

KAZUKO MIYAGUI

METABOLISMO DE COENZIMAS Q

Tese de mestrado em Bioquímica apresentada ao Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA
1967

METABOLISMO DE COENZIMAS G

ORIENTADOR: prof. J.H.DUARTE

KAZUO MIYAGUI

- 1- Introdução
- 2- Nomenclatura
- 3- Química da coenzima Q
- 4- Investigação, determinação e identificação
- 5- Isolamento e purificação
- 6- Distribuição da coenzima Q
- 7- Biossíntese
- 8- Função bioquímica
- 9- Conclusão
- 10- Bibliografia

INTRODUÇÃO-

Em 1955, Festenstein et alii(1), isolaram várias frações lipídicas da mucosa intestinal de cavalo. Uma destas frações era sensível a álcali e apresentava faixas de absorção (em ciclohexano) em 272m μ , 330m μ e 400m μ . Um ano após, Morton(2) trabalhando com fígado de rato isolou uma substância que apresentava absorção espectroscópica semelhante ao composto de Festenstein. Posteriormente, Crane et alii(3), obtiveram pela primeira vez uma quinona cristalizada a qual estava correlacionada com o sistema de transporte de elétrons na cadeia respiratória. Esta substância recebeu a denominação de Q₂₇₅ e apresentava propriedades espectroscópicas semelhantes aos compostos acima citados. O estudo químico desta quinona foi realizado por vários autores(4,5,6,7) que estabeleceram a sua estrutura definitiva.

Embora Morton(8) e Green(9) tenham localizado a nova quinona em sistemas enzimáticos isolados do mitocôndria, a denominação de mitoquinona sugerida por Crane et alii(10) e Hatefi et alii(11) é imprópria em virtude desta quinona ter sido isolada de sistemas enzimáticos não particulados. O termo ubiquinona foi adotado por Morton(8) e o de coenzima Q pelo grupo de Wisconsin(3).

A finalidade deste trabalho foi de estudar as coenzimas em seus diversos aspectos quinônicos e fazer uma condensação da biossíntese deste composto.

NOMENCLATURA-

Em virtude da falta de padronização da nomenclatura das quinonas com uma cadeia isoprenóide, a International Union of Pure and Applied Chemistry(IUPAC) e a Commission on Biochemical Nomenclature da International Union of Biochemistry(IUB) designaram, em 1961, uma sub-comissão para estudar a padronização da nomenclatura destes compostos. Em 1964, a IUPAC e a IUB acataram as sugestões sobre a nomenclatura das quinonas apresentadas pela sub-comissão com certas restrições.

A sub-comissão discutiu os seguintes problemas:

- a) a designação do comprimento da cadeia lateral isoprenóide,
- b) os nomes triviais para cada grupo,
- c) a designação de membros individuais de cada grupo.

Para designar o comprimento da cadeia lateral isoprenóide, a base seria o número de unidades isoprenílicas em vez do número de átomos de carbono. E uma unidade isoprenílica seria denominada "prenil"..

Dificuldades foram encontradas pela IUPAC e IUB com respeito à designação dos membros individuais de cada grupo de quinona, em virtude do grupo de pesquisadores de duas escolas diferentes defenderem pontos de vista contrários a esse respeito. Uma escola(I) propõe que seja adotada para a vitamina E, vitamina K e a coenzima Q o nome genérico de tocoquinona e as suas abreviações seriam, respectivamente, E, K e Q.E, em relação às quinonas foi proposto ainda que os componentes desta série fossem designados com os nomes de quinona-n ou em sua forma abreviada Q-n. A letra "n" indicaria o número de uni-

dades isoprenóides. A outra escola (II) propôs a manutenção das letras E, Q e K como parte integrante do nome acompanhados do subscrito "n". Um resumo das duas propostas encontra-se abaixo descritos.

PROPOSIÇÃO	NOME	ABREVIACÃO
I	Ubiquinona	Q_n
II	Ubiquinona Q_n	Q_n

A comissão de nomenclatura reconheceu as duas propostas, embora considerasse a segunda como a menos desejável. Os nomes comuns recomendados e as abreviações para algumas ubiquinonas estão abaixo exemplificados:

NOME COMUM	PROPOSIÇÃO I		PROPOSIÇÃO II	
	NOME	ABREV.	NOME	ABREV.
Ubiquinona-50 Coenzima- Q_{10}	Ubiquinona-10	Q_{10}	Ubiquinona Q_{10}	Q_{10}
Ubiquinona-30 Coenzima- Q_6	Ubiquinona-6	Q_6	Ubiquinona Q_6	Q_6

Química da coenzima Q -

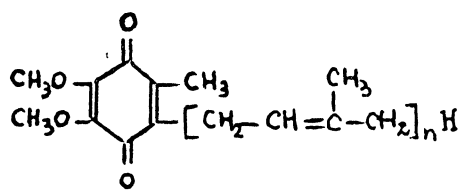
a-Estudos estruturais-

Festenstein et alii(1) descreveram várias substâncias nas frações lipídicas insaponificáveis (em KOH alcoólico) de tecidos animais. Um destes compostos obtido por cromatografia em alumina, denominado de "SA", foi descrito como substância amarelo-viscosa, com absorção (em ciclohexano) em 272mμ. A análise química por diferentes métodos demonstraram que "SA" continha 2 átomos de oxigênio e teria a possível fórmula molecular de $C_{28}H_{42}O_2$. Dos estudos polarimétricos e espectrofotométricos, estes autores sugeriram que "SA" deveria ser um esteróide. A natureza quinônica do composto foi comprovado pela primeira vez por Crane et alii(3), em 1957. Em seguida Morton et alii(13) ampliando seus estudos sobre "SA", confirmaram a natureza quinônica do composto e determinaram a sua fórmula molecular $C_{44}H_{66}O_3$. Ao composto em questão foi atribuído o peso molecular de 642. Esta preparação, por hidrogenação catalítica, absorveu 8 moles de H_2 por mol do composto e exibiu um potencial

de óxido-redução $E_0 = 0.542 \text{ V}$.

Foi proposto para "SA" a estrutura da naftoquinona com anel quinônico, parcial ou completamente saturado. Nessa etapa de seus trabalhos, tanto o grupo de Morton o como o de Wisconsin(3) tiveram dificuldades em determinar o peso molecular de seus respectivos compostos. Uma variedade de métodos incluindo crioscopia isotérmica, difração em raios X e processos ebulioscópicos foram experimentados e o peso molecular obtido foi de cerca de 530 a 1.000. Trabalhos publicados por Famy et al.(14) Lester et al.(6) e Wolf et al.(7) estabeleceram a estrutura da coenzima Q. Os estudos de Fahmy et al.(14) foram efetuados em ubiquinonas obtidas de coração de porco e seu derivado diacetato apresentou um ponto de fusão (p.f.) de 37°C . Dados obtidos por hidrogenação completa do diacetato de ubiquinona e da perhidroquinona (para-perhidroquinona) sugerem um peso molecular de 890 para a ubiquinona. A análise do diacetato deu uma fórmula fundamental de $\text{C}_{55}\text{H}_{88}\text{O}_4$ (P.M.=849) para a quinona. Foram referidos, também, dois grupos metoxilas (método de Zeisel) e pelo menos 8 grupos metil-carbono (método de Kuhn-Roth). Segundo estes autores a ubiquinona apresenta a mesma estrutura cromofórica da aurantiogliocladina (2,3-dimetoxi-5,6-dimetilbenzoquinona) e que a cadeia lateral pode ser $\text{C}_{50}\text{H}_{80}$, com 10 duplas ligações e pelo menos 8 grupos metilas, provavelmente, de natureza isoprenóide. Lester et al.(6) analisaram preparações cristalinas da coenzima Q_{10} (p.f. de 49.9°C) e de seu derivado diacetato e sugeriram uma fórmula fundamental $\text{C}_{59}\text{H}_{90}\text{O}_4$ (P.M.=863) para a coenzima Q_{10} .

As determinações do grupo alcoila (método de Zeisel) sugeriram 2 grupo metoxilas por mol do composto. Da oxidação com o permanganato de potássio foram identificados ácido levulínico, ácido acético e ácido succínico. A hidrogenação catalítica, a determinação do grupo metila (método Kuhn-Roth) e análises de difração de raios-X indicaram 10 unidades isoprenicas monoinsaturadas, com peso molecular de 863. As coenzimas Q_9 , Q_8 , Q_7 e Q_6 foram também estudadas e apresentavam, respectivamente, as seguintes fórmulas moleculares: $\text{C}_{54}\text{H}_{82}\text{O}_4$ (p.f. de 45.2°C), $\text{C}_{49}\text{H}_{74}\text{O}_4$ (p.f. de 37°C), $\text{C}_{44}\text{H}_{66}\text{O}_4$ (p.f. de 30.5°C) e $\text{C}_{39}\text{H}_{58}\text{O}_4$ (p.f. de 16°C). Foi estabelecido, também, que estes compostos têm o mesmo grupo cromóforo que o da coenzima Q_{10} e que diferem do homólogo inferior seguinte por uma unidade isoprenica de 5 carbonos. Finalmente, Wolf et al.(7) estabeleceram a estrutura molecular da coenzima Q do grupo Q(I).



