OHARA AUGUSTO

EFEITO DE DIFENÓIS SOBRE ALGUNS PROCESSOS OXIDATIVOS

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. GIUSEPPE CILENTO

a meus pais

e

àqueles que me emocionam.

*Ao Prof.Dr. G. Cilento, um agradecimento especial,
pela orientação segura e eficiente.*

Agradeço:

Ao Prof. Dr. F.G. da Nóbrega pelas amostras de citocromo b_5 e NADH citocromo b_5 redutase e pela cooperação amiga.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho. Principalmente aos integrantes dos nossos laboratórios: Adelaide, Alberto, Ana, Carmen, Etelvino, Jacyra, Klaus, ~~Ly~~dia, Olga e Roberto; também ao Divo, José Roberto e Shirley.

À Cida pela revisão do português.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 - Ativação do oxigênio	2
1.2 - O íon superóxido em sistemas biológicos. Papel dos o-difenóis	6
1.3 - Escopo do presente trabalho	15
2. PARTE EXPERIMENTAL	17
2.1 - Material	17
2.2 - Aparelhagem	18
2.3 - Métodos	19
2.3.1 - Preparação e dosagem do citocromo b_5 ..	19
2.3.2 - Preparação e dosagem da NADH-citocro mo b_5 redutase	19
2.3.3 - Preparação de microssomos. Dosagem de proteína	20
2.3.4 - Preparação e dosagem da superóxido dismutase	20
2.3.5 - Obtenção e dosagem da oxihemoglobina ..	20
2.3.6 - Obtenção e dosagem da oximioglobina ..	21
2.3.7 - Dosagem da catalase	21

	Pág.
2.3.8 - Determinação de peróxido de lipídeos...	22
2.3.9 - Formação de adrenocromo	22
2.3.10 - Concentração das hemeproteínas	22
2.3.11 - Atividades NADPH e NADH oxidásica dos microsossomos	22
2.3.12 - Autoxidação do citocromo b ₅	23
2.3.13 - Oxidação da oxihemoglobina e oximio- globina	24
2.3.14 - Solução dos difenóis	25
3. RESULTADOS	26
3.1 - Efeito de o-difenóis sobre as atividades NADPH e NADH oxidásica dos microsossomos	26
3.1.1 - Atividade NADPH oxidásica	26
3.1.1.1 - Efeito da natureza do o-difenol ...	26
3.1.1.2 - Efeito catalítico da adrenalina....	26
3.1.1.3 - Efeito do adrenocromo	30
3.1.1.4 - Atividade NADPH oxidásica estimu- lada por menadiona	33
3.1.2 - Atividade NADH oxidásica	35
3.1.2.1 - Formação de produtos de oxidação da adrenalina	35
3.1.3 - Oxidação simultânea de NADH e NADPH mediada pelos microsossomos	35
3.1.4 - Efeito de o-difenóis sobre a autoxi- dação de componentes das cadeias mi- crossomais	37

	Pág.
3.1.4.1 - Autoxidação do citocromo b_5	37
3.1.5 - Efeito do p-cresol	37
3.2 - Oxidação da oxihemoglobina e oximioglobina catalisada por difenóis	40
3.2.1 - Efeito de variações no tampão	40
3.2.2 - Efeito da concentração do difenol	49
3.2.3 - Efeito da concentração das oxihemepro- teínas	49
3.2.4 - Efeito da catalase e da superóxido di- mutase sobre os processos catalisados..	55
3.2.5 - Efeito de captadores do radical hidro- xila	60
3.2.6 - Complexação do difenol com as oxiheme- proteínas	60
3.2.7 - Efeito da variação da tensão de oxi- gênio	60
3.2.8 - Efeito da p-benzoquinona	61
3.2.9 - Identificação do produto final de redu- ção do oxigênio	61
4. DISCUSSÃO	65
4.1 - Efeito de o-difenóis sobre as atividades NADPH e NADH oxidásica dos microsossomos.....	65
4.2 - Oxidação da oxihemoglobina e oximioglobina catalisada por difenóis	72

ABREVIATURAS

Tiron	-	ácido 1,2-dihidroxibenzeno-3,5-dissulfônico
NADH	-	nicotinamida adenina dinucleotido reduzido
NADP ⁺	-	nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
NADPH	-	nicotinamida adenina dinucleotido fosfato reduzido
FAD ⁺	-	flavina adenina dinucleotido
FADH	-	flavina adenina dinucleotido reduzido
Dopa	-	3,4-dihidroxi fenil alanina
Tris	-	tris(hidroximetil)-aminometano
EDTA	-	ácido etileno diamino tetracético
HbO ₂	-	oxihemoglobina
HbFe ³⁺	-	methemoglobina
MbO ₂	-	oximioglobina
HRP	-	peroxidase de rabanete

1. INTRODUÇÃO

1.1 - ATIVAÇÃO DO OXIGÊNIO

A ocorrência universal do oxigênio, bem como a sua formação em sistemas biológicos através da fotossíntese, frequentemente nos faz esquecer que existe somente um equilíbrio metaestável entre material orgânico e o oxigênio. Fornecendo-se a energia de ativação necessária, os compostos orgânicos reagem com o oxigênio produzindo grande quantidade de energia. Estas duas características do oxigênio, isto é, inércia por um lado e alto potencial de oxidação por outro, são as principais responsáveis pela posição única que o oxigênio ocupa na energética do processo vital (GEORGE, 1965). Mas, embora justifiquem a "conveniência do oxigênio", estas mesmas propriedades colocam sérios problemas mecanísticos para o metabolismo do oxigênio molecular.

Considerando as propriedades do oxigênio molecular, constata-se que os possíveis mecanismos de redução, tanto o iônico como o de radical, apresentam problemas cinéticos.

O oxigênio molecular apresenta um estado fundamental triplete. Por outro lado, seus produtos estáveis de redução (H_2O_2 e H_2O), bem como essencialmente todos os compostos orgânicos apresentam um estado fun

damental singlete. A reação direta de uma molécula triplete com uma molécula singlete para dar produtos singlete, é um processo proibido pela conservação do spin, ou seja, é uma reação lenta. Por outro lado, a redução do oxigênio por passos consecutivos de um eletrón, é um processo permitido pela conservação do spin, e leva aos intermediários:

E'^0 (volts)

Contudo, pelos valores dos potenciais de óxido-redução (GEORGE, 1965), constata-se que para a redução se processar por este mecanismo, é necessário vencer a alta barreira de energia livre para o primeiro passo.

Para explicar a rapidez com a qual o oxigênio reage em condições fisiológicas, tem sido postulada alguma "ativação do oxigênio" desde as primeiras investigações em oxidações biológicas (TRAUBE, 1882; ENGLER, 1897; BACH e CHODAT, 1903; WARBURG, 1949) mas até hoje, a natureza dessa forma ativa permanece uma questão não elucidada totalmente. De fato, com os conhecimentos

atuais sobre as reações enzimáticas do oxigênio, conclui-se que não existe uma única espécie que possa ser chamada "oxigênio ativo". Assim vários mecanismos, frequentemente os mesmos encontrados em reações não enzimáticas, têm sido sugeridos para as reações biológicas do oxigênio molecular (HAMILTON, 1974). Passaremos a resumir os mais importantes.

Oxigênio singlete. Em vista das propriedades descritas acima, torna-se compreensível que o estado singlete excitado venha sendo sugerido como a forma ativa do oxigênio em muitas reações biológicas (FOOTE e DENNY, 1968; POLITZER e col., 1971; WASSERMAN e col., 1972). Apesar das objeções levantadas, principalmente no que se refere ao provimento, por uma enzima, da energia eletrônica de 22 Kcal (HAMILTON, 1974), começam a aparecer na literatura mais e mais indicações do envolvimento dessa espécie em sistemas bioquímicos.

Oxenõide. Estudos de hidroxilação enzimática de substratos aromáticos mostraram que durante a reação, o substituinte é deslocado pelo grupo hidroxila que entra, migrando para uma posição adjacente do anel aromático. Baseados em estudos extensivos deste fenômeno, postulou-se que o agente oxidante em muitas reações das oxigenases é uma espécie capaz de transferir um átomo de oxigênio ao substrato. Este mecanismo é chamado oxenõide (DALY e col., 1968; JERINA e col., 1970; 1971; BOYD e col., 1972; HAMILTON, 1974).

Complexo com metais de transição. A ativação do oxigênio por algumas das enzimas que contêm metais de transição, tem sido justificada pela complexação do oxigênio molecular triplete com o íon metálico, que possui ele próprio eletrons desemparelhados (HAMILTON, 1969; HAMILTON, 1974). Num complexo deste tipo só se pode falar do número de eletrons desemparelhados do complexo como um todo. E assim, sua reação com um composto singlete pode ser permitida pela regra de conservação do spin.

Espécies reduzidas. Também têm sido consideradas como possíveis formas ativas do oxigênio, seus intermediários de redução [Eq. (1.1)-(1.4)]. Até há pouco, os bioquímicos não acreditavam que espécies tão reativas, como O_2^- e $\cdot OH$, pudessem ser formados em oxidações biológicas normais. Contudo, a partir de 1969, tornou-se evidente que o íon superóxido é formado em muitas reações enzimáticas e não enzimáticas de importância biológica. A alta barreira de energia livre para o primeiro passo [Eq (1.1)], pode ser vencida pela estabilização, ou do íon O_2^- intermediário (WEISS, 1953; YAMAZAKI, 1966) ou do radical da molécula que reage com o oxigênio (HAMILTON, 1974). O papel do íon superóxido em reações enzimáticas será abordado no tópico 1.2. A H_2O_2 em condições fisiológicas e na ausência de um catalisador, é uma molécula pouco reativa, a não ser que possa atuar como nucleófilo (JENCKS, 1969). Contudo, ela pode ser

quimicamente alterada, dando compostos mais reativos; vários peróxidos modificados como perácidos, peramidas, carbonil óxidos podem estar envolvidos em reações das oxigenases (HAMILTON, 1974). Embora, a participação do radical $\cdot\text{OH}$ em processos biológicos ainda seja discutível, existem reações que poderiam levar a sua formação em condições fisiológicas. Assim, pela reação de Fe(II) e Cu(I) de metaloenzimas com H_2O_2 (NORMAN e SMITH, 1965; PRYOR, 1966); pela reação entre O_2^- e H_2O_2 (HABER e WEISS, 1934); durante a autooxidação de certos agentes citotóxicos (COHEN e HEIKKILÄ, 1974). Mais recentemente, por métodos indiretos, ELSTNER e KONZE (1975) sugeriram que lamelas de cloroplastos, no escuro, reduzem O_2 às expensas de NADPH, produzindo $\cdot\text{OH}$.

1.2 - O ÍON SUPERÓXIDO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS. PAPEL DOS o-DIFENÓIS

CILENTO e ZINNER (1966, 1967a, 1967b), constataram que o-difenóis, incluindo catecolaminas, aceleravam a autooxidação de p-hidroquinona, p-fenilenodiaminas e a dos próprios o-difenóis. A primeira explicação aventada foi a de que os o-difenóis ativariam a molécula de oxigênio, formando com esta um complexo de transferência de carga.

Eram recentes, na literatura, as sugestões sobre a formação do íon superóxido em reações enzimáticas e sobre a possibilidade de o-difenóis atuarem co-

mo captadores daquele íon. Assim, HANDLER e col. (FRIDOVICH e HANDLER, 1961, 1962; RAJAGOPLAN e col., 1962; HANDLER e col., 1964) sugeriram que a redução do citocromo c mediada pela xantina, aldeído oxidase e dihidrorrótico desidrogenase, era devida à prévia formação do íon superóxido, pelo ferro não heminico destas enzimas. A primeira fonte de evidência para este mecanismo veio de estudos com o agente quelante de Fe(III), Tiron; este composto parecia comportar-se como um inibidor competitivo do citocromo c perante a xantina oxidase e aldeído oxidase (FRIDOVICH e HANDLER, 1962). Além de inibir a redução do citocromo c, o Tiron inibia a iniciação da oxidação aeróbica do sulfito e a indução da quimiluminescência do luminol, propriedades daquelas enzimas explicadas pela formação do íon superóxido; isto levou HANDLER e col. (1964) a sugerirem que o Tiron reagia com o íon superóxido por um mecanismo desconhecido. MILLER e MASSEY (1965) constataram que a dihidrorrótico desidrogenase apresentava uma atividade "citocromo c oxidase", induzida por Tiron. Os autores sugeriram que o Tiron reagia com o íon superóxido ligado à enzima, oxidando-se; seus produtos de oxidação, por sua vez, oxidariam o citocromo c e regenerariam a estrutura o-difenólica.

Finalmente, KNOWLES e col. (1969) identificaram conclusivamente por EPR, o íon superóxido num sistema bioquímico, justamente durante a oxidação de substratos catalisada pela xantina oxidase a pH 10.

Nesta mesma época surgiu um instrumento analítico fundamental para investigar a participação do íon superóxido em oxidações biológicas: a superóxido dismutase. Durante os estudos com a xantina oxidase observou-se que além do Tiron, certas preparações de proteínas inibiam especificamente as propriedades da xantina oxidase devidas ao íon superóxido, sendo inativas sobre a atividade enzimática (FRIDOVICH, 1962; 1967). Estes estudos levaram à descoberta da enzima superóxido dismutase (Mc CORD e FRIDOVICH, 1969a,b) que catalisa a reação:

A superóxido dismutase, isolada de coração e eritrócitos bovino, mostrou-se idêntica a uma metaloproteína anteriormente isolada de várias fontes, cuja atividade enzimática era desconhecida e que recebera várias denominações: hemocupreína, eritrocupreína, hepatocupreína, cerebrocupreína ou citocupreína (MANN e KEILIN, 1938; MARKOWITZ e col., 1959; KIMMEL e col., 1959; STANSELL e DEUTSCH, 1965; HATZ e DEUTSCH, 1969).

