ETELVINO JOSÉ HENRIQUES BECHARA

AUTOXIDAÇÃO DE 1,4-DIHIDRONICOTINAMIDAS
PROMOVIDA POR N,N,N',N'-TETRAMETIL-P-FENILENODIAMINA:
MODELO DE SÍNTESE DE ATP NO SÍTIO I DA CADEIA RESPIRATÓRIA

Tese de Doutorado apresentada
ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. GIUSEPPE CILENTO

SÃO PAULO .

1 972

A MEUS PAIS

MINHA DULCE

E MEUS FILHOS

Ao Prof. G. Cilento, minha gratidão
pela orientação segura e objetiva.

Meus agradecimentos,

à D. Jacyra, personificação da eficiência, bondade e compreensão.

ao Roberto, amigo certo em todos os momentos.

aos demais colegas do laboratório: professores, doutorandos e funcionários.

à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela ajuda material.

ao "Equipe Vestibulares" pela solidariedade na confecção desta tese.

ÍNDICE

PÁG.

1.	INTRODUÇÃO À FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA	1
2.	HIPÓTESES SOBRE MECANISMO DE ACOPLAMENTO OXIDAÇÃO-FOSFORILAÇÃO	4
3.	MODELOS QUÍMICOS DE FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA	6
4.	PARTE EXPERIMENTAL	11
	Abreviações	11
4.1.	Drogas	12
4.2.	Aparelhagem	15
4.3.	Métodos	15
4.3.1.	Medidas Manométricas e Espectrofotométricas	15
4.3.2.	Preparação de Solução Aquosa de 1-n-Propil-6-Hidroxi-1,4, 5,6-Tetrahidronicotinamida	16
4.3.3.	Isolamento, Identificação e Dosagem dos Cátions Resultan- tes da Autoxidação de 1,4-Dihidronicotinamidas e 1-n-Pro- pil-6-Hidroxi-1,4,5,6-Tetrahidronicotinamida em Meio Aquo- so	17
4.3.4.	Cinética da Autoxidação	17
4.3.5.	Testes de Autoxidação de 1-n-Propil-6-Hidroxi-1,4,5,6,-Te- trahidronicotinamida em Piridina. Formação de Pirofosfato	18
4.3.6.	Separação, Identificação e Dosagem dos Produtos de Oxi- dação de 1-n-Propil-1,4-Dihidronicotinamida, em Piridina:	19
4.3.6.1.	Procedimento da Reação	19
4.3.6.2.	Cromatografia em Resina de Troca Aniônica	20
4.3.6.3.	Cromatografia em Resina de Troca Catiônica	21
4.3.6.4.	Cálculo de Rendimentos	22
5.	RESULTADOS:	23
5.1.	Autoxidação de 1,4-Dihidronicotinamidas Promovida pelo Sistema $O_2/N,N,N',N'$ -Tetrametil-p-Fenilenodiamina, em Solução Aquosa	23
5.1.1.	Considerações Preliminares	23
5.1.2.	Identificação dos Produtos Catiônicos	26
5.1.3.	Efeito da Presença de Catalase	30
5.1.4.	Efeito da Natureza do Substrato	30
5.1.5.	Efeito da Natureza do Catalisador	33
5.1.6.	Efeito da Natureza do Solvente	33
5.1.7.	Efeito da Luz	35
5.1.8.	Efeito da Presença de Detectores de Íon Superóxido, O_2^- ..	35
5.1.9.	Cinética de Autoxidação das 1,4-Dihidronicotinamidas: ...	39
5.1.9.1.	Variação da Concentração dos Participantes	39
5.1.9.2.	Influência da Temperatura	44

5.1.9.3.	Substituição do Solvente H_2O por D_2O	44
5.1.9.4.	Substituição Isotópica de H do C4 por D na 1,4-Dihidronicotinamida	46
5.2.	Autoxidação de 1-n-Propil-6-Hidroxi-1,4,5,6-Tetrahidronicotinamida em Solução Aquosa, Promovida pelo Sistema $O_2/N, N^-, N', N'$ -Tetrametil-p-Fenilenodiamina. Catálise por Fosfato	46
5.2.1.	Autoxidação Comparativa de 1-n-Propil-1,4-Dihidronicotinamida em Tampão Tris e em Tampão Fosfato	46
5.2.2.	Autoxidação de 1-n-Propil-6-Hidroxi-1,4,5,6-Tetrahidronicotinamida	48
5.2.3.	Substituições Isotópicas	55
5.2.4.	Efeito da Natureza do Solvente	57
5.2.5.	Efeito da Variação da Concentração e Natureza dos Reagentes	57
5.2.6.	Efeito da Presença de Detectores de O_2^-	60
5.2.7.	Substituição do Sistema Oxidante $O_2/N, N, N', N'$ -Tetrametil-p-Fenilenodiamina por:	60
5.2.7.1.	Flavina Mononucleótido	60
5.2.7.2.	KBr_3	63
5.3.	Formação de "Ligações Ricas" na Oxidação de 1-n-Propil-1,4-Dihidronicotinamida e 1-n-Propil-6-Hidroxi-1,4,5,6-Tetrahidronicotinamida pelo Sistema $O_2/N, N, N', N'$ -Tetrametil-p-Fenilenodiamina em Meio Piridínico	65
6.	DISCUSSÃO	71
6.1.	Autoxidação de Coenzimas Piridínicos e Modelos Promovida pelo Sistema $O_2/N, N, N', N'$ -Tetrametil-p-Fenilenodiamina. Mecanismo e Considerações Termodinâmicas	71
6.2.	Autoxidação de 1-n-Propil-6-Hidroxi-1,4,5,6-Tetrahidronicotinamida em H_2O	76
6.3.	Geração de "Ligações Ricas" em Meio Piridínico. Modelo de Síntese de ATP no Sítio I da Cadeia Respiratória	78
6.4.	Implicações Biológicas	80
7.	RESUMO - SUMMARY	84
8.	BIBLIOGRAFIA	86

1. INTRODUÇÃO A OXIDAÇÃO-FOSFORILATIVA

O conceito de fosforilação ligada à oxidação é conhecido há cerca de quarenta anos (ENGELHARDT, 1930, 1932). A primeira evidência para este fenômeno foi obtida por KALCKAR (1937, 1939) em preparações de tecidos livres de células. BELITZER e TSIBAKOVA (1939) trabalhando com homogenatos de músculo e OCHOA (1940, 1941) com homogenatos de cérebro e de coração observaram que a razão entre moles de fosfato esterificado e moles de átomos de oxigênio consumido (razão P/O) é igual a dois. Desde que tais preparações tinham atividade atepéásica foi muito difícil chegar a resultados mais precisos. Mais tarde, OCHOA (1943) calculou um valor médio para a razão P/O igual a três na oxidação completa de piruvato a CO_2 e H_2O .

De especial importância foi a descoberta de FRIEDKIN e LEHNINGER (1949) que a mitocôndria de fígado catalisa a fosforilação do ADP às custas da oxidação de NADH por O_2 . LEHNINGER (1955) encontrou uma razão P/O igual a 2,6 para esta oxidação, ao usar soluções hipotônicas que favorecem a penetração de NADH na mitocôndria. Num trabalho anterior, LARDY e WELLMAN (1952) tinham constatado que a velocidade de transporte de elétrons entre NADH e O_2 é controlada pelas concentrações de ADP e fosfato. Investigações posteriores em vários laboratórios permitiram chegar a valores da relação P/O para cada etapa do ciclo de Krebs e a informações mais completas sobre "contrôle respiratório".

Concomitantemente ao estabelecimento da sequência dos transportadores de elétrons na cadeia respiratória, procurou-se determinar os sítios aproximados de fosforilação. Cumpre citar os trabalhos pioneiros de NILSEN e LEHNINGER (1955), COOPER e LEHNINGER (1956), COPENHAVER e LARDY (1952), CHANCE E WILLIAMS (1955a, b; 1956), SLATER (1956). Pode-se propor simplifcadamente o seguinte esquema mostrando os sítios de fosforilação (LARDY e FERGUSON, 1969):

F_{PD} ~ NADH desidrogenase

F_{PS} - succinato desidrogenase

$\text{N} - \text{HFe}$ - proteínas com Fe não hemínico

Entretanto até hoje existem certas dúvidas sobre a sequência de transportadores e sobre a localização exata dos sítios de fosforilação.

Frequentemente se tem usado inibidores e desacopladores no estudo da respiração e fosforilação mitocondrial. LOOMIS e LIPMANN (1948) foram os primeiros a demonstrar que 2,4-dinitrofenol estimula a respiração mesmo na ausência de fosfato e que impede a formação de ATP. Logo depois alguns pesquisadores sugeriram que o 2,4-dinitrofenol catalisa a clivagem de um intermediário "rico em energia" ($\text{X} \sim \text{P}$ ou $\text{X} \sim \text{I}$) responsável pelo acoplamento entre a oxidação e a fosforilação do ADP. Outros desacopladores foram utilizados posteriormente, uns atuando com mesma eficácia nos três locais de fosforilação e outros sendo específicos para determinados locais.

A partir de 1955 vários grupos de pesquisadores têm fracionado a mitocôndria em partículas capazes de respirar porém não fosforilantes ("partículas submitocondriais") e soluções ou suspensões de proteínas (fatores de acoplamento). Estas frações quando reunidas restauram a fosforilação acoplada à respiração, embora não completamente. Este fato mostra que não é imprescindível ter-se a mitocôndria intacta para que ela possa realizar suas funções respiratória e fosforilativa.

Malgrado estas quatro décadas de pesquisa sobre fosforilação oxidativa, pode-se dizer que o problema fundamental - o mecanismo de transferência de energia das reações de redox à formação de "ligações ricas" - ainda não foi satisfatoriamente solucionado.

PULLMAN e SCHATZ (1967) e LARDY e FERGUSON (1969), entre ou tros pesquisadores, elaboraram revisões sobre vários aspectos ligados ao fenômeno.

2. HIPÓTESES SOBRE MECANISMO DE ACOPLAMENTO OXIDAÇÃO-FOSFORILAÇÃO

Um dos principais problemas é determinar como a energia livre liberada na cadeia respiratória é utilizada para formação de ATP. São conhecidas três hipóteses:

a) - Hipótese química (SLATER, 1953; CHANCE e WILLIAMS, 1956) - baseada no modelo de fosforilação ao nível do substrato, propõe a formação de compostos intermediários "ricos em energia" como precursores de ATP.

b) - Hipótese quimiosmótica (MITCHELL, 1956, 1961, 1968) - propõe que a energia de oxi-redução é utilizada na formação de um gradiente de pH através da membrana, descompensado pelo movimento de cátions no sentido contrário ou de ânions no mesmo sentido. O potencial da membrana é usado na síntese de ATP.

c) - Hipótese conformacional (KING et al, 1965 e BOYER, 1965) - propõe que a energia liberada na cadeia provoca alterações conformacionais nas proteínas respiratórias. A energia conformacional da membrana é usada na síntese de ATP:

A hipótese conformacional é portanto algo semelhante à química, com a diferença da primeira enfatizar a apoproteína e a última, a

formação de ligação covalente envolvendo grupos prostéticos.

SLATER (1971), analisou criticamente estas hipóteses e salien
tou como mais viável a química, ou seja, a formação de intermediário "ri
co em energia". Entretanto, a falta de evidência experimental direta pa
ra existência do intermediário, a dificuldade em se explicar a especifici
dade relativa ao ADP ou a ação de desacopladores e inibidores da fosfori-
lação oxidativa constituem sérios problemas a serem superados para acei
tação definitiva da hipótese química.

3. MODELOS QUÍMICOS DE FOSFORILAÇÃO-OXIDATIVA

LIPMANN (1941), inspirado na fosforilação oxidativa ao nível do substrato, propôs que a adição de fosfato à dupla carbonílica de um composto não especificado, seguida de oxidação, gera o intermediário precursor do ATP. Esta opinião também foi compartilhada por vários pesquisadores, entre eles GLAHN e NILSEN (1959) e TERWELLE e SLATER (1967). Os primeiros postularam modelos para os três sítios de fosforilação baseados no ataque de agentes nucleófilos aos grupos carboxamida do NADH, carboximida das flavinas e formil do heme A da citocromoxidase. Seguindo-se a oxidação, haveria formação dos intermediários $\text{NAD}\sim\text{X}$, $\text{FAD}\sim\text{X}$ e $\text{cit a}_3\sim\text{X}$, onde X = mercapteto, carboxilato ou fosfato.

Outra linha de pesquisa (CLARK et al, 1961; CHMIELEWSKA, 1960; VILKAS e LEDERER, 1962; ERICKSON et al, 1963; MOORE e FOLKERS, 1964) sugeriu a participação de quinolfosfatos e metinoquinonas no processo de acoplamento; entretanto tais modelos foram contestados posteriormente para sistemas biológicos além de que a própria formação dos substratos oxidáveis requer energia.

A fosforilação ao nível dos coenzimas piridínicos foi sugerida por BURTON e KAPLAN (1963) e por BARLTROP et al (1963). Os primeiros verificaram que piridino nucleótidos e estruturas análogas tratados com ácidos geram um composto com forte banda de absorção em 290 nm, provavelmente devida à conjugação do grupo carboxamida com a ligação dupla $\text{C}_2=\text{C}_3$. Com base nestes resultados e em trabalhos anteriores (RAFTER et al, 1954; CHAYKIN et al, 1954; MEINHART e CHAYKIN, 1955; MEINHART et al, 1956) propuseram o seguinte esquema para fosforilação do ADP no sítio I da cadeia respiratória:

BARLTROP et al (1963) apresentaram evidências químicas para dois tipos semelhantes de mecanismo de fosforilação, um envolvendo o anel da adenina e outro, o anel da 1,4-dihidronicotinamida. Em ambos mecanismos postularam que parte do NADH (NAD) da mitocôndria está envolvida num ciclo de ativação e transferência de fosfato e o resto do NADH (NAD) nos processos de óxido-redução. O modelo apresentado para o anel da 1,4-dihidronicotinamida é o seguinte:

BRINIGAR e WANG (1964) observaram a formação de ATP na oxidação de clorocruoroheme (2-formil-4-vinil-deutero-heme) e do seu isômero (4-formil-2-vinildeutero-heme), estruturas modelo do heme A, por O_2/CO em N,N-dimetilacetamida e contendo fosfato de imidazolínio e ADP. Por outro lado viram que a oxidação do protoheme, desprovido de grupo formil, não era acoplada à formação do ATP. De início deram importância à participação do grupo formil e propuseram mecanismo baseado na transferência de um elétron. Posteriormente (BRINIGAR et al, 1967; COOPER et al, 1968) concluiu-se por outro mecanismo envolvendo dois elétrons, no qual o 1-fosfoimidazol formado na etapa 3 seria o responsável pela fosforilação de AMP e de ADP:

Investigações recentes têm ressaltado a participação de compostos de enxofre (tióis, tioéteres, tioésteres) no processo de fosforilação oxidativa, ora usando sistemas modelo ora trabalhando com material biológico. SABADIE-PIALOUX e GAUTHERON (1971) investigaram o possível papel de tióis no mecanismo de acoplamento através da medida de variações de grupos SH livres durante a síntese de ATP em mitocôndria de coração. Ao que parece as proteínas que contêm enxofre e ferro não hemínico da mitocôndria desempenham papel muito importante.

