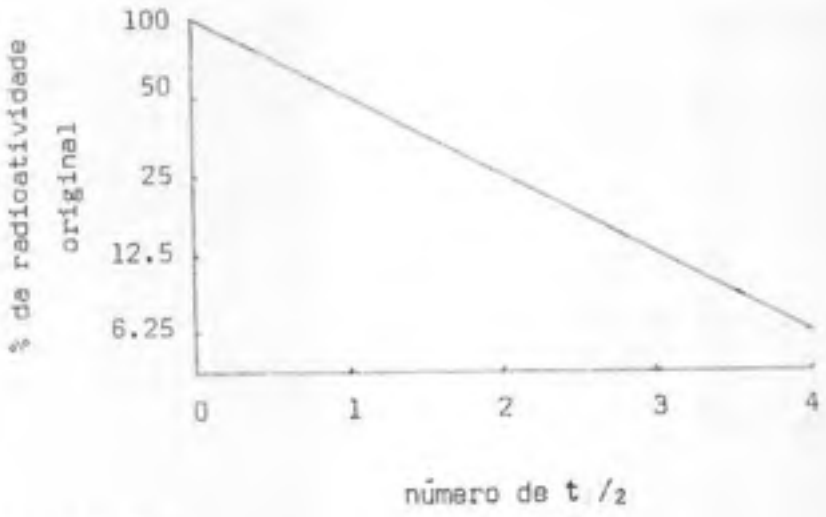
ou seja:

$$0{,}693 = \lambda t_{1/2}$$

portanto:

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{\lambda}$$

Desse modo a quantidade restante em uma amostra, pode ser facilmente calculada a partir de um gráfico construído em papel semilog, como o representado na Figura 1.



3.4. O Curie

O padrão de unidade de desintegração radioativa é o curie, o qual define a velocidade de desintegração que ocorre em uma amostra de material radioativo. Essa unidade se refere ao número de átomos isotópicos na amostra e é definido como a quantidade de radioatividade de 1 grama de ^{226}Ra, o isótopo que serve como padrão. Experimentalmente nessa quantidade de rádio são detectadas $3,7 \times 10^{10}$ desintegrações por segundo (dps) que passou a ser a unidade fundamental de radioatividade. Os seus submúltiplos são o milicurie (mc), igual a $3,7 \times 10^{7}$ dps, e o microcurie (µc) igual a $3,7 \times 10^{4}$ dps ou $2,2 \times 10^{6}$ dpm (desintegrações por minuto). Como muitos aparelhos de detecção de radioatividade, como os "gas flow counters", podem detectar e registrar (ou contar) cerca de 50% de todas as desintegrações de uma amostra, pode-se dizer que grosseiramente 1 µc corresponde a cerca de 1 milhão de cpm (contagem por minuto).

Quando se comparam diferentes isótopos com distintas meias vidas, o curie não define o conteúdo isotópico dentro de uma amostra. Entretanto, o curie define o número de isótopos quando se comparam diferentes amostras de um mesmo isótopo. Por exemplo, injetamos 100 µc de um aminoácido-^{14}C em uma cobaia; após o tempo experimental conseguimos coletar 10 µc de $^{14}CO_2$ respirado. Isto signifi-

ca que o aminoácido injetado contém um certo número de moleculas marcadas com ^{14}C e que o dióxido de carbono expirado contém 10% desse número. O número de moléculas marcadas em uma amostra de 50 µc do mesmo aminoácido, porém tritiado, deverá ser bem diferente e muito menor. Isto porque, para um mesmo número de átomos radioativos, o tritio tem muito mais desintegrações por minuto do que o ^{14}C, uma vez que a meia vida do tritio é de 12 anos e a do ^{14}C é de 5.700 anos.

3.5. Atividade específica

A atividade específica se refere à quantidade de radioatividade por unidade de substância. É expressa em termos de curies/grama (c/g), milicuries/mg (mc/mg), milicuries/milimol (mc/mmol), desintegrações/minuto/milimol (dpm/mmol), contagem/minuto / micromol (cpm/µmol), e outras formas. Desde que a atividade de um dado composto é conhecida, e expressa por exemplo em uma das formas acima mencionadas, pode-se encontrar a quantidade do mesmo em uma amostra.

3.6. Medida da concentração de isótopos estáveis

A medida da concentração de isótopos estáveis é mais difícil e menos sensível do que a detecção de radioisótopos, pois depende somente da diferença entre as massas atômicas. Em bioquímica os isótopos estáveis somente são usados quando não existem radioisótopos disponíveis. Os mais comumentes utilizados são os ^{15}N e o ^{18}O, se bem que ^{13}C tem sido ultimamente empregado.

O espectrômetro de massa é o aparelho que tem sido utilizado para a medida da concentração de isótopos estáveis em amostras biológicas. A amostra é convertida em gás, que é então ionizado, os íons sendo acelerados por um campo elétrico. Um campo magnético deflete os íons, sendo que o ângulo de deflecção varia com o peso dos íons; os íons isotópicos mais pesados atingem "marcas" diferentes daquelas alcançadas pelos íons normais, que são mais leves. Nessas "marcas", as concentrações dos respectivos íons são medidas e registradas.

4. O MÉTODO DA DILUIÇÃO ISOTÓPICA

4.1. Análise de diluição com radioisótopos

A metodologia dos radioisótopos ganhou um grande impulso com o método da diluição isotópica introduzido em 1934 por *HEVESY E HOFER*. O método tem largo emprego seja como processo analítico em ensaios de compostos conhecidos, seja na extração, purificação e identificação de intermediários em reações metabólicas, ou ainda na evidência de síntese de compostos e nas relações precursor- produto entre compostos conhecidos.

Há 3 tipos gerais de métodos da diluição isotópica:

4.1.1. O método direto

O processo é usado para se determinar a quantidade de um constituinte não radioativo em uma mistura de compostos intimamente relacionados, que são difíceis de separar quantitativamente pelos métodos convencionais. Neste método é essencial que o composto isolado seja absolutamente puro, mas a recuperação completa desse composto (100% de recuperação) não é necessária. Desde que nesta técnica, moléculas radioativas são misturadas com moléculas não radioativas de um mesmo composto, o conteúdo isotópico da porção isolada (não importa a quantidade) é determinado pela medida de sua atividade específica.

Se a um recipiente contendo p mg do composto a ser analisado com uma atividade específica Ao cpm/mg se adicionar Z mg de um carregador não marcado, haverá uma mistura homogênea de p e Z, uma vez que ambos são moléculas do mesmo composto. O material marcado, portanto, foi diluído com o não marcado, e tem agora uma nova atividade específica A cpm/mg. O que se adicionou foi unicamente *carregador* não marcado; por conseguinte, a radioatividade total no recipiente não sofreu modificação. Ora:

$$\text{atividade específica} = \frac{\text{atividade total}}{\text{peso}}$$

portanto,

atividade total = atividade específica x peso

No nosso caso:

Ao	x	p	=	A	x	(p+Z)
atividade específica inicial		peso inicial		nova atividade específica		novo peso

Tem-se então que a Equação Fundamental da Diluição Isotópica é a seguinte: atividade total antes da diluição = atividades após a diluição.

Consideremos o caso em que Z é muitíssimo maior que p, este último sendo, portanto, negligível. Por exemplo: uma mistura de aminoácidos marcados contém uma diminuta quantidade de um aminoácido M* (p = 0,01 mg). Para se saber a radioatividade total de M*,o carregador não marcado M(Z = 100 mg) é adicionado à mistura. Ora, o novo peso (p + Z) = 100, 01 mg, pode ser considerado como sendo 100 mg, já que o peso inicial é desprezível. O carregador é uniformemente misturado com os aminoácidos marcados e é então reisolado e purificado. No processo de purificação parte dele pode se perder; isola-se então uma pequena amostra do mesmo, pesa-se, determina-se sua radioatividade e calcula-se sua atividade específica (A, a nova atividade específica). Portanto, conhece-se Z e A, e desses dois dados, a atividade total de aminoácido na mistura (Ao x p) pode ser calculada, pela equação da diluição isotópica:

(Ao x p) = A x Z

Note-se que o nosso aminoácido marcado não foi isolado a não ser através do carregador que foi adicionado, uma vez que M (adicionado) é o mesmo aminoácido M* já existente na mistura.

4.1.2. Método inverso

Este método é o inverso do anterior. Consiste em se deter-

minar a quantidade (Z) de um dado composto não marcado em solução, adicionando-se molécula marcadas (p) do mesmo composto à solução. Por exemplo, uma amostra de material biológico contém Z mg de composto M não marcado. Adiciona-se a ela p mg de M* marcado, com atividade específica conhecida Ao. M* se misturará com M, e se diluirá. O composto é agora isolado e purificado; a nova atividade específica A é então obtida em uma pequena fração do mesmo. Conhece-se então Ao, p e A; pode-se, por conseguinte, calcular a quantidade Z do composto no material biológico, por um rearranjamento da equação fundamental da diluição isotópica:

$$Z = \frac{p\ (Ao - A)}{A}$$

Do mesmo modo, no caso do método direto, se por algum meio se pudesse determinar a atividade específica Ao do aminoácido em estudo, o peso p do mesmo poderia ser assim calculado:

$$p = \frac{AZ}{Ao - A}$$

4.1.3. Método de derivado isotópico

Este método é utilizado quando se deseja determinar o peso de um composto em uma mistura de pequenas quantidades de compostos conhecidos não marcados. Digamos que a mistura seja formada por ácidos graxos, entre os quais o ácido palmítico, cuja quantidade se deseja determinar. O reagente neste caso é o diazometano-^{14}C; nessa reação todos os ácidos graxos se convertem em seus respectivos derivados isotópicos, os metil-éster-^{14}C, nos quais a única radioatividade é aquela proveniente do reagente, fazendo com que a atividade específica do produto da reação seja a mesma do diazometano-^{14}C (Ao). A fim de se separar o ácido palmítico, adiciona-se uma quantidade (Z) conhecida do "derivado" metil-palmitato, o que facilitará o isolamento e a purificação. Uma vez isolado, a atividade específica (A) será determinada em uma pequena fração do derivado diluido. A quantidade original (p) do ácido palmítico, por pequena que

seja, é agora calculada pela expressão já conhecida.

$$p = \frac{AZ}{Ao - A}$$

O processo é aplicado a quase todo tipo de composto *não marcado* que esteja presente em misturas as mais complexas, desde que se escolha corretamente o reagente marcado que dará o derivado isotópico. Ele de fato aumenta de muito o já grande poder da técnica da diluição isotópica.

4.2. Análise da diluição com isótopos estáveis

Como já vimos, os isótopos estáveis podem ser usados em análise de diluição do mesmo modo que os radioisótopos. Naturalmente, aqui os cálculos são baseados na diluição da porcentagem dos átomos em excesso ao invés das radioatividades específicas. Entretanto, a base dos cálculos é a mesma.

O grau em que os "átomos porcento em excesso" são diluidos está diretamente relacionado com a quantidade de composto não marcado equilibrado com o composto marcado antes da separação.

Partindo-se de que:

A_r = átomos por cento em excesso reisolados.

A_o = átomos por cento em excesso adicionados.

M_o = quantidade de composto marcado adicionado.

M_u = quantidade de composto desconhecido na mistura.

tem-se:

$$\text{diluição} = \frac{A_r}{A_o} = \frac{M_o}{M_o + M_u}$$

e então:

$$(A_o)\ M_o = (A_r)\ M_o + (A_r)\ M_u$$

$$(A_r)\ M_u = (A_o)\ M_o - (A_r)\ M_o$$

$$M_u = \frac{(A_o)\, M_o - (A_r)\, M_o}{A_r}$$

$$M_u = \frac{(A_o) - (A_r)}{A_r}\, M_o$$

$$M_u = \frac{A_o}{A_r} - \frac{A_r}{A_r}\, M_o$$

Finalmente:

$$M_u = \frac{A_o}{A_r} - 1\ M_o$$

Nessa expressão, os valores de M_o e M_u são dados em moles. Desse modo, evita-se confusão resultante das diferenças nos pesos moleculares do composto traçador e do não enriquecido.

