

ORIETA SILVEIRA

ASPECTOS DO METABOLISMO OXIDATIVO EM RIM DE SUÍNO

Tese de mestrado em Bioquímica  
apresentada ao Instituto de  
Bioquímica da Universidade Fe-  
deral do Paraná.

CURITIBA

-1968-

O presente trabalho foi realizado com bolsa do  
**CONSELHO NACIONAL DE PESQUISAS** (T. C. 8540)

CONTEÚDO

I - INTRODUÇÃO.....	1
II - MATERIAL E MÉTODOS.....	6
III - RESULTADOS.....	8
IV - DISCUSSÃO.....	14
V - CONCLUSÕES.....	17
VI - SUMÁRIO.....	18
VII - AGRADECIMENTOS.....	18
VIII - BIBLIOGRAFIA.....	19

## I - INTRODUÇÃO

O metabolismo oxidativo dos ácidos orgânicos do ciclo de Krebs é um problema que vem despertando o interesse de inúmeros investigadores. A ocorrência de algumas reações em tecidos musculares vem sendo estudado desde 1911, quando Battelli e Starn (1) demonstraram a oxidação de citrato, succinato, fumarato e malato em músculo de rã. Alguns anos mais tarde Martins e Knoop (2) revelaram o mecanismo da conversão do citrato em succinato.

O estímulo respiratório com adição de catalizadores foi primeiramente observado por Szent-Györgyi (3) em 1935 e definitivamente comprovado por Stare e Baumann (4) e Stare (5).

Em 1936, Stare (5) realizou estudos químicos e manométricos do efeito do fumarato na respiração de tecidos renal e hepático, verificando que o fumarato produzia aumento no consumo de  $O_2$  por êsses tecidos, enquanto o malonato inibia a respiração normal. Entretanto, a adição de quantidade adequada de fumarato revertia a inibição provocada por malonato. Estes resultados foram confirmados por Krebs e Eggleston (6) alguns anos mais tarde, utilizando fatias de músculo do peito de pombo.

Por estimações químicas quantitativas foi demonstrado que o fumarato adicionado ao tecido renal e hepático é oxidado para oxaloacetato. Do mesmo modo o ácido oxalo acético a-

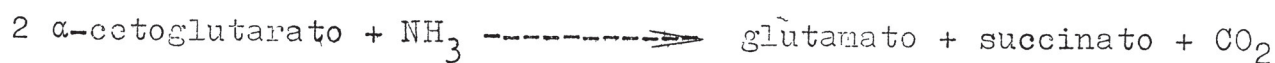
dicionado a êsses tecidos é reduzido, o que foi indicado pelo rápido desaparecimento do mesmo e o aparecimento simultâneo da mesma quantidade de fumarato-malato em mistura equilibrada. Estes fatos sugerem que a teoria da catálise fumárica da respiração estabelecida por Szent-Györgyi et al (7), para tecido muscular é também aplicada para tecido hepático e renal.

Também Innes (8) no mesmo ano verificou que o consumo extra de  $O_2$  por fatias de músculo, quando o ácido fumárico era acrescentado, era responsável pela oxidação do fumarato. Em concentrações equivalentes o fumarato parece ser oxidado em preferência ao ácido láctico. Os resultados sugerem que sob essas condições o fumarato era usado como substrato para respiração e não para a oxidação catalítica de outros substratos, como sugeriu Szent-Györgyi.

Ainda em 1936, Krebs (9) descreveu o sistema que cataliza a oxidação do ácido  $\beta$ -hidroxibutírico a aceto-acético e a formação do ácido succínico a partir do pirúvico, via óxido-redução anaeróbica.

Krebs e Johnson (10) em 1937, estabeleceram definitivamente a existência do ciclo dos ácidos Tri Carboxílicos em animais, plantas e microrganismos. Contudo as investigações não pararam aí e os estudos tiveram prosseguimento em diferentes órgãos ou tecidos.

