

11. QUÍMICA

ISÓTOPOS EM BIOQUÍMICA

Ainda há poucos anos, o bioquímico viu-se diante de um problema quase irresolúvel, querendo seguir, no organismo vivo, as trocas e transformações metabólicas das substâncias alimentícias ingeridas. Confundem-se estas com os constituintes da célula viva, perdendo-se a sua pista antes da eliminação dos seus derivados, já inúteis para a economia material e energética do organismo. Revelaram-se insuficientes os métodos analíticos da bioquímica estática, grosseira a determinação de números globais, como sejam o balanço nutritivo, e do cociente respiratório. Para distinguir matérias endógenas, para identificar e dosear os produtos intermediários do metabolismo, que desaparecem tão rapidamente como se formam, em quantidades mínimas, num laboratório cujos recipientes não são de vidro, recorreu-se ainda a várias técnicas, nem sempre isentas de objecções justificadas: O método de estudar sistemas simplificados — a profusão dos órgãos isolados e os cortes de tecidos são exemplos desta técnica — não toma em consideração a multiplicidade e a coordenação das reacções biológicas, e as experiências com sistemas alterados lesam as condições fisiológicas. Sobrecarregando, por exemplo, o organismo com determinadas substâncias bioquímicas, para seguir o seu caminho pela acumulação dos seus derivados metabólicos, o bioquímico quase se torna patologista.

Para evitar estes inconvenientes, os bioquímicos procuraram métodos que permitissem assinalar as substâncias ingeridas, em qualquer altura, mediante *indicadores que marcassem* os bioelementos sem alterar as condições fisiológicas pela introdução de corpos estranhos.

A introdução de grupos — NO_2 nos ácidos orgânicos, a aplicação de corantes estranhos

ao organismo, foram apenas tentativas neste sentido que deram resultados isolados e comprometidos pelas objecções apontadas.

O passo decisivo dos últimos anos, na resolução do problema posto, deve-se à descoberta dos isótopos. Isolaram-se e prepararam-se isótopos dos elementos naturais, que, mesmo em quantidades ínfimas, se distinguem destes pela análise e não lesam as condições fisiológicas.

A técnica dos isótopos-indicadores segue dois métodos fundamentalmente diferentes: Por um lado, empregam-se os *isótopos radioactivos artificiais*, preparando os chamados bioelementos «marcados» pela mistura dos radio-isótopos-indicadores, em quantidades ínfimas, com elementos fisiológicos; por outro lado, aplicam-se os *isótopos estáveis*, que são considerados igualmente como indicadores quando marcam a pleiade do bioelemento em estudo, alterando a sua massa atômica normal.

Entre os *isótopos estáveis* é particularmente importante o caso do hidrogénio. Foi Urey quem, em 1932, descobriu no hidrogénio normal partículas com a massa 2, que acompanham o isótopo leve de massa 1 na proporção de 0,02 %. Com este hidrogénio pesado ou deutério, Lewis preparou a chamada água pesada, cuja densidade é cerca de 10 % superior à da água ordinária, o que é muito, dado o rigor dos métodos densimétricos.

Na nova técnica bioquímica, o organismo a estudar é alimentado, no sentido mais vasto do termo, com os compostos hidrogenados, marcados com deutério, quer se trate de compostos minerais, como a água, quer de compostos orgânicos em que se introduziu por métodos químicos, por exemplo por hidrogenação catalítica, algum hidrogénio pesado.

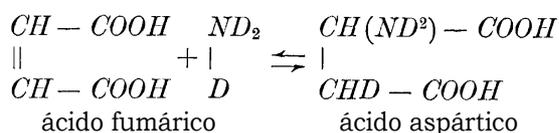
As substâncias alimentícias normais são marcadas com os compostos deuterados apenas na concentração indispensável para que seja possível a identificação posterior do hidrogénio pesado pela sua massa.

