

DEPARTAMENTO DE TERAPEUTICA CLINICA
Diretor: Prof. Dr. Fernando V. Carvalho

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA E BIOFISICA
Diretor: Prof. Dr. Metry Bacila

DESNATURAÇÃO DA ACTOMIOSINA DE MÚSCULO ESTRIADO DE COELHO PELA PROMETAZINA *

(DENATURATION OF ACTOMIOSINE FROM RABBIT STRIATED
MUSCLE BY PROMETHAZINE)

HEITOR MEDINA
Prof. Assistente Docente

FERNANDO VARELA DE CARVALHO
Prof. Catedrático

ARLETE EMILY CURY
Assistente

METRY BACILA
Prof. Catedrático

INTRODUÇÃO

Os derivados da tiodifenilamina caracterizam-se por suas ações farmacológicas, resultantes que são da multiplicidade de efeitos produzidos pelo núcleo fenotiazínico sobre a estrutura e funções dos sistemas biológicos. É assim que tais compostos foram empregados como inseticida, helminticida, antimalárico, inibidor enzimático, antiespasmódico, antiemético, potencializador da anestesia, tranquilizante, antiarrítmico, depressor do metabolismo, bloqueador adrenérgico, bloqueador dos reflexos condicionados, ganglioplégico, etc., na dependência das modificações que se puderam processar na estrutura do núcleo fundamental, o 2:3:5:6-dibenzo-1-4-tiazina, ou então na cadeia lateral N-substituída (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8) e (30). O estudo das propriedades farmacológicas dos fenotiazínicos alcoilados permitiu dividi-los em dois grandes grupos, os anti-histamínicos do tipo prometazina, dotados de efeitos colaterais sedativos e os fenotiazínicos do tipo clorpromazina, psicofármaco de alta atividade bloqueadora das respostas condicionadas, porém francamente anti-helmintico. Ambos os grupos entretanto apresentam efeitos colaterais comuns, são quelantes e dão lugar à formação de complexos de transferência de carga.

* Com auxílio do Banco Nacional do Desenvolvimento Económico, Projeto FUNTEC N.º 31.

Recentemente foi demonstrado que os derivados da fenotiazina interferem diretamente nos mecanismos que regulam a pressão arterial (16), (17) e (30), especialmente o trabalho cardíaco e de modo mais específico interferem nos ciclos de libertação, armazenamento ou utilização da energia (9). A experiência demonstra ainda que os fenotiazínicos modificam a capacidade funcional da fibra cardíaca (10), (11), (18), (19), (20), (21), (22) e (30).

Estudos preliminares (26) demonstram serem os fenotiazínicos desnaturantes da proteína contrátil do músculo esquelético do coelho; impedem a reversão da forma F para a forma B da actomiosina quando se eleva a concentração molar de cloreto de potássio nas soluções próprias para o estudo da referida reversão. A actomiosina, quando mantida na forma G solúvel, numa concentração salina a 0,6 M de cloreto de potássio, é naturalmente opaca, sua absorvância aumenta quando se adicionam quantidades crescentes de fenotiazínicos a 10^{-2} M, nos mesmos moldes como foi observado no caso das mitocôndrias isoladas, resultando na formação de um sedimento que não mais se redissolve apesar da diálise contra a água ou mesmo frente ao cloreto de potássio 0,6 M (29).

Visa a presente investigação estudar a natureza da lesão bioquímica produzida pelos derivados da fenotiazina, em nível molecular, bem como esclarecer os prováveis mecanismos responsáveis pelas modificações que ditas substâncias operam no comportamento funcional orgânico e nas propriedades da proteína contrátil do músculo estriado do coelho.

MATERIAL E MÉTODOS

Actomiosina foi preparada a partir de músculo estriado de coelho, segundo as linhas gerais da preparação de SZENT-GYORGYI (31). Coelhos albinos foram decapitados e eviscerados. Toda a massa muscular foi cuidadosamente retirada e mantida na câmara fria até o momento da trituração em máquina de moer carne e reduzida a pequenos fragmentos de 2 mm de espessura. Porções de 100 g foram armazenadas a -20°C em pequenos sacos de plástico e dêsse modo protegidas contra o dessecação. Para a obtenção da proteína contrátil, 100 g de material de músculo triturado foram suspensas em 3 volumes de líquido de Weber-Edsal e em seguida passadas pelo liquidificador. Este último artifício permite extração mais completa da proteína, além do que a pasta muscular assim obtida permite extrações intervaladas de proteína recém-preparada.

Aliquotas de massa pastosa são centrifugadas a 20.000 rpm em Centrífuga Refrigerada Sorvall RCB-2, depois de 24 horas de infusão em solução de Weber-Edsal, obtendo-se assim sobrenadante altamente viscoso contendo actomiosina que em seguida é precipitada mediante a adição de 12 vezes o volume com água des-

tilada. Nessas condições, a actomiosina, que em seguida é precipitada em densos flocos se acumula no fundo do recipiente. Depois de algum tempo, o líquido sobrenadante é então decantado por sifonamento e o sedimento de proteína é lavado 2 vezes com água destilada e centrifugado a 20.000 rpm depois de cada lavagem. A adição de cloreto de potássio 0,6 M transforma a actomiosina F precipitada em actomiosina G solúvel e então utilizada para as experimentações.