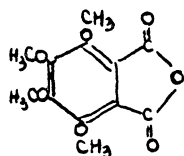
(I)

coenzima Q_{10}	- n=10
coenzima Q_9	- n= 9
coenzima Q_8	- n= 8
coenzima Q_7	- n= 7
coenzima Q_6	- n= 6

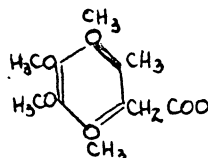
O espectro de absorção da coenzima Q sugeriu uma semelhança do grupo cromóforo com a 2,3-dimetoxi-5,6-dimetilbenzoquinona (aurantioglicladina). Estudos da ressonância nuclear magnética (NMR) caracterizaram os prótons e indicaram dois CH_3O^- , um CH_3^- e uma cadeia poliisoprenóide de 10 unidades ligada ao anel benzoquinônico, mas, não, indicaram a posição da mesma no anel. Destes estudos concluíram os autores

pela presença do próton aromático, assim como de $-C=CH_2$ e $-CH_2-CH_3$.

A redução e metilação da coenzima Q_{10} com dimetilsulfato deu um cristal incolor de tetrametoxi derivado. Este composto por oxidação com excesso de permanganato em solução alcalina a 100°C produziu o anidrido tetrametoxiftálico(II) o qual por oxidação com quantidades estequiométricas de permanganato em acetona, deu ácido 2-metil-3,4,5,6-tetrametoxifenilacético(III). Foram encontrados, também, como produto de oxidação os ácidos levulínico e succínico.

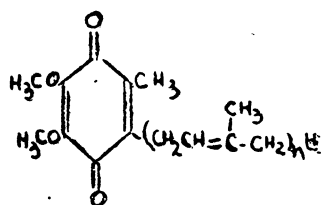


(II)



(III)

Estes estudos foram reforçados pela síntese do 6-farnesil(IV), do 6-geranil(V), do 6-(3-metil-2-butenil)(VI), e do 6-fítill(VII), derivados do 2,3-dimetoxi-5-metil-benzoquinona.(15).

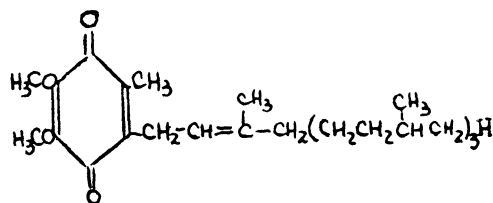


IV - n=3

V - n=2

VI - n=1

(IV-VI)



(VII)

A configuração trans da dupla ligação na cadeia lateral da coenzima Q foi estabelecida por Morton et al.(2) e Isler et al.(16).

Isler et al.(16) e Gloor et al.(17) realizaram um excelente método para a síntese dos diferentes compostos do grupo da coenzima Q, cuja cadeia isoprenóide variavam de 1 a 10.

b-Propriedades físicas e químicas(18)

As coenzimas Q_6 e Q_8 têm propriedades físicas semelhantes, presumindo-se que todas têm o mesmo núcleo cromóforo dialcoxilado e diferindo somente pelo número de unidades de sua cadeia lateral poliisoprenóide. São compostos de coloração amarelo-alaranjada e possuem propriedades de hidrocarbonetos neutros. Na tabela I estão resumidas as constantes físicas das coenzimas Q.

TABELA I

CONSTANTES FÍSICAS DAS COENZIMAS Q (17)

composto	P.m.	p.f.	máx. 275mμ (forma oxidada em etanol)		máx. 270mμ (forma oxidada em éter de petróleo)		máx. 290mμ (forma reduzida em etanol)	mín. 236mμ (forma oxidada em etanol)	(oxidada menos reduzida a 245mμ)	máx. 405mμ
			$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	E	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	E	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$
Q ₆	590.5	18.0	252	14.900	260	15.300	83.0	-	-	-
Q ₇	658.5	30.5	221	14.500	229	15.100	63.9	39.5	188	8.8
Q ₈	726.6	37.0	206	14.900	206	15.000	60.0	37.9	176	7.4
Q ₉	794.6	45.2	185	14.700	187	14.900	51.7	33.1	158	6.9
Q ₁₀	862.7	49.9	165	14.200	176	15.200	46.4	28.4	142	5.9

As diferenças encontradas nos valores da tabela são atribuídas à variações do comprimento da cadeia isoprenóide. Todas as coenzimas são solúveis apenas nos solventes de lipídeos, entretanto, a coenzima Q₁ (isoprenóide sintético) é solúvel em água (19). O ponto de fusão das coenzimas Q sintéticas abaixo de Q₆ são todas inferior a 20°C. O espectro das formas oxidadas e reduzidas da coenzima Q₁₀ são mostradas na Fig. I. A forma oxidada (em etanol) mostra um máximo de absorção em 275mμ e isto explica a designação original Q₂₇₅, dada por Crane et al. (3). O composto apresenta ainda uma ampla absorção em torno de 450mμ e um mínimo de absorção em 236mμ. Em solventes menos polares, tal como o ciclohexano, a absorção máxima se desloca para 272mμ. Após a redução da quinona as faixas de absorção a 275mμ e a 450mμ desaparecem e surge um novo pico em 290mμ, característico da coenzima reduzida.

As coenzimas podem ser reduzidas por Na₂S₂O₄, KBH₄, Zn em meio ácido e mais lentamente em mistura de ácido ascórbico-HCl. A quinona reduzida, dissolvida em ciclohexano é menos rapidamente oxidada. A rápida reoxidação da coenzima (H₂ (reduzida)) pode ser realizada na presença de FeCl₃ ou AgO.

De acordo com Horton (2), o potencial de óxido-redução do composto "SA", em meio alcalino e pH ácido apresentava um valor de $E_0 = 0.542$ V. Entretanto, Slater et al. (20) encontraram um valor de $E_0' = 0.089$ V para a coenzima Q, em pH 7.3. O potencial final está em concordância com o procedimento de óxido-redução da coenzima Q no sistema de transporte de elétrons.

O isolamento da coenzima de várias fontes é usualmente precedido por saponificação do material em meio alcalino. A adição de pingelol previne a destruição da coenzima Q nessa operação (21, 8).

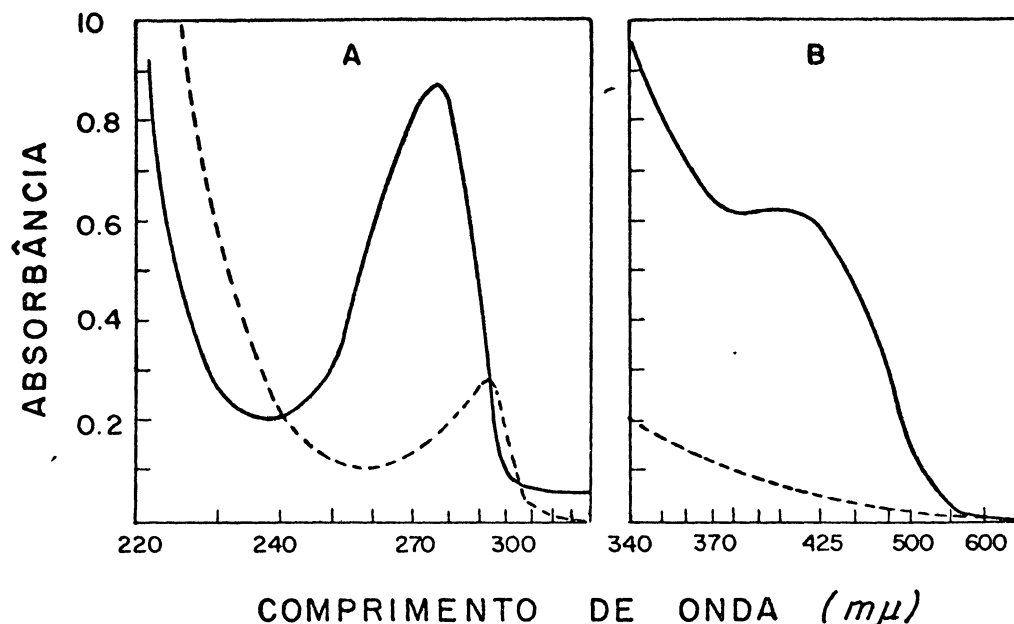


Fig.1. ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA COENZIMA Q EM ALCOOL-ABSOLUTO.

Linha cheia representando a forma oxidada e a linha interrompida o espectro obtido após redução com KBH_4 . (18).

INVESTIGAÇÃO, DETERMINAÇÃO E INVESTIGAÇÃO (18,22)

a- Método espectrofotométrico

O método é baseado na redução da quinona em etanol e borhidreto e consequente mudança da absorção em 275mμ. Este simples método é satisfatório em muitos casos para a investigação e avaliação da coenzima Q.

b- Reações coloridas

O método de Dam-Karr utilizado para a determinação da vitamina K tem sido aplicado com sucesso para a determinação da coenzima Q e da plastoquinona.

