

BR 90 228 17

ISSN 0101-3084



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

NOÇÕES DE QUÍMICA DA RADIAÇÃO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Nélida Lúcia DEL MASTRO

IPEN-PUB -- 276 .

PUBLICAÇÃO IPEN 276

OUTUBRO/1989

SÃO PAULO

PUBLICAÇÃO IPEN 276

OUTUBRO/1989

NOÇÕES DE QUÍMICA DA RADIAÇÃO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Nélida Lúcia DEL MASTRO

DEPARTAMENTO DE APLICAÇÕES EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO - BRASIL**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

C11.00

BIOLOGICAL MATERIALS
BIOLOGICAL RADIATION EFFECTS
RADIATION CHEMISTRY
RADICALS

IPEN - Doc - 3476

Aprovado para publicação em 06/09/89

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es).

NOÇÕES DE QUÍMICA DA RADIAÇÃO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Nélida Lúcia DEL MASTRO

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR - SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05499 - São Paulo - BRASIL

RESUMO

A presente publicação examina alguns aspectos dos efeitos biológicos diretos e indiretos da radiação: formação de pares, radicais livres, ion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, oxigênio singlete junto aos mecanismos radioprotetores endógenos dos organismos e os meios em que pode ser incrementada a radiorresistência de sistemas bioquímicos.

NOTIONS OF RADIATION CHEMISTRY IN BIOLOGICAL SYSTEMS

Nélida Lúcia DEL MASTRO

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR - SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05499 - São Paulo - BRASIL

ABSTRACT

The present paper examines some aspects of the direct and indirect biological radiation effects: pair formation, free radicals, superoxide ion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, oxygen singlet together with the endogenous radioprotector mechanisms of organisms and the ways in which an improved radioresistance of biochemical systems can be achieved.

Na interação da radiação com o material biológico, é importante distinguir-se o efeito direto do efeito indireto. No primeiro, a molécula recebe energia diretamente da radiação incidente por meio da ionização e excitação, e no efeito indireto, a molécula recebe a energia pela transferência de outra molécula. O efeito indireto é especialmente importante em sistemas aquosos, nos quais a molécula de água pode ser ionizada e posteriormente transferir a energia adquirida para outra molécula.

a) Formação de pares.

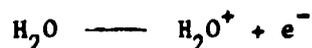
Quando as radiações ionizantes depositam energia cinética no material biológico, criam partículas carregadas mediante a ionização de moléculas ou átomos. Quando um elétron (e^-) é ejetado de uma molécula, um íon positivo (A^+) é formado. Este processo pode ser descrito pela equação:



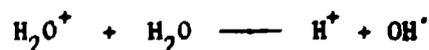
os íons produzidos A^+ e e^- , são conhecidos como pares de íons. Este é um processo puramente físico, e é o passo inicial para desencadear o efeito direto ou indireto da radiação. Os pares de íons têm uma vida média extremamente curta (10^{-18} a 10^{-16} s).

b) Radicais livres.

Um radical é uma molécula eletronicamente neutra, altamente reativa e que possui um elétron não emparelhado no seu orbital externo. Os radicais livres são geralmente intermediários entre os pares de íons e os produtos químicos finais. Por causa dos sistemas biológicos serem compostos de 70 a 80% de água, a maior parte das ionizações primárias nos tecidos vivos acontece nas moléculas de água:



A água ionizada pode então reagir com outra molécula de água e formar o radical hidroxila (OH^{\cdot}) que é altamente reativo:



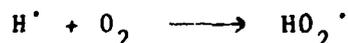
O elétron não emparelhado (e^-) criado pela ionização da água pode recombinar com o íon da água ou mais provavelmente ser atraído por outra molécula de água para formar um elétron aquoso (H_2O^-). Este elétron aquoso, provavelmente, vai se decompor na presença de água para formar o íon OH^- e o radical (H^\cdot):



Como o íon (OH^-) e o hidrogênio (H^\cdot) não contém excesso de energia, eles recombinarão para formar uma molécula de água. Assim, o resultado da irradiação da água será:



Os radicais livres H^\cdot e OH^\cdot são altamente reativos e têm um tempo de vida da ordem de 10^{-9} a 10^{-11} s. Estes radicais possuem considerável energia para quebrar ligações químicas e ainda podem recombinar-se compartilhando seus elétrons não emparelhados numa ligação química, formando assim H_2O , H_2 ou H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) ou podem reagir com outras moléculas. Supõe-se que o "efeito do oxigênio", isto é, a capacidade do oxigênio em sensibilizar os sistemas biológicos frente à radiação, opera neste nível. O oxigênio é um excelente aceitante de elétrons e pode se combinar com o radical hidrogênio (H^\cdot) para formar o radical peroxila:



Este produto, sendo muito reativo, assemelha-se aos outros radicais livres.

