Adelaide Faljoni-Alario

Efeitos Cotton nas Coenzimas Piridínicas e
Compostos Relacionados

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

São Paulo
1976

O presente trabalho foi
realizado sob orientação do
Prof. Dr. GIUSEPPE CILENTO

À minha tríade essencial:

Hollanda, Guerino e Dante

e

à memória do meu exemplo de vida:

nona Adelaide

Agradeço ao Prof. G. Cilento
pela confiança e orientação,
que me tributou, no decorrer
deste trabalho

Deixo expresso meus agradecimentos

Aos amigos do Instituto de Química e, especialmente ao grupo de trabalho do Prof. Dr. G. Cilento, que gentilmente contribuíram e deram seu apoio, tornando possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Klaus Zinner, responsável pelo encaminhamento ao estudo de espectropolarimetria de tamanha importância para a execução da tese.

À Zenaide Aparecida Faljone pela revisão ortográfica do manuscrito.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelas bolsas concedidas e apoio financeiro durante todo o desenvolvimento do trabalho.

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	1
1. INTRODUÇÃO	4
1.1. Derivados diidronicotinamídicos	4
1.2. Reações de hidratação das coenzimas piridínicas reduzidas	8
1.3. Estereoquímica das coenzimas piridínicas	11
1.4. Escopo do presente trabalho	27
2. PARTE EXPERIMENTAL	29
2.1. Material	29
2.2. Aparelhagem	31
2.3. Métodos	31
2.3.1. Preparação de tampões	31
2.3.2. Adição de água às coenzimas piridínicas reduzidas	31
2.3.3. Preparação de NADH-X por via química	32
2.3.4. Preparação de NADH-X por via enzimática	33
2.3.5. Preparação do isômero 1,6-NADH	34
2.3.6. Espectros de absorção eletrônica e de absorção circular dicróica do isômero 1,6-NADH	34
2.3.7. Dosagem de GPD de lêvedo	35

	Pág.
2.3.8. Dosagem de LDH de músculo de coelho	35
2.3.9. Dosagem de LDH de lêvedo	35
2.3.10. Dosagem de LDH de músculo cardíaco	35
2.3.11. Dosagem de ADH de lêvedo	35
2.3.12. Adição de cianeto às coenzimas piridínicas oxidadas	35
2.3.13. β -NAD ⁺ ligado à GDP	37
2.3.14. Transições fracas na região do visível do espectro das 1,4-diidronicotinamidas	37
2.3.15. Transições fracas na região do visível do espectro dos adutos cianeto/coenzimas piridínicas oxidadas	38
2.3.16. Interação das coenzimas piridínicas com íons Cu ⁺⁺	39
2.3.17. Cálculos de elipticidade molar	39
3. RESULTADOS	40
3.1. Hidratação das coenzimas piridínicas reduzidas. Formação de NADH-X e análogos	40
3.1.1. Hidratação de β -NADH	40
3.1.2. Hidratação de α -NADH	43
3.1.3. Hidratação de β -NADPH	43
3.1.4. Hidratação de β -NMNH	47
3.1.5. Hidratação de desamino- β -NADH	47

	Pág.
3.2. Isômero 1,6-NADH	52
3.3. Adição de cianeto às coenzimas piridínicas oxidadas	52
3.3.1. Adição de cianeto ao β -NAD ⁺	52
3.3.2. Adição de cianeto ao α -NAD ⁺	59
3.3.3. Adição de cianeto ao β -NADP ⁺	63
3.3.4. Adição de cianeto ao β -NMN ⁺	63
3.3.5. Adição de cianeto ao β -NAD ⁺ ligado à GPD	68
3.4. Transições fracas na região do visível do espectro das 1,4-diidronicotinamidas	68
3.4.1. β -NADH	68
3.4.2. α -NADH	70
3.4.3. Adutos cianeto/coenzimas piridínicas oxidadas	70
3.4.3.1. β -NAD ⁺ /CN ⁻	70
3.4.3.2. α -NAD ⁺ /CN ⁻	70
3.4.4. Interação das coenzimas piridínicas com íons Cu ⁺⁺	73
4. DISCUSSÃO	76
4.1. Hidratação das coenzimas piridínicas reduzidas. Formação de NADH-X e análogos	76
4.2. Isômero 1,6-NADH	82
4.3. Adição de cianeto às coenzimas piridínicas oxidadas	83

	Pág.
4.4. Transições fracas na região do visível do espectro das 1,4-diidromicotimamidas	91
5. CONCLUSÕES	95
6. SUMÁRIO	97
SUMMARY	102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

ABREVIATURAS

AMP - Adenosina 5'-monofosfato

ADP - Adenosina 5'-difosfato

ATP - Adenosina 5'-trifosfato

ADH - Álcool desidrogenase

GPD - Gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase

LDH - Lactato desidrogenase

BSA - Albumina de soro bovino

α -NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídio oxidada, na
configuração α

β -NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídio oxidada, na
configuração β

β -NMN⁺ - Nicotinamida mononucleotídio oxidada na, configura-
ção β

β -NADP⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato oxida-
da, na configuração β

α -NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida, na con-
figuração α

β -NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida, na con-
figuração β

β -NMNH - Nicotinamida mononucleotídio reduzida, na configu-
ração β

β -NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida, na configuração β

NADH-X - Produto de hidratação em 5-6 do NADH (monoidroxite-traído-NADH)

p.a.p. - Produto ácido primário

TRIS - Tris-(hidroximetil)-aminometano

DEAE - Dietil amino etil

NH₂DH - Nicotinamida hipoxantina dinucleotídeo reduzida

RNM - Ressonância nuclear magnética

RNMP - Ressonância nuclear magnética protônica

NH⁺D - Nicotinamida hipoxantina dinucleotídeo oxidada

Estrutura da nicotinamida adenina dinucleotídio oxidada.

1. INTRODUÇÃO

1.1. DERIVADOS DIIDRONICOTINAMÍDICOS

As reações químicas das coenzimas piridínicas são processos simples como oxidação e redução. Quando o grupo piridínico de β -NAD⁺, α -NAD⁺ ou análogos é reduzido, originam-se cromóforos que mostram um máximo de absorção na região de 325 a 340 nm. Essa região de absorção é comum a cinco estruturas básicas que, no entanto, apresentam-se com diferentes coeficientes de extinção molar (KAPLAN, 1960; SUND e col., 1964).

I (λ_{max} . 340 nm)

II (λ_{max} , 260 e 345 nm)

III (λ_{max} , 345 nm)

IV (λ_{max} . 340 nm)

V (λ_{max} . 260 e 345 nm)

Do mesmo modo, a adição de anions nas posições 2, 4 ou 6 do anel nicotinamídico das coenzimas oxidadas leva, essencialmente, aos mesmos cromóforos. Dessa maneira, quando se tem uma coenzima piridínica absorvendo em 340 nm, não se pode afirmar que é necessariamente β -1,4-NADH. Entretanto pode-se distinguir, facilmente, o β -1,4-NADH e o β -1,4-NADPH dos outros análogos, devido a atuarem como agentes redutores específicos em sistemas de desidrogenases (CHAYKIN e col., 1966).

Os dímeros 4,4' (IV) e 6,6' (V) são distinguidos a partir de suas mobilidades cromatográficas (CHAYKIN e col., 1965).

Quanto aos derivados 1,2-diidro (III), esses têm um máximo de absorção característica e são extremamente lábeis na presença de ácidos (SUND e col., 1964; CHAYKIN e col., 1966a; CHAYKIN e MEISSNER, 1964).

O composto 1,6-diidro (II) pode ser identificado pela ausência de reatividade em relação às desidrogenases (CHAKRAVERTY e CHAYKIN, 1964). Em 1967, CHAYKIN indicou uma possível ocorrência natural desse isômero, com base na suscetibilidade deste composto a uma enzima encontrada em lêvedo (CHAKRAVERTY e CHAYKIN, 1964). O fato de o isômero 1,6-NADH ser atacado por uma enzima que atua "in vivo" pode ser a primeira indicação de sua importância metabólica. MATHEWS e

e CONN, em 1953, apontaram a existência de várias formas de NAD^+ reduzidos, além da clássica 1,4-NADH, uma vez que os produtos de redução do NAD^+ , por hidreto de boro e sódio não eram totalmente oxidados pela desidrogenase láctica. LOVESEY e ROSS (1966) mostraram, usando técnicas de absorção no ultravioleta e de RNM, que a redução de derivados de 4-metil-nicotinamidas com dititionito de sódio tinha, como produto principal, os derivados de 1,4-diidronicotinamidas e que a redução com hidreto de boro e sódio originava, preferencialmente, 1,6-diidronicotinamidas. LUDOWIEG (1962), efetuando a redução com hidreto de boro e sódio, marcado com trítio, verificou a incorporação nas posições 2, 4 e 6 do anel piridínico. Segundo, CHAYKIN e MEISSNER (1964) e CHAYKIN e col. (1966b) os produtos de redução do NAD^+ por hidreto de boro e sódio são os isômeros 1,2-; 1,4- e 1,6-NADH.

Com relação à adição de aníons ao anel piridínico, foi observado que cianeto reage com as coenzimas piridínicas, dando origem a adutos que apresentam características espectrofotométricas semelhantes aos produtos de redução dessas coenzimas. O aduto apresenta uma banda de absorção a 260 nm, mais fraca do que aquela do NAD^+ , e uma nova banda na região de 325-331 nm (MEYERHOF e col., 1938; COLOWICK e col., 1951; DIEKMANN e col., 1964a,b; LINDQUIST e CORDES, 1968). O coeficiente de extinção molar a 340 nm para os piridinos nucleotídios reduzidos é $6,22 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$

(GERLACH e col., 1965; LYLE e GAUTHIER, 1965), e para o aduto de cianeto foi encontrado o valor $6,33 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 327 nm (COLOWICK e col., 1951). LYLE e GAUTHIER (1965) constataram que a adição de cianeto às posições 2 e 6 do anel piridínico de compostos modelos é, cineticamente, mais favorecida do que em 4, porém, o produto de adição nessa última tem maior estabilidade termodinâmica. Dessa maneira concluíram que, primeiramente há formação de compostos de adição 1,2 e 1,6 que, então, isomerizam para dar o produto 1,4. Analogamente o 1,6-NADH tende a isomerizar-se ao 1,4-NADH (CHAYKIN e col., 1966). LYLE e GAUTHIER (1965) observaram, ainda, que um grupo atraente de elétrons, na posição 3 do anel piridínico, favorece mais o ataque nucleofílico na posição 2 do que na 6.

Outro tipo de isomerização pode ser observado com os nucleotídeos reduzidos, marcados isotopicamente. LUDOWIEG e LEVY (1964) mostraram que uma mistura de coenzimas, nas formas oxidadas e reduzidas, pode entrar em um equilíbrio de óxido-redução não enzimático, levando a uma marcação isotópica aleatória da coenzima que, inicialmente, estava estereoespecificamente marcada.

Das cinco estruturas das coenzimas piridínicas que aparecem no esquema 1, apenas a primeira foi considerada de

importância biológica. Atualmente, essa idéia já não é mais aceita. Por exemplo, o isômero 1,6-NADH, é substrato para uma enzima encontrada em lêvedo (CHAKRAVERTY e CHAYKIN, 1964). O dímero 4,4' produzido pela redução eletrolítica de NAD^+ (BRUNETT e UNDERWOOD, 1965; BRAUN e col., 1975) pode ser oxidado por uma enzima encontrada num tipo de feijão (KONO e SUEKANE, 1958). É válido notar que são reações catalisadas "in vitro"; contudo, a suscetibilidade do 1,6-NADH e do dímero 4,4', ao ataque enzimático, pode ser a primeira indicação da importância de tais formas no metabolismo.

1.2. REAÇÕES DE HIDRATAÇÃO DAS COENZIMAS PIRIDÍNICAS REDUZIDAS

A instabilidade de NADH em meio ácido é conhecida há longo tempo (WARBURG e CRISTIAN, 1934; von EULER e col., 1938; HAAS, 1936) sendo caracterizada pelo desaparecimento da fluorescência e perda da banda de absorção a 340 nm e, com o aparecimento concomitante da banda a 280-290 nm. A absorção nessa região foi atribuída a uma alteração no anel da nicotinamida desde que modelos como N-metil nicotinamida reduzidos também mostraram essa banda (HAAS, 1936; KARRER e col., 1936, 1938). Mais precisamente, estas alterações estão vinculadas à remoção da dupla ligação, em 5-6, do anel piridínico pela adição de H_2O (STOCK e col., 1961; ANDERSON e BERKELHAMMER, 1958), conforme a reação seguinte:

As investigações pioneiras do mecanismo de reação do NADH e de seus modelos, em meio ácido, conduziram a proposições mecanísticas conflitantes, o mesmo acontecendo com respeito à natureza dos intermediários e produtos (WALLENFELS e col., 1959, 1968; ANDERSON e BERKELHAMMER, 1958; ALIVISATOS e col., 1964).

O produto de adição ácida foi chamado de produto ácido primário do NADH.

Investigações adicionais, a respeito do NADH mostraram que, em pH próximo a neutralidade, vários agentes como íons polibásicos (ALIVISATOS e col., 1965; REGUEIRO e col., 1970), íons metálicos (STOCK e col., 1961) e a enzima GPD (RAFTER e col., 1954; MEINHART e CHAYKIN, 1955; MEINHART e col., 1956; HILVERS e col., 1966), também podem provocar variações no espectro de absorção do NADH. O produto das reações acima mostrava características semelhantes, mas não idênticas às do p.a.p., e, devido à sua estrutura desconhecida, foi denominado de NADH-X (CHAYKIN e col., 1956). Constatou-se que o produto da reação do NADH, por ação da GPD,

ou aquele formado nos estágios iniciais da reação com fosfato, era revertido, por ação enzimática, ao NADH, porém, o p.a.p. do NADH era insensível a tal ação (MEINHART e CHAYKIN, 1955; MEINHART e col., 1956).

Investigações posteriores efetuadas por MILES e col. (1968) mostraram que a adição catalisada por ácidos, leva a uma série de reações como por exemplo epimerização $\beta \rightarrow \alpha$. De fato, o α e o β levam ao mesmo produto final. Se houvesse uma inversão da configuração em C_1 , seria de se esperar que houvesse ruptura de alguma ligação. Realmente, uma abertura do anel diidronicotinamídico, para o p.a.p., foi proposta por BURTON e KAPLAN (1963). Porém, a amplitude do efeito Cotton do produto final da hidratação, catalisada por ácido, é uma evidência para a integridade do anel (MILES e col., 1968). Dessa maneira, foi proposto por esses pesquisadores o seguinte esquema:

Também foi observado que o efeito Cotton do p.a.p. a 290 nm, é bem maior quando comparado com o de α - e β -NADH a 340 nm. Os autores acreditam que isso é devido a uma conformação fechada preferencial do anel da ribose ligado ao anel nicotinamídico modificado, e/ou devido a uma rotação mais restrita do anel saturado.