O efeito da prometazina sobre as propriedades físicas da actomiosina foi analisado pelo uso de técnicas diversas. A interação da actomiosina com a prometazina foi estudada em sistemas contendo variáveis quantidades de actomiosina F incubada com quantidade fixa de prometazina e alíquotas do sobrenadante de tais sistemas foram usadas para dosar prometazina residual. Por outro lado, foi estudada a capacidade da prometazina de opacificar soluções de actomiosina G, tendo sido estudado o fenômeno por turbidimetria em espectrofotômetro Hitachi-Perkin Elmer a 600 nm.

O efeito da prometazina sobre a proteína contrátil se evidencia melhor quando se compara o comportamento da actomiosina G que sofreu a ação do fenotiazínico, com o da actomiosina G não desnaturada no momento da transformação da forma G para a forma F em ambos os casos. Assim os fenotiazínicos não impedem a transformação da forma G da actomiosina para a forma F, porém impedem a transformação em contrário quando se faz variar a concentração molar do KCl entre os valores 0,6 e 0,2 M.

A actomiosina F desnaturada pelo PTZ perde sua consistência normal com facilidade ante a menor agitação do líquido que a contém, transformando-se numa suspensão que se esfarela com muita facilidade em partículas bastante atomizadas. Procurando-se quantificar o fenômeno, foi estabelecido um método que se convencionou denominar "Método da Gôta", pelo qual a actomiosina G adicionada de fenotiazínico é gotejada de uma pipeta em água destilada (38), mostrando comportamento distinto da actomiosina não adicionada de fenotiazínico. Nesse caso, a gôta se mantém uniforme, ao passo que no anterior a actomiosina se desfaz completamente, mostrando total alteração das suas propriedades fundamentais. A intensidade desse efeito depende da concentração de fenotiazínico e da altura com que a gôta é despreendida até a água destilada.

O método da gôta se baseia na rápida transformação da actomiosina da forma G para a forma F, quando se baixa instantaneamente a concentração do cloreto de potássio (31). Dessa maneira, o gotejamento de uma solução concentrada de actomiosina G contida numa pipeta sobre a água destilada dá lugar à formação imediata de uma pérola de actomiosina F, esférica ou levemente achatada, cuja forma se modifica à medida que se eleva a altura em que se processa o gotejamento sobre a superfície livre de água

destilada. Em base a essa observação, foi idealizado um método de dosagem dos efeitos desnaturantes do PTZ sobre a actomiosina G.

Proteína foi determinada pelo método do microkjeldahl. Prometazina foi determinada pelo método colorimétrico do reativo de cloreto de paládio (39). Determinações turbidimétricas para verificar a ação opacificante da prometazina sobre a actomiosina G foram levadas a efeito em espectrofotômetro Hitachi-Perkin Elmer a 600 nm.

Prometazina 10-(2-dimetilamino-2-metiletil) fenotiazina foi gentilmente cedida pela Indústrias Químicas Rhodia S. A. Todos os demais produtos utilizados são de boas fontes comerciais.

RESULTADOS

1. *Interação da prometazina com actomiosina F.* Interação de prometazina com actomiosina F foi estudada em sistema contendo variadas quantidades de actomiosina F e 50 μg de prometazina por 1,0 ml de solução. Após incubação do sistema, prometazina residual foi medida nos sobrenadantes (Fig. 2), quando se verificou que o desaparecimento da prometazina do meio de reação aumenta em relação à concentração de proteína.
2. *Medida turbidimétrica da interação actomiosina G-prometazina.* MEDINA, DMYTRACZENKO e BACILA (37) verificaram que a adição de prometazina a uma suspensão de mitocôndria cardíaca de cobaia causa imediata elevação da absorbância da suspensão, ao mesmo tempo que o fenotiazínico desaparece do sistema de reação (33), fenômeno diretamente proporcional à concentração de proteína. Em base ao referido achado, foi aventada a hipótese de uma possível interação actomiosina-prometazina de modo similar ao que acontece com mitocôndria cardíaca.

Efetivamente foi verificado que a adição de quantidades diferentes de prometazina na concentração (10^{-2}M), à actomiosina G tem a propriedade de modificar o seu comportamento físico-químico. Nesse caso, a solução de actomiosina, translúcida normalmente, torna-se opaca à medida que se aumentam as quantidades da droga adicionada à proteína. A actomiosina assim transformada apresenta-se grumosa, de densidade maior e sedimenta facilmente quando centrifugada a baixa rotação (Fig. 3). A actomiosina G assim desnaturada mantém a capacidade de se transformar na forma F quando em contato com a água destilada, porém não retorna à forma G mesmo lavada de todo o fenotiazínico ou mesmo quando agitada durante 48 horas numa solução de cloreto de potássio 0,6 M.