Os organismos aeróbicos estão expostos a uma atmosfera que contém, aproximadamente, 20% de oxigênio. Embora o oxigênio molecular não seja tóxico, ele pode formar produtos intermediários que são altamente reativos e que possuem um grande potencial para provocar dano celular ou letalidade.

A aparente toxicidade de O_2 provem dos produtos de sua redução ou excitação para o estado de singleto. A completa redução do oxigênio requer quatro elétrons e água será o produto final formado. Inversamente, quando ocorre oxidação da água há liberação de quatro elétrons.

Quando a redução do oxigênio se dá em passos univalentes, são produzidos intermediários reativos, entre eles, o íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) (Fig.1).

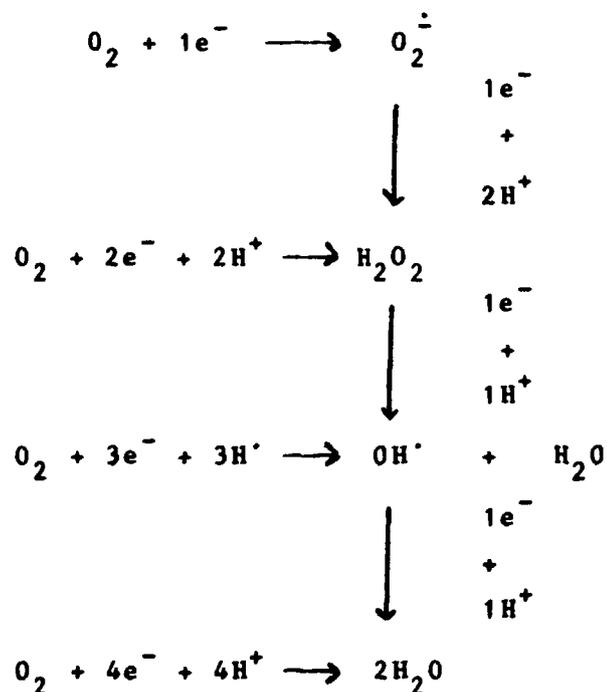


Fig.1 . Vias de redução do oxigênio: formação de intermediários ativos (Salin, 1987).

Assim, as mesmas espécies reativas de oxigênio que são formadas em decorrência do metabolismo normal dos organismos aeróbicos, são também produzidas como consequência da interação da radiação ionizante com o material biológico.

c) Íon superóxido

A molécula de oxigênio (O_2) no seu estado fundamental é um triplete; ela contém dois elétrons desemparelhados com spins paralelos. A adição de um par de elétrons requerirá uma inversão de spin de acordo com o princípio de exclusão de Pauli. O tempo requerido para inverter o spin de um elétron é relativamente longo quando comparado a vida média dos complexos de colisão. Por causa da restrição do spin, o O_2 tem uma maior tendência de reagir com elétrons desemparelhados do que com

substratos que doem pares de elétrons. O caminho mais simples de redução, é pois, o caminho univalente. O produto na forma ionizada é o íon superóxido $O_2^{\cdot -}$. A adição de um próton produz o radical peridroxila (HO_2^{\cdot}). O superóxido é produzido tanto pela redução univalente do O_2 quando pela oxidação univalente de H_2O_2 . Pode ser também produzido enzimaticamente pela ação de flavoproteínas desidrogenases ou não enzimaticamente por meio da autooxidação de substratos, tais como, ferredoxinas, hidroquinonas, tióis e hemoproteínas reduzidas.

O valor do potencial de redução standard (E°) para a hemi-reação $O_2/O_2^{\cdot -}$ é estimada em $-0,33V$, portanto o superóxido seria um bom redutor (Fee & Valentine, 1977). Mas por outro lado, como o E° para a hemi-reação $O_2^{\cdot +}/H_2O_2$ é de $0,87V$ (Fee e Valentine, 1977), ele pode também atuar como agente oxidante.