OPPENHEIMER (1973) propõe um mecanismo diverso deste acima citado, onde a epimerização catalisada por ácido, envolve uma protonação em C₅, seguida de um ataque da hidroxila em C₂, da ribose sobre o C₆, formando assim um anel de 5 membros.

A formação de NADH-X foi detectada em reações, envolvendo NADH-oxidase (HUENNEKENS e col., 1955). BACHUR e KAPLAN (1955) encontraram que NADH-X, diferentemente do p.a.p., pode promover o crescimento de "Hemophilus-parainfluenzae".

1.3. ESTEREOQUÍMICA DAS COENZIMAS PIRIDÍNICAS

As coenzimas piridínicas possuem oito centros assimétricos, a saber: C₁, ; C₂, ; C₃, e C₄, dos açúcares presentes na molécula. Além disso, as coenzimas piridínicas podem sofrer as seguintes variações conformacionais: (i) rotações livres em torno de ligações simples, (ii) inversão do "guarda-chuva" do átomo de nitrogênio terciário, (iii) interconversões das geometrias do anel diidronicotinamídico. Quanto aos hidrogênios em C₄ do anel piridínico, eles mantêm o mesmo relacionamento geométrico que aparece nas estruturas diastereoisoméricas do ácido tartárico, sendo denominados de "par diastereostópicos". Portanto estão situados em diferentes

ambientes químicos, e podem ser distinguidos através de RNM. Apesar de não identificados em aparelhos de 60 e 100-MHz são perfeitamente caracterizados nos de 220-MHz. Isto significa que as diferenças químicas entre eles são muito pequenas. PATEL (1969) achou o valor de 0,065 ppm para a frequência de ressonância a 16°C, enquanto que a 59°C essa diferença de deslocamentos químicos é demasiadamente pequena para permitir resolução das frequências de absorção.

Essa variação resulta ou da maior concentração da forma aberta do NADH em altas temperaturas, ou do equilíbrio mais rápido entre as duas formas moleculares aberta e fechada. Um possível equilíbrio é mostrado na figura abaixo:

Os estudos de RNM mostram, ainda, que as coenzimas piridínicas existem numa conformação fechada, onde os anéis da adenina e piridina estão dispostos em planos paralelos (SARMA e col., 1968).

A explicação com respeito à temperatura, favorecendo a conformação aberta, é consistente com a apresentação de um singlete para o par de hidrogênios em C_4 .

As investigações sobre NADH, usando técnica de RNM ilustram conclusivamente, que os hidrogênios de C_4 do anel diidronicotinamídico são distintos. Eles podem ser diferenciados por sofisticadas medidas físico-químicas (SARMA e col., 1968a,b; 1969; 1970a,b,c,d). Esses hidrogênios diastereostópicos dentro da molécula sentem ambientes geométricos distintos. No caso do NADH, o par de hidrogênios mostra diferenças químicas tão pequenas que é necessário um espectrômetro de 220-MHz para distinguí-los, a menos que haja alguma interação estereoespecífica, como no caso da conformação fechada, onde aparece a interação com o anel da adenina. Contudo, não se pode concluir que a diferenciação enzimática entre estes hidrogênios do anel diidronicotinamídico no NADH e no NADPH seja totalmente dependente dessa interação estereoespecífica com a adenina (ALWORTH, 1972). Até agora, o que se demonstrou é que as diferenças químicas entre os hidrogênios

em C_4 do NADH, na conformação aberta e do NMNH, não são suficientes para serem detectadas por um espectrômetro de 220-MHz.

Estudos feitos por SARMA e KAPLAN (1969), utilizando um espectrômetro de RNMP (220-MHz), para os compostos α -NAD⁺, β -NAD⁺, β -NADP⁺, β -NMNH e (AcPy) NADH, indicam que há uma forte interação intramolecular entre os pares de bases e que estas estão arranjadas em planos paralelos. As diferenças dos deslocamentos químicos para os hidrogênios do anel piridínico estão relacionadas com as interações entre os anéis da adenina e da nicotinamida. Para os compostos, acima relacionados, os deslocamentos de hidrogênio em C_2 (C_2H) são diferentes daqueles para o hidrogênio em C_6 (C_6H). Como o anel piridínico é capaz de girar livremente em torno da ligação glicosídica, esses hidrogênios trocam de lugar tornando-se equivalentes, uma vez que são simétricos em relação à ligação glicosídica. São seriam maiores os deslocamentos para o C_2H , nestes compostos, se a adenina interagisse com o lado do anel piridínico que contém a amida; mas isso não é possível quando o anel piridínico está numa conformação anti(ver esquema pág. 15).

No caso do (AcPy)NADH e (AcPy)NADPH o C_6H apresenta deslocamentos maiores, indicando que a maior parte do tempo a adenina interage com o lado piridínico que contém o

torção do ângulo diidropiridina/ribose $\sim 150^\circ$

torção do ângulo diidropiridina/ribose $\sim 30^\circ$

grupo $-\text{COCH}_3$. Foi verificado, também, com estes compostos, um deslocamento pequeno para o grupo $-\text{CH}_3$, indicando, assim, que se tem uma conformação anti para o anel acetil piridina com respeito ao açúcar.

Os estudos com $\beta\text{-NMN}^+$ mostram que a ligação açúcar-piridina é syn e que a forma reduzida é anti (SARMA e MYNOTT, 1973).

Quanto ao $\beta\text{-NAD}^+$ ainda há dúvidas em relação às conformações syn e anti. SARMA e KAPLAN (1969) afirmam que $\beta\text{-NAD}^+$ e $\beta\text{-NADP}^+$ têm uma conformação syn em relação à

ligação ribose-piridina e uma conformação anti para a da adenina-ribose.

Em investigações mais recentes, ZENS e col. (1975) postulam que devido à mobilidade conformacional, β -NAD⁺ apresenta-se syn e anti com respeito à ligação piridina-ribose, com uma certa preferência para a forma anti.

Com relação ao problema de conformação fechada e aberta das coenzimas piridínicas, já está bem estabelecido que essas moléculas podem assumir uma conformação onde o anel piridínico e o anel adenínico de uma mesma molécula, estão em planos paralelos (MEYER e col., 1962; CZERLINSKI e HOMMES, 1964; JARDETZKY e WADE-JARDETZKY, 1966; MILES e URRY, 1968b; SARMA e col., 1970c; CROSS e FISHER, 1969; CATTERALL e col., 1969; OPPENHEIMER e col., 1971). Na conformação fechada, como mencionado anteriormente, os dois hidrogênios em C₄ do anel piridínico não são equivalentes e, portanto, aparecem em campos diferentes nos espectros de RNM (220-MHz). A diferença parece residir no fato de um hidrogênio estar justaposto à adenina e o outro não. Porém, SARMA e KAPLAN (1970a) dão as seguintes possíveis causas para a não equivalência desses hidrogênios: (i) o anel diidronicotinamídico pode existir em uma geometria de barco torcido na qual um prôton é quase-axial e o outro quase-equatorial e, a inversão

do "guarda-chuva" do sistema trigonal do átomo de nitrogênio sendo suficientemente lenta para permitir que esses dois prótons sejam equivalentes; (ii) o anel de diidropiridina é planar e a velocidade de rotação em torno da ligação nitrogênio-ribose é suficientemente lenta comparada com a escala de tempo de RNM. A orientação dos centros quirálicos da D-ribose, com respeito ao plano do anel diidropiridina, induziria a uma menor ordem de simetria sobre o metileno em C_4 ; (iii) a cadeia lateral amídica não está no mesmo plano do anel diidropiridina e assim a amida pode deslocar os hidrogênios metilênicos; (iv) o anel da adenina está justaposto ao anel diidropiridina de maneira que os dois prótons em C_4 encontram-se em diferentes ambientes eletrônicos e geométricos.

Numa mistura equimolar de AMP e NMNH os hidrogênios em C_4 são magneticamente equivalentes, mostrando que a hidrólise da ponte difosfato destrói a justaposição das bases.

Com relação à temperatura, verifica-se que a 5°C não há equivalência desses dois hidrogênios, diferentemente do que acontece a 74°C . Isso se deve à conformação aberta da coenzima a temperaturas altas. Porém, só a justaposição das bases não é suficiente para produzir um quarteto para os hidrogênios no C_4 , e observa-se que, no caso do derivado (AcPy) NADH, esse quarteto não aparece. A ausência do quarteto no

NMNH não está de acordo com a geometria de barco torcido para o anel diidropiridina. Realmente, os dados de difração de raio-X de 1,4-diidronicotinamidas N-substituídas mostram que o anel é planar (KARLE, 1961). Dessa maneira, a diferença nos ambientes eletrônicos e geométricos desses grupos metilênicos, deve ser atribuída a um dos fatores abaixo ou, possivelmente à sua combinação: (i) restrição da rotação em torno da ligação ribose-piridina. Também, há indicação de que o limite máximo da velocidade de re-orientação da ligação seja menor do que 10^2 sec^{-1} (SARMA e KAPLAN, 1970a). Como a distinção desses prótons não é verificada num espectrômetro de 100-MHz, a causa pode ser o problema de resolução instrumental ou, então, que essa rotação seja mais rápida que 40 seg^{-1} ; (ii) conformação fechada dos dinucleotídeos. Podem existir duas conformações fechadas para as coenzimas piridínicas. Em um dos arranjos fechados, o anel da diidropiridina pode despendar um certo tempo acima do plano da adenina. Tal arranjo foi denominado, arbitrariamente, de conformação fechada para a direita. No outro arranjo, o anel diidropiridínico está abaixo da adenina e foi designado de conformação fechada para a esquerda.

Uma maneira que possibilitou verificar a existência das conformações fechadas foi a RNM do NAD(D). Através desses estudos chegou-se à conclusão que apenas um próton

despende tempo suficiente em dois ambientes geométricos eletrônicos diferentes, descartando, portanto, a idéia de uma única conformação fechada. Com base nessa proposição de conformações fechadas, para diteita e para esquerda, usou-se para denominá-las a regra de Cahn (CAHN e col., 1966) para helicidade, isto é: a hélice à esquerda é designada "menos" e denotada por M e a hélice à direita é denominada "mais" e denotada por P. Dessa maneira, os esqueletos dos dinucleotídeos podem ser M e P. Na hélice P do NADH e NADPH, o anel piridínico permanece acima do plano da adenina, enquanto que na M verifica-se o contrário (SARMA e KAPLAN, 1970a).

Esquema para os equilíbrios entre as formas fechada e aberta (SARMA e KAPLAN, 1970a).

Quanto ao (AcPy) NADH, onde não se observa um quarteto para esses dois prótons do anel diidropiridínico e sim um singlete, afirmaram esses pesquisadores que as hélices P e M estão igualmente populadas.

É conhecido o comportamento distinto, em diferentes reações enzimáticas, dos dois prótons do anel piridínico das coenzimas.

Por outro lado, constatou-se que a oxidação com ferricianeto ou enzimática de (R)-NAD(D) leva à retenção de 65% do deutério no produto, enquanto que a oxidação de (S)-NAD(D) leva à retenção de 100% do deutério no produto.

PULLMAN e col. (1954)

SAN PIETRO e col. (1955)

Estes dados mostram que os dois prótons gêmeos do anel diidro piridínico, das coenzimas piridínicas reduzidas, comportam-se diferentemente frente a agentes químicos e enzimáticos.

A antiga classificação das desidrogenases específicas para o lado A e B do anel piridínico pode estar vinculada

a essas conformações fechadas das coenzimas piridínicas. Por exemplo, conforme suposição de SARMA e KAPLAN (1970a) uma desidrogenase específica para o lado A do anel interagiria somente com a hélice M da coenzima e, com o progresso da reação haveria passagem da conformação fechada, não reativa, para aquela reativa. Porém, na verdade, ainda não é possível especificar com qual dos tipos de hélices das coenzimas interage a desidrogenase.

Dos estudos realizados até 1970, sobre a conformação das coenzimas e seus análogos, podia-se resumir o seguinte: (i) NAD^+ e NADH apresentam, no pH e temperatura biológica, significativa interação intramolecular entre as bases paralelas; (ii) NHD^+ e NHDH , conforme os dados de fluorescência (SHIFRIN e KAPLAN, 1959), mostram uma menor interação no par de bases dos derivados de hipoxantina; (iii) NADP^+ e NADPH , oferecem uma significativa interação entre o par de bases e (iv) $(\text{AcPy}) \text{NAD}^+$ e $(\text{AcPy}) \text{NADH}$, ostentam uma interação entre as bases.

Em 1971, ao ser feita uma re-investigação, através de RNM, com NAD(D) e alguns análogos especificamente marcados (OPPENHEIMER e col., 1971), foi verificado que os prótons em C_4 da piridina aparecem como um singlete. Esses pesquisadores, também, observaram que, $\beta\text{-NADH}$, $(\text{AcPy}) \text{NADH}$, NADPH ,

desamino-NADH e α -NADH, especificamente marcados, apresentam uma troca rápida entre as várias conformações com respeito à escala de tempo na RNM. Essas coenzimas e análogos reduzidos apresentam o anel diidronicotinamídico torcido, com o próton B em posição equatorial e o próton A em posição axial. Essa torção não aparece nem nos mononucleotídeos, nem nos dinucleotídeos, mesmo em temperaturas elevadas ou em CD_3OD . Dessa maneira, conclui-se que NADH e seus análogos existem, predominantemente, em uma conformação ou conformações onde o próton C_4B projeta-se no sentido oposto ao anel adenínico, enquanto o próton C_4A projeta-se em direção ao anel adenínico.

Com relação às coenzimas oxidadas, essas não podem ser estudadas diretamente, usando técnica de RNM, porque não possuem o grupo metilênico. No entanto, pode-se estudá-las através dos seus adutos com cianeto. Este, adiciona-se em ambos os lados do anel piridínico, dando lugar à produção de dois isômeros do aduto. Assim, se for constatada uma inabilidade na adição de cianeto, ter-se-á uma medida direta de impedimento estérico ou repulsão eletrostática sobre o anel piridínico.