5. PROBLEMAS NA METODOLOGIA DOS TRAÇADORES

Em experimentos biológicos nos quais os isótopos traçadores são utilizados, há perigo de uma interpretação errônea dos dados experimentais, devido a fontes de erro que podem ser assim divididas: 1. efeitos químicos; 2. pureza radioquímica; 3. efeitos da radiação; 4. reações de troca; e 5. efeito isotópico.

5.1. Efeitos químicos

Podem ser devidos seja a elementos estranhos à reação ou pela própria atividade principal. No primeiro caso microelementos podem estar presentes nas preparações do elemento radioativo e podem ser inibidores da ação enzimática, quando por exemplo é esse o tipo de estudo que se está levando a efeito.

Em relação ao segundo caso, a quantidade de atividade principal administrada frequentemente altera a sua distribuição biológica. É o que pode acontecer com a absorção de iodeto pela glândula tireóide; quanto maior a massa de iodeto fornecido, menor a porcentagem de absorção. Quando a quantidade de iodeto é aumentada, a tireóide torna-se saturada com o elemento, e se bem que o teor total de iodeto (radioativo e estável) continue a aumentar com o aumento das doses, a porcentagem de absorção diminui. Com esse exemplo, vê-se que a quantidade do elemento principal introduzido no sistema deve ser considerado como bastante importante. A massa empregada depende da atividade específica, do grau de acumulação nas amostras a serem medidas e a sensibilidade da medida. Existe uma terminologia que é usada no emprego de radioisótopos:

5.1.1. Dose traçadora

A quantidade de elemento administrado é pequena comparada com a absorção normal, ou em relação àquela normalmente presente no sistema.

5.1.2. Dose fisiológica

A quantidade de elemento administrada é da mesma ordem de grandeza que a absorção normal.

5.1.3. Dose massiva

A quantidade do elemento fornecido ultrapassa de muito o consumo normal.

As doses traçadora e fisiológica usualmente seguem o caminho normal, já que o teor do elemento introduzido no sistema não é tão grande para determinar distúrbios nas condições de equilíbrio e de "steady state". Ao contrário, a dose massiva pode interferir no metabolismo da célula e desse modo determinar um quadro anormal.

5.2. Pureza radioquímica

Em estudos realizados com traçadores é essencial que a radioatividade medida no sistema tenha origem em uma simples espécie atômica ou molecular. De outro modo os resultados poderão levar a conclusões errôneas; portanto, é necessário que qualquer radioatividade outra além da principal seja identificada e eliminada.

Na produção de radioisótopos podem ocorrer reações nucleares que levam à marcação de outros elementos além daquele que se deseja marcar. É o que acontece quando se irradia seja o superfosfato ou um fosfato de rocha; outros elementos além do fósforo (elemento principal) se tornarão marcados, principalmente as impurezas, como ferro e manganês. Vários adubos fosfatados (superfosfatos, hiperfosfatos, fosfato da Flórida, fosforita de Olinda, apatita de Araxá, Escórias de Thomas, farinha de ossos, fosfato bicálcico), foram submetidos, durante 3 horas a um fluxo de 1 trilhão de neutrons sec^{-1} cm^{2}. A contagem da radioatividade foi feita periodicamente no material "in natura", até que os dados indicassem a desintegra-

ção total do ^{32}P. O meterial, continuava radioativo, indicando que outros elementos, de meia vida mais longa do que o radiofósforo, estavam radioativos. A análise espectrográfica revelou a presença principalmente de ferro e manganês radioativos. O teor de ^{32}P, entretanto, é muitíssimo maior que o dos outros elementos: apesar disso, a interferência radioatividade das impurezas deve ser eliminada. Para tanto, recomenda-se o uso de pequenas doses de adubos radioativos assim obtidos da ordem de 30 mg, e que é viável em ensaios de curta duração, como os microbiológicos. Contudo, experimentos de longa duração, como os realizados no campo ou em vasos de casa de vegetação, o emprego desses adubos não é possível. Porém pode-se empregá-los em estudos de absorção pelas plantas dos micronutrientes ferro e manganês, em ensaios que durem 6 a mais meses. As meias vidas de ^{59}Fe e ^{54}Mn são relativamente longas e além disso, o analisador de impulsos separa as energias desses dois radioisótopos.

Outras impurezas são formadas pelos próprios elementos principais, os quais durante o bombardeamento não permaneceram na mesma forma química ou no mesmo estado de valência. Assim, o bombardeamento de NaH_2PO_4 para produzir ^{32}P em reatores de pilha, pode determinar que somente 50% dos átomos de ^{32}P permaneçam na forma de íônio ortofosfato. Este comportamento anômalo pode ser ocasionado pela elevada temperatura existente nas pilhas; isto é particularmente importante no caso de bombardeamento de fosfatos de rocha que irão ser utilizados como fertilizantes.

Alguns traçadores livres de transportador ("carrier free") podem comportar-se em soluções antes como coloides do que como verdadeiros solutos, e sob tais condições são chamados de radiocolóides. Estes podem ser detectados por processos tais como: diálise, ultrafiltração, difusão, eletroforese, adsorção e autoradiografia. Alguns fatores que tendem a promover a formação de colóides são:

a. Uso de solventes nos quais o traçador tende a hidrolisar ou formar um composto insolúvel;

b. Presença de certos eletrólitos;

CENA
2970 ex.1
Biblioteca

c. Presença de partículas estranhas na solução;

d. Envelhecimento da solução.

Os radiocolóides podem comportar-se diferentemente em um sistema biológico do que fazem os iônios do mesmo radioisótopo. Geralmente, o comportamento de preparações de ouro, fosfato de cromo e fosfato de zircônio no sistema retículo-endotelial depende do tamanho da partícula coloidal.

Em experimentos que empregam ^{90}Sr e alguns outros radioisótopos, há quase inevitavelmente a formação de "radioisótopos filhos":

$$^{90}Sr \xrightarrow{28\ anos} {}^{90}Y \xrightarrow{61\ horas} {}^{90}Zr\ (estável)$$

Isso quer dizer que partindo-se do "pai", este se desintegra no organismo dando o "filho".

Nesses casos deve-se frequentemente esperar que a mistura entre em equilíbrio secular antes de se medir a atividade. Mesmo que o "pai" e o "filho" (^{90}Sr e ^{90}Y) possam ter estado em"estado de equilíbrio"antes de serem administrados, tal situação não causará distúrbio algum pois o organismo facilmente separará os elementos por processos semelhantes, por exemplo, ao da adsorção.

5.3. Efeitos da radiação

A propriedade característica dos radioisótopos, ou seja a emissão de radiação é a causa de diferenças no efeito biológico. É o que se observa quando o teor total de material radioativo exigido é de tal grandeza que a radiação age em detrimento do organismo. Para se determinar se a radioatividade em si está influenciando uma reação, necessário se torna repetir o mesmo experimento com várias quantidades de radiação, mantendo-se a mesma concentração química total.

A radiação causa ionização e por conseguinte dano a célula. É óbvio então que a dose mínima de radioisótopo que pode ser usada com dano negligível ao tecido depende do tipo, quantidade e da energia da radiação emitida. Alguns níveis nos quais se observam efeitos biológicos determinados pela radiação advinda dos traçadores e que não são considerados patalógicos, mas sim fisiológicos, são os seguintes:

^{131}I 0,045 µc/g de peso vivo em camundongo.

^{32}P 0,05 µc/ml de solução em larva de pernilongo.

0,8 µc/g de peso vivo em ratos.

2,0 µc/l de solução nutritiva em plantas.

^{226}Ra 0,03 µc/g de peso vivo.

Os beta-emissores são menos danosos aos tecidos, porque sua radiação é prontamente absorvida pelo meio aquoso envolvente. Assim, ^{32}P, beta-emissor forte, na forma de fósforo, mesmo em doses tão altas como 16 r/dia/animal (camundongo) não causa tumor cancerígeno. Naturalmente podem ter ocorrido outros efeitos menos visíveis que passaram desapercebidos. No caso de beta-emissores fracos, como o ^{14}C e T (^{3}H), a situação é ainda menos séria, uma vez que quase nenhuma radiação penetra a camada de água envolvente além de alguns milímetros. Contudo, há uma grave exceção: o efeito sobre o material genético. É claro que isso se aplica a isótopos mais energéticos, porém os radioisótopos mais frequentemente usados para marcar material genético são o radiocarbono e o tritio.

Três são os casos que podem ser citados como exemplo:

a. A molécula contendo ^{14}C está em solução no meio aquoso de uma célula, e a radiação beta que ela emite é instantaneamente absorvida e inativada pela molécula de água que a envolve.

b. Um aminoácido-^{14}C faz parte de uma molécula protéica; a radiação pode ser absorvida pelo solvente aquoso ou pode atingir um aminoácido vizinho que faz parte da mesma proteína.

Se este último caso se der, ocorrerá uma troca química na molécula protéica, e uma atividade enzimática, se for o caso, pode decrescer ou ser eliminada totalmente. Mas desde que em um experimento dessa natureza somente umas poucas moléculas de proteína terão aminoácido marcado, as consequências para a célula e seu metabolismo passarão completamente desapercebidos. Uma pequena fração de quantidade total de uma dada enzima destruída nada significa para a célula: será substituída imediatamente pela maquinaria de renovação protéica da célula;

c. Nucleotídeo-^{14}C é a parte da molécula do ácido desoxiribunucleico (DNA). Ora, este é o material genético da célula. Cada enzima sintetizada e portanto cada coisa que a célula faz é completamente dependente da estrutura do gen ou seja do DNA. Variação em sua estrutura determinará a produção de uma proteína errada, e o erro se repetirá nas gerações futuras do organismo; se o erro não for corrigido imediatamente será ele herdado pela célula, dando resultados catastróficos. A radiação emitida pelos radioisótopos de um nucleotídeo pode atingir um outro nucleotídeo na cadeia do DNA. Dano genético nesse sentido, tem sido observado mais frequentemente com tritio do que com ^{14}C, apesar de que a radiação beta do T é muito mais fraca do que a do ^{14}C. A razão é que atividades específicas muito mais altas podem ser obtidas com tritio do que com radiocarbono: tritio "carrier-free" tem 57,5 curies por miliátomo, enquanto que carbono tem 0,064; isto é devido à meia-vida muito mais curta do tritio e portanto sua maior intensidade de desintegração.

O nucleotídeo no qual o ^{14}C se incorpora especificamente é timidina. Em pontas de raiz de cebola crescendo em timidina-^{14}C, cêrca de 20% dessas células apresentaram aberrações devidas à quebras cromossômicas. Em cultura de tecido, 90% das células morreram

quando a cultura cresceu em presença de 0,1 milicurie de timidina-^{3}H. De modo geral, considera-se que 50 r/Kg determina dano genético.

5.4. Reações de troca

Em processos metabólicos a "marca" pode ser transferida a uma enzima ou cofator ou a um outro material presente na reação. Se esta transferência não ocorre na presença de um inibidor enzimático (como CN^-, fluoracetato, AsO_4^{-3}) pode-se considerá-la como sendo o resultado de um processo enzimático desde que troca verdadeira não é afetada por agentes desnaturantes de proteínas nem por inibidores enzimáticos.

Em química orgânica a reação de Friedel-Crafts é um bom exemplo para se demonstrar a existência dessas reações de troca isotópica.

$$C_6H_6 + CH_3\ COCl^* \xrightarrow{AlCl_3} C_6H_5COCH_3 + HCl^*$$

Quando acetil cloreto é marcado no cloreto, o átomo de radiocloro será também encontrado no $AlCl_3$, se bem que o cloreto de alumínio não estava marcado inicialmente. Por sua vez, quando $AlCl_3$ é marcado, o radiocloreto aparece no cloreto de acetilo. Esta reação de troca torna bastante difícil a determinação do papel do $AlCl_3$ na reação.