Para seguir o destino do hidrogénio ingerido, são analisados, passado algum tempo, os órgãos e excreções do organismo, onde se poderia ter instalado. Neste intuito, a água dos humores é separada por destilação cuidadosa, e a matéria orgânica submetida à combustão, que produz, do mesmo modo, água a partir do hidrogénio. A densidade destas fracções aquosas é determinada, indicando um valor superior ao da água normal a presença de água marcada, proveniente da matéria alimentícia em estudo.

As primeiras experiências com água pesada foram realizadas por Hevesy e colaboradores sobre problemas de permeabilidade de membranas à água. Segundo estes autores, são rápidas as trocas entre a água do organismo de peixe e a do ambiente. Krogh e Ussig observaram que a água penetra nos ovos retirados do oviduto da truta, mas que, ao cabo de poucas horas, estes ovos se tornam impermeáveis, ficando neste estado até que aparecem os olhos do embrião. No coelho a água marcada atravessa a membrana capilar em 40 segundos e, após 24 minutos, toda a água do organismo está diluída com a água injectada. Hevesy e Hofer mostraram que o homem só lentamente elimina o óxido de deutério ingerido; em cerca de 9 dias, só metade aparece nas urinas.

As experiências mencionadas e inúmeras outras foram realizadas com água «marcada», isto é, com água normal contendo pequena percentagem de óxido de deutério. Outros trabalhos foram efectuados com água pesada quase pura, com o intuito de estudar a acção da água como meio de reacção bioquímica. Verificámos no Instituto Rocha Cabral, já em 1935, que várias reacções enzimáticas que estudámos se realizam mesmo em água pesada pura, mas que as velocidades das fermentações não são iguais às das observadas com água normal, o que, segundo Bonhöffer,

permite conclusões cinéticas no que respeita à afinidade do enzima para com o seu substrato, ou melhor, no que respeita à constante de dissociação do complexo substrato-enzimático. Pela mesma técnica, procedemos à síntese fermentativa de vários compostos deuterados, mediante processos que compreendem reacções em que intervém hidrogénio, como sejam hidrolises, oxireduções ou hidratações. Obtivemos assim, por exemplo, ácido aspártico com hidrogénio pesado no grupo aminogénio, fixando amónia deuterada sobre a dupla ligação do ácido fumárico.



As nossas experiências cinéticas demonstram que, em solutos concentrados de água pesada, o deutério, embora quimicamente idêntico ao isótopo de massa 1, já pode produzir efeitos específicos, efeitos dependentes naturalmente da sua massa elevada. As ratas, porém aguentam bem uma concentração de água pesada desde que não vá além de 25 %; em muitas plantas não se manifesta efeito algum mesmo com o óxido de deutério puro.

As experiências mais interessantes em bioquímica foram realizadas, claro está, com compostos *orgânicos* do deutério, empregados para marcar, com quantidades pequenas, substâncias fisiológicas cujo trajecto no organismo se procurava seguir.

Foram pioneiros da técnica com isótopos estáveis os americanos Rittenberg e Schönheimer; estes autores foram os primeiros a demonstrar que a desidrogenação dos ácidos gordos é um processo fisiológico e que, vice-versa, a hidrogenação enzimática de ácidos não saturados é também uma função vital do organismo dos ratos.

Na investigação dos protidos, foi estudada, por exemplo, em que medida se dá a síntese *in vivo* de aminoácidos. No organismo de ratos tratados com água pesada, todos os

aminoácidos isolados eram deuteronados, isto é, sintéticos, com excepção da lisina, o que não é surpresa, visto que a lisina sempre foi considerada um aminoácido exogéneo, indispensável à alimentação animal.

Todavia as experiências mais elucidativas da nova técnica, no domínio proteico, foram realizadas com o isótopo pesado do azoto normal, cuja pleiade contém, por cada 3000 átomos de massa 14, só um átomo do isótopo de massa 15. Têm-se empregado igualmente isótopos indicadores do enxofre, do oxigénio, e o isótopo estável do carbono, de massa 13, isótopo de importância decisiva em bioquímica.