No análogo (AcPy) NAD^+ , que apresenta 50% de conformação fechada em D_2O a 20°C , os adutos isoméricos são formados na proporção de 1,8:1 e em $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ (1:1), onde o

(AcPy)NAD⁺ encontra-se na forma totalmente aberta, os dois isômeros são formados na relação de 1,1:1 (OPPENHEIMER e col., 1971). Esses resultados indicam que a conformação fechada, provavelmente, é a responsável pela diferença de população dos isômeros dos adutos de cianeto. Como a forma fechada dispõe-se de tal maneira que impede o ataque do cianeto em um dos lados, seja por causa da adenina ou seja por causa da repulsão eletrostática do esqueleto de pirofosfato, a razão dos adutos em solução aquosa deveria ser de 2:1. Essa suposição é consistente com o valor encontrado nos experimentos realizados com RNM (1,8:1). Consequentemente, parece que as coenzimas oxidadas e análogos existem numa conformação fechada, onde um lado do anel piridínico está comprometido com o anel adenínico. Isto exclui a possibilidade das coenzimas oxidadas existirem em proporções iguais de hélices P e M, uma vez que as hélices P e M dirigiriam o cianeto a lados opostos do anel piridínico, dando ensejo à produção de quantidades iguais dos dois isômeros. Portanto, a partir desses estudos, sobre a adição de cianeto às coenzimas oxidadas, pode-se afirmar que elas existem, predominantemente, em uma conformação fechada, que está em equilíbrio rápido com uma forma aberta, muito semelhante à das coenzimas reduzidas.

Porém, segundo JACOBUS (1971), a interpretação dos deslocamentos químicos relatados na literatura é ambígua. JACOBUS (1971) acrescenta que, na verdade, pouco se sabe a respeito da geometria molecular das coenzimas piridínicas.

McDONALD e col. (1972), analisando os dados de deslocamentos químicos constantes da literatura, através de métodos estatísticos, calcularam os parâmetros termodinâmicos $\Delta H'$, $\Delta F'$ e $\Delta S'$ e, a partir dos resultados, propõem um equilíbrio

entre as formas "completamente fechada" e "completamente aberta" a saber:

onde X_q corresponde à soma das conformações completamente fechadas das hélices para direita e para esquerda; X_i ($i=1, \dots, q-1$) representa a soma de cada conformação parcialmente fechada da hélice para direita e para esquerda e X_o configura a soma das conformações completamente abertas.

Paralelamente, os estudos baseados em deslocamentos químicos de ^{13}C do anel piridínico são interpretados com base nas interações intramoleculares nas coenzimas piridínicas (WILLIAMS e col., 1976). Admite-se que estas interações provêm de uma família de conformações, onde os anéis aromáticos encontram-se próximos um do outro, por algum tempo (SCHRIMER e col., 1972; EGAN e col., 1975; ZENS e col., 1975; WILLIAMS e col., 1976).

Na tentativa de determinar a natureza das interações intramoleculares do NAD^+ , foram estudados detalhadamente os mononucleotídeos NMN^+ e NMNH (BIRDSALL e col., 1975; WILLIAMS e col., 1976). No entanto as controvérsias, quanto à interpretação dos dados existentes entre os deslocamentos químicos de ^1H e

de ^{13}C , tornam difícil prever corretamente alguma coisa a respeito da população das diversas conformações para o NMN^+ . WILLIAMS e col. (1976) enfatizam ainda mais essa difficuldade no que diz respeito aos dinucleotídeos, onde o número de conformações permitidas é maior.

1.4. ESCOPO DO PRESENTE TRABALHO

O escopo do presente trabalho foi de obterem-se informações sobre estrutura e reações das coenzimas piridínicas, por estudo de dicroísmo circular.

O estudo de piridinos nucleotídeos, por absorção circular dicróica, tem sido pouco explorado e os dados existentes são restritos, principalmente quanto aos produtos finais de algumas reações. Assim, procurou-se examinar reações de nucleotídeos piridínicos que resultassem no aparecimento de centros quirálicos associados a alguns cromóforos. Dessa forma, ter-se-iam em mãos os elementos capazes de permitir as necessárias análises.

Inicialmente, as reações de hidratação das coenzimas e compostos relacionados foram analisadas com o intuito de elucidar a estereoquímica da adição e conseqüentemente a estrutura do derivado hidratado.

Estudaram-se, em seguida, as adições de íons cianeto às coenzimas piridínicas oxidadas. Esta reação também produz um novo cromóforo e novo centro assimétrico, desde que a coenzima tenha uma estrutura fechada.

Decorrente deste último estudo, mostrou-se, também, viável a investigação por dicroísmo circular da transição que as coenzimas piridínicas apresentam na região de 435-440 nm. Esta transição pertence ao núcleo diidropiridina e é extremamente fraca. Ela foi observada pioneiramente neste laboratório. Pretendeu-se, então, confirmá-la por dicroísmo circular.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. MATERIAL

Drogas	Procedências
acetaldeído	E. Merck-D.
ácido clorídrico	BDH-Laboratory Reagents
ácido maleico	BDH-Laboratory Reagents
ADH	Sigma Chemical Co.
ADP	BDH-Laboratory Reagents
AMP	BDH-Laboratory Reagents
arsenato	J.T. Baker Chemical Co.
ATP	BDH-Laboratory Reagents
BSA	Sigma Chemical Co.
cianeto de sódio	May e Baker LTD.
cisteína	BDH-Laboratory Reagents
cloreto de bário	J.T. Baker Chemical Co.
DEAE-celulose	Sigma Chemical Co.
desamino-NADH	Sigma Chemical Co.
diidrogenofosfato de sódio	J.T. Baker Chemical Co.
dioxano	BDH-Laboratory Reagents
EDTA	Harleco
gliceraldeído	BDH-Laboratory Reagents
GPD	Sigma Chemical Co.

Drogas	Procedências
hidreto de boro e sódio	Ventron
hidrogenocarbonato de amônio	E. Merck-D.
hidrogenocarbonato de potássio	E. Merck-D.
hidrogenofosfato de sódio	J.T. Baker Chemical Co.
LDH (lêvedo)	Sigma Chemical Co.
LDH (músculo de coelho)	Sigma Chemical Co.
LDH (músculo cardíaco de porco)	Boehringer M. Gmbh
α -NAD ⁺	Sigma Chemical Co.
β -NAD ⁺	Sigma Chemical Co.
β -NADP ⁺	Sigma Chemical Co.
β -NMN ⁺	Sigma Chemical Co.
α -NADH	Sigma Chemical Co.
β -NADH	Sigma Chemical Co.
β -NADPH	Sigma Chemical Co.
β -NMNH	Sigma Chemical Co.
pirofosfato de sódio	BDH-Laboratory Reagents
piruvato de sódio	BDH-Laboratory Reagents
sulfato de amônio	J.T. Baker Chemical Co.
sulfato de cobre II	J.T. Baker Chemical Co.
sulfato de sódio	J.T. Baker Chemical Co.
tris	E. Merck-D.

2.2. APARELHAGEM

- espectropolarímetro Cary-60 equipado com o acessório de Dicroísmo Celular, modelo 6002
- espectrofotômetros Zeiss, tipos DMR-10 e DMR-21
- calculadora Hewlett-Packard, modelo 10
- centrífuga Sorvall
- balanças Mettler, tipos H-10 e H-10 T
- potenciômetro Metrohm, tipo E-388

2.3. MÉTODOS

2.3.1. Preparação de tampões

Na preparação de tampões foram utilizadas as tabelas de GOMORI (1955).

2.3.2. Adição de água às coenzimas piridínicas reduzidas

A reação de adição de água às coenzimas foi feita em tampão pirofosfato 0,02M-maleato 0,012 M, no intervalo de pH 5,0-7,0, na ausência ou na presença de GPD. A concentração das coenzimas piridínicas e análogos oscilou entre 7,0 e $9,0 \times 10^{-4}$ M, enquanto que a de GPD foi da ordem de 10^{-6} M.

A adição foi acompanhada pelo decréscimo de absorbância a 340 nm e concomitante aumento de absorbância a 285 nm, a 27°C. Utilizaram-se celas de 1 mm de caminho óptico.

Os espectros de absorção circular dicrônica foram obtidos a 27°C, usando-se celas circulares de 1 mm de caminho óptico; ou de 1 cm, quando alíquotas de 0,2 ml da mistura de reação, foram diluídas a um volume de 3,1 ml, com o tampão descrito.

2.3.3. Preparação de NADH-X por via química

Para a síntese e isolamento do monoidroxitetraidro-nicotinamida adenina dinucleotídio, foram seguidos os métodos de PFLEIDERER e STOCK (1962); CHAYKIN e col. (1956) REGUEIRO e col. (1970). Dentre uma série de alternativas apresentadas por esses pesquisadores os melhores resultados foram obtidos a pH 7,0 e na presença de arsenato. Assim, 50 mg de sal dissódico de β -NADH foram dissolvidos em 1,0 ml de tampão arsenato de sódio 0,25 M, pH 7,0. A reação foi acompanhada através do decaimento de absorbância a 340 nm e concomitante aumento de absorbância a 290 nm. Após 22 horas de reação observou-se o desaparecimento de cerca de 90% de NADH. O pH da mistura foi então ajustado a 8,5 com NaOH 1 M e, em seguida foram adicionados 0,29 ml de perclorato de bário (2 M). O precipitado formado foi removido por centrifugação. Ao sobrenadante adicionou-se um volume de etanol a 95% e, novamente o precipitado removido por centrifugação. À solução límpida adicionaram-se cinco volumes de álcool absoluto (-15°C), o que resultou na formação de um

precipitado amarelo floculoso. Essa suspensão foi mantida a -20°C por 24 horas. O precipitado formado foi coletado por centrifugação a $20.000 \times g$ durante 15 minutos. O sedimento foi lavado sucessivamente com álcool absoluto, mistura de álcool-éter 1:1, éter e seco a vácuo sobre cloreto de cálcio. Esse sal de bário de NADH-X pode ser armazenado em dessecador a $0-5^{\circ}\text{C}$ durante vários meses.

Quanto à obtenção do sal sódico do NADH-X, que é solúvel em água, partiu-se de uma solução de 0,02 M de sal de bário, a qual adicionou-se uma solução de sulfato de sódio 0,1 M. O precipitado de sulfato de bário foi removido por centrifugação. Sulfato de sódio foi adicionado ao sobrenadante até que a precipitação não mais foi observada. Este sal sódico de NADH-X também é estável durante meses quando conservado sob congelamento.

2.3.4. Preparação de NADH-X por via enzimática

A preparação de NADH-X por ação da GPD foi também baseada em trabalhos de CHAYKIN e col. (1956) e de REGUEIRO e col. (1970), com algumas modificações.

A mistura inicial de reação continha: 500 mg de NADH e 200 mg de GPD num total de 10 ml de solução (tampão tris 0,2M, pH 6,0, tampão maleato 0,025 M, pH 6,0 e tampão pirofosfato

0,035 M, pH 6,0). Após 30 minutos de reação adicionaram-se 100 mg de GPD, mantendo-se a mistura a temperatura ambiente, durante duas horas. Posteriormente, seguiu-se o mesmo procedimento descrito para a preparação química.

2.3.5. Preparação do isômero 1,6-NADH

A preparação do derivado 1,6-NADH foi feita segundo CHAKRAVERTY e col. (1964, 1969).

O isômero 1,6-NADH foi identificado a partir de sua não reatividade em presença de álcool desidrogenase de levedo; mobilidade cromatográfica (CHAYKIN e col., 1966a) e absorção máxima característica a 345 nm (CHAYKIN e col., 1964, 1966b).

Como o isômero 1,6-NADH possui uma relação de $A_{260\text{nm}}/A_{340\text{nm}}$ que varia entre 3,5 e 3,6 (CHAYKIN e col., 1966a), as frações da coluna de DEAE-celulose, apresentando tal relação, foram usadas para este trabalho.

2.3.6. Espectros de absorção eletrônica e de absorção circular dicróica do isômero 1,6-NADH

Para os espectros de absorção utilizaram-se celas de 1 mm de caminho óptico, a 27°C, enquanto que, para os espectros de dicroísmo circular, na mesma temperatura, foram usadas celas circulares de 1 mm de caminho óptico.

2.3.7. Dosagem de GPD de lvedo (EC.1.2.1.12)

A dosagem de GPD foi feita segundo o mtodo de KREBS (1955).

2.3.8. Dosagem de LDH de msculo de coelho (EC. 1.1.1.27)

A LDH foi aferida atravs da velocidade de oxidao de NADH (KORNBERG, A., 1955).

2.3.9. Dosagem de LDH de lvedo (EC.1.1.1.27)

A LDH de lvedo foi dosada, segundo o mtodo de DIXON (1955).

2.3.10. Dosagem de LDH de msculo cardaco (EC.1.1.1.27)

A dosagem dessa LDH foi feita com base no trabalho de NEILANDS (1955).

2.3.11. Dosagem de ADH de lvedo (EC.1.1.1.1.)

A ADH de lvedo foi testada, acompanhando-se a velocidade de oxidao do NADH (RACKER, 1950).

2.3.12. Adio de cianeto s coenzimas piridnicas oxidadas

A adio de cianeto s coenzimas piridnicas oxidadas na presena de enzima foi acompanhada no espectroftmetro

Zeiss DMR-21, de duplo feixe, utilizando-se 4 celas de 1 cm: A, B, C e D, posicionadas, duas a duas, em série. O compartimento de amostra continha as celas A e B, e o compartimento de referência as celas C e D.

- cela A: cianeto 0,1 M, tampão tris 0,1 M (pH 10,5),
enzima $4,0 \times 10^{-6}$ M e coenzima $\sim 2,0 \times 10^{-4}$ M.
- cela B: tampão tris 0,1 M (pH 10,5)
- cela C: cianeto 0,1 M, tampão tris 0,1 M (pH 10,5) e
enzima $4,0 \times 10^{-6}$ M.
- cela D: cianeto 0,1 M e coenzima $\sim 2,0 \times 10^{-4}$ M.

As coenzimas piridínicas e análogos utilizados para estes trabalhos foram os seguintes: β -NAD⁺, α -NAD⁺, β -NADP⁺ e β -NMN⁺, enquanto que as enzimas foram: GPD de lêvedo, LDH de músculo de coelho, de músculo de coração de porco, de lêvedo e ADH de lêvedo. Também foi usada a proteína BSA.

No espectropolarímetro as cinéticas foram medidas com celas circulares de 1 cm de caminho óptico.

Foram feitos os controles para absorção circular di-cróica das enzimas com cianeto. A mistura era composta de enzima, cianeto e tampão tris e, esses controles serviram de linha base para os espectros.

A adição de cianeto, na ausência de enzima foi acompanhada de maneira análoga à descrita para aquela na presença de enzima, com a diferença que para as medidas espectrofotométricas foram utilizadas somente duas celas, uma no compartimento da amostra e outra no compartimento de referência. Como linha base para os espectros de dicroísmo circular utilizaram-se os espectros das soluções de tris 0,1 M, pH 10,5 e cianeto 0,1 M.

Experimentos controle, omitindo cianeto, foram realizados em pH que variaram de 7,0 a 12,0.

2.3.13. β -NAD⁺ ligado à GPD

Para obter-se a saturação dos sítios de ligação da coenzima na GPD, na proporção de 4 moles de coenzima por mol de enzima, foi adicionado β -NAD⁺, à enzima comercial. A essa GPD "saturada", com β -NAD⁺, foi adicionado cianeto. Após essa adição, a solução foi filtrada em millipore ou ultracentrifugada com o intuito de retirar a proteína.