O teste de Craven foi ~~considerado~~ considerado ser específico para as quinonas contendo um hidrogênio lábil ou átomo de halogênio adjacente ao grupo carbonila da quinona. Este teste envolve a união da quinona com etilcianoacetato em meio alcalino. A formação de um cromóforo neste processo é discutido por Folkers et alii (23). A reação dá uma coloração azul-violeta-escura que muda para marron-avermelhada. As ubiquinonas poderiam não responder a este teste, porque são tetra-substituídos (17), encontrou-se que a ubiquinona reage com etilcianoacetato por deslocamento do grupo metoxil e produz um composto colorido, fortemente azul. Desde que são poucas as quinonas que têm uma extensa cadeia lateral não polar em meios biológicos, como as ubiquinonas, a presença de substâncias positivas ao tes-

te de Craven tem sido um método simples para a pesquisa da coenzima Q. A Fig. 2 apresenta um esquema da reação:

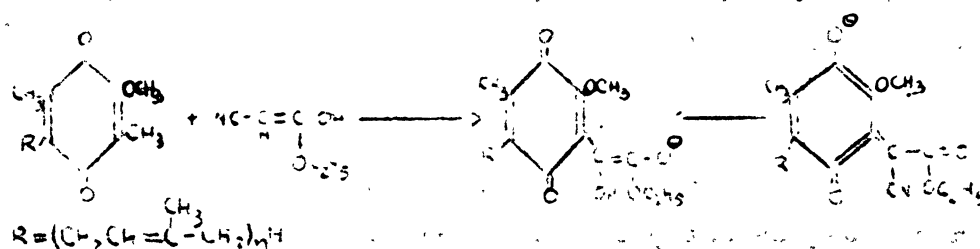


Fig. 2. Reação de etilcianacetato com coenzima Q.

Em adição aos testes mencionados, outras reações foram descritas para a coenzima Q que, depende de propriedades de óxido-redução destes compostos.

c- Cromatografia

A cromatografia em papel tem sido utilizada com sucesso para a separação dos homólogos da ubiquinona.

Os métodos cromatográficos mais utilizados são os que usam papel impregnado com vaselina (24) ou com silicone (550 fluid, da Dow Corning Corp.) (25).

d- Método enzimático

Reações enzimáticas envolvendo a coenzima Q podem, também, ser usadas para pesquisa da coenzima Q e seus vários homólogos sintéticos.

O sistema NADP-coenzima Q-redutase que é sensível ao amital é específico para os homólogos da coenzima Q.

ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO (18)

O processo para o isolamento e purificação da coenzima Q é relativamente simples. Após extração seletiva ou direta dos lipídeos totais, a coenzima Q deste extrato é então purificada por cromatografia em Decalco ou ácido silícico, seguida de cristalização em etanol ou metanol. A quinona é extraída mais rapidamente do material saponificado, tornando mais fácil também, a sua purificação. A saponificação pode ser feita com KOH ou NaOH, em presença de pirogallol que, age como antioxidante. A mistura saponificada pode ser extraída com heptano ou isooctano. As maiores impurezas identificáveis, quando se extrai com heptano são os carotenóides e esteróides que podem ser facilmente removidos por técnicas cromatográficas ou por cristalização diferencial.

A extração direta feita com heptano ou isooctano é relativamente rica em coenzima Q. A mistura álcool-éter tem sido a mais eficiente para a extração de toda a coenzima. Uma grande parte das impurezas que se encontram neste caso são fosfolipídeos que podem ser removidos por precipitação com acetona sem perda do material. E a quinona pode ser facilmente separada dos lipídeos acetona-

solúveis, por processos cromatográficos. A vantagem deste método é que a coenzima não é exposta à ação de álcali ou a temperatura elevada, durante o isolamento.

A purificação do extrato inicial pode ser feita em cromatografia em coluna. Vários adsorventes foram utilizados como alumina, decalco, florissil, ácido silícico, super-cel e polietileno em pó. Em geral as quinonas ~~dissol~~úveis em heptano ou isooctano são adsorvidas em coluna cromatográfica e são eluídas em uma mistura de solventes levemente mais polar do que o heptano.

Após esta purificação preliminar as quinonas podem ser facilmente cristalizadas em etanol ou metanol.

DISTRIBUIÇÃO DAS UBIQUINONAS (67)

As ubiquinonas estão largamente distribuídas no reino animal, reino vegetal e em microorganismos, abrangendo organismos de bactéria ao homem. As quantidades encontradas estão nas tabelas a seguir.

TABELA 2
UBIQUINONAS EM BACTÉRIAS

ESPÉCIES	TIPO	moles/g peso seco
<i>Bacillus subtilis</i>	nd	-
<i>B. megaterium</i>	nd	-
<i>Staphylococcus albus</i>	nd	-
<i>Sarcina lutea</i>	nd	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	nd	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	nd	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	nd	-
<i>Lactobacillus casei</i>	nd	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	nd	-
<i>C. perfringens</i>	nd	-
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Q ₃	2.6
<i>A. chroococcum</i>	Q ₈	6.48
<i>Escherichia coli</i> ML	Q ₈	0.31
<i>E. coli</i> K12	Q ₈	
<i>E. coli</i>	Q ₈	0.41
<i>Proteus vulgaris</i>	Q ₈	0.67
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q ₉	1.59
<i>P. fluorescens</i>	Q ₉	0.94
<i>P. dentrificans</i>	Q ₁₀	1.20
<i>P. fragi</i>	Q ₉	0.44
<i>P. geniculata</i>	Q ₉	0.70
<i>P. mildenbergii</i>	Q ₉	0.35
<i>P. putida</i>	Q ₉	0.035
<i>Serratia marcescens</i>	Q ₈	-
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Q ₈	0.72
<i>Pasteurella pseudotuberculosis</i>	Q ₈	0.12
<i>Chromobacter prodigiosum</i>	Q ₈	0.35
<i>Neisseria catarrhalis</i>	Q ₈	2.05

TABELA 2

cont.

ESPÉCIES	TIPO	umoles/g peso seco
<i>Achromobacter hartlebii</i>	Q ₈	0.45
<i>Hydrogenomonas</i> s.p.	Q ₈	0.10
<i>Tiobacillus thiooxidans</i>	Q ₈	4.30
<i>T. thioparus</i>	Q ₈	-
BACTÉRIAS FOTOSSINTÉTICAS		
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Q ₉	4.30
<i>Chromatium strain D</i>	Q ₇	2.9
<i>Chlorobium thiosulfatophilum</i>	Q _d	-

TABELA 3

UBIQUINONAS EM PLANTAS

ESPÉCIE	TIPO	umoles/g peso seco
CYANOPHYTA		
<i>Anacystis nidulans</i>	nd	-
CHLOROPHYTA		
<i>Cladophora</i> sp.	Q ₉	0.018
<i>Chlorella</i>		0.020
EUGLENOPHYTA		
<i>Englena gracilis</i>	Q ₈	0.021
RHODOPHYTA		
<i>Polysiphonia</i> sp.	Q	0.027
PHAEOPHYTA		
<i>Fucus</i> sp.	Q ₉	0.019
SPERMATOPHYTA		
<i>Spinacia oleacea</i> (fôlhas)	Q ₁₀	0.049
<i>Medicago sativa</i> (espiga)	Q ₁₀	0.023
<i>Zea mays</i> (espiga)	Q ₁₀	0.068
<i>Zea mays</i> (raiz)	Q ₁₀	0.037
<i>Ipomoea batatas</i> (raiz)	Q ₁₀	0.029
<i>Solanum tuberosum</i> (tubérculo)	Q ₁₀	0.005
<i>Brassica oleracea</i> (gérmen)	-	0.012
<i>Tecoma stans</i> (fôlhas)	-	0.019

TABELA 3

cont.

ESPÉCIE	TIPO	umoles/g peso seco
<i>Tamrinus indicum</i> (fôlhas)	-	0.045
<i>Piper betel</i> (fôlhas)	-	0.021
<i>Phaseolus radiatus</i> (sementes)	-	0.015
Soya max (sementes)	Q ₁₀	0.35
Zea mays (óleo de semente)	Q ₉	1.40-2.40
<i>Triticum vulgaris</i> (óleo de semente)	Q ₉	1.40
<i>Allium cepa</i> (bulbo)	Q ₁₀	-
<i>Arum maculatum</i> (espádice)	Q ₁₀	-

TABELA 4

UBIQUINONAS EM FUNGOS

GRUPO E ESPÉCIE	TIPO	umoles/g peso seco
ACTINOMYCETOS		
<i>Streptomyces griseus</i>	nd	-
PHYCOMYCETOS		
<i>Mucor corymbifer</i>	Q ₉	0.20
<i>Blastocladiella emersonii</i>	nd	-
ASCOMYCETOS		
<i>Neurospora crassa</i>	Q ₁₀	-
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Q ₆	0.35
<i>S. cavaleri</i>	Q ₆	-
<i>S. fragilis</i>	Q ₆	-
<i>Candida utilis</i> (Torula)	Q ₇	0.59
	Q ₉	0.59
<i>S. cerevisiae</i>	Q ₇	0.29
<i>S. cerevisiae</i>	Q ₆	-
<i>S. ludwigii</i>	Q ₆	0.36
<i>Zygosaccaromyces barkeri</i>	Q ₆	0.33
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Q ₉	-
<i>Penicillium ochrisogenum</i>	Q ₉	0.44
<i>Ashbya gossypii</i>	Q ₆	0.34
<i>Endomyces lindneri</i>	Q ₇	-
<i>Endomycopsis fibuliger</i>	Q ₇	-

TABELA 4

cont.