WIELAND e BAUERLEIN (1967a,b,c; 1968) e WIELAND e AQUILA (1968) descobriram que N-acetilhomocisteína tiolactona (I), tiazolidona e

N-derivados (II) e S-alquilmonotiohidroquinonas (III), oxidados com Br_2 em piridina e na presença de fosfato e AMP produzem ADP e ATP em altos rendimentos. Estas reações foram propostas como modelos para fosforilação oxidativa na mitocôndria.

(I)

(II) $\text{R} = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_6\text{H}_5,$
 CH_3CO

(III)

No caso dos compostos I e II os autores postularam que a oxidação do átomo de enxôfre leva à formação de um carboxilfosfato enquanto III produziria uma fosfoquinona. As tiazolidonas seriam produzidas na mitocôndria através de condensação do tipo:

Porém não se sabe até o presente se os produtos da oxidação podem ser reduzidos e condensados sob condições biológicas para formar os compostos originais.

Mais tarde, LAMBETH e LARDY (1969) efetuaram a síntese de polifosfatos inorgânicos (pirofosfato, trimetafosfato, tripolifosfato, etc.) e orgânicos (ADP, ATP, ATetraP) acoplada à oxidação com Br_2 de tioéteres a sulfóxido em meio piridínico contendo fosfato e AMP ou ADP de tetrabutilamônio. Verificaram que a água compete no processo de fosforilação, diminuindo sobremaneira os rendimentos de "ligações ricas". Propuseram

um mecanismo análogo ao sugerido por HIGUCHI e GENSCHE (1966a,b), onde o íon fosfosulfônio é o responsável pela fosforilação (etapa 3):

$R'' = OH, Pi, \text{ adenosina, AMP, etc.}$

Recentemente FROEDE e HUNTER (1970) e PAINTER e HUNTER (1970a,b,c,d) observaram a formação de ATP durante a oxidação do grupo tiol da glutatona (GSH) por citocromo c, na presença de dissulfeto (GSSG) como catalisador essencial. Demonstraram a ação de desacopladores, obtiveram evidências da existência de um intermediário e comprovaram que ADP é mais eficiente que AMP como aceptor de fosfato. Com base nestes resultados sugeriram um modelo de fosforilação onde, à semelhança do modelo de WIELAND e colaboradores, ressaltam a participação de um íon fosfosulfônio como precursor do ATP. Entretanto, o mecanismo proposto deve ser revisado pois MASSEY et al (1971) demonstraram que o efeito catalítico de GSSG na redução de citocromo c por GSH se deve a enxofre elementar, contaminante de amostras comerciais do catalisador.

Nesta tese apresentaremos nossos resultados sobre a autooxidação de coenzimas piridínicos reduzidos, de seus modelos e do 1-n-propil-6-hidroxi-1,4,5,6-tetrahidronicotinamida (PHTN), catalisada por N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamina (TMPD). Demonstraremos que estas oxidações, quando realizadas em meio piridínico, são acompanhadas da formação de "ligações ricas" e servem como modelo de fosforilação ao nível do NADH.

4. PARTE EXPERIMENTAL

As seguintes abreviações são usadas neste trabalho:

NAD ⁺	- -nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	- -nicotinamida adenina dinucleótido reduzido
NADP ⁺	- -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	- -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
ClBC ⁺	- cloridrato de 1-benzil-3-carboxamidopiridínio
ClBCH	- 1-benzil-3-carboxamido-1,4-dihidropiridina ou 1-benzil-1,4-dihidronicotinamida
ClBCD	- 1-hidro-4-deutero-1-benzil-3-carboxamidopiridina
ClPC ⁺	- cloridrato de 1-n-propil-3-carboxamidopiridínio
ClPCH	- 1-n-propil-3-carboxamido-1,4-dihidropiridina ou 1-n-propil-1,4-dihidronicotinamida
PHTN	- 1-n-propil-6-hidroxi-3-carboxamido-1,4,5,6-tetrahidropiridina ou 1-n-propil-6-hidroxi-1,4,5,6-tetrahidronicotinamida
TMPD	- N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamina
PPDA	- p-fenilenodiamina
FMN	- flavina mononucleótido
TBA-OH	- hidróxido de tetra-n-butilamônio
AMP	- adenosina,5'-monofosfato
ADP	- adenosina,5'-difosfato
ATP	- adenosina,5'-trifosfato
Tris	- tris (hidroximetil)-aminometano
RPPRA	- esta abreviação refere-se às unidades presentes no NADH, exceto o anel da 1,4-dihidronicotinamida
RPPRAP	- idem para o caso do NADPH
DIPAP	- 2,6-diiôdo-p-aminofenol

4.1. DROGAS

ClBC⁺ foi preparado de acordo com KARRER e STARE (1937) e purificado por recristalização de acetona-água (PF = 235-236°C; PF descrito = 236°C). $\epsilon_{263\text{nm}} = 4,25 \cdot 10^3$ (em água). Por redução do ClBC⁺ com Na₂S₂O₄ segundo MAUZERALL e WESTHEIMER (1955), obteve-se o ClBCH; sua purificação foi feita segundo os mesmos autores (PF = 122-123°C; PF descrito = 120-122°C). $\epsilon_{355\text{nm}} = 7,30 \cdot 10^3$ (em H₂O).

ClPC⁺ foi preparado e purificado segundo SUELTER e METZLER (1960) (PF = 193-194°C; PF descrito = 192-194°C). $\epsilon_{265\text{nm}} = 3,94 \cdot 10^3$ (em H₂O). ClPCH foi obtido por redução de ClPC⁺ segundo os mesmos autores e recristalizado de H₂O (PF = 91-92°C; PF descrito = 91,0-91,5°C). $\epsilon_{360\text{nm}} = 7,06 \cdot 10^3$ (em H₂O).

Os análogos do ClBCH e ClPCH monodeuterados no C₄ foram preparados de acordo com os mesmo autores, fazendo-se a redução em D₂O (General Dynamics Corp., pureza 99,5%). Os PF medidos foram os mesmos e a incorporação do deutério foi confirmada nos espectros I.R. (banda ao redor de 1.100 cm⁻¹).

ClBCD

ClPCD

A formação do PHTN em H_2O e em piridina está descrita na seção de MÉTODOS; $\epsilon_{290nm} \sim 2.10^4$.

PHTN

NADH e NADPH (sais dissódico e tetrasódico, respectivamente), FMN e AMP (forma ácida) foram comprados da "Sigma Chemical Co". e o ATP (sal dissódico) da "Pabst Laboratories". Foram usadas duas amostras diferentes de ADP (sal dissódico): uma da "Sigma" e outra da "Pabst".

Os sais de tetra-n-butilamônio $(TBA)_3 ADP$, $(TBA)_2 AMP$ e $(TBA)_2 HPO_4$ foram preparados pelo método de WIELAND e BÄUERLEIN (1967c) da forma indicada por LAMBETH e LARDY (1969). A solução benzeno-metanólica de hidróxido de tetra-n-butilamônio usada nestas preparações foi obtida a partir de iodeto de tetra-n-butilamônio (reagente BDH) e Ag_2O , segundo o método de CUNDIFF e MARKUNAS (1956). O fosfato de piridínio foi obtido por adição direta de H_3PO_4 90% (reagente BDH) à piridina.

TMPD.2HCl (reagente BDH) foi recristalizado de metanol absoluto e, para fins comparativos, de acetona-água. PPDA da "Schering-Kahlbaun A.G." foi duas vezes sublimada no vácuo (PF = $146-147^\circ C$; PF descrito = $145-147^\circ C$, "The Merck Index").

TMPD

PPDA

O catecol foi comprado da "General Chemical Co." e recristalizado de tolueno (PF = 104-105°C; PF descrito = 105°C; "The Merck Index"). Hidroquinona foi adquirida da "May and Baker" e recristalizada de água (PF = 170-171°C; PF descrito = 170-171°C).

A catalase foi adquirida da "Sigma Chemical Co." e a álcool desidrogenase da "C.F. Bohringer e Soehne". A superóxido dismutase foi preparada a partir de sangue de boi segundo McCORD e FRIDOVICH (1969a) e obtida em duas frações de concentrações aproximadas $1.10^{-3}M$ e $3.10^{-5}M$. Sua atividade foi testada no processo de oxidação do sistema xantina-xantina oxidase por ferricitocromo c, na autooxidação de sulfito, na redução de ferricitocromo c por sulfito (McCORD e FRIDOVICH, 1969b) e na reoxidação de um intermediário formado durante a redução de NAD^+ com $Na_2S_2O_4$ (comunicação pessoal do Prof. Dr. VINCENT MASSEY).

Na preparação dos tampões (GOMORI, 1955) o monohidrogenofosfato e o dihidrogenofosfato de sódio eram da "Baker" ao passo que o Tris, o monohidrogenoarsenato de sódio e citrato de sódio eram da "Merck". Nos casos em que o tampão foi diluído com solvente orgânico, o pH assinalado refere-se aquele do tampão original. Os tampões em D_2O foram preparados imediatamente antes seu uso e levou-se em conta que $pD = pH$ medido + 0,4 (GLASOE e LONG, 1960; SRERE et al, 1961).

Todos os solventes usados foram cuidadosamente purificados e destilados antes seu uso (VOGEL, 1964). Para reações em meio anidro, a piridina foi seca sobre KOH e os demais reagentes sobre P_2O_5 .

A marcação do fosfato das misturas de reação com P^{32} foi feita usando-se amostra de fosfato sódico- P^{32} proveniente do Instituto de Energia Atômica de São Paulo.

Outras drogas usadas tinham a seguinte procedência:

Carlo Erba: H_2SO_4 , $MgCl_2$, $MnCl_2$, KBr, $FeSO_4$

BDH: H_3PO_4 , $CaCl_2$, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$

Baker: KCl, HCl

Merck: NH_4Cl , Br_2 , $HClO_4$, CCl_3COOH

Qeel: NH_4OH , $Na_4P_2O_7$

Mann Research: 2,4-dinitrofenol

As demais drogas usadas no trabalho experimental eram também de origem comercial e da maior pureza disponível.

4.2. APARELHAGEM

O consumo de O_2 foi acompanhado manometricamente em "Precision Warburg Apparatus" segundo técnicas convencionais, geralmente a $25,0 \pm 0,1^\circ C$.

Os valores de pH foram lidos num potenciômetro "Metrohm E 388", com precisão de $\pm 0,01$.

Os espectros de absorção e absorbâncias a comprimento de onda fixo, no visível e no U.V., foram obtidos em vários aparelhos: Beckman D.U., Beckman D.B., Cary 14, Zeiss DMR 21, Zeiss PMQ II. A cinética de reações por via espectrofotométrica foi acompanhada nos aparelhos citados com registro gráfico, ora fixando-se o comprimento de onda ora correndo-se os espectros nos vários tempos. A não ser que se especifique diferentemente, as celas foram termostatizadas a $25,0 \pm 0,1^\circ C$. Os espectros de absorção de misturas de reação no I.R. próximo (800 a 1300nm) foram obtidos com Cary-14 e Zeiss-DMR 21. Na identificação de drogas pelo espectro IR usou-se um aparelho da Perkin-Elmer, Modelo 337.

Foram geralmente usadas celas de vidro ou de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico e 3,7 ml de capacidade. As reações em anaerobiose foram realizadas em celas de Thunberg, fazendo-se o vácuo a $0^\circ C$ para reduzir perdas do solvente por evaporação ou em atmosfera de N_2 puro.

A atividade do P^{32} foi contada num aparelho Geiger - Muller da Nuclear Chicago, Modelo 181B.

4.3. MÉTODOS

4.3.1. Medidas no Warburg e no Espectrofotômetro:

As reações de autooxidação de 1,4-dihidronicotinamidas e de seus derivados hidratados foram estudadas a $25,0 \pm 0,1^\circ C$, seguindo-se o consumo de oxigênio no manômetro de Warburg. A cinética de autooxidação também foi seguida espectrofotometricamente pelo desaparecimento da banda na região de 340 - 360 nm. Neste caso, para assegurar concentração constante de oxigênio, a reação foi realizada no Warburg, em sistema aberto e, a intervalos regulares, retiraram-se alíquotas da mistura de reação as

quais eram imediatamente diluídas para leitura da absorvância. Os solventes usados foram tampões Tris e fosfato, de concentrações e pH indicados em cada caso, sendo que no caso do ClBCH, pouco solúvel em água, usou-se mistura tampão-metanol (1:1;v/v). A reação com PHTN foi geralmente realizada em tampão fosfato 0,2M pH 6,88.

As oxidações de ClPCH com KBr_3 (BARLTROP et al., 1963) e de PHTN com FMN serão descritas na seção de RESULTADOS.

4.3.2. Preparação de Solução Aquosa de PHTN :

O PHTN e análogos foram preparados em anaerobiose a partir da 1,4-dihidronicotinamida, em tampão fosfato, em cela de Thunberg. A hidratação foi seguida por medidas de absorvância na região de 400 nm até valores baixos e constantes. O fosfato atua como catalisador na hidratação (STOCK et al., 1961; JOHNSTON et al., 1963; ALIVISATOS et al., 1965; ANDERSON et al., 1965):

R = benzil, propil, RPPRA, RPPRAP

A hidratação em D_2O foi mais lenta que em H_2O , fato observado também por KIM e CHAYKIN (1968).