2.3.14. Transições fracas na região do visível do espectro das 1,4-diidronicotinamidas

Os espectros de absorção circular dicróica de β -NADH e de α -NADH foram determinados, usando-se altas concentrações,

isto é, 50-100 mM. Utilizaram-se celas circulares de 1 cm de caminho óptico, na região espectral de 500-400 nm. As soluções das coenzimas piridínicas foram preparadas em tampão tris pH 9,0.

Também foi feita a redução enzimática de β -NAD⁺, na própria cela espectropolarimétrica. Inicialmente o β -NAD⁺, foi dissolvido em 2,57 ml de tampão tris 0,1 M (pH 9,8), resultando numa solução final 100 mM. A esta solução adicionou-se 0,43 ml de álcool e 0,5 mg de ADH. Em seguida, traçou-se o espectro de absorção circular dicrótica desse β -NADH gerado enzimaticamente.

2.3.15. Transições fracas na região do visível do espectro dos adutos cianeto/coenzimas piridínicas oxidadas

A adição de cianeto (1,0 M) às coenzimas piridínicas oxidadas (50-100 mM) foi feita em tris 0,1 M, pH 10,5. As coenzimas utilizadas nesses experimentos foram β -NAD⁺ e α -NAD⁺.

As medidas espectropolarimétricas dos adutos, na região de 500-400 nm, foram feitas com celas circulares de 1 cm, usando-se alta concentração do aduto. Para controle, foram traçados os espectros de absorção circular dicrótica de AMP e ATP, com cianeto. A primeira solução continha AMP

100 mM, cianeto 1,0 M e tris 0,1 M, pH 10,5, enquanto a segunda continha ATP 100 mM, cianeto 1,0 M e tris 0,1 M, pH 10,5. Os espectros foram tomados em celas circulares de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

2.3.16. Interação das coenzimas piridínicas com íons de cobre II

Para medidas espectrofotométricas e espectropolarimétricas do complexo de β -NADH e cobre II, foram usadas soluções aquosas aciduladas com ácido sulfúrico (pH 4,8) que continham: β -NADH 100 mM e sulfato de cobre II 500 mM. As medidas foram feitas a 27°C. A complexação ocorre na proporção de 1:1 com $K_{\text{ass.}} = 250 \text{ l.mol}^{-1}$ a 27,5°C (BAPTISTA, 1972). Devido a instabilidade das coenzimas piridínicas, em meio ácido (MILES e col., 1968; BRAUN e col., 1975), e a hidrólise dos íons Cu^{++} , as soluções foram adiculadas imediatamente antes do uso.

2.3.17. Cálculos de elipticidade molar

Para os cálculos de elipticidade molar ($[\theta]_{\lambda}$) usou-se a seguinte expressão:

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{3300}{Cl} \frac{\Delta E}{\text{decimol}^{-1}} \text{ grau.cm}^2$$

onde ΔE é a densidade circular dicróica, C é a concentração molar e l é o caminho óptico em cm.

3. RESULTADOS

3.1. HIDRATAÇÃO DAS COENZIMAS PIRIDÍNICAS REDUZIDAS. FORMAÇÃO DE NADH-X E ANÁLOGOS

3.1.1. Hidratação de β -NADH

A formação de NADH-X foi acompanhada espectrofotometricamente, observando-se o desaparecimento da banda de 340 nm, característica das coenzimas piridínicas reduzidas, e o concomitante aumento da absorbância a 285 nm.

Fazendo-se a hidratação química do β -NADH na presença de pirofosfato/maleato (pH 5,5), verificou-se que o aumento de absorbância a 285 nm é mais lento do que quando GPD está presente na mistura de reação. Acompanhando a absorção circular dicróica, observou-se o aparecimento de um efeito Cotton positivo a 285 nm. Porém, na reação enzimática, esse efeito só se desenvolveu nos estágios finais da reação. Um exemplo é mostrado na Figura 1.

Quando β -NADH foi hidratado na presença e ausência de GPD em pH que variaram de 6,0 a 7,0, o efeito Cotton positivo a 285 nm, somente foi detectado quando grande parte da reação já havia ocorrido (Figura 2).

Figura 1 - Hidratação de β -NADH ($8,0 \times 10^{-4}$ M) em tampão piro fosfato de sódio (0,02 M)/maleato de sódio (0,012 M), pH 5,5, na ausência (---●---) e na presença (—●—) de GDP ($1,7 \times 10^{-6}$ M). Vê-se também a intensidade do efeito Cotton positivo a 285 nm, na ausência (....○....) e na presença (-.-.-●-.-.-) da enzima. Caminho óptico de 1 mm.

Figura 2 - Hidratação de β -NADH ($7,45 \times 10^{-4}$ M) em tampão pirofosfato de sódio (0,02 M)/maleato de sódio (0,012 M), pH 6,0, na ausência (---) e na presença (—) de GPD ($1,7 \times 10^{-6}$ M). Vê-se também, a intensidade do efeito Cotton positivo a 285 nm, na ausência (....) e na presença (-.-.-) da enzima. Caminho óptico de 1 mm.

3.1.2. Hidratação de α -NADH

Observou-se que a hidratação de α -NADH, na presença de GPD, apresentava aumento de absorbância a 285 nm mais rápido do que no caso de β -NADH. O efeito Cotton positivo só começou a desenvolver-se depois de ocorrido 60% do aumento esperado para a absorbância a 285 nm.

Na hidratação química, isto é, na presença de pirofosfato-maleato, a reação foi mais lenta; porém, o efeito Cotton começou a desenvolver-se concomitantemente com a reação enzimática, o que pode ser visto na Figura 3.

Com relação à variação de pH observou-se um comportamento semelhante àquele da configuração β , onde a reação foi mais lenta a pH acima de 6,0. Em pH 5,0 o efeito Cotton apareceu nos estágios iniciais da reação (Figura 4).

3.1.3. Hidratação de β -NADPH

Na hidratação de NADPH, na presença e ausência de GPD, notou-se comportamento semelhante ao β -NADH.

Quanto a atuação da enzima, notou-se uma maior eficiência na hidratação do anômero α , seguida do anômero β e pouco menor quando se tem um grupo fosfato a mais, como no caso do NADPH (Figura 5).

Figura 3 - Hidratação de α -NADH ($7,75 \times 10^{-4}$ M) em tampão pirófosfato de sódio (0,02 M)/maleato de sódio (0,012 M), pH 5,0, na ausência (----) e na presença (—) de GPD ($1,7 \times 10^{-6}$ M). Vê-se também, a intensidade do efeito Cotton positivo a 285 nm, na ausência (....) e na presença (---) da enzima. Caminho óptico de 1 mm.

Figura 4 - Hidratação de α -NADH ($7,7 \times 10^{-4} \text{ M}$) em tampão pirofosfato de sódio ($0,02 \text{ M}$)/maleato de sódio ($0,012 \text{ M}$), pH 6,0, na ausência (---) e na presença (—) de GPD ($1,7 \times 10^{-6} \text{ M}$). Vê-se também, a intensidade do efeito Cotton por sitivo a 285 nm, na ausência (....) e na presença (----) da enzima. Caminho óptico de 1 mm.

Figura 5 - Hidratação de β -NADPH ($7,7 \times 10^{-4}$ M) em tampão pirofosfato de sódio (0,02 M)/maleato de sódio (0,012 M), pH 5,5, na ausência (- - - -) e na presença (—) de GPD ($1,7 \times 10^{-6}$ M). Vê-se também, a intensidade do efeito Cotton positivo a 285 nm, na ausência (....) e na presença (- . . .) da enzima. Caminho Óptico de 1 mm.

3.1.4. Hidratação de β -NMNH

No caso do derivado mononucleotídico de β -NADH não se observou diferença significativa nas velocidades de hidratação química e enzimática. O mononucleotídico, apesar da ausência de um anel glicosídico, apresentou efeito Cotton positivo, nesta região de 285 nm, com aproximadamente a mesma intensidade daquele dos dinucleotídios. Esse efeito Cotton só apareceu quando se teve parte da hidratação efetuada. Também, para esse sistema, observou-se que em pH acima de 6,0, o efeito Cotton positivo só aparecia nos estágios finais da reação, como pode ser visto nas Figuras 6 e 7.

3.1.5. Hidratação de desamino- β -NADH

As reações de hidratação química e enzimática do desamino- β -NADH não mostraram diferença significativa nas velocidades, com relação à absorbância a 285 nm. Quanto ao comportamento espectropolarimétrico, notou-se que o derivado desamino também apresentava efeito Cotton positivo a 285 nm, e esse só aparecia nos estágios finais da reação, como pode ser visto na Figura 8.

Com relação ao pH, verificou-se que a reação foi mais rápida a pH abaixo de 6,0 e mais lenta a pH acima de 6,0 (Figura 9).

Figura 6 - Hidratação de β -NMNH ($8,64 \times 10^{-4}$ M) em tampão pirofosfato de sódio (0,02 M)/maleato de sódio (0,012M), pH 5,0, na ausência (- - - -) e na presença (—) de GPD ($1,7 \times 10^{-4}$ M). Vê-se também, a intensidade do efeito Cotton positivo a 285 nm, na ausência (.....) e na presença (----) da enzima. Caminho óptico de 1 mm.

Figura 7 - Hidratação de β -NMNH ($9,2 \times 10^{-4}$ M) em tampão piro fosfato de sódio (0,02 M)/maleato de sódio (0,012M), pH 6,0, na ausência (- · - · -) e na presença (—) de GPD ($1,7 \times 10^{-6}$ M). Vê-se também, a intensidade do efeito Cotton positivo a 285 nm, na ausência (.....) e na presença (- - - -) da enzima. Caminho óptico de 1 mm.

Figura 8 - Hidratação de desamino- β -NADH ($9,0 \times 10^{-4}$ M) em tampão pirofosfato de sódio (0,02 M)/maleato de sódio (0,012M), pH 5,0, na ausência (---) e na presença (—) de GPD ($1,7 \times 10^{-6}$ M). Vê-se também, a intensidade do efeito Cotton positivo a 285 nm, na ausência (....) e na presença (----) da enzima. Caminho óptico de 1 mm.

Figura 9 - Hidratação de desamino- β -NADH ($9,2 \times 10^{-4}$ M) em tampão pirofosfato de sódio (0,02 M)/maleato de sódio (0,012 M), pH 6,0, na ausência (-.-.-) e na presença (—) de GPD ($1,7 \times 10^{-6}$ M). Vê-se também, a intensidade do efeito Cotton positivo a 285 nm, na ausência (....) e na presença (---) da enzima. Caminho óptico de 1 mm.

Comparando as velocidades da reação de hidratação para os vários componentes, na presença de GPD, observou-se a seguinte ordem:

α -NADH > β -NADH > β -NADPH > desamino-NADH > NMNH

3.2. ISÔMERO 1,6-NADH

Os espectros de absorção circular dicróica foram feitos em tampão maleato-pirofosfato (Figura 10). Observou-se um efeito Cotton negativo a 340 nm. Esse efeito Cotton negativo apresentou-se bem mais intenso do que aquele para o 1,4-NADH. Por outro lado, o efeito Cotton a 260 nm, proveniente da base adenínica, foi mais forte no isômero 1,4 do que no 1,6 (Tabela I).

Também, foram investigados os espectros em mistura de dioxano-água (30:70), com base nos estudos de MILES e URRY (1968a) com α - e β -1,4-NADH. Constatou-se que o efeito Cotton a 228 nm aparece diminuído quando se tem dioxano na proporção acima.

3.3. ADIÇÃO DE CIANETO ÀS COENZIMAS PIRIDÍNICAS OXIDADAS

3.3.1. Adição de cianeto ao β -NAD⁺

A adição de cianeto (0,1 M) ao β -NAD⁺ ($2,0 \times 10^{-4}$ M) ocorreu rapidamente, dando origem a um aduto que apresentava

Figura 10 - Espectro de absorção circular dicróica do isômero 1,6-NADH ($4,2 \times 10^{-4} \text{ M}$), em solução aquosa, pH 7,0. Caminho óptico de 1 mm.

Tabela 1 - Elipticidades molares das coenzimas piridínicas reduzidas e dos adutos de cianeto-coenzimas piridínicas oxidadas

Coenzimas piridínicas	Visível $[\Theta]_{\lambda}$ grau.cm ² .decimol ⁻¹	Ultravioleta próximo $[\Theta]_{\lambda}$ grau.cm ² .decimol ⁻¹	Ultravioleta $[\Theta]_{\lambda}$ grau.cm ² .decimol ⁻¹
1,4-β-NADH	+ 40	- 40.200	-254.600
1,6-β-NADH	----	-102.100	-204.300
1,4-α-NADH	+ 42	-125.000	- 56.200
β-NAD ⁺ /CN ⁻	+ 20	- 55.700; - 64.300	-280.700
α-NAD ⁺ /CN ⁻	-100	-147.500; -112.500	+110.000

uma banda de absorção bem definida com máximo a 326 nm, correspondendo a adição predominante em C₄ (Figuras 11 e 12). Essa reação deu-se com rendimento de cerca de 80%.

O espectro de absorção circular dicróica mostrou uma banda larga, com máximo em torno de 330 nm. Essa banda é assimétrica, o que permitiu um desdobramento em outras duas com máximos a 325 nm e a 345-350 nm, de intensidades semelhantes (Figura 13).

Verificou-se que a banda de absorção circular dicróica diminuía sua intensidade com o tempo, contrário ao que acontecia com a banda de absorção eletrônica, a qual não variava com o tempo.

O efeito Cotton negativo a 260 nm, referente ao anel adenínico, mostrou-se mais intenso no aduto, em relação ao do β -NADH. Os valores de elipticidades molares constam da Tabela I.

As adições de CN⁻ efetuadas na presença de GPD de lêvedo, LDH de músculo de coelho, de músculo de coração de porco e de lêvedo, ADH de lêvedo e BSA, não mostraram diferença significativa na velocidade, com respeito as adições na ausência de enzima. O espectro de absorção circular dicróica, também, não foi afetado.

Figura 11 - Adição de CN^- (0,1 M) ao $\beta\text{-NAD}^+$ ($2,0 \times 10^{-4}$ M) em tampão tris (0,1 M), pH 10,5. Caminho óptico de 1 cm.

Figura 12 - Espectro de absorção eletrônica do aduto $\beta\text{-NAD}^+/\text{CN}^-$ ($1,57 \times 10^{-4}$ M) em tampão tris (0,1 M), pH 10,5. Caminho óptico de 1 cm.

Figura 13 - Espectro de absorção circular dicróica do aduto $\beta\text{-NAD}^+/\text{CN}^-$ (1,54 x 10⁻⁴ M) em tampão tris (0,1 M), pH 10,5. Caminho óptico de 1 cm. O desdobramento está indicado pelas linhas tracejadas.

