

Renato César Caetano

**Efeito de Água Sobre a Atividade da
Ribonuclease a (RNase A)**





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP.

**"EFEITO DE ÁGUA SOBRE A ATIVIDADE DA
RIBONUCLEASE A (RNase A)"**

Renato César Caetano

**Dissertação apresentada junto ao
Curso de Pós-Graduação em
Física, do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências
Exatas, para a obtenção do grau
de Mestre em Ciências (Área de
concentração em Biofísica
Molecular).**



792/98

Orientador: Prof. Dr. Márcio Francisco Colombo

São José do Rio Preto, Dezembro de 1996

AGRADECIMENTOS

Permito-me não estender nos agradecimentos, afim de que não cometa nenhuma injustiça, por algum esquecimento.

Gostaria de fazer um agradecimento especial ao Prof. Dr. Márcio Francisco Colombo, pelo louvável rigor na orientação deste trabalho, o qual me permitiu conduzi-lo com segurança; pelos ensinamentos que me passou e pela oportunidade de iniciar os meus estudos de pós-graduação.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, o qual me deu a primeira oportunidade de desenvolver atividades de iniciação científica; a Prof^a Dr^a Marileila Varella-Garcia, a qual me deu a oportunidade de ser bolsista de iniciação científica; ao Prof. Dr. João Ruggiero Neto, o qual possibilitou a minha vinda para este Departamento e com quem também tive o prazer de desenvolver atividades científicas; aos demais Professores do Departamento de Física pelo ótimo convívio e ambiente acadêmico e ao Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla pela grande amizade.

Gostaria de agradecer aos funcionários do Departamento e especialmente ao "Paulinho", Ilva e "D.Cida" (aqui não poderia esquecer dos cafezinhos que a D.Cida nos serve) pela recepção que me deram quando da minha vinda para este Departamento e ao grande amigo "guarda Muniz".

Aos amigos do Departamento pelo ótimo convívio (aqui não poderia deixar de agradecer ao "Macgiver" que me incentivou a dar os primeiros passos no estudo da física e o Uderlei pelos ensinamentos de Biologia Molecular) e especialmente à Fernanda, Arthur e Lucimara, que me deram a satisfação de poder "orientá-los" numa fase de seus estudos de iniciação científica.

Gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro e ao assessor da FAPESP pelas críticas e sugestões levantadas no transcorrer de todo o trabalho.

*Dedico este trabalho aos meus Pais
pelos ensinamentos que nunca
faltaram, bem como pelo
incansável apoio, incentivo e
equilíbrio que sempre me deram e
aos meus queridos irmãos
Alexander (in memorian) e Eliane.*



Índice

1. <i>Introdução</i>	01
1.1. <i>Sinopse da obra</i>	01
1.2. <i>Contexto histórico</i>	02
1.3. <i>Objetivos da obra</i>	03
1.3.1. <i>Objetivos da obra</i>	03
1.3.2. <i>Objetivos da obra</i>	04
1.4. <i>Introdução da obra</i>	05
1.4.1. <i>Introdução da obra</i>	05
1.4.2. <i>Introdução da obra</i>	06
1.5. <i>Introdução da obra</i>	07
1.6. <i>Introdução da obra</i>	08
1.7. <i>Introdução da obra</i>	09
1.7.1. <i>Introdução da obra</i>	09
1.7.2. <i>Introdução da obra</i>	10
1.8. <i>Introdução da obra</i>	11
1.9. <i>Introdução da obra</i>	12
1.10. <i>Introdução da obra</i>	13
1.11. <i>Introdução da obra</i>	14

2. <i>Introdução da obra</i>	15
------------------------------	----

“O que é verdadeiro é frutífero”
Goethe, filósofo e escritor Alemão.

2.1. <i>Introdução da obra</i>	15
2.2. <i>Introdução da obra</i>	16
2.3. <i>Introdução da obra</i>	17
2.4. <i>Introdução da obra</i>	18
2.5. <i>Introdução da obra</i>	19
2.6. <i>Introdução da obra</i>	20
2.7. <i>Introdução da obra</i>	21
2.8. <i>Introdução da obra</i>	22
2.9. <i>Introdução da obra</i>	23