Krebs e Cobreu (11), trabalhando com fatias de córtex renal e músculo cardíaco, verificaram que os sais de amônio aumentavam cataliticamente a taxa de oxidação de  $\alpha$ -cetoglutarato.



Esta reação é provavelmente uma etapa na sequência oxidativa normal do  $\alpha$ -ceto ou daquelas substâncias que dão  $\alpha$ -cetogluturato.

Em 1945, Breusch (12) descobriu a citrogênase catalizando a formação do ácido cítrico para ácido oxálico e ácidos graxos. De acordo com o mecanismo proposto, os ácidos graxos e ácido oxaloacético condensar-se-iam para formar um composto intermediário, que sofreria hidrólise para formar o ácido cítrico e um ácido graxo, com perda de dois átomos de carbono. Os carbonos removidos de ácido graxo apareceriam no ácido cítrico e seriam metabolizados em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , via ácido cítrico ou ciclo dos ácidos tri carboxílicos. O ácido oxaloacético seria regenerado e o processo repetido tão frequentemente quanto ocorresse a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos.

Independentemente, Wieland e Rosenthal (13), publicaram descoberta semelhante à de Breusch com respeito ao ácido oxaloacético e Martius (14) confirmou parcialmente àquelas descobertas. Entretanto Weil-Malharbe, Krebs e Eggleston (15) informaram não terem encontrado evidência da existência da citrogênase metabolizando ácido acetoacético. As observações da formação do ácido cítrico do ácido acetoacético e do oxaloacético para o tecido renal, foram confirmados.

Cutting, Hargory e Cance (16) em 1946 realizaram

estudos metabólicos em fatias de rim de suíno, de gato e em embriões humanos levando em consideração o gasto de  $O_2$  das fatias de rim em relação a idade do animal (recém-nascido e adulto).

Ching Tseng Teng (17) em 1954 estudou o metabolismo do glicerol e piruvato em fatias de fígado de rato, em condições aeróbicas; ao mesmo tempo Kaland e Young (18), descreveram algumas observações metabólicas de células de fígado isoladas, tendo comprovado que independentemente do método de preparação, as células de fígado (tanto fatias, como suspensões), apresentavam  $QO_2$  igual em succinato.

Trabalhando com cortex renal de mamíferos, Hudge, Wuttman e Davies (19) constataram que o acúmulo intratissular de íons  $K^+$  e expulsão de íons  $Na^+$  era estreitamente dependente de uma intensidade respiratória normal; sendo o rim um tecido eletricamente não excitável, realizaram estudos da distribuição de eletrólitos em função do  $QO_2$ , utilizando-se fatias de córtex renal de cobaia, afim de comparar os resultados aos obtidos dos tecidos excitáveis (cortex cerebral, retina).

Rochman et al (20) verificaram que fatias de rim de rato conservadas por 6 horas à  $4^{\circ}C$  consumiam oxigênio com velocidade semelhante às fatias obtidas imediatamente após o sacrifício dos animais. Entretanto, o consumo de oxigênio caía 22 e 32% respectivamente, após 12 ou 24 horas de conservação das fatias à  $4^{\circ}C$ . As experiências manométricas foram realizadas à  $38^{\circ}C$ .

As experiências respirométricas realizadas por William et al (21) com homogenado do cortical de rim, adicionado de Mg e ATP, à 37°C por período de 45 minutos, mostraram maior oxidação para succinato, fumarato e citrato, sendo inferior quando os substratos eram  $\alpha$ -cetoglutatarato e malato.

Vianna e Brandão (22) verificando o efeito de fenotiazínicos e de anti histamínicos não fenotiazínicos na respiração de tecido renal, utilizando respirômetro de Warburg, obtiveram  $QO_2$ , na ausência das drogas citadas, para o endógeno em torno de 8,81, para  $\alpha$ -cetoglutatarato 8,73 e succinato 12,12.