O íon superóxido está envolvido em certas reações deletérias mediadas por oxigênio. Estas incluem peroxidação de lipídeos, inativação de vírus, dano a membranas, toxicidade celular e quebras do DNA (Fridovich, 1986). É possível que o papel do superóxido possa ser fundamentalmente o de gerar um outro oxidante potente, o OH^{\cdot} , em uma reação com H_2O_2 , catalizada por metais, mas há evidências concretas de seu envolvimento no dano celular. Dentre esses efeitos cabe mencionar a inativação da catalase e glutathione peroxidase, a oxidação de NAD(P)H e epinefrina e o decréscimo da eficiência de plaqueamento de linhagens de células de hamster chinês (Fridovich, 1986).

Níveis constantes de $O_2^{\cdot +}$ podem ser detectados diretamente por absorção no ultravioleta ou por espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR) rápida por congelamento. Estes métodos não são apropriados para sistemas biológicos. Os ensaios para determinação de íon superóxido são usualmente realizados pelo aprisionamento de radicais com um indicador e monitoração das mudanças. Entre os mais comumente utilizados se encontram o tetranitrometano,

citocromo C, sais de tetrazolio ou detecção dos radicais $O_2^{\dot{}}$ por EPR, utilizando armadilhas de spin (spin-trapping).

d) Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio é o mais estável dos oxí-intermediários. Os orbitais externos estão completamente preenchidos e a molécula não exibe propriedades de radical. Da mesma maneira que o íon superóxido, pode agir tanto como um oxidante quanto como um fraco redutor e mesmo com um potencial "standard" de redução de 1,77V, ele é um agente oxidante nucleofílico forte. Apesar da reação ser altamente exotérmica, o H_2O_2 , da mesma maneira que o O_2 , é relativamente pouco reativo. Não reage eficientemente com substratos orgânicos mas tende a formar complexos com metais de transição.

O peróxido de hidrogênio libera um próton para formar HO_2^- com um pKa observado de 11,7.

Como aparece na fig.1, o H_2O_2 é o produto de redução divalente do O_2 . Sua presença pode ser detectada diretamente por espectrofotometria na faixa do UV ou por um número de reações colorimétricas que servem para detectar a presença de catalase e peroxidase endógena.

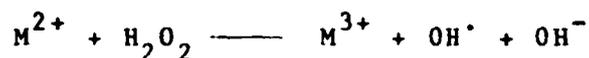
A toxicidade biológica do H_2O_2 é conhecida de longa data, especialmente no caso de microorganismos. A oxidação dos grupos -SH é um dos principais modos de exercer sua toxicidade (Jocelyn, 1972). Entretanto, em geral, H_2O_2 tem baixa reatividade e os efeitos tóxicos são vistos somente em concentrações não fisiológicas (Fridovich, 1976). Na presença de catalizadores metálicos, a toxicidade é aumentada possivelmente por causa da formação de radicais hidroxila, catalizada por metais.

e) Radical hidroxila

O produto da redução univalente do H_2O_2 é o radical hidroxila ($OH^{\dot{}}$) altamente reativo. Este ácido fraco tem um pK similar ao do H_2O_2 (11,85) e E° na faixa de 2,0V, sendo um dos agentes mais oxidantes (Buettner, 1985).

O radical hidroxila reage praticamente a taxas controladas pela difusão ($K > 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) com a maioria dos compostos orgânicos. A vida média em solução, é portanto, curta, sendo sua concentração baixa e sua detecção difícil. Entretanto, o radical hidroxila apresenta absorvância na faixa do UV.

O radical hidroxila pode ser gerado a partir de H_2O por radiólise por pulsos ou a partir de H_2O_2 por fotólise em comprimentos de onda inferiores a 350nm (Czapski, 1984). Além disso, pode ser produzido por uma redução do H_2O_2 , catalizada por um metal de transição de acordo com a reação de Fenton:



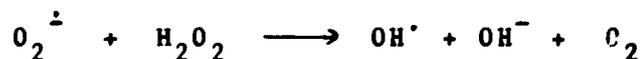
Por causa da alta reatividade e curta vida média, a detecção direta de OH^\cdot por espectroscopia óptica ou EPR é difícil. Um método útil de detecção é o da "armadilha" de spin (spin trapping): o radical é adicionado a um solvente que contém um composto dimagnético (spin trap) que, ao reagir com OH^\cdot , dá origem a um produto de vida média longa (spin adduct) com um espectro EPR definido (Buettner 1985). Exemplos de "spin traps" apropriados incluem 2-nitroso-2-metilpropano, N-terbutil- α -fenilnitron e 5,5-dimetilpirrolina-N-oxide. Um método adicional é o da monitoração da formação de etileno a partir de metional (Beauchamp & Fridovich 1970). Dentre os métodos indiretos aplicados para a detecção de OH^\cdot há o que utiliza agentes que aprisionam radicais livres (scavenging agents) e o da inibição combinada de superóxido dismutase e catalase (Fridovich 1976, Cohen 1977).