GRUPO E ESPÉCIE	TIPO	umoles/g peso seco
<i>Mycoderma monosa</i> . .	Q ₈	-
<i>Mycoderma monosa</i>	Q ₇	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Q ₁₀	0.58
<i>Gibberella fujkuroi</i>	Q ₁₀ (H-10)	
BASIDIOMYCETOS		
<i>Agaricus campestris</i>	Q ₉	0.05
<i>Ustilago zea</i>	Q ₉	0.02
	Q ₁₀	0.20

TABELA 5

UBIQUINONAS EM INVERTEBRADOS

ESPÉCIE	TIPO	umoles/g peso seco
PROTOZOA		
<i>Tetrahymena pyriformis</i> (7 dias)	Q ₈	0.72
<i>T. pyriformis</i> (2 dias)	Q ₈	0.45
<i>Crithidia fasciculata</i>	Q ₉	0.23
<i>T. pyriformis</i>	Q ₈	0.65
<i>Strigomonas oncopelti</i>	Q ₉	0.404
<i>Astasia klebsii</i>	Q ₉	0.14
ECHINODERMATA		
Ouriço do mar	Q ₁₀	
INSECTA		
<i>Musca domestica</i>	Q ₉	0.32
<i>Pieris rapae</i>	Q ₉	0.27
<i>Sphinx pinastri</i>	Q ₁₀	
<i>Celerio emporbitae</i>	Q ₁₀	
<i>Anatis ocellata</i>	Q ₁₀	-
<i>Antherae pernyi</i>	Q ₉	-

TABELA 5

cont.

ESPÉCIE	TIPO	umoles/g peso seco
ANNELIDA		
Lumbricus terrestris	Q ₁₀	-
CRUSTACEA		
Homarus americanus(músc.)	-	-
Camarão (músc.)	Q ₁₀	0.001

TABELA 6

UBIQUINONAS EM VERTEBRADOS INFERIORES

ESPÉCIE	TEGIDO	TIPO	umoles/g peso seco
Galinha	coração	Q ₁₀	0.075
Galinha	coração	Q ₁₀	0.053
Galinha	músculo da perna	Q ₁₀	0.023
Galinha	rim	Q ₁₀	0.053
Galinha	gema de ovo	Q ₁₀	0.007
Pato	coração	Q ₁₀	0.064
Rã	coração	Q ₁₀	0.023
Rã	músculo da perna	Q ₁₀	0.011
Bacalhau	coração	Q ₁₀	0.057
Bacalhau	fígado	Q ₁₀	0.010
Bacalhau	músculo de esqueleto	Q ₁₀	0.0024
Lúcio	coração	Q ₁₀	0.064
Lampreia do mar	coração	Q ₁₀	0.081
Lampreia do rio	coração	Q ₁₀	0.059
Enguia elétrica	coração	Q ₁₀	0.079
Truta	coração	Q ₁₀	0.066
"Wall-eyed pike"	coração	Q ₉	0.009

TABELA 7
UBIQUINONAS EM MAMÍFEROS

TECIDO	ESPÉCIE	TIPO	umoles/g pêsso úmido
CORAÇÃO	Humano	Q ₁₀	0.065
	Vaca	Q ₁₀	0.035
	Porco	Q ₁₀	0.038
	Cordeiro(3 dias)	Q ₁₀	0.200
	Cavalo	Q ₁₀	0.110
	Cobaia		0.150
	Coelho	Q ₁₀	0.110
	Rato	Q ₁₀ -Q ₉	0.160
FÍGADO	Humano	Q ₁₀	0.015
	Vaca	Q ₁₀	0.040
	Porco	Q ₁₀	0.034
	Cavalo	Q ₁₀	0.123-0.014
	Cão	Q ₁₀	0.023
	Gato	Q ₁₀	0.015
	Cobaia		0.014
	Coelho		
Rim	Rato	Q ₁₀ -Q ₉	-
	Camundongo		0.045
	Humano	Q ₁₀	0.011
	Vaca	Q ₁₀	0.018
	Vaca	Q ₁₀	0.044
Baço	Cordeiro	Q ₁₀	0.055
	Humano	Q ₁₀	0.008
	Vaca	Q ₁₀	0.010
	Porco	Q ₁₀	0.022
	Cordeiro		0.012
Pâncreas	Carneiro		0.010
	Humano	Q ₁₀	0.007
	Vaca	Q	0.012-0.023
Músculo de esqueleto	Porco		0.012-0.023
	Humano		0.003
	Cordeiro(3 dias)	Q ₁₀	0.060
	Vaca		0.014
	Rato		0.028

BIOSSÍNTESE-

Geral-

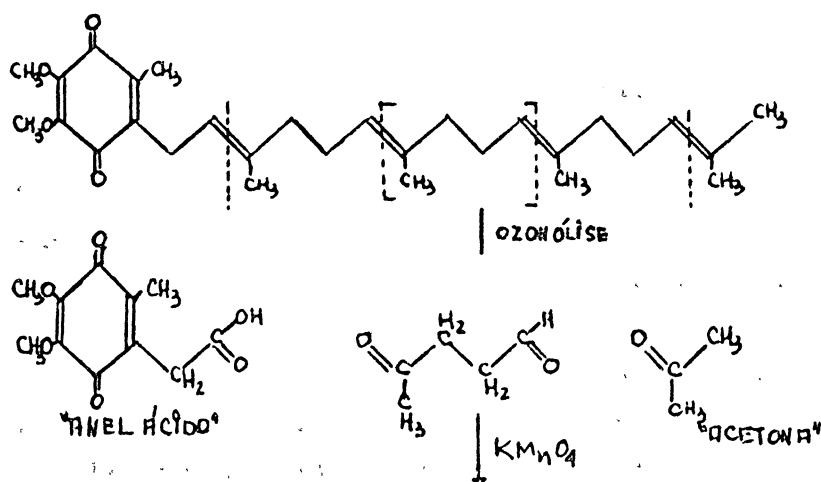
Os animais superiores não sintetizam o anel aromático a partir de pequenas unidades de carbono, mas, podem modificar a estrutura de várias substâncias cíclicas presentes na dieta, deferindo assim dos animais de vida inferior, quanto a biossíntese dos compostos aromáticos.

A primeira ubiquinona isolada do fígado e músculo cardíaco (26,27), mostrou ser a 2,3-dimetoxi-5alquil-6-metil-1,4-benzoquinona. O grupo alquil era $C_{50}H_{81}$, compreendendo 10 unidades isoprenóides, no caso das quinonas obtidas do porco e do boi por Morton et alii (13), Lester et Crane (26) e Wolf et alii (?). A ubiquinona de tecido de rato é de difícil cristalização. Esta preparação parcialmente purificada, após análise cromatográfica em fase reversa (26), mostrou ser uma mistura de compostos com cadeias laterais C_{50} a C_{25} . Por outro lado as quinonas isoladas (Q_6 e Q_7) de leveduras possuíam um grupo alquil mais curto, contendo somente 6 ou 7 unidades isoprenicas. Contudo, logo tornou-se evidente que existia uma família completa de ubiquinonas no tecido animal. Conforme demonstraram Linn et alii, Ruegg et alii, Diplock et alii e Lawson et alii (29,30,31,32), o mesmo ocorria com a série de vitamina K_2 , em microorganismos. Corroborando com estes fatos, foi verificado por Martius e Esner (33) que a administração da 2-metil-1,4-naftoquinona (menadiona), resultavam, somente no corpo animal, na formação da vitamina K_2 , após acoplamento do composto com uma cadeia lateral isoprenóide de 20 carbonos.

Desde que os animais sintetizam o esqualeno, hidrocarboneto poliisoprenóide de 30 carbonos, era de se esperar que eles fossem capazes de sintetizar a cadeia lateral polisoprenóide da ubiquinona. Esta hipótese foi posteriormente confirmada.

Cadeia lateral isoprenica-

Após o desenvolvimento de técnicas satisfatórias de isolamento e purificação, a síntese da cadeia lateral foi rapidamente testada no rato, usando acetato- C^{14} , marcado em C_1 e C_2 (32,34) e mevalonato- C^{14} (4). Estes estudos mostraram de modo conclusivo que ambos os substratos eram incorporados na molécula "in vivo" e "in vivo" (32,35). O maior componente marcado foi a ubiquinona $_{45}$ (Q_9) que, foi isolada em forma cristalina. Este composto foi degradado por ozonólise e os produtos aldeídicos resultantes foram oxidados a ácidos correspondentes, como se vê na Fig. 3.