O presente trabalho apresenta os resultados do estudo do consumo de oxigênio para a utilização de alguns substratos do ciclo de Krebs em fatias de rim de suíno normal. Foi feito um estudo comparativo entre as camadas medular e cortical de rim.

## II - MATERIAL E MÉTODOS

O material foi coletado no frigorífico Catci. Suínos machos com pêsos médio entre 90 e 110 Kg., com 10 a 12 meses de idade, foram sacrificados por perfuração cardíaca, entre 7 e 9 horas da manhã. Os rins foram retirados e imediatamente colocados em Ringer-fosfato com temperatura em torno de 0°C. Transportado ao laboratório, o material foi transferido para um copo contendo Ringer-fosfato, parcialmente imerso em gelo pilado, afim de manter a temperatura baixa, e foram rigorosamente separadas as camadas cortical e medular de cada rim. Para cada experiência foram empregados dois rins de um mesmo animal. O material foi rejeitado sempre que apresentou qualquer indício de anormalidade.

As fatias de tecido foram obtidas com o aparelho descrito por Vianna (23), possibilitando a obtenção de material homogêneo, com espessura inferior a 1mm. As fatias de cortical e medular foram colocadas isoladamente em placas de Petri, contendo Ringer-fosfato, em superfície de gelo e continuamente aeradas.

Reativos: O Ringer-fosfato foi preparado de acordo com Krebs e Hanselcit (24) segundo a modificação de Barron et al. (25), adicionando-se a 80 ml da solução de Ringer, 20 ml de solução tampão fosfato, pH 7,48 de Sørensen.

A solução de Ringer continha 876 ml de

NaCl 0,154 M; 26ml de KCl 0,154 M; 10 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,11M e 5ml de  $\text{Hg SO}_4$  0,154M.

O tampão fosfato continha  $\text{Na}_2\text{H PO}_4$  0,1 M e  $\text{H}_2\text{KPO}_4$  0,1M em proporções suficientes para oferecer pH de 7,43. O pH foi determinado antes de cada experiência, usando-se potenciômetro Beckman, modelo Zeromatic II. A solução de Ringer e o tampão fosfato foram misturadas no momento do uso.

O consumo de oxigênio por fatias, foi avaliado pela técnica clássica de Warburg. O sistema continha fatias de tecidos; 2,5 a 2,7 ml de Ringer-fosfato; 10  $\mu$ moles de substrato e 0,15 ml de KOH a 20%, que foi colocado no poço central do frasco de Warburg, acrescentado de uma tira de papel de filtro. Os substratos utilizados foram: citrato, isocitrato, malato, fumarato, piruvato, succinato,  $\alpha$ -ceto-glutarato e cis-aconitato.

A determinação de peso seco foi feita mantendo-se as fatias de tecido, colhidas ao fim de cada experiência, em estufa à 100°C, até peso constante.

Os produtos químicos usados neste trabalho eram todos pró-análise.

Com os dados originais foi feita uma análise de Variância seguindo o esquema fatorial 9 x 2 x 4.

### III - RESULTADOS

A tabela I mostra os dados relativos a consumo de oxigênio expresso em  $\mu\text{l}$  de  $\text{O}_2$  por mg. de peso sêco de fatias de cortical de rim, usando-se 10  $\mu\text{moles}$  de substrato por frasco. Os dados numéricos dessa tabela correspondem as médias de dezessete (17) repetições.

TABELA I

Consumo de oxigênio por fatias de cortical de rim. ( $\mu\text{l}$  de  $\text{O}_2/\text{mg}$  de peso sêco).