Paralelamente, CILENTO e col.(1967c;1967d; 1968; ARAUJO e CILENTO, 1969) dando continuidade aos estudos iniciados com os o-difenóis, constataram a catálise de reações de autooxidação também por N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamina, p-fenilenodiamina e íon iodeto, sendo que em algumas destas catálises foi observado efeito de saturação em relação ao catalisador. Complementando a primeira

hipótese apresentada, ARAUJO e col. (1970) sugeriram que os o-difenóis ativavam o oxigênio, reagindo com o íon superóxido no ato de formação. Assim, em complexos de oxigênio deve ocorrer uma considerável transferência eletrônica, contudo, como o íon superóxido é formado na "gaiola de solvente", existe grande tendência de retorno do elétron; uma maneira de ativar o oxigênio seria simplesmente o fornecimento do segundo elétron ao íon superóxido, o que pode ser conseguido com um redutor. Concomitantemente, MILLER (1970) constatou que os o-difenóis atuavam como captadores do íon superóxido.

De fato, a reação de o-difenóis com o íon superóxido tornou-se um instrumento analítico complementar à superóxido dismutase, para indicar a participação daquele íon em reações de oxido-redução. Em primeiro lugar, a superóxido dismutase capta o íon superóxido livre em solução, enquanto que os o-difenóis podem captar o íon superóxido no ato de sua formação, ou seja, ainda ligado ao sítio ativo (ARAUJO e col., 1970; MILLER e PARUPS, 1971; MILLER e RAPP, 1973; MILLER e MACDOWALL, 1975). Por outro lado, a superóxido dismutase inibe processos nos quais o íon superóxido é um intermediário, sendo inativa sobre processos nos quais aquele íon é um produto final. Entretanto, os o-difenóis reagem com esse superóxido final, formando produtos que podem ser identificados por métodos simples (Mc CORD e FRIDOVICH, 1969b; RAPP e col., 1973; COHEN e HEIKKILA, 1974), ou, aumentando a velocidade do processo, se a espécie gerada pela co-oxidação

do o-difenol for capaz de oxidar o substrato (MILLER e MASSEY, 1965; ARAUJO e col., 1970; AUGUSTO e col., 1973). Assim, embora ainda não esteja devidamente elucidado o mecanismo da reação de o-difenóis com o íon superóxido, principalmente a reação com a adrenalina, tem sido amplamente utilizada na detecção do íon superóxido como produto final de um processo.

A superóxido dismutase e os o-difenóis tem sido os principais instrumentos analíticos para a constatação da formação ou participação do íon superóxido, em reações enzimáticas e não enzimáticas de importância bioquímica.

Além da xantina e da aldeído oxidase que possuem em comum FAD, molibdenio e centros de ferro e enxofre como grupos prostéticos, várias outras ferro-flavoproteínas, incluindo dihidroorótico desidrogenase e ferredoxina-NADPH redutase, são capazes de produzir o íon superóxido. Foi sugerido por MASSEY e col. (1969a,b) que somente flavoproteínas desidrogenases são capazes de gerar o íon superóxido livre; as oxidases reduzem o oxigênio bivalentemente, enquanto as hidroxilases formam o íon superóxido, que permanece ligado à enzima.

A formação do íon superóxido por ferroproteínas que contêm enxofre foi primeiramente observada durante o processo de reativação aeróbica destas enzimas (ORME-JOHNSON e BEINERT, 1969; MISRA e FRIDOVICH,

1971b). Recentemente, estudou-se os sistemas:ferredoxina de espinafre, ferredoxina adrenal e rubredoxina e suas respectivas NADPH-redutases. Os resultados mostraram que a formação aeróbica do íon superóxido é dependente de NADPH (NAKAMURA e KIMURA, 1972; CHU e KIMURA, 1973; MAY e col., 1973).

A existência de complexos ternários de oxigênio, substrato e enzimas de oxido-redução, tem sido amplamente demonstrada (BORS e col., 1974) e se acredita que eles sejam intermediários comuns durante as reações das oxigenases (HAYAISHI e NOZAKI, 1969). De fato, a formação de tais complexos foi constatada para mono e dioxigenases, embora a formação do íon superóxido não seja evidente para todos esses sistemas. No caso do citocromo P_{450} , a formação intermediária de superóxido complexado durante a sequência de transferência de elétrons, foi primeiramente verificada no sistema hidroxilante reconstituído de microsossomos de fígado de rato (STROBEL e COON, 1971). Para a enzima triptofano 2,3-dioxigenase, tem sido postulada a participação do íon superóxido durante a reação enzimática (HIRATA e HAYAISHI, 1971) bem como durante a ativação redutiva da enzima (BRADY e col., 1971; BRADY e FEIGELSON, 1973). No caso da peroxidase, a titulação da enzima com H_2O_2 leva à formação de cinco compostos: ferroperoxidase, compostos I, II e III e ferriperoxidase (NOBLE e GIBSON, 1970; ODAJIMA e YAMAZAKI, 1970; TAMURA e col., 1972). Existem várias evidências de que o íon superóxido é a espécie ativa do composto III, formu

lado como $\text{HemeFe}^{3+} \dots \text{O}_2^-$ (NAKAMURA e YAMAZAKI, 1969; ODAJIMA, 1971; ODAJIMA e YAMAZAKI, 1972; ROTILIO e col., 1975); foi também identificado o composto III, possuindo estrutura superoxo-ferriheme no caso da mieloperoxidase (ODAJIMA e YAMAZAKI, 1972). Além disso, têm sido consideradas fontes potenciais de íon superóxido, adutos oxigenados de proteínas hemínicas, das quais a peroxidase e mieloperoxidase são exemplos. De fato existem evidências de produção do íon superóxido durante a autooxidação da oxihemoglobina (MISRA e FRIDOVICH, 1972b; WEVER e col., 1973), das cadeias α e β da hemoglobina humana (BRUNORI e col., 1975), da oximioglobina (AUGUSTO e CILENTO, 1975) e da oxiperoxidase (ROTILIO e col., 1975).

O envolvimento do íon superóxido tem sido constatado em vários outros sistemas bioquímicos, como oxidases que contêm cobre, no caso da diamino oxidase (ROTILIO e col., 1970) e galactose oxidase (KMIA-TROWSKI e KOSMAN, 1973). Outro sistema que vem recebendo muita atenção como fonte de íon superóxido, é o dos cloroplastos (ELSTNER e KRAMER, 1973; ALLEN e HALL, 1973; ELSTNER e HEUPEL, 1974a,b; ELSTNER e col., 1975). Em organelas subcelulares, a produção de H_2O_2 no mitocondria (CHANCE e col., 1972), levou à sugestão de que o íon superóxido poderia ser formado intermediariamente; de fato existem evidências de produção do íon superóxido em partículas submitocondriais obtidas por ultrasonicação (BOVERIS e CADENAS, 1975). E, em pelo menos um caso,

o íon superóxido parece ser produzido por uma célula. Assim, durante a fagocitose ativa de leucócitos existem evidências da formação do íon superóxido, e de que este seja um componente essencial das reações que levam à destruição do microorganismo fagocitado (FRIDOVICH, 1974).

A formação do íon superóxido em sistemas biológicos levanta o problema de sua função em tais sistemas. Existem três linhas principais de pensamento quanto a esse papel e o da superóxido dismutase.

FRIDOVICH (1975) propôs que a toxidez do oxigênio aos organismos vivos é devida ao radical hidroxila formado pela reação entre o íon superóxido e H_2O_2 (HABER e WEISS, 1934). Para minimizar ou prevenir a reação de HABER-WEISS, existem enzimas específicas que agem como captadoras do íon superóxido (superóxidos dismutases) e de H_2O_2 (catalases e peroxidases), mantendo a concentração de estado estacionário dessas espécies num nível bastante baixo. De fato, o autor considera a distribuição generalizada dessas enzimas entre os organismos aeróbicos como evidência daquele papel protetor. Isto concorda com seus resultados (Mc CORD e col., 1971) que em bactérias, a aerobiose, aerotolerância e anaerobiose obrigatória, estão relacionadas com o conteúdo de superóxido dismutase e catalase; também com o fato de que a superóxido dismutase, em Escherichia coli e Streptococcus faecalis, é induzida por oxigênio hiperbárico (GREGORY e FRIDOVICH, 1973).

Segundo FINAZZI AGRO e col.(1972); WESER e col. (WESER e PASCHEN, 1972; PASCHEN e WESER, 1973; ZIMMERMANN e col., 1973), a função essencial da superóxido dismutase é a de suprimir o oxigênio singlete e não a dismutação do íon superóxido. O oxigênio singlete pode, inclusive, ser formado através da dismutação do íon superóxido (KHAN, 1970).

Além disso, o aumento da quimiluminescência durante certas reações de oxidação, que anteriormente era considerado evidência da participação do íon superóxido, atualmente vem sendo tomado como indicação da presença de oxigênio singlete (ARNESON, 1970; FINAZZI AGRO e col., 1972; HOWES e STEELE, 1972; WESER e PASCHEN, 1972). De fato, pela inibição acumulativa da superóxido dismutase e catalase, ARNESON (1970) sugeriu uma modificação no ciclo de HABER-WEISS, incluindo a reação [Eq.(1.9)] como fonte de oxigênio singlete:

Além do íon superóxido, outras possibilidades de formação do oxigênio singlete em reações biológicas, têm sido levantadas (POLITZER e col., 1971). PASCHEN e WESER (1973)

observaram a alta eficiência de pequenas quantidades de superóxido dismutase, como supressor biológico de oxigênio singlete. Contudo, existem controvérsias quanto a esse ponto (MICHELSON, 1974; PASCHEN e WESER, 1975).

FRIED e col. (1973) aventam a hipótese de que o íon superóxido é uma espécie necessária em reações enzimáticas de oxidação e hidroxilação; as enzimas catalase e superóxido dismutase teriam simplesmente uma função reguladora.

Obviamente, a função do íon superóxido em sistemas biológicos continua desconhecida. Não foi ainda possível uma caracterização de fatores comuns como distribuição e localização celular, estrutura e função metabólica das enzimas, que produzem o íon superóxido. Falta também uma melhor compreensão a respeito das reações do íon superóxido com componentes dos ácidos nucleicos, com peptídeos, com lipídeos, enfim, com biomoléculas.

1.3 - ESCOPO DO PRESENTE TRABALHO

Este trabalho foi iniciado, tendo como base as hipóteses sugeridas neste laboratório, sobre a ativação do oxigênio por o-difenóis. Tentando compreender melhor este processo, ensaiamos o-difenóis e compostos relacionados sobre sistemas bioquímicos que, potencialmente, poderiam formar o íon superóxido. Assim, eles

foram ensaiados sobre as atividades NADPH e NADH oxidásica dos microsossomos e sobre dois componentes das cadeias microsossomais de transporte de eletrons, a NADH citocromo b_5 redutase e o citocromo b_5 . Estudamos, também, o efeito de difenóis sobre a autooxidação da oxihemoglobina e oximioglobina. Antecipamos que tal estudo poderia trazer informações sobre a discutida estrutura destas oxiferroporfirinas.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 - MATERIAL

NADH, NADPH, adrenalina, noradrenalina, L-Dopa, D-Dopa, adrenocromo, catalase de fígado bovino, hemoglobina de eritrócitos de ovelha tipo III, ou de sangue bovino tipo I, mioglobina de músculo esquelético equino tipo I, ditiotreitol e albumina de soro bovino, foram obtidos da "Sigma Chemical Company" (St. Louis, Mo).

Catecol ("BDH") foi recristalizado de tolueno (PF = 104-105°C; P.F. descrito = 105°C; "The Merck Index").

p-Hidroquinona ("May and Baker") foi recristalizada de água P.F. = 170-171°C; P.F. descrito = 170-171°C, "The Merck Index").

p-Benzoquinona ("Pfaltz & Bauer") foi purificada por sublimação (PF = 115-116°C; P.F. descrito = 115,7°C).

Menadiona foi recristalizada de benzeno P.F. = 105-107°C; P.F. descrito = 105-107°C, "The Merck Index").

p-Cresol ("Carlo Erba") foi purificado por destilação à pressão reduzida (P.E./10 mmHg = 88,6°C, "The Merck Index").

Reagente de Folin foi adquirido da "Merck".

Sephadex G-25 foi adquirida da "Pharmacia" (Uppsala-Sweden).

Na preparação dos tampões (GOMORI, 1955), o monohidrogeniofosfato de potássio era da "May and Baker", o dihidrogeniofosfato de potássio da "Carlo Erba", enquanto que o Tris era da "Merck". O EDTA utilizado era da "HARLECO".

As demais drogas utilizadas eram de pureza analítica.

A água utilizada era deionizada.

2.2 - APARELHAGEM

Para medidas de consumo ou de evolução de oxigênio usou-se um "Precision Warburg Apparatus", segundo técnicas convencionais, e também um monitor Biológico de Oxigênio "Yellow Springs Instruments".

Os valores de pH foram lidos num potenciômetro "Metrohm E 388".

Os espectros de absorção de luz e os valores de absorbância a comprimento de onda fixo, no visível e no ultravioleta, foram obtidos principalmente num espectrofotômetro "Zeiss DMR 21 termostatizado, e, ocasionalmente, em espectrofotômetros "Zeiss PMQ II" e "Cary 14".

Foram utilizadas geralmente celas de vidro ou quartzo com 1,0 cm de caminho óptico e 3,7 ml de capacidade. As reações em anaerobiose foram realizadas em celas de Thunberg, em atmosfera de nitrogênio puro.

Regressões lineares foram executadas num "Model 10 Calculator Hewlett-Packard".

2.3 - MÉTODOS

2.3.1 - Preparação e dosagem do citocromo b_5

O citocromo b_5 foi obtido de fígado de galinha; a preparação e a dosagem do citocromo b_5 foram executadas segundo NOBREGA e col. (1969).