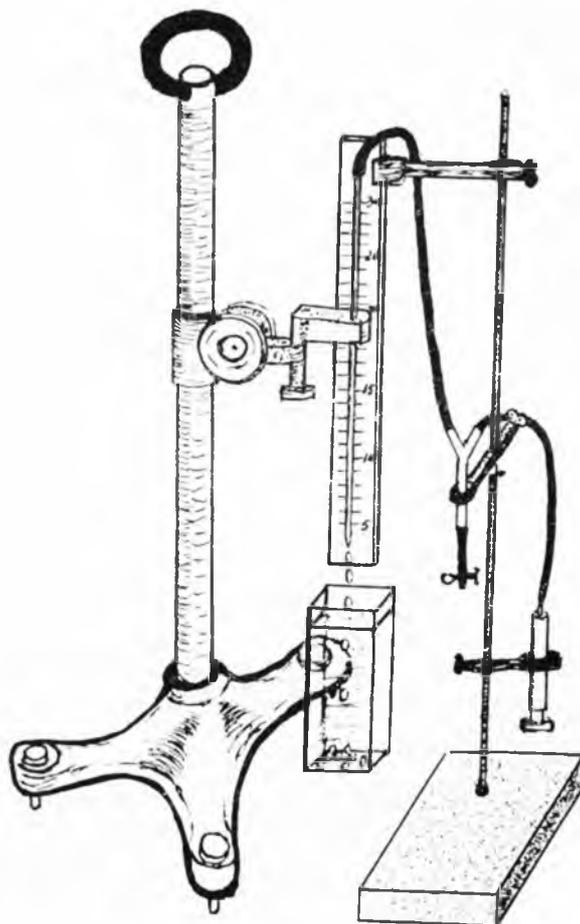


Fig. 1 *Dispositivo utilizado para medir a altura da queda da gôta de actomiosina sobre a superfície de água destilada.* O aparelho empregado consta de dois suportes, o primeiro mundo de crematheira destinada a sustentar uma pipeta de 5 ml dividida em décimos, munida de tubo de borracha conectada pela extremidade oposta a um dos ramos de um tubo em Y. O outro ramo do tubo em Y está ligado a uma seringa cujo êmbolo foi previamente tratado com silicone. O ramo perpendicular do tubo em Y está munido de dispositivo que permite controlar o número de gôtas que flui da pipeta. Uma vez fechado o ramo perpendicular do tubo em Y, a pressão negativa exercida pela seringa permite introduzir a proteína na pipeta e pela abertura controlada do mesmo ramo torna-se possível regular a frequência do gotejamento da proteína sobre a água. O segundo suporte sustenta uma régua milimetrada cujo zero coincide com a superfície livre da água. Nestas condições, é possível determinar em centímetros a altura da queda da gôta desde a ponta da pipeta até a superfície livre da água contida no recipiente e ao mesmo tempo observar as modificações físicas sofridas pela proteína e ocasionadas pelo impacto do choque.

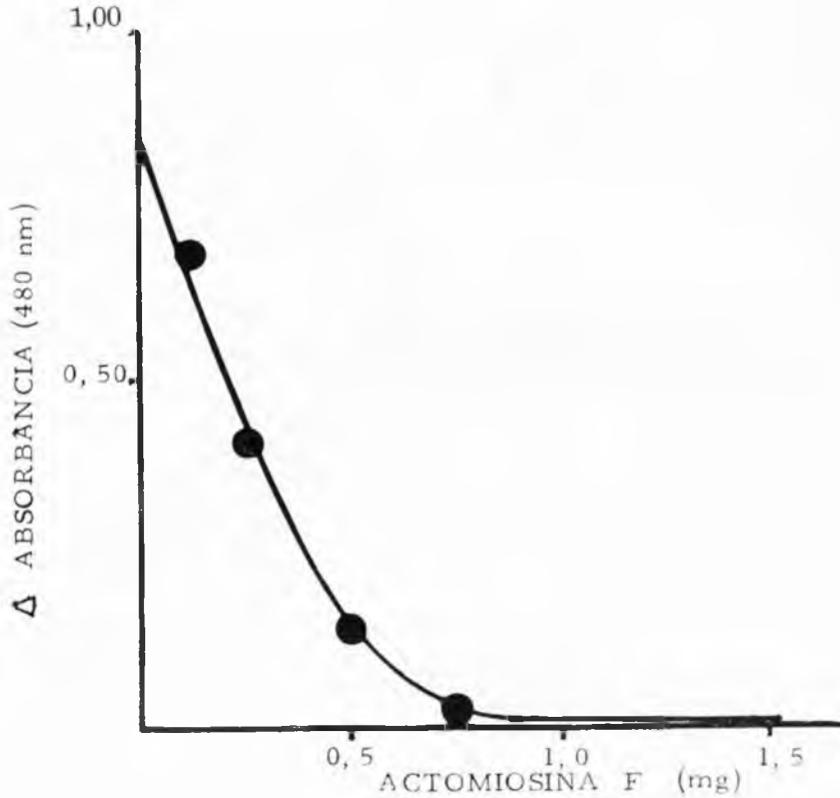


Fig. 2 — O sistema contendo 0,1 ml de solução de cloreto de prometazina contendo 50 μ g por ml e água destilada em volumes variáveis para completar 5,0 ml de volume total, actomiosina F foi adicionada em concentração final de 0,5 mg a 1,5 mg de proteína por ml. Após 10 minutos de incubação, cada sistema foi centrifugado 10 minutos a 10.000 rpm em centrífuga Sorvall RCB-2 refrigerada e alíquotas de 3,0 ml do sobrenadante foram utilizadas para a determinação colorimétrica da prometazina pelo método PdCl_4 .