ÍNDICE

I. Introdução.....	01
I.1 Sistemas Biológicos.....	01
I.2 Proteínas.....	02
I.3 Enzimas.....	05
I.3.1 CatalisadoreQuímicos.....	05
I.3.2 Catalisadores Bioquímicos.....	06
I.4 Ribonuclease A (RNase A).....	09
I.4.1 Atividade Enzimática.....	13
I.4.2 Mecanismo de Ação da RNase A.....	15
I.5 Velocidade de Reação.....	17
I.6 Ordens de Reação.....	19
I.7 Cinética Enzimática.....	24
I.7.1 Análise de Michaelis-Menten.....	24
I.7.2 Equação de BriggHaldane.....	29
I.8 Interação deLigantes.....	33
I.9 Efeito de Água em Sistemas Biológicos.....	35
I.10 Efeito de Osmólitos sobre a Atividade de Água.....	41
I.11 Objetivos deste Estudo.....	43
 II. Materias e Métodos.....	 46
II.1 Preparações de Soluções.....	46
II.2 Determinação de Osmolalidades.....	47
II.3 Dependência da Viscosidade da Solução com a concentração de Sacarose, Sorbitol e Glicerol.....	48
II.4 Purificação da Ribonuclease A (RNase A).....	50
II.5 Caracterização Eletroforética da (RNase A).....	50
II.6 Caracterização espectral de macromoléculas biológicas.....	51
II. 6.1 Ácido Polirribonucleotídeo (RNA).....	51
II 6.2 2'3' Citidina Monofosfato Cíclico (2'3' CMP)....	52



II.7	Determinação da Atividade Enzimática.....	53
II.8	Ensaio Enzimático do RNA.....	57
II.9	Ensaio Enzimático do 2'3' CMP.....	57
II.10	Determinação da Velocidade Inicial.....	58
II.10.1	RNA.....	58
II.10.2	2'3' CMP.....	58
II.11	Análise de Dados Cinéticos.....	60
III.	Resultados.....	62
III.1	Dicroísmo Circular	62
III.1.1	CD RNA.....	62
III.1.2	CD RNase A.....	64
III.2	Efeito de Sacarose Sobre a Cinética de RNase A com RNA.....	66
III.3	Efeito de Sacarose Sobre a Cinética de RNase A com C>p.....	84
III.4	Efeito de Sorbitol Sobre a Cinética de RNase A com C>p.....	100
IV	Discussão.....	108
IV.1	Diferenciando o efeito de viscosidade do de solvatação sobre os parâmetros cinéticos K_M e k_{cat}.....	110
IV.2	Sobre o mecanismo de ação da RNase A revelado pela adição de solutos neutros.....	112
IV.3	Sobre o efeito de água e de viscosidade na reação de RNase A com RNA.....	115
IV.4	Sobre o efeito de água e de viscosidade na reação de RNase A com C>p.....	119
IV.4.1	Caso 1: A hidrólise de C>p por RNase A segue o mecanismo cinético com $k_3 < k_2$.....	121
IV.4.2	Caso 2. A hidrólise de C>p por RNase A segue o mecanismo cinético com $k_3 > k_{-2} + k_2$.....	124

IV.4.3 Comparação entre os mecanismos de hidrólise de C>p por RNase A associados aos casos 1 e 2.....	127
IV.5 Considerações Finais.....	133

V. Conclusão.....	135
--------------------------	------------

VI. Referências Bibliográficas.....	138
--	------------

I. INTRODUÇÃO

I. 1 SISTEMAS BIOLÓGICOS

Os sistemas biológicos têm um auto-controle que permite iniciar ou acelerar processos sob certas condições e terminá-los ou desacelerá-los sob outras condições (Koshland, 1973).

Considerando a variedade de processos que devem ser regulados e a diversidade das condições ambientais determinadas por temperatura, pressão e composição às quais um organismo está sujeito, é de se esperar que os controles em sistemas biológicos sejam bastante complexos. Todavia, quando se faz uma análise mais aprofundada e cuidadosa desses sistemas, nota-se que os elementos fundamentais de controle são notavelmente simples e universais. Esse elemento fundamental, desde as mais simples bactérias até o homem, é a molécula de proteína (Koshland, 1973).

A analogia entre um organismo vivo e uma máquina é perfeitamente sustentável em todos os níveis em que se analise. A grande diferença entre os dois sistemas, é que o vivo tem a capacidade reproduzir-se e adaptar-se ao meio ambiente (Changeaux, 1965).



Portanto, uma célula em si poderia ser considerada uma máquina química na qual as várias estruturas são interdependentes e controladas por sistemas de “retroalimentação”, muito similares aos sistemas que compreendem as máquinas.

Esta célula fabrica produtos a partir de elementos simples, seguindo uma codificação estabelecida— por exemplo a formação de proteínas a partir de aminoácidos segundo uma sequência de bases— por meio de uma série de reações semelhantes a uma linha de produção numa fábrica.