3.3.2. Adição de cianeto ao α -NAD⁺

A adição de cianeto (0,1 M) a α -NAD⁺ ($1,94 \times 10^{-4}$ M) deu origem a um aduto que apresentava uma banda de absorção a 331 nm (Figuras 14 e 15). Comparativamente à forma β , existe um deslocamento de 5 nm. O rendimento dessa reação foi em torno de 60%.

O espectro de dicroísmo circular mostrou uma banda negativa com máximo a 342 nm e uma inflexão a 325 nm (Figura 16). Na região ultravioleta do espectro, viu-se um forte efeito Cotton positivo (260-270 nm). Diferentemente, do que aconteceu com o aduto β , o efeito Cotton do aduto do α -NAD⁺, não variou com o tempo.

É conhecido que, associado à transição adenínica, o α -1,4-NADH apresenta efeito Cotton negativo (MILES e URRY, 1968a), entretanto, o α -NAD⁺ mostrou efeito Cotton positivo nessa região. Sabe-se que a reação de α -NAD⁺ com cianeto processa-se com rendimento de 60%, de maneira que se tem 40% de α -NAD⁺ residual. Mesmo subtraindo o efeito desse α -NAD⁺ residual, obteve-se efeito Cotton positivo nessa região.

Os valores de elipticidades molares são apresentados na Tabela I.

Figura 14 - Adição de CN^- (0,1 M) a $\alpha\text{-NAD}^+$ ($1,94 \times 10^{-4}$ M) em tampão tris (0,1 M), pH 10,5. Caminho óptico de 1 cm.

Figura 15. Espectro de absorção eletrônica do aduto $\alpha\text{-NAD}^+/\text{CN}^-$ ($1,16 \times 10^{-4}$ M) em tampão tris (0,1 M), pH 10,5. Caminho óptico de 1 cm.

Figura 16 - Espectro de absorção circular dicrótica do aduto α -NAD⁺/CN⁻ (1,32 x 10⁻⁴ M) em tampão tris (0,1 M), pH 10,5. Caminho óptico de 1 cm. As linhas tracejadas indicam o desdobramento.

As enzimas GPD de *lêvedo*, LDH de músculo de coelho, de músculo cardíaco de porco e *lêvedo*, ADH de *lêvedo* e a proteína BSA, não afetaram sensivelmente a velocidade de adição de CN^- ao $\alpha\text{-NAD}^+$. No caso de GPD e LDH de músculo cardíaco de porco houve uma pequena diminuição na velocidade de adição relativa àquela na ausência de enzima. Quanto ao comportamento espectropolarimétrico, foi o mesmo na ausência e presença das enzimas e da proteína BSA.

3.3.3. Adição de cianeto a $\beta\text{-NADP}^+$

A adição de cianeto (0,1 M) a $\beta\text{-NADP}^+$ ($1,8 \times 10^{-4}\text{M}$), deu origem a adutos que apresentam características muito semelhantes àsquelas dos adutos $\beta\text{-NAD}^+/\text{CN}^-$, como pode ser visto nas Figuras 17 e 18.

Quanto a ação das enzimas e de proteína mencionadas no item 3.3.1, verificou-se que não afetam a velocidade de adição de CN^- nem o espectro de dicroísmo circular.

3.3.4. Adição de cianeto ao NMN^+

A adição de cianeto (0,1 M) ao NMN^+ ($1,84 \times 10^{-4}\text{M}$) ocorreu rapidamente dando origem ao aduto com um rendimento de aproximadamente 96%. O espectro de absorção eletrônica foi idêntico ao obtido para o aduto $\beta\text{-NAD}^+/\text{CN}^-$ (Figuras 19 e 20).

Figura 17 - Adição de CN^- (0,1 M) a $\beta\text{-NADP}^+$ ($1,8 \times 10^{-4}$ M) em tampão tris (0,1 M), pH 10,5. Caminho óptico de 1 cm.

Figura 18 - Espectro de absorção eletrônica do aduto $\beta\text{-NADP}^+/\text{CN}^-$ ($1,37 \times 10^{-4}\text{M}$) em tampão tris (0,1 M), pH 10,5. Caminho óptico de 1 cm.

Figura 19 - Adição de CN^- (0,1 M) a $\beta\text{-NMN}^+$ ($1,84 \times 10^{-4}$ M) em tampão tris (0,1 M), pH 10,5. Caminho óptico de 1 cm.

Figura 20 - Espectro de absorção eletrônica do aduto β -NMN⁺/CN⁻ ($1,78 \times 10^{-4}$ M) em tampão tris (0,1 M), pH 10,5. Caminho óptico de 1 cm.

A absorção circular dicróica apresentou um efeito Cotton bem fraco na região de 340 nm ($[\theta]_{340\text{nm}} = \sim 19.280$ grau.cm².decimol⁻¹). Esse efeito Cotton era mais fraco no início da reação e intensificou-se com o tempo, mesmo após a reação química estar completa.

Das reações de adição efetuadas na presença das enzimas e da proteína mencionadas no item 3.3.1, verificou-se que não houve nem aumento de velocidade, nem aumento na estereosseletividade de adição.

3.3.5. Adição de cianeto ao β -NAD⁺ ligado à GPD

Foi tentada a adição de cianeto ao β -NAD⁺ ligado a GPD, porém, não se observou a formação do aduto.

3.4. TRANSIÇÕES FRACAS NA REGIÃO DO VISÍVEL DO ESPECTRO DAS 1,4-DIIDRONICOTINAMIDAS

3.4.1. β -NADH

β -1,4-NADH apresenta uma transição extremamente fraca ($\epsilon_{\text{max}} \sim 1 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) ao redor de 435 nm (BAPTISTA e CILENTO, 1971). Usando-se altas concentrações (50 mM) foi possível detectar um efeito Cotton positivo associado a essa transição, com elipticidade molar ($[\theta]$) máxima de 40 grau.cm².decimol⁻¹. Obteve-se o mesmo resultado com a

Figura 21 - Espectro de absorção circular dicróica do aduto $\beta\text{-NMN}^+/\text{CN}^-$ ($\sim 1,78 \times 10^{-4} \text{ M}$) em tampão tris (0,1 M), pH 10,5. Caminho óptico de 1 cm.

redução enzimática de β -NAD⁺ com álcool e ADH, na própria cela espectropolarimétrica (Figura 22).

3.4.2. α -NADH

Assim como β -1,4-NADH, o isômero α -1,4-NADH apresentou uma transição na região de 435 nm ($\epsilon_{\text{max}} \sim 1$). Dessa maneira, foi traçado o espectro de dicroísmo circular de α -1,4-NADH em altas concentrações (50-100 mM), observando-se um efeito Cotton positivo com $[\theta]_{445\text{nm}} = 42 \text{ grau.cm}^2.\text{decimol}^{-1}$ (Figura 23).

3.4.3. Adutos de cianeto/coenzimas piridínicas oxidadas

3.4.3.1. β -NAD⁺/CN⁻

O aduto β -NAD⁺/CN⁻ mostrou uma banda de absorção circular dicrônica positiva fraca e bastante larga que se estende na região de 470-430 nm, como pode ser visto na Figura 22.

3.4.3.2. α -NAD⁺/CN⁻

O aduto α -NAD⁺/CN⁻ (50 mM) apresentou um efeito Cotton negativo, com um $[\theta]_{435\text{nm}} = -101 \text{ grau.cm}^2.\text{decimol}^{-1}$ (Figura 23).

Figura 22 - Espectros de absorção circular dicrônica de $\beta\text{-NADH}$ (50 mM) em tampão tris (0,1 M), pH 9,8 (----) e do aduto $\beta\text{-NAD}^+\text{/CN}^-$ (~ 72 mM) em tampão tris (0,1 M), pH 10,5 (—). Caminho óptico de 1 cm.

Figura 23 - Espectros de absorção circular dicrônica de α -NADH (50 mM) em tampão tris (0,1 M), pH 9,0 (----) e do aduto α -NAD⁺/CN⁻ (~ 60 mM) em tampão tris (0,1 M), pH 10,5 (—). Caminho óptico de 1 cm.

3.4.4. Interações das coenzimas piridínicas com íons cobre II

A interação de íons cobre II com β -NAD⁺ dá origem a uma nova absorção, na extremidade visível da banda de absorção, característica para a transição $^1S-S_0$ a 340 nm das coenzimas piridínicas reduzidas. Sabe-se que há uma complexação na proporção de 1:1, com uma constante de associação de 250 l.mol⁻¹ (25°C) (BAPTISTA, 1972). Fazendo-se a resolução desta nova transição, no espectro de absorção, notou-se que está localizada a 435 nm com um $\epsilon_{\text{máx}} = 15 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Figura 24) (BAPTISTA e col., 1976).

O espectro de absorção circular dicróica desse complexo mostrou um grande aumento de elipticidade molar em relação ao β -NADH (Figura 25).

$$\begin{array}{ll} \beta\text{-NADH} & [\theta]_{440\text{nm}} = + 40 \text{ grau.cm}^2.\text{decimol}^{-1} \\ \beta\text{-NADH.Cu}^{++} & [\theta]_{440\text{nm}} = +490 \text{ grau.cm}^2.\text{decimol}^{-1} \end{array}$$

figura 24 - Resolução do espectro de absorção do complexo β -NADH. Cu^{++} . A linha tracejada representa a cauda da transição $1\text{S}-\text{S}_0$ a 340 nm de β -NADH (100 mM) na presença de CuSO_4 (400 mM), solução aquosa - H_2SO_4 , pH 4,9. O inserte mostra nova transição com a escala das ordenadas ampliada (x2,5). caminho óptico de 1 cm (BAPTISTA e col., 1976).

Figura 25 - Espectros de absorção circular dicrônica de β -NADH (50 mM) (da Sigma Chemical Co. ou gerada enzimaticamente na própria cela espectropolarimétrica) em tampão tris (0,1 M), pH 10,5 (----); ou na presença de CuSO_4 (200 mM) em solução aquosa- H_2SO_4 , pH 4,9 (—). Caminho óptico de 1 cm.

4. DISCUSSÃO

4.1. HIDRATAÇÃO DAS COENZIMAS PIRIDÍNICAS REDUZIDAS. FORMAÇÃO DE NADH-X E ANÁLOGOS

O fato do efeito Cotton desenvolver-se mais lentamente do que o do aumento de absorbância a 285 nm, indica que na transformação de NADH em p.a.p., primeiro existe a formação de um intermediário. Este intermediário e o produto final têm valores de $\epsilon_{285\text{nm}}$ bem semelhantes, porém, efeitos Cotton de diferentes intensidades. A possibilidade mais viável é que o intermediário seja o NADH-X que, na conversão em p.a.p., sofra uma epimerização $\beta \rightarrow \alpha$.

Em presença de GPD de músculo ou em ausência de enzima, o fenômeno foi menos marcante. Provavelmente, isto é devido ao fato da hidratação ser mais lenta, o que permite maior oportunidade para a concretização da segunda fase, ou seja a epimerização.

Experiências com α -NADH mostraram um aumento de absorbância a 285 nm mais rápido do que com β -NADH. O efeito

Cotton positivo s3 começa a desenvolver-se depois de ocorrido 60% do aumento esperado para a absorb3ncia a 285 nm. Assim, tamb3m no caso de α -NADH, formar-se-ia, primeiramente, um intermedi3rio que apresentaria um efeito Cotton aproximadamente igual a zero, a 285 nm.

No caso da hidrata33o de β -NADH, presume-se a forma33o de uma mistura de ep3meros em rela33o ao C_6 , explicando, desta forma, o efeito Cotton nulo, quando se tem grande parte da hidrata33o efetuada.

No caso do α -NADH, o efeito Cotton que aparece com o tempo, deve ser devido 3 transform33o da mistura de ep3meros em C_6 , no ep3mero termodinamicamente mais est3vel.

Esse mesmo epímero, responsável pelo efeito Cotton positivo, deve também formar-se a partir da configuração β do NADH, após a epimerização $\beta \rightarrow \alpha$. O fato de GPD e de íons polibásicos induzirem comportamentos semelhantes em ambos, α e β -NADH, sugere, que a ação enzimática de GPD não é estereoespecífica. Dessa maneira, a mistura de epímeros em C_6 , seria justificada, explicando o efeito Cotton inicialmente nulo.

A mesma hipótese também explicaria os resultados obtidos por MEINHART (1956), ao observar que a NADPH-desidratase, na presença de ATP e íons magnésio, age rapidamente sobre 50% do substrato e lentamente sobre a outra metade. EVANS e WOLFENDEN (1972) observaram esse

mesmo fenômeno na desidratação de pteridina 3,4-monoidratada na presença de adenosina deaminase.

Uma explicação alternativa para os resultados obtidos seria uma hidratação estereoespecífica, com base na proposição de VELICK (1961) de que a enzima GPD atuaria no β -NADH, em sua conformação fechada. Entretanto, os seguintes fatos: α -NADH é hidratado por GPD; íons polibásicos induzem a um comportamento qualitativo sobre α e β -NADH, semelhante ao do GPD; o efeito Cotton, praticamente nulo, nos estágios iniciais da reação de hidratação, contradizem essa hipótese da hidratação estereoespecífica.

MILES e col. (1968) além de mostrarem que o p.a.p. do NADH tem um forte efeito Cotton positivo a 285 nm, constataram que a adição de água ou de cloreto de mercúrio II ao α -NADH também produz semelhante efeito Cotton positivo nesta região. Os mesmos autores também verificaram que a adição de cloreto de mercúrio II ao β -NADH ou ao β -NMNH produz forte efeito Cotton negativo a 285 nm. Desta maneira, a existência de três tipos de efeito Cotton a 285 nm, positivo, negativo e praticamente nulo, no espectro das coenzimas 6-hidroxi-1,4,5,6-tetraidronicotinamídicas sugere, que são oriundos, não só da interação com o grupo ribosídico, relacionado com o cromóforo a 285 nm, mas também provenientes

da interação com o centro quirático em C_6 . Com referência a essa quiralidade, o seguinte esquema poderia ser proposto:

Dos estudos da variação de pH, nota-se que em pH superior a 6,0, a reação é mais lenta e, o aparecimento de efeito Cotton é tardio em relação à reação química. Em pH 5,0 e 5,5 a reação é mais rápida e o efeito Cotton aparece em estágios anteriores. Esses dados mostram que, realmente, passa-se por um estado intermediário, sendo esse intermediário uma mistura de dois compostos com semelhantes valores de $\epsilon_{285\text{nm}}$, mas com efeitos Cotton, neste λ , de diferentes sinais.

O p.a.p. mostra forte efeito Cotton positivo nessa região, de maneira que, em pH menor haveria epimerização rápida, explicando-se, assim, o aparecimento de efeito Cotton já nos estágios iniciais da reação.