O grau de turvação da actomiosina produzida pelo fenotiazínico foi determinado em espectrofotômetro Hitachi-Perkin-Elmer a 600 nm.

A actomiosina utilizada encontrava-se na forma G e foi diluída com cloreto de potássio 0,6 M até a concentração protéica máxima de 35 mg de proteína por ml.

3. *Efeito da prometazina sobre a consistência da actomiosina F.* O efeito da prometazina sobre a consistência da actomiosina F foi estudado em solução de actomiosina G adicionada de pro-

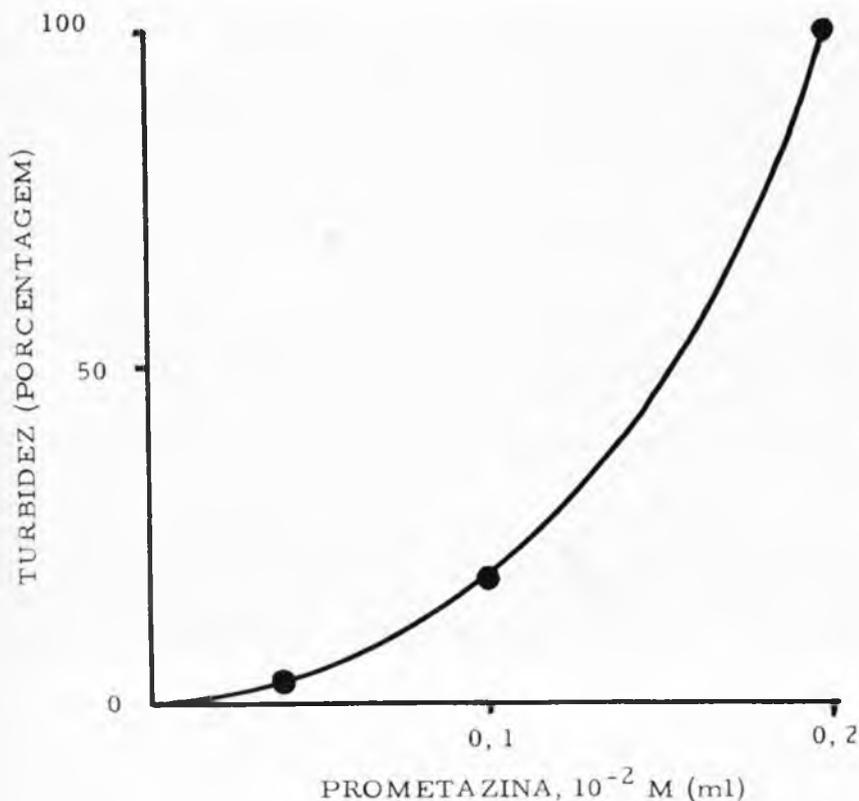


Fig. 3. *Determinação turbidimétrica do efeito opacificante da prometazina sobre a actomiosina G.* Actomiosina G foi diluída em solução 0,6M de KCl até concentração de 35 mg de proteína por ml. Os tubos contendo 2,0 ml da solução de actomiosina G, foram adicionados 0,01-0,02 — 0,1 e 0,2 ml de solução de prometazina 10⁻²M, exceto em tubo controle adicionado de 0,2 ml de KCl 0,6M. Solução de KCl 0,6M foi adicionada a todos os sistemas completando o volume a 2,2 ml. Turbidez das suspensões foi lida a 600 nm e o valor máximo percentual de turbidez foi tomado como sendo a diferença entre a absorbância da suspensão contendo 0,2 ml de prometazina 10⁻²M e solução de actomiosina G adicionada de 0,2 ml de solução 0,6M de KCl.

metazina e gotejada sobre a superfície de uma coluna de água destilada (Fig. 4). Ao impacto sobre a superfície da água destilada, a actomiosina G se transforma em F e quando não adicionada de prometazina a pêrola que se forma mantém-se com contorno nítido, fato que não ocorre no caso de actomiosina adicionada de prometazina.