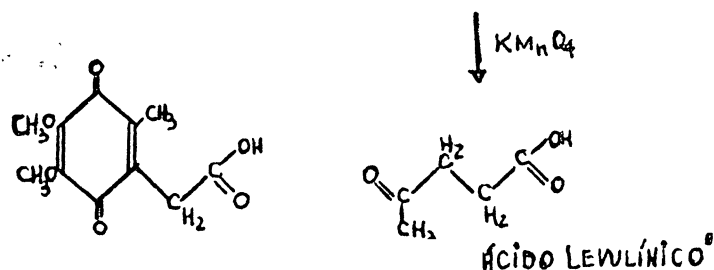


Fig.3

A acetona e o ácido levulínico da cadeia lateral estavam marcados, entretanto, não foi encontrado radioatividade em quantidade detectável no fragmento aromático (anel ácido) isolado, como sal cristalino.

Estava completamente esclarecido que os animais deveriam juntar a parte "poliisoprenóide, presumivelmente, da mesma maneira como o faz o intermediário C_{15} (farnesil-pirofosfato) para a biossíntese do esqualeno. Para a formação da cadeia C_{50} , contudo ela poderia ser completada por uma adição contínua nas extremidades dos homólogos inferiores do precursor C_5 (isopentenil-pirofosfato) e não por uma união de duas unidades C_{25} como acontece na síntese do esqualeno.

Deste modo é possível que cada órgão seja capaz de sintetizar sua própria cadeia lateral para acoplar ao núcleo quinônico. Esta observação foi confirmada por Joshi et alii (36). A administração de doses de Q_{10} a grupos de ratos submetidos a dieta deficientes em Q_9 , por várias semanas, não afetou apreciavelmente a quantidade de Q_9 encontrada nos tecidos. Isto demonstrou que os 45 carbonos da cadeia lateral eram rapidamente sintetizada pelo rato (37). Numa experiência mais criteriosa, Gloor e Wiss (35) administrando mevalonato- C^{14} , marcado no C_2 , em ratos, demonstraram que os isoprenólos Q_9 e Q_{10} tornaram-se marcados, bem como o Q_7 e o Q_8 . Normalmente, Q_7 e Q_8 estão presentes em quantidades muito pequenas nos tecidos para permitir uma análise segura da radioatividade. É possível que Q_7 e Q_8 possam provir do alimento, mas não revelaram quantidades detectáveis de nenhuma ubiquinona, a não ser Q_9 . Novos estudos sobre a absorção de Q_{10} através do intestino do rato mostraram que o nível de absorção é baixo (menos de 15% da dose total) e que o metabolismo do material absorvido é muito rápido, de modo que seria pouco provável a retenção de pequena quantidade de homólogos inferiores a partir da dieta. A outra fonte possível dos homólogos inferiores no rato poderia ser a microflora intestinal. Assim, evidências indicaram que os ratos podiam sintetizar pequenas quantidades de Q_7 e Q_8 em adição aos homólogos superiores. O porco, o boi e o homem parecem sintetizar somente o Q_{10} . As diferentes ubiquinonas podiam ser originadas da ação inespecífica da enzima envolvida no acoplamento da unidade poliisoprenóide ao núcleo. A este respeito supõe-se que a enzima do rato possui uma especificidade maior do que a dos outros animais.

Uma suposição razoável é de que a cadeia lateral poliisoprenóide na forma de pirofosfato (PP) seja agregada ao anel benzoquinona, do mesmo modo como foi demonstrado para o farnesil-pirofosfato (Goodman e Popjak, 38) ou para o geranyl-geranyl-PP. Segundo Lynen (39), este tipo de acoplamento envolveria um ataque nucleofílico ao

anel aromático parcialmente substituído, Fig.4. A hipótese do crescimento da cadeia lateral enquanto está ligada ao núcleo aromático não foi excluída, embora considerada pouco provável.

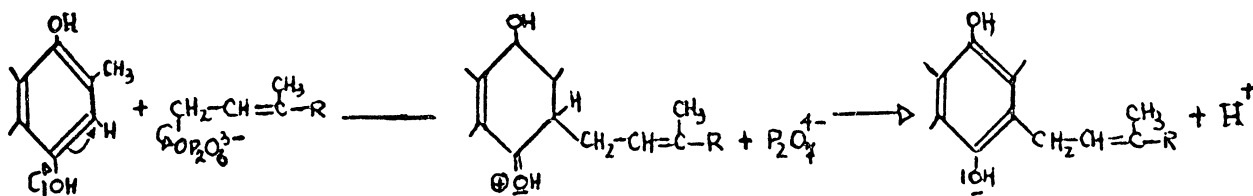


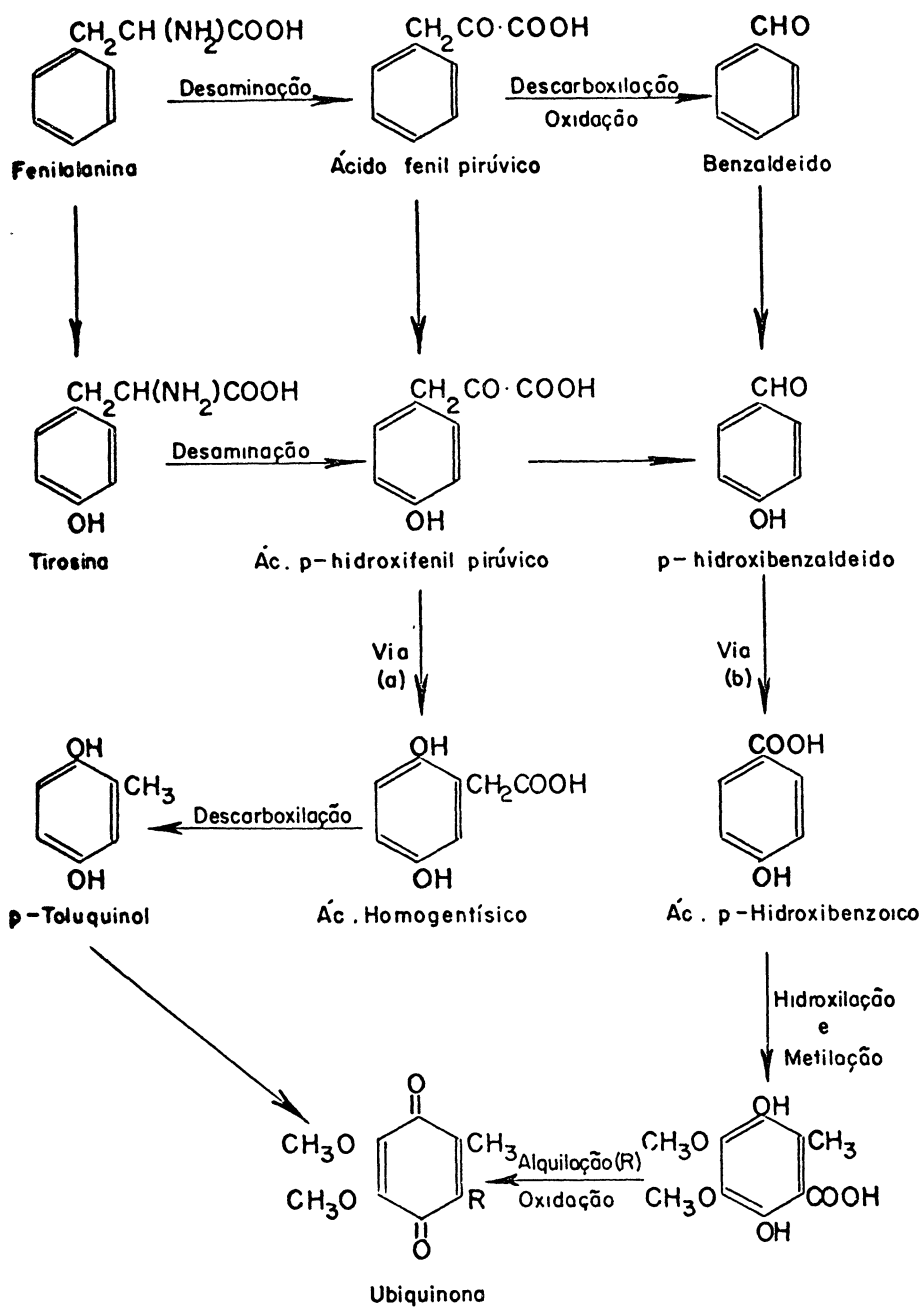
Fig.4.- Possível mecanismo do acoplamento da cadeia lateral isoprenóide ao núcleo aromático na formação da ubiquinona.