Para esclarecimentos a respeito da influência de grupos fosfato, amino e açúcar na catálise da hidratação e dos centros responsáveis pelo efeito Cotton positivo a 285 nm, foi investigada a hidratação dos derivados NADPH, NMNH e desamino-NADH. Comparando as velocidades de reação de hidratação para os vários componentes, na presença de GPD, verifica-se a seguinte ordem:

Na hidratação de NADPH, na presença e ausência de GPD

nota-se um comportamento semelhante aos anômeros α e β de NADH, isto é, a reação enzimática ocorre mais rapidamente, em relação à reação química; o efeito Cotton positivo desenvolve-se nos estágios finais da reação em pH maior que 6,0, porém, pode ser observado nos estágios iniciais da reação se esta for feita em pH inferior a 6,0.

Quanto à atuação da enzima, nota-se uma maior eficiência na hidratação do anômero α em relação à do anômero β que, por sua vez, é maior que no caso do NADPH, provavelmente, devido à presença de um grupo fosfato a mais neste último. No caso dos derivados desamino-NADH e mononucleotídeo, não há diferença significativa na velocidade de hidratação química e enzimática, o que demonstra a importância da presença do amino grupo da adenina para a catálise enzimática. O fato do efeito Cotton desenvolver-se apenas nos estágios finais da reação, indica que o carboidrato ligado à purina não é um centro orientador. Além disso, o NMNH.HOH apresenta um efeito Cotton de intensidade semelhante à dos dinucleotídeos, o que vem confirmar que o açúcar ligado ao anel da nicotinamida e o centro quirático em C₆ são os responsáveis pela dissimetria do produto formado.

4.2. ISÔMERO 1,6-NADH

Os espectros de absorção circular dicróica de 1,4- α - e de 1,4- β -NADH são conhecidos (MILES e col., 1968); o mesmo

não acontece para o 1,6-NADH. O efeito Cotton negativo a 340 nm no 1,4-NADH tem um $[\theta] = -40.200 \text{ grau.cm}^2.\text{decimol}^{-1}$ enquanto que no 1,6 verifica-se um $[\theta] = -102.140$. Isto pode ser um indício de uma estrutura mais rígida para esse isômero. Por outro lado, o efeito Cotton a 260 nm proveniente da base adenínica é mais forte no isômero 1,4 do que no isômero 1,6-NADH com $[\theta] = -254.600$ e $[\theta] = -204.280$, respectivamente.

Em relação à diminuição do efeito Cotton, a 228 nm, quando o espectro de 1,6-NADH é traçado em mistura de dioxano e água (30:70), pode-se afirmar que neste isômero também existe uma interação entre os anéis de adenina e nicotinamida, estando esses numa conformação paralela.

4.3. ADIÇÃO DE CIANETO ÀS COENZIMAS PIRIDÍNICAS OXIDADAS

Com a adição de cianeto ao anel piridínico origina-se um novo centro assimétrico:

A assimetria do substituinte R e, em especial, a conformação fechada dessa coenzima deve favorecer uma das duas

configurações, de maneira que não se tem uma adição estatística de 50% e sim o favorecimento de uma das duas formas.

Com base nessas considerações, estudaram-se os efeitos Cotton dos adutos cianeto-coenzimas piridínicas.

Como descrito na Introdução deste trabalho, LYLE e GAUTHIER (1965), estudando a adição de cianeto a íons piridínicos substituídos na posição 3, verificaram o aparecimento do derivado 1,6 no anel piridínico e, concluíram que a formação deste seria controlada por um fator cinético que com o tempo seria convertido no isômero 1,4, termodinamicamente mais estável. Para FOSTER e FYFE (1969), a adição predominante é na posição 4 do anel piridínico e em alguns casos, haveria também adição nas posições 2 e 6. LINDQUIST e CORDES (1968); OKUBO e ISE (1973), usando íons N-substituídos-3-carbamoil piridínicos, encontraram que a adição de cianeto dá-se predominantemente na posição 4, mas que o aduto é instável podendo ser convertido, com o tempo, nos outros isômeros. Para BEAR e col. (1973) as diidropiridinas 3-alquil substituídas podem existir em duas formas isoméricas: 1,2- e 1,6-diidro.

Com base nas características da banda de absorção circular dicróica do aduto $\beta\text{-NAD}^+/\text{CN}^-$ e, por analogia com a redução dos piridinos nucleotídios, pode-se afirmar que

a adição de cianeto também ocorre em outras posições além da posição 4.

Sabe-se que o isômero 1,4-NADH absorve a 340 nm, o 1,6 a 345 nm e o 1,2 a 390 nm (CHAYKIN e col., 1966a). Por analogia, pode-se prever a localização das bandas de absorção dos isômeros do aduto com cianeto. Dessa maneira, a banda de absorção circular dicróica na região de 345-350 nm é uma indicação da presença do isômero 1,6. O fato deste isômero estar em concentrações baixas, a ponto de não ser detectável espectrofotometricamente, vem indicar que a força rotacional é bem maior do que aquela para o isômero 1,4, o que pode estar relacionado à maior proximidade do grupo cianeto, com o anel carboidrático.

Segundo OPPENHEIMER e col. (1971), as coenzimas piridínicas apresentam-se em duas formas, aberta e fechada, que coexistem em um equilíbrio rápido. Assim, a forma aberta daria origem a adições em C₄, com baixa estereosseletividade, entretanto, em C₂ e C₆, provavelmente, seriam estereosseletivas. Realmente, estudos de OPPENHEIMER e col. (1971), através de RNM, mostraram que essas adições são estereosseletivas. Pode-se, assim, explicar os valores de elipticidades molares maiores para os adutos cianeto-coenzimas piridínicas em relação ao β-1,4-NADH, como também, o fato

do efeito Cotton a 345 nm, pertencente ao isômero 1,6 ter intensidade semelhante ao do 1,4 , apesar de sua baixa concentração.

A banda de absorção circular dicrônica em torno de 330 nm diminui sua intensidade com o tempo, podendo ser uma indicação da conversão de um enantiômero em outro, de maneira que, o efeito Cotton inicial refletiria a estereosseletividade de adição e, no caso do aduto C_4 , configuraria a posição do equilíbrio abaixo:

Uma vez que o aduto em C_6 está em baixa concentração e apresenta menor absortividade molar, pode-se inferir que a força rotacional ou a estereosseletividade de adição, ou ambas, são consideravelmente maiores do que para o aduto em C_4 . Tal fato pode ser devido à proximidade dos centros quirálicos com a ribose adjacente, de maneira que, mesmo na conformação aberta da coenzima, a adição é estereosseletiva. A maior força rotacional pode ser atribuída a uma rotação mais impedida, no caso do aduto em C_6 .

O efeito Cotton negativo a 260 nm, referente ao anel adenínico, aparece mais intenso no aduto, com relação àquela do β -NADH, possivelmente devido à influência do centro

assimétrico em C_6 sobre a transição adenínica ou, simplesmente, uma sobreposição da banda de absorção circular dicróica, referente à transição a 265 nm, característica das 1,6-dihidronicotinamidas.

A Figura 16 mostra o espectro de dicroísmo circular do aduto $\alpha\text{-NAD}^+/\text{CN}^-$, onde observa-se uma banda larga negativa com máximo a 342 nm e uma inflexão a 325 nm. É interessante notar, que esta banda é 2,6 vezes mais intensa do que aquela para o $\beta\text{-NAD}^+/\text{CN}^-$. Aqui fica bastante evidente, que trata-se de mais de um isômero, uma vez que a inflexão é bem nítida. As duas bandas obtidas através do desdobramento, centralizam-se a 342 nm e 320 nm. Por analogia ao trabalho de CHAKRAVERTY e CHAYKIN (1964), a primeira foi atribuída ao aduto em C_6 e a segunda ao aduto em C_4 .

Apesar do isômero 1,6 ocorrer em menor concentração e ter menor absortividade molar, a transição circular dicróica a 342 nm, praticamente, domina o espectro. Uma vez que o aduto em C_6 está em baixa concentração, mas mostra forte efeito Cotton, conclui-se que a adição em C_6 é bastante estereosseletiva. Outro fator que pode estar contribuindo, no caso de aduto em C_6 , é a menor mobilidade rotacional do anel diidronicotinamídico devido a maior proximidade do cianeto ao anel carboidrático.

O efeito Cotton para o aduto de $\alpha\text{-NAD}^+$ não varia com o tempo, diferentemente do que acontece com o aduto de $\beta\text{-NAD}^+$, o que leva a concluir que os controles cinético e termodinâmico levam a produtos idênticos.

Na região ultravioleta do espectro de absorção circular dicrônica, o aduto $\alpha\text{-NAD}^+/\text{CN}^-$ mostra um forte efeito Cotton positivo (260-270 nm); entretanto, é conhecido que, associado à transição da parte adenínica, o $\alpha\text{-l,4-NADH}$ apresenta um forte efeito Cotton negativo, enquanto que o $\alpha\text{-NAD}^+$ nessa região, mostra um efeito Cotton positivo (MILES e URRY, 1968a). Portanto, comparando-se os espectros de absorção circular dicrônica dos adutos $\alpha\text{-NAD}^+/\text{CN}^-$ e $\alpha\text{-NADH}$, verifica-se que a formação dos novos centros quirâlicos em C_4 e C_6 , tem grande influência sobre o efeito Cotton a 260 nm. Possivelmente, ou os novos centros quirâlicos influenciam a transição adenínica, ou o novo centro quirâlico em C_6 influencia a transição no ultravioleta do anel 1,6-diidronicotinâmico.

Os adutos $\beta\text{-NADP}^+/\text{CN}^-$, mesmo apresentando características semelhantes aos adutos de $\beta\text{-NAD}^+$, mostram um fraco efeito Cotton positivo na região de 360-380 nm, que poderia indicar alguma adição de cianeto em C_2 . Essa adição em C_2 , seria tão estereosseletiva, que afetaria o espectro de

absorção circular dicrônica, embora não seja detectável espectrofotometricamente. Na região da transição devida a adeni-na tem-se, também, um efeito Cotton negativo mais intenso do que o observado para as coenzimas reduzidas, sugerindo, assim, alguma contribuição do aduto em C_6 .

No caso da adição de cianeto ao NMN^+ , tem-se um rendimento em torno de 96%, com banda de absorção eletrônica a 327 nm, muito semelhante à do aduto $\beta-NAD^+/CN^-$ (Figura 20), porém, o efeito Cotton nessa região é bastante fraco. Esse efeito Cotton é intensificado com o tempo, mesmo após a finalização da reação química, sugerindo que, inicialmente, há um controle cinético, seguido de um controle termodinâmico (Figura 21). Porém, a intensificação do efeito Cotton do aduto de NMN^+ não conduz a valores similares aos observados para o $\beta-NAD^+/CN^-$, como pode ser visto abaixo.

$$\beta-NAD^+/CN^- \quad [\theta]_{340nm} = -55.714 \text{ grau.cm}^2.\text{decimol}^{-1}$$

$$\beta-NMN^+/CN^- \quad [\theta]_{340nm} = -19.280 \text{ grau.cm}^2.\text{decimol}^{-1}$$

Numa tentativa de aumentar-se a estereosseletividade dessas adições, foram testadas várias proteínas, como descrito na parte experimental. Nas condições de trabalho empregadas, nenhuma das proteínas influenciou a adição de cianeto, uma vez que nem a velocidade de adição, nem o espectro de

absorção circular dicrônica foram afetados. No entanto, em relação à lactato desidrogenase, os resultados obtidos não confirmaram os de GERLACH e col. (1965), que observaram a catálise enzimática da adição de cianeto ao β -NAD⁺. Para tanto, várias amostras de lactato desidrogenase foram utilizadas, inclusive uma de mesma procedência daquela usada por GERLACH e col. (1965).

Sabe-se que GPD tem β -NAD⁺ ligado na proporção de quatro moles por mol de enzima. Dessa maneira, foi tentada a adição de cianeto a esse NAD⁺ ligado, esperando-se, assim, uma maior estereosseletividade de adição, uma vez, que a coenzima ligada à proteína deve apresentar-se em uma conformação bem definida. Porém, não foi observada adição. Acredita-se que tal fato está correlacionado a uma conformação fechada do β -NAD⁺. Isto vai ao encontro das observações de CILENTO e SANIOTO (1965), de que um dos lados do anel piridínico está comprometido numa complexação de transferência de carga com o núcleo indólico da cadeia lateral da proteína.

Os controles de pH, descritos na parte experimental, foram feitos com o intuito de verificar a possibilidade de adição de uma hidroxila ao anel piridínico e posterior abertura do anel como descritos por KAPLAN e col., 1951; ANDERSON e ANDERSON, 1963; ANDERSON e col., 1965; BURTON e col., 1963; JOHNSON e MORRISON, 1970a,b.

Estes experimentos mostram que a adição de hidroxila, nessas condições de trabalho, não é significativa.

4.4. TRANSIÇÕES FRACAS NA REGIÃO DO VISÍVEL DO ESPECTRO DAS 1,4-DIIDRONICOTINAMIDAS

β -NADH mostra uma transição extremamente fraca ($\epsilon_{\text{máx.}} \sim 1$) em torno de 435 nm (BAPTISTA e CILENTO, 1971). Usando-o em altas concentrações (50 mM), foi possível detectar um efeito Cotton positivo, associado a essa transição, com elipticidade molar ($[\theta]_{\lambda}$) máxima de 40 grau.cm².decimol⁻¹. Nessas mesmas concentrações observa-se, também, para o aduto de cianeto com β -NAD⁺, um efeito Cotton que estende-se na região de 470-430 nm, como pode ser visto na Figura 22. Devido às características da banda é possível que ela seja resultante da superposição de duas outras que teriam seus máximos a 435 e 460 nm aproximadamente. O efeito Cotton a 435 nm deve corresponder ao do β -1,4-NADH, referente a uma transição T $\leftrightarrow$ S (singlete-triplete), enquanto que o efeito Cotton a 460 nm poderia ser atribuído à mesma transição, para o isômero 1,6 do aduto.

Para o α -NADH obtém-se um $[\theta]_{445\text{nm}} = 42$ grau.cm².decimol⁻¹ (Figura 23). Esse efeito Cotton está associado a uma transição fraca ($\epsilon_{\text{máx}} \sim 1$), possivelmente T $\leftrightarrow$ S (singlete-

-tripleto). Para os adutos $\alpha\text{-NAD}^+/\text{CN}^-$ obtém-se um $[\theta] = -101$ grau.cm².decimol⁻¹, bem intensificado em relação ao anômero β . Isto vem confirmar que a adição de cianeto é estereoespecífica e, devido às características da banda, pode-se afirmar a existência de mais de um isômero. Esses efeitos Cotton, na região visível do espectro, dos adutos de cianeto devem corresponder aos das coenzimas reduzidas, a 435 nm, e são provenientes dessa transição eletrônica, bastante fraca, que aparece na cauda da transição $^1S \leftarrow S_0$, com máximo a 340 nm.