Terminada a hidratação o sistema foi aberto, a concentração do PHTN obtida por medida de absorvância a 290nm ($\epsilon \approx 2.10^4$) e amostras pipetadas para reação nos frascos de Warburg. Para estudar a catálise por fosfato na autoxidação de PHTN, este reagente foi preparado em tampão Tris pH = 6,88 contendo TMPD e em condições de anaerobiose. A forma monoprotonada de TMPD, além de catalisar a autoxidação, mostrou-se excelente catalisador do processo de hidratação.

4.3.3. Isolamento, Identificação e Dosagem dos Cátions Formados na Oxidação em Água:

O NAD^+ foi identificado e determinado diretamente na mistura de reação com o sistema álcool-álcool desidrogenase (CIOTTI e KAPLAN, 1957).

Os modelos oxidados puderam ser identificados no espectro de absorção da mistura de reação pela banda típica em 265 nm. Entretanto, especialmente no caso do ClPCH e PHTN , a identificação do ClPC^+ foi dificultada pela presença do produto hidratado residual e de outros produtos que absorvem fortemente em 290 nm. Por isso tornou-se necessária a separação dos componentes de mistura de reação em resina de troca iônica, tipo Dowex 50W-X4, 200-400 "meshes".

Passou-se lentamente 0,5 ml da mistura de reação através da coluna de resina (0,58 x 3,0 cm) na forma de sal de NH_4^+ . A coluna foi então exaustivamente lavada com água para garantir remoção completa dos produtos moleculares que absorvem a 290 nm. Os cátions foram eluídos com solução de NH_4Cl 5,0M. O ClBC^+ saiu geralmente na quinta ou sexta fração de 5 ml e o ClPC^+ nas duas primeiras frações de 5 ml. Entretanto no caso do ClPC^+ em tampão fosfato o espectro destas frações já mostrou contribuição de absorção devida a um cátion não identificado ($\lambda_{\text{máx.}} = 290 \text{ nm}$) o qual é eluído nas frações seguintes (até sexta ou sétima fração). Com o intuito de se eluir ClPC^+ puro recolheram-se frações de 1,0 ml. Os cátions ClBC^+ e ClPC^+ puderam assim ser mais facilmente identificados e dosados pelo seu espectro de absorção no UV.

O ClPC^+ formado na oxidação com FMN foi analisado segundo este mesmo procedimento, exceto que o eluente foi NH_4Cl 1,0M.

4.3.4. Cinética:

A dependência entre velocidade de consumo de oxigênio e concentração de um reagente ou catalisador foi obtida da inclinação da reta que se obtém ao projetar o logaritmo das velocidades iniciais versus o logaritmo das concentrações; em cada estudo a concentração dos demais reagentes foi mantida constante:

Se $v = k [A]^a [B]^b [C]^c$ tem-se que
 para o caso de $[B]$ e $[C]$ constantes

$$\log v = k' + a \log [A]$$

onde a é a ordem de reação relativa a A.

Para verificar se o desaparecimento da banda do NADH, na au toxidação catalisada por TMPD, na região de 345 nm em condições de concentração constante de oxigênio segue cinética de pseudo-primeira ordem, projetou-se $\log A_{345}$ em função do tempo. Neste processo desprezou-se a pequena absorção residual devida a forma semiquinônica do catalisador. O valor da constante de reação k foi obtida da inclinação $-k/2,303$ da reta $\log (A_t - A_\infty) = -k/2,303 + \log A_0$.

Para determinar o efeito da temperatura, a reação de autoxidação de NADH catalisada por TMPD foi realizada a 25,0, 37,0 e 47,0 $\pm 0,1^\circ\text{C}$. A energia da ativação E_a foi obtida da inclinação $-E_a/2,303$ na projeção logaritmo decimal da velocidade inicial em função de $1/T$ (Equação de Arrhenius).

A reprodutibilidade dos dados cinéticos foi geralmente satisfatória, com velocidades iniciais divergindo de no máximo 10%.

4.3.5. Testes em Piridina. Formação de Pirofosfato.

O PHTN foi preparado em piridina-água (98:2; v/v) a partir de ClPCH usando-se H_3PO_4 como catalisador de hidratação. Realizaram-se vários ensaios nos quais foram variadas as concentrações de H_3PO_4 , dihidronicotinamida e TMPD, o tempo de borbulhamento de O_2 e a temperatura. Em experiências controle omitiu-se ora o ClPCH, ora o oxigênio, ora o catalisador. O pirofosfato formado na reação foi identificado por cromatografia de papel (BERNHART e CHESS, 1959) à temperatura ambiente. Abaixo é descrito o procedimento empregado e condições de uma das experiências:

Preparou-se uma solução em piridina contendo H_3PO_4 (0,5M) e ClPCH (0,2M). Após hidratação exaustiva a 50°C da ligação dupla $\text{C}_5=\text{C}_6$ (deduzida do aumento da banda a 290nm), adicionou-se TMPD (0,02M) e borbulhhou-se O_2 puro durante duas horas, mantendo-se a temperatura a 50°C . A piridina foi evaporada a vácuo durante uma hora e o resíduo da mistura disis

solvido em água. Aliquotas de 2, 5 e 10 μ l. desta solução e de soluções com pirofosfato padrão foram cromatografadas paralelamente em papel de filtro Whatman nº 1. Algumas vezes a mancha devida a pirofosfato foi re-cromatografada para confirmação do R_F .

4.3.6. Separação, Identificação e Determinação dos Produtos de Oxidação de ClPCH e PHTN em Piridina.

4.3.6.1. Procedimento da reação:

A maior parte das experiências relativas à formação de "ligações ricas" foi realizada em piridina-água (98:2 v/v) e as restantes em piridina anidra. Escolhemos piridina como solvente porque esta permite a formação de pirofosfato e dissolve muito bem ClPCH, PHTN e os sais de tetrabutylamônio de H_3PO_4 , AMP e ADP.

A concentração inicial da 1,4-dihidronicotinamida foi $6,0 \cdot 10^{-2} M$. O fosfato foi adicionado na forma de H_3PO_4 à piridina-água e na forma de $(TBA)_2HPO_4$ à piridina anidra, ambos para dar concentração final 0,22M. Em algumas experiências nas quais a concentração de fosfato em piridina-água era superior a 0,22M o excesso foi adicionado na forma de $(TBA)_2HPO_4$. Quando a intenção foi investigar a formação de ATP, adicionou-se $(TBA)_3ADP$ na mistura de reação em concentração 0,10-0,15M. Para investigar a formação de ADP e de ATP usou-se $(TBA)_2AMP$ 0,20M como fonte de AMP. Em diversos casos adicionou-se pequena quantidade de P^{32} nas misturas de reação.

A formação de PHTN a partir de ClPCH em piridina-água foi feita mantendo-se a mistura durante 2-3 horas em atmosfera de N_2 , a 48-50°C. Ocorreu 50% de hidratação. Evidentemente também ocorre formação de PHTN durante a fase oxidativa.

A oxidação do ClPCH ou PHTN foi realizada na presença de TMPD ($1 \cdot 10^{-2} M$), borbulhando-se O_2 puro em 2,0 ml da mistura de reação na mesma temperatura. Procurou-se manter constante o volume da mistura de reação por adição do solvente. Após 2-3 horas de reação a solução foi congelada e a piridina removida a vácuo. O resíduo foi dissolvido em 2,0 ml de água gelada, a solução extraída com éter gelado e diluída algumas vezes a 3,0 ml.

O passo seguinte foi o processamento da solução em resina de troca iônica para análise dos cátions e ânions formados na reação.

4.3.6.2. Cromatografia em Resina de Troca Aniônica:

A resina usada foi Dowex-1-X2 (200-400 "meshes") na forma de Cl^- . As posições dos picos no cromatograma correspondentes à eluição do fosfato, pirofosfato, AMP, ADP e ATP foram previamente acertadas com amostras autênticas e misturas. Estas operações permitiram, por outro lado, conhecer as concentrações de contaminantes (como ATP) nas amostras de AMP e ADP que foram usadas no sistema.

A separação dos ânions da mistura de reação obedeceu ao seguinte procedimento:

Passou-se lentamente 0,5 ml da solução aquosa que representa um quarto ou um sexto da mistura final de reação, através da coluna de Dowex Cl^- (0,8 x 6,0 cm). A coluna foi então exaustivamente lavada com água até o eluido não absorver no UV. A eluição do AMP, fosfato e ADP, nesta ordem, foi feita com cerca de 250 ml de solução 0,01 M em HCl e 0,01M em KCl. Para eluir pirofosfato e ATP passaram-se 75 ml de solução 0,05M em HCl e em KCl. Estas operações foram realizadas à temperatura ambiente coletando-se frações de 5 ml cada 2-3 minutos. Este procedimento está baseado no descrito por COHN, 1957. Em nossas condições o AMP começou a ser eluido nas frações 2-3, o fosfato nas frações 6-7 e o ADP nas frações 11-13; aumentando-se a concentração do eluente o pirofosfato começou a sair nas frações 2-3 e logo a seguir o ATP, cujas soluções mais concentradas foram as frações 8-10.

A eluição dos nucleotídeos foi acompanhada por medidas de absorbância a 260 nm, onde a adenina absorve fortemente, e também por medidas de radioatividade quando o fosfato foi marcado com P^{32} . Neste caso, pipetaram-se 50 ou 100 μl de cada fração eluída para discos de papel de filtro (diâmetro: 22mm) Whatman 3 mm e a atividade contada no Geiger-Muller.

O fosfato inorgânico e o fosfato lábil resultante da hidrólise do pirofosfato, ADP e ATP em H_2SO_4 1,5N a 92°C durante 30 minutos (LAMBETH e LARDY, 1969) foram localizados no cromatograma e determinados segundo o método de SUMNER (1944). As condições de diluição e tempo de

revelação (geralmente 1 hora) do "azul de molibdênio" foram previamente controlados. Ao lado de cada determinação foram construídas curvas de calibração com amostras autênticas de pirofosfato. Como esperado, as posições dos picos foram as mesmas obtidas por medidas de absorbância em 260nm ou da radioatividade.

4.3.6.3. Cromatografia em Resina de Troca Catiônica:

Enquanto a separação do ClPC^+ formado em soluções aquosas não apresentou dificuldades, diferente situação apresentou-se quando piridina foi usada como solvente. Apesar da evaporação a vácuo e extração da piridina com éter, a solução aquosa a ser analisada mostrou-se contaminada com cátion piridínio ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}^+$), de semelhante comportamento cromatográfico e espectral no UV. ao do ClPC^+ .

Procedeu-se da seguinte maneira:

Um quarto ou um sexto da mistura de reação em pH 8-9 foi passado através de uma coluna de Dowex 50W-X4 (200-400 "meshes"). Lavou-se exaustivamente com água até não se detectar absorção no UV.; em seguida os cátions foram eluidos com solução 0,1 ou 1,0M de NH_4Cl . Os primeiros cátions a saírem foram o ClPC^+ e o $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}^+$ e depois, o cátion com máximo de absorção em 290nm.

Os espectros de absorção das primeiras frações eluidas foram medidos em pHs ácido (2-3) e alcalino (8-9). O espectro diferencial foi idêntico ao da piridina. Como o espectro de ClPC^+ não é alterado nestas condições, foi possível calcular a concentração de $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}^+$ nas frações eluidas (ϵ diferencial da piridina em 255 nm = $2,63 \cdot 10^3$; HUGHES et al, 1948). Assim foi possível subtrair do espectro do eluido a contribuição de absorção devida ao $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}^+$. O espectro resultante foi semelhante ao do ClPC^+ , exceto que se mostrou ainda contaminado com a absorção do cátion com λ_{max} em 290nm, o qual sai principalmente nas últimas frações. Como o espectro deste cátion é conhecido, pôde-se subtrair sua contribuição no espectro total. A interferência entre os espectros deste cátion e do ClPC^+ é pequena.

Deve-se mencionar que muitas vezes o espectro do ClPC^+ assim determinado estava um pouco deslocado para comprimentos de onda menores. Este fato deve advir do procedimento empregado pois ClPC^+ autêntico, tra

tado nas mesmas condições da reação e de isolamento, produziu os mesmos resultados.

Sem dúvida este processo de obtenção de espectro do ClPC^+ é laborioso e os valores de concentração assim obtidos aproximados. Porém o processo só foi aplicado àquelas frações eluídas que pareciam ser mais ricas em ClPC^+ , o que foi deduzido da forte banda de absorção em 255-265nm e da pequena queda de absorbância ao se aumentar o pH.

4.3.6.4. Cálculo de Rendimentos

Os rendimentos de ClPC^+ , pirofosfato e ATP foram calculados com base na concentração inicial da 1,4-dihidronicotinamida. O ClPC^+ foi determinado com base ao $\epsilon_{265\text{nm}} = 3,94 \cdot 10^3$, o pirofosfato pelo método já descrito e os nucleotídeos pela absorbância das frações reunidas em 260nm ($\epsilon = 1,54 \cdot 10^4$).

Desde que somente uma fração da dihidronicotinamida reage em nossos sistemas (diretamente e presumivelmente também como PHTN), os rendimentos reais devem ser consideravelmente mais altos. Nos cálculos dos rendimentos de pirofosfato e ATP levou-se em conta a presença de contaminantes.

5. RESULTADOS

5.1. Autoxidação de 1,4-Dihidronicotinamidas Promovida pelo Sistema O_2 /TMPD, em Solução Aquosa.

5.1.1. Considerações preliminares:

Soluções de coenzimas piridínicas (NADH e NADPH) e de seus modelos (ClBCH e ClPCH) se autoxidam muito lentamente. Entretanto na presença de TMPD, mesmo que este esteja em concentração cem vezes menor que a concentração da dihidronicotinamida, a velocidade de consumo de O_2 é enormemente aumentada (Figuras 1 e 2). O consumo de O_2 ao término da reação é estequiométrico ou algo acima para a formação de H_2O . Sempre se observou um aumento do pH e desenvolvimento de cor azul escuro ao terminar a reação. Demonstraremos que a reação principal é a oxidação de 1,4-dihidronicotinamida ao cátion piridínico, seguida de lenta decomposição da água oxigenada formada durante este processo:

R = RPPRA, RPPRAP, $n-C_3H_7$, $-CH_2C_6H_5$

FIGURA 1 - Consumo de O₂ na autoxidação de NADH (10,0mM) catalisada por TMPD (1,0mM) em tampão Tris 0,2M pH 6,86.
 (—) NADH+TMPD. (---) TMPD; (-.-.-) NADH.
 pH final da mistura = 7,06.