Experimentos recentes têm mostrado que a habilidade das proteínas de mudar sua conformação sob influências externas e/ou induzir mudanças conformacionais em ácidos nucleicos, é o fator fundamental que propicia o controle de “liga-desliga”, tão vitais para os sistemas vivos.

1.2 PROTEÍNAS

Já nos primeiros trabalhos com matéria viva, os químicos depararam-se com substâncias que apresentavam um comportamento peculiar. Quando aquecidas, tais substâncias passavam do estado “líquido”



para o “sólido”, coagulavam. Como exemplo podemos citar a caseína, uma substância do leite, e a globulina, um pigmento do sangue.

Em 1777, todas as substâncias que coagulavam foram incluídas numa classe denominada albuminosa. Foi somente no século XIX, quando os químicos começaram a analisar estas substâncias, que se verificou que eram consideravelmente mais complexas que outras moléculas orgânicas.

Quando em solução, estas moléculas apresentavam uma estrutura definida e delicada: uma simples agitação ou acidificação/alcalinização do meio em que estas se encontravam, eram suficientes para desorganizar suas estruturas. Este fenômeno, designado desnaturação, implica na perda da sua função biológica (Asimov, 1972).

Naquela época, tais moléculas, por sua complexidade e diversidade, passaram a ser designadas proteínas (Do gr., *proteios*, ‘principal’). Hoje, sabe-se que desempenham várias funções biológicas, tais como: a) transporte de gases, íons, glicose, lipídios e outras moléculas; b) formação de um sistema de defesa dos organismos mais complexos; c) catalisadores de reações químicas e d) sustentação supra estrutural.

As proteínas são formadas pela combinação de vinte aminoácidos essenciais, ligados covalentemente por ligações peptídicas, que



formam cadeias polipeptídicas. Nestas ligações, a porção amina de um aminoácido se liga à porção carboxila de outro, liberando uma molécula de água (Mathews, p.142).

As cadeias polipeptídicas organizam-se em quatro tipos de configurações. A primeira, conhecida como estrutura primária, representa a sequência de aminoácidos da proteína; modificações nesta sequência podem alterar, não necessariamente, a sua função biológica.

Na estrutura secundária, a cadeia polipeptídica enrola-se em forma de α -hélice, de folha β -pregueada e de “random coil”, como consequência das interações não covalentes entre os aminoácidos.

A estrutura terciária caracteriza a maneira como a estrutura secundária se compacta sobre si mesma, para formar, geralmente, um glóbulo. Finalmente, a estrutura quaternária representa o arranjo espacial entre duas ou mais cadeias polipeptídicas com organização terciária..

I.3 ENZIMAS

I.3.1 Catalisadores Químicos

Como sabemos, para manter a vida em todos os seus aspectos, várias reações químicas devem processar-se no organismo. Estas devem ser diversas e eficientes e ocorrer em condições adequadas tais como temperaturas não muito elevadas, pH fisiológico, pressão relativamente constante e altas velocidades. Cada reação está interligada a várias outras, e do retardamento ou da aceleração em uma ou algumas destas reações, depende a organização de todo o sistema.

Foi por volta do fim do século XVIII, seguindo o exemplo de Lavoisier, que os químicos começaram a estudar as reações biológicas de maneira quantitativa, interessando-se pela velocidade das reações. Notaram, assim, que estas velocidades podem ser significativamente alteradas com pequenas variações do meio em que se processam.

Kirchhoff, descobriu que amido podia ser convertido em açúcar em meio ácido e que esta condição aumentava grandemente a velocidade da reação sem, contudo, consumir ou liberar prótons. Ao mesmo tempo, Johann Wolfgang Döbereiner verificou que a platina, um composto



metálico, favorecia a combinação de hidrogênio com oxigênio para formar água. Sem a presença deste composto, a reação só se processaria a altas temperaturas (Asimov, 1972)

Uma vez que as reações rápidas acontecem no sentido da decomposição de uma substância complexa em outra menos complexa, Berzelius chamou este fenômeno de catálise (Do gr., *kata*, ‘para baixo’; *lysis*, ‘dissolução’). Portanto, as substâncias que aceleravam as reações químicas passaram a ser designadas de catalisadores (Asimov, 1972).