Tem sido proposto recentemente o conceito de OH^\cdot "cripto" (Young-man, 1984), que significa um oxi-radical "enjaulado". Este conceito hipotético se baseia por um lado, na alta reatividade do OH^\cdot e portanto, difusão limitada nos sistemas biológicos, e por outro nas diferenças observadas nos efeitos de "scavenger" e inibitórios.

Estando o oxidante ligado, o conceito de radical "enjaulado" justificaria a restrição na reatividade do substrato. A vida média tornar-se-ia mais longa e haveria um maior grau de especificidade do complexo de reação intermediário, do que se o OH[•] estivesse livre.

Sendo o OH[•] extremamente inespecífico e altamente reativo, ele reage com o primeiro substrato disponível, seja enzimas, metabólitos, ácidos nucleicos ou membranas, sendo por isso de enorme potencial mutagênico e destrutivo para sistemas biológicos.

Apesar de que sua presença ter sido postulada há muitos anos, foi somente a partir de 1970, mediante estudos intensivos dos processos mediados por superóxidos, que o OH[•] foi considerado uma espécie significativamente tóxica do oxigênio. Sua presença tinha sido inferida para explicar os casos que não eram completamente inibidos por "scavengers" de O₂^{•-} ou H₂O₂. Entretanto, quando ambos tipos de scavengers são aplicados simultaneamente, há uma inibição sinérgica. O mecanismo postulado envolveria a reação entre O₂^{•-} e H₂O₂ que presumivelmente seria catalizada por um metal:



Esta reação, conhecida como reação de Haber-Weiss (Haber & Weiss, 1934), é evocada para explicar muitos fenômenos envolvendo oxi-radicais (Cohen, 1977).

f) Oxigênio singlete

Espécies de oxigênio excitadas eletronicamente são formadas quando um dos elétrons do orbital externo é elevado a um orbital de nível superior tendo seu spin invertido. O spin antiparalelo resultante é referido como estado de singlete. O oxigênio diatômico existe no estado fundamental como triplete com estados excitados de singlete que podem ser obtidos mediante o fornecimento de energia suficiente. O estado de oxigênio singlete pode ser ¹Δg ou ¹Σg. A representação do

orbital do estado fundamental do triplete e os dois estados singletos excitados, bem como, os níveis de energia acima do estado fundamental é a seguinte:

Estado	$\Delta G, \text{kJ}$	Spin
$^1\Sigma_g$	155	$\uparrow \quad \downarrow$
$^1\Delta_g$	92	$\uparrow\downarrow \quad \text{---}$
$^3\Sigma_g$.	$\uparrow \quad \uparrow$

A relaxação ao estado fundamental pode se proceder pela transferência de energia à outra molécula ou pela emissão de radiação. A emissão por relaxação do estado $^1\Delta_g$ ao estado fundamental é a $1,27\mu\text{m}$, enquanto que a partir do estado $^1\Sigma_g$ é a 726nm . Além disso, uma emissão do dímol ($[\text{O}_2]^2$) ocorre a partir do oxigênio singlete a 634 e 703nm (Kasha & Kahn, 1970).

A vida média curta do estado $^1\Sigma_g$ (10^{-12} a 10^{-9} s) não permite consequências biológicas significativas (Kasha and Kahn 1970, Krinsky 1979). A estabilidade do estado $^1\Delta_g$ é maior e as transições até ele provenientes do $^1\Sigma_g$ são permitidas. Como resultado disso, muitas das reações do oxigênio singlete envolvem espécies $^1\Delta_g$.

Oxigênio singlete pode ser formado em inúmeros sistemas químicos, fotoquímicos e bioquímicos envolvendo radicais livres, peróxidos lipídicos ou foto-oxidações (Krinsky 1979).