2.3.2 - Preparação e dosagem da NADH-citocromo b_5 redutase |E.C.1.6.2.2. |

A NADH citocromo b_5 redutase foi preparada e dosada segundo STRITTMATTER (1967).

2.3.3 - Preparação de microsossomos. Dosagem de proteína

Os microsossomos de fígado de ratos adultos, machos, da raça Wistar foram preparados de acordo com FRANKLIN e ESTABROOK (1971). Após a última lavagem, os microsossomos foram ressuspensos em tampão fosfato-glicerol (7:3; v/v) contendo ditioneitol $1.10^{-3}M$, EDTA $1.10^{-4}M$, sendo 7,6 o pH final (NISHIBAYASHI e SATO, 1968). A dosagem de proteína foi feita pelo método de Lowry, modificado por HARTREE (1972). Após essa determinação, a suspensão de microsossomos foi conservada a $-15^{\circ}C$, dividida em alíquotas pequenas para serem descongeladas uma única vez, no momento do uso.

2.3.4 - Preparação e dosagem da superóxido dismutase [E.C.1.15.1.1]

A superóxido dismutase foi preparada a partir de sangue bovino segundo Mc CORD e FRIDOVICH (1969); a atividade foi determinada segundo MISRA e FRIDOVICH (1972a).

2.3.5 - Obtenção e dosagem da oxihemoglobina

A oxihemoglobina foi obtida pela redução do produto comercial; 55 mg foram dissolvidos em 2,0 ml de tampão fosfato 0,05M, pH 7,8 e reduzidos com ditionito de sódio em anaerobiose. Imediatamente após a

redução, a mistura de reação foi separada em uma coluna de Sephadex G-25 fina, equilibrada com o mesmo tampão saturado com nitrogênio; nas frações mais concentradas em proteína foi borbulhado oxigênio. A oxihemoglobina assim obtida, era mantida a 0°C e usada desde que a razão entre as absorbâncias A_{577}/A_{540} fosse maior ou igual a 1,04 (BENESCH e BENESCH, 1961).

A concentração foi determinada espectrofotometricamente a 577 nm, utilizando-se $\epsilon = 14.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (WEVER e col., 1973).

2.3.6 - Obtenção e dosagem da oximioglobina

A oximioglobina foi obtida de maneira análoga à descrita para a oxihemoglobina e usada desde que a razão entre as absorbâncias A_{582}/A_{543} fosse maior ou igual a 1,02 (HASASHI e col., 1973). A concentração foi determinada espectrofotometricamente a 582 nm, utilizando-se $\epsilon = 16.300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (HASASHI e col., 1973).

2.3.7 - Dosagem da catalase |E.C.1.11.1.6|

A catalase foi dosada espectrofotometricamente acompanhando-se a queda da absorbância da H_2O_2 a 240 nm. Uma unidade de catalase foi definida como aquela quantidade que decompõe 1,0 μmol de H_2O_2 por minuto a pH 6,8 e 25°C, enquanto a concentração de H_2O_2 cai de 10,3 a 9,2 μmoles por ml da mistura de reação.

2.3.8 - Determinação de peroxidação de lipídeos

A peroxidação microsomal de lipídeos foi determinada pela formação de malonaldeído; este foi dosado pelo método do ácido tiobarbitúrico, segundo NAKANO e col. (1971).

2.3.9 - Formação de adrenocromo

A formação de adrenocromo foi acompanhada a 480 nm, utilizando-se $\epsilon = 4020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (MISRA e FRIDOVICH, 1971a).

2.3.10 - Concentração das hemoproteínas

Para as experiências manométricas, as hemoproteínas foram concentradas por ultrafiltração sobre uma membrana Amincon UM-2.

2.3.11 - Atividades NADPH e NADH oxidásica dos microsomos

As atividades NADPH e NADH oxidásica dos microsomos foram acompanhadas manometricamente, pelo consumo de oxigênio e espectrofotometricamente, pelo desaparecimento da absorção dos coenzimas reduzidos a 340 nm.

As experiências manométricas foram realizadas a $25,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, em frascos de Warburg, com aproximadamente 20 ml de capacidade, sendo 3,1 ml o volume final da mistura de reação. O solvente foi tampão fosfato cuja concentração e pH foram variados entre 0,2-0,4M

e 6,5-8,0, respectivamente; concentração dos nucleótidos foi $1,0 \cdot 10^{-2} \text{M}$ e a concentração dos microsossomos foi de 0,32 mg proteína/ml. A reação foi iniciada pela adição do piridino nucleótido.

As experiências espectrofotométricas foram realizadas em tampão fosfato 0,4M a diferentes pH (6,5-8,0), temperatura ($25-40^{\circ}\text{C}$) e força iônica (adição de NaCl, 0,25-0,40M). A concentração dos nucleótidos foi $1,0 \cdot 10^{-4} \text{M}$ e a concentração dos microsossomos de 0,50 mg proteína/ml; o volume final da mistura de reação foi 3,0 ml. A reação foi iniciada pela adição do coenzima reduzido.

2.3.12 - Autoxidação do citocromo b_5

A autoxidação do citocromo b_5 reduzido foi acompanhada espectrofotometricamente, pelo desaparecimento da absorção do NADH, a 340 nm. Ao se estudar o efeito de o-difenóis sobre esta autoxidação, preparou-se um sistema contendo NADH, a redutase e o citocromo b_5 ; durante o decréscimo linear da absorbância a 340 nm, adicionou-se 5 μ l de solução de o-difenol. O solvente foi tampão tris-acetato 0,1M, pH 7,28, contendo EDTA $1,0 \cdot 10^{-3} \text{M}$. Utilizou-se celas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e 0,7 ml de capacidade, sendo 0,5 ml o volume final da mistura de reação.

2.3.13 - Oxidação da oxihemoglobina e da oximioglobina

A oxidação das oxihemoproteínas à forma ferri foi acompanhada espectrofotometricamente a 430 nm ou 630 nm, no caso de soluções concentradas. Foram usados os seguintes valores para a variação dos coeficientes de extinção: $\Delta\epsilon_{430} = 35.000\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e $\Delta\epsilon_{630} = 3800\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ para a oxihemoglobina; para a oximioglobina utilizou-se $\Delta\epsilon_{430} = 52.000\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e $\Delta\epsilon_{630} = 3.600\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Estes valores de $\Delta\epsilon$ são a média dos valores determinados pela oxidação total das hemoproteínas com ferricianeto e p-benzoquinona.

A evolução de oxigênio durante a oxidação foi determinada quantitativamente por manometria em Warburg, com frascos de aproximadamente 13 ml de capacidade.

Para detectar a formação de H_2O_2 e peróxidos como intermediários da oxidação, foram retiradas alíquotas da mistura de reação, adicionando-as a ácido tricloroacético gelado, para uma concentração final de 5%. Após centrifugação, adicionou-se ao sobrenadante excesso de NaI e em seguida benzeno.

Para acompanhar uma eventual variação da concentração do difenol durante a oxidação catalisada, procedeu-se como para a determinação de H_2O_2 . Após a

centrifugação, determinou-se o espectro visível e ultravioleta do sobrenadante.

A não ser quando diferentemente especificado, as experiências foram realizadas em tampão fosfato 0,05M, pH 6,8, contendo EDTA $1,0 \cdot 10^{-4}$ M a 37°C, sendo 3,0 ml o volume final da mistura de reação.

Expressou-se as velocidades como decréscimo da absorbância a 430 nm/min. na fase linear, ou seja, após o período de indução.

Os resultados aqui apresentados foram obtidos com oxihemoglobina bovina, contudo, resultados essencialmente idênticos foram obtidos com oxihemoglobina de ovelha.

2.3.14 - Solução dos difenóis

As soluções dos difenóis foram preparadas imediatamente antes do uso.

3. RESULTADOS

3.1 - EFEITO DE o-DIFENÓIS SOBRE AS ATIVIDADES NADPH E NADH OXIDÁSICA DOS MICROSSOMOS

3.1.1 - Atividade NADPH oxidásica

Observamos, que a atividade NADPH oxidásica - processo pelo qual os microssomos catalisam um consumo de oxigênio dependente de NADPH, na ausência de substrato - é aumentada de duas a três vezes por adrenalina. Um resultado representativo aparece na Figura 1.

3.1.1.1 - Efeito da natureza do o-difenol

Dentre os o-difenóis, testados, catecol, noradrenalina, D-Dopa, L-Dopa, e adrenalina, somente este último aumentou o consumo de oxigênio em presença de NADPH. O efeito específico da adrenalina foi confirmado, acompanhando-se espectrofotometricamente o desaparecimento do coenzima reduzido (FIG. 2, TAB. I).

3.1.1.2 - Efeito catalítico da adrenalina

A magnitude do efeito da adrenalina sobre a atividade NADPH oxidásica mostrou-se insensível à força iônica (NaCl 0,25 - 0,40M), ao pH (7,5-8,0) e à temperatura (25-40°C). Da mesma forma, a adição de NaCN $1 \cdot 10^{-3}M$, não influi no efeito da adrenalina.

FIGURA 1. Efeito catalítico da adrenalina ($2,0 \cdot 10^{-4} M$) sobre a autooxidação do NADPH ($1,0 \cdot 10^{-2} M$) mediada por microsossomos (0,32 mg de proteína/ml), em tampão fosfato 0,2M pH 7,5 a $25^{\circ}C$. Curva inferior: sistema em ausência de adrenalina.

FIGURA 2. Efeito catalítico da adrenalina ($1,0 \cdot 10^{-5} M$) sobre a oxidação do NADPH ($1,0 \cdot 10^{-4} M$) mediada por microsossomos (0,5 mg de proteína/ml) em tampão fosfato 0,4M contendo NaCl 0,4M, pH 8,0 a 35°C. Curva superior: sistema em ausência de adrenalina.

TABELA I

Efeito da natureza do o-difenol ($1,0 \cdot 10^{-5}M$) sobre a atividade NADPH oxidásica dos microsossomos. As condições experimentais foram as mesmas da Figura 2

o-difenol	$\Delta A_{340}/\text{min.}$ ($\times 10^2$)
-	3,4
adrenalina	11,0
noradrenalina	3,0
L-DOPA	3,3
D-DOPA	3,5
Catecol	3,4

Por outro lado, o efeito é completamente suprimido pela superóxido dismutase adicionada antes do início da reação; se adicionada após o período de indução, a enzima não tem qualquer efeito sobre o processo catalisado. Resultados representativos aparecem na Tabela II.

O período de indução, sempre presente na atividade NADPH oxidásica catalisada por adrenalina, não é removido pela pré-incubação durante cinco minutos, dos microsossomos com adrenalina ou com NADPH; também não é removido por adrenocromo $1,0 \cdot 10^{-6} M$.

A Figura 3 mostra que durante o processo catalisado pela adrenalina, ocorre formação praticamente quantitativa de adrenocromo.

O efeito da adrenalina não é exercido sobre a peroxidação endôgena de lipídeos, porque nas condições experimentais empregadas, a pequena formação de malonaldeído não foi alterada. Além disso, se os microsossomos são pré-incubados com NADPH até oxidação total do coenzima reduzido e se novamente é adicionado NADPH, agora em presença de adrenalina, o efeito desta sobre a velocidade de desaparecimento do NADPH, é o mesmo que o observado sem a pré-incubação.

3.1.1.3 - Efeito do adrenocromo

O adrenocromo em baixas concentrações ($1,0 \cdot 10^{-6} M$) não elimina o período de indução; contudo, quando usado em concentrações maiores ($5,0 \cdot 10^{-6}$ -

FIGURA 3. Formação de adrenocromo (A₄₈₀) durante a autoxidação do NADPH (A₃₄₀) mediada por microsomos. As condições experimentais foram as mesmas da Figura 2.

TABELA II

Efeito catalítico da adrenalina sobre a oxidação do NADPH
($1,0 \cdot 10^{-4} M$) mediada por microsossomos (0,5 mg proteína/ml)
em tampão fosfato 0,4M

pH	Adrenalina	$\Delta A_{340}/\text{min}$ ($\times 10^2$)		
7,5	-	3,4		25°C
7,5	$10^{-4} M$	9,8		25°C
7,5	$10^{-4} M + CN^{-a}$	10,0		25°C
7,5	-	4,0	0,25M NaCl;	35°C
7,5	$10^{-4} M$	11,4	0,25M NaCl;	35°C
8,0	-	3,5	0,25M NaCl;	35°C
8,0	$10^{-4} M$	13,4	0,25M NaCl;	35°C
8,0	$10^{-4} M + SD^b$	3,7	0,25M NaCl;	35°C
8,0	$10^{-5} M$	10,4	0,25M NaCl;	35°C
8,0	-	3,4	0,4M NaCl;	35°C
8,0	$10^{-5} M$	11,0	0,4M NaCl;	35°C
8,0	$10^{-5} M$	10,0	0,4M NaCl;	40°C

a $1,0 \cdot 10^{-3} M$ de NaCN

b $3,0 \cdot 10^{-7} M$ de superóxido dismutase

$1,0 \cdot 10^{-5} \text{M}$), aumenta a velocidade de oxidação do NADPH. O efeito do adrenocromo mostra-se linearmente dependente de sua concentração no intervalo investigado e é parcialmente inibido pela superóxido dismutase. Estes resultados são apresentados na Tabela III.

3.1.1.4 - Atividade NADPH oxidásica estimulada por menadiona

O efeito da menadiona (vitamina K_3), estimulando a atividade NADPH oxidásica dos microsossomos, já era conhecido (SATO e col., 1962; NISHIBAYASHI-YAMASHITA e SATO, 1970); constatamos que a superóxido dismutase, bem como os o-difenóis, são inativos sobre esse processo. De fato, a adrenalina e os outros o-difenóis não afetam o consumo de oxigênio, na concentração de $2,0 \cdot 10^{-4} \text{M}$, nem tampouco a velocidade de desaparecimento do NADPH, no intervalo de concentração de $1,0 \cdot 10^{-5}$ - $1,0 \cdot 10^{-4} \text{M}$. Por outro lado, durante a atividade NADPH oxidásica estimulada por menadiona em presença de adrenalina, não ocorre formação de adrenocromo.