Substratos	30'	60'	90'	120'
Endógeno	2,66	4,51	6,12	8,13
Citrato	2,67	4,78	6,70	8,54
Isocitrato	2,42	4,38	6,42	8,12
Malato	2,51	4,88	7,05	8,97
Fumarato	2,61	2,71	6,71	8,85
Piruvato	2,15	3,92	5,79	7,54
Succinato	4,43	6,90	9,16	11,09
$\alpha$ -cetogluturato	2,87	5,25	7,59	9,71
Cis-aconitato	2,26	5,66	6,21	7,74

Sistema: fatias de cortical de rim em 2,5 ml de Ringer-fosfato pH 7,48; 0,2 ml de solução contendo 10  $\mu\text{moles}$  de substrato; 0,15 ml de KOH a 20%. Volume final = 2,85, ajustado quando necessário com Ringer-fosfato. Temperatura 37°C. Agitações: 100 p.m. Fase gasosa:- Ar atmosférico.

A tabela II mostra consumo de oxigênio expresso em  $\mu\text{l}$  de  $\text{O}_2$  por mg de peso sêco de fatias da camada medular de rim. Os dados numéricos correspondem às médias de dezessete (17) repetições.

TABELA II

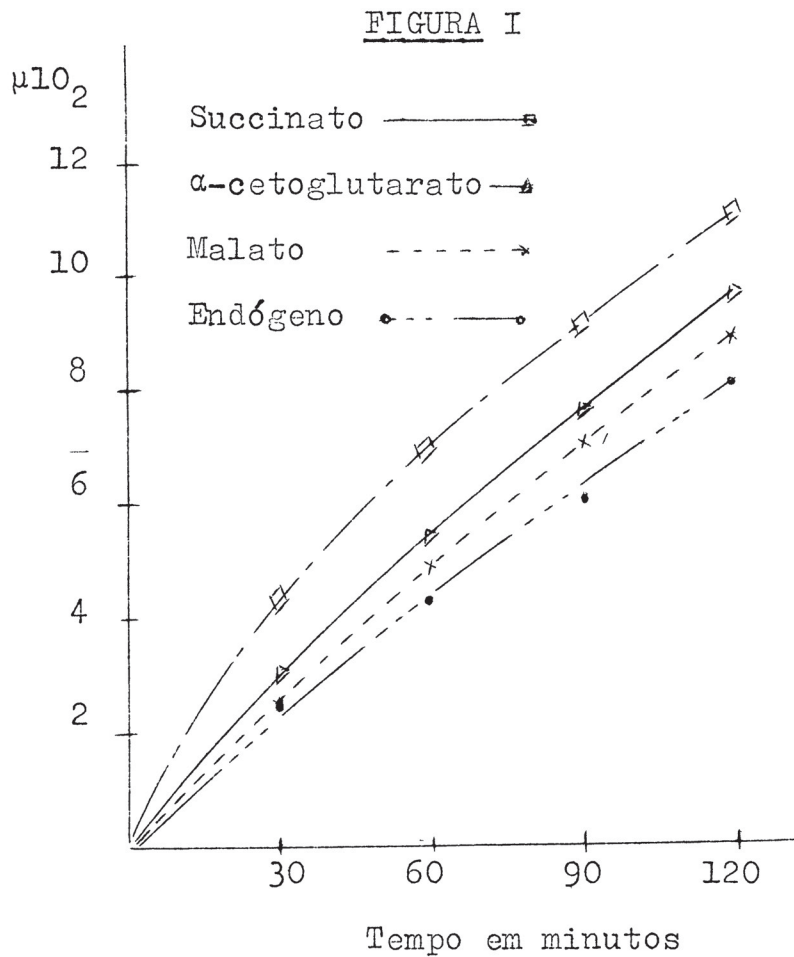
Consumo de oxigênio por fatias de medular de rim. ( $\mu\text{l}$  de  $\text{O}_2/\text{mg}$  de peso sêco)

Substratos	30'	60'	90'	120'
Endógeno	1,67	2,92	4,48	5,91
Citrato	1,45	2,53	4,10	5,46
Isocitrato	1,51	2,79	4,24	5,47
Malato	1,40	3,13	4,97	6,65
Fumarato	1,44	2,88	4,34	5,72
Piruvato	1,32	2,92	4,31	5,71
Succinato	4,22	7,60	9,89	11,90
$\alpha$ -cetoglutarato	1,50	3,37	5,04	6,75
Cis-aconitato	1,42	2,75	4,33	5,82