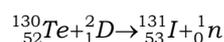
Os bioelementos marcados podem portanto ser preparados a partir das pleiades normais da Natureza e ser doseados com grande rigor, o que se confirma sobretudo para o hidrogénio, por ser a massa do deutério dupla da do isótopo leve e abundante. Mas as operações analíticas de separação são muitas vezes difíceis e prolongadas, não só para eliminar quaisquer impurezas, mas também para evitar trocas espontâneas com elementos do ambiente.

Estas dificuldades não existem praticamente com os *isótopos radioactivos artificiais*. A sua detecção talvez nem sempre atinja o rigor da densimetria da água pesada, mas os aparelhos registadores das radiações são de extrema sensibilidade qualitativa e sobretudo são muito simples as operações analíticas. No entanto, um elemento radioactivo tem muitas vezes um período relativamente curto, o que faz com que se deva trabalhar rapidamente, em síntese e análise, a não ser que se apliquem concentrações elevadas, quer dizer, prejudiciais, do radioelemento. É este, contudo, o único inconveniente dos isótopos radioactivos artificiais cuja aplicação, de preferência à dos estáveis, é cada vez mais frequente pelas facilidades analíticas que oferecem e pela simplicidade da sua preparação, pelo menos nos Estados Unidos da América e em outros países que possuem as instalações respectivas. Muitos isótopos radioactivos são hoje obtidos, em abundância, pela cisão do urânio nas pilhas atómicas.

É particularmente importante, em bioquímica,

a preparação de radioisótopos do enxofre, do iodo, do sódio, do ferro, do fósforo e sobretudo a dos radiocarbonos de números de massa 11 e 14.

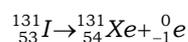
A aplicação em bioquímica de radioelementos indicadores com o intuito de marcar compostos, cujo trajecto nos organismos vivos se pretende seguir, é já anterior à descoberta da radioactividade artificial, por Joliot e I. Curie. Hevesy, em 1923, utilizou rádio D, isótopo radioactivo natural do chumbo, para seguir o trajecto deste elemento em plantas; sendo a análise radioscópica um milhão de vezes mais sensível do que a química, Hevesy pôde empregar quantidades ínfimas, evitando assim quaisquer efeitos tóxicos dos vestígios de rádio D que marcaram o chumbo. Mas o chumbo não é um elemento biogénio; o primeiro radioelemento fisiológico estudado sistematicamente, pela nova técnica, foi o fósforo, aplicado em estudos muito completos por Hevesy e colaboradores. Seguiram-se inúmeros outros trabalhos, em que se distinguiu especialmente a escola americana de Hamilton. É particularmente interessante o caso do iodo. Joliot e colaboradores descrevem como obter radioiodo $^{131}_{53}I$ com o período de semitransformação de 8 dias, bombardeando o telúrio normal com deutões, segundo o esquema:



O telúrio normal inclui, na sua pleiade de isótopos, 33 % de $^{130}_{52}Te$.

Além do radioiodo indicado, formam-se outros isótopos do iodo com pequenos rendimentos ou de períodos demasiadamente curtos. Para isolar o radioisótopo preparado, o sistema bombardeado é atacado por um ácido e o radioiodo arrastado, por destilação, em presença de iodo inactivo. Em seguida, o iodo é fixado sob a forma dum sal sódico.

Este isótopo 131 do iodo transmuta-se segundo o esquema:



isto é, com emissão de electrões negativos. 3 mg de uma preparação de iodo assim mar-

cado manifestaram uma actividade de 5×10^6 impulsos/min, medida com um contador de partículas de Geiger-Müller, sob determinadas condições geométricas.