Durante a atividade NADPH oxidásica estimulada por adrenalina, a adição de menadiona após o período de indução, aumenta ligeiramente a velocidade de oxidação do coenzima reduzido.

TABELA III

Efeito do adrenocromo sobre a autooxidação do MADPH
mediada por microsossomos. As condições experimen-
tais foram as mesmas da Figura 2

Adrenocromo	$\Delta A_{340}/\text{min}$ ($\times 10^2$)
-	3,8
$1,0 \cdot 10^{-6} \text{M}$	3,8
$5,0 \cdot 10^{-6} \text{M}$	7,0
$7,0 \cdot 10^{-6} \text{M}$	10,0
$1,0 \cdot 10^{-5} \text{M}$	13,6
$1,0 \cdot 10^{-5} \text{M} + \text{SD}^a$	7,8

^a $3,7 \cdot 10^{-7} \text{M}$ de superóxido dismutase.

3.1.2 - Atividade NADH oxidásica

O pequeno consumo de oxigênio dependente de NADH, catalisado pelos microssomos, não é aumentado nem por adrenalina, nem pelos outros o-difenóis, no intervalo de concentração de $1,0 \cdot 10^{-5} \text{M}$ - $1,0 \cdot 10^{-4} \text{M}$. A ausência de efeito de o-difenóis, bem como de adrenocromo, sobre a atividade NADH oxidásica, estimulada ou não por menadiona, foi confirmada espectrofotometricamente. Resultados obtidos com adrenalina aparecem na Tabela IV.

3.1.2.1 - Formação de produtos de oxidação da adrenalina

Durante a atividade NADH oxidásica em presença de adrenalina não se forma adrenocromo, nem tampouco produtos que removam o período de indução da oxidação do NADPH estimulada por adrenalina. Para verificar esta última possibilidade, os microssomos foram incubados com NADH e adrenalina, após a oxidação de aproximadamente 50% do NADH, adicionou-se NADPH. Mesmo aqui se observa o período de indução.

3.1.3 - Oxidação simultânea de NADH e NADPH mediada pelos microssomos

A oxidação concomitante de NADH e NADPH mediada pelos microssomos, em presença ou ausência de adrenalina, processa-se segundo velocidades aditivas. Resultados representativos, aparecem na Tabela IV.

TABELA IV

Oxidação simultânea de NADH ($1,0 \cdot 10^{-4}$ M) e NADPH ($1,0 \cdot 10^{-4}$ M) mediada por microsossomos ($0,5$ mg proteína/ml) em tampão fosfato $0,4$ M

Piridino	nucleotido	pH	o-difenol	$\Delta A_{340}/\text{min}$ ($\times 10^2$)
NADH		7,5	-	2,0
NADH		7,5	10^{-4} M adrenalina	2,0
NADPH		7,5	-	3,4
NADPH		7,5	10^{-4} M adrenalina	9,8
NADH + NADPH		7,5	-	4,9
NADH + NADPH		7,5	10^{-4} M adrenalina	12,6
NADH		8,0	-	3,1
				$0,4$ M NaCl; 35°C
NADH		8,0	10^{-5} M adrenalina	3,5
				$0,4$ M NaCl; 35°C
NADPH		8,0	-	3,4
				$0,4$ M NaCl; 35°C
NADPH		8,0	10^{-5} M adrenalina	11,0
				$0,4$ M NaCl; 35°C
NADH + NADPH		8,0	-	7,3
				$0,4$ M NaCl; 35°C
NADH + NADPH		8,0	10^{-5} M adrenalina	15,6
				$0,4$ M NaCl; 35°C

3.1.4 - Efeito de o-difenóis sobre a autooxidação de componentes das cadeias microssomais

Investigamos o possível efeito de o-difenóis sobre a autooxidação de dois componentes das cadeias microssomais de transporte de eletrons, a NADH-citocromo b_5 redutase e o citocromo b_5 . A NADH-citocromo b_5 redutase não se mostrou autoxidável nas condições experimentais empregadas, nem tampouco na presença dos o-difenóis testados.

3.1.4.1 - Autooxidação do citocromo b_5

O citocromo b_5 autoxida-se lentamente a julgar pela contínua oxidação do NADH (FIG.4). Nota-se também que a adição de um o-difenol ao sistema duplica a velocidade de oxidação do NADH. Este efeito do o-difenol mostra-se independente da natureza e da concentração do catalisador acima de $1,0 \cdot 10^{-4}M$. Resultados representativos aparecem na Tabela V.

3.1.5 - Efeito do p-cresol

OSHINO e SATO (1971) mostraram que o p-cresol e em menor extensão outros difenóis, inclusive o-difenóis, estimulam a reoxidação aeróbica do citocromo b_5 reduzido por NADH em microssomos de fígado de rato com alta atividade estearil-CoA dessaturase. Isto nos levou a ensaiar p-cresol sobre nossos sistemas; contudo, não encontramos qualquer efeito.

FIGURA 4. Efeito da adrenalina ($1,2 \cdot 10^{-3} M$) sobre a oxidação do NADH ($1,3 \cdot 10^{-4} M$) em presença de NADH-citocromo b₅ redutase ($7,6 \cdot 10^{-7} M$) e citocromo b₅ ($6,4 \cdot 10^{-6} M$), em tampão tris-acetato, pH 7,28, contendo EDTA $1,0 \cdot 10^{-3} M$. Primeira flecha: adição de citocromo b₅; segunda flecha: adição de adrenalina.

TABELA V

Efeito de catecol e catecolaminas sobre a autooxidação do NADH em presença de quantidades catalíticas de NADH citocromo b_5 redutase e citocromo b_5 . As condições experimentais foram as mesmas da Figura 4.

o-Difenol	% Aumento na velocidade de desaparecimento do NADH
$5,0 \cdot 10^{-4}M$ catecol ^a	80
$1,0 \cdot 10^{-3}M$ catecol	80
$2,0 \cdot 10^{-3}M$ catecol	100
$5,0 \cdot 10^{-3}M$ catecol	100
$1,2 \cdot 10^{-3}M$ adrenalina	120
$2,0 \cdot 10^{-3}M$ adrenalina	110
$2,0 \cdot 10^{-3}M$ noradrenalina	110
$2,0 \cdot 10^{-3}M$ D-DOPA	100
$2,0 \cdot 10^{-3}M$ L-DOPA	80

^a Em tampão fosfato 0,4M, pH 8,0

3.2 - OXIDAÇÃO DA OXIHEMOGLOBINA E OXIMIOGLOBINA CATALISADA POR DIFENÓIS

A lenta autooxidação da oxihemoglobina e oximioglobina "in vitro" é nitidamente acelerada pela adição de p-hidroquinona ou catecol (FIGS. 5 e 6). Os processos são caracterizados por um período de indução, que desaparece ao se aumentar a concentração do difenol ou a concentração da ferrohemoproteína. A oxidação à forma ferri é quantitativa; esta forma é o único produto das oxihemoproteínas, como mostram os espectros diferenciais (FIGS. 7 e 8).

O efeito dos difenóis é catalítico. Assim, no caso da oximioglobina constatamos a formação de uma quantidade de ferrimioglobina de cinco a dez vezes maior que a quantidade de difenol empregada (FIG. 9). Estudos deste tipo não foram possíveis com oxihemoglobina, porque os difenóis quando usados em concentrações muito menores que a proteína, não mostraram efeito sobre a velocidade de oxidação. Contudo, a catálise pôde ser confirmada, utilizando-se concentrações maiores do difenol. Este pode ser recuperado quantitativamente, durante o processo (FIG. 10).

3.2.1 - Efeito de variações no tampão

O efeito do difenol é maior em tampão fosfato que em tampão Tris e aumenta pronunciadamente com o aumento do pH (FIGS. 11 e 12). A variação da força

FIGURA 5. Efeito de p-hidroquinona ($6,0 \cdot 10^{-4} M$) sobre a autooxidação de oxihemoglobina ($1,42 \cdot 10^{-5} M$). Curva superior: autooxidação espontânea.

FIGURA 6. Efeito do catecol ($6,0 \cdot 10^{-4} M$) sobre a autooxidação de oximioglobina ($1,18 \cdot 10^{-5} M$). Curva superior: autooxidação espontânea.

FIGURA 7. Espectro diferencial correspondente à autoxidação de oxihemoglobina $1,42 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ em ausência (---), e em presença (—) de p-hidroquinona $6,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Os espectros, do processo não catalisado (após 131 min. de reação) e do processo catalisado (após 15 min. de reação), foram corrigidos contra uma solução de oxihemoglobina recém-preparada.

FIGURA 8. Espectros da autoxidação da oxihemoglobina $1,45 \cdot 10^{-5} \text{M}$ promovida por catecol $4,0 \cdot 10^{-4} \text{M}$, corridos contra uma solução de oxihemoglobina $1,45 \cdot 10^{-5} \text{M}$. Após 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos e 40 minutos de reação.

FIGURA 9. Autoxidação de oximioglobina $1,25 \cdot 10^{-4} \text{M}$ a pH 7,50 acelerada por quantidades catalíticas de o-difenóis. Curva inferior: autoxidação espontânea; curva média: em presença de catecol $1,0 \cdot 10^{-5} \text{M}$; curva superior: em presença de p-hidroquinona $1,0 \cdot 10^{-5} \text{M}$.

FIGURA 10. Espectro da p-hidroquinona extraída da mistura de reação entre oxihemoglobina $5,0 \cdot 10^{-5} M$ e p-hidroquinona $2,5 \cdot 10^{-4} M$, como descrito em MÉTODOS. (—), no tempo zero; (---), após 80 minutos de reação, quando a quantidade de MetHb formada era $3,8 \cdot 10^{-5} M$.

FIGURA 11. Efeito do pH sobre a velocidade de autooxidação de oxihemoglobina $1,41 \cdot 10^{-5}M$ promovida por p-hidroquinona $6,0 \cdot 10^{-4}M$.

FIGURA 12. Efeito do pH sobre a velocidade de autooxidação de oxihemoglobina $1,41 \cdot 10^{-5}M$ promovida por catecol $6,0 \cdot 10^{-4}M$.

iônica do tampão fosfato não produziu qualquer efeito sobre as velocidades dos processos catalisados, contrariamente ao que ocorre durante a autooxidação espontânea (SALVATI e col., 1969).

3.2.2 - Efeito da concentração do difenol

A oxidação catalisada da oxihemoglobina, a baixas concentrações dos difenóis, mostra dependência de meia ordem em relação à p-hidroquinona e cerca de 0,7 em relação ao catecol (FIG. 13). Aumentando-se a concentração do difenol, observou-se efeito de saturação (FIG. 14). Regressão linear com os valores de $1/V \times 1/C$, correspondentes aos dados experimentais da Figura 14, leva aos parâmetros: $r = 0,997$ e $V_{m\acute{a}x} = 0,055$ para o catecol e $r = 0,992$ e $V_{m\acute{a}x} = 0,045$ no caso da p-hidroquinona.

A velocidade da oxidação catalisada da oximioglobina aumenta lentamente com o aumento da concentração do difenol; a Figura 15 mostra uma ordem de reação de 0,2 em relação à p-hidroquinona e de 0,3 em relação ao catecol.

3.2.3 - Efeito da concentração das oxihemoproteínas

Nos intervalos de concentração estudados, as velocidades dos processos catalisados mostraram dependência de primeira ordem em relação à oxihemoglobina e oximioglobina (FIGS. 16 e 17).

FIGURA 13. Determinação gráfica da dependência da velocidade de autooxidação da oxihemoglobina $1,37 \cdot 10^{-5} \text{M}$, em relação à concentração do catalisador. ●●●, p-hidroquinona; $\Delta\Delta\Delta$, catecol

FIGURA 14. Efeito da concentração do catalisador sobre a velocidade de autoxidação de uma solução de oxihemoglobina $1,37 \cdot 10^{-5}M$. $\bullet\bullet\bullet$, p-hidroquinona; $\Delta\Delta\Delta$, catecol.

$\log [Difenol]$

FIGURA 15. Determinação gráfica da dependência da velocidade de autoxidação da oximioglobina $1,19 \cdot 10^{-5}M$, em relação a concentração do catalisador. ●●●, p-hidroquinona; ΔΔΔ, catecol.

FIGURA 16. Determinação gráfica da dependência da velocidade de autoxidação da oxihemoglobina catalisada por difenol $6,0 \cdot 10^{-4} \text{M}$, em relação a sua concentração. ●●●, p-hidroquinona, △△△, catecol

FIGURA 17. Determinação gráfica da dependência da velocidade de autoxidação da oximioglobina catalisada por difenol $6,0 \cdot 10^{-4} M$, em relação a sua concentração. ●●●, p-hidroquinona; $\Delta\Delta\Delta$, catecol.

3.2.4 - Efeito da catalase e da superóxido dismutase sobre os processos catalisados

Nos sistemas que contem p-hidroquinona, a catalase não afeta o período de indução, nem a extensão da reação. Testes paralelos mostraram que a p-hidroquinona, nas concentrações empregadas, não altera a atividade da catalase. A superóxido dismutase, por sua vez, reduz o período de indução e acelera nitidamente a oxidação. Em presença de catalase e superóxido dismutase o comportamento do sistema é semelhante ao obtido quando só a superóxido dismutase está presente. Estes resultados aparecem na Figura 18 e Tabela VI. A adição de superóxido dismutase a sistemas contendo oxihemoglobina e concentrações saturantes de p-hidroquinona ($2,0 \cdot 10^{-2}M$), duplica a velocidade do processo.