A detecção do oxigênio singlete pode ser realizada monitorando-se as bandas de emissão produzidas pela transição:



medida na região de $1,2 \mu\text{m}$ (Kahn et al 1983). Além disso, oxigênio singlete pode ser detectado analisando-se a formação de produtos na presença de substratos que especificamente reagem com oxigênio singlete, por exemplo o 5-hidroxicolesterol que é formado a partir de colesterol (Foote 1979). Outros métodos de detecção incluem a observação do prolongamento da vida média e portanto,

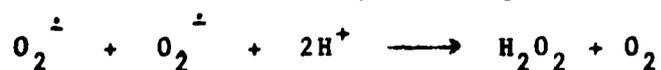
maior reatividade, na presença de D_2O (Kearns 1979), bem como a inibição dos efeitos do oxigênio singlete por "amortecedores" (quenchers) específicos (Foote 1979).

O oxigênio singlete é altamente reativo e pode participar de reações de adição a enos e dienos formando hidroperóxidos e endoperóxidos (Foote 1979, Krinsky 1979). Estes propagam radicais livres em reações em cadeia (Pryor 1976). Em sistemas biológicos, causa peroxidação de lipídeos resultando num enfraquecimento e alteração de membranas.

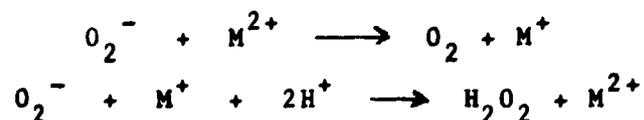
Mecanismos radioprotetores endógenos

a) Superóxido dismutases

As superóxido-dismutases compõem um grupo de metaloenzimas que catalizam a reação de duas moléculas de superóxido conforme a seguinte equação:



O mecanismo envolve a redução e a oxidação alternada do metal associada com a enzima:



As superóxido dismutases são enzimas eficientes com constantes de velocidade praticamente limitadas pela difusão ($2 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$). Revisões extensivas do histórico desta enzima, bem como, sua importância química e fisiológica podem ser encontradas nos trabalhos de Fridovich (1976, 1986).

Existem três tipos de superóxido dismutases (SOD):

- a) SOD que contém Cu e Zn;
- b) SOD que contém Mn;
- c) SOD que contém Fe.

Os dois últimos tipos são semelhantes mas diferem da enzima que contém cobre. A SOD contendo Cu e Zn é um dímero de 33kDa que consiste de duas subunidades de 16,5 kDa e se caracteriza pela inibição por CN^- e inativação por H_2O_2 . É encontrada predominantemente em organismos eucariotos.

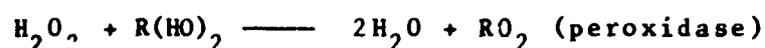
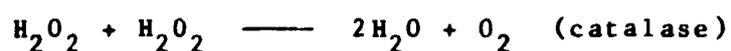
O grupo das SOD insensíveis a CN^- é composto das SOD que contém manganês e das SOD que contém ferro. A enzima que contém Mn, de 46 ou 92 kDa dependendo do organismo, consiste de 2 ou 4 subunidades do mesmo tamanho. Não é inativada por H_2O_2 e é encontrada em organismos procariotos e eucariotos. Nestes últimos, a enzima é encontrada associada a organelas tal como a mitocôndria.

As SOD contendo ferro não são sensíveis à inibição por CN^- mas da mesma maneira que as SOD que contém cobre, podem ser inativadas pelo H_2O_2 . Têm ao redor de 30-46 kDa e consistem de 2 subunidades de igual tamanho. O conteúdo de metal varia de 1 a 2 átomos por dímero. Estas proteínas mostram uma grande similaridade às SOD que contém manganês no que diz respeito a sequência de aminoácidos. De fato, há referências de que SOD em bactérias podem utilizar manganês ou ferro, dependendo do metal fornecido ao meio de cultura (Martin et al. 1986). Isto é, a apo-enzima é capaz de aceitar manganês ou ferro como co-fator.

As SOD que contém ferro foram consideradas inicialmente como estando restritas aos organismos procariotos, mas hoje sabe-se que são também encontradas em plantas. Todas as organelas até agora examinadas, contém ao menos uma isoenzima da SOD tornando possível a proteção contra O_2^{\cdot} .