Um caso bastante importante é a reação de troca que sofrem o deutério e o trítio. Moléculas orgânicas mantidas em equilíbrio com gás trítio tem os seus átomos de hidrogênio trocados com o radioisótopo sendo que a intensidade de troca, ou seja, facilidade com que os átomos de hidrogênio nas moléculas são trocadas, depende tanto da energia de ligação como da estereoconfiguração da molécula. Mas, os átomos que passam a fazer parte das moléculas por reação de troca também podem ser produzidos por troca. Assim deutério e trítio presos a átomos de oxigênio, nitrogênio, enxôfre e carbono

ativo, são perdidos quase instantaneamente por troca com água; entretanto quando presos a átomos inativos de carbono, ambos aqueles isótopos são relativamente permanentes.

5.5. Efeito isotópico

Os radioisótopos são utilizados como traçadores na suposição de que o átomo radioativo se comporta da mesma maneira que seu "irmão estável". Isso é verdadeiro ou quase na maioria dos casos, mas não o é em outros casos, principalmente com os elementos mais leves. Essa diferença no comportamento é conhecida como efeito isotópico e é determinada pelas diferenças nas massas dos átomos respectivos.

Moléculas contendo o isótopo mais leve, reagem mais rapidamente do que as que possuem o isótopo mais pesado.

As reações químicas entre átomos dependem do número e arranjo de eletrons orbitais em volta do núcleo e estes são idênticos para os átomos normais e seus isótopos. Contudo as velocidades das reações químicas são influenciadas pela massa dos átomos reagentes e pelo número de eletrons, e os isótopos, naturalmente, diferem em massa dos átomos normais. Deve haver, por conseguinte, um comportamento diferente entre compostos normais e isotópicos, no que tange à velocidade de reação e o equilíbrio das mesmas.

O efeito isotópico pode ser considerado negligível no caso dos isótopos de carbono, já que as diferenças entre velocidades de reação dependem da relação entre os pesos atômicos de ^{14}C e ^{12}C (14/12) que é próximo à unidade. No caso dos isótopos de hidrogênio, ^{1}H, ^{2}H e ^{3}H, contudo, a relação dos pesos atômicos é 2/1 e 3/1, ou seja, o dobro e o triplo. Por outro lado, nenhum efeito isotópico é observado para certos elementos nos quais o radioisótopo tem uma massa que é intermediária entre as massa dos isótopos naturais, estáveis. O cobre-64 é radioativo, mas o Cu-63 e o Cu-65 são estáveis.

Na realidade o efeito isotópico pode ser intramolecular e intermolecular. Um exemplo do primeiro tipo é a descarboxilação do ácido malônico marcado com radiocarbono no C-1:

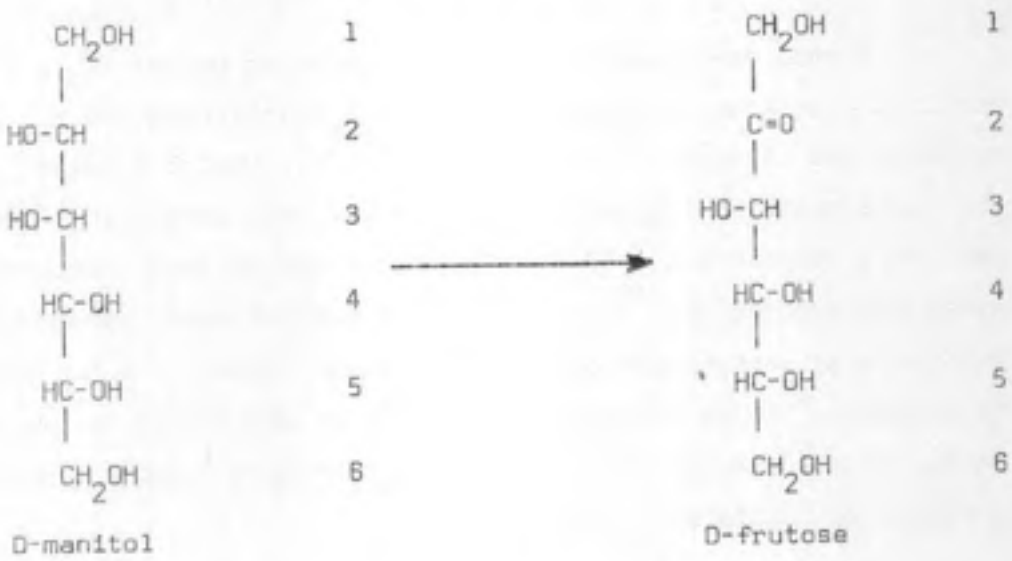
$$HOO^{14}C\text{-}^{12}CH_2\text{-}^{12}COOH$$

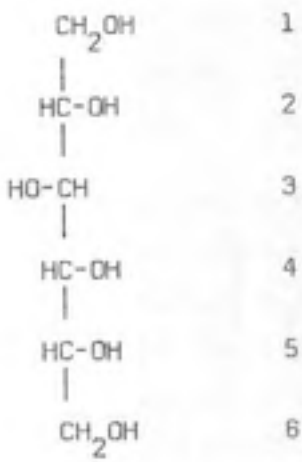
Quando descarboxilado, o ácido malônico produz CO_2 e ácido acético. Consequentemente, a reação está relacionada com a força relativa das ligações ^{12}C - ^{14}C e ^{12}C - ^{12}C. Devido à maior massa do ^{14}C, a primeira ligação é relativamente mais estável. Pode-se, portanto, esperar que o CO_2 resultante da reação será comparativamente enriquecido com ^{12}C e que o ácido acético será, também comparativamente, enriquecido com ^{14}C que vem de -COOH. É o que realmente acontece. Essas reações competitivas se dão dentro de uma mesma molécula, e apesar disso o efeito isotópico será observado mesmo se a reação se completa.

Um exemplo de efeito isotópico intermolecular é a descarboxilação de ácido benzóico-7-^{14}C. Neste caso, o pesquisador estará estudando realmente a descarboxilação de 2 compostos: C_6H_5 - $^{14}COOH$ e C_6H_5 - $^{12}COOH$. Como já foi dito acima, a ligação ^{12}C - ^{14}C é a mais estável e portanto, pode-se esperar que durante a fase inicial da reação, haverá um enriquecimento de $^{12}CO_2$ no meio, quando comparada à atividade específica do carbono marcado no ácido benzóico. A medida que a reação se completa, o reagente(que é o ácido benzóico) se enriquecerá relativamente com as moléculas marcadas; consequentemente, o CO_2 produzido apresentará uma atividade específica maior do que o carbono do material de origem. Entretanto, quando a reação se completa, a atividade específica do CO_2 será naturalmente igual a do átomo de carbono no ácido benzóico, ou seja, nenhum efeito isotópico foi observado. Isto significa que o efeito isotópico pode ser diminuído ou mesmo ignorado, quando não se trata de reações do tipo intramolecular.

O efeito isotópico tem sido também utilizado na elucidação do mecanismo das reações enzimáticas. Os experimentos são conduzidos de modo tal a fazer com que ocorra um efeito isotópico.

Acetobacter suboxydans oxida D-manitol a D-frutose:





D-sorbitol

Os três átomos de oxigênio, nas posições 1, 2 e 3 têm de estar em configuração correta para que a oxidação tenha lugar. Se um deles trocar, como em D-sorbitol, a enzima não o transformará. Portanto, deve existir alguma espécie de interação ou ligação destes átomos (1, 2 e 3) do açúcar com a molécula enzimática. A pergunta é: haveria uma reação química envolvendo as ligações de valências também nestas posições?

Se carbono 1 ou 3 é marcado com ^{14}C, a oxidação dos compostos isotópicos se dará com a mesma velocidade que a normal. Mas,se o carbono 2 é o isotópico (ou o hidrogênio a ele preso) então a velocidade é grandemente diminuída. Logo, apesar da estereospecificidade nos carbonos 1 e 3, nenhuma reação química terá lugar nessa posição, mas somente alguma forma de fraca união com a enzima. A cisão enzimática da ligação química ocorrerá na posição 2.

6. APLICAÇÕES DA TÉCNICA ISOTÓPICA

Uma vez estabelecido o conceito de estado dinâmico dos constituintes celulares, ou seja, que cada composto em um ser vivo está constantemente sendo sintetizado e degradado, tornou-se de suma importância compreender a sequência de reações que levam a esse equilíbrio. São os passos metabólicos, muitos dos quais, antes do advento do isotópico artificial, tinham sido estabelecidos por métodos de difícil execução e que se tornaram ultrapassados.

Para se ter uma visão geral dos processos metabólicos, basta lembrarmos que o CO_2 atmosférico fixado pelas plantas e outros seres fotossintetizadores, se incorpora em açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídeos e aparece em outros compostos bastante complexos que servem de alimento para os animais, ajudando-os a construirem os seus órgãos e tecidos. Esses compostos continuam suas transformações no corpo do animal e terminam com sua degradação em produtos de excreção. Quase todos esses passos metabólicos foram estabelecidos com o uso de isótopos radioativos ou estáveis.

Os exemplos que escolhemos do uso dessa técnica na elucidação de caminhos metabólicos darão uma visão de como, expressando a atividade específica de diferentes maneiras, chegou-se a estabelecer preferências de vias metabólicas: na realidade são exemplos do uso do método da diluição isotópica discutido anteriormente.

6.1. Atividade específica por mol

O trabalho de Wolf publicado em 1953 tornou-se clássico, pois representou um ponto de partida para outros trabalhos semelhantes.

Histidina-^{14}C foi injetada em animais e o ácido glutâmico foi isolado pelo método da diluição isotópica. Os resultados da Tabela 2, mostram os produtos da degradação química do ácido glutâmico isolado. A Figura 2 por sua vez está indicando que ácido glutâmico é produzido de histidina e, uma vez isolado e purificado, foi

Tabela 2- Degradação de Ácido Glutâmico isolado de Proteínas Viscerais após Injeção de Histidina-^{14}C*

Localização da radioatividade	Atividade específica µc/mmol x 10^{-3}
Ácido Glutâmico	167,5
Ácido Succínico (vindo da degradação de glutamato)	164,0
(CO_2 do-COOH do succinato) x 2	43,2 (26,3%)
Carbonos metilênicos do succinato (calculado)	120,8 (73,7%)

* Dados de Wolf, 1953 (J.Biol.Chem. 200, 637).