FIGURA 2 - Consumo de O_2 na autoxidação de ClBCH (15,0mM) catalisada por TMPD (1,0mM) em tampão Tris 0,1M-metanol (1:1,v/v) pH 6,42. (—) ClBCH + TMPD; (---) TMPD; (-.-.-) ClBCH. pH final da mistura = 7,05.

5.1.2. Identificação dos produtos catiônicos

Verificou-se espectrofotometricamente que, durante a reação, o desaparecimento da banda de absorção do NADH a 340nm é seguido de intensificação da banda a 260nm, conforme esperado pela oxidação a NAD^+ . O NAD^+ foi identificado e dosado com o sistema álcool-álcool desidrogenase (CIOTTI e KAPLAN, 1957). O rendimento de NAD^+ formado no curso da reação foi ao redor de 80%.

O ClBC^+ foi identificado no espectro da mistura final da reação em tampão Tris pelo pico a 263nm. Neste espectro também apareceu a banda a 290nm devida ao produto de adição de H_2O à ligação dupla $\text{C}_5=\text{C}_6$ da 1,4-dihidronicotinamida:

No caso da autooxidação do ClPCH pôde-se também verificar o aparecimento de duas bandas (275 e 290nm) no espectro da mistura final de reação. O ClBC^+ e ClPC^+ foram isolados das misturas finais de reação em Tris, usando-se a coluna de Dowex- H^+ . Observaram-se rendimentos de até 85% e 70%, respectivamente. As Figuras 3 e 4 ilustram a separação cromatográfica destes dois cátions.

Os rendimentos subestequiométricos são devido, pelo menos no caso dos modelos, ao fato do TMPD provavelmente na forma monoprotonada catalisar a adição do solvente à dupla $\text{C}_5=\text{C}_6$ da dihidronicotinamida. Isto foi demonstrado seguindo-se paralelamente, em condições de anaerobiose, o desaparecimento da banda visível do ClPCH na presença e na ausência de TMPD em tampão Tris (Figura 5). Concomitantemente observou-se a intensificação da banda do produto 5,6-hidratado ($\lambda_{\text{máx.}} = 290\text{nm}$).

FIGURA 3 - Separação cromatográfica em Dowex - H^+ (vide MÉTODOS) dos produtos de autooxidação de ClBCH 16,8mM, em tampão Tris 0,1M-metanol (1:1;v/v) pH 6,86, catalisada por TMPD 1,0mM (—): espectro da mistura final de reação; diluição 1:200; (— · — · —): espectro do material não retido pela coluna; diluição 1:10; (---): espectros dos eluidos (frações de 5ml) com NH_4Cl 5,0M. Os eluidos 1 e 3 foram diluídos na proporção 1:5, o eluido 2 foi diluído 1:10 e o eluido 4, 1:2.

FIGURA 4 - Separação cromatográfica em Dowex- H^+ (vide MÉTODOS) dos produtos de autooxidação de ClPCH 15,0mM, em tampão Tris 0,1M-metanol (1:1;v/v) pH 6,86, catalisada por TMPD 1,0mM.
 (—): espectro da mistura final da reação, diluição 1:200; (-·-·-): espectro do material não retido pela coluna, diluição 1:25; (----): espectros dos eluidos (frações de 5ml) com NH_4Cl 5,0M, sendo que o eluido 1 foi diluído 6:100.

FIGURA 5 - Hidratação comparativa em anaerobiose de ClPCH 15,0mM em tampão Tris 0,2M pH 6,88 na presença de TMPD 2,0mM (curva inferior) e na sua ausência, acompanhada pelo desaparecimento da banda visível. Leituras iniciadas 3 minutos após misturar os reagentes.

Desde que a velocidade de autoxidação é função da concentração de O_2 dissolvido, o processo competitivo de adição do solvente foi minimizado trabalhando-se em atmosfera de O_2 puro. Neste caso obteve-se rendimento quase estequiométrico do cátion piridínico. Por outro lado a velocidade de adição de H_2O ao ClPCH é cerca de quatro vezes mais rápida que a do ClBCH, porém trabalhando-se em D_2O a velocidade de adição é fortemente diminuída (KIM e CHAYKIN, 1968). Assim, em D_2O os rendimentos de $ClPC^+$ atingiram cerca de 90%.

5.1.3. Formação de H_2O_2 :

Demonstrou-se a formação de H_2O_2 no processo de oxidação adicionando-se catalase ao sistema. A velocidade inicial de consumo de O_2 caiu à metade, indicando que 50% do O_2 absorvido foi devolvido pela decomposição enzimática da água oxigenada (Figura 6). Este resultado também indica que H_2O_2 é produto inerte da reação. Como esperado, as misturas finais de reação com e sem catalase apresentaram o mesmo pH.

5.1.4. Efeito da natureza do redutor:

O NADH reage um pouco mais rapidamente que o NADPH (Figura 7). O modelo propílico é algo mais reativo que as coenzimas e o benzílico algo menos reativo. A catálise da autoxidação do modelo propílico 5,6-hidratado está descrita no item 5.2 desta tese.

FIGURA 6 - Efeito de catalase ($5 \cdot 10^{-7} M$) sobre a velocidade de consumo de O_2 na autoxidação de NADH (20,0mM) catalisada por TMPD (1,0mM) em tampão Tris 0,2M pH 7,00. Curva inferior: na presença de catalase.

FIGURA 7 - Autooxidação comparativa de NADH 10,0mM (curva superior) e de NADPH 10,0mM (curva inferior), catalisada por TMPD 1,0mM em tampão Tris 0,2M pH 6,8.

TMPD também catalisa a autoxidação de p-hidroquinona em pH 6,7; em pH 7,3 a catálise é menos eficiente e em pH 7,8 é nula.

Não se observou absorção de O_2 quando se adicionou TMPD a soluções de ferrocitocromo c, tiofenol, xanteno, difenilmetano, 9,10-dihidroantraceno, tetralina, acetanilida, anilina, nitrobenzeno, lactato, formiato e succinato.

5.1.5. Efeito da natureza do catalisador:

p-Fenilenodiamina não substitui o TMPD como catalisador da autoxidação de 1,4-dihidronicotinamidas. Por outro lado, não se notaram diferenças na atividade do TMPD recristalizado de diferentes solventes (metanol e acetona-água).

5.1.6. Efeito de mudanças no solvente

O NADH foi estudado em tampão Tris totalmente aquoso e em mistura tampão Tris-metanol (1:1). As curvas de absorção de O_2 foram quase idênticas.

A reação ocorreu bem em tampão fosfato ou Tris. Entretanto, fosfato é um excelente catalisador de hidratação da 1,4-dihidronicotinamida (ALIVISATOS et al, 1965; ANDERSON et al, 1965), do que resulta menores velocidade e consumo total de O_2 . No caso do modelo propílico observou-se um fato muito interessante: apesar de quase completa hidratação nos primeiros 20 minutos de reação, a solução continuou a absorver O_2 inclusive suplantando o consumo de O_2 pela mistura de reação em Tris. Este foi o ponto de partida para o estudo da autoxidação da dihidronicotinamida 5,6-hidratada, catalisada por TMPD e fosfato.

A autoxidação de ClBCH foi estudada em tampão Tris-metanol (1:1) em vários pHs. A velocidade de consumo de O_2 aumentou com o abaixamento do pH até 6,49 (Figura 8). Em pH 6,21 e 6,03 não houve praticamente alteração da velocidade. Isto se deve ao fato de que nestes pHs o catalisador já se encontra protonado. Obviamente nestes pHs o Tris já não atua como tampão, fato este irrelevante se considerarmos apenas as velocidades iniciais de reação.

FIGURA 8 - Efeito da variação do pH na autoxidação de CLBCH 15,0mM catalisada por TMPD 1,0mM em tampão Tris 0,1M - metanol (1:1;v/v). A pH 7,82; B, pH 7,49; C, pH 7,14; D, pH 6,77; E, pH 6,49. As curvas para pHs 6,21 e 6,03 são muito semelhantes à curva E.

5.1.7. Efeito da luz:

As curvas de consumo de O_2 pelo sistema ClBCH-TMPD em tampão Tris-metanol (1:1) foram exatamente iguais, quando esta reação foi realizada no escuro e à luz ambiente. Por outro lado, os espectros de absorção das misturas finais de reação também foram idênticos, qualitativa e quantitativamente.

5.1.8. Efeito da presença de detectores do íon superóxido, O_2^- :

É perfeitamente concebível que o TMPD funcione como catalisador através de seus produtos de autooxidação:

Ou seja, a espécie $O_2^-/HO_2^\bullet$ poderia ter um papel importante no processo. Por isso testamos a influência de detectores de O_2^- na velocidade de autooxidação. Isto foi feito de dois modos:

a) - Em 1969, McCORD e FRIDOVICH descreveram uma enzima denominada superóxido dismutase que inibe os processos dependentes de O_2^- pois catalisa o desproporcionamento deste íon:

Esta enzima em concentração $2 \cdot 10^{-7} M$ inibiu em 23% a velocidade de inicial de autooxidação de NADH (15,0mM) na presença de TMPD (1,0mM); em concentração $5 \cdot 10^{-8} M$ inibiu em 35% a velocidade inicial de autooxidação de ClPCH (10,0mM) com TMPD (1,0mM). As curvas obtidas no caso de ClPCH estão apresentadas na Figura 9.

FIGURA 9 - Efeito inibitório de superóxido dismutase $5 \cdot 10^{-8} M$ sobre a autoxidação de ClPCH $10.0mM$ catalisada por TMPD $0,5mM$ em tampão Tris $0,2M$ pH $7,00$ a $30,0^{\circ}C$. Curva superior: sistema sem superóxido dismutase.

b) - Catecol, assim como os o-difenóis em geral, age como captador do ion superóxido (MILLER, 1970; SILVA ARAÚJO e CILENTO, 1969). Quando adicionamos catecol ($6,0 \cdot 10^{-4} \text{M}$) ao sistema NADH (15,0mM) - TMPD (1,0mM), o consumo inicial de O_2 diminui de 40% . Aumentando-se a concentração de catecol para $3,0 \cdot 10^{-3} \text{M}$, a inibição do processo foi apenas ligeiramente maior. Os resultados obtidos com catecol estão apresentados na Figura 10.

FIGURA 10 - Efeito inibitório de catecol $6,0 \cdot 10^{-4}$ M sobre a autooxidação de NADH 15,0mM catalisada por TMPD 1,0mM em tampão Tris 0,2M pH 6,88. Curva superior: sistema sem catecol.

5.1.9. Cinética de Autoxidação das 1,4-Dihidronicotinamidas na Presença de TMPD:

5.1.9.1. Efeito da concentração dos participantes:

A velocidade de consumo de O_2 por TMPD sozinho é muito pequena. Por isso o papel da TMPD não é o de agir ciclicamente através de sua autoxidação à semiquinona ("azul de Wurster") e posterior redução pela dihidronicotinamida. A autoxidação do TMPD deve-se dar no término da reação, quando a mistura de reação se cora de azul intenso devido à semiquinona.

Os dados manométricos (Tabela I) mostram que a velocidade de reação mantém dependência de primeira ordem em relação a 1,4-dihidronicotinamida. Isto também pôde ser verificado espectrofotometricamente seguindo-se o desaparecimento de pseudo primeira ordem do NADH durante três períodos de meia vida (Figura 11). Nas condições experimentais empregadas (Tris 0,2M pH 6,88 e $[TMPD] = 1,0mM$) a constante de reação k foi calculada em $1,7 \cdot 10^{-4} s^{-1}$.

Ao se passar de soluções saturadas com ar para soluções saturadas com O_2 puro, a velocidade inicial de autoxidação do NADH aumentou de um fator 2,7 e aquela do ClBCH de um fator 2,2. (Tabela II). Daí calculamos a ordem de reação em relação ao O_2 como sendo 0,6 e 0,5, respectivamente.

Em relação à concentração de TMPD também se observou dependência de meia ordem (Tabela III).

TABELA I

Velocidade inicial de autooxidação de 1,4-dihidronicotinamidas catalisada por TMPD 1,0 mM em tampão Tris 0,1 M pH 6,88, em função da concentração da 1,4-dihidronicotinamida.

SOLVENTE	NADH(mM)	CLBCH(mM)	Velocidade Inicial (μ l O ₂ /min)	ORDEM
Tampão Tris	10,0		3,28	1,0
	20,0		6,68	
Tampão Tris- Metanol(1:1;v/v)		10,0	1,82	1,1
		20,0	4,12	
		30,0	6,84	
		40,0	8,40

FIGURA 11 - Desaparecimento de primeira ordem da absorção de NADH na autooxidação catali-
sada por TMPD 1,0mM em tampão Tris 0,2M pH 6,88. Reta superior: medidas a
345nm; reta inferior, a 360nm.

TABELA II

Efeito da concentração de O_2 na velocidade de autoxidação de 1,4-dihidro-cotinamidas catalisada por TMPD, em tampão Tris 0,1M-metanol pH 6,87 (1:1;v/v).

TMPD	NADH	ClBCH	$\mu l O_2/min$		ORDEM
			Em ar	Em O_2	
0,2	15,0		1,58	4,40	0,6
1,0		15,0	2,60	5,64	0,5

TABELA III

Velocidade inicial de autoxidação de 1,4-dihidronicotinamidas catalisada por TMPD em pH 6,86 em função da concentração do catalisador.

SOLVENTE	NADH (mM)	ClBCH (mM)	TMPD (mM)	$\mu\text{l O}_2/\text{min}$	ORDEM
Tampão Tris 0,1 M-metanol (1:1;v/v)	15,4		0,05	0,94	0,53
	15,4		0,10	1,22	
	15,4		0,20	1,82	
	15,4		0,40	2,58	
Tampão Tris 0,2 M	15,0		0,01	0,60	0,48
	15,0		0,10	1,34	
	15,0		1,00	4,36	
Tampão Tris 0,1 M-Metanol (1:1;v/v)		15,0	0,05	0,36	0,62
		15,0	0,10	0,56	
		15,0	0,20	0,88	

5.1.9.2. Influência da temperatura:

Estudou-se a autooxidação de NADH (10,0mM) catalisada por TMPD (1,0mM) em tampão Tris totalmente aquoso nas temperaturas de 25,0, 37,0 e 47,0 $\pm$ 0,1°C.