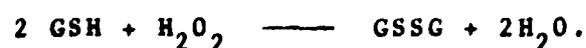
b) Catalase e peroxidase

Nos sistemas biológicos a remoção de H_2O_2 , que possui vida média relativamente longa, é realizada pelas catalases e peroxidases. Estas proteínas que contêm o grupo heme catalizam a remoção eficiente do H_2O_2 em reações análogas:

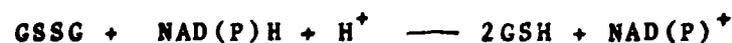


Do ponto de vista do mecanismo, ambas reações são similares. O primeiro produto de reação contém o heme em um estado de oxidação formal de V. A estrutura exata deste composto não é conhecida, mas ele pode ser um ferril-heme (Fe^{4+}) com um radical catiônico adicional associado à porfirina. Esse composto é reduzido à enzima original numa série sequencial de passos de 1 elétron pelo $R(OH)_2$ como no caso da peroxidase ou de 2 elétrons pela H_2O_2 como no caso da catalase. A catalase é uma heme-enzima tetramérica de 240 kDa enquanto que a peroxidase é uma heme-proteína de 40 kDa. A maior parte da atividade da catalase está associada aos peroxissomos.

O sistema glutathione peroxidase/redutase é de especial importância para a desintoxicação de oxirradicais nos animais. O peróxido de hidrogênio é removido na peroxidação do tripeptídeo glutathione:

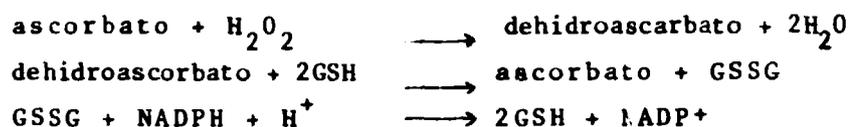


catalizado por uma enzima que contém selênio, a qual tem uma alta especificidade pela glutathione. A glutathione oxidada pode ser então convertida na forma reduzida pela glutathione redutase:



De grande importância na decomposição de peróxidos aparece também o ciclo do ácido ascórbico, no qual o ascorbato é peroxidado, catalizado pela

ascorbato peroxidase, e logo reduzida novamente enzimaticamente ou não enzimaticamente pela glutathione. A redução da glutathione é efetuada pela NADPH glutathione redutase. As reações podem ser representadas da maneira seguinte:



Como resultado do ciclo, a H_2O_2 é removida pelo NADPH.

- c) Remoção não enzimática de espécies reativas de oxigênio.

Acredita-se que outras moléculas pequenas endógenas possam desempenhar também um papel na remoção de espécies tóxicas do oxigênio, além da glutathione e o ácido ascórbico já mencionado. Tal é o caso da metalotioneína, cujo índice de biosíntese no fígado, pode ser correlacionado com a resistência do organismo à ação da radiação. Camundongos tratados com Mn, Cd, ou Zn mostraram tolerâncias aumentada à radiação, estando os níveis de metalotioneína incrementados num fator de 2 a 8 quando comparados com os animais não tratados (Matsubara 1988).

É preciso mencionar, que as espécies reativas de oxigênio reagem rapidamente com os compostos endógenos ou exógenos provenientes da ingestão de alimentos tais como ácido graxos, complexos metálicos, sulfatos, carotenos, tocoferóis. Durante a reação, entretanto, os próprios substratos são transformados em radicais podendo eles mesmos iniciar reações em cadeia. Se esses substratos "scavengers" não forem sendo repostos, a exposição repetida a fluxos de radicais oxidativos poderá acarretar consequências letais para o organismo.

Assim, a formação de radicais livres é um processo químico, mas pode ser modulado por processos biológicos.

Necessidade de drogas radiomodificadoras

As práticas de defesas convencionais contra a radiação são fundamentalmente a distância, os refúgios e as blindagens. Nas situações em que há uma demanda tática de radioproteção, isto é, em trabalhos de campo onde os meios de proteção física não são possíveis é que se torna necessário contar com drogas que possam ser usadas para reduzir ou atenuar a incapacitação ou os efeitos fatais da radiação. Drogas radioprotetoras poderiam assim serem usadas pelo pessoal encarregado de descontaminação de áreas após acidentes ou contaminadas por "fallout". Também nos futuros vôos espaciais, haverá requerimento deste tipo de proteção.