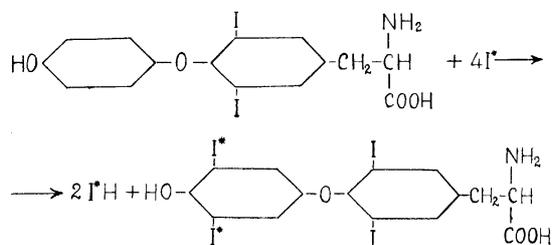
Nos estudos com radioiodo aplicam-se três técnicas usadas geralmente com os radioelementos indicadores. Em primeiro lugar, o bioquímico pode seguir *in vitro* a assimilação do elemento administrado, a sua transformação em derivados metabólicos e a sua eliminação, pela determinação quantitativa da radioactividade de amostras de tecidos retirados do organismo, mediante electroscópios e, sobretudo, mediante contadores Geiger-Müller. Em segundo lugar, a acumulação selectiva do radioelemento pode ser observada *in vivo*, medindo-se a intensidade das radiações que, atravessando o organismo, atingem um contador de Geiger-Müller, colocado em face do órgão em estudo. Em 3.º lugar, podem obter-se autoradiografias de cortes de tecidos onde o radioelemento se tenha acumulado, pois as radiações emitidas podem impressionar películas fotográficas.

O radioiodo foi empregado sobretudo no estudo da glândula tiroideia, a qual é o único tecido com a propriedade de acumulação selectiva de iodo em quantidades relativamente grandes, contendo em condições normais 1 % de iodo. Foi mediante o emprêgo de radioiodo que Herz e colaboradores demonstraram a grande velocidade com que o iodo é acumulado na tiroideia, chegando a este órgão poucos minutos depois de administrado por via bucal. Hamilton comparou, *in vivo*, a velocidade de assimilação do iodo marcado em pessoas normais e em doentes sofrendo de vários estados patológicos. Foram administrados, pela boca, solutos de iodeto alcalino contendo 14 mg de iodo marcado com o radioisótopo, cuja actividade correspondeu a 24-100 microcuries. Colocando o contador de Geiger-Müller directamente sobre o istmo da glândula, a radioactividade foi determinada e comparada com a do produto administrado. Verificou-se a rápida assimilação do radioiodo em doentes com bócios não tóxicos, feita a comparação com casos normais, o que deve atribuir-se à

falta aparente de iodo nestes doentes. Nos casos de hipertiroidismo, a rápida assimilação é seguida por perdas imediatas de $1/2$ até $4/5$ do iodo recebido na glândula nas primeiras horas. Esta observação faz admitir não só a avidéz da glândula para o iodo, mas também que o mecanismo da retenção do elemento deve estar perturbado. A reduzida assimilação nos doentes sofrendo de hipertiroidismo pode ser explicada pelo facto de que a glândula não está habilitada a fornecer as quantidades hormonais necessárias às exigências metabólicas, isto é, a incapacidade da assimilação do iodo deve estar relacionada com a falta de possibilidade de síntese para a hormona tiroideia.

A técnica das autoradiografias é utilíssima também em estudos embriológicos como, mais uma vez, mostra o exemplo da tiroideia. Gorbmann e Evans averiguaram em que período do desenvolvimento do embrião da rã a glândula começa a ter possibilidade de fixar iodo. Mantiveram as larvas durante uns poucos de dias em 500cm^3 de água contendo 150 mc de radioiodo, procedendo em seguida à obtenção das autoradiografias de preparações histológicas de cortes tecidulares. Larvas com menos de 10 mm de comprimento não revelaram evidência da acumulação de iodo, mas larvas com dimensões superiores mostraram já certa evolução morfológica, começando a ter a capacidade de acumular cada vez mais iodo.

A revolução da técnica bioquímica é posta em destaque particular pela primeira síntese duma hormona radioactiva, síntese conseguida por F. Joliot e colaboradores que obtiveram tiroxina com dois átomos de radioiodo, segundo o esquema:



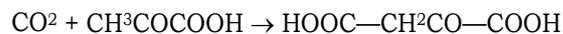
Pela aplicação de poucos mg de iodo marcado, prepararam 7 mg de tiroxina radioac-

tiva, (correspondendo a sua actividade, no início, a 700.000 impulsos /min, medidos sob determinadas condições geométricas fixas, o que permite identificar quantidades de hormona da ordem de 0,01 γ), que foi injectada nas veias de coelhas grávidas, sendo os animais sacrificados após 5 horas. Mediu-se a seguir a radioactividade do sangue, das urinas, da bilis, da tiroideia, da hipófise e dos embriões, comparando ainda os valores obtidos com os observados nos mesmos órgãos em animais a que foi injectado radioiodo mineral em lugar da hormona. Em alguns casos, separou-se até a tiroxina, a di-iodotirosina e o iodeto mineral. Segundo as observações dos autores franceses, a radioactividade das urinas é mais forte após ingestão de hormona do que com o radioiodo. O mesmo se passa na bilis. Verificaram mais uma vez que o ião iodeto se precipita com tropismo extraordinário para a tiroideia e que, 5 horas depois da injeção, o animal já elimina tiroxina e di-iodotirosina radioactivas, sintetizadas pelo organismo. A tiroxina injectada dirige-se mais facilmente à hipófise do que à tiroideia, o que é uma constatação importante para o estudo das funções tireotrópicas. Finalmente, permitiu a técnica radioactiva de Joliot estudar a permeabilidade da placenta que, no meio da gestação, deixa passar muito mais facilmente o ião iodeto do que a tiroxina.

Entende-se que a aplicação dos isótopos do carbono em bioquímica tem uma importância decisiva. Trabalha-se aqui não só com o isótopo estável C^{13} , mas também com os rádio-carbonos C^{11} e C^{14} , tendo o primeiro uma vida média extremamente curta de 21 minutos e o segundo, pelo contrário, um período de mil anos aproximadamente, de modo que pode ser sempre recuperado.

Marcando com estes isótopos-indicadores o anidrido carbónico, os biólogos começam a esclarecer o mecanismo da fotosíntese nas folhas verdes, sobre o qual se tem mantido, durante dezenas de anos, hipóteses completamente errôneas, como mostraram sobretudo Ruben, Kamen e outros; nos seus trabalhos com a alga *Chlorella*, nunca encontraram al-

deido fórmico marcado, mas sim grupos carboxilos de ácidos bastante complexos que se formaram segundo $RH + CO^2 \rightarrow RCOOH$. Além disto, verificou-se sobretudo que o próprio organismo animal é capaz de fixar directamente o anidrido carbónico marcado segundo o esquema:



Só com a técnica dos isótopos indicadores foi possível estabelecer que, mediante a reacção anterior, por 25 moléculas de CO^2 eliminadas, uma é assimilada, com prolongamento da cadeia carbonada. Com o óxido de carbono contendo radiocarbono foram executados ainda estudos *in vivo* sobre as possibilidades da sua oxidação respiratória, problema que tem interesse, por exemplo, para os soldados que ocuparem tanques, aviões ou submarinos. Verificou-se que o anidrido carbónico eliminado nunca apresentava radioactividade e, portanto, não provinha do óxido de carbono ingerido.

Quanto ao metabolismo mineral, são igualmente inúmeros os trabalhos já executados. A escola de Hevesy e a de Hamilton distinguiram-se aqui particularmente.

O caso do radiofósforo, com um período muito favorável de 14 dias, é especialmente ilustrativo e de grande interesse fisiológico, por ser um elemento biogéneo muito importante não só no metabolismo mineral, mas também no dos lípidos e na oxidação celular dos glúcidos. Centenas de trabalhos foram já efectuados sobre a absorção do fósforo branco e vermelho, trocas de fósforo nutritivo e endógeno, excreção pelos rins e intestinos e rejuvenescimento do esqueleto, assim como sobre a formação dos fosfolipóides do tecido nervoso, intervenção de ésteres fosfóricos no metabolismo dos glucidos etc., etc., estudos estes ligados, sobretudo, à escola de Hevesy.

A tabela apresentada a seguir, sobre a distribuição do fósforo marcado no organismo duma ratazana, mostra o desaparecimento de 98 % do sal administrado, dentro de 4 horas, que se explica sobretudo pelas trocas com o fósforo do esqueleto que, por sua vez, mobi-

liza o fósforo necessário a outras funções do organismo.