Considerando-se a ordem de reação em relação ao O_2 igual a 0,6 e a variação da solubilidade do O_2 com a temperatura, a energia de ativação foi calculada em 10 kcal/mol. A temperatura também deve afetar a reação na medida em que ela afeta o pKa do radical perhidroxil, $HO_2^\bullet$, e o pKa do catalisador. No último caso porém, a variação das concentrações de TMPD e $TMPDH^+$ em equilíbrio pode ser compensada por um efeito semelhante no Tris, que também é amina.

5.1.9.3. Efeito do solvente:

Substituindo-se H_2O por D_2O no meio de reação com NADH não se observou variação da velocidade inicial de reação (Figura 12). Isto deve significar que não existem fases de protonação cineticamente importantes. Desde que $pD = pH$ medido + 0,4 (GLASOE e LONG, 1960; SRERE et al, 1961), o tampão Tris em D_2O foi preparado de modo a se ter medida potenciométrica igual a 6,6 e, para efeitos comparativos, o pH do tampão em H_2O foi 7,0.

Com o modelo propílico observaram-se velocidades iguais de reação em H_2O e D_2O apenas num primeiro estágio. A seguir, a reação em H_2O é mais lenta devido à hidratação competitiva mais intensa em H_2O .

FIGURA 12 - Influência da substituição do tampão em H_2O por D_2O e do TMPD recrystalizado de diferentes solventes na autoxidação de NADH 15,0mM catalisada por TMPD 1,0mM em tampão Tris 0,2M pH 7,0.
 Curva A: NADH-TMPD (recrystalizado de metanol), em D_2O .
 Curva B: NADH-TMPD (recrystalizado de metanol), em H_2O .
 Curva C: NADH-TMPD (recrystalizado de acetona-água), em H_2O .

5.1.9.4. Efeito de substituição isotópica de H no C_4 :

Se a oxidação de 1,4-dihidronicotinamidas ao cátion piridínico ocorre pela quebra da ligação C_4-H , a velocidade de reação deve diminuir quando se passa de ClBCH para ClBCD. De fato, a velocidade inicial de autoxidação do análogo monodeuterado no C_4 foi cerca de 71% daquela do ClBCH. Entretanto, considerando-se que a reação é de primeira ordem na 1,4-dihidronicotinamida, o quociente isotópico k_{C-H}/k_{C-D} foi calculado em 2,3.

5.2. Autoxidação de PHTN em Solução Aquosa, Catalisada por Fosfato e TMPD

5.2.1. Autoxidação comparativa de ClPCH em tampões Tris e fostato

Quando se estudou paralelamente a autoxidação de ClPCH em tampão Tris e tampão fosfato (em duplicata) no mesmo pH, obtiveram-se as curvas de absorção de O_2 apresentadas na Figura 13. Após 20 minutos de reação retirou-se uma das misturas em tampão fosfato; seu espectro no UV mostrou que praticamente todo o ClPCH sofreu adição de H_2O na insaturação $C_5=C_6$. Apesar disso a outra solução em tampão fosfato continuou absorvendo O_2 , embora com menor velocidade.

A solução em Tris, depois de algum tempo parou de consumir O_2 devido à saturação da dihidronicotinamida com H_2O . Após uma noite, o espectro da mistura de reação em Tris mostrou uma banda predominante de produ^{to}s com $\lambda_{máx}$ a 290nm, e um pequeno ombro a 275nm devido ao $ClPC^+$.

FIGURA 13 - Consumo de O₂ pelo sistema CLPCH 15,0mM e TMPD 1,0mM em tampões 0,2M pH 6,80. Curva superior, em Tris; curva inferior em fosfato.

O espectro da solução em fosfato, após uma noite, mostrou duas bandas de quase mesma intensidade a 290 e a 265-275nm. Lembrando que o ϵ do PHTN é cerca de cinco vezes maior que do ClPC^+ , deve-se concluir que tal mistura é bastante rica em ClPC^+ . De fato, ao se fracionar esta mistura de reação em Dowex- H^+ , obtivemos com o primeiro eluido o espectro típico de ClPC^+ . O rendimento de ClPC^+ em experiências semelhantes variou de 55 a 70%. Na Figura 14 mostra-se o fracionamento da mistura de reação em fosfato.

A partir destes resultados iniciou-se o estudo da catálise por fosfato na autooxidação do sistema PHTN-TMPD, pois tal reação poderia estar envolvida no mecanismo de acoplamento entre oxidação e fosforilação no sítio I da cadeia respiratória.

5.2.2. Autooxidação de PHTN:

Preparou-se o PHTN em tampão Tris 0,2M pH 6,88, na presença de TMPD (2,0mM) como catalisador da hidratação e em atmosfera de N_2 puro. Uma parte desta solução foi diluída ao dobro com o mesmo tampão e a outra com tampão fosfato 0,4M pH 6,88. A concentração final de PHTN em ambas soluções foi 15,1 mM. As curvas de consumo de O_2 por estas soluções estão apresentadas na Figura 15. A solução contendo fosfato absorveu muito mais O_2 porém o consumo final é algo subestequiométrico para formação de H_2O . O espectro de ambas misturas finais de reação é dominado pela banda na região de 290-295 nm. No caso do espectro da solução contendo fosfato pôde-se observar o ombro devido ao ClPC^+ .

FIGURA 14 - Separação cromatográfica em Dowex- H^+ (vide MÉTODOS) dos produtos de autoxidação de ClPCH 15,0mM, em tampão fosfato 0,2M pH 6,82, catalisada por TMPD 1,0mM. (—) espectro da mistura final de reação; diluição 1:200. (-.-.-) espectro do material não retido pela coluna; diluição 1:3. (----) espectros dos eluidos (frações de 5 ml) com NH_4Cl 5,0M, sendo que o eluido 1 foi diluído na proporção de 1:5.

FIGURA 15 - Consumo de O_2 na autoxidação de PHTN 15,1mM catalisada por TMPD 1,0mM em pH 6,88. Curva superior, tampão Tris-fosfato; curva inferior, tampão Tris.

Posteriormente preparou-se PHTN em tampão fosfato, adicionou-se o TMPD e acompanhou-se o consumo de O_2 . Nestas condições as velocidades iniciais de reação foram consideravelmente maiores que aquela da Figura 15 (vide Figura 16). O cátion $ClPC^+$ foi isolado das misturas de reação em Dowex- H^+ e facilmente identificado pelo seu espectro (Figuras 17 e 18). Geralmente o rendimento de $ClPC^+$ variou em torno de 55%, valor relativamente alto se considerarmos que, durante o longo período de reação, uma fração do PHTN (II) sofre nova hidratação na ligação dupla $C_2=C_3$ (STOCK et al, 1961; JOHNSTON et al, 1963) dando um produto (III) não oxidável nas nossas condições:

Outro cátion eluído da resina, com máximo de absorção a 290nm, é formado na preparação do PHTN e contribui também para o espectro do PHTN. O espectro do material não retido pela coluna foi semelhante mas não idêntico ao do PHTN, pois as relações $A_{295(max)}/A_{240(min)}$ são diferentes. Logo, as misturas de reação parcialmente oxidadas devem conter, além do PHTN remanescente, outro composto de espectro semelhante o qual sugerimos ser uma amida, resultante de oxidação no C_6 :

FIGURA 16 - Consumo de O_2 na autooxidação de PHTN 15,0mM, preparado em tampão fosfato 0,2M pH 6,81, catalisada por TMPD 1,0mM realizada no mesmo tampão. Curva superior, PHTN - TMPD; curva inferior, PHTN sozinho.

FIGURA 17 - Separação cromatográfica, conforme descrito em "MÉTODOS", dos cátions formados na autooxidação de PHTN 15,0mM promovida por TMPD 1,0mM em tampão fosfato 0,2M pH 6,81 (vide Figura 16). As curvas representam os espectros de frações de 5ml eluidas da Dowex- H^+ com NH_4Cl 1,0M. A fração 1 foi diluída 1:4 e a fração 2, 2:3. As frações 6 e 7 não absorveram luz. O cátion eluído nas frações 2-5 também se forma na ausência de O_2 .

FIGURA 18 - Comparação do espectro do ClPC^+ formado na experiência descrita na Figura 16, eluído da resina Dowex- H^+ (linha cheia) e espectro de ClPC^+ autêntico (círculos negros).

Em geral no término da reação observou-se aumento do pH.

A principal reação que deve ocorrer é a seguinte:

Por outro lado observou-se que no caso de PHTN recém-preparado havia um período de indução na curva de absorção de O_2 . Se as misturas são pré-incubadas com fosfato durante duas ou mais horas a fase de indução desaparece e as velocidades iniciais de reação se tornam maiores (Figura 19).

5.2.3. Substituições isotópicas:

Quando se substituiu PHTN pelo análogo monodeuterado no C_4 , a velocidade de reação quase não foi alterada.

Em D_2O , a velocidade de consumo de O_2 pelo composto

$\text{R} = \text{H}, \text{D}$

FIGURA 19 - Efeito do tempo de incubação de PHTN 18 ± 1 mM com tampão fosfato 0,2M pH 6,87 na autoxidação catalisada por TMPD 1,0mM.

(-.-.-) - pré-incubação de 48'; (—) idem, 2h5' e
 (---) - idem, 4h30'.

foi menor que a observada com PHTN em H_2O em idênticas condições experimentais. O cátion piridínico formou-se com rendimentos muito baixos ($< 5\%$).

5.2.4. Efeito da natureza do solvente:

Em tampão fosfato-metanol (1:1;v/v) a autoxidação de PHTN catalisada por TMPD foi bem mais lenta que em tampão totalmente aquoso (Figura 20).

Estudou-se a influência do pH na reação em H_2O . Verificou-se que em tampões de fosfato pHs 6,9, 6,2 ou 6,0 as velocidades de autoxidação são muito semelhantes. Entretanto, a velocidade tornou-se significativamente menor a pH 7,6 (vide Tabela IV).

5.2.5. Efeito da variação da concentração e natureza dos reagentes:

Não houve consumo de O_2 pelo PHTN na ausência de TMPD ou quando este foi substituído por PPDA. Substituindo-se o tampão fosfato por arsenato observou-se um aumento de 50% na velocidade inicial de reação, enquanto que em tampões Tris ou citrato praticamente não houve reação. Substituindo-se o grupo propil do PHTN por benzil ocorreu grande queda na velocidade de reação. Neste caso o ClBC⁺ (rendimento 26%) foi o único cátion isolado da mistura de reação por cromatografia na coluna de Dowex-H⁺. O NADH é lentamente hidratado nas condições empregadas e o produto desta reação não se autoxidou.

FIGURA 20 - Autooxidação comparativa de PHTN 14,0mM catalisada por TMPD 1,0mM em tampão fosfato 0,2M pH 6,03 (curva superior) e em mistura tampão-metanol 1:1 (curva superior).

TABELA IV

Influência do pH na velocidade inicial de autoxidação de PHTN 16 mM catalisada por TMPD 1,0 mM em tampão fosfato 0,2 M.

pH	$\mu\text{l O}_2/\text{min}$
6,0	1,42
6,2	1,40
6,9	1,28
7,6	0,37

A adição de 2,4-dinitrofenol ou de íons de Mg^{2+} não afetou a velocidade de autooxidação do PHTN pelo sistema O_2 /TMPD em tampão fosfato.

A Tabela V mostra o efeito da variação das concentrações de PHTN e de fosfato na velocidade inicial de absorção de O_2 . A figura 21 mostra o efeito da concentração de TMPD. Observou-se um aumento de 150% na velocidade inicial quando se passou de solução saturada com ar para solução saturada com O_2 puro.

5.2.6. Efeito da presença de detectores de íons O_2^- :

O sistema O_2 /TMPD deve promover a oxidação do PHTN ou através do íon superóxido, ou através do "azul de Wurster" ou por ambos. Por isso procurou-se verificar se a enzima superóxido dismutase e catecol podem inibir a autooxidação de PHTN em H_2O . Entretanto, mesmo em concentrações relativamente altas (superóxido dismutase, $1 \cdot 10^{-5}M$ e catecol, $1 \cdot 10^{-3}M$) estas substâncias não alteraram a velocidade de reação.

5.2.7. Substituição do sistema oxidante, O_2 /TMPD:

5.2.7.1. Oxidação por FMN:

Preparou-se o PHTN em tampão Tris 0,4M pH 6,86 em atmosfera de N_2 . Uma alíquota desta solução foi diluída ao dobro com o mesmo tampão e outra com tampão fosfato 0,4M pH 6,86, de modo a se ter concentração de PHTN igual a 14mM. Adicionou-se FMN 2mM e seguiu-se o consumo de O_2 por estas misturas no Warburg. Em Tris a velocidade inicial foi de 18 μl de O_2 /h e em Tris-fosfato, 27. Neste caso porém a flavina reduzida, $FMNH_2$, formada na reação se autooxida através de reações de radicais livres onde se formam O_2^- e a semiquinona $FMNH^\bullet$ o que torna o processo mais complicado (MASSEY et al, 1969).

TABELA V

Influência das concentrações de PHTN e de fosfato na velocidade inicial de autoxidação da tetrahidronicotinamida catalisada por TMPD 1,0 mM em tampão 0,2 M pH 6,87.

PHTN (mM)	FOSFATO (mM)	$\mu\text{l O}_2/\text{min}$
17,0	0,20	1,04
34,0	0,20	1,32
48,0	0,20	1,51
17,0	0,20	1,04
17,0	0,40	1,21
17,0	0,66	1,36

FIGURA 21 - Efeito da concentração de TMPD na velocidade de autoxidação de PHTN 16,0mM em tampão fosfato 0,2M pH 6,87.

Curva A: TMPD 0,5mM

Curva B: TMPD 1,0mM

Curva C: TMPD 2,0mM

Realizaram-se várias experiências em atmosfera de N_2 com PHTN, 15mM e FMN, 10 - 20mM. As reações foram acompanhadas pelo aumento da absorbância a 1000nm devida ao complexo de transferência de carga FMN . $FMNH_2$ (GIBSON et al, 1962). Em todos os casos, o aumento da absorbância foi muito mais rápido em tampão Tris-fosfato que em Tris (Figura 22). Nas misturas em Tris-fosfato, depois de 2-3 horas de reação, houve formação de um precipitado verde floculento o qual, exposto ao ar, imediatamente se torna alaranjado. Em experiências paralelas a mistura de reação foi analisada logo que se iniciou a turvação. O cátion $ClPC^+$ foi identificado nos eluidos com NH_4Cl da coluna de Dowex- H^+ em rendimentos de 17% no caso da mistura em Tris-fosfato e de 14% em Tris.