Sistema: fatias de medular de rim em 2,5ml de Ringer-fosfato, pH 7,48; 0,2 ml de solução contendo 10  $\mu\text{moles}$  de substrato; 0,15 ml de solução K $\text{HO}$  a 20%. Volume final= 2,85 ml, ajustado quando necessário com Ringer-fosfato. Temperatura = 37°C. Agitações = 100 por minuto. Fase gasosa: ar atmosférico.

FIGURA I

A figura I mostra consumo de oxigênio expresso em  $\mu\text{l}$  de  $\text{O}_2$  por mg de pêsso sêco de tecido cortical. Os valores correspondem aos dados da tabela I; para os seguintes substratos:  $\alpha$ -cetogluturato, malato, succinato e endógeno.

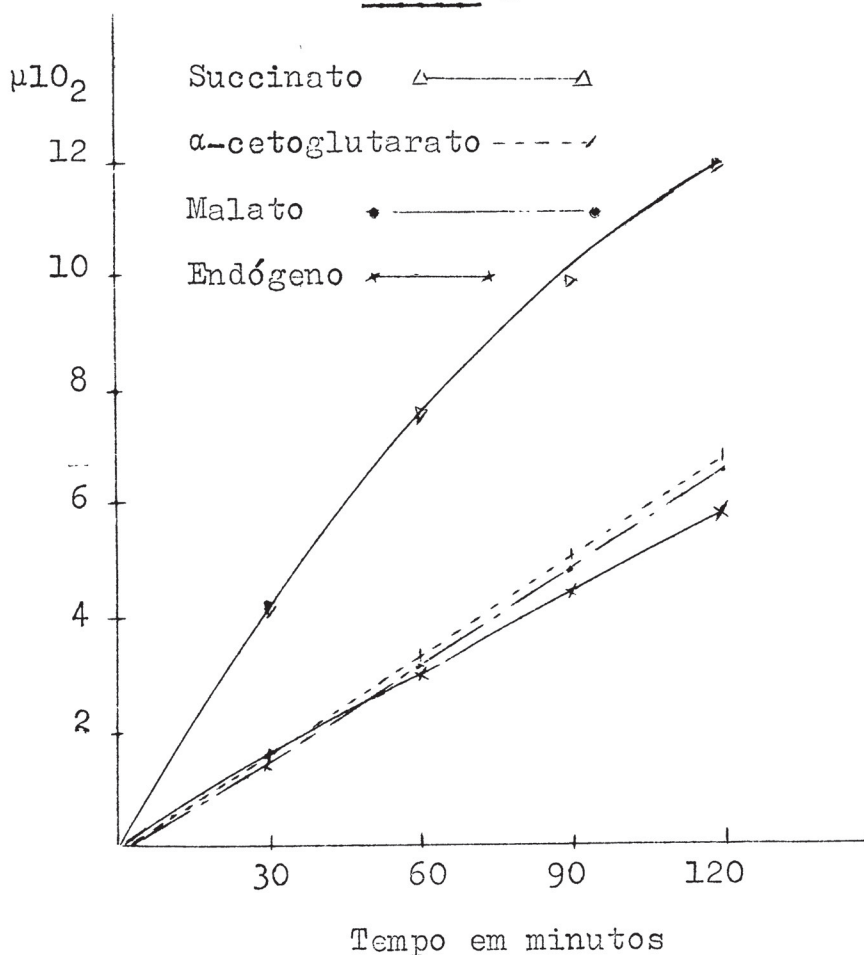


Sistema: Idêntico ao da tabela I.