CENA
Biblioteca

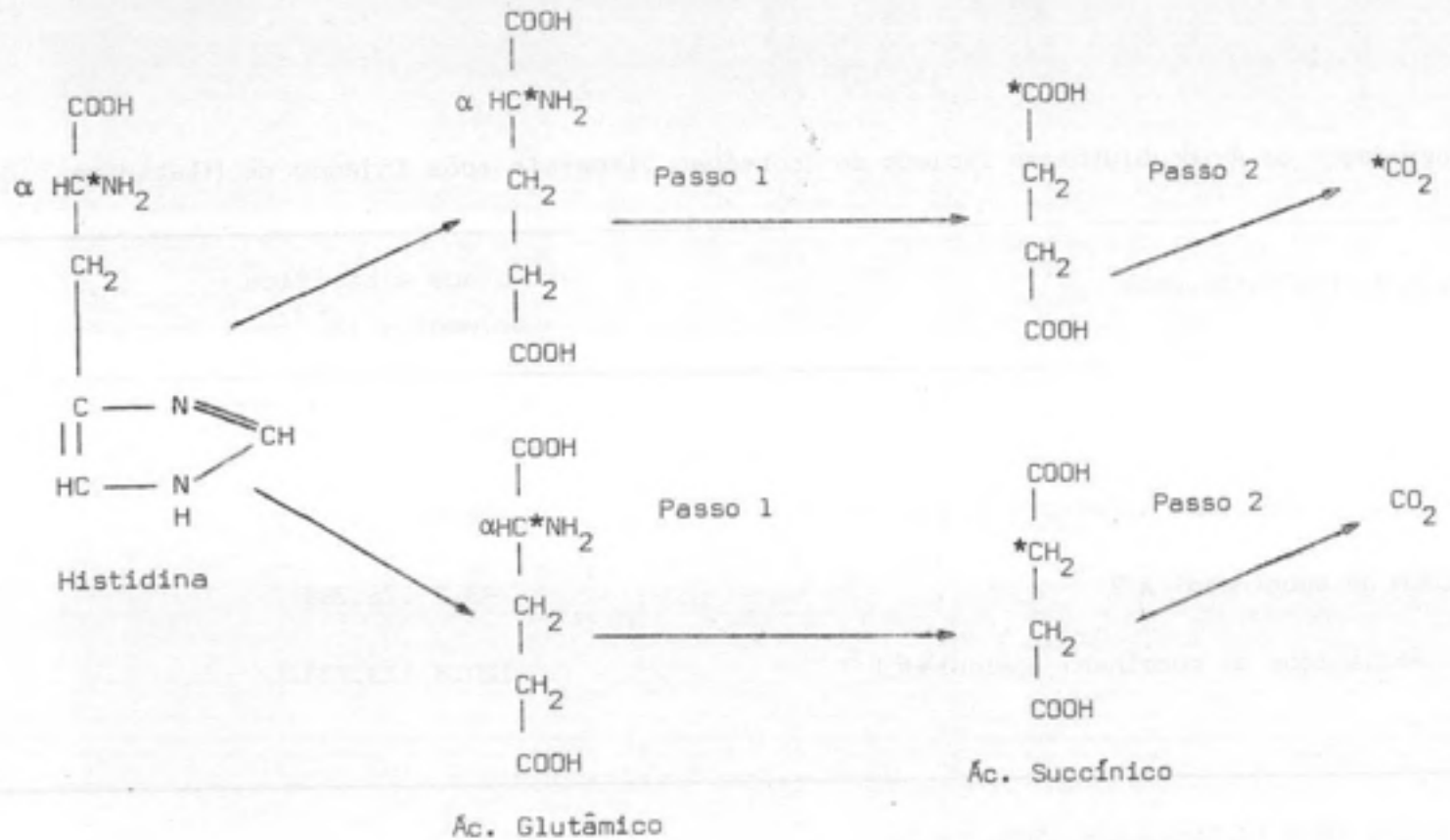


Fig. 2 - Esquemas de degradação química de ácido glutâmico.

degradado quimicamente em ácido succínico e finalmente os seus carbonos aparecem como CO_2. Na Figura 2, a marcação em histidina está no carbono amínico. Qual das vias de transformação bioquímica será seguida, A ou B? A resposta a essa pergunta está na degradação química do ácido glutâmico isolado. Dos dados da Tabela 2 está claro que, em base molar, as atividades específicas dos ácidos glutâmico e succínico são iguais. Isto indica que somente carbono não radioativo foi perdido no passo 1 da degradação. Portanto, mol por mol, toda a radioatividade de ácido glutâmico foi mantida no ácido succínico. No passo degradativo seguinte, um nível muito menor de radioatividade foi detectado no CO_2; consequentemente, a alternativa B não teve lugar, pois nesse caso toda a atividade deveria aparecer no CO_2, o que não aconteceu. A conclusão é de que A é a via preferencial.

Pode-se ir um pouco mais adiante e usar uma outra unidade de atividade específica: concentração relativa de isótopo assim expressa:

$$\frac{\mu c/mol \text{ de composto isolado}}{\mu c/mmol \text{ de composto administrado/grama de peso vivo}}$$

Este modo de expressar os resultados mostra a atividade específica de um produto metabólico isolado em relação a atividade específica de seu precursor, o qual fora administrado ao sistema em estudo. O emprego de "grama de peso vivo" é para diminuir qualquer possível influência do peso do animal.

Essa unidade é bastante útil quando se pretende relacionar precursor/produto em uma sequência metabólica, uma vez que ela revela o grau de diluição do material marcado fornecido ao sistema, pelos compostos não marcados já presentes no mesmo. Além disso, em uma sequência metabólica, quanto mais distante estiver um metabólito de seu precursor, menor será sua concentração relativa isotópica, e portanto maior a diluição de sua radioatividade. É o que mostra o esquema abaixo:

$$X^{***} \rightarrow Y^{**} \rightarrow Z^{*}$$

X*** é o composto marcado fornecido ao sistema.

Y** um metabólito diluído com Y não marcado já presente no sistema.

Z* um metabólito diluído com Z não marcado já presente no sistema.

6.2. Atividade específica por átomos de carbono

A radioatividade de ^{14}C presente em compostos orgânicos pode ser medida transformando-os totalmente em CO_2, por combustão. O material convertido em carbonato de bário, é em seguida colocado em cubetas, as quais são levadas a um contador G-M. Se a camada de carbonato de bário excede à espessura infinita (cêrca de 25mg/cm^2), as radiações β emitidas pelas camadas inferiores do carbonato de bário serão completamente absorvidas (auto absorção) pelas camadas superiores. Não atingirão, portanto, o contador. Desse modo, só o carbonato de bário presente nas camadas superiores será contado, sendo que as contagens registradas serão proporcionais à atividade específica da camada superior, e não à quantidade total de radioatividade da cubeta. Ou seja, a radioatividade do material contido em uma cubeta, com espessura infinita, é proporcional à sua atividade específica. Isso é frequentemente usado em bioquímica e a atividade específica é expressa como cpm/cm^2 na espessura infinita. Note-se que essa atividade diz respeito a átomo de carbono, e não a mol, pois no processo de combustão do material a CO_2, os átomos de carbono não radioativos contribuíram para a formação de CO_2.

Nesse caso, a atividade específica é a média das atividades de todos os átomos de carbono do composto, ou seja, cpm/átomo de carbono. Para convertê-la em cpm/mol do composto, deve-se multiplicá-la pelo número de átomos de carbono presentes na molécula. Assim, o ácido glutâmico tem 5 átomos de carbono. Se ele fosse submetido à combustão daria CO_2 o qual, convertido em carbonato de bário e contado daria, por exemplo, 1000 cpm. Esta contagem diz respeito a cpm/átomo de carbono. Para expressá-la em por mol, basta multiplicar por 5, tendo-se então 5000 cpm/mol.

6.3. Cristalização até atividade específica constante

Um dos casos bioquímicos mais frizantes de aplicação de radioisótopos na elucidação de caminhos metabólicos é o ciclo redutivo de CO_2 durante a fotossíntese.

A fixação de CO_2 por planta foi a primeira aplicação biológica de ^{14}C, em um trabalho clássico realizado na década de 1940 por Ruben e Kamen. Logo depois, o grupo de Calvin iniciou uma série de elegantes e definitivos ensaios, utilizando algas verdes, *Chorella e Scenedesmus*. Essas algas foram mantidas em meio líquido contido em vasos transparentes e iluminadas. $^{14}CO_2$, sob a forma de bicarbonato de bário foi injetado nos vasos e a luz foi apagada. Após os tempos experimentais de incubação pre-estabelecidos, as células de algas foram recebidas em etanol fervente, e o extrato assim preparado foi submetido à análise por cromatografia de papel, seguido de radioautocromatografia. Obteve-se desse modo o modelo de distribuição do radioisótopo entre os constituintes celulares. Em 30 sec de exposição, um grande número de compostos se apresentou radioativos, entre eles açúcares e aminoácidos. Quando a exposição ao $^{14}CO_2$ foi de 5 sec, somente um composto apresentou-se virtualmente com toda a radioatividade administrada. Usando a técnica da diluição isotópica, que discutiremos adiante, esse composto foi identificado como sendo o ácido 3-fosfoglicérico. Separado e quimicamente degradado em compostos derivados dos seus carbonos 1, 2 e 3 a radioatividade foi detectada somente no composto derivado do carbono 1. Naturalmente, o CO_2 livre fora adicionado a algum composto durante a reação de fixação fotossintética, para produzir o ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA). Esse é realmente o primeiro composto a ser formado no ciclo redutivo do CO_2 em plantas C_3 e que é posteriormente convertido em açúcares e aminoácidos.

A conclusão sobre a natureza desse primeiro produto da fotossíntese foi conseguida graças ao método da diluição isotópica: o

material foi obtido em quantidades relativamente grandes de plantas verdes ou de algas, naturalmente em uma forma não radioativa. Uma pequena quantidade sob a forma de sal de bário foi misturada, em solução, com o "desconhecido" radioativo obtido, por sua vez, do material de análise exposto ao $^{14}CO_2$. Essa mistura foi repetidamente cristalizada.

Vamos supor que a mistura de 10 mg de 3-PGA não radioativo e do "desconhecido" radioativo sem peso, apresentasse 20.000 cpm. A atividade específica seria então, 20.000 cpm/10 mg ou 2.000 cpm/mg. Vamos supor, por outro lado, que o "desconhecido" radioativo não fosse 3-PGA. Nesse caso, após a primeira cristalização, o material radioativo não se misturaria com os cristais de 3-PGA, pois somente moléculas idênticas se aderem uma às outras na formação de cristais. Consequentemente, os cristais obtidos na primeira cristalização apresentariam no mínimo uma atividade específica menor do que 2.000 cpm/mg e posteriores cristalizações levariam a uma radioatividade zero no 3-PGA.

Por outro lado, se o "desconhecido" fosse idêntico ao 3-PGA não radioativo, então logo na primeira cristalização, os cristais formados se mostrariam radioativos, e após repetidas cristalizações, atingiriam uma atividade específica constante. Então, existe uma alta probabilidade de que o "desconhecido" e o 3-PGA, não radioativo sejam uma mesma substância. É o que ocorreu; entretanto, outros critérios também foram e devem ser empregados.

6.4. Interpretação dos resultados

A interpretação dos resultados de ensaios em que se utilizam isótopos está sujeita a possíveis falhas, como aliás todos os outros tipos de experimentos. Aqui, porém, as tentações para se tirar conclusões rápidas e "óbvias" são grandes. O pesquisador, como já foi dito anteriormente, deve ter um bom conhecimento do sistema biológico em estudo, a fim de chegar à conclusões sem prejulgamentos.

Um fato histórico serve de exemplo. É o caso do estabelecimento do ciclo de Krebs, o qual é reconhecidamente um dos mais importantes passos metabólicos para a oxidação bioquímica de compostos orgânicos a CO_2 e água. Além disso, o ciclo é também fonte de precursores para a formação de aminoácidos e outros compostos, e portanto, está comprometido nos processos de biossíntese. O ácido cítrico é um dos seus intermediários essenciais. Entretanto, os primeiros experimentos utilizando radiocarbono como marcador de CO_2 e também piruvato não marcado, os quais foram administrados a fatias de fígado, levaram à observação de que o radiocarbono se incorporava no ácido alfa-cetoglutárico, um dos intermediários do ciclo. Concluiu-se que existiria um processo de fixação do CO_2 levando a oxaloacetato marcado ($HOO^*C - CH_2 - CO - COOH$). Este último se converteria a alfa-cetoglutárico, o qual então, no experimento, apareceu radioativo.