5.2.7.2. Oxidação com KBr_3 :

O procedimento foi semelhante ao empregado por BARLTROP et al (1963) ao estudar a formação de pirofosfato na oxidação de 1-metil-1,4-dihidronicotinamida e compostos análogos por KBr_3 em meio aquoso e contendo íons de Mg^{2+} como catalisador. Efetuou-se a reação a $60^\circ C$ durante 2 horas. As concentrações usadas foram: PHTN-19,mM, KBr_3 -0,16M, NaH_2PO_4 -0,16M e $MgCl_2$ -78mM. Constatou-se a formação de $ClPC^+$ com rendimentos ao redor de 17%, porém não se detectou a formação de pirofosfato. Também não se formaram produtos com máximo de absorbância em 290nm nem nas misturas originais de BARLTROP et al, nem substituindo-se a dihidronicotinamida por PHTN. A formação de produtos com $\lambda_{m\acute{a}x}$ na região de 290nm era de se esperar em base ao esquema de fosforilação oxidativa sugerido por BARLTROP et al.

FIGURA 22 - Oxidação de PHTN 15mM com FMN 20mM, em condições de anaerobiose, em tampões 0,5M pH 6,88 de Tris (reta inferior) e Tris-fosfato (reta superior).

5.3. Formação de Pirofosfato e ATP na Oxidação de ClPCH e PHTN pelo Sistema TMPD/O_2 em Piridina

Em tampão aquoso de fosfato contendo ADP, apesar de várias tentativas, não houve formação de pirofosfato nem de ATP quando o ClPCH ou PHTN eram oxidados com O_2/TMPD . Os resultados foram sempre negativos mesmo quando a reação foi realizada na presença de íons de Mg^{2+} , Ca^{2+} ou Mn^{2+} . Nem usando-se P^{32} como marcador do fosfato e cromatografando-se a mistura em Dowex- Cl^- pôde-se detectar "ligações ricas" como produtos de reação.

Entretanto em testes preliminares realizados em piridina-água (98:2;v/v) como solvente, houve formação de pirofosfato quando se borbulhou O_2 puro na solução piridínica contendo PHTN, H_3PO_4 e TMPD, a 50°C . A cromatografia de papel da mistura final de reação mostrou claramente a presença de pirofosfato ($R_F=0,55$) comportando-se idênticamente a amostras autênticas de pirofosfato ($R_F=0,55$) e de misturas fosfato-pirofosfato (Figura 23). Em outra experiência a mancha cromatográfica do pirofosfato foi eluída, adicionou-se pirofosfato autêntico e recromatografou-se. Como esperado somente apareceu uma mancha no cromatograma. Em experiências controle onde se omitiu a dihidronicotinamida ou em que se estabeleceu condições de anaerobiose, os resultados foram negativos. Houve formação de pequena mancha cromatográfica de pirofosfato quando a reação foi realizada na ausência de TMPD. Isto é esperado como resultado da oxidação direta por O_2 .

Posteriormente isolou-se pirofosfato das misturas de reação em piridina-água por cromatografia em resina Dowex- Cl^- . Quando se partiu de ClPCH 60mM e TMPD 10mM, os rendimentos de pirofosfato em função da concentração de H_3PO_4 presente na mistura de reação foram:

FIGURA 23 - Cromatografia ascendente em papel de filtro Whatman nº 1 de uma mistura padrão de fosfato-pirofosfato (1) e da mistura final de autoxidação de ClPCH/PHTN (2) em piridina-água, catalisada por TMPD, e na presença de H_3PO_4 . Temperatura em que foi feita a corrida cromatográfica: 25°C.

H_3PO_4 (M)	Rendimento de pirofosfato (%)
0,22	2,0
0,32	3,1
0,60 (solução saturada)	3,7

Em três outras experiências onde se usou H_3PO_4 0,22M e $(TBA)_3ADP$ 0,15M, os rendimentos de pirofosfato variaram entre 5,3 e 6,1% e de ATP entre 3,0 e 3,3%. Visto que estes resultados sugerem que ADP aumenta o rendimento de pirofosfato, realizaram-se duas experiências em paralelo. Na primeira estavam presentes fosfato em forma de fosfato de piridínio e $(TBA)_2HPO_4$ (concentração total 0,62M) e $(TBA)_3ADP$, 0,15M. Obteve-se 14,3% de pirofosfato e 2,6% de ATP. Na segunda, onde se omitiu o sal de ADP, o rendimento de pirofosfato foi de 4,0%. Experiências controle mostraram que a maior formação de pirofosfato não se deve à reação direta entre ADP e fosfato nas condições empregadas.

A Figura 24 mostra um dos cromatogramas ilustrando a separação do pirofosfato e do ATP.

Em outras experiências investigamos a influência de ions Mg^{2+} (solução saturada em piridina-água) e de 2,4-dinitrofenol sobre o rendimento da fosforilação, mas não se constatou efeito algum.

Em piridina anidra contendo $(TBA)_2HPO_4$ 0,20M e $(TBA)_3ADP$ 0,10M os rendimentos foram 2,1% de pirofosfato e 4,0% de ATP. Entretanto, considerando-se que apenas um quarto do ClPCH reagiu (calculado da A_{350} no espectro da mistura final de reação), os rendimentos reais foram de 8% e 16% respectivamente. O rendimento de $ClPC^+$ isolado na coluna de Dowex- H^+ foi um pouco acima do estequiométrico para formação de "ligações ricas", ou seja, de 29%.

Em outra experiência em piridina anidra com $(TBA)_2HPO_4$ 0,10M e $(TBA)_2AMP$ 0,20M, o rendimento de pirofosfato caiu para 1% e os rendimentos de ADP e de ATP formados foram 3 e 1,5% respectivamente. Entretanto, como apenas um quarto do ClPCH reagiu, o rendimento real de "ligações ricas" foi de 22%. Ainda, se lembrarmos que o ATP foi formado a partir do ADP que por sua vez é resultado da fosforilação do AMP, o rendimento total de fosforilação sobe para 28%.

FIGURA 24 - Exemplo representativo da eluição de pirofosfato e ATP da resina Dowex- Cl^- , como descrito em "MÉTODOS". A mistura original de reação em piridina-água (98:2;v/v) continha fosfato 0,22M, $(\text{TBA})_3\text{ADP}$ 0,15M, ClPCH 60mM, TMPD 1,0mM. As ordenadas à esquerda representam as absorbâncias em 260nm (círculos brancos) e as ordenadas à direita, as absorbâncias a 700nm (círculos negros) após hidrólise ácida e tratamento pelo método de SUMNER. As curvas traçadas foram obtidas com uma mistura autêntica contendo 10 μ moles de pirofosfato e 5 μ moles de ATP. Deve-se notar que o desenvolvimento do "azul de molibdênio" para a mistura autêntica foi feito sob diferentes condições de hidrólise (tempo e diluição).

Nesta experiência adicionou-se quantidade suficiente de fosfato com P^{32} para confirmar no cromatograma (Figura 25) a incorporação de fosfato nos nucleotídeos.

FIGURA 25 - Separação cromatográfica de ADP e ATP em resina Dowex-Cl⁻ (descrito em "MÉTODOS"), formados na autoxidação de ClPCH 60mM, em piridina anidra como solvente. A reação foi catalisada por TMPD 10mM e foi efetuada na presença de (TBA)₂AMP 0,20M e (TBA)₂HPO₄ 0,10M. Adicionou-se fosfato com P³² na mistura de reação. O fosfato e AMP foram removidos da coluna com mistura 0,01M HCl/0,01M KCl. Os outros dois nucleotídeos foram eluídos com mistura 0,05M HCl/0,05M KCl. As ordenadas à esquerda representam as absorbâncias a 260nm (círculos brancos) e as ordenadas à direita, as contagens da radiatividade do P³² (círculos negros).

6. DISCUSSÃO

6.1. Autoxidação de Coenzimas Piridínicos e Modelos Promovida por O_2 /TMPD

É pouco provável, em vista dos dados cinéticos, que o mecanismo principal da autoxidação de coenzimas piridínicos e modelos catalisada por TMPD consista numa reação direta da dihidronicotinamida com O_2 , tal como parece dar-se na catálise por 2,6-dihalogeno-4-aminofenóis (SILVA ARAUJO e CILENTO, 1969). De fato neste último caso a velocidade de autoxidação é de primeira ordem no O_2 ao passo que na catálise por TMPD a dependência observada foi 0,5-0,6. Outra diferença importante está no valor do quociente k_{C-H}/k_{C-D} , igual a 2,3 no caso da catálise por TMPD e 6 (ou acima) na catálise por 2,6-diiodo-p-aminofenol, valor este muito grande para clivagem homolítica. Pode-se acrescentar ainda que TMPD mas não o DIPAP catalisa a autoxidação de p-hidroquinona a qual se comporta nas reações de redox como doador de um elétron ou de átomo de hidrogênio.

Então, enquanto que com 2,6-dihalogeno-4-aminofenóis parece dar-se transferência direta de íon hidreto da 1,4-dihidronicotinamida para o O_2 (SILVA ARAUJO et al, 1970), com TMPD deve operar mecanismo homolítico. Realmente, desde que 1,4-dihidronicotinamidas podem ser oxidadas em duas etapas de um elétron e que o radical piridinil é altamente reativo com O_2 (KOSOWER e POZIOMEK, 1964) o mecanismo em cadeia é bastante provável. Deve-se também considerar que NADH pode reduzir o "azul de Wurster" (MUSTAFA et al, 1968). Assim sugerimos a seguinte série de reações:

1.

B

S

2a.

2b.

3.

4.

5.

A fase de término da cadeia (5) está formulada de acordo com o trabalho de BEHAR et al (1970).

Assume-se que a etapa 1 é muito mais lenta que as demais e que a única reação entre radicais livres é aquela entre radicais perhidroxil ($\text{HO}_2^\bullet$) e superóxido (O_2^-). Então, aplicando-se o tratamento de estado estacionário temos:

$$\text{I} - \text{velocidade} = k_4(\text{Py}^\bullet)(\text{O}_2)$$

$$\text{II} - \frac{d(\text{S})}{dt} = k_1(\text{B})(\text{O}_2) - k(\text{D})(\text{S}) = 0$$

$$\text{III} - \frac{d(\text{Py}^\bullet)}{dt} = k_2(\text{D})(\text{HO}_2^\bullet) + k_2'(\text{D})(\text{O}_2^-) + k_3(\text{D})(\text{S}) - k_4(\text{Py}^\bullet)(\text{O}_2) = 0$$

$$\text{IV} - \frac{d(\text{HO}_2^\bullet + \text{O}_2^-)}{dt} = k_1(\text{B})(\text{O}_2) + k_4(\text{Py}^\bullet)(\text{O}_2) - k_2(\text{D})(\text{HO}_2^\bullet) - k_2'(\text{D})(\text{O}_2^-) - k_5(\text{O}_2^-)(\text{HO}_2^\bullet) = 0$$

Das equações II e IV tiramos:

$$2k_1(\text{B})(\text{O}_2) = k_5(\text{O}_2^-)(\text{HO}_2^\bullet)$$

$$\text{V} - (\text{O}_2) = \frac{k_5(\text{O}_2^-)(\text{HO}_2^\bullet)}{2k_1(\text{B})}$$

Rearranjando II temos:

$$(\text{Py}^\bullet) = \frac{k_2(\text{D})(\text{HO}_2^\bullet) + k_2'(\text{D})(\text{O}_2^-) + k_3(\text{D})(\text{S})}{k_4(\text{O}_2)}$$

Daí:

$$\text{velocidade} = k_1(\text{B})(\text{O}_2) + k_2(\text{D})(\text{HO}_2^\bullet) + k_2'(\text{D})(\text{O}_2^-)$$

Desde que a velocidade de autooxidação do catalisador sozinho é geralmente muito menor que aquela do sistema completo, o termo $k_1(\text{B})(\text{O}_2)$ pode ser negligenciado:

$$\text{VI} - \text{velocidade} = k_2(\text{D})(\text{HO}_2^\bullet) + k_2'(\text{D})(\text{O}_2^-)$$

Da equação V e de $K = \frac{(H^+)(O_2^-)}{(HO_2^\bullet)}$ $K =$ constante de dissociação do radical perhidroxil

tiramos: $(HO_2^\bullet) = \left[\frac{2k_1(B)(O_2)(H^+)}{k_5 K} \right]^{\frac{1}{2}}$

$$(O_2^-) = \left[\frac{2k_1(B)(O_2)K}{k_5(H^+)} \right]^{\frac{1}{2}}$$

Substituindo-se estes valores na equação da velocidade (VI):

$$\text{velocidade} = \left[\frac{k_2(H^+)^{\frac{1}{2}}}{K^{\frac{1}{2}}} + \frac{k_2'K^{\frac{1}{2}}}{(H^+)^{\frac{1}{2}}} \right] \left[\frac{2k_1(B)(O_2)}{k_5} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (D)$$

Esta equação está de acordo com os resultados experimentais os quais mostraram claramente dependência de primeira ordem com respeito à dihidronicotinamida e de meia ordem em relação ao TMPD e ao O_2 .

Em condições de concentração constante de O_2 , a forma simplificada da equação final pode ser integrada. Obtém-se uma expressão que mostra dependência de pseudo primeira ordem na velocidade de desaparecimento da hidronicotinamida, como realmente foi observado:

$$\log(D)_t = -kt/2,303 + \log(D)_0$$

O mecanismo proposto também está de acordo com a razão isotópica 2,3 a qual mostra ruptura homolítica de uma das ligações C_4-H da dihidronicotinamida. O valor da energia de ativação calculado em 10 kcal/mol também é consistente com a etapa cinética principal que envolve abstração de hidrogênio da dihidronicotinamida.

Consistente com o mecanismo proposto é a redução da velocidade observada na presença de catecol e de superóxido dismutase.