FIGURA II

A figura II mostra consumo de oxigênio expresso em  $\mu\text{l}$  de  $\text{O}_2$  por mg de pêsô de tecido medular. Os valores correspondem aos dados da tabela II, para os seguintes substratos:  $\alpha$ -cetogluturato, malato, succinato e endógeno.

FIGURA 2



Sistema: Idêntico ao da tabela II.

Com os dados da tabela I e II foi feita uma análise de Variância, seguindo o esquema fatorial 9 X 2 X 4, cujos resultados constam na tabela III.

TABELA III.  
Análise da Variância

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Substratos (S)	8	94,19	11,77	107,00 **
Camadas (C)	1	45,92	45,92	417,45 **
Tempos (T)	3	289,28	96,43	876,64 **
Interação S X C	8	11,37	1,42	12,91 **
Interação S X T	24	6,73	0,28	2,55 *
Interação C X T	3	3,02	1,01	9,18 **
Resíduo (SxCxT)	24	2,59	0,11	
T o t a l	71	453,11		

\*\* - Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

\* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

As médias dos substratos afetados de um erro padrão da média,  $S(\hat{m}) = 0,12 \text{ QO}_2$  foram:

Citrato.....	4,53	Succinato.....	8,15
Isocitrato.....	4,42	$\alpha$ -cetogluturato.....	5,26
Malato.....	4,94	Cis-aconitato.....	4,52
Fumarato.....	4,58	Piruvato.....	4,21
Endógeno.....	4,55		

A diferença mínima significativa, calculada pelo método de Tuckey ao nível de 1% de probabilidade foi  $\Delta = 0,68$ .

As médias das camadas, ambas afetadas de um erro padrão da média  $s(\hat{m}) = 0,55 \text{ QO}_2$  foram:

Cortical.....	5,82	Medular.....	4,22
---------------	------	--------------	------

A diferença mínima significativa, calculada pelo método de Tuckey ao nível de 1% de probabilidade foi  $\Delta = 0,22$ .

As médias de tempos, todas afetadas de um erro padrão da média  $s(\hat{m}) = 0,78 \text{ QO}_2$  foram:

30'.....	2,25	90'.....	5,97
60'.....	4,22	120'.....	7,64

A diferença mínima significativa, calculada pelo método de Tuckey, ao nível de 1% de probabilidade foi  $\Delta = 0,38$ . O coeficiente de variação foi C.V. = 6,60%.

IV - DISCUSSÃO

Os dados respirométricos das preparações de rim confirmaram os efeitos anteriormente registrados por Rochman et al (20) de que não havia alteração na velocidade do consumo de oxigênio, podendo o material ser mantido até 6 horas a 4°C. Os resultados obtidos com material recém-colhido e após 5 horas, mantido a 0°C e aerado, foram aproximadamente os mesmos.

TABELA IV

Substratos	<u>recém colhido</u>				<u>5 hrs.após a coleta</u>			
	30'	60'	90'	120'	30'	60'	90'	120'
Endógeno	3,12	5,72	7,89	9,92	3,50	5,20	6,90	8,40
Glutarato	3,04	6,08	9,12	11,28	3,36	7,75	8,59	10,84
Malato	2,85	5,58	8,23	10,20	2,94	5,26	7,32	9,10
Succinato	6,63	11,78	14,21	16,52	8,00	12,35	15,52	17,76

Com os dados da tabela IV, expressos em  $QO_2$ , foi feita uma análise estatística.

As médias das Determinações, afetadas de um Erro padrão da média  $s(\hat{m}) = 0,11 QO_2$  foram:

5 h. após a coleta = 8,30 - Recém colhido = 8,26.

Conclue-se que não há diferença significativa entre as médias de determinações.

Trabalhando com rim de rato, cortical e medular indiscriminadamente, Vianna e Bradão (22) encontraram valores para succinato e endógeno que correspondem a aproximadamente o  $\frac{1}{2}$  do valor encontrado neste trabalho, quando se empregava cortical.