Núcleo aromático-

É conhecido que os animais não sintetizam o anel benzênico (com exceção do anel aromático dos hormônios estrogênicos) e, necessitam que os mesmos lhe sejam fornecidos na dieta, como os aminoácidos aromáticos que eles modificam de acordo com as suas necessidades metabólicas. O precursor aromático podia ser formado pelas bactérias intestinais, embora seja difícil sua absorção pelo intestino. A favor desta hipótese convém citar que a vitamina K_2 é sintetizada por microorganismos e pode ser absorvida pelos animais.

Muitas experiências têm sido feitas baseadas na idéia de que a fenilalanina e a tirosina, via ácido xiquímico, possam dar origem à parte benzoquinônica da coenzima Q. Rudney e Sugimura (40) usaram leveduras que aumentam de 5 a 10 vezes seu conteúdo em Q_6 quando são aeradas células que foram previamente crescidas anaerobicamente. Este sistema sob condições adaptativas mostrou a incorporação de formiato, glicose, mevalonato marcados com C^{14} e metionina (marcado no S). Sob condições semelhantes não houve a incorporação da fenilalanina marcada uniformemente. Wiss et al. (41), também, verificaram uma escassa incorporação da fenilalanina e tirosina, bem como ácido mevalônico-2- C^{14} , na fração insaponificável de fígado de rato. Por outro lado, Olson et alii (42), em experiência semelhante, com doses de 1.0 mc de aminoácido marcado, obtiveram marcação suficiente na ubiquinona purificada. Uma grande porção de radioatividade estava localizada no anel benzênico (ver Fig.3).

Possíveis vias metabólicas de aminoácidos aromáticos precursores do núcleo da ubiquinona são indicados na Fig.5.



Algumas das etapas do esquema acima resumido já foram comprovados experimentalmente e outros não. Por exemplo, a metilação ou a inserção da cadeia lateral isoprenóide ao núcleo benzênico pode preceder as etapas de hidroxilação. A via (a) é bem conhecido, para a formação de ácido homogentísico e p-toluquinol. Com relação a p-toluquinol convém ressaltar que a p-toluquinona tem mostrado atividade precursora no rato. Entretanto, a p-toluquinona em doses elevadas é tóxica para os animais, por causa de sua pronta combinação com grupos sulfidrila das várias enzimas (43). As quinonas com uma posição livre no anel reagem rapidamente com grupo -SH e quanto maior o número de posições livres, mais reativa é a quinona (44). Contudo, "in vivo" uma considerável porção de quinona seria reduzido a quinol. Stoffel e Martius (45) incluíram solanesil-PP e (metil³H)toluquinol como doador de cadeia lateral co m preparação de fígado de rato e não verificaram incorporação do isótopo de trítio na ubiquinona. Ainda sob as mesmas condições experimentais a 4-metoxi-(metil³H)-toluquinona produziu resultados positivos. Mais recentemente, foi feita uma experiência para comprovar estes resultados, administrando-se oralmente pequenas doses de (4-C¹⁴-metoxil)-p-toluquinona em ratos e examinando-se os tecidos 24 horas mais tarde, nenhum dos carbonos marcados (C¹⁴) foram encontrados na ubiquinona do fígado ou de outro órgão (46).

Com respeito à via (b), foi observado que o anel-C¹⁴ e não o benzoato (COOH-C¹⁴) era incorporado à ubiquinona, no fígado de rato (47). Estes resultados sugeriram que os aminoácidos aromáticos eram metabolizados tanto a benzoato como a p-hidroxibenzoato ou a derivado estreitamente relacionados com a síntese de ubiquinona. Esta via alternativa para o metabolismo da fenilalanina e tirosina a ácido benzóico ou a ácido p-hidroxibenzóico, respectivamente, foi estabelecida em mamíferos (48, 49), bem como foi estabelecida a hidroxilação dos ácidos fenólicos. Foi, recentemente, demonstrado que o benzoato é convertido a p-hidroxibenzoato "in vivo" (50) e, também, foi

determinado a ocorrência dop-hidroxi-benzaldeído no fígado humano(51).A descoberta de Rudney e Parson(52,53)que,êste aldeído é um precursor eficiente de ubiquinona nas bactérias fotossintéticas(Rodospirillum rubrum e Azotobacter vinelandii),leveduras e rim de rato,favorece a hipótese de que êste composto seja o precursor do núcleo quinônico.

Os estágios em que os vários substituintes são inseridos ainda não foram esclarecidos,mas,foi bem estabelecido que os grupos metoxilas são derivados da S-adenosil-metionina(36,54) ou formiato(47).Olson et alii(47)mostraram que o grupo metila é também derivado do formiato.

Outra fonte possível do núcleo quinônico pode ser um composto aromático formado pela flora intestinal ou mais remotamente,substâncias de origem vegetal ingeridas na dieta.De fato,no intestino o metabolismo da ubiquinona proveniente do alimento,pode liberar um fragmento aromático que será reutilizado pelo tecido animal, para a síntese de novas moléculas de ubiquinona.Evidências baseadas nestes fatos foram obtidas com experiências feitas sôbre a biossíntese da ubiquinona a partir de acetato- 14 ,"in vitro".Foi observado que após a incubação de fígado ou de alças intestinais como substrato marcado que a ubiquinona- C^{14} era formada somente quando algum transportador de Q_{10} era adicionado à preparação.A indicação era que o material fornecido transportava fragmentos de metabolitos aromáticos capazes de serem acoplados com a cadeia lateral poliisoprenóide,que por sua vez era sintetizada a partir do acetato.

É pouco provavel se processar a transformação do homólogo superior para o inferior por simples degradação oxidativa da unidade terminal isoprenóide na cadeia lateral.Uma vez iniciada a oxidação,seria difícil parar o processo oxidativo ao longo da cadeia.Realmente,a descoberta do ácido tocoferônico(55)em metabolito do alfa-tocoferol com somente uma pequena cadeia lateral favorece essa via.Êstes resultados envolvem alguns dos núcleos benzoquinônicos libertados metabôlicamente da ubiquinona da dieta e são reutilizados na biossíntese do isoprenólogo requerido por uma espécie particular,exatamente como o núcleo naftoquinônico da vitamina K que pode ser usado para a síntese da vitamina $K_{2(20)}$ (tetraprenilmenaquinona), na galinha e no rato(57).

Grupos Metila e Metoxilas do anel

Estudando a biossíntese de Q_6 em leveduras,Olson et alii(42),sugeriram que o $H-^{14}COOH$ funcionava como precursor dos grupos metila e metoxilas das quinonas.A incorporação de formiata radioativo($H^{14}COOH$) ao anel benzoquinônico do Q_{10} ,foi comprovado também por Lawson et alii(32) em Aspergillus fumigatus.Neste caso era lógico que os grupo metoxilas se apresentassem marcados,mas a comprovação de radioatividade,a partir de formiato- ^{14}C ,na metila do anel tende a excluir o acetato como uma fonte dêste grupo,de acôrdo com a "hipótese do acetato" para a biossíntese do anel aromático,de Birch et alii(57).Presume-se que esta C-metilação ocorra de maneira semelhante ao observado para a O-metilação que,requer a S-adenosilmetionina como o doador imediato do grupo metila,conforme Axelrod e Tomchik(58).

O grupo metila do último(S-adenosilmetionina) derivado do formiato através dos intermediários N^{5-10} -metileno e N^5 -metiltetrahidrofolato. Este é conhecido como "formaldeído ativo"(Osborn e Huenneekens,59) e dos seu grupo metila à homocisteína na síntese da metionina(60,61,62).

A metilação dos átomos de carbono em microorganismos foi encontrado anteriormente em metabolitos de fungos.O grupo de C_{28} do ergosterol é derivado do formiato(63,64,65)via metionina e parece se inserida na última etapa da seqüência biossintética.O mesmo poderia acontecer para as metilas na biossíntese de ubiquinonas.

FUNÇÃO BIOQUÍMICA-

Foram apresentadas evidências do papel da coenzima Q como um componente essencial da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria .Estas evidências foram obtidas por vários métodos,entre eles:

- 1-a oxidação e redução da coenzima Q por partículas mitocondriais,
- 2-a exigência da coenzimaQ na respiração de partículas esgotadas,
- 3-a mudança de óxido-redução da coenzima Q na mitocôndria sob a influência de vários substratos,oxigênio e inibidores.
- 4-o isolamento de complexos enzimáticos do sistema de transporte de elétrons que cataliza especificamente a redução e oxidação da coenzima por outros transportadores de elétrons da cadeia respiratória.