Entretanto, quando outros ensaios foram feitos, um passo além foi dado: o ácido alfa-cetoglutárico foi quimicamente degradado, encontrando-se que a marcação estava confinada ao seu grupo carboxilo (C-1). Ora, o ácido cítrico é um composto simétrico e, portanto, o ácido alfa-cetoglutárico derivado do citrato deveria ter o radioisótopo nas suas posições C-1 e C-5:

$$HOO^*C\text{-}CH_2 - CO - COOH + CH_3\,CO - CoA \longrightarrow$$

oxaloacetato-4-*C Acetil-CoA

$$\begin{array}{l} CH_2 - COOH \\ | \\ HOC\text{-}COOH \\ | \\ CH_2 - {}^*COOH \end{array} \quad \rightarrow\rightarrow\rightarrow \quad \underset{5\ 4}{HOO^*C\text{-}CH_2} - \underset{3}{CH_2} - \underset{2\ \ 1}{CO\text{-}{}^*COOH}$$

citrato - 1 - *C alfa-ceto glutarato-1,5-*C

Os resultados pareciam, então, serem discrepantes e fizeram com que os bioquímicos não mais considerassem o ácido cítrico como um intermediário essencial do ciclo de Krebs. Mais tarde contudo,

Ogston postulou que se um substrato se une à superfície de sua enzima através de 3 pontos que são cataliticamente diferente, ele pode passar pelo estágio de um intermediário simétrico (o ácido cítrico), e então ser convertido em compostos assimétricos sem randomização da marcação. Essa concepção pode ser facilmente compreendida em uma representação geométrica na qual o átomo de carbono central do ácido cítrico ocuparia o centro de um tetraedro equilátero (Figura 3). Quando livre, a molécula apresenta planos de simetria e é oticamente inativa. Porém, se antes da reação, 3 grupos da molécula do ácido cítrico, -OH, -COOH e $-CH_2COOH$, se orientarem de modo predeterminado na superfície assimétrica da enzima, unicamente uma das faces do tetraedro a ela se unirá, e então a simetria primitiva deixou de existir. Os dois grupos $-CH_2COOH$ já não se equivalem e um deles fica em posição diferente em relação à enzima. Essa hipótese encontrou confirmação nos trabalhos de Potter e Heidelberger, com $^{14}CO_2$. O gás carbônico radioativo foi incorporado em ácido cítrico em um homogenado de fígado de rato. Isolou-se o ácido que foi purificado por cromatografia e incubado com outro homogenado de fígado de rato. Deste homogenado foi isolado o ácido alfa-cetoglutárico, que foi pu

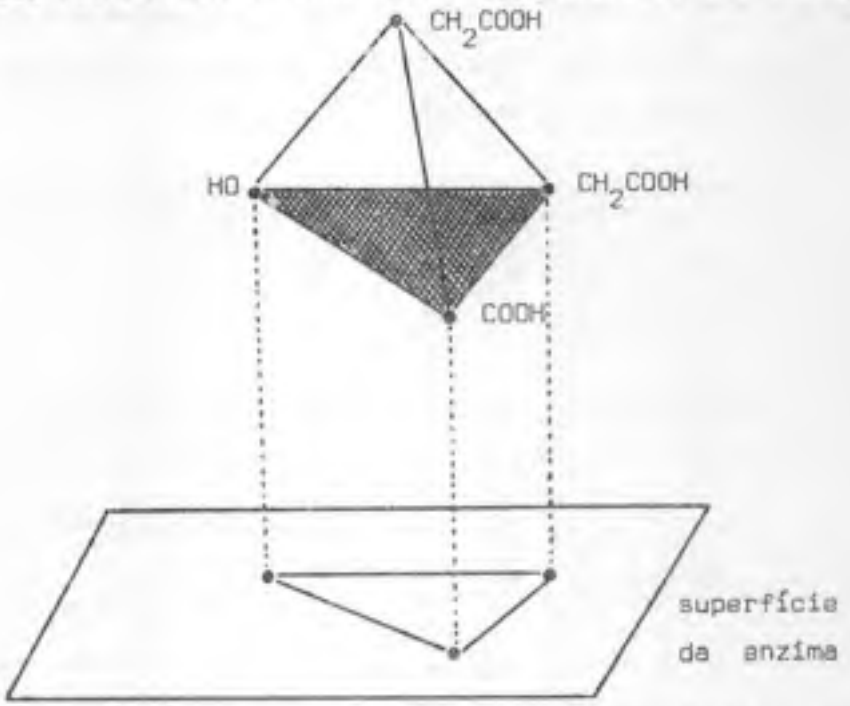
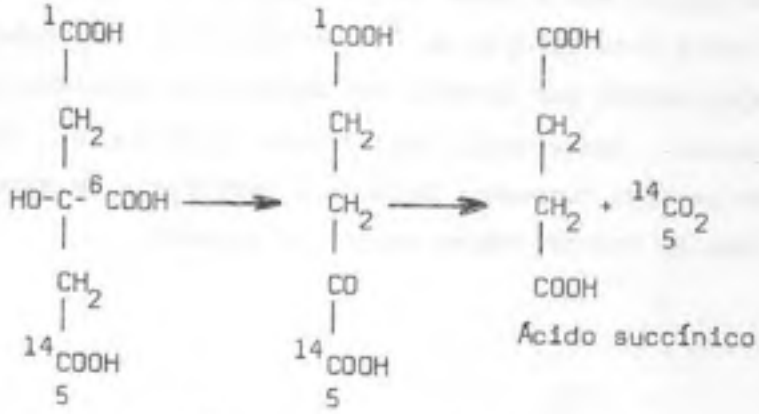


Fig. 3 - Representação da união entre o ácido cítrico e a enzima.

rificado e degradado quimicamente, com produção de CO_2 e ácido succínico. Na equação abaixo, pode-se verificar que os átomos de carbono 1 e 5 não são idênticos quanto à ação da enzima.



Ácido cítrico Ácido alfa-cetoglutárico Ácido succínico

Um outro caso que pose levar à interpretação errôneas, é o fenômeno de randomização muito comum em estudos metabólicos com traçadores isotópicos. O ácido fumárico é uma molécula simétrica. Consequentemente, costuma-se indicar a incorporação de $^{14}CO_2$ em ácido fumárico como sendo nos carbonos 1 e 4:

HOO*C - CH = CH - *COOH

Ácido fumárico

Isto implica em dizer que a marca foi randomizada nos dois grupos atômicos correspondentes, de tal modo que cada um deles teria a metade da radioatividade total. Entretanto, sabe-se que, apesar de o composto parecer ser duplamente marcado, ele na realidade é formado de uma mistura de dois compostos marcados em somente um dos grupos carboxilos:

$$*CO_2 + CH_3 - CO - COOH \rightleftarrows HOO*C - CH_2 - CO - COOH \rightleftarrows$$

piruvato oxaloacetato - 4 - *C

$$HOO*C - CH_2 - CHOH - COOH \rightleftarrows$$

malato - 4 - *C

HOO*C - CH = CH - COOH

e

HOOC - CH = CH - *COOH

fumarato - 4 ou 1 - *C

Finalmente, deve-se ter em mente que nos experimentos com traçadores isotópicos, o pesquisador está seguindo a marca e não o composto administrado. Quando, por exemplo, se fornece acetato-^{14}C a um sistema biológico que é capaz de metabolizá-lo, significa simplesmente que houve incorporação do ^{14}C em compostos bioquímicos. Essa incorporação poderá ser direta, mas poderá ser complexa envolvendo muitos passos. Nesse caso, não se deve dizer que o acetato se converteu em um dado composto, pois isso implicaria em assegurar que tal mecanismo de transformação existe no sistema.

7. CARACTERÍSTICAS BÁSICAS PARA A CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

Os experimentos que fazem uso de traçadores, bem como os que não os utilizam, exigem o mesmo grau de precisão tanto na preparação dos ensaios como na obtenção dos dados analíticos que permitam depois uma interpretação correta. O método traçador requer que o pesquisador esteja familiarizado com o material de estudo e o caráter de problema envolvido. Em outras palavras, o pesquisador irá usar isótopos em seu próprio campo de trabalho.

Os aspectos cinéticos são importantes quando se penetra no domínio dos sistemas biológicos que sempre estão em estado dinâmico. Nesse particular é necessário o conhecimento dos possíveis caminhos metabólicos que um dado composto marcado pode tomar no organismo. Deve-se ponderar o efeito de fatores como a existência de alternativas metabólicas, a extensão da diluição determinada por fontes endógenas, a possibilidade de volta de produtos degradados para o sistema, o grau de variação química dos átomos marcados, e também se o sistema é aberto ou fechado.

Uma existência básica do desenho experimental é o cálculo da quantidade necessária do composto marcado que será utilizada. É justamente este um dos aspectos que discutiremos detalhadamente mais adiante. Por outro lado, a extensão da diluição do radioisótopo no organismo é de suma importância. Esta diluição é primeiramente uma função do tamanho relativo do sistema biológico. Naturalmente, maiores quantidades de traçador serão ministradas a uma árvore do que a um "seedling". Do mesmo modo, células de plantas e animais cultivadas in vitro e de microrganismos em pesquisas com traçadores exigem pequenas quantidades de compostos marcados. Entretanto, quando for difícil a estimativa da extensão da diluição, é preferível usar-se maiores quantidades, levando-se sempre em consideração também o número de amostras.

Todas as considerações acima, são, por sua vez, baseada nos

objetivos do experimento. Por exemplo, quando se pretende medir o $^{14}CO_2$ respirado por um sistema biológico, a quantidade de material será bem menor do que quando, além dessa medida, se desejar também acompanhar a distribuição do radiocarbono em metabólitos, e ainda mais a sua localização nos diferentes grupos atômicos das moléculas isoladas. Naturalmente, além da dose a ser empregada, deve-se levar em conta também a eficiência do sistema de detecção de radioatividade, o que depende do radioisótopo usado. Assim, maiores quantidades serão necessárias para se medir um emissor gama se um tubo G-M é usado do que quando se utiliza um detector de cintilação. É o mesmo caso do ^{14}C: pequenas quantidades são necessárias quando o sistema de detecção é o contador de cintilação para líquidos.

A escala de operações de um dado experimento tendo sido delineada, ou seja, os objetivos, o sistema biológico, a natureza e quantidade (miligramas, milimoles, etc.) do radioisótopo, fica por determinar a atividade específica a ser empregada, e portanto, a radioatividade total que se ministrará ao sistema. Essa determinação depende da técnica do preparo de amostras e do sistema de detecção.

Para se determinar a atividade específica inicial é conveniente calcular a atividade específica que se deseja ter em uma amostra de contagem, ou seja, na coleta dos dados. Uma vez resolvido esse particular, pode-se então, considerar os fatores de diluição envolvidos nos vários passos do experimento, as perdas de radioatividade devido às operações biológicas como excreção (no caso de animais), e outros possíveis fatores, dependendo do sistema em uso. O mais sério fator é o da diluição do traçador com material não marcado. Como medida de segurança considera-se nos cálculos um fator de 2 a 10, para contornar diluições inesperadas.

7.1. Escala de Operações

Como exemplo de um desenho experimental, vamos considerar a utilização de $^{14}CO_2$ por um microrganismo, com o objetivo de acompa-

nhar o seu metabolismo nas células.

O dióxido de carbono radioativo pode ser administrado no estado gasoso em um sistema fechado, ou ser fornecido como $H^{14}CO_3^-$ em solução no meio nutritivo. Após o período experimental, as células são extraídas com um solvente apropriado e os metabólitos são separados por cromatografia de papel de filtro. O ^{14}C poderá ser detectado por autoradiocromatografia ou por "scanning" ou ainda, cortando-se as regiões radioativas dos cromatogramas, eluindo e contando a radioatividade preferencialmente em contador de cintilação de líquidos. A distribuição da radioatividade dos aminoácidos, por exemplo, servirá como elemento para se acompanhar o mecanismo e papel desempenhado pelo CO_2 no metabolismo daquelas células em particular.

A. CARATER GERAL DOS PROBLEMAS

Sabe-se que muitos microrganismos podem produzir CO_2 a partir de seus substratos orgânicos. Por outro lado, há reações bioquímicas nas quais o CO_2 é fixado segundo um esquema de biossíntese. Essa incorporação pode ser seguida em experimentos utilizando dióxido de carbono radioativo. O microrganismo geralmente utilizado para esse tipo de demonstração é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Os seguintes passos fazem parte da execução do experimento:

1. exposição de uma dada quantidade de células de $^{14}CO_2$ gerado no recipiente de reação;
2. remoção do dióxido de carbono residual;
3. separação e hidrólise das células da levedura;
4. cromatografia do hidrolizado;
5. detecção da radioatividade das regiões radioativas dos cromatogramas;
6. determinação do modelo de marcação dos aminoácidos e das quantidades relativas de ^{14}C incorporado nos vários aminoácidos, por comparação dos autoradiocromatogramas.