Nos sistemas que contêm catecol, a catalase reduz a velocidade do processo à metade e aumenta o período de indução no caso da oximioglobina, mas não altera a extensão da reação. A superóxido dismutase aumenta, consideravelmente, tanto o período de indução como a velocidade de oxidação. Em presença de catalase e superóxido dismutase, a velocidade do processo é semelhante àquela obtida quando só a catalase está presente. Estes resultados aparecem na Figura 19 e Tabela VII. A adição de superóxido dismutase a sistemas contendo oxihemoglobina e concentrações saturantes de catecol ($2,0 \cdot 10^{-2}M$), não altera a velocidade do processo.

FIGURA 18. Efeito da catalase e da superóxido dismutase sobre a oxidação da oxihemoglobina promovida por p-hidroquinona. As condições experimentais foram as mesmas da Tabela VI. (—) na ausência das enzimas; (...) em presença de catalase; (-.-) em presença de superóxido dismutase; (---), em presença de catalase e superóxido dismutase.

FIGURA 19. Efeito da catalase e da superóxido dismutase sobre a oxidação da oximioglobina promovida por catecol. As condições experimentais foram as mesmas da Tabela VII. (—) na ausência das enzimas; (...) em presença de catalase; (-.-) em presença de superóxido dismutase; (---) em presença de catalase e superóxido dismutase.

TABELA VI

Efeito da catalase e da superóxido dismutase sobre a
oxidação da oxihemoglobina e oximioglobina, promovida
por p-hidroquinona^a

	Período de indução (min.)	Velocidade ($\Delta A_{430}/\text{min}$) $\cdot 10^4$
HbO ₂	3,25	156
HbO ₂ + catalase	3,25	172
HbO ₂ + superóxido dismutase	2,00	660
HbO ₂ + superóxido dismutase + + catalase	2,70	500
MbO ₂	2,90	620
MbO ₂ + catalase	2,50	590
MbO ₂ + superóxido dismutase	2,00	1260
MbO ₂ + superóxido dismutase + + catalase	1,75	1050

^a Todos os sistemas contêm p-hidroquinona $6,0 \cdot 10^{-4} \text{M}$. As outras concentrações foram: oxihemoglobina $1,42 \cdot 10^{-5} \text{M}$; oximioglobina $1,29 \cdot 10^{-5} \text{M}$; catalase 167 unidades/ml; superóxido dismutase 10 $\mu\text{g/ml}$.

TABELA VII

Efeito da catalase e da superóxido dismutase sobre a oxidação da oxihemoglobina e oximioglobina, promovida por catecol^a

	Período de indução (min.)	Velocidade ($\Delta A_{340}/\text{min}$) $\cdot 10^4$
HbO ₂	2,50	120
HbO ₂ + catalase	2,50	74
HbO ₂ + superóxido dismutase	6,50	294
HbO ₂ + superóxido dismutase + + catalase	5,00	88
MbO ₂	2,40	500
MbO ₂ + catalase	3,50	240
MbO ₂ + superóxido dismutase	6,75	990
MbO ₂ + superóxido dismutase + + catalase	12,5	320

^a Todos os sistemas contêm catecol $6,0 \cdot 10^{-4} \text{M}$. As outras concentrações foram: oxihemoglobina $1,42 \cdot 10^{-5} \text{M}$; oximioglobina $1,20 \cdot 10^{-5} \text{M}$; catalase (167 unidades/ml); superóxido dismutase 10 $\mu\text{g/ml}$.

3.2.5 - Efeito de captadores do radical hidroxila

O radical hidroxila é um forte oxidante e pode ser formado pela reação entre H_2O_2 e íon superóxido. Como estas espécies podem ser produtos intermediários dos processos estudados, testamos em nossos sistemas o efeito de captadores do radical hidroxila. O benzoato de sódio ($5,0 \cdot 10^{-3}M$), bem como o etanol ($1,0 \cdot 10^{-2}M$), mostraram-se inativos sobre os processos promovidos por catecol e por p-hidroquinona.

3.2.6 - Complexação do difenol com as oxihemoproteínas

Para verificar se o difenol complexa com a oxihemoproteína no tempo zero, fizemos estudos espectrofotométricos, utilizando soluções $1,35 \cdot 10^{-5}M$ de oxihemoglobina e $1,0 \cdot 10^{-4}M$ de difenol. Pelo menos durante os primeiros 10 segundos, não se observou nenhuma mudança no espectro visível da oxihemoglobina.

3.2.7 - Efeito da variação da tensão de oxigênio

Com o intuito de verificarmos se os efeitos observados são específicos para a forma oxigenada das hemoproteínas, variamos a tensão de oxigênio. Constatamos que contrariamente, ao que ocorre na oxidação espontânea, a velocidade da oxidação catalisada varia diretamente com a tensão de oxigênio.

3.2.8 - Efeito da p-benzoquinona

No sistema oxihemoglobina-p-hidroquinona, a p-benzoquinona $5,0 \cdot 10^{-7} M$, elimina quase que completamente o período de indução. Em ausência de p-hidroquinona, a p-benzoquinona reage estequiometricamente com a oxihemoglobina e a reação apresenta dependência de primeira ordem, em relação à concentração de p-benzoquinona; tal comportamento já foi descrito (KAKIZAKI e col., 1969).

Por outro lado, a p-benzoquinona consegue promover cataliticamente, a oxidação da oximioglobina à forma ferri. As Figuras 20 e 21, mostram o comportamento diferente das oxihemoproteínas frente à p-benzoquinona.

3.2.9 - Identificação do produto final de redução do oxigênio

Durante a oxidação catalisada da oxihemoglobina e da oximioglobina detectou-se, qualitativamente, liberação de oxigênio por intermédio de um monitor biológico de oxigênio. No caso da oxidação da oximioglobina catalisada por p-hidroquinona determinou-se quantitativamente por manometria em Warburg, a liberação de 0,75 moles de oxigênio por mol de oximioglobina, como esperado para a formação de H_2O (FIG. 22). De fato, não se detectou H_2O_2 pelo método do iodeto, nem como produto final, nem como produto intermediário dos processos catalisados.

FIGURA 20. Oxidação da oxihemoglobina $1,48 \cdot 10^{-5} M$ em presença de: p-hidroquinona $1,0 \cdot 10^{-4} M$ (—); p-benzoquinona $2,0 \cdot 10^{-6} M$ (...); p-hidroquinona $1,0 \cdot 10^{-4} M$ e p-benzoquinona $2,0 \cdot 10^{-6} M$ (---).

FIGURA 21. Oxidação da oximioglobina $1,15 \cdot 10^{-5} \text{M}$ em presença de : p-hidroquinona $2,0 \cdot 10^{-6} \text{M}$ (—); p-benzoquinona $2,0 \cdot 10^{-6} \text{M}$ (...); p-hidroquinona $2,0 \cdot 10^{-6} \text{M}$ e p-benzoquinona $2,0 \cdot 10^{-6} \text{M}$ (---).

FIGURA 22. Liberação de oxigênio durante a autoxidação da oximioglobina $1,50 \cdot 10^{-3} M$, catalisada por p-hidroquinona $1,66 \cdot 10^{-4} M$, a pH 7,58. Curva inferior: autoxidação espontânea. O volume teórico de oxigênio para a formação de H_2O é 70 µl.

4. DISCUSSÃO

4.1 - EFEITO DE o-DIFENÓIS SOBRE AS ATIVIDADES NADPH E NADH OXIDÁSICA DOS MICROSSOMOS

Um aumento na velocidade da autooxidação de um substrato em presença de um o-difenol, é consistente com a hipótese de que este capta o íon superóxido, impedindo sua dismutação. Se o íon superóxido estava livre em solução, a velocidade do processo aumentará por um fator de dois conforme esquema abaixo, onde B é o substrato autooxidável e D o o-difenol:

Contudo, se o catalisador intercepta o íon superóxido no ato de formação, devemos esperar um aumento muito maior na velocidade do processo:

Assim, o aumento por um fator de dois, observado na velocidade de oxidação do NADH, mediada por NADH citocromo b_5

redutase e citocromo b_5 , sugere que durante a autooxidação do citocromo b_5 ocorre formação do íon superóxido. Nas condições experimentais, qualquer dos o-difenóis, à concentração de $1,0 \cdot 10^{-3} M$, consegue captar todos os íons superóxidos formados.

No caso dos microsossomos observou-se um efeito duplamente específico; somente a adrenalina agiu e unicamente sobre a oxidação do NADPH. A completa inibição do efeito pela superóxido dismutase, confirma que a adrenalina age captando o íon superóxido.

A especificidade da adrenalina poderia sugerir que ela consegue captar o íon superóxido no sítio de formação. Contudo, neste caso, o efeito não deveria ser inibido pela superóxido dismutase (MILLER e MAC DO-WALL, 1975). Por outro lado, foi demonstrado que catecolaminas se ligam a membranas microsossomais (LEKOWITZ, 1974) e poderiam não estar livres para reagir com o íon superóxido; só um estudo mais aprofundado do fenômeno poderia responsabilizá-lo pela diferente reatividade das catecolaminas. A especificidade da adrenalina poderia estar relacionada com a formação de um intermediário estável requerido pelo sistema. A necessidade de tal intermediário também é sugerida pelo período de indução, que sempre ocorre nos processos catalisados pela adrenalina. Como a superóxido dismutase inibe completamente o processo se adicionada inicialmente e não tem qualquer efeito se adicionada após o período de indução, pode-se in-

ferir que uma vez formado um certo intermediário X, a adrenalina, não é mais necessária. Desta maneira o intermediário seria a espécie catalítica verdadeira, conectando a NADPH citocromo c redutase ao oxigênio agindo semelhantemente à menadiona na cadeia de transporte de elétrons (MASTERS e col., 1965b).

A questão que se coloca é a natureza de X, já que vários estados intermediários de oxidação da adrenalina têm sido demonstrados (HARRISON, 1963; BORG, 1965; HAWLEY e col., 1967; RAO e HAYON, 1973):

Nossos resultados são mais convenientemente explicados, considerando-se que dois produtos de oxidação da adrenalina estejam envolvidos no processo, o adrenocromo produto de oxidação de quatro elétrons e a quinona, produto de oxidação de dois elétrons. O adrenocromo seria capaz de reoxidar a redutase dando a quinona, que reagiria rapidamente com o oxigênio, regenerando o adrenocromo:

Tal esquema explica o efeito do adrenocromo sem período de indução, sua ação específica sobre a cadeia do NADPH, bem como o pequeno consumo de adrenocromo durante o processo por ele catalisado.

Além disso, a reoxidação da redutase pelo adrenocromo pode explicar convenientemente a especificidade da adrenalina. De fato, WALAAS e WALAAS (1961), estudando a oxidação de NADH e NADPH em presença de ceruplasmina e catecolaminas observaram que a noradrenalina oxidava as coenzimas muito mais rapidamente que a adrenalina. Os autores sugeriram que a adrenalina possuía maior tendência à formação de adrenocromo e, portanto, menor atividade oxidativa, que foi atribuída à semiquinona. Esta sugestão foi confirmada por HAWLEY e col. (1967) os quais observaram que a velocidade de ciclicização da adre-

nalina é cerca de cento e quarenta vezes maior do que a da noradrenalina e dopamina.

O mecanismo aqui sugerido apresenta pontos concordantes e outros discordantes em relação àquele proposto por PROUGH e MASTERS (1973a,b) para o efeito da adrenalina sobre a oxidação do NADPH mediada pela citocromo c redutase. Aqueles autores mostram que em presença de adrenalina a enzima é oxidada a FAD^+ , contrariamente ao que ocorre em presença de outros aceptores (MASTERS e col., 1965a,b). Contudo, como não foi estudado o efeito catalítico da adrenalina, os autores sugerem a quinona como espécie ativa, que atuaria recebendo elétrons da redutase. Cumpre mencionar que os estudos de PROUGH e MASTERS foram realizados simultaneamente aos nossos.

Um problema que surge quanto ao esquema proposto é o da inibição parcial do efeito do adrenocromo pela superóxido dismutase. Contudo, tal inibição pode ser devida a uma interação da enzima com o adrenocromo; de fato, RAPP e col. (1973) constataram que produtos de oxidação de o-difenóis não são removidos da superóxido dismutase por diálise.

A ausência de efeito da adrenalina e dos outros o-difenóis sobre a atividade NADPH oxidásica estimulada por menadiona, bem como a não formação de adrenocromo em presença de adrenalina, sugerem que, neste caso, o íon superóxido não se forma. Por outro lado, o fato de que a adição de menadiona não altera muito a velocidade do

processo em presença da quinona, corrobora a sugestão de que os intermediários da adrenalina atuem de maneira análoga à menadiona. De estudos com a redutase purificada sugeriu-se que o efeito da menadiona seja devido à reação da forma totalmente reduzida com oxigênio (MASTERS e col., 1965b), enquanto que NISHIBAYASHI-YAMASHITA E SATO (1970), sugerem que a formação de H_2O_2 seja devida à reação de dois moles de naftosemiquinona com O_2 . Nos microsomas é possível que a vitamina K_3 transfira elétrons para o citocromo b_5 (YANAGI e YAMAZAKI, 1969); isto conduziria elétrons da cadeia do NADPH que produz o íon superóxido, à cadeia do NADH. Nossos resultados não sustentam a hipótese de que a naftosemiquinona transfere um elétron ao oxigênio (NILSSON, 1969).

Nem adrenalina nem adrenocromo estimulam a atividade NADH oxidásica dos microsomas. Pelo fato de que produtos formados durante a atividade NADH oxidásica, em presença de adrenalina, não eliminam o período de indução da atividade NADPH oxidásica, podemos inferir que o íon superóxido não se forma durante a oxidação do NADH. Esta mesma conclusão foi obtida por DEBEY e BALNY (1973) utilizando métodos diferentes. Outra inferência possível pelos nossos resultados, é que no caso das atividades oxidásicas não ocorre cooperação entre as cadeias (COHEN e ESTABROOK, 1971a,b; HILDEBRANDT e ESTABROOK, 1971) uma vez que em presença dos dois coenzimas observamos sempre velocidades aditivas.