A coenzima Q foi encontrada em todas as mitocôndrias examinadas.E,existe em grandes concentrações em partículas do sistema de transporte de elétron terminal de Azotobacter(26) e Escherichia coli(24).Em muitos destes sistemas foi demonstrado que a quinona sofre mudança de óxido-redução,durante o transporte de elétrons.Na cadeia respiratória está intercalada entre as flavoproteínas e os citocromos(Fig.6)

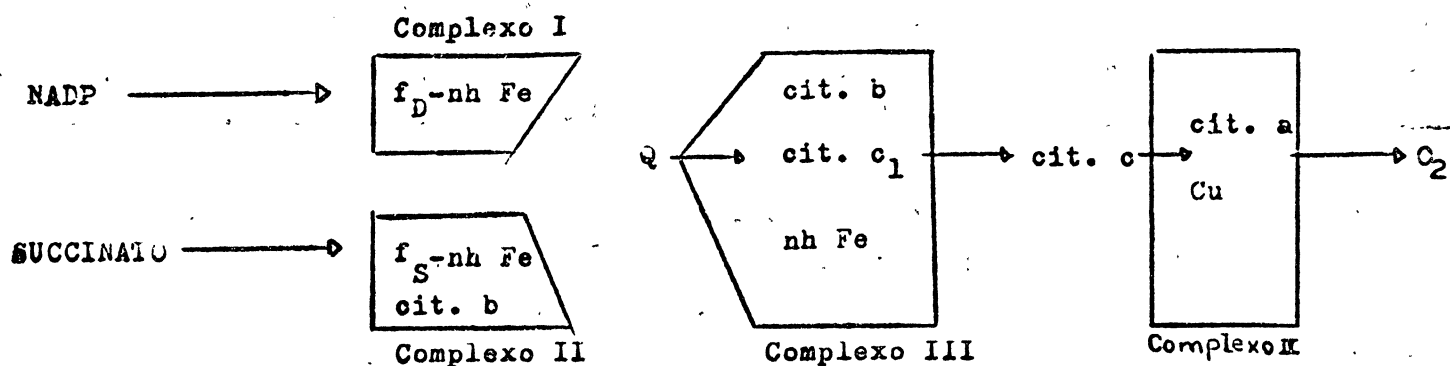


Fig. 6.- Cadeia de transporte de elétron mostrando a posição e a composição dos 4 complexos e sua relação com os componentes móveis, coenzima Q e citocromo c ; f_D - flavoproteína NADP; f_S - flavoproteína succínica; nh Fe - ferro não hemínico.

A reação que sofre como portador de hidrogênio no sistema quinona-hidroquinona é a que segue: (Fig. 7)

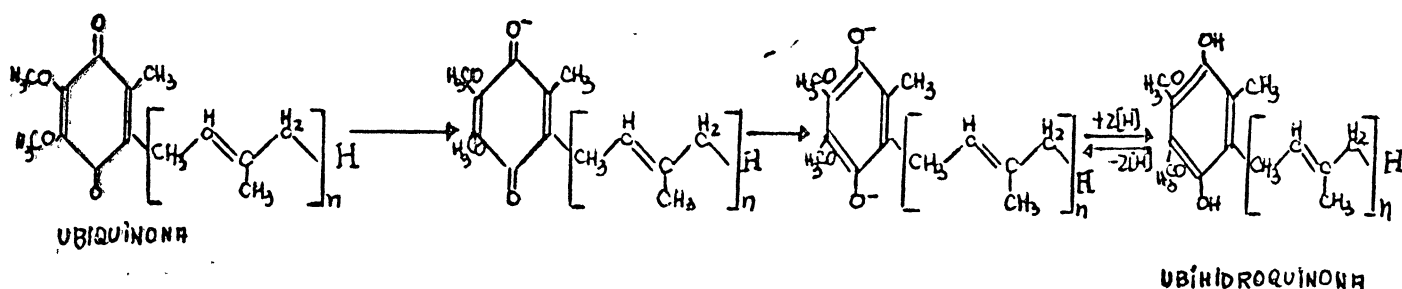


Fig. 7.

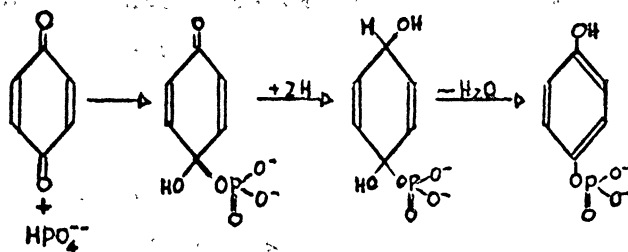
A primeira etapa é a adição de elétrons à quinona, sendo a adição de prótons um processo secundário que depende do pH da solução.

A enzima que transfere o hidrogênio do sistema quinônico ao citocromo c recebe o nome de ubihidroquinona-citocromoc-redutase e já foi isolada, entretanto, a preparação continua ainda os cit. b e c_1 .

Foi mostrado que a preparação por extração de solventes orgânicos cessa o transporte de elétrons e que a atividade pode ser restaurada quando se junta quinona ao sistema extraído. Estudos com inibidores como a antimicina A, tenoiltrifluoroacetona e amital, usando desidrogenase succínica purificada indicaram que a coenzima Q é uma coenzima do sistema desidrogenase succínica, catalizando o transporte de elétrons do ferro não hemínico por meio da desidrogenase succínica ao citocromo c_1 . Segundo Green é provável que na cadeia respiratória existam sistemas intercalados e dispostos paralelamente e dependentes dos doadores de hidrogênio (NADH e ácido succínico). Por outro lado parece que existem enzimas que catalizam a reação direta entre o grupo flavínico e o sistema de citocromos, verdadeiras citocromo redutases que evitam o sistema quinônico.

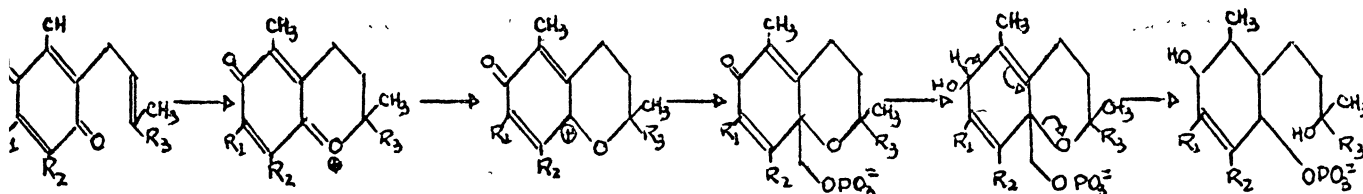
Estudando as relações do óxido-redução da coenzima Q sob condições de "steady-state", Hatefi (13) mostrou que ela atua como transportador de elétrons na fosforilação oxidativa. A adição de fosfato inorgânico estabiliza a coenzima Q numa forma reduzida (quinol fosfato) e, este efeito é revertido por adenosina difosfato (ADP). Na reação terminal o ATP é formado por transferência de uma alta energia do grupo fosfato a ADP e a quinona torna-se um transportador acessível novamente para uma repetição do ciclo de fosforilação oxidativa. Hatefi e Chance (18) consideraram a possibilidade de que a coenzima Q possa ocorrer em estado de alta energia (QH_2-1). Concernente ao possível mecanismo da formação de quinol fosfatos na célula Clark e Todd (66) enumeraram as seguintes possibilidades:

- a- a redução da quinona com subsequente fosforilação,
- b- a fosforilação redutiva (concomitante) da quinona (reação A)



Reação A.

c- a formação do íon carbaníu terciário de acordo com a reação B, seguida de ataque nucleofílico por um fosfato dianion (HPO_4^{2-}) e, uma redução subsequente deixando o anel aberto e a formação de um quinol fosfato.



Reação B.

Clark e Todd mostraram que o primeiro mecanismo requeriria um fosfato ativado por acilação e o segundo mecanismo não se processa, como demonstrado com um número de quinonas. Contudo, o terceiro mecanismo é mantido pela ocorrência na natureza das estruturas (ubiquinona, ubiquinonol, alfa tocoferolquinona e vitamina K) que poderiam orientar para a formação do carbonium intermediário. Além disso, o anel benzílico e o metil grupo na vitamina K e coenzima Q poderiam servir para estabilizar a estrutura intermediária (Fig. 8).

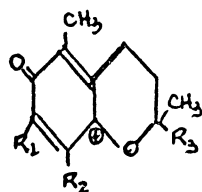
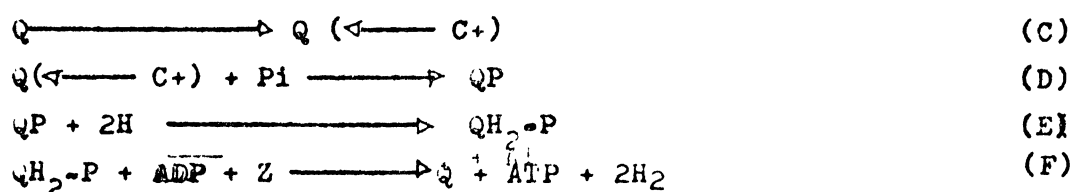


Fig. 8.

Esta hipótese, resumida nas reações de C-F, com certas observações feitas com a coenzima Q e a vitamina K₁.



Onde, $\text{Q}^{\leftarrow \text{C}^+}$ é a estrutura intermediária

Z é um transportador de elétrons.

Até o presente está em evidência que o NAD é um dos componentes de alta energia e que existe uma evidência circunstancial de um papel análogo para a coenzima Q. Shigeta et alii(65) verificaram que a coenzima Q₇ estimula a oxidação da glicose e a síntese de ácidos graxos no tecido adiposo de rato "in vitro". E, em ratos aloxano diabéticos o decréscimo da produção de CO₂ marcado, injetando-se glicose marcada, era recuperado ao nível normal após tratamento com a coenzima Q₇.