B. DESENHO EXPERIMENTAL

Ao se estabelecer o desenho experimental, algumas suposições devem ser feitas, baseadas em resultados de trabalhos anteriores com o sistema biológico, no caso a levedura. Como se trata de um ensaio de incorporação de radiocarbono em aminoácidos, a quantidade de ^{14}C a ser utilizada é baseada em uma quantidade fixa de um dado aminoácido, por exemplo o ácido aspártico.

a. Cálculo da atividade específica

1. a quantidade ótima de uma substância em uma mancha de cromatrograma é usualmente estimada como sendo 10 µg;
2. para produzir uma boa imagem em um filme de raios x, em um tempo razoável, que é de 1 semana, uma mancha de 1 cm^2 deverá ter cerca de 100 cpm, quando detectada por um tubo G-M de janela fina, colocado diretamente sobre a mancha;
3. supondo que a eficiência de detecção do G-M é de 10%, e que a amostra de aminoácido no papel tem uma espessura de saturação, isto é, cerca de 25% de transmissão, teremos:

$$\frac{100 \text{ cpm/cm}^2}{0{,}10(\text{eficiência da detecção}) \times 0{,}25(\text{correção de transmissão})} =$$

$= 4000 \text{ dpm/cm}^2$ de mancha

4. desde que cada mancha deve conter o correspondente a 10 µg de ácido aspártico, isso dará uma atividade específica de

$$\frac{4000 \text{ dpm/cm}^2 \text{ de mancha}}{10 \text{ µg/cm}^2 \text{ de mancha}} = 400 \text{ dpm/µg de ácido aspártico}$$

b. Esquema de Operações

1. a quantidade ótima de células de leveduras é, neste experimento,

20 mg de peso seco;

2. supondo que toda a matéria orgânica nessas células possui a mesma atividade específica do $^{14}CO_2$, segue-se que o peso total de compostos orgânicos em questão é igual a:

$$400 \text{ dpm}/\mu g \text{ (atividade específica desejada)} \times 2 \times 10^4 \mu g = 8 \times 10^6 \text{ dpm}$$

esta é a atividade total nas células de levedura;

3. é provável, entretanto, que de acordo com o que se sabe sobre o processo de fixação de CO_2, somente uma parte dos compostos orgânicos nessas células se tornem marcados algumas horas após a incorporação de $^{14}CO_2$. Pode-se grosseiramente supor que somente 10% dos compostos celulares ficarão preferencialmente marcados. Consequentemente, a atividade total acima calculada será reduzida para 8×10^5 dpm;

4. pode-se também dizer que somente uma pequena porção do $^{14}CO_2$ fornecido será fixado pelas células, pois os experimentos que têm sido realizados indicam que 1% da atividade total administrada é realmente fixada. Deve-se então usar:

$$\frac{8 \times 10^5 \text{ dpm}}{0{,}01 \text{ (fração da atividade fixada)}} = 8 \times 10^7 \text{ dpm } ^{14}CO_2$$

Esta será a atividade utilizada neste experimento particular.
Ou seja:

$$\frac{8 \times 10^7 \text{ dpm}}{2{,}2 \times 10^6 \text{ dpm}/\mu c} = 36 \mu c$$

5. o carbono será fornecido sob a forma de $Ba^{14}CO_3$ e então torna-se agora necessário o cálculo do número de miligramas desse composto radioativo que será utilizado. Para tanto, tem-se de saber a atividade específica do $Ba^{14}CO_3$ original, a qual é fornecida pela fonte de produção (um laboratório produtor). Vamos supor, entretanto, que o composto radioativo que temos em mãos tem um conteúdo isotópico de 40%. Isto quer dizer que na nossa amostra de carbono de bário, 40%

está sob a forma de $Ba^{14}CO_3$, sendo o restante como $Ba^{12}CO_3$ e $Ba^{13}CO_3$. A atividade específica expressa em milicuries por milimol (mc/mmol) pode ser então calculada.

A velocidade de desintegração de 1 mol de carbonato de bário contendo 40% de $Ba^{14}CO_3$ será:

$$-\frac{dN}{dt} = N_o$$

ou seja:

$$\frac{0,693}{5570 \text{ (anos)} \times 365 \text{ (dias)} \times 24 \text{ (hr)} \times 60 \text{(min)} \times 60 \text{ (sec)}} \times 0,4$$

(conteúdo isotópico) x $6,02 \times 10^{23}$ (número de Avogadro)

$= 9,51 \times 10^{11}$ dps ou 25,7 curies/mol

A atividade específica será então:

25,7 mc/mmol ou 0,130 mc/mg de $Ba^{14}CO_3$.

Finalmente, para os 36 µc de radioatividade de ^{14}C exigidos no experimento, se necessitará de:

$$\frac{36 \text{ µc de } ^{14}C}{130 \text{ µc/mg } Ba^{14}CO_2} = 0,27 \text{ mg de } Ba^{14}CO_3 \text{ (40\% de conteúdo isotópico)}$$

8. RELAÇÕES PRECURSOR-PRODUTO

Os bioquímicos se interessam muito mais pelo destino químico de um composto do que em sua distribuição anatômica, se bem que ambos são muito importantes em seu papel fisiológico total.

Para se seguir a incorporação de uma "marca" em constituintes macromoleculares de um sistema, usa-se um processo bastante comum na separação de material biológico, ou seja, separação nas frações "solúvel em ácido" e "insolúvel em ácido". Os ácidos geralmente empregados são o ácido tricloacético a 5% e o ácido perclórico 0,2 M, que precipitam a maioria das macromoléculas. O filtrado ou o sobrenadante obtido nas precipitações é chamado "fração solúvel em ácido". Desse modo o composto marcado pode ser injetado em animais ou plantas e amostras serem colhidas em vários intervalos de tempo e analisadas para os compostos que se deseja estudar.

Durante as análises pode-se encontrar por exemplo muita radioatividade na fração insolúvel em ácido; ou então muito pouca ou nenhuma. Se a quantidade é pequena, porém crescente, deve-se planejar um outro ensaio no qual a coleta de dados se fará em intervalos mais longos. Se por outro lado, uma quantidade considerável de radioatividade está presente na fração insolúvel em ácido,deve-se realizar outros ensaios onde se utilizem precipitantes mais suaves e técnicas de fracionamento mais apuradas a fim de se determinar que compostos particulares se tornaram marcados.

Usualmente as pequenas moléculas permanecem intactas quando tratadas com ácidos tricloroacético ou perclórico, e portanto a fração solúvel em ácido pode ser submetida a posterior separação, por exemplo, cromatográfica. Neste caso, a radioatividade pode ser encontrada em alguns ou em muitos compostos, e as atividades provavelmente variarão com o tempo.

Uma vez estabelecido que há compostos radioativos no material de estudo, deve-se voltar a atenção para a sequência de even-

tos que ocorreram após o fornecimento do composto marcado, eventos esses que devem estar acontecendo durante todo o tempo - ou seja,os passos metabólicos.

Vamos supor que, tendo-se fornecido um composto radioativo M, detectou-se alta radioatividade no composto solúvel em ácido T, e que mais tarde muita da radioatividade fornecida foi encontrada em Z. Pode-se supor que ocorreu a seguinte transformação:

$$M \rightarrow T \rightarrow Z$$

Deve-se é claro, considerar que M produziu também outros compostos diferentes de T; o mesmo se deve dizer de T em relação a Z. Isso quer dizer que uma coisa é supor que uma sequência exista e outra é provar a sua ocorrência. Os métodos isotópicos tem sido de grande utilidade na elucidação das relações precursor produto.Assim, vamos supor que fornecemos a um material biológico uma quantidade de M*(radioativo) insignificante em relação à quantidade de M (não radioativo) já existente no meio. A radioatividade de M deverá ser suficiente para ser detectada, mesmo após alguma diluição.

Quando M^{*} entra neste sistema supostamente constante em tamanho, se misturará de início com moléculas de M já existentes, o que produzirá uma atividade específica menor do que a do composto fornecido. Ou seja, M* passou a fazer parte do "pool" metabólico.

> Um "pool" é considerado como sendo um conjunto de substâncias químicas semelhantes, em equilíbrio entre si, presente em um organismo. O "pool" pode ser enriquecido seja com substâncias externas ao organismo,seja com produtos da degradação dos tecidos.

A medida que o tempo transcorre, a atividade específica de M* decresce, o que pode ser devido a duas causas: a remoção de M (inclusive algumas moléculas de M*) e à substituição de M por mate

rial não marcado. Desse modo o tamanho do "pool" permanece constante. Se, em intervalos a partir do fornecimento de M*, o mesmo é isolado do sistema em estudo, por exemplo, da fração solúvel em ácido, e sua atividade específica for determinada, obtém-se um gráfico como o da Figura 4.

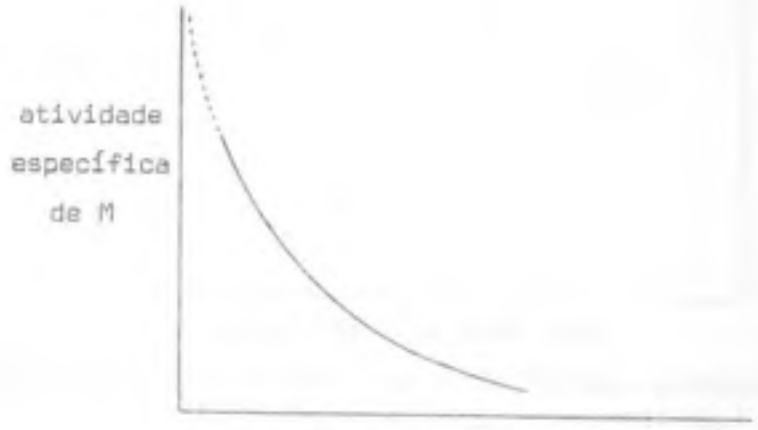


Figura 4 - Atividade específica de um composto em função do tempo

Consideremos algumas características dessa curva. Assim, foi feita uma extrapolação, obtendo-se um intersepto com a ordenada, o que é estritamente correto, pois no mdmento imediatamente anterior à administração do traçador a atividade específica de M era zero. Ainda, mesmo que tenha ocorrido uma mistura muito rápida haverá um intervalo até que a atividade específica possa atingir seu valor máximo e então diminua.

Por outro lado, conforme sabemos a atividade específica decresce com o tempo, como resultado da síntese de novas moléculas de M (que diluirão M*) e da própria remoção de M. Esta remoção pode ser por excreção, transporte a outro local, ou conversão a outras substâncias. Se a radioatividade total do sistema permanece constante, não se considera a excreção como via significante de remoção.

A forma da curva é uma terceira característica. É idêntica por exemplo, à obtida quando se estuda o desaparecimento de substra

to sob cinética de 1a. ordem, e à curva de desintegração radioativa. Desse modo, o gráfico do logarítimo da atividade específica de M em função do tempo, será uma linha reta (Figura 5).

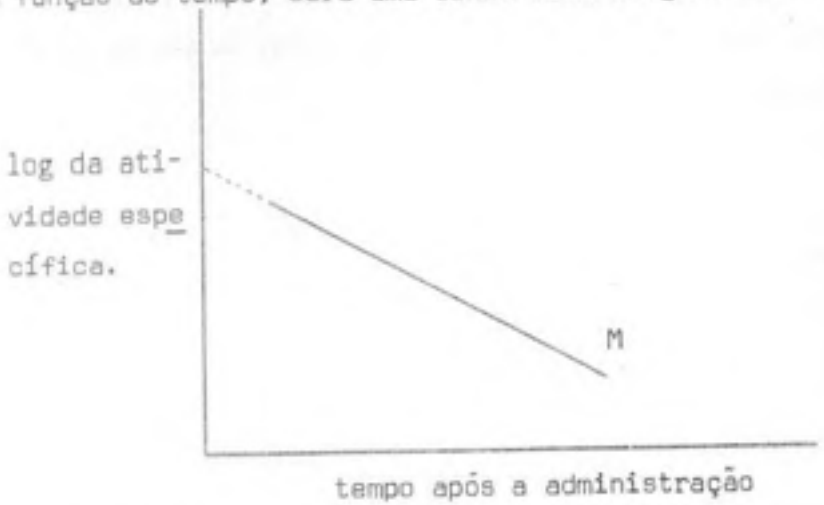


Figura 5 - Atividade específica de um composto expressa em termos de logarítmo.