Durante a atividade NADPH oxidásica, o íon superóxido é formado pela autoxidação da NADPH citocromo c redutase (AUST e col., 1972). No caso da atividade de NADH oxidásica, a flavina reduzida não é autoxidável. Considerando que a nossa amostra de citocromo b_5 tenha a mesma autoxidabilidade da forma nativa (BERMAN e col., 1975), podemos inferir que o citocromo b_5 não é o terminal oxidase na cadeia do NADH, pois nossos resultados indicam a formação do íon superóxido durante a sua autoxidação.

Torna-se importante ressaltar que, apesar dos vários trabalhos (AUST e col., 1972; AUGUSTO e col., 1973; DEBEY e BALNY, 1973), sugerindo o envolvimento do íon superóxido em processos microssomais dependentes da NADPH citocromo c redutase, o papel do íon superóxido na redução do citocromo P_{450} , bem como nas reações de hidroxilação catalisadas por microssomos, permanece obscuro. De fato, COON e col. (STROBEL e COON, 1971; COON e col., 1973), mostraram a participação do íon superóxido em hidroxilação catalisadas por sistemas reconstituídos dos microssomos, mas não conseguiram demonstrar o seu envolvimento nas hidroxilações catalisadas pelos microssomos intactos.

4.2 - OXIDAÇÃO DA OXIHEMOGLOBINA E DA OXIMIOGLOBINA CATALISADA POR DIFENOIS

4.2.1 - Oxidação da oxihemoglobina promovida por p-hidroquinona

A presença de um período de indução durante a oxidação da oxihemoglobina promovida pela p-hidroquinona, indica que um produto da reação acelera o processo. Este produto poderia ser methemoglobina, H_2O_2 ou uma quinona. O primeiro é improvável, pois a oxihemoglobina está sempre contaminada com methemoglobina ainda que em pequena extensão. A H_2O_2 também pode ser excluída, pois a catalase não tem qualquer efeito sobre o processo. Assim, resta a quinona como a provável espécie envolvida na catálise. De fato, pequenas quantidades de quinona ($5,0 \cdot 10^{-7} M$) reduzem o período de indução. Por outro lado, a p-benzoquinona oxida a oxihemoglobina estequiometricamente, ou seja, a quinona não atua cataliticamente. Devemos, então, considerar as possíveis fontes de quinona nas condições experimentais empregadas. Nestas, a formação da quinona, durante o período de indução, não deve vir da autooxidação espontânea da p-hidroquinona (PEDERSEN, 1973). Outra possibilidade é apresentada no esquema abaixo, onde D representa o difenol, S' a semiquinona e Q a quinona:

Contudo, tal seqüência é improvável, pois a superóxido dismutase não aumenta o período de indução. Podemos, também, eliminar a peroxidação da p-hidroquinona catalisada pela hemoglobina (SMITH e BECK, 1967; CHUNG e WOOD, 1971), como responsável pela formação da quinona, pois a catalase não tem efeito sobre o sistema.

Assim, a formação da quinona deve vir principalmente da lenta reação direta, através da semi-quinona:

Como o efeito da p-hidroquinona é catalítico e exige a presença da p-benzoquinona, sugerimos o esquema abaixo para explicar o processo:

Uma alternativa para este esquema seria a oxidação da p-benzosemiquinona pelo oxigênio, o que levaria à mesma estequiometria final. Entretanto, a p-benzosemiquinona (OHNISHI e col., 1969; WILSON, 1971) diferentemente da 2-metil-naftosemiquinona (OHNISHI e col., 1969) não é autoxidável. A autooxidação da 2 metil-naftosemiquinona pode ser a causa da oxidação da oxihemoglobina catalisada por menadiona (KIESE, 1966).

No esquema acima formulamos o produto de redução do oxigênio como H_2O_2 , contudo, não detectamos H_2O_2 nem como intermediário, nem como produto final da reação. Apesar das dúvidas ainda existentes sobre a autodecomposição de oxihemoproteínas (TAMURA e YAMAZAKI, 1972), foi observada a evolução de 0,75 moles de oxigênio por mol de oxihemoproteína, durante o processo espontâneo (BROWN e MEBINE, 1970) e agora, neste trabalho, durante o processo catalisado. Tal estequiometria mostra que o produto final de redução do oxigênio é H_2O [Eq. (4.12)].

A evolução de oxigênio deve vir da reação da oxihemoproteína com a quinona, como ocorre na reação com ferricianeto (TAMURA e YAMAZAKI, 1972), e com outros agentes oxidantes (RIFKIND, 1974). A formação de H_2O , bem como o fato da catalase ser inativa sobre o sistema, indica que o produto de redução de dois elétrons, $HbFe^{3+}.H_2O_2$, for-

malmente análogo ao Composto I da peroxidase, deve reagir tão logo seja formado. Torna-se importante notar que não se acumulam intermediários durante o processo catalisado, como o demonstra a manutenção dos pontos isosbéticos (FIG. 8).

O papel da p-hidroquinona no esquema proposto é o de manter uma concentração suficiente de semiquinona; na ausência do difenol reduzido ocorre somente a reação estequiométrica com a quinona. O fato de que a velocidade do processo catalisado é maior a pH mais altos, onde a semiquinona é mais estável, concorda com o mecanismo proposto. Outro ponto de apoio para o esquema é a velocidade do processo apresentar dependência de meia ordem em relação à concentração de p-hidroquinona, quando esta não é muito alta. Assim, se a velocidade depende da concentração de semiquinona, então como

temos:

$$|S^{\cdot}| = K|D|^{1/2}|Q|^{1/2}$$

desde que:

$$|S^{\cdot}| \ll |Q|$$

O esquema sugerido está de acordo com a dependência da primeira ordem em relação à concentração de oxihemeproteína. Concorda, também, com o fato de que as semiquinonas, muito mais reativas que a forma totalmen

te reduzida, desempenham um papel importante nos processos de transferência de elétrons, normalmente como doadores (OHNISHI e col., 1969; IYANAGI e YAMAZAKI, 1969).

Nosso esquema difere daquele sugerido por EYER e col. (1974) para o processo, envolvendo 4 dimetil aminofenol, onde é proposto um papel cíclico para a forma totalmente reduzida do catalisador. Na catálise por nós observada, embora a reação da oxihemoglobina com a p-hidroquinona deva ser muito lenta, ela pode explicar a formação de traços do catalisador oxidado necessário ao processo cíclico. É importante lembrar que existem indicações de reação direta entre hemoglobina e aril hidro_xilaminas (KIESE, 1966).

A saturação observada a altas concentrações do catalisador deve ser comentada. Ela pode ser devida às seguintes possibilidades:

(a) A semiquinona, a partir de certo limite, não tem oportunidade de sofrer dismutação;

(b) um intermediário, formado a partir da oxihemoglobina, é a verdadeira espécie reagente:

Assim, a concentração do difenol aumenta a concentração de estado estacionário da semiquinona e, portanto, aumenta a velocidade de formação da metemoglobina, mas somente até um valor máximo determinado por k_1 . O fato de que, ainda maiores concentrações de p-hidroquinona não mantenham a saturação, não invalida a hipótese, pois cresce a importância da reação direta com a quinona. Também, é importante ressaltar, que os valores de $V_{m\acute{a}x}$ obtidos devem estar afetados pela capacidade dos difenois reduzirem a ferrihemeproteína.

Em presença de superóxido dismutase observa-se um grande aumento do efeito da p-hidroquinona. Como esta enzima promove a formação da semiquinona do catecol e também estabiliza a semiquinona de o-difenóis substituídos (RAPP e col., 1973), uma possibilidade para o efeito da superóxido dismutase seria a estabilização e consequente aumento da concentração da p-benzosemiquinona.

4.2.2 - Oxidação da oxihemoglobina catalisada por catecol

No processo promovido pelo catecol, o fato da superóxido dismutase aumentar o período de indução, indica que o íon superóxido livre em solução deve ser importante para a formação do produto oxidado necessário à catálise. Isto difere do processo promovido pela p-hidroquinona, provavelmente porque o catecol, sendo um redu-

tor menos eficiente, não consegue reagir diretamente com a oxihemoglobina. Para reagir, o catecol dependerá da formação de sua semiquinona, o que deve envolver a série |Eq (4.6)-(4.10)| de reações.

Uma outra diferença em relação ao processo promovido pela p-hi quinona, é o efeito da catalase sobre a velocidade da oxidação catalisada pelo catecol. A inibição observada de 40 a 50%, indica que a H_2O_2 formada intermediariamente, contribui para a oxidação da oxihemoglobina.

Por outro lado, os dois difenóis apresentam o mesmo comportamento cinético, sugerindo que o esquema proposto para o processo catalisado pela p-hidroquinona, deve operar, também no processo promovido pelo catecol. A diferença entre os dois processos estaria nas reações de formação dos produtos de oxidação necessários à catálise.

O fato de que o valor de $V_{m\bar{x}}$ obtido com catecol, seja similar àquele obtido com p-hidroquinona, reforça a hipótese de que um intermediário reversível da oxihemoglobina participa do processo, ou seja, de que a velocidade máxima depende de k_1 |Eq.(4.13)-(4.14)|.

A superóxido dismutase também aumenta o efeito do catecol. Contudo, como esperado, este efeito não ocorre em concentrações saturantes do catalisador, ou seja, $V_{m\bar{x}}$ não é alterada.

Devemos mencionar que o esquema proposto para explicar o efeito catalítico dos difenóis sobre a autoxidação da oxihemoglobina e oximioglobina, explica também por analogia, o aumento da velocidade de decaimento da oxiferroperoxidase, promovido pela p-benzoquinona em presença de dihidroxifumarato (TAMURA e YAMAZAKI, 1972).

4.2.3 - Comportamento comparativo da oxihemoglobina e oximioglobina

A oximioglobina foi, em geral, mais reativa que a oxihemoglobina. Uma diferença entre as duas oxihemoproteínas, foi a saturação obtida a altas concentrações dos catalisadores no caso da oxihemoglobina, enquanto que para os sistemas contendo oximioglobina, observou-se uma contínua dependência de ordem 0,2. Esta pequena dependência deve vir de uma maior reatividade da oximioglobina em relação à semiquinona. A maior reatividade da oximioglobina é demonstrada pelo fato de que a p-benzoquinona, sozinha, atua cataliticamente. Isto poderia significar que a p-benzosemiquinona é interceptada rapidamente pela oximioglobina, não tendo oportunidade de sofrer dismutação. Apesar destas considerações, permanece difícil explicar porque não se obteve saturação a altas concentrações dos catalisadores, durante a oxidação da oximioglobina.

4.2.4 - Estrutura da oxihemoglobina

Um ponto importante é analisar, em função dos nossos resultados, as estruturas sugeridas para a oxihemoglobina, $\text{HbFe}^{2+} \dots \text{O}_2$ e $\text{HbFe}^{3+} \dots \text{O}_2^-$. De fato, a polêmica iniciada por PAULING (1964) e WEISS (1964) ainda não foi resolvida; dependendo das técnicas empregadas e das análises dos resultados, as duas estruturas continuam a ser sugeridas na literatura (POLITZER, 1968; HARCOURT, 1971; MAXWELL e col., 1974; RIMAI e col., 1975). Vários grupos de pesquisadores têm desenvolvido sistemas modelos simplificados que imitam a hemoglobina, ligando o oxigênio reversivelmente. Baseados em estudos com modelos, COLLMAN e col. (1975) sugeriram que o oxigênio coordenado, seja oxigênio singlete (para uma revisão geral, ver MAUGH II, 1975).

Considerando-se nossos resultados, como o catecol não reage diretamente com a oxihemoglobina, mas o faz com o HRP-composto III ($\text{HRPFe}^{3+} \dots \text{O}_2^-$), deve-se inferir ou que a oxihemoglobina não tem estrutura similar ao composto III, ou, então, que o catecol não reage com tal estrutura. Por outro lado, é bem conhecido que o oxigênio é um ineficiente oxidante de um elétron, sendo rapidamente reduzido pela entrada múltipla, simultânea de elétrons. Portanto, a oxidação de oxihemoglobina pela semiquinona implica numa transferência simultânea de dois elétrons ao oxigênio, inferência que exige, por sua vez, a presença do oxigênio como $\text{HbFe}^{2+} \dots \text{O}_2$.

Também do processo inverso, saída de um elétron, podemos inferir que a estrutura da oxihemoglobina não é do tipo ferri-superoxi. Assim, enquanto a saída de um elétron da oxihemoglobina leva à liberação de oxigênio, no caso da $\text{HRPFe}^{3+} \dots \text{O}_2^-$, tal liberação não é observada. Nesse caso, parece que o oxigênio molecular é ativado e incorporado (TAMURA e YAMAZAKI, 1972), um resultado que pode ser antecipado se o elétron que é removido do superóxido não é o desemparelhado.

Podemos estender a discussão sobre as possíveis estruturas da oxihemoglobina. Foi postulado por WILLIAMS (1970) que o estado fundamental da oxihemoglobina tem estrutura $\text{HbFe}^{2+} \dots \text{O}_2$, mas que a estrutura $\text{HbFe}^{3+} \dots \text{O}_2^-$ está muito próxima da primeira. Se nossa hipótese de um intermediário reversível é correta, poderíamos identificá-lo com a estrutura do nível elevado. Tal nível seria populado termicamente e simultaneamente à chegada ao nível superior, ou seja, num período de tempo menor que 10^{-11} seg. (WESTHEIMER, 1954), a semiquinona doaria um elétron à estrutura "excitada".