Na área médica, por outro lado, a necessidade do desenvolvimento de produtos radioprotetores e radiosensibilizadores é de enorme importância para a otimização da radioterapia, isto é, tornar o tecido tumoral especificamente radiosensível, preservando ou protegendo o restante do organismo ou mesmo aumentando a radioproteção intrínseca.

Grande parte das substâncias que protegem contra os efeitos deletéreos da radiação, são eficientes também como desintoxicantes da ação nociva de certos compostos químicos ou tratamentos agressivos. Isto é especialmente válido quando se considera os radioprotetores endógenos.

No caso de radioprotetores ou radiosensibilizadores exógenos, é mister levar em consideração a toxicidade de qualquer substância alheia ao organismo como fator limitante para seu uso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - BEAUCHAMP, C.O. & FRIDOVICH, I. 1970. A mechanism for the production of ethylone from menthional. J.Biol. Chem. 245: 4641-6.
- 02 - BUETTNER, G.R. Spin trapping of hydroxyl radical. In: GREENWALD, ed. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Roton, FL, CRC, 1985. p.151-5.
- 03 - COHEN, G. In defense of Haber-Weiss. In: MICHELSON, AM.; McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I., eds. Superoxide and superoxide dismutases. New York. N.Y., Academic, 1977. p. 317-21.
- 04 - CONKLIN, J.J. & WALKER, R.I. Military radiobiology. London, Academic, 1978.
- 05 - CZAPSIK, G. Reactin of OH[•] Methods Enzymol. 105:209-15
- 06 - DORFMAN, L.M. & ADAMS, G.E. Reactivity of the hydrocyl radical in aqueous solutions. Washington, D.C. National Bureau of Standards US Department of Commerce, 1973 p.59.
- 07 - FEE, J.A. & VALENTINE, J.S. Chemical and physical properties of superoxide. In: MICHELSON, A.M.; McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I., eds. Superoxide and superoxide dismutase. New York, N.Y., Academic, 1977. p.19-60.
- 08 - FOOTE, C.S. Quenching of singlet oxygen. In: WASSERMAN, H.M. & MURRAY, R.W., eds. Singlet oxygen. New york, N.Y., Academic, 1979. p. 129-71.
- 09 - FRIDOVICH, L. Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. In: PRYOR, A.W. ed. Free Radicals in Biology. New York, N.Y. Academic, 1976. p.239-77.
- 10 - FRIDOVICH ., I. Biological effects of superoxide radical. Arch. Biochem. Biophys. 274: 1-11.

- 11 - HABER, F. & WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proc. R. Soc., Ser. A 147: 332-51.
- 12 - JOCELYN, P.C. The Biochemistry of the SH group. New York N.Y., Academic, 1977. p.94-136.
- 13 - KASHA, M. & KHAN, A.V. The physics, Chemistry and Biology of singlet molecular oxygen. Ann. N.Y. Acad. Sci., 171:5-23.
- 14 - KEARNS, D.R. Solvent and solvent isotope effects on the lifetime of singlet molecular oxygen. In: WASSERMAN, H.H. & MURRAY, R.W. eds. Singlet oxygen. New York, N.Y. Academic, 1983. p.115-37.
- 15 - KHAN, A.U.; GEBAYER, P., HAGER, L.P. Chloroperoxidase generation of singlet molecular oxygen observed directly by spectroscopy in the 1 - to 1,6 μ m region - Proc. Natl. Acad. Sci., 80:5195-7, 1983.
- 16 - KRINSKY, N. Biological roles of singlet oxygen. In: WASSERMAN, H.H. & MURRAY, R.W., eds. Singlet oxygen. New York, N.Y. Academic, 1979. p. 597-641.
- 17 - MARTIN, M.E.; BYERS, B.R., OLSON, M.O.J. SALIN, M.L., ARCENEAUX, J.E.L. & TOLBERT, A. Streptococcus mutans superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor. J. Biol. Chem., 21: 9361-7, 1986.
- 18 - PRYOR, W.A., ed. the role of free radical reaction in biological system. In: Free radicals in biology. New York, N.Y., Academic, 1976. p. 1-49.
- 19 - SALIN, M.L. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. Physiologia Plantarum, 72:681-9, 1987.
- 20 - YOUNGMAN, R.J. Oxygen activation: Is the hydroxyl radical always biological relevant? Trends Biochem. Sci. 9:280-3, 1984.