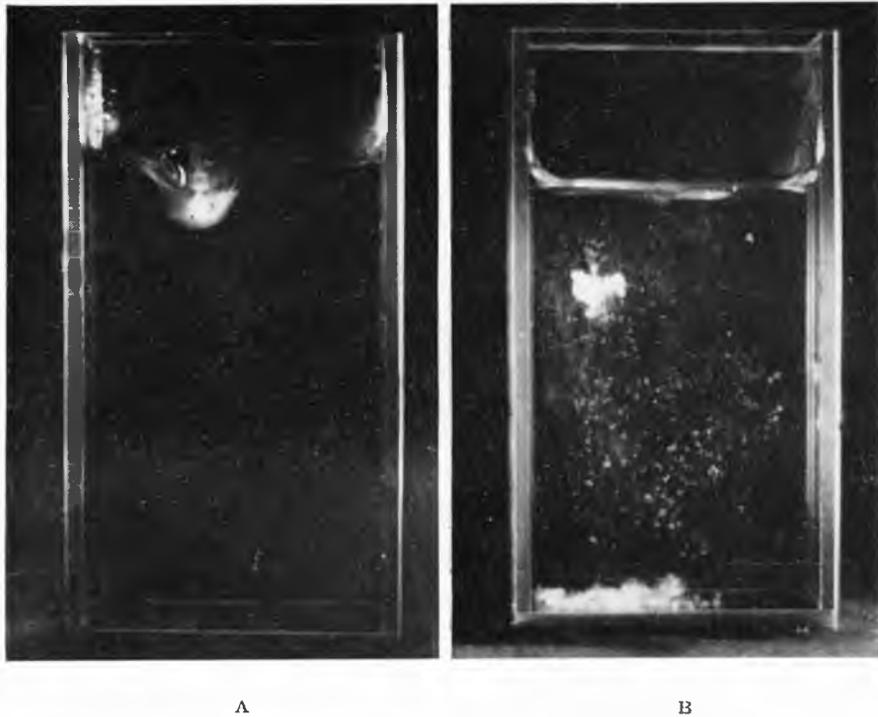


Fig. 4. *Efeito da prometazina sobre a consistência da actomiosina F.* (A) solução de actomiosina G em KCl 0,6 M é gotejada sobre a superfície de água destilada quando se transforma em actomiosina F, mostrando contornos nítidos de proteína. (B) Solução de actomiosina G em KCl 0,6 M contendo prometazina $6 \cdot 10^{-3}$ M. Em (B), ao entrar a actomiosina em contato com a superfície da água destilada, a pérola própria da actomiosina F (A) perde o seu contorno, deformando-se para em seguida pulverizar-se. O conteúdo de actomiosina, em ambos os sistemas, era de 52,0 mg por ml.

4. *“Efeito da gôta”. Relação entre concentração de prometazina e o comportamento físico-químico da actomiosina F.*

Em sistemas contendo actomiosina G e variadas concentrações de prometazina, foi estudado o efeito da altura do seu gotejamento sobre a superfície de uma coluna de água destilada pelo uso do dispositivo mostrado na Fig. 1. A Tabela I mostra o delineamento da experiência levada a efeito, enquanto que a Fig. 5 revela a relação matemática existente entre a concentração de prometazina e a altura máxima de gotejamento capaz de produzir, ao impacto sobre a superfície de uma coluna de água destilada, pérola de contorno uniforme, simi-

TABELA I — Delineamento de seqüência realizada para verificar o “efeito da gôta” na preparação Actomiosina G — Actomiosina F, na ausência e na presença de prometazina.

Sistema	Actomiosina G em KCl 0,6 M (ml)	Sol. prometazina * (0,258mg/10 ml de KCl 0,6M) (ml)	Altura máxima (h) da pipeta em cm para produzir gôta (pérola) normal
1	0,5	0,1 ($2 \cdot 10^{-3}M$)	18
2	0,5	0,2 ($4 \cdot 10^{-3}M$)	12
3	0,5	0,3 ($6 \cdot 10^{-3}M$)	4
4	0,5	0,4 ($8 \cdot 10^{-3}M$)	0,5
5	0,5	— — —	20

* A solução de prometazina contém 1 mg por ml de ácido ascórbico. Proteína: 52 mg/ml. A pérola de actomiosina F que se forma é compacta e uniforme quando a gôta atinge a água. Há toda uma modificação no aspecto da gôta à medida que a pipeta se eleva da superfície do líquido.