BAPTISTA (1972), observou que a absorção fraca a 435 nm não se intensifica em solução de iodeto de etila. Isto pode ser a indicação de uma transição $T \leftarrow S_0$ do tipo $n \rightarrow \pi^*$, conforme mencionado por EL SAYED (1964); KEARNS e CASE (1966) e CILENTO e col. (1968). Como descrito anteriormente, observa-se um efeito Cotton associado a essa transição perto de 435 nm para o $\beta\text{-NADH}$ comercial (Sigma Chemical Co., pureza 99%), e que foi reproduzido, em vários ensaios ao gerar-se a coenzima, enzimaticamente, na própria cela espectropolarimétrica. Constata-se, também, esse efeito Cotton fraco para o $\alpha\text{-NADH}$, para os adutos $\beta\text{-NAD}^+/\text{CN}^-$ e $\alpha\text{-NAD}^+/\text{CN}^-$, o que confirma tal transição eletrônica. Portanto, não há dúvida de que o efeito Cotton débil está associado a uma transição fraca do anel 1,4-diidronicotinamida, na região do visível do espectro.

Se esta transição for, realmente, uma $T \leftarrow S_0$, do tipo $n \rightarrow \pi^*$, proibida pelas regras de seleção de "spin", este será o primeiro caso de um efeito Cotton associado a uma transição single-te-triplete. As transições do tipo $(n \rightarrow \pi^*)$ são, em geral, fontes de efeitos Cotton, na região do visível e, WEIGANG, em 1962, encontrou, para a relação de absortividades molares das transições $T \leftarrow S_0$ e $^1S \leftarrow S_0$, valores tão altos quanto 10^{-2} . De acordo com o mencionado pesquisador, valores semelhantes são esperados para o efeito de uma transição $T \leftarrow S_0$ (n, π^*) sobre a força rotacional. Entretanto, tal dedução foi colocada em dúvida por DIJKGRAAF, em 1963.

Partindo do pressuposto que as transições das coenzimas piridínicas reduzidas a 340 nm e 435 nm pertenceriam ao mesmo sistema eletrônico, encontrou-se uma razão de elipticidade molar (10^{-3}) maior do que a de absortividade molar ($10^{-3,8}$). Portanto, tais resultados favorecem o pensamento de DIJKGRAAF.

Sabendo-se que as transições $T \leftarrow S$ podem ser intensificadas na presença de espécies paramagnéticas (YUSTER e WEISSMAN, 1949; HOIJTINK, 1960), estudou-se nesse laboratório a complexação de NADH com cobre II (BAPTISTA, 1972). Observou-se uma banda mascarada na cauda do pico de absorção a 340 nm, resultante da complexação, na proporção de 1:1 dos participantes

($K_{\text{ass}} = 250 \text{ l.mol}^{-1}$). Tal banda encoberta é 15 vezes mais intensa do que a existente no β -NADH (Figura 24).

Quanto ao efeito Cotton associado a esta transição fraca das coenzimas piridínicas reduzidas, ele torna-se 100 vezes maior no complexo com Cu^{++} . A possibilidade de tratar-se de uma transição de transferência de carga foi descartada, já que essas transições apresentam, normalmente, absortividades molares bem maiores. Assim, no caso do complexo de NADH-Fe^{3+} , a transição devido à transferência de carga ocorre na região de 375 nm com um $\epsilon_{\text{máx}}$ variando de 4.000 a 8.000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (GUTMAN e col., 1968). As transições de transferência de carga aos íons Cu^{++} já foram descritas por BYERS e colaboradores (1973) e são da mesma ordem de grandeza. O espectro do complexo $\beta\text{-NADH.Cu}^{++}$ não varia na região acima de 500 nm, levando a concluir que não se trata de uma transição relativa aos íons Cu^{++} complexados. Também, é improvável que os níveis d dos íons Cu^{++} estejam espaçados no complexo, de maneira a permitir uma transição. É possível que o aumento de absortividade molar dessa banda a 435 nm das coenzimas piridínicas reduzidas, quando complexadas com Cu^{++} , seja devido ao paramagnetismo dos íons Cu^{++} , reforçando a idéia de tratar-se de uma transição singlete-triplete.

5. CONCLUSÕES

A hidratação do β -NADH leva à formação de uma mistura de epímeros em C_6 , que se transforma no produto de controle termodinâmico por uma epimerização $\beta \rightarrow \alpha$. NADH-X deve corresponder a esta mistura de epímeros resultante do controle cinético na reação.

Com relação ao isômero 1,6-NADH, conclui-se que sua estrutura é mais rígida do que a do isômero 1,4-NADH, devido a ligação simples, que une os anéis piridínico e ribosídico, ter rotação impedida, presumivelmente, em consequência da proximidade do par de hidrogênios do anel piridínico com a ribose.

A reação de adição de cianeto às coenzimas piridínicas é, pelo menos, parcialmente estereoespecífica. Esses resultados vão ao encontro dos de OPPENHEIMER (1971), que através dos dados obtidos por RNM, postula um equilíbrio entre as conformações aberta e fechada.

A possível existência de uma nova transição no espectro eletrônico, presumivelmente, de natureza singlete-triplete, vinculada ao núcleo diidronicotinamídico foi confirmada, uma vez que, o efeito Cotton fraco observado nos isômeros

α e β do NADH, foi reproduzido pela adição de cianeto aos piridino nucleotídios oxidados.

Constata-se que os resultados obtidos, concretizaram o escopo proposto.

6. SUMÁRIO

O produto de redução da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) foi convertido no seu derivado hidratado NADH-X (6-hidroxi-1,4,5,6-tetraidronicotinamida adenina dinucleotídeo) por ação de íons polibásicos tais como: fosfato, arsenato etc, ou por ação enzimática da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD). A cinética da hidratação foi acompanhada pelo aumento de absorbância ($\Delta A_{285 \text{ nm}}$) e o aparecimento de um efeito Cotton a 285 nm, notando-se que quando se parte do anômero β da coenzima, o efeito Cotton positivo só se desenvolve nos estágios finais da reação na presença de enzima.

Com base nesses resultados postulou-se a formação de um intermediário que se transforma num produto final, o qual mostra um efeito Cotton positivo a 285 nm. Supõe-se que essa última transformação seja uma epimerização $\beta \rightarrow \alpha$, de maneira que a adição de água não afeta inicialmente a configuração do átomo C_1 da ribose. Contudo, após a hidratação, o produto se transforma no epímero α , que é termodinamicamente mais estável. Na ausência da enzima, o efeito Cotton aparece em estágios anteriores, sugerindo que a hidratação, sendo lenta, dá oportunidade à epimerização. Consequentemente não há tanto acúmulo deste intermediário, que apresenta efeito Cotton praticamente nulo.

A hidratação do anômero α -NADH, na presença de GDP, mostrou um aumento de absorbância a 285 nm mais rápido do que para a forma β . Por outro lado, o efeito Cotton positivo só começou a aparecer após desenvolvimento de 60% do $\Delta A_{285 \text{ nm}}$. Isto indicou que também para α -NADH há formação de um intermediário, o qual apresenta um efeito Cotton nulo. Quando α -NADH foi hidratado na ausência da enzima, observou-se um comportamento semelhante, porém, menos marcante com relação ao aparecimento do efeito Cotton.

O fato de GPD e íons polibásicos produzirem efeitos semelhantes sobre os anômeros α e β , sugere que a ação enzimática da GPD não é estereoespecífica, produzindo uma mistura de epímeros em C_6 . Explica, também, o efeito Cotton nulo quando já se tem grande parte da hidratação efetuada.

Desta maneira pôde-se afirmar (i) que o intermediário é uma mistura de epímeros em C_6 ; (ii) que com o tempo predomina o epímero termodinamicamente mais estável.

Os mesmos estudos foram desenvolvidos com NADPH, desamino-NADH e NMNH, para esclarecimentos a respeito da influência de grupos fosfato, amino e açúcar na catálise da hidratação e dos centros responsáveis pelo efeito Cotton positivo a 285 nm, nos piridinos nucleotídios. Observou-se que NADPH tem

comportamento semelhante ao β -NADH, indicando que o grupo fosfato não tem papel importante nas catálises química e enzimática.

No caso do mononucleotídeo e desamino-dinucleotídeo não houve diferença significativa entre as velocidades de hidratação química e enzimática, o que significa ser importante a presença do amino grupo da adenina para catálise enzimática no caso de NADH. Os derivados acima, também, apresentaram efeito Cotton positivo nos estágios finais da reação. Com base no fato, que o mononucleotídeo também apresentou efeito Cotton positivo, de mesma intensidade dos dinucleotídeos, pôde-se afirmar que o açúcar ligado ao anel da nicotinamida é o responsável pela dissimetria do produto formado.

Traçou-se o espectro de absorção circular dicrônica do isômero 1,6-NADH, ainda desconhecido, para obter-se informações a respeito da sua estrutura. Através dos valores de elipticidades molares, concluiu-se que é mais rígida do que a do 1,4-NADH, presumivelmente, devido a ligação simples, que une os anéis piridínico e ribosídico, ter rotação mais impedida, como consequência da maior proximidade do par de hidrogênios da piridina, com a ribose.

O estudo da adição de CN^- aos piridinos nucleotídeos e compostos relacionados, usando técnica de dicroísmo circular,

mostrou haver estereosseletividade na adição. O espectro de absorção circular dicróica do aduto β -NAD⁺/CN⁻ mostrou uma banda negativa larga com máximo em torno de 330 nm. Esta banda é assimétrica, o que permite um desdobramento em outras duas, com máximos a 325 e a 345 nm, de intensidade semelhantes. Em analogia com a redução dos piridinos nucleotídios, que ocorre nas posições 2, 4 e 6, pôde-se afirmar que a adição de CN⁻, também, ocorre em outras posições e não exclusivamente em 4. A banda de dicroísmo circular na região de 345 nm, pareceu indicar a presença do isômero 1,6. O fato deste estar em concentração baixa a ponto de não ser detectável espectrofotometricamente, indicou que a força rotacional é bem maior do que para o isômero 1,4. Tal fato deve estar relacionado com a maior proximidade do CN⁻ ao anel carboidrático.

No aduto da forma α do piridino nucleotídio, o espectro de dicroísmo circular apresentou uma banda negativa, com máximo de 342 nm e uma inflexão a 325 nm. Essa assimetria mostrou, claramente, a existência dos dois isômeros e, que a adição de CN⁻ em C₆ é bastante estereosseletiva. Além da estereosseletividade, pode estar contribuindo, também a menor mobilidade rotacional do anel diidronicotinamídico, quando se tem aduto em C₆.

A estereosseletividade da adição de cianeto veio corroborar com a proposição de um equilíbrio rápido entre as

conformações aberta e fechada para os piridino nucleotídeos.

A possível existência de uma transição fraca, associada ao núcleo diidronicotinamídico, foi confirmada detectando-se um efeito Cotton associado a ela. Esse efeito foi observado para α -NADH, β -NADH e seus correspondentes adutos de CN^- . Realizando-se o mesmo estudo para o complexo de β -NADH. Cu^{++} , verificou-se que o efeito Cotton é 15 vezes mais intenso, confirmando assim, a detecção pioneira dessa transição fraca, presumivelmente de natureza singlete-triplete.

SUMMARY

The reduction product of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) is converted into the hydration product NADH-X (6-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydronicotinamide adenine dinucleotide) by the action of polybasic ions such as phosphate, arsenate etc., or by enzymatic catalysis with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPD). The hydration kinetics were followed by the increase in absorbance at 285 nm. Starting with the β -anomer of the coenzyme, the transition at 285 nm begins to exhibit a positive Cotton effect only in the later stages of the reaction.

On the basis of the results, the formation of an intermediate not exhibiting a Cotton effect at 285 nm is postulated. Since the hydration would not be expected to change the configuration at C_1 , of the ribose, the appearance of the Cotton effect is presumably due to an epimerization from the β -epimer to the thermodynamically more stable α -epimer. In the absence of enzyme, the Cotton effect appears at somewhat lower conversions, suggesting that the slower hydration reaction provides greater opportunity for the occurrence of the epimerization.

The increase in absorbance at 285 nm is more rapid for the hydration of the α -anomer of NADH than for the β -form in the presence of GPD. A positive Cotton effect is only observed for the former after the reaction has gone to about 60% completion. This indicates that an intermediate not exhibiting a Cotton effect is also formed in the case of α -NADH. Similar behavior was observed in the non-enzymatic hydration, however, as in the case of β -NADH, the onset of the Cotton effect occurred at lower conversions.

The fact that GPD and polybasic ions produce similar effects on both the α and β anomers suggests that the enzymatic action of GPD is non-stereospecific, producing a mixture of epimers at C_6 . This also explains the absence of a Cotton effect even though significant hydrations have occurred.

Thus we conclude (i) that the intermediate is a mixture of C_6 epimers and (ii) that the more thermodynamically stable epimer predominates at long reaction times.

The same studies were carried out with NADPH, deamino-NADH and NMNH to clarify the catalytic influence of the phosphate, amino, and sugar groups on the hydration and to identify the centers responsible for the positive Cotton effect at 285 nm in pyridine nucleotides. The observation that the behavior of NADPH is similar to that of β -NADH indicates

that the phosphate group does not play an important role in the chemical and enzymatic catalysis.

In the case of NMNH and deamino-NADH there is no significant difference between the rates of the chemical and enzymatic hydration, which implies that the presence of the amino group of adenine is important in the enzymatic catalysis of the hydration of NADH. The above derivatives also present positive Cotton effects in the later stages of the reaction. Since that mononucleotide exhibits a positive Cotton effect of intensity equal to that of the dinucleotides, it can be concluded that the sugar attached to the nicotinamide ring is responsible for the asymmetry of the product.

The previously unknown circular dichroic absorption spectrum of 1,6-NADH was determined in order to gain insight into its structure. From the values of the molar ellipticity it is concluded that the asymmetric center of 1,6-NADH is more rigid than that of 1,4-NADH. This is presumably due to a greater hindrance to rotation about the single bond between the pyridine and ribose rings in 1,6-NADH.

A circular dichroic study of the addition of CN^- to pyridine nucleotides and related compounds demonstrated the stereoselectivity of the addition. The circular dichroic absorption spectrum of the $\beta\text{-NAD}^+/\text{CN}^-$ adduct exhibits a broad

assymmetric negative band with a maximum at about 330 nm. This band was interpreted in terms of two bands of similar intensity with maxima at 325 and 345 nm. By analogy with the reduction of pyridine nucleotides, which occurs at position 2,4 and 6, it is concluded that CN^- addition also occurs at positions other than C_4 . The band at 345 nm was attributed to the 1,6-isomer. The fact that this isomer could not be detected by conventional absorption techniques indicates that it is present in low concentrations relative to the 1,4-isomer. It must have therefore has a much greater rotational strength, which is reasonable in view of the proximity of the CN^- to the carbohydrate ring.