CONCLUSÃO-

Embora a estrutura da ubiquinona esteja completamente esclarecida, sua biossíntese apresenta ainda etapas obscuras,

O anel aromático desta coenzima não é sintetizada pelos mamíferos, mas é obtido de metabolitos de fenilalanina ou tirosina.

Os grupos metoxilas e metila do anel aromático são derivados de unidades monocarbônicas, em que participa a S-adenosilmetionina (metionina ativa) e a coenzima do ácido fólico.

A cadeia lateral é facilmente sintetizada pelas células do organismo animal a partir de acetato e mevalonato, por um mecanismo de biossíntese semelhante ao dos terpenóides.

BIBLIOGRAFIA-

- 1-Festenstein, G.N. (et alii), in *Advances in enzymology*, ed. por F.F.Nord, Interscience, New York e London, 25:276, (1963).
- 2-Morton, R.A., in *Advances in enzymology*, ed. por F.F.Nord, Interscience, New York e London, 25:276, (1963).
- 3-Crane, F.L. (et alii), *Biochem. Biophys. Acta*, 25:220, (1957).
- 4-Gloor, U. e Wiss, O., *Arch. Biochem. Biophys.*, 33:216, (1959).
- 5-Morton, R.A. (et alii), in *Arch. Biochem. Biophys.*, 33:216, (1959).
- 6-Lester, R.L. (et alii), *J. Am. Chem. Soc.* 80:4751, (1958).
- 7-Wolf, Donald L. (et alii), *J. Am. Chem. Soc.* 80:4752, (1958).
- 8-Morton, R.A. *Nature* 182:1764, (1958).
- 9-Green, D.E., in *Nature* 182:1764, (1958).
- 10-Crane, F.L. e Ambe, K.S., in *Nature* 182:1764, (1958).
- 11-Hatefi, Y. (et alii), in *Nature*, 182:1764, (1958).
- 12-IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochem. Biophys. Acta* 107:5-10, (1965).
- 13-Morton, R.A. (et alii), *Biochem. J.* 63:16P, (1958).
- 14-Fahmy, M.I. (et alii), *Biochem. J.* 70:1P, (1958).
- 15-Shunk, Clifford H. (et alii), *J. Am. Chem. Soc.* 80:4753, (1958).
- 16-Isler, O. (et alii), in *Advances in enzymology*, ed. por F.F.Nord, Interscience, New York e London, 25:280, (1963).
- 17-Gloor, U. (et alii), in *Advances in enzymology*, ed. por F.F.Nord, Interscience, New York e London, 25:280, (1963).
- 18-Hatefi, Youssef, *Advances in enzymology*, ed. por F.F.Nord, Interscience, New York e London, 25:276-323, (1963).
- 19-Hatefi, Y. (et alii), *J. Biol. Chem.* 273:1676, (1962).
- 20-Slater, E.C. (et alii), in *Advances in enzymology*, ed. por F.F.Nord, Interscience, New York e London, 25:283, (1963).
- 21-Crane, F.L., in *Advances in enzymology*, ed. por F.F.Nord, Interscience, New York, London, 25: (1963).
- 22-Crane, F.L. e Dilley, R.A., *Methods of Biochemical Analysis*, ed. por David Glick, Interscience, New York e London, 11:279, (1963).
- 23-Folkers, K. (et alii), in *Advances in enzymology*, ed. por F.F.Nord, Interscience, New York, London, 25:281, (1963).
- 24-Bouman, J. (et alii), *Biochim. Biophys. Acta* 29:456, (1958).
- 25-Lester, R.L. e Ramasarma, T., *J. Biol. Chem.* 234:672, (1959).
- 26-Lester, R.L. e Crane, F.L., *J. Biol. Chem.* 234:2169, (1959).
- 27-Lowe, J.S. (et alii), *Biochem. J.* 67:215, (1957).
- 28-Lowe, J.S. (et alii), *Biochem. J.* 67:228, (1957).
- 29-Linn, B.O. (et alii), in *Biochemistry of Quinones*, ed. por R.A.Morton, Academic Press, London-New York, p.211, (1965).
- 30-Ryegg, A. (et alii), in *Biochemistry of Quinones*, ed. por R.A.Morton, Academic Press, London, New York, p.211, (1965).
- 31-Diplock, A.T. (et alii), in *Biochemistry of Quinones*, ed. por R.A.Morton, Academic Press, London-New York, p.211, (1965).

- 32-Lawson, D.E.M. (et alii), *Biochem. J.* 74:38P, (1960).
- 33-Martius e Esser, in *Biochemistry of Quinones*, ed. por R.A.Morton, Academic Press, London-New York, p.212, (1965).
- 34-Olson, Robert E. e Dialameh, G.Hosseini, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2:193, (1961).
- 35-Gloor, U. e Wiss, O., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2:222, (1960).
- 36-Josh, U.C. (et alii), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12:247, (1963).
- 37-Lawson, D.E. e Glover, J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4:223, (1961).
- 38-Goodman, DeWitts e Popják, G., *Biochem. J.* 74:35P, (1960).
- 39-Lynen, F., in *Biochemistry of Quinones*, ed. por R.A.Morton, Ac. Press, London-New York, p.214, (1965).
- 40-Rudney, H. e Sugimura, I., in *Advances in enzymology*, ed. por F.F.Nord, Interscience, New York London, 25:298, (1963).
- 41-Wiss, O. (et alii), in *Biochemistry of Quinones*, ed. por R.A.Morton, Ac. Press, London-New York, p.219, (1965).
- 42-Olson, R.L. (et alii), in *Biochemistry of Quinones*, ed. por R.A.Morton, Ac. Press, London-New York, pp.219-240, (1965).
- 43-Snell, J.M. e Weissberger, A., *J. Am. Chem. Soc.* 61:450, (1939).
- 44-Redfearn, E.R. e Whittaker, P.A., in *Biochemistry of Quinones*, p.219, (1965).
- 45-Stoffel, V. e Martius, C., in *Biochemistry of Quinones*, ed. por R.A.Morton, Academic Press, London-New York, p.219, (1965).
- 46-Thelwell, D. e Glover, J., *Biochem. J.* 82:14P, (1962).
- 47-Olson, Robert E. (et alii), *J. Biol. Chem.* 238:PC3146(4), (1963).
- 48-Grumer, H.D., in *Biochemistry of Quinones*, ed. por R.A.Morton, Academic Press, London-New York, p.220, (1965).
- 49-Booth, A.N. (et alii), *J. Biol. Chem.* 235:2649, (1960).
- 50-Acheson, R.M. e Gibbard, R., in *Biochemistry of Quinones*, ed. por R.A.Morton, Ac. Press, London-New York, p.221, (1965).
- 51-Denton, S., Dunnett, N. e Wallis, M.J., *Nature* 198:793, (1963).
- 52-Rudney, H. e Parson, W.W., *J. Biol. Chem.* 238:PC3147, (1963).
- 53-Parson, W.W. e Rudney, H., *Proc. Nat. Acad. Science* 51:444, (1964).
- 54-Wiss, O. e Gloor, U., in *Biochemistry of Quinones*, ed. por R.A.Morton, Ac. Press, London-New York, p.221, (1965).
- 55-Simon, E.J. (et alii), *J. Biol. Chem.* 221:7977, (1956).
- 56-Billeter, M. e Martius, C., in *Biochemistry of Quinones*, ed. por R.A.Morton, Ac. Press, London-New York, p.222, (1965).
- 57-Birch, A.J. (et alii), in *Biochemistry of Quinones*, ed. por R.A.Morton, Ac. Press, London-New York, p.241, (1965).
- 58-Axerlod, Julius e Tomick, Robert, *J. Biol. Chem.* 233:702, (1958).
- 59-Oshorn, M.J. e Hueneckens, F.M., *Biochim. Biophys. Acta* 26:646, (1957).
- 60-Danzaldson, Kenneth O. e Kerebztsey, John W., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 5:289, (1961).
- 61-Larrabee, A.R. e Buchanan, J.M., in *Biochemistry of Quinones*, ed. por R.A.Morton, Ac. Press, London-New York, p.241, (1965).

- 62-Alexander, G.J. e Schwenk, E., in Biochemistry of Quinones, ed. por R.A.Morton, Ac.Press, London-New York, p.241, (1965).
- 63-Danielson, H. e Block, K., J.Am.Chem.Soc. 79:500, (1957).
- 64-Alexander, G.J. e Schwenk, E., J.Biol.Chem. 232:611, (1958).
- 65-Shigeta, Y. (et alii), Biochem.Biophys.Res.Comm. 25:409, (1966).
- 66-Cairk, V.M. e Todd, A., in Biochem. of Quinones, ed. por R.A.Morton, Academic Press, London-New York, p.425, (1965).
- 67-Morton, R.A., Biochemistry of Quinones, ed. by R.A.Morton, Ac.Press, (1965).