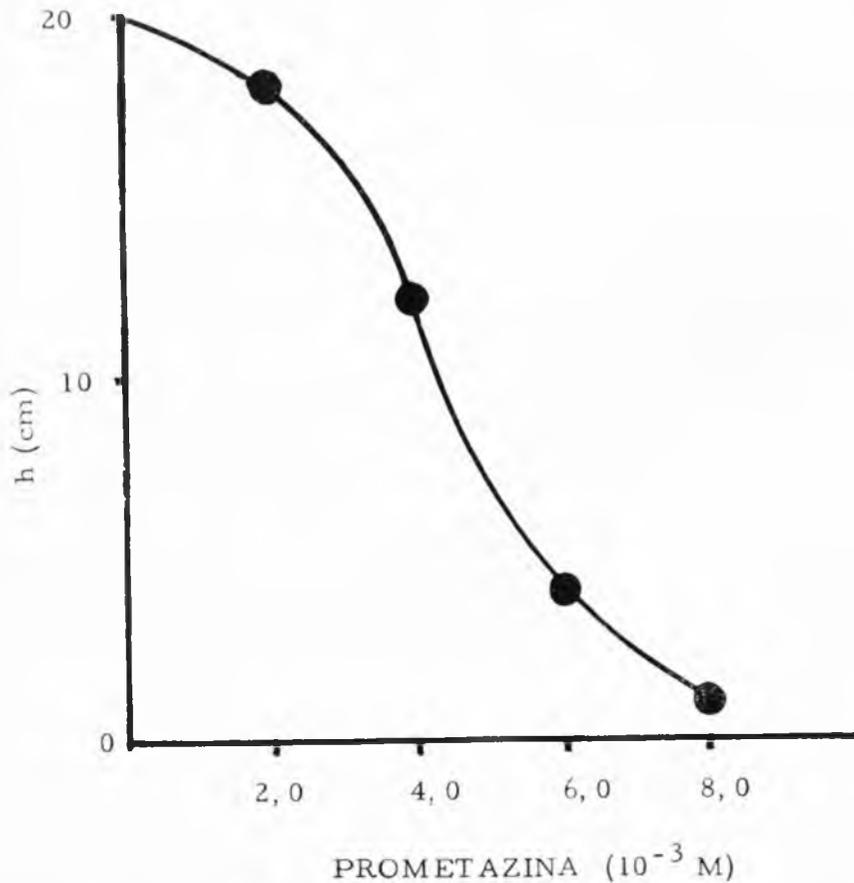


Fig. 5. Relação entre a concentração de prometazina, a altura do gotejamento e a resistência da actomiosina F no momento do impacto da gôta contra a superfície da água destilada.

lar à que se obtém com solução de actomiosina G não adicionada de prometazina. Nêste último caso e dentro das condições da experiência, foi verificado que a altura máxíma de gotejamento para produzir pérola de contornos nítidos de actomiosina F foi de 20 cm.

Sistema: Soluções de actomiosina G contendo 52,0 mg por ml de proteína e variadas concentrações (2.10^{-3} M a 8.10^{-3} M) de prometazina foram gotejadas de distintas alturas sôbre a superfície livre da água destilada contida num recipiente de cristal e de paredes planas, Fig. 1 e 4, até uma altura máxíma que permitisse manter os contornos normais da pérola de actomiosina F formada, Fig. 4A.

A gota de actomiosina G não adicionada de prometazina resistiu ao impacto de uma altura de 20 cm não se deformando, ao passo que, nas demais amostras a altura da queda diminuiu proporcionalmente a concentração de prometazina. Acima das alturas encontradas para cada concentração de prometazina, ocorre alteração na consistência da actomiosina F, na forma descrita na Fig. 4B.

DISCUSSÃO

A adição de fenotiazínicos a preparações mitocondriais funcionantes e estreitamente acopladas inibe o controle da respiração bem como desacopla a fosforilação oxidativa (12), além de lhes modificar a estrutura morfológica (9), o que significa haver de algum modo interferência do fármaco na intimidade do processo funcional, isto é, no transporte de eletrons (13) e (14). Tais efeitos se justificam, ainda, pelo fato de possuírem os fenotiazínicos reatividade química, propriedade doadora de eletrons, excesso de carga apresentada pela configuração atômica na altura dos carbonos, cousa que se evidencia dada a fácil formação de complexos de transferência de carga e a reatividade que tais compostos apresentam para com os reagentes eletrófilos. Por outro lado, o núcleo da tiodifenilamina está formado por dois anéis benzenóides ligados por duas pontes imino e sulfeto situadas em posição orto, os quais interagem através de ambos os anéis, influenciando dêsse modo na distribuição eletrônica e na reatividade dos anéis carbocíclicos (31) e (15).

O anel fenotiazínico possui, no estado normal e estável, órbita completa frenadora e mais alta, podendo ser então um excelente doador monovalente de eletron e capaz de formar complexos estáveis de transferência de carga (23). A formação do complexo seria suportada pela natureza planar do extenso sistema de duplas ligações conjugadas com seu "pool" de eletrons π e os pares isolados de eletrons sôbre os átomos de N e de S (24), (25). Assim,

a direta interferência sobre os mecanismos de transporte de elétrons da mitocôndria cardíaca pode muito bem ser explicada, então, pelos processos de transferência de carga resultantes da formação de complexos entre os fenotiazínicos e os componentes da mitocôndria, sendo tais complexos a causa primeira do mecanismo de inibição da respiração e fosforilação oxidativa, cuja consequência mais remota seria a inibição do trabalho cardíaco, ou ainda a causa responsável pelas modificações do eletrocardiograma normal, nos animais que receberam fenotiazínico (11).

Embora os estudos em microscopia eletrônica de tecido cardíaco não revelem modificações estruturais da mitocôndria ou da proteína contrátil, não se pode afastar a possibilidade de uma lesão molecular, apenas demonstrável tão somente quando se isolam a proteína contrátil ou as referidas partículas sub-celulares. O fato é que os fenotiazínicos possuem acentuada e visível ação sobre a estrutura normal da mitocôndria, bem como sobre as propriedades da proteína contrátil (12), (26).