Os dados apresentados na Tabela I mostram que fatias da camada cortical apresentam oxidação superior à camada medular (Tabela II), com excessão do succinato, cuja velocidade do consumo de  $O_2$  da camada medular é mais elevado que o da cortical, principalmente levando-se em consideração o endógeno mais baixo. Estatisticamente essas diferenças são sensíveis ao nível 1%, estando ambas as camadas afetadas de um erro padrão da média igual a 0,55 de  $QO_2$ .

A cortical mantém um acréscimo de mais ou menos 2,0 de  $QO_2$  em cada 30 minutos, enquanto que a medular mantém um acréscimo de mais ou menos 1,5, sendo a probabilidade para a interação substratos x tempo significativa ao nível de 5% e camada x tempo ao nível de 1%. (Tabela III).

A oxidação do succinato, do  $\alpha$ -cetogluturato e do malato é significativa ao nível de 1%, diferindo da oxidação dos demais substratos do ciclo dos ácidos tri-carbóxicos, que apresentam um  $QO_2$  em torno do endógeno. Estes resultados confirmam os obtidos por William et al (21) que

trabalhando com homogenado de cortical de rim de cobaia obtiveram consumo de oxigênio bastante elevado em relação à êsses mesmos substratos. Empregando piruvato, êsses autores encontraram uma taxa em  $O_2$  bastante baixa, que está de acôrdo com àquela do presente trabalho. Os autores citados obtiveram consumo de oxigênio quando utilizavam fumarato e citrato como substratos, o que não foi confirmado nêste trabalho.

É interessante notar que os valores correspondentes ao citrato, isocitrato, fumarato, piruvato e cis-acnitato são semelhantes ao endógeno.

## V - CONCLUSÕES

1 - Os efeitos foram significativos ao nível de 1% de probabilidade para camadas, tempos e para as interações duplas de substratos x camadas, camadas x tempos e ao nível de 5% de probabilidade para a interação substratos x tempos.

2 - As médias de consumo de oxigênio para oxidar succinato e  $\alpha$ -cetogluturato diferem significativamente da média do endógeno.

3 - A média do succinato difere da do malato, as quais diferem das demais médias, porém a do  $\alpha$ -cetogluturato não difere da do malato.

4 - O consumo de oxigênio por fatias de medular e cortical de rim de suino diferem significativamente entre si. (Tabelas I e II).

5 - Todas as médias relativas aos tempos, diferem significativamente entre si.

6 - Estatisticamente não há diferença entre a velocidade de consumo de oxigênio entre o material recém colhido e após 5 horas mantido a 0°C com acração.

## VI - SUMÁRIO

Foi determinado o consumo de  $O_2$  por fatias de tecidos das camadas medular e cortical de rim de suino, frente a diversos intermediários do ciclo dos ácidos tricarbóxílicos.

Os resultados obtidos, foram analisados estatisticamente.

## VII - AGRADECIMENTOS

Aos componentes da Divisão de Bioquímica do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná e do Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, bem como ao seu DD. Diretor, Dr. Milton Giovannoni, pela colaboração prestada na execução desta tese.

Ao Prof. Dr. Annibal de Paiva Campello e Profa. Dra. Clotilde de Lourdes Branco, pela segura orientação, que nos permitiu realizar o presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz José Bove Kesikowski, pela realização dos trabalhos estatísticos.