Consideremos agora o destino de M. Se M está sendo realmente convertido em T, a atividade específica de T aumentará enquanto a de M decrescerá. Em um determinado ponto, as atividades específicas de ambos serão iguais, ou seja, as curvas das atividades específicas se cruzarão (Figura 6).

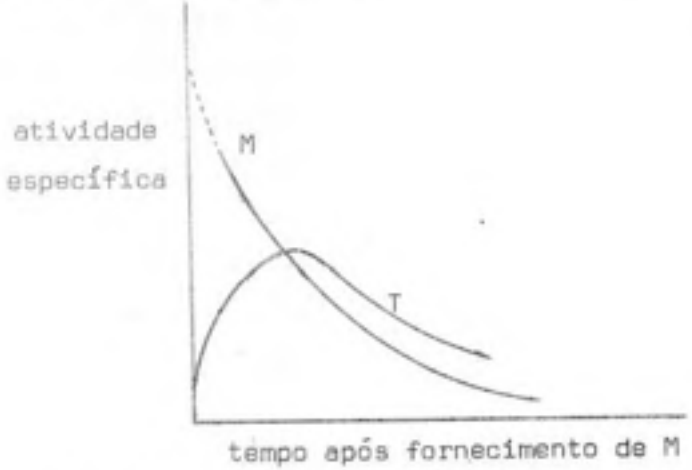


Figura 6 - Transformação de M em T

Por outro lado, se T está sendo removido, por exemplo por

conversão em Z, e substituído, sua atividade específica diminuirá, se bem que continuará a ser maior do que a de M. A Figura 6 mostra essas relações; as suas curvas são as clássicas para a representação das atividades específicas de um produto (T) e seu precursor imediato (M). Note-se que as curvas se cruzam quando a atividade de M está em seu máximo.

Se T é o precursor imediato de Z, curvas semelhantes deverão ser obtidas. Assim, se em intervalos após a administração de M nós isolamos T e Z, deveremos encontrar atividades específicas que variam de acordo com a Figura 7.

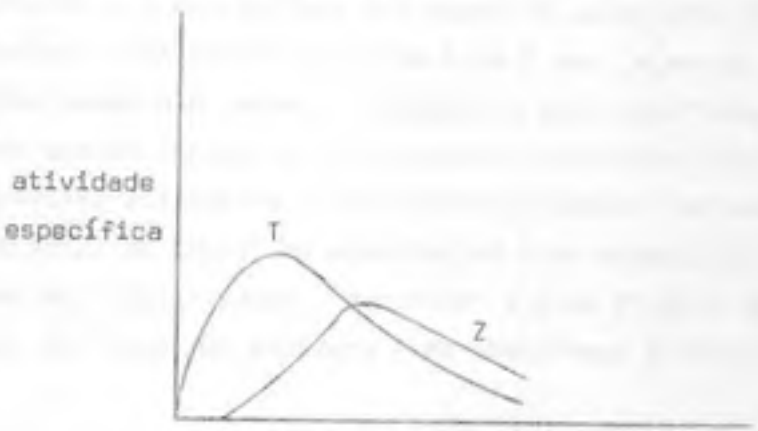


Figura 7 - Transfiguração de T em Z

Note-se que as curvas se cruzam quando as atividades específicas de T são máximas. Um exame cuidadoso das curvas de atividades específicas para T nas Figuras indicadas, mostrará que, após atingir o seu máximo, a atividade específica de T decrescerá logaritimicamente, e portanto, o gráfico do log da atividade específica contra o tempo será uma linha reta.

Se ocorreu considerável diluição, como por exemplo, M foi convertido em muitos outros compostos além de T - as atividades medidas podem ser baixas e a curva estará sujeita a erros. Também se as atividades específicas de T e Z forem semelhantes, será difícil

estabelecer relações entre ambos. Nesses casos, deve-se repetir o ensaio fornecendo-se, porém, T marcado. T* introduzido no sistema produzirá dados que deverão ser analisados logaritmicamente, cujas retas deverão ter uma inclinação idêntica à determinada por uma reação de primeira ordem, já que quando a atividade específica decresce logaritmicamente, o processo é de 1a. ordem.

A partir da reta obtida, pode-se calcular a meia-vida de T, o que nos leva à pergunta: esta meia-vida tem algum significado além do matemático ? A resposta está baseada sobre a nossa compreensão do metabolismo de T. Senão, vejamos: administrando-se M ou T, as medidas em intervalos de tempo nos mostram que T é continuamente substituido, ou seja, que T está sofrendo "turnover". Portanto, sua meia-vida é uma "meia-vida biológica" ou seja, é o tempo exigido para remover (por conversão, transporte ou excreção) metade das moléculas marcadas de T presente neste "pool" metabólico particular. Esta meia-vida biológica está relacionada ao "tempo de turnover" ou seja, o tempo exigido para o "turnover" (substituição) de uma quantidade de T igual à quantidade de T presente no "pool" em qualquer momento.

Podem ocorrer casos nos quais a atividade específica não decresce na maneira ideal representada pela linha sólida da Figura 8, ou seja, a inclinação da linha pode não ser constante, mas apresentar-se como a linha interrompida. Neste caso, diz-se que há mais de um "componente".

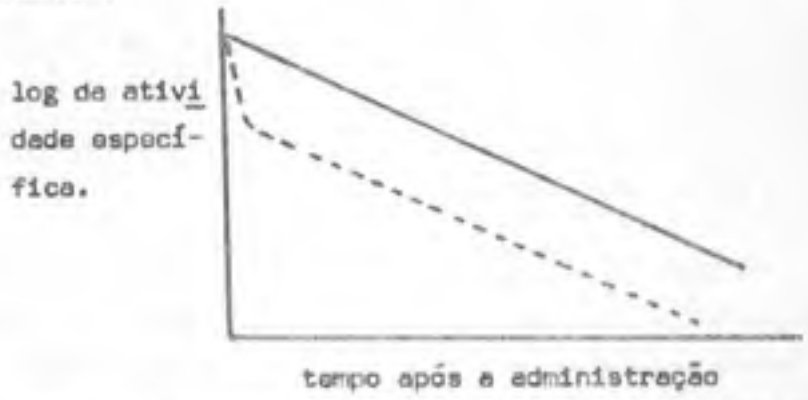


Figura 8 - Presença de mais de um "componente" em uma sequência bioquímica.

Este fenômeno é em geral observado após a injeção intravenosa de compostos marcados, como proteína, colesterol, etc. Nestes casos deve-se verificar se toda a marcação estava presente num mesmo composto. Se tal não for comprovado, uma explicação para a presença de dois componentes pode ser a de que dois compostos marcados foram introduzidos e cada um tinha seus "tempo de turnover" característicos no sistema; ou então, a de que mais de um "pool" da substância pode estar comprometido.

Neste ponto, deve-se enfatizar que a técnica de traçadores representa somente um instrumento de trabalho. É claro que uma vez estabelecida a relação precursor/produto, outros métodos como os de enzimologia e processos de separação deverão ser usados para corroborar os dados encontrados.

Dependendo da informação que se deseja e material experimental, há vários métodos que tem sido utilizados para introduzir um traçador num sistema. Um deles é chamado "método do pool constante". Nesse método, o composto marcado será continuamente adicionado ou, se isso for impossível, fornecido em várias doses, ou em uma única, porém, grande dose; desse modo mantém-se um "pool" precursor aproximadamente constante quanto à atividade específica. Pode-se, então, medir a intensidade com que os produtos formados a partir do precursor, aumentam sua atividade específica.

Em contraste, o processo acima - fornecimento do precursor M, ou do intermediário T - consistia na introdução de uma pequena dose de composto marcado durante um breve intervalo de tempo, ou seja, forneceu-se um "impulso" de composto marcado ao sistema. Este processo em muitos casos pode apresentar certa dificuldade, principalmente quando se consideram as últimas reações em uma sequência metabólica, uma vez que o precursor marcado pode continuar a ser incorporado durante um determinado período de tempo. Em tais condições é interessante diluir-se a atividade do precursor inicial, de tal modo que a radioatividade não continue a ser adicionada aos in-

termediários iniciais. É a técnica do "pulse-chase": o impulso inicial do precursor radioativo é seguido, após um determinado intervalo, pela administração de uma dose considerável de precursor não marcado.

9. PROBLEMAS PRÁTICOS

1. O ^{45}Ca tem uma meia vida de 163 dias. Calcular:

a) constante de desintegração (λ) em termos de dias^{-1}, sec^{-1} e

b) a porcentagem de radioatividade remanescente numa amostra depois de 90 dias.

Solução:

a) $\lambda = \frac{0,693}{t^{1/2}} = \frac{0,693}{163 \text{ dias}} = 4,26 \times 10^{-3} \text{ dias}^{-1}$

$$\lambda = \frac{0,693}{163 \text{ dias} \times 24 \text{ hs} \times 60 \text{ min} \times 60 \text{ sec}} = 4,92 \times 10^{-8} \text{ sec}^{-1}$$

b) $2,3 \log \frac{No}{N} = \lambda t$

Fazendo No = 100%

$$2,3 \log \frac{100}{N} = (4,26 \times 10^{-3}) \times 90 = 0,384$$

$$\log \frac{100}{N} = \frac{0,384}{2,3} = 0,167$$

$$\log 100 - \log N = 0,167$$

$$\log N = \log 100 - 0,167$$

$$\log N = 2 - 0,167$$

$$\log N = 1,833$$

portanto,

$$N = 68,1\%$$

CENA
Biblioteca

2. O ^{14}C tem uma meia vida de 5.700 anos. Calcular:

a) a fração de átomos de ^{14}C que se desintegra por ano e

b) a atividade específica do ^{14}C puro em dpm/g, curies/g e em curies/átomo grama.

Solução:

a) $\lambda = \frac{0,693}{5.700} = 1,215 \times 10^{-4}$ anos^{-1}

$$\frac{dN}{N} = \lambda dt$$

$$\frac{dN}{N} = (1,215 \times 10^{-4}) \times 1 = 1,215 \times 10^{-4}$$

Isto é, $1,215 \times 10^{-4}$ átomos por átomos se desintegram em um período de 1 ano.

Ou ainda, $\frac{1}{1,215 \times 10^{-4}} = 0,823 \times 10^{4} = 8,23 \times 10^{3}$

Ou seja: um átomo em cada 8230 átomos radioativos se desintegra por ano.

b) $\lambda = \frac{0,693}{5700 \times 365 \times 24 \times 60} = 2,32 \times 10^{-10}$ min^{-1}

$$dpm = \frac{dN}{dt} = \lambda N$$

onde N = número de átomos de carbono em 1g de ^{14}C

$$1g\,^{14}C = \frac{1}{14} = 0,0714 \text{ atmos grama}$$

$$N = 0,0714 \times 6,023 \times 10^{23} = 4,3 \times 10^{22} \text{ atmos/g}$$

$$\lambda = \frac{0,693}{1,3 \times 109 \times 365 \times 24 \times 60} = 1,014 \times 10^{-15}\ min^{-1}$$

$$dpm = -\frac{dN}{dt} = \lambda N$$

$$dpm = 1,014 \times 10^{-15} \times 4,75 \times 10^{20} = 4,82 \times 10^{5}\ dpm$$

Como

$1\ c \rightarrow 2,22 \times 10^{6}$ dpm

$x \leftarrow 4,82 \times 10^{5}$ dpm

$$x = \frac{4,82 \times 10^{5}}{2,22 \times 10^{6}} = 0,217\ \mu c$$

6. Um frasco contém 1 mc de L-fenilalanina-^{14}C (uniformemente marcada) em 2,0 ml de solução. A atividade específica do material é de 150 mc/mmol. Calcular:

a) a concentração de fenilalanina na solução.

b) a atividade da solução em termos de cpm/ml a uma eficiência de contagem de 80%.