Tal discussão apresenta analogias com o mecanismo proposto por WALLACE e col. (1974), para a autoxidação da oxihemoglobina promovida por nucleófilos. Os autores postularam que o complexo $\text{Fe}^{2+} \dots \text{O}_2$, sob a influência do nucleófilo atacante, transforma-se no complexo $\text{Fe}^{3+} \dots \text{O}_2^-$.

4.3 - CONCLUSÕES E POTENCIALIDADES

Nossos resultados, embora não sustentem totalmente a hipótese inicialmente formulada sobre a ativação do oxigênio por o-difenóis (ARAUJO e col., 1970), comprovam as idéias mais gerais. Principalmente, reafirmam a importância de grupos orgânicos redutores, agora desviando a atenção para semiquinonas, em processos de "ativação do oxigênio".

Assim, quanto às reações das oxidasas, já foi proposto que ocorrem duas duplas transferências de elétrons ao oxigênio para sua redução até água (MALMSTRÖM, 1970). O fato de que a oxidação de proteínas ferroporfirínicas oxigenadas seja promovida por espécies redutoras, como a p-benzosemiquinona, serve de modelo para a múltipla entrada de elétrons na molécula de oxigênio: dois elétrons são introduzidos quase que simultaneamente, um do íon metálico, outro do agente redutor. Além disso, desde que, pelo menos no caso da oxidação da oximioglobina catalisada pela p-hidroquinona, foi observada liberação de 0,75 moles de oxigênio por mol de oxihemeproteína, como esperado para formação de água, nossos sistemas podem ser considerados modelos de oxidase terminal. Neste contexto é especialmente interessante o mecanismo sugerido por ABEL e col. (1974) para a citocromo oxidase. Os autores levantam a possibilidade de que resíduos de cisteína ou tirosina, presentes na enzima, participem na transferência de equivalentes redutores ao oxigênio coordenado.

Pelo raciocínio inverso, nossos resultados corroboram a idéia de que, em sistemas armazenadores e transportadores de oxigênio, é a ausência de uma fonte do segundo elétron que previne reações de oxidação (WILLIAMS, 1970). A redução do oxigênio coordenado a metais por doadores externos, fornece explicação para problemas clínicos, que envolvem a oxidação da hemoglobina. Assim, a hemoglobina tipo M, que provoca methemoglobinemia, apresenta como anormalidade ao nível molecular, a substituição de histidina por tirosina. Este resíduo, mais redutor que o primeiro, pode atuar como fonte do segundo elétron, o que explicaria a methemoglobinemia em portadores de hemoglobina tipo M (CAUGHEY, 1967; WALLACE e CAUGHEY, 1975). Além disso, dentre as várias drogas que provocam methemoglobinemia (LEMBERG e LEGGE, 1949; KIESE, 1966) muitas são redutoras.

Os compostos difenólicos, de origem natural ou relacionada, devido a sua reação com o íon superóxido, podem desempenhar importantes funções "in vivo". Neste sentido, de considerável importância potencial, é a hipótese de ELSTNER e col. (ELSTNER e HEUPEL, 1974a,b; ELSTNER e col., 1975) que um fator redutor de oxigênio, isolado de cloroplastos, possua estrutura o-difenólica. Tal fator participaria da cadeia de transportes de elétrons, responsável pela redução fotossintética do oxigênio.

5. SUMÁRIO

Catecol e catecolaminas foram ensaiados sobre as atividades NADPH e NADH oxidásica dos microsso - mos. Quantidades catalíticas de adrenalina aumentam de duas a três vezes a velocidade de oxidação do NADPH, após um pequeno período de indução. O efeito da adrenalina é suprimido pela superóxido dismutase, se a enzima é adi - cionada antes de iniciada a reação. O efeito catalítico é atribuído a dois produtos de oxidação da adrenalina pelo íon superóxido; à quinona, produto de oxidação de dois elétrons e ao adrenocromo, produto de oxidação de qua - tro elétrons. Provavelmente, o adrenocromo reoxida a NADPH citocromo c redutase, e a quinona formada reage com oxigênio, regenerando adrenocromo. A adrenalina não mos - trou qualquer efeito sobre a atividade NADH oxidásica, nem sobre a atividade NADPH oxidásica, estimulada por menadio - na. Provavelmente, durante estes processos, dois elê - trons são transferidos simultaneamente ao oxigênio.

Catecol e catecolaminas duplicam a velo - cidade de oxidação do NADH em presença de quantidades cata - líticas de NADH-citocromo b_5 redutase e citocromo b_5 . Este resultado sugere a formação do íon superóxido, durante a autooxidação do citocromo b_5 .

Catecol e p-hidroquinona promovem, cataliticamente, a oxidação da oxihemoglobina e oximioglobina à forma ferri. A velocidade de oxidação da oxihemoglobina mostra dependência de primeira ordem em relação à concentração de heme proteína e de meia ordem em relação ao difenol; contudo a altas concentrações dos catalisadores observa-se saturação, com valores de $V_{m\bar{x}}$ similares para ambos os difenóis. É proposto que uma quinona, inicialmente formada, oxida a oxihemoproteína com liberação de oxigênio; por sua vez, a semiquinona oxida uma segunda molécula de oxihemoproteína, sendo que o oxigênio ligado recebe dois elétrons. Exceto para o caso da oximioglobina, que é mais reativa, a forma reduzida do catalisador deve estar presente para se opor ao desaparecimento da semiquinona por dismutação. Desde que se observa a liberação de oxigênio, esperada para a formação de água, o sistema pode ser considerado modelo de oxidase terminal. Infere-se tentativamente, que a oxihemoglobina tem estrutura $HbFe^{2+} \dots O_2$, e que a velocidade da oxidação catalisada é limitada pela velocidade de produção da verdadeira forma reativa, a estrutura ferri-superóxido, $HbFe^{3+} \dots O_2^-$.

SUMMARY

Catechol and catecholamines have been assayed upon the microsomal NADPH and NADH oxidase activities. Adrenaline shows a catalytic effect on the NADPH oxidation characterized by a small lag. The two-to three fold increase in rate can be suppressed by superoxide dismutase if the enzyme is added before the reaction begins. The catalytic effect is ascribed to two products of adrenaline oxidation by the superoxide ion; to the quinone, the two electron oxidation product, and to the adrenochrome, the four electron oxidation product. Presumably, the adrenochrome reoxidizes the NADPH-cytochrome c reductase, and the formed quinone reacts with oxygen and regenerates the adrenochrome. Adrenaline neither changed, the NADH oxidase activity nor the menadione-stimulated NADPH oxidase activity. Presumably in these processes, two electrons are simultaneously transferred to the oxygen.

Catechol and catecholamines doubled the rate of autoxidation of NADH in the presence of catalytic amounts of NADH-cytochrome b_5 reductase and cytochrome b_5 . This result suggests superoxide ion formation in the autoxidation of the cytochrome.

Catechol and p-hydroquinone catalytically promote the oxidation of oxyhemoglobin and oxymyoglobin to the ferri-form. Kinetic data for oxyhemoglobin oxidation indicates a first-order dependence upon the hemoprotein concentration and half-order dependence upon diphenol; however at high catalyst concentration, saturation is observed with similar $V_{\max}$ values for both diphenols despite the difference in reactivity. It is proposed that initially formed quinone oxidizes the hemoprotein with oxygen release; in turn the semiquinone oxidizes a second molecule of hemoprotein and regenerates the quinone, with the bound oxygen acquiring two electrons. Except for the more reactive oxymyoglobin, the reduced form of the catalyst must be present to oppose semiquinone disappearance by dismutation. Since the expected release of O_2 for water formation is observed, the system may be considered a model for terminal oxidase. It is tentatively inferred that oxyhemoglobin has the structure $HbFe^{2+} \dots O_2$ and that the rate of the catalyzed oxidation is limited by the rate of generation of the true reacting form, the superoxide ferri structure, $HbFe^{3+} \dots O_2^-$.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, E.W., PRATT, J.M., WHELAN, R. e WILKINSON, P. J. (1974). J. Am. Chem. Soc. 96, 7119-7120.
- ALLEN, J.F. e HALL, D.O. (1973). Biochem. Biophys. Res. Comm. 52, 856-862.
- ARAUJO, M.S. e CILENTO, G. (1969). Biochemistry 8, 2145-2152.
- ARAUJO, M.S., BECHARA, E.J.H., ZINNER, K. e CILENTO, G. (1970). Rec. Chim. Progr. 31, 189-198.
- ARNESON, R.M. (1970). Arch. Biochem. Biophys. 136, 352-360.
- AUGUSTO, O., BECHARA, E.J.H., SANIOTO, D.L. e CILENTO, G. (1973). Arch. Biochem. Biophys. 158, 359-364.
- AUGUSTO, O. e CILENTO, G. (1975). Arch. Biochem. Biophys. 168, 549-556.
- AUST, S.D., ROERIG, D.L. e PEDERSON, T.C. (1972). Biochem. Biophys. Res. Comm. 47, 1133-1137.
- BACH, A. e CHODAT, R. (1903). Ber. Deut. Chem. Ges. 36, 600-605.
- BENESCH, R. e BENESCH, R.E. (1961). J. Biol. Chem. 236, 405-410.

- BERMAN, M.C., IVANETICH, K.M. e KENCH, J.E. (1975). Biochem. J. 148, 179-186.
- BORG, D.C. (1965). Proc. Nat. Acad. Sci. 53, 633-639.
- BORS, W., SARAN, M., LENGFELDER, E., SPÖTTL, R. e MICHEL, C. (1974). Curr. Top. Radiat. Res. Q. 9, 247-309.
- BOVERIS, A. e CADENAS, E. (1975). FEBS-Lett. 54, 311-314.
- BOYD, D.R., DALY, J.W. e JERINA, D.M. (1972). Biochemistry 11, 1961-1966.
- BRADY, F.O., FORMAN, H.J. e FEIGELSON, P. (1971). J. Biol. Chem. 246, 7119-7124.
- BRADY, F.O. e FEIGELSON, P. (1973). Arch. Biochem. Biophys. 156, 745-750.
- BROWN, W.D. e MEBINE, L.B. (1970). J. Biol. Chem. 244, 6696-6701.
- BRUNORI, M., FALCIONE, G., FIORETTI, E., GIARDINA, B. e ROTILIO, G. (1975). Eur. J. Biochem. 53, 99-104.
- CAUGHEY, W.S. (1967). Ann. Rev. Biochem. 36, 611-644.
- CHANCE, B. BOVERIS, A. e OSHINO, N. (1972). Biochem. J. 128, 617-630.
- CHU, J.W. e KIMURA, T. (1973). J. Biol. Chem. 248, 5183-5187.

- CHUNG, J. e WOOD, J.L. (1971). J. Biol. Chem. 246, 555-560.
- CILENTO, G. e ZINNER, K. (1966). Biochim. Biophys. Acta 120, 84-90.
- CILENTO, G. e ZINNER, K. (1967a). Biochim. Biophys. Acta 143, 88-92.
- CILENTO, G. e ZINNER, K. (1967b). Nat. Cancer Inst. Monogr. 27, 88-95.
- CILENTO, G. e ZINNER, K. (1967c). Biochim. Biophys. Acta 143, 93-96.
- CILENTO, G. e ZINNER, K. (1967d). Arch. Biochem. Biophys. 120, 244-246.
- CILENTO, G. e ARAUJO, M.S. (1968). Chem. Commu. 1420-1421.
- COHEN, B.S. e ESTABROOK, R.W. (1971a). Arch. Biochem. Biophys. 143, 46-53.
- COHEN, B.S. e ESTABROOK, R.W. (1971b). Arch. Biochem. Biophys. 143, 54-65.
- COHEN, G. e HEIKKILA, R.E. (1974). J. Biol. Chem. 249, 2447-2452.
- COLLMAN, J.P., GAGNE, R.R., REED, C.A., HALBERT, T.R., LANG, G. e ROBINSON, W.T. (1975). J. Am. Chem. Soc. 97, 1427-1439.

- COON, M.J., STROBEL, H.W. e BOYER, R.F. (1973). Drug Metabol. Disposit. 1, 92-97.
- DALY, J., GUROFF, G., JERINA, D., UDENFRIEND, S. e WITKOP, B. (1968). Adv. Chem. Ser. 77, 279-289.
- DEBEY, P. e BALNY, C. (1973). Biochimie 55, 329-332.
- ELSTNER, E.F. e KRAMER, R. (1973). Biochim. Biophys. Acta 314, 340-353.
- ELSTNER, E.F. e HEUPEL, A. (1974a). Z. Naturforsch. 29c, 559-563.
- ELSTNER, E.F. e HEUPEL, A. (1974b). Z. Naturforsch. 29c, 564-571.
- ELSTNER, E.F., STOFFER, C. e HEUPEL, A. (1975). Z. Naturforsch. 30c, 53-56.
- ELSTNER, E.F. e KONZE, J.R. (1975). Z. Naturforsch. 30c, 58-63.
- ENGLER, C. e WILD, W. (1897). Ber. Deut. Chem. Ges. 30, 1669-1682.
- EYER, P., KIESE, M., LIPOWSKY, G. e WEGER, N. (1974). Chem. Biol. Interact. 8, 41-59.
- FINAZZI AGRO, A., GIOVAGNOLI, C., DE SOLE, P., CALABRESE, L., ROTILIO, G. e MONDOVI, B. (1972). FEBS-Lett. 21, 183-185.