The circular dichroic absorption spectrum of the $\alpha\text{-NAD}^+/\text{CN}^-$ adduct exhibited a negative band with a maximum at 342 nm and an inflection at 325 nm. This assymetry clearly demonstrated the presence of two isomers and the stereoselectivity of CN^- addition at C_6 . Although the 1,6-adduct could not be detected by conventional absorption techniques, the stereoselectivity of the addition and a large rotational strength contribute to its circular dichroic intensity.

The stereoselectivity of the CN^- addition corroborates the existence of a rapid conformational equilibrium between the

folded and unfolded forms of pyridine nucleotides.

A Cotton effect associated with the weak electronic transition attributed to the dihydronicotinamide nucleus was observed for α -NADH, β -NADH, and the corresponding CN^- adducts, confirming the existence of the transition. For the β -NADH. Cu^{++} complex, the Cotton effect was found to be 15 times more intense, thus confirming the original detection of this weak transition, which presumably has singlet-triplet character.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIVISATOS, S.G.A.; UNGAR, F. e ABRAHAM, G. (1964) - Nature 203, 973-975.
- ALIVISATOS, S.G.A.; UNGAR, F. e ABRAHAM, G. (1965) - Biochemistry 4, 2616-2630.
- ALWORTH, W.L. in the "Stereochemistry and its Applications in Biochemistry" by John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., (1972), p. 49.
- ANDERSON, B.M. e ANDERSON, C.D. (1963) - J. Biol. Chem. 238, 1475-1478.
- ANDERSON, B.M.; REYNOLDS, M.L. e ANDERSON, C.D. (1965) - Arch. Biochem. Biophys. 111, 202-205.
- ANDERSON, JR., A.G. e BERKELHAMMER, G. (1958) - J. Am. Chem. Soc. 80, 992-999.
- BACHUR, N.R. e KAPLAN, N.O. (1955) - Bact. Proc. 116.
- BAPTISTA, R.C., Tese de doutoramento apresentada a Universidade de São Paulo (1972).
- BAPTISTA, R.C. e CILENTO, G. (1971) - Spectrochim. Acta 27A, 2277-2279.
- BAPTISTA, R.C.; FALJONI, A. e CILENTO, G. (1976) - Photochem. Photobiol., no prelo.
- BEAR, C.A.; CULLEN, W.R.; KUTNEY, J.P.; RIDAURA, V.E.; TROTTER, J. e ZANAROTTI, A. (1973) - J. Am. Chem. Soc. 95, 3058-3060.

- BIRDSALL, B.; BIRDSALL, N.J.M.; FEENEY, J. e THORTON, J.
(1975) - J. Am. Chem. Soc. 97, 2845-2850.
- BRAUN, R.D.; SANTHANAM, K.S.V. e ELVING, P.J. (1975) -
J. Am. Chem. Soc. 97, 2591-2598.
- BURNETT, J.N. e UNDERWOOD, A.L. (1965) - Biochemistry 4,
2060-2064.
- BURTON, R.M. e KAPLAN, N.O. (1963) - Arch. Biochem. Biophys.
101, 139-149.
- BYERS, W.; CURZON, G.; GARBETT, K.; SPEYER, B.E.; YOUNG,
S.N. e WILLIAMS, R.J.P. (1973) - Biochim. Biophys. Acta
310, 38-50.
- CAHN, R.S.; INGOLD, C. e PRELOG, V. (1966) - Angew. Chem.
Intern. Ed. Engl. 5, 385-415.
- CATTERALL, W.A.; HOLLIS, D.P. e WALTER, C.F. (1969) -
Biochemistry 8, 4032-4036.
- CHAKRAVERTY, K. e CHAYKIN, S. (1964) - Biochem. Biophys.
Res. Comm. 15, 262-268.
- CHAKRAVERTY, K.; KING, L.; WATSON, J.G. e CHAYKIN, S. (1969) -
J. Biol. Chem. 244, 4208-4217.
- CHAYKIN, S. (1967) - Ann. Rev. Biochem. 36, 149-170.
- CHAYKIN, S.; CHAKRAVERTY, K.; KING, L. e WATSON, J.G. (1966b) -
Biochem. Biophys. Acta 124, 1-12.
- CHAYKIN, S.; DAGANI, M.; JOHNSON, L.; SAMLI, M. e BATTAILE, J.
(1965) - Biochim. Biophys. Acta 100, 351-365.

- CHAYKIN, S.; KING, L. e WATSON, J.G. (1966a) - Biochim. Biophys. Acta 124, 13-25.
- CHAYKIN, S.; MEINHART, J.O. e KREBS, E.G. (1956) - J. Biol. Chem. 220, 811-820.
- CHAYKIN, S. e MEISSNER, L. (1964) - Biochem. Biophys. Res. Comm. 14, 233-240.
- CILENTO, G. e SANIOTO, D.L. (1965) - Arch. Biochem. Biophys. 110, 133-136.
- CILENTO, G.; SANIOTO, D.L. e ZINNER, K. (1968) - Spectrochim. Acta 24A, 785-786.
- COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O. e CIOTTI, M.M. (1951) - J. Biol. Chem. 191, 447-459.
- CROSS, D.G. e FISHER, H.F. (1969) - Biochemistry 8, 1147-1155.
- CZERLINSKI, G. e HOMMES, F. (1964) - Biochim. Biophys. Acta 79, 46-50.
- DIEKMANN, H.; ENGLERT, G. e WALLENFELS, K. (1964a) - Tetrahedron 20, 281-291.
- DIEKMANN, H.; HOFMANN, D. e WALLENFELS, K. (1964b) - Ann. Chem. 674, 79-87.
- DIJKGRAAF, C. (1963) - Nature 198, 660-661.
- DIXON, M. (1955) - Methods in Enzymology 1, 444-449.
- EGAN, W.; FORSÉN, S. e JACOBUS (1975) - Biochemistry 14, 735-742.
- EL-SAYED, M.A. (1964) - J. Chem. Phys. 41, 2462-2467.

- EVANS, B. e WOLFENDEN, R. (1972) - J. Am. Chem. Soc. 94, 5902-5903.
- FISHER, H.F.; OFNER, P.; CONN, E.E.; VENNESLAND, B. e WESTHEIMER, F.H. (1952) - Fed. Proc. 11, 211.
- FOSTER, R. e FYFE, C.A. (1969) - Tetrahedron 25, 1489-1496.
- GERLACH, D.; PFLEIDERER, G. & HOLBROOK, J.J. (1965) - Biochem. Z. 343, 354-359.
- GOMORI, G. (1955) - Methods in Enzymology 1, 138-146.
- GUTMAN, M.; MARGALIT, R. e SCHEFTER, A. (1968) - Biochemistry 7, 2778-2785.
- HAAS, E. (1936) - Biochem. Z. 288, 123-125.
- HILVERS, A.G.; WEENEN, J.H.M. e VAN DAM, K. (1966) - Biochim. Biophys. Acta 128, 74-81.
- HOIJTINK, G.J. (1960) - Mol. Phys. 3, 67-70.
- HUENNEKENS, F.M.; BASFORD, R.E. e GABRIO, B.W. (1955) - J. Biol. Chem. 213, 951.
- JACOBUS, J. (1971) - Biochemistry 10, 161-164.
- JARDETZKY, O. e WADE-JARDETZKY, N.G. (1966) - J. Biol. Chem. 241, 85-91.
- JOHNSON, S.L. e MORRISON, D.L. (1970a) - J. Biol. Chem. 245, 4519-4524.
- JOHNSON, S.L. e MORRISON, D.L. (1970b) - Biochemistry 9, 1460-1470.
- KAPLAN, N.O., in "The Enzymes", 3, 105-169 (BOYER, P.D.; LARDY, L. e MYRBÄCK, K., Eds., Academic Press, New York, N.Y. (1960)).

- KAPLAN, N.O.; COLOWICK, S.P. e BARNES, C.C. (1951) - J. Biol. Chem. 191, 461-472.
- KARLE, I.L. (1961) - Acta Cryst. 14, 497.
- KARRER, P.; KAHNT, F.W.; EPSTEIN, R.; JAFFÉ, W. e ISHII, T. (1938) - Helv. Chim. Acta 21, 223-236.
- KARRER, P.; SCHWARZENBACH, G.; BRENZ, F. e SOLMSEN, U. (1936) - Helv. Chim. Acta 19, 811-828.
- KEARNS, D.R. e CASE, W.A. (1966) - J. Am. Chem. Soc. 88, 5087-5097.
- KONO, T. e SUEKANE, M. (1958) - Bull. Chem. Soc. Japan 22, 404-410, extraído de CHAYKIN, S. (1967) - Ann. Rev. Biochem. 36, 149-170.
- KORNBERG, A. (1955) - Methods in Enzymology 1, 441-443.
- KREBS, E.G. (1955) - Methods in Enzymology 1, 407-411.
- LINDQUIST, R.N. e CORDES, E.H. (1968) - J. Am. Chem. Soc. 90, 1269-1274.
- LUDOWIEG, J. (1962) - Abstracts of Papers Presented at Washington, The Division of Biological Chemistry of the American Chemical Society, March 21-24, p. 54c.
- LUDOWIEG, J. e LEVY, A. (1964) - Biochemistry 3, 373-378.
- LYLE, R.E. e GAUTHIER, G.J. (1965) - Tetrahedron Letters 51, 4615-4621.
- MATHEWS, M.B. e CONN, E.E. (1953) - J. Am. Chem. Soc. 75, 5428-5430.

- MCDONALD, G.; BROWN, B.; HOLLIS, D. e WALTER, C. (1972) - Biochemistry 11, 1920-1930.
- MEINHART, J.O. e CHAYKIN, S. (1955) - Federation Proc. 14, 99, extraído de MILES e col. (1968).
- MEINHART, J.O.; CHAYKIN, S. e KREBS, E.G. (1956) - J. Biol. Chem. 220, 821-829.
- MEYER, W.L.; MAHLER, H.R. e BAKER JR., R.H. (1962) - Biochim. Biophys. Acta 64, 353-358.
- MEYHOF, O.; OHLMEYER, P. e MOHLE, W. (1938) - Biochem. Z. 297, 113, extraído de GERLACH (1965).
- MILES, D.W. e URRY, D.W. (1968a) - J. Biol. Chem. 243, 4181-4188.
- MILES, D.W. e URRY, D.W. (1968b) - Biochemistry 7, 2791-2799.
- MILES, D.W.; URRY, D.W. e EYRING, H. (1968) - Biochemistry 7, 2333-2338.
- NEILANDS, J.B. (1955) - Methods in Enzymology 1, 449-454.
- OKUBO, T. e ISE, N. (1973) - J. Am. Chem. Soc. 95, 4031-4036.
- OPPENHEIMER, N.J. (1973) - Biochem. Biophys. Res. Comm. 53, 683-690.
- OPPENHEIMER, N.J.; ARNOLD, L.J. e KAPLAN, N.O. (1971) - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 3200-3205.
- PATEL, D.J. (1969) - Nature 221, 1239-1241.
- PFLEIDERER, G. e STOCK, A. (1962) - Biochem. Z. 336, 56-61.
- PULLMAN, M.E.; SAN PIETRO, A. e COLOWICK, S.P. (1954) - J. Biol. Chem. 206, 129-141.

- RAFTER, G.W.; CHAYKIN, S. e KREBS, E.G. (1954) - J. Biol. Chem. 208, 799-811.
- REGUEIRO VARELA, B.; AMELUNXEN, R. e GRISOLIA, S. (1970) - Physiol. Chem. Phys. 2, 445-454.
- SAN PIETRO, A.; KAPLAN, N.O. e COLOWICK, S.P. (1955) - J. Biol. Chem. 212, 941-952.
- SARMA, R.H.; DANNIES, P. e KAPLAN, N.O. (1968a) - Biochemistry 7, 4059-4067.
- SARMA, R.H. e KAPLAN, N.O. (1969) - Biochem. Biophys. Res. Comm. 36, 780-788.
- SARMA, R.H. e KAPLAN, N.O. (1970a) - Biochemistry 9, 539-548.
- SARMA, R.H. e KAPLAN, N.O. (1970b) - Biochemistry 9, 557-564.
- SARMA, R.H. e KAPLAN, N.O. (1970c) - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 67, 1375-1382.
- SARMA, R.H.; MOORE, M. e KAPLAN, N.O. (1970d) - Biochemistry 9, 549-556.
- SARMA, R.H. e MYNOTT, R.J. (1973) - J. Am. Chem. Soc. 95, 1641-1649.
- SARMA, R.H.; ROSS, V. e KAPLAN, N.O. (1968b) - Biochemistry 7, 3052-3062.
- SCHIRMER, R.E.; DAVIS, J.P.; NOGGLE, J.H. e HART, P.A. (1972) - J. Am. Chem. Soc. 94, 2561-2572.
- SHIFRIN, S. e KAPLAN, N.O. (1959) - Nature 183, 1529.

- STOCK, A.; SANN, E. e PFLEIDER, G. (1961) - Ann. Chem. 647, 188-219, extraído de MILES e col. (1968).
- SUND, H.; DIEKMANN, H. e WALLENFELS, K. in "Advances in Enzymology" 26, 115-191 (NORD, F.F., Ed., Interscience Publishers, New York, N.Y., 1964).
- VELICK, S.F. in "Light and Life" (McELROY, W.D. e GLASS, B., Eds., The Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1961), p. 108.
- VON EULER, H.; SCHLENK, F.; HEIWINKEL, H. e HOGBERG, B. (1938) - Z. Physiol. Chem. 256, 208, extraído de MILES e col. (1968).
- WALLENFELS, K.; HOFMANN, D. e SCHUELY, H. (1959) - Ann.Chem. 621, 188, extraído de MILES e col. (1968).
- WARBURG, O. e CHRISTIAN, W. (1934) - Biochem. Z. 274, 112-116.
- WEIGANG JR., O.E. (1962) - J. Chem. Phys. 37, 673-674.
- WILLIAMS, T.J.; ZENS, A.P.; WISOWATY, J.C.; FISHER, R.R.; DUNLAP, B.R.; BRYSON, T.A. e ELLIS, P.D. (1976) - Arch. Biochem. Biophys. 172, 490-501.
- YUSTER, P. e WEISSMAN, S.I. (1949) - J. Chem. Phys. 17, 1182-1188.
- ZENS, A.P.; WILLIAMS, T.J.; WISOWATY, J.C.; FISHER, R.R.; DUNLAP, R.B.; BRYSON, T.A. e ELLIS, P.D. (1975) - J. Am. Chem. Soc. 97, 2850-2857.