VII - BIBLIOGRAFIA

- 1 - Battelli, F. e Stern, L. Biochem. Z., 31:478, 1911. In Metabolic Pathways, 1:131-132, 1960.
- 2 - Martius, C. e Knoop, F.Z. Physiol. Chem., Hoppe-Scyler's 246, 1 - 1937. In Metabolic Pathways, 1: 131-132, 1960.
- 3 - Szent-Györgyi, A.Z. Physiol. Chem., Hoppe-Scyler's 236: 1, 1935; 244: 105, 1936. In Metabolic Pathways, 1: 131-132, 1960.
- 4 - Starc, F.J. e Baumann, C.A. Effect of fumarate on respiration. Proc. Roy. Soc. (London), B 121: 338-57, 1936.
- 5 - Starc, F.J. The effect of fumarate on the respiration of liver and kidney tissue. Biochem. J. 30: 2257-61, 1936.
- 6 - Krebs, H.A. e Eggleston, L. Biochem. J. 33:442-59, 1940.
- 7 - Szent-Györgyi, Blazsóhaki e Straub - Hoppe-Scyl 2 244:105, 1936 in Biochem., 30, 2256, 1936.
- 8 - Innes, J. The role of C<sub>4</sub> Dicarboxylic acids in muscle respiration. Biochem. J. 30: 2040-8, 1936.
- 9 - Krebs, H.A. Intermediate Metabolism of Carbohydrate. Nature 138: 288-9, 1936.
- 10 - Krebs, H.A. e Johnson, W.A. Citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. Enzymologia, 4:148-56, 1937.

- 11 - Krebs, H.A. e Cobreu, P. Metabolism of  $\alpha$ -ketoglutaric acid in animal tissues. *Biochem. J.* 33: 1895-9, 1939.
- 12 - Hunter, F. Edmund e Leloir, Luiz F.--Citric acid formation from acetoacetic and oxalacetic acids. *J. Biol. Chem.* 159:295-310, 1945.
- 13 - Wieland, H. e Rosenthal, C. *Am. Chem.* 554:241,1943. In *J. Biol. Chem.* 159:295,1945.
- 14 - Martius, C.Z. *Physiol Chem.* 279:96,1945. In *J. Biol. Chem.* 159:295, 1945.
- 15 - Weil-Malherbe, H. *Nature*, 153: 435, 1944. Krebs, H.A. e Eggeston, L.V., *Nature* 154:209,1944. In *J. Biol. Chem.* 159:295,1945.
- 16 - Cutting, Margery e McCance, R.A. The metabolism of kidney slices from newborn and mature animals. *J. Physiol. London*, 105:205-14, 1946.
- 17 - Teng, Ching Tseng. Carbohydrate metabolism in rat-kidney slices. Metabolism of glycerol and pyruvate. *Arch. Biochem. Biophys.* 48: 409-14,1954.
- 18 - Kalant, H. e Youg, F.G. Metabolic behaviour of isolated liver and kidney cells. *Nature*, 179:816-17, 1957.
- 19 - Joanny, P.; Corriol, J. e Hillman, H. Oxygen consumption and alkali metal ion gradients of isolated

- mammalian renal cortex, J.Physiol, Paris,57:  
256-7,1965.
- 20 - Rochman, H.; Clark, P.B.;Lathe, G.H. e Parsons, F.M. The effect of temperature and anoxia of rat kidney slices on their subsequent respiration. Biochem. J.102:44-7,1967.
- 21 - Lotspeich, Wm. D.; Keller, Daniel M. e Woronkon, S. Some effects of phlorizin on the metabolism of kidney tissue in vitro. J. Biol. Chem.222: 843-53, 1956.
- 22 - Vianna, C.H.M. e Brandão, D. Efeito de fenotiazínicos e de antihistamínicos não fenotiazínicos na respiração de fatias de tecido. Ciência e Cultura, 14(4): 235,1962.
- 23 - Vianna, C.H.M. - Dispositivo para a obtenção de fatias de tecido para estudos respirométricos. XIV Reunião Anual da S.B.P.C. Curitiba, julho 1962.
- 24 - Krebs, H.A. e Henseleit, K. Die Bildung des Harnstoff in Tierrecher Gewebe Ztschr. für physiol Chem.210: 33,1932.
- 25 - Barron, E.S.G., Meyer, J. e Miller, Z.B. The metabolism of Skin. Effect of vesicant agents. J. Invest. Dermat, 11:97, 1948.