- FOOTE, C.S. e DENNY, R.W. (1968). J. Am. Chem. Soc., 90, 6233-6235.
- FRANKLIN, M.R. e ESTABROOK, R. (1971). Arch. Biochem. Biophys. 143, 318-329.
- FRIDOVICH, I. e HANDLER, P. (1961). J. Biol. Chem. 236, 1836-1840.
- FRIDOVICH, I. (1962). J. Biol. Chem. 237, 584-586.
- FRIDOVICH, I. e HANDLER, P. (1962). J. Biol. Chem., 237, 916-921.
- FRIDOVICH, I. (1967). J. Biol. Chem. 242, 1445-1449.
- FRIDOVICH, I. (1974). Adv. Enzymol. 41, 31-97.
- FRIDOVICH, I. (1975). American Scientist 63, 54-59.
- FRIED, R., FRIED, L.W. e BABIN, D.R. (1973). Eur. J. Biochem. 33, 439-445.
- GEORGE, P. (1965). Em "Oxidases and Related Redox Systems" (T.E. King e col., eds) Vol.1, p. 3-33. John Wiley, New York.
- GOMORI, G. (1955). Methods Enzymol. 1, 138-146.
- GREGORY, E.M. e FRIDOVICH, I. (1973). J. Bacteriol. 114, 543-548.
- HABER, F. e WEISS, J. (1934). Proc. Roy. Soc. Ser. A 147, 332-335.

- HAMILTON, G.A. (1969). Adv. Enzymol. 32, 55-96.
- HAMILTON, G.A. (1974). Em "Molecular Mechanisms of Oxygen Activation" (O. Hayaishi, ed.), p. 405-451. Academic Press, New York.
- HANDLER, P., RAJAGOPLAN, K.V. e ALEMAN, V. (1964). Federation Proc. 23, 30-38.
- HARCOURT, R.D. (1971). Int. J. Quantum Chem. 5, 479-495.
- HARRISON, W.H. (1963). Arch. Biochem. Biophys. 101, 116-130.
- HARTREE, E.F. (1972). Anal. Biochem. 48, 422-427.
- HARTZ, J.W. e DEUTSCH, H.F. (1969). J. Biol. Chem. 244, 4565-4572.
- HASASHI, A., SUZUKI, T. e SHIN, M. (1973). Biochim. Biophys. Acta 310, 309-316.
- HAWLEY, M.D., TATAWAWADI, S.V., PIEKARSKI, S. e ADAMS, R.N. (1967). J. Am. Chem. Soc. 89, 447-450.
- HAYAISHI, O. e NOZAKI, M. (1969). Science 164, 389-396.
- HILDEBRANDT, A.G. e ESTABROOK, R.W. (1971). Arch. Biochem. Biophys. 143, 66-79.
- HIRATA, F. e HAYAISHI, O. (1971). J. Biol. Chem. 246, 7825-7826.

- HOWES, R.M. e STEELE, R.H. (1972). Res. Comm. Chem.Pathol. Pharmacol. 3, 349-357.
- IYANAGI, T. e YAMAZAKI, I. (1969). Biochim. Biophys.Acta 172, 370-381.
- JENCKS, W.P. (1969). Em "Catalysis in Chemistry and Enzymology". p. 107, 499. McGraw-Hill, New York.
- JERINA, D.M., DALY, J.W., WITKOP, B., ZALTMANNIRENBERG, P. e UDENFRIEND, S. (1970). Biochemistry 9, 147-156.
- JERINA, D.M., KAUBISCH, N. e DALY, J.W. (1971). Proc.Nat. Acad. Sci. U.S. 68, 2545-2548.
- KAKIZAKI, T., SATO, M., TSURUTA, H. e HASEGAWA, H. (1969). Ind. Health 7, 13-21.
- KHAN, A.U. (1970). Science 168, 476-477.
- KIESE, M. (1966). Pharmacol. Rews. 18, 1091-1161.
- KIMMEL, J.R., MARKOWITZ, H. e BROWN, D.M. (1959). J.Biol. Chem. 234, 46-50.
- KNOWLES, P.F., GIBSON, J.F., PICK, F.M. e BRAY, R.C.(1969). Biochem. J. 111, 53-58.
- KWIATKOWSKI, L.D. e KOSMAN, D.J. (1973). Biochem. Biophys. Res. Comm. 53, 715-721.
- LEKOWITZ, R.J. (1974). Biochem. Biophys. Res. Comm. 58, 1110-1118.

- LEMBERG, R. e LEGGE, J.W. (1949). Em "Hematin Compounds and Bile Pigments", p. 519. Interscience Publishers, Inc., New York.
- MALMSTRÖM, B.G. (1970). Biochem. J. 117, 15P-16P.
- MANN, T. e KEILIN, D. (1938). Proc. Roy. Soc. Ser. B. 126, 303-315.
- MARKOWITZ, H., CARTWRIGHT, G.E. & WINTROBE, M.M. (1959). J. Biol. Chem. 234,40-45.
- MASSEY, V., STRICKLAND, S., MAYHEW, S.G., HOWELL, L.G., ENGEL, P.C., MATTHEWS, R.G., SCHUMAN, M. e SULLIVAN, P.A. (1969a). Biochem. Biophys. Res. Comm. 36, 891-897.
- MASSEY, V., MÜLLER, F., FELDEBERG, R., SCHUMAN, M., SULLIVAN, P.A., HOWELL, L.G., MAYHEW, S.G., MATHEWS, R.G. e FOUST, G.P. (1969b). J. Biol. Chem. 244, 3999-4006.
- MASTERS, B.S.S., KAMIN, H., GIBSON, Q.H. e WILLIAMS, C.H. Jr. (1965a). J. Biol. Chem. 240, 921-931.
- MASTERS, B.S.S., BILIMORIA, M.H. e KAMIN, H. (1965b). J. Biol. Chem. 240, 4081-4088.
- MAUGH II, T.H. (1975). Science 187, 154-156.
- MAXWELL, J.C., VOLPE, J.A., BARLOW, C.H. e CAUGHEY, W.S. (1974). Biochem. Biophys. Res. Comm. 58, 166-171.
- MAY, S.W., ABBOTT, B.J. e FELIX, A. (1973). Biochem. Biophys. Res. Comm. 54,1540-1545.

- Mc CORD, J.M. e FRIDOVICH, I. (1969a) Fed. Proc. 28,346.
- Mc CORD, J.M. e FRIDOVICH, I. (1969b). J. Biol. Chem. 244, 6049-6055.
- Mc CORD, J.M., KEELE, B.B. e FRIDOVICH, I. (1971). Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 1024-1027.
- MICHELSON, A.M. (1974). FEBS-Lett. 44, 97-100.
- MILLER, R.W. e MASSEY, V. (1965). J. Biol. Chem. 240, 1466-1472.
- MILLER, R.W. (1970). Can. J. Biochem. Physiol. 48,935-939.
- MILLER, R.W. e PARUPS, E.V. (1971). Arch. Biochem. Biophys. 143, 276-285.
- MILLER, R.W. e RAPP, U. (1973). J. Biol. Chem. 248,6084-6090.
- MILLER, R.W. e MACDOWALL, F.D.H (1975). Biochim. Biophys. Acta 387, 176-187.
- MISRA, H.P. e FRIDOVICH, I. (1971a). J. Biol. Chem. 246, 188-192.
- MISRA, H.P. e FRIDOVICH, I. (1971b). J. Biol. Chem. 246, 6886-6890.
- MISRA, H.P. e FRIDOVICH, I. (1972a). J. Biol. Chem. 247, 3170-3175.

- MISRA, H.P. e FRIDOVICH, I. (1972b), J. Biol. Chem. 247, 6960-6962.
- NAKAMURA, S. e YAMAZAKI, I. (1969). Biochim. Biophys. Acta 189, 29-37.
- NAKAMURA, S. e KIMURA, T. (1972). J. Biol. Chem. 247, 6462-6468.
- NAKANO, M., TSUTSUMI, Y. e USHIJIMA, Y. (1971). Biochim. Biophys. Acta 252, 335-347.
- NILSSON, R. (1969). Biochim. Biophys. Acta 184, 237-251.
- NISHIBAYASHI, H. e SATO, R. (1968). J. Biochem. (Tokyo) 63, 766-779.
- NISHIBAYASHI-YAMASHITA, H. e SATO, R. (1970). J. Biochem. (Tokyo) 67, 199-210.
- NOBLE, R.W. e GIBSON, Q.H. (1970). J. Biol. Chem. 245, 2409-2413.
- NOBREGA, F.G., ARAUJO, P.S., PASETTO, M. e RAW, I. (1969). Biochem. J. 115, 849-856.
- NORMAN, R.O.R. e SMITH, J.R.S. (1965). Em "Oxidases and Related Redox Systems" (T.E. King e col., eds) Vol. 1, p. 131-156. John Wiley, New York.
- ODAJIMA, T. (1971). Biochim. Biophys. Acta 235, 52-60.
- ODAJIMA, T. e YAMAZAKI, I. (1970). Biochim. Biophys. Acta 206, 71-77.

- ODAJIMA, T. e YAMAZAKI, I. (1972). Biochim. Biophys. Acta 284, 355-359.
- OHNISHI, T., YAMAZAKI, K., IYANAGI, T., NAKAMURA, T. e YAMAZAKI, I. (1969). Biochim. Biophys. Acta 172, 357-369.
- ORME-JOHNSON, W.H. e BEINERT, H. (1969). Biochem. Biophys. Res. Comm. 36, 905-911.
- OSHINO, N. e SATO, R. (1971). J. Biochem. (Tokyo) 69, 169-181.
- PASCHEN, W. e WESER, U. (1973). Biochim. Biophys. Acta 327, 217-222.
- PASCHEN, W. e WESER, U. (1975). Z. Physiol. Chem. 356, 727-737.
- PAULING, L. (1964). Nature 203, 182-183.
- PEDERSEN, J.A. (1973). J. Chem. Soc. Perkin Transact. II 424-431.
- POLITZER, I.R., GRIFFIN, G.W. e LASETER, J.L. (1971). Chemico-Biol. Interactions 3, 73-93.
- POLITZER, P. (1968). Biochim. Biophys. Acta 153, 799-803.
- PROUGH, R.A. e MASTERS, B.S.S. (1973a). Federation Proc. 32, 666 Abs.

- PROUGH, R.A. e MASTERS, B.S.S. (1973b). Ann. N.Y. Acad. Sci. 212, 89-93.
- PRYOR, W.A. (1966). Em "Free Radicals". Mc Graw-Hill, New York.
- RAJAGOPLAN, K.V., FRIDOVICH, I. e HANDLER, P. (1962). J. Biol. Chem. 237, 922-928.
- RAO, P.S. e HAYON, E. (1973). J. Phys. Chem. 77, 2274 - 2276.
- RAPP, U., ADAMS, W.C. e MILLER, R.W. (1973). Can.J.Biochem. 51, 158-171.
- RIFKIND, J.M. (1974). Biochemistry 13, 2475-2481.
- RIMAI, L., SALMEEN, I. e PETERING, D.H. (1975). Biochemistry 14, 378-382.
- ROTILIO, G., CALABRESE, L., FINAZZI AGRO, A. e MONDOVI, B. (1970). Biochim. Biophys. Acta 198, 618-620.
- ROTILIO, G., FALCIONE, G., FIORETTI, E. e BRUNORI, M. (1975). Biochem. J. 145, 405-407.
- SALVATI, A.M., AMBROGIONI, M.T. e TENTORI, L. (1969). Ital. J. Biochem. 18, 1-18.
- SATO, R., NISHIBAYASHI, H. e OMURA, T. (1962). Biochim. Biophys. Acta 63, 550-552.
- SMITH, M.J. e BECK, W.S. (1967). Biochim. Biophys. Acta 147, 324-333.

- STANSELL, M.J. e DEUTSCH, H.F. (1965). J. Biol.Chem.240, 4299-4305.
- STRITTMATTER, P. (1967). Methods Enzymol. 10, 561-565.
- STROBEL, H.W. e COON, M.J. (1971). J. Biol. Chem. 246, 7826-7829.
- TAMURA, M., ASAKURA, T. e YONETANI, T. (1972). Biochim. Biophys. Acta 268, 292-304.
- TAMURA, M. e YAMAZAKI, I. (1972). J. Biochem. (Tokyo) 71, 311-319.
- TRAUBE, M. (1882). Ber. Deut. Chem. Ges. 15, 659-675.
- WALAAS, E. e WALAAS, O. (1961). Arch. Biochem. Biophys. 95, 151-162.
- WALLACE, W.J., MAXWELL, J.C. e CAUGHEY, W.S. (1974). Biochem. Biophys. Res. Comm. 57, 1104-1110.
- WALLACE, W.J. e CAUGHEY, W.S. (1975). Biochem. Biophys. Res. Comm. 62, 561-567.
- WARBURG, O. (1949). Em "Heavy Metal Prosthetic Groups and Enzyme Actions", Oxford Univ. Press, London e New York.
- WASSERMAN, H.H., SCHEFFER, J.R. e COOPER, J.L. (1972). J. Am. Chem. Soc. 94, 4991-4996.
- WEISS, J. (1953). Experientia 9, 61-62.

- WEISS, J.J. (1964). Nature 202, 83-84.
- WESER, U. e PASCHEN, W. (1972). FEBS-Lett. 27, 248-250.
- WESTHEIMER, F.H. (1954). Em "The Mechanism of Enzyme Action" (W.D. Mc Elroy e B. Glass, eds) p. 321-356. The Johns Hopkins Press, Baltimore.
- WEVER, R., OUDEGA, B. e VAN GELDER, B.F. (1973). Biochim. Biophys. Acta 302, 475-478.
- WILLIAMS, R.J.P. (1970). Biochem. J. 117, 14p-15p.
- WILSON, L. (1971). Trans. Faraday Soc. 67, 3020-3029.
- YAMAZAKI, I. (1966). Em "Biological and Chemical Aspects of Oxygenases" (K. Bloch e O. Hayaishi, eds) p. 433 - 442. Maruzen Company, LTD., Tokyo.
- YANAGI, T. e YAMAZAKI, I. (1969). Biochim. Biophys. Acta 172, 370-381.
- ZIMMERMANN, R., FLOHE, L., WESER, U. e HARTMANN, H.-J. (1973). FEBS-Lett. 29, 117-120.