Quando se vai de pH neutro para pHs mais baixos, a reação se torna mais rápida porque os ions O_2^- são substituídos por radicais mais reativos $HO_2^\bullet$ ($pK_a = 4,9 \pm 0,1$; BEHAR et al, 1970). Entretanto, em pHs suficientemente baixos, o efeito é contrabalançado pela protonação do catalisador o que dificulta a fase de iniciação. Isto se deve a efeitos semelhantes e opostos através dos termos $(H^+)^{1/2}$ e $(B)^{1/2}$ desde que em pH muito ácido, o termo $k_2' K^{1/2} (H^+)^{1/2}$ pode ser desprezado em relação a $k_2 (H^+)^{1/2} / K^{1/2}$ além de que k_2 é provavelmente 10 - 100 vezes maior que k_2' .

Mudando-se a H_2O por D_2O o valor de K deve tornar-se aproximadamente um terço do original. Assim uma reação será levemente acelerada devido ao termo $1/K^{1/2}$ e a outra levemente retardada devido ao termo $K^{1/2}$. Desde que ambas espécies $HO_2^\bullet$ e O_2^- reagem, o efeito da mudança de solvente sobre a reação 2a pode ser contrabalançada, em parte ou totalmente, pelo efeito oposto na reação 2b. De fato as velocidades iniciais de reação em H_2O e D_2O em pH 7,0 foram idênticas, sugerindo que nestas condições as reações com as espécies O_2^- e $HO_2^\bullet$ são aproximadamente de igual importância.

Considerações termodinâmicas:

Na fase 2a, $D + HO_2^\bullet \longrightarrow Py^\bullet + H_2O_2$, uma ligação C-H é substituída pela ligação O-H. Considerando que a energia de dissociação do segundo H do H_2O_2 é 90 kcal/mol (BENSON, 1965) e da ligação C-H no trimetilmetano é 91 kcal/mol (BENSON 1965). ΔH seria praticamente igual a zero. Apesar disso ΔH deve ser negativo porque o radical piridinil, $Py^\bullet$, é estabilizado por ressonância.

Por outro lado a etapa 4, $Py^\bullet + O_2 \longrightarrow P + O_2^-$, é certamente exotérmica. No caso de autooxidação do radical ciclohexadienil $-\Delta H$ foi calculado em 23 kcal/mol a partir da energia de dissociação da ligação C-H do radical (24 kcal/mol; BENSON, 1965) e da energia de dissociação do primeiro hidrogênio no H_2O_2 (47 kcal/mol; FONER e HUDSON, 1962). A este ΔH ainda deve-se considerar a energia de estabilização por ressonância.

Provavelmente a exotermicidade das etapas 2 e 4 instabilidade do radical hipotético $\text{PyO}_2^\bullet$ são as razões que determinam o mecanismo observado.

Esta situação é bem diferente daquela que ocorre com flavinas reduzidas, as quais originam hidroperóxidos como intermediários (MARGER e BERENDS, 1966; MASSEY et al, 1969). Além disso, se uma semiquinona é formada a partir do hidroperóxido como sugerido no caso de flavodesidrogenases, a semiquinona reagiria lentamente com O_2 .

6.2. Autoxidação de PHTN em Água:

Na autoxidação de PHTN pelo sistema O_2/TMPD o produto principal é o cátion ClPC^+ . Embora pequenas quantidades de ClPCH estejam em equilíbrio com PHTN, o cátion ClPC^+ não deve ter-se formado a partir da dihidronicotinamida, como proposto por JOHNSTON et al (1963) quando riboflavina atua como oxidante (SUELTER, 1959). Já foi dito que a velocidade de autoxidação de NADH e modelos catalisada por TMPD é de primeira ordem com respeito à concentração de dihidronicotinamida. Ora, a dihidronicotina está presente em equilíbrio com o produto 5,6-hidratado em concentração muito baixa; logo não se deveria esperar velocidade de autoxidação detectável. Por outro lado, ao se substituir H_2O por D_2O houve brusca queda na velocidade de autoxidação do PHTN e o cátion piridínico formou-se em quantidade muito pequena (rendimento $< 5\%$). A autoxidação de 1,4 dihidronicotinamida por O_2/TMPD não foi afetada ao se substituir H_2O por D_2O . Logo o cátion piridínico deve-se formar a partir do PHTN e não do ClPCH . Considerando que nunca se encontrou influência de fosfato na reatividade do O_2 (CILENTO e ZINNER, 1966, 1967 a,b,c; SILVA ARAUJO E CILENTO, 1969) e que provavelmente o fosfato se encontra incorporado em intermediários altamente reativos, sugerimos o seguinte esquema de reações:

A formação do intermediário fosforilado, seja pela adição de fosfato à dihidronicotinamida em equilíbrio com PHTN ou ao grupo aldeído resultante do tautomerismo anel-cadeia, deve envolver uma fase de adição de próton cineticamente importante. Logo deve-se esperar uma diminuição na velocidade de reação em D_2O , como realmente foi notada. A pequena formação de $ClPC^+$ em D_2O está ligada talvez a mais difícil regeneração da dupla ligação $C_5 = C_6$ da mesma forma com a saturação desta ligação em 1,4-dihidronicotinamidas é grandemente diminuída em D_2O (KIM e CHAYKIN, 1968).

Não se detectou efeito isotópico no C_4 provavelmente porque a velocidade de reação mostrou apenas pequena dependência na concentração do PHTN (vide Tabela IV). O efeito relativamente pequeno das concentrações de PHTN e fosfato na velocidade de consumo de O_2 se deve ao fato que nestas experiências a velocidade de autooxidação do TMPD per si é relativamente grande.

Como a velocidade de oxidação do PHTN pelo sistema O_2 /TMPD não foi alterada pela presença da enzima superóxido dismutase e catecol, deve-se concluir que a espécie oxidante principal é a semiquinona "azul de Wurster".

Neste esquema, $\text{PHTN}^{\bullet}-\text{Pi}$ é o hipotético intermediário fosforilado.

Tal como no caso do sistema oxidante O_2/TMPD , a oxidação de PHTN com FMN foi mais rápida em tampão fosfato que em Tris. Isto poderia resultar da oxidação do ClPCH (JOHNSTON et al, 1963) cuja formação a partir do PHTN é catalisada por fosfato. Por outro lado se fosfato permite a formação de um intermediário mais reativo, a maior reatividade deste com FMN não é manifestada na posição C_4 pois os rendimentos de ClPC^+ produzido foram quase idênticos nos dois tampões. Deve-se notar que SUELTER e METZLER (1960) observaram que a oxidação de ClPCH por riboflavina é mais rápida em tampão fosfato que em Tris e atribuíram o fato a uma catálise ácida geral por HPO_4^- .

Quando KBr_3 reagiu com PHTN o rendimento de ClPC^+ foi de somente 17%.

Concluindo, nossos resultados indicam que a habilidade do sistema O_2/TMPD de promover a oxidação do PHTN a ClPC^+ em tampão fosfato não é superada por nenhuma das outras espécies oxidantes testadas.

6.3. Geração de "Ligações Ricas":

Provavelmente o resultado mais importante desta tese foi de mostrar que fosfato catalisa a oxidação de ClPCH e PHTN, estruturas modelo de NADH e NADH hidratado, que o cátion piridínico é o produto desta reação e que "ligações ricas" podem ser geradas se o processo se dá em meio não aquoso. Por isto estas reações constituem modelo para geração de ATP ao nível dos coenzimas piridínicos.

O ADP age como aceptor de fosfato não somente porque leva à formação de ATP, mas também à de pirofosfato. No último caso provavelmen

te se forma AMP o qual é fosforilado novamente:

Neste processo, apesar da substituição de uma "ligação rica" (ADP) por outra (pirofosfato) e portanto sem ganho líquido, um fosfato de alto potencial ($\text{X} \sim \text{Pi}$) deve estar envolvido. Assim sendo, esta formação de pirofosfato também deve ser contada como "formação de ligação rica". Não se deve esquecer que o pirofosfato também se forma a partir do $\text{X} \sim \text{Pi}$ e o fosfato do meio de reação.

Embora não haja praticamente dúvida sobre a presença de ClPC^+ nas misturas finais de reação, sua identificação e determinação não pôde ser muito precisa. Mesmo assim, pode-se inferir que em nosso sistema há formação de uma "ligação rica" para poucas moléculas de 1,4-dihidronicotinamida oxidadas ao cátion piridínico. Sugerimos o seguinte modelo de fosforilação:

Na última etapa, resultados isotópicos indicaram que a ponte final do oxigênio no ATP é oriunda do ADP (BOYER, 1957):

Formalmente não há energia suficiente para a etapa 1 ser seguida pela etapa 5. Provavelmente um intermediário pentacovalente é formado primeiro no qual ocorre pseudo-rotação. Isto permite a relação geométrica de 90° entre o grupo ADP que entra e a molécula de água que sai (McLICK e KORMAN, 1971).

A oxidação no C_4 é mais provável na medida em que a formação de ATP pode estar ligada à tendência de aromatização do anel, um processo no qual é aumentada a acidez do próton adjacente ao fosfato. A outra possibilidade de oxidação no C_6 do intermediário fosforilado (BARLTROP et al, 1963) é inviável pois não se detectou amida na mistura final de reação.

Pretendemos posteriormente investigar esta reação modelo em outros solventes que podem permitir uma determinação mais acurada do $ClPC^+$, embora tentativas preliminares (em tetrahydrofurano) mostrassem outras dificuldades.

6.4. Implicações Biológicas:

Apesar do efeito catalítico de TMPD sobre a autooxidação de coenzimas piridínicas ser ainda claramente detectável quando TMPD está presen

te em concentração $1 \cdot 10^{-5} M$, é pouco provável que este efeito seja importante em estudos da cadeia de oxidação-fosforilação, especialmente porque TMPD transfere um elétron para o sistema de citocromos e não para o oxigênio (MUSTAFA et al, 1968).

O íon superóxido se forma em alguns sistemas bioquímicos, por exemplo durante a autooxidação de flavinas reduzidas (BALLOU et al, 1969; ORME-JOHNSON e BEINERT, 1969). Também participa da atividade oxidativa da peroxidase (YAMAZAKI, 1966). Nesta reação, radicais livres do doador são formados às custas do H_2O_2 ; os radicais livres ativam o O_2 a $HO_2^{\cdot}$ que mantém a cadeia de reações. Nosso trabalho é consistente com o fato da geração bioquímica de íons $O_2^{\cdot -}$ depender mais do baixo potencial de redox que da estrutura específica da enzima (NILSSON et al, 1969).

Na fosforilação oxidativa, NAD^+ é o produto de oxidação do NADH (CHAYKIN, 1967). Além disso, como as reações de radicais livres geralmente requerem energia de ativação muito menor que no ataque nucleofílico, é provável que elas sejam importantes na fosforilação oxidativa (COOPER et al, 1968). Neste sentido nosso modelo de fosforilação é quase perfeito, haja visto que uma 1,4-dihidronicotinamida é oxidada por uma semiquinona ao cátion piridínico, a remoção sendo acoplada à formação de ATP. Entretanto, no nosso modelo as flavinas se mostraram ineficientes na oxidação do PHTN em meio aquoso, no sentido de não permitir maior formação de cation $ClPC^+$ em fosfato relativamente a Tris. Este fato porém não reduz o valor do nosso sistema modelo haja visto que "in vivo" a flavina funciona em cooperação com uma apoenzima (DIXON, 1971), a qual por sua vez determina a especificidade da flavina. Na verdade, a partir da observação que a semiquinona "azul de Wurster" é a espécie oxidante efetiva no sistema modelo, pode-se suspeitar que a forma semiquinônica da flavina participa do processo oxidativo na mitocôndria.

Sugerimos o seguinte esquema de fosforilação oxidativa na mitocôndria:

Este esquema está de acordo com recentes trabalhos relacionados ao processo mitocondrial de fosforilação oxidativa (CROSS et al, 1970; SABADIE-PIALOUX e GAUTHERON, 1971). O esquema apresenta muita semelhança com o mecanismo de formação de ATP promovida pelo sistema da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. A principal diferença está no fato que em nosso esquema a oxidação não ocorre no carbono ao qual o enxôfre se liga. Isto é necessário para imediata regeneração da forma oxidada da coenzima. Esta regeneração é concomitante com a formação de ATP (CHAYKIN, 1967). Por outro lado o mecanismo sugerido por BARLTROP et al (1963) requer duas moléculas de coenzima piridínico por molécula formada de ATP, com diferentes funções.

É interessante notar que a enzima gliceraldeído desidrogenase pode promover a formação do NADH-X (RAFTER et al, 1954; HILVERS et al,

1966) provavelmente através de adição preliminar de um grupo -SH na ligação dupla $C_5=C_6$ da coenzima.

7. RESUMO

N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamina (TMPD) catalisa a autooxidação de coenzimas piridínicos (NADH, NADPH) e modelos (ClBCH, ClPCH) ao cátion piridínico com rendimentos de 80-100%. A velocidade destas reações mostrou dependência de primeira ordem com respeito à concentração da 1,4-dihidronicotinamida e de meia ordem em relação às concentrações de O_2 e TMPD. Estes dados cinéticos e testes com captadores de ion superóxido e superóxido dismutase indicam que os radicais $HO_2^\bullet$ oriundos da autooxidação lenta do TMPD promovem a oxidação da dihidronicotinamida numa reação em cadeia; no término os radicais $HO_2^\bullet$ se aniquilam por dismutação. O mecanismo proposto também é confirmado (1º) pela razão $k_{C-H}/k_{C-D} = 2,3$ quando se substitui um dos hidrogênios do C_4 de ClBCH por deutério, (2º) pelas idênticas velocidades iniciais em H_2O e D_2O , (3º) pelo valor da $E_a = 10$ kcal/mol na autooxidação do NADH e (4º) pelo aumento da velocidade de de pH = 7,8 a pH 6,5.

TMPD também promove a autooxidação do derivado 5,6-hidratado (PHTN) da dihidronicotinamida ao cátion piridínico (ClPC⁺) apenas de fosfato ou arsenato estão presentes. O ClPC⁺ não se forma a partir do ClPCH em equilíbrio com o PHTN. Muito provavelmente se forma a partir do intermediário fosforilado no C_6 por oxidação no C_4 seguida de eliminação de fosfato.