Os fenotiazínicos são considerados substâncias quelantes (27), e como tal capazes de formar complexos com diversos metais divalentes e trivalentes, muitos deles co-fatores de reações biológicas. Um sinal de "electron spin" de tipo de radical livre, em espectrofotometria de ESR (electron spin resonance) dos compostos coloridos de derivados fenotiazínicos com metais, é fato compatível com a transferência de um elétron doador fenotiazínico para o íon metálico aceptor, deixando um vazio ou elétron desemparelhado para trás (25). Todas as indicações obtidas foram de que o elétron desemparelhado seja o restante de um par isolado de elétrons não ligados originalmente, colocados próximo ao enxofre heterocíclico depois que o outro par foi doado para transferência de carga ou para o processo redox. Esta conclusão está de acordo com outra que aceita ser o tioeter que provê o ligante ou ponto na molécula da fenotiazina, enquanto que a ausência de momento magnético nuclear no enxofre pode explicar o tipo de sinal ESR.

É possível que dentro de um complexo, um elétron de uma das duas moléculas complexantes pode ser transferido para a órbita da outra, fato que pode bem explicar o comportamento dos fenotiazínicos frente às proteínas.

Efetivamente, as proteínas enzimáticas têm capacidade para doar ou receber elétrons e mesmo formar complexos de transporte de carga especialmente aquelas que, como a actomiosina, possuem na sua composição aminoácidos aromáticos (28).

A adição de quantidades diferentes de fenotiazínicos à actomiosina modifica-lhe o comportamento físico-químico e as suas propriedades fundamentais. Para quantificar o fenômeno foi estabelecido um método que se convencionou chamar de "método da gota" (26), pelo qual a actomiosina adicionada de fenotiazínicos e gote-

jada de uma pipeta, em água destilada, mostra comportamento diferente daquela sem fenotiazínico. Nêsse caso a gôta se mantém uniforme, ao passo que no anterior a actomiosina perde a textura, se desfaz completamente, em consequência da total alteração das propriedades inerentes à proteína. A intensidade do efeito depende da concentração de fenotiazínico e da altura com que a gôta é desprendida até a água destilada. No primeiro caso a gôta de actomiosina ao tocar a superfície livre da água passa instantâneamente da forma G para a forma F e sedimenta formando depósito de pequenos globos que se acumulam e se superpõem, ao passo que, sob os efeitos da droga, a proteína se acumula de maneira homogênea e dispersa no fundo do recipiente. A gôta de actomiosina normal suporta o impacto sôbre a água caída de uma altura de aproximadamente 20 cm., ao passo que sob os efeitos do fenotiazínico a gôta se pulveriza tão logo atinge a superfície do liquido, mesmo partindo de alturas bem menores.

Tomando como variáveis a altura da queda da gôta e a concentração do fenotiazínico, foi possível o estabelecimento de curvas perfeitamente demonstrativas da proporcionalidade existente entre a dose e o efeito obtido, fato que confirma a atividade desnaturante do fenotiazínico. Corroborando essa asserção, foi desenvolvido método colorimétrico para dosagem do fenotiazínico livre, em solução e não adsorvido à proteína. Os resultados obtidos na análise quantitativa das misturas onde se fêz variar as proporções de fenotiazínicos e proteína confirmaram os resultados obtidos com o "método da gôta", deixando claro ser real a formação de um complexo entre ambas as substâncias reagentes.

Até que ponto, porém, as considerações acima podem explicar os fenômenos mostrados nas experiências do presente trabalho, é problema ainda a ser confirmado. Várias experiências estão sendo levadas a efeito nêste laboratório com a finalidade de explicar aspectos dêsse importante problema. Dentre outras, determinação da prometazina ligada à actomiosina está sendo efetivada, bem como da possível interrelação química do fenotiazínico com grupos químicos da molécula da actomiosina.

SUMMARY

Interaction between Promethazine and contractile proteins prepared from rabbit striated muscle has been studied by methods based on the fact that the phenothiazinic compound acting upon actomiosine causes a physical change in the protein, which results in the loss of the capability of changing from the F to the G forms. Measurements have been carried out on the effect of Promethazine to cause turbidity when added to a solution of actomiosine G. Furthermore, it has been shown that actiomiosine F is able to re-