O quadro revela, de facto, não só a distribuição, numa ratazana, do fósforo marcado e o mecanismo da sua eliminação, mas também que certa parte do fósforo assimilado pelos ossos deve passar, dentro de três semanas, para os outros órgãos. Em outras experiências, confirmou-se o equilíbrio dinâmico na formação óssea, pela distribuição rápida e igual do radiofósforo sobre todo o esqueleto do individuo.

Distribuição do Fósforo marcado numa ratazana.
(Administração oral)

Fracção	% P marcado	
	após 3 semanas	após 4 horas
Sangue	2,4	—
Ossos	48	24,8
Músculos	25	18,4
Trato digestivo...	10,8	—
Fígado	9,8	1,7
Rins	2,3	0,1
Baço	0,3	—
Pele, pelos	1,2	—
Cérebro	0,08	0,1
Urina	—	26,3
Fezes	—	31,8

Mas é curiosa a constatação de que, no homem adulto, que deve ingerir 2 g diários de fósforo, a troca de 1 % do fósforo dentário se deve efectuar em cerca de 250 dias. Demonstrou-se também, pela nova técnica, que o fósforo eliminado pelo intestino só em pequena proporção provém de fonte alimentícia directa, sendo a maior parte de origem endógena.

Na realidade, a aplicação dos isótopos radioactivos não se limita a investigações de problemas puramente científicos na química fisiológica: os radioisótopos foram empregados já com exito em prol da saúde humana; impõe-se, por um lado, a sua aplicação no diagnóstico clínico, e, pelo outro, a absorção selectiva de substâncias, dotadas de radioactividade, não pode deixar de chamar a atenção do médico sobre as possibilidades terapêuticas de irradiações eficazes *in situ*, onde os raios X ou não penetram ou não podem ser orientados de maneira concentrada.

Finalmente, deve salientar-se que a aplicação biológica dos radioelementos é só uma entre muitas; não se aludiu sequer, neste relatório dedicado à bioquímica, às aplicações vastas que os isótopos-indicadores têm em análise química, no estudo da catálise, em geologia, em agronomia e em muitos outros problemas tecnológicos e científicos.

Deviam igualmente analisar-se as possibilidades de aplicação da nova técnica no nosso país. Sendo indiscutível o grande valor científico e humanitário dos isótopos-indicadores, quer sejam estáveis quer radioactivos, convém-nos averiguar em que condições seria possível a sua obtenção em Portugal. Podemos importar os isótopos ou então produzi-los. Existem nos Estados Unidos, sobretudo, além dos centros de separação dos isótopos estáveis, vários ciclotrões e, especialmente, as pilhas atômicas, produtoras de radioelementos, e há várias organizações para a sua distribuição mundial. A Sun Oil C.^o e a Houdry Process Foundation, por exemplo, distribuem gratuitamente o isótopo estável C¹³ a quem possa justificar tal donativo... e os pedidos de radioisótopos provenientes da cisão do urânio, segundo o Manhattan Project, devem ser dirigidos a «Isótopos Branch Research Division», Manhattan District. Entre nós, no entanto, várias dificuldades vêm complicar a aquisição dos produtos; basta lembrar que muitos radioelementos têm um período de semitransformação de poucas horas ou dias para se reconhecer a utilidade duma fabricação no país, pelo menos dos radioisótopos. A instalação de um dispositivo que permitisse aumentar a energia cinética de partículas pesadas na medida suficiente para se poderem obter isótopos artificiais por bombardeamento de elementos estáveis naturais, seria sem dúvida dispendiosa, mas os sacrificios seriam largamente recompensados pelos incalculáveis benefícios científicos, humanitários e mesmo económicos que o país teria.

KURT JACOBSON

PROF. AGREGADO DA F. C. L.

(segundo um relatório apresentado ao 2.^o Congresso
Biológico Português, 1948)