Solução:

a) 150 mc → 1 mmol

1 mc (2,0 ml) → x

$$x = \frac{1}{150} = 0,00667\ mmol/2,0\ ml$$

0,00667 mmol → 2,0 ml

y ← 1000 ml

$$y = \frac{0,00667 \times 1000}{2,0} = 3,335\ mm/litro$$

ou $3,335 \times 10^{-3}$M

b) 1 c = $2,22 \times 10^{12}$ dpm

1mc = $2,22 \times 10^{9}$ dpm

atividade em 2,0 ml = $0,80 \times 2,22 \times 10^{9}$ cpm

atividade em 1,0 ml da solução = $\frac{0,80 \times 2,22 \times 10^{9}}{2}$ =

= $8,88 \times 10^{8}$ cpm/ml

7. Descreva a preparação de 100 ml de uma solução de L-metionina-^{35}S $10^{-2}N$ na qual o aminoácido tenha uma atividade específica de $1,5 \times 10^{5}$ dpm/µMol. Dispõe-se de uma solução de L-metionina não marcada de concentração 0,1 M e uma solução estoque de L-metionina-^{35}S (30 mc/mMol) com 1 mc/ml.

Solução:

Quantidade de radioatividade necessária:

10^{-2}M = 10 µmoles/ml

10 µmoles/ml x 1000 ml = 1000 µmoles

1000 µmoles x $1,5 \times 10^{5}$ dpm/µmole = $1,5 \times 10^{8}$ dpm

Quantidade da solução estoque radioativa para fornecer $1,5 \times 10^{8}$ dpm:

1 mc → $2,22 \times 10^{9}$ dpm

x ← $1,5 \times 10^{8}$ dpm

$x = \frac{1,5 \times 10^{8}}{2,22 \times 10^{9}} = 0,675 \times 10^{-1}$ mc

Como 1 ml contém 1 mc, o volume a ser tomado será de $0,675 \times 10^{-1}$ ml ou

67,5 µl

Quantidade de L-metionina que é levada juntamente com os 67,5 µl da solução radioativa.

1 mmol → 30 mc

x ← 1 mc (1 ml)

$$x = \frac{1}{30} = 0{,}0333 \text{ m moles/ml}$$

0,0333 m moles → 1 ml

y ← 0,0675 ml (67,5 µl)

y = 0,033 x 0,0675 = 2,25 µmoles

Geralmente a quantidade de L-metionina adicionada (2,25 µm) ao se tomar as $1{,}5 \times 10^8$ dpm é tão pequena ao se comparar com o total (1000 µmoles) que pode ser desprezada. Neste caso a solução radioativa estoque é considerada como sendo "carrier-free", isto é, como se contivesse somente radioatividade e nenhuma massa.

Toma-se então, 67,5 µl da solução estoque de L-metionina-^{35}S, adiciona-se 10 ml de solução 0,1 m de L-metionina não radioativa e completa-se o volume a 100 ml com água. Se houver necessidade de um rigor absoluto na concentração, toma-se então 9,978 ml de L-metionina não marcada, pois dessa solução 2,25 µM corresponde a um volume de 0,0225 ml.

8. Glucose-1-fosfato-^{14}C (uniformemente marcada, de atividade específica igual a 16,000 cpm/µmol) foi incubada com glicogenio em presença de um extrato livre de células contendo a enzima fosforilase. Radioatividade foi incorporada no glicogênio "primer" a velocidade inicial de 2550 cpm/min.

a) Calcular a velocidade da reação enzimática em termos de µmoles de glucose incorporada por minuto.

b) Calcular a velocidade em termos de µmoles/litro - minuto supondo o volume de reação igual a 0,2 ml.

c) Calcular a velocidade em termos de µmoles/mg proteína - minuto

supondo conter a mistura de reação 0,35 mg de proteína.

Solução:

a) $v = \frac{2550 \text{ cpm/min}}{16.000 \text{ cpm/µmol}} = 0{,}159 \text{ µmol/min}$

b) $v = \frac{0{,}159 \text{ µmol/min}}{0{,}2 \times 10^{-3} \text{l}} = 795 \text{ µmol/l-min}$

c) $v = \frac{0{,}159 \text{ µmol/min}}{0{,}35 \text{ mg prot.}} = 0{,}454 \text{ µmol/mg proteína-min}$

9. Uma planta cresceu em uma atmosfera contendo $^{14}CO_2$ (3 x 10^8 cpm/µmol). Após várias semanas um extrato de fôlhas foi preparado para a determinação de glucose-1-P pela técnica da diluição isotópica. Adicionou-se 1,5 mMol de glucose-1-P não marcada em 20 ml de extrato. Uma pequena quantidade de glucose-1-P foi reisolada do extrato e recristalizada em etanol até atividade específica constante de 2,6 x 10^5 cpm/µmol. Calcular a concentração de glucose-1-P marcada no extrato original. Supondo que todos os átomos de carbono da planta tenham a atividade específica de 3 x 10^8 cpm/átomo µ grama e sendo a glucose constituída por 6 átomos de carbono, a sua atividade específica seria de:

$$6 \times 3 \times 10^8 = 18 \times 10^8 \text{ cpm/µmol}$$

Seja x a quantidade de glucose (µmol) no extrato, teríamos após a adição de glucose-1-P:

$$(x + 1.500) \text{ µmoles}$$

A atividade total do extrato seria de:

$$(18 \times 10^8 \text{cpm/µmol}) \quad (x \text{ µmol}) = (18 \times 10^8) \quad (x \text{ cpm})$$

Logo:

(18×10^8) (x cpm) → (x + 1.500) µMoles

$2{,}6 \times 10^5$ cpm ← 1 µMol

$(18 \times 10^8)\, x = 2{,}6 \times 10^5\, (x + 1.500)$

$(18 \times 10^8)\, x = (2{,}6 \times 10^5)\, x + (2{,}6 \times 10^5 \times 1.500)$

$(18 \times 10^8)\, x - (2{,}6 \times 10^5)\, x = 2{,}6 \times 10^5 \times 1.500$

$x\, (18 \times 10^8 - 2{,}6 \times 10^5) = 3{,}9 \times 10^8$

$x\, (18.000 \times 10^5 - 2{,}6 \times 10^5) = 3{,}9 \times 10^8$

$10^5 . x . (18.000 - 2{,}6) = 3{,}9 \times 10^8$

Desprezando-se a parcela 2,6 em relação a 18.000, teremos

$10^5 . x . 18.000 = 3{,}9 \times 10^8$

$$x = \frac{3{,}9 \times 10^8}{10^5 . 18.000} = 0{,}217 \text{ µMoles}$$

0,217 µMoles → 20 ml

y ← 1000 ml

$$y = \frac{0{,}217 \times 1000}{20} = 10{,}85 \text{ Moles/l}$$

ou

$y = 1{,}085 \times 10^{-5}$ M

10. 6 µc de L-leucina (uniformemente marcada, 4 mc/mMol) foi ministrado a 5 g de plantas. No ensaio os 2 tratamentos foram plantas normal e deficiente em potássio, nas quais os teores de L-leucina são 1,5 e 2,5 µMoles/g, respectivamente. As frações proteicas de ambos os tratamentos, normal e deficiente, foram isoladas, apresen-

tando 180.000 e 66.000 dpm, respectivamente. O tempo de incubação foi de 24 horas. Calcular a velocidade de síntese de proteína expresso em µM de L-leucina incorporados por grama de planta por hora.

Quantidade de leucina presente nas 5 g de material vegetal:

normal: 5 g x 1,5 µM/g = 7,5 µM

deficiente: 5 g x 2,5 µM/g = 12,5 µM

Quantidade de leucina adicionada ao se ministrar 6 µc de leucina-^{14}C

4 mc → 1 mM

4 µc → 1 µM

6 µc → x

$$x = \frac{6}{4} = 1,5 \text{ µM}$$

Quantidade total de leucina nas 5 g de plantas que se diluiram com 6 µc de leucina-^{14}C:

normal: 7,5 + 1,5 = 9 µM

deficiente: 12,5 + 1,5 = 14 µM

Quantidade de leucina incorporada:

planta normal: 180.000 dpm → x

6 µc X 2,2 x 10^6 dpm/µc → 9 µM

$$x = \frac{180.000 \times 9}{6 \times 2,2 \times 10^5} = 0,12 \text{ µM}$$

planta deficiente: 66.000 dpm → y

6 X 2,2 x 10^6 → 14 µM

$$y = \frac{66.000 \times 14}{6 \times 2,2 \times 10^6} = 0,07 \text{ µM}$$

Velocidade de síntese:

$$\text{normal: } v = \frac{0{,}12\ \mu M}{24\ h \times 5\ g} = 10 \times 10^{-4}\ \mu M/\text{hora - grama}$$

$$\text{deficiente: } v = \frac{0{,}07\ \mu M}{24\ h \times 5\ g} = 5{,}83 \times 10^{-4}\ \mu M/\text{hora - grama}$$

11. 2 µc de uréia-^{14}C (50 mc/mM) foram adicionados a uma preparação enzimática contendo atividade de urease. O volume final da mistura de reação foi de 5 ml contendo 2 mg de proteína. O CO_2 liberado após 30 min de reação foi recolhido em "hyamine" cuja radioatividade forneceu 26.640 cpm a 60% de eficiência de contagem. Calcular:

a) a atividade de enzima em termos de M de CO_2 liberados por hora por mg de proteína.

b) a porcentagem de radioatividade da radioatividade original que se desprendeu como $^{14}CO_2$.

Solução:

a) $\frac{26.640\ cpm \times 100}{60} = 44.400\ dpm$

$$\frac{44.400\ dpm}{2{,}22 \times 10^{6}\ dpm/\mu c} = 0{,}02\ \mu c$$

50 mc → 1 mm

50 µc → 1 µM

0,02 µc → x

$x = \frac{0{,}02}{50} = 4 \times 10^{-4}$ µMoles de uréia que foram hidrolisados, ou µM de CO_2 formados.

Atividade = 4×10^{-4} µM por 30 min por 2 mg proteína.

$$At. = \frac{4 \times 10^{-4} \times 2 \times 10^{3}}{2} = 0,8 \text{ µM/h - grama}$$

b) 2 µc → 0,02 µc

100 → z

$$z = \frac{100 \times 0,02}{2} = 1\%$$

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Apresentamos aqui alguns livros que recomendamos aos nossos leitores para aprofundamento nos assuntos tratados neste trabalho.

CROCOMO, O.J., A.B.GUSMAN e L.C.BASSO, 1967 - Fundamentos de metodologia de radioisótopos. CENA, ESALQ, USP.

FINLAYSON, J.S., 1969 - Basic biochemical calculations. Addison-Wesley Publ. Co., USA, págs. 226-279.

HARVEY, B.G., 1967 - Química Nuclear, Prentice-Hall, Inc.; tradução brasileira da Ed. E.Blucher Ltda., SP.

SEGEL, I.H., 1968 - Biochemical calculations, John Wiley & Sons, Inc., N.Y. - págs. 279-302.

SHEPPARD, C.W., 1962 - Basic principles of the tracer method. John Wiley & Sons, Inc., N.Y.

WOLF, G., 1964 - Isotopes in biology. Acad. Press Inc., N.Y.

WANG, C.H. e D.L.WILLIS, 1965 - Radiotracer methodology in biological Sciences, Prentice-Hall, Inc., N.Y.