move Promethazine from a solution to which both actomiosine F and Promethazine have been added in suitable preparations. When a solution of actomiosine G is dropped over the surface of a column of distilled water, it changes to the F form showing a well rounded and limited drop. However, when actomiosine G is previously treated with Promethazine in suitable concentrations, and it is dropped over the surface of a column of water, the drop of actomiosin F becomes shapeless by losing its physical form. A method, called the "drop method" has been devised in order to quantitate this phenomenon due to the fact that such physical changes in the properties of actomiosine F are related to two parameters: the concentration of Promethazine and the height from which the dropping is carried out on the water surface.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HALPERN, B. N. & DUCROT, R. — *C. R. Soc. Biol.* 140:361, 1946.
2. VIAUD, P. — *Progressus Medicinæ*, 4, 1949.
3. MARTIN, G. J.; BRANDEL, R. & BEILER, J. M. — *Arzn. Forsch.* 6:408, 1956.
4. JINDAL, M. N.; TIWARI, N. M. & KHERDIKAR, P. R. — *Arch. Int. Pharmacodyn.* 129(1/2):166, 1961.
5. STEINER, C. — *Il Farmaco*, 16(12):847, 1961.
6. REUSE, J. J. — Aspects de la pharmacodynamie des dérivés phénothiaziniques. In: *Colloque Intern. sur la chlorpromazine et les médicaments neuroleptiques en thérapeutique psychiatrique*. Paris, Doin, 1956, p. 20.
7. BOISSIER, J. B.; DUMONT, C. & NALÉN, C. — *Arch. int. pharmacodyn.* 128(1/2):187, 1960.
8. JINDAL, M. N. & DESHPANDE, V. R. — *Arch. int. pharmacodyn.* 131(3/4):322, 1961.
9. MEDINA, H. S. G. — Contribuição ao conhecimento da ação farmacodinâmica dos derivados fenotiazínicos. Tese. Curitiba, 1962.
10. DONATELLI, L. & BEANI, L. — *Arch. Sci. Biol.* 36:256, 1952.
11. GERMINIANI, H.; MEDINA, H. & PEREIRA, J. R. — *Ann. Fac. Med. Univ. Paraná*, 4:9, 1961.
12. BACILA, M. & MEDINA, H. — *Nature*, 194:547, 1962.
13. KARREMAN, G.; ISENBERG, I. & SZENT-GYORGYI, A. — *Science*, 130:1191, 1959.
14. SZENT-GYORGYI, A. — *Introduction to a submolecular biology*. New York, Academic Press, 1960.
15. MULLIKEN, R. S. — *J. Am. Chem. Soc.* 72:600, 1950.
16. GLAUZMANN, S. & MIQUEL, J. A. S. — *Acta Allergol.* 2(1):26, 1949.
17. GARCIA BLANCO, J. & VINA, J. — *Rev. Española Fisiol.* 7(4):237, 1951.

18. CYAFFA-BONIFAZ, J. J. & MENDEZ-BAUER, C. — *Arch. Soc. Biol. Montevideo*, 18:87, 1951.
19. GADERMANN, E. & DONAT, K. — *Arch. int. pharmacodyn.* 102:85, 1955.
20. DAWES, G. S. — *Brit. J. Pharmacol.* 1:90, 1946.
21. BARLOW, R. B. — *Introduction to Chemical Pharmacology*. New York, John Wiley, 1955.
22. MALINOW, M. R.; BATTLE, F. & MALAMUD, B. — *Arch. Int. Pharmacodyn.* 102:55, 1955.
23. MICHAELIS, L. — *Chem. Rev.* 16:243, 1935.
24. KARREMAN, G.; ISEMBERG, I. & SZENT-GYORGYI, A. — *Science*, 130:1191, 1959.
25. BORG, D. G. — *Fed. Proc.* 20(3):104, 1961.
26. COSTA, A.; MEDINA, H. & BACILA, M. — Interação de derivados fenotiazínicos com a actomiosina. 1.º Congres. Bras. Farmacologia, São Paulo, 1967.
27. BORG, D. C. & COTZIAS, G. C. — *Fed. Proc.* 19:248, 1960.
28. PULLMAN, B. — *La biochimie électronique*. Paris. Presses Universitaires de France, 1963.
29. MEDINA, H. — Trabalho em preparação.
30. GORDON, M. — *Medicinal Chemistry*, 4(2):1-161, 1967.
31. SZENT-GYORGYI, A. — *Chemistry of muscular contraction*. 2nd ed. New York. Academic Press, 1951.
32. BLAIER, P. V.; PERDUE, J. F. & GREEN, D. E. — Information Exchange Group n.º 1. from the Institute for Enzyme Research. University of Wisconsin, 1965.
33. BACILA, M.; COSTA, A. & MEDINA, H. — *Rev. Fac. Med. Vet.*, S. Paulo, 7(3):511-9, 1966/7.
34. JAHNCHEN, J. K. & KUSCHINSKY, G. — *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. Exp. Path.* 263:375-86, 1969.
35. TELLER, D. N.; DENBER, H. C. B. & KOPAC, M. J. — *Biochem. Pharm.* 16:1397-410, 1967.
36. COSTA, A.; MEDINA, H.; LEPREVOST, A. & BACILA, M. — 1.º Congres. Bras. Farmacol., São Paulo, 1967.
37. MEDINA, H.; DMYTRACZENKO, A. & BACILA, M. — *Biochem. Pharmacol.* 13:461, 1964.
38. COSTA, A.; MEDINA, H. & BACILA, M. — 1.º Congres. Bras. Farmacol., São Paulo, 1967.
39. OVERHOLSER, L. G. & YOE, J. H. — *Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.)*, 14:646, 1942.