Quando PHTN e ClPCH foram oxidados pelo sistema O_2 /TMPD na presença de fosfato de piridínio ou de tetra-n-butilamônio em meio piridínico houve formação de pirofosfato, isolado por cromatografia de papel e por resina de troca aniônica. Adicionando-se ADP de tetra-n-butilamônio ao sistema, constatou-se a formação de pirofosfato e de ATP com rendimentos mínimos de 5% e 3%, respectivamente. Por outro lado se a mistura de reação contém AMP de tetra-n-butilamônio pôde-se verificar a formação de pirofosfato, ADP e ATP com rendimento total de 28% de "ligações ricas". A reação estudada foi proposta como modelo para síntese de ATP no sítio I da cadeia respiratória.

SUMMARY:

N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) catalyses the autoxidation of the pyridine coenzymes and of their models to the pyridinium form (80-100% yields). The first order dependence of the rate upon the dihydronicotinamide concentration and half order upon both the O_2 and TMPD concentrations, indicates that the relatively slow autoxidation of TMPD is the source of free radicals: dihydronicotinamide autoxidizes by the $HO_2^\bullet$ chain mechanism and in the termination step the $HO_2^\bullet$ radicals decay by dismutation. Such a mechanism is also supported by the inhibitory effects of cathecol, a scavenger of the $HO_2^\bullet$ radical, and of superoxide dismutase, an enzyme which accelerates the dismutation of the $O_2^-/HO_2^\bullet$ species. The mechanism is further supported by (1) $k_{C-H}/k_{C-D} = 2,3$ for C_4 substitution in 1-benzyl-1,4-dihydronicotinamide (ClBCH), (2) identical rates in H_2O and D_2O buffers, (3) $E_a = 10$ kcal/mole in the autoxidation of NADH and (4) the increase in rate from pH 7,8 to 6,5.

TMPD promotes also the autoxidation of 1-n-propyl-6-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydronicotinamide (PHTN) to the 1-propyl-3-carboxamidopyridinium cation (ClPC⁺) provided phosphate or arsenate are present. ClPC⁺ originates not from 1-n-propyl-1,4-dihydronicotinamide (ClPCH) in equilibrium with PHTN but most certainly from a C_6 phosphorylated intermediate by oxidation at C_4 and loss of phosphate.

When PHTN and ClPCH were oxidated by the system O_2 /TMPD in the presence of pyridinium phosphate or tetra-n-butylammonium phosphate in pyridine as solvent, formation of pyrophosphate occurred. Pyrophosphate was isolated and identified by paper and ionic exchange resin chromatography. If tetra-n-butylammonium ADP is also present in the system, one can observe the formation of both pyrophosphate and ATP (5% and 3% minimum yields, respectively). In the presence of tetra-n-butylammonium AMP there, formation of pyrophosphate, ADP and ATP occurs. The total yield of energy rich bond is 28%. We suggest that the reaction is a model for the generation of the first ATP in the respiratory chain.

9. BIBLIOGRAFIA

- ALIVISATOS, S.G.A., UNGAR, F., e ABRAHAM, G.J. (1965), *Biochemistry* 4, 2616.
- ANDERSON, B.M., REYNOLDS, M.L. e ANDERSON, C.D. (1965), *Arch. Biochem. Biophys.* 110, 577.
- BALLOU, D., PALMER, G., e MASSEY, V. (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 898.
- BARLTROP, J.A., GRUBB P.W., e HESP, B. (1963), *Nature* 199, 759.
- BEHAR, D., CZAPSKI, G., RABANI, J., DORFMAN, L.M., e SCHWARZ, H.A. (1970), *J. Phys. Chem.* 74, 3209.
- BELITZER, V.A., e TSIBAKOVA, E.T. (1939), *Biokhimiya* 4, 516.
- BENSON, S.W. (1965), *J. Chem. Educ.* 42, 502.
- BERNHART, D.N., e CHESS, W.B. (1959), *Anal. Chem.* 31, 1026.
- BOYER, P.D. (1965), in "Oxidases and Related Redox Systems", Ed. T.E. King., H.S. Mason e M. Morrison, New York, John Wiley Co., vol. 2, p. 707.
- BOYER, P.D. (1957), in "Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry", Maruzen Co., Tokyo and Kyoto, p. 301.
- BRINIGAR, W.S., e WANG, J.H. (1964), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 52, 699.
- BRINIGAR, W.S., KNAFF, D.B., e WANG, J.H. (1967), *Biochemistry* 6, 36.
- BURTON, R.M., e KAPLAN, N.O. (1963), *Arch. Biochem. Biophys.* 101, 150.
- CHANCE, B., e WILLIAMS, G.R. (1955a), *J. Biol. Chem.* 217, 409.
- CHANCE, B., e WILLIAMS, G.R. (1955b), *J. Biol. Chem.* 217, 429.
- CHANCE, B., e WILLIAMS, G.R. (1956), *Adv. Enzymol.* 17, 65.
- CHAYKIN, S., MEINHART, J.O. e KREBS, E.G. (1954), *J. Biol. Chem.* 220, 811.
- CHAYKIN, S. (1967), *Ann. Rev. Biochem.* 36, 149.
- CHMIELEWSKA, I. (1960), *Biochim. Biophys. Acta* 39, 170.
- CILENTO, G., e ZINNER, K. (1966), *Biochim. Biophys. Acta* 120, 84.
- CILENTO, G., e ZINNER, K. (1967a), *Biochim. Biophys. Acta* 143, 88.
- CILENTO, G., e ZINNER, K. (1967b), *Biochim. Biophys. Acta* 143, 93.
- CILENTO, G., e ZINNER, K. (1967c), *Arch. Biochem. Biophys.* 120, 244.
- CIOTTI, M.M., e KAPLAN, N.O. (1957), *Methods Enzymol.* 3, 890.
- CLARK, V.M., KIRBY, G.W. e TODD, A. (1958), *Nature* 181, 1650.
- COHN, W.E. (1957), *Methods Enzymol.* 3, 867.
- COOPER, C., e LEHNINGER, A.L. (1956), *J. Biol. Chem.* 219, 519.
- COOPER, T.A., BRINIGAR, W.S., e WANG, J.H. (1968), *J. Biol. Chem.* 243, 5854.
- COPENHAVER, J.H. Jr, e LARDY, H.A. (1952), *J. Biol. Chem.* 195, 225.
- CROSS, R.L., CROSS, B.A., e WANG, J.H. (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 1155.
- CUNDIFF, R.H., e MARKUNAS, P.C. (1956), *Anal. Chem.* 28, 792.

- DIXON, M. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* 226, 269.
- ENGELHARDT, W.A. (1930), *Biochem. Z.* 227, 16.
- ENGELHARDT, W.A. (1932), *Biochem. Z.* 251, 343.
- ERICKSON, R.E., WAGNER, A.F., e FOLKERS, K. (1963), *J. Am. Chem. Soc.* 85, 1535.
- FONER, S.N., e HUDSON, R.L. (1962), *J. Chem Phys.* 36, 2681.
- FRIEDKIN, M., e LEHNINGER, A.L. (1949), *J. Biol. Chem.* 78, 611.
- FROEDE, H.C., e HUNTER, F.H. Jr. (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 954.
- GIBSON, Q.H., MASSEY, V., e ATHERTON, N.M. (1962), *Biochem. J.* 85, 369.
- GLAHN, P.E., e NILSEN, S.O. (1959), *Nature* 183, 1578.
- GLASOE, P.K., e LONG, F.A. (1960), *J. Phys. Chem.* 64, 188.
- GOMORI, G. (1955), *Methods Enzymol.* 1, 143.
- HIGUCHI, T., e GENSCHE, K.-H. (1966a), *J. Am. Chem. Soc.* 88, 3874.
- HIGUCHI, T., e GENSCHE, K.-H. (1966b), *J. Am. Chem. Soc.* 88, 5486.
- HILVERS, A.G., WEENEN, J.H.M., e VAN DAM, K. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 128, 74.
- HUGHES, E.B., JELLINEK, H.H.G., e AMBROSE, B.A. (1949) *J. Phys. & Colloid Chem.* 53, 410.
- JOHNSTON, C.C., GARDNER, J.L., SUELTER, C.H., e METZLER, D.E. (1963), *Biochemistry* 2, 689.
- KALCKAR, H. (1937), *Enzymologia* 2, 47.
- KALCKAR, H. (1939), *Biochem. J.* 33, 631.
- KARRER, P., e STARE, F.J. (1937), *Helv. Chim. Acta* 20, 418.
- KIM, C.S.Y., e CHAYKIN, S. (1968), *Biochemistry* 7, 2339.
- KING, T.E., KUBOYAMA, M., e TAKEMORI, S. (1965), in "Oxidases and Related Redox Systems", Ed. T.E. King, H.S. Mason e M. Morrison, New York, John Wiley Co., vol. 2, p. 707.
- KOSOWER, E.M., e POZIOMEK, E.J. (1964), *J. Am. Chem Soc.* 86, 5515.
- LAMBETH, D.O., e LARDY, H.A. (1969), *Biochemistry* 8, 3395.
- LARDY, H.A., e WELLMAN, H. (1952), *J. Biol. Chem.* 195, 215.
- LARDY, H.A., e FERGUSON, S.M. (1969), *Ann. Rev. Biochem.* 38, 991.
- LEHNINGER, A.L. (1955), *Harvey Lectures* 49, 176.
- LIPMANN, F. (1941), *Adv. Enzymol.* 1, 99.
- LOOMIS, W.F., e LIPMANN, F. (1948), *J. Biol. Chem.* 173, 807.
- MAGER, H.I.X., e BERENDS, W. (1966), *Biochim, Biophys. Acta*, 118, 440.
- MASSEY, V., MILLER, F., FELDBERG, R., SCHUMAN, M., SULLIVAN, P.A., HOWELL, L.G., MAYHEW, S.G., MATTEWS, R.G., e FOUST, G.P. (1969), *J. Biol. Chem.* 244, 3999.
- MASSEY, V., WILLIAMS, C.H., e PALMER, G. (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 730.
- MAUZERALL, D., e WESTHEIMER, F.H. (1955), *J. Am. Chem. Soc.* 77, 2261.
- MCCORD, J.M., e FRIDOVICH, I. (1969), *J. Biol. Chem.* 244, 6049.
- MCCORD, J.M., e FRIDOVICH, I. (1969), *J. Biol. Chem.* 244, 6056.

- McLICK, J., e KORMAN, E.F. (1971), Federation Proc. 30, II, 1245.
- MEINHART, J.O., e CHAYKIN, S. (1955), Federation Proc. 14, 99.
- MEINHART, J.O., CHAYKIN, S., e KREBS, E.G. (1956), J. Biol. Chem. 220, 821.
- MILLER, R.W. (1970), Can. J. Biochem, 48, 935.
- MITCHELL, P. (1956), "Chemismotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation". Bodmin. Glynn Research Ltd.
- MITCHELL, P. (1961), Nature 191, 144.
- MITCHELL, P. (1968), "Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction". Bodmin. Glynn Research Ltd.
- MOORE, H.W., e FOLKERS, K. (1964), J. Am. Chem. Soc. 86, 3393.
- MUSTAFA, M.G., COWGER, M.L., LABBE, R.F., e KING, T.E. (1968) J. Biol. Chem. 243, 1908.
- NILSEN, S.O., e LEHNINGER, A.L. (1955), J. Biol. Chem. 215, 555.
- NILSSON, R., PICK, F.M., e BRAY, R.C. (1969), Biochim. Biophys. Acta 192, 145.
- OCHOA, S. (1940), Nature 146, 267.
- OCHOA, S. (1941), J. Biol. Chem. 138, 751.
- OCHOA, S. (1943), J. Biol. Chem. 151, 493.
- ORME-JOHNSON, W.H., e BEINERT, H. (1969), Biochim. Biophys. Res. Commun. 36, 905.
- PAINTER, A.A., e HUNTER, F.E. Jr. (1970a), Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 360.
- PAINTER, A.A., e HUNTER, F.E. Jr. (1970b), ibidem 40, 369.
- PAINTER, A.A., e HUNTER, F.E. Jr. (1970c), ibidem 40, 378.
- PAINTER, A.A., e HUNTER, F.E. Jr. (1970d), ibidem 40, 387.
- PULLMAN, M.E., e SCHATZ, G. (1967), Ann. Rev. Biochem. 36, 539.
- RAFTER, G.W., CHAYKIN, S., e KREBS, E.G. (1954), J. Biol. Chem. 208, 799.
- SABADIE-PIALOUX, N., e GAUTHERON, D. (1971), Biochim. Biophys. Acta 234, 9.
- SILVA ARAUJO, M., e CILENTO, G. (1969), Biochemistry 8, 2145.
- SILVA ARAUJO, M., BECHARA, E.J.H., ZINNER, K., e CILENTO, G. (1970), Record Chem. Prog. 31, 189.
- SLATER, E.C. (1953), Nature 172, 975.
- SLATER, E.C. (1956), in "Proc. 3rd Internat. Congr. Bioch. Bruxelles, 1955", Academic Press, New York, p. 264.
- SLATER, E.C. (1971), Quaterly Reviews of Biophysics 4, 3⁵.
- SRERE, P.A., KOSICKI, G.W., e LUMRY, R. (1961), Biochim. Biophys. Acta 50, 184.
- STOCK, A., SANN, E., e PFLEIDERER, G. (1961), Ann. Chem. 647, 188.
- SUELTER, C. (1959), Ph.D. Thesis, Iowa State University, p. 78.
- SUELTER, C.H., e METZLER, D.E. (1960), Biochim. Biophys. Acta 44, 23.
- SUMNER, J.B. (1944), Science 100, 413.
- TER WELLE, H.F., e SLATER, E.C. (1967), Biochim. Biophys. Acta 143, 1.
- VILKAS, M., e LEDERER, E. (1962), Experientia 18, 546.

- VOGEL, A.I. (1964), "A Textbook of Practical Organic Chemistry", Longmans, 3rd. ed., Londres, p. 163.
- WIELAND, T., e BÄUERLEIN, E. (1967a), Naturwissenschaften 54, 80.
- WIELAND, T., e BÄUERLEIN, E. (1967a.), Montash. Chem, 98, 1381.
- WIELAND, T., e BÄUERLEIN, E. (1967c), Chem. Ber. 100, 3869.
- WIELAND, T., e BÄUERLEIN, E. (1968), Angew. Chem. 80, 915.
- WIELAND, T., e AQUILA, H. (1968), Chem. Ber. 101, 3031.
- YAMAZAKI, I. (1966), in "Biological and Chemical Aspects of Oxygenases", Ed. K. Block e O. Hayaishi, Tokyo, Maruzen Co., p. 433.