1.3.2. Catalisadores Bioquímicos

O mundo orgânico também tem os seus catalisadores, da mesma maneira que o mundo inorgânico. Como exemplo de catalisador orgânico podemos mencionar as leveduras. Elas transformam estruturas complexas em simples, ou melhor, açúcares complexos que não são assimilados pelos organismos em açúcares simples que podem ser assimilados (assimilados no sentido de que são utilizados na formação de estruturas mais complexas). Outros organismos, tais como as bactérias,



também podem acelerar inúmeros processos de decomposição nos sistemas biológicos

Em função do seu papel de “quebrar” as substâncias orgânicas, os catalisadores orgânicos passaram, então, a ser designados enzimas (Do gr., *en*, ‘dentro’; *zyme*, ‘fermento’), que são proteínas que apresentam propriedades catalíticas e alta especificidade para o seu substrato. O nome ‘enzima’ foi inicialmente empregado em 1878 por Fredrich Wilhelm Kuhne.

A partir de então, começou-se a definir que toda enzima é uma proteína, mas isto só se tornou realmente aceito por volta de 1930. Atualmente, sabemos que os catalisadores biológicos não são ,necessariamente, moléculas de proteína pois experimentos têm demonstrado que algumas espécies de RNA também têm propriedades catalíticas semelhantes às das enzimas.

A história da enzimologia , ou seja, o estudo das enzimas, é a própria história da Bioquímica. Ambas desenvolveram-se através de estudos de fermentação e digestão. Foi somente por volta de 1777, que Edward Stevens, isolando fluido do suco gástrico, demonstrou que era possível estudar os processos digestivos fora do corpo, isto é, *in vitro*.



Em 1810, Joseph Gay-Lussac, estudando fermentação, demonstrou que etanol e dióxido de carbono eram produtos da decomposição de açúcar por levedura.

No século XIX, Louis Pasteur propôs que os processos de fermentação também poderiam ocorrer em células vivas e que os sistemas vivos eram dotados de uma “força vital” que decompunha substâncias complexas em simples. Outra hipótese de decomposição nos organismos vivos, defendida por Justus Liebig, baseava-se no fato de os processos biológicos processarem-se pela ação de substâncias químicas que agem como “fermentos”.

Em 1894, a descoberta de Emil Fischer de que a enzima glicolítica pode distinguir açúcares estereoisômeros permitiu que se formulasse o modelo da “chave-fechadura”. A especificidade de uma enzima (fechadura) com o seu substrato (chave), resulta da sua total complementariedade (Voet & Voet, 1990).

Em 1926, James Sumner estudando urease, primeira enzima cristalizada, obteve a catálise hidrolítica da uréia em amônia e dióxido de carbono. Em meados de 1930, John Northrops e Moses Kunitz confirmaram que havia uma correlação direta entre a atividade enzimática dos



cristais de pepsina, tripsina e quimotripsina e a quantidade de proteína presente. Assim, confirmaram a idéia vigente até então de que toda enzima é uma proteína.

Embora o assunto da enzimologia tenha uma longa história, a maioria do nosso entendimento da natureza e função das enzimas advêm, sobretudo, de estudos realizados na segunda metade do século XX. Foi somente em 1963 que a primeira seqüência de aminoácidos de uma enzima (RNase A) foi elucidada (Boyer, 1971). Também nessa década, mais precisamente em 1965, foi apresentada a primeira estrutura tridimensional de uma enzima, a lisozima, a qual foi obtida através de estudos de difração de raios-X.

Hoje, estima-se que há em torno de 2000 enzimas purificadas e caracterizadas (Voet & Voet, 1990).

1.4 RIBONUCLEASE A (RNase A)

Em 1941, Fankuchen realizou os primeiros trabalhos cristalográficos com RNase A, a primeira enzima e a segunda proteína que teve a sua seqüência de aminoácidos conhecida (Boyer, 1971). A sua conformação,



determinada por métodos de difração de raios-X, revela uma macromolécula em forma de fígado com sítio ativo localizado em sua depressão central (Wlodawer et al, 1985), como mostrado na figura 1 (Udgaonkar & Baldwin, 1990). Dados estruturais desta proteína com diversos ligantes mostram a inclusão do substrato justamente nessa depressão central.

McPherson (1986), trabalhando com polinucleotídeos de vários tamanhos, mostrou, através de estudos de difração de raios-X, que além do ligante se ligar na depressão central, há também uma grande complementariedade em toda a extensão do complexo formado entre RNase A e DNA de fita simples (um desoxirribonucleotídeo).

A Ribonuclease A (RNase A) (E.C. 3.1.27.5), a qual cataliza a clivagem do RNA, é uma das enzimas melhor entendidas (Breslow, 1982). Esta enzima atua na porção interna do seu substrato; portanto, é uma endonuclease e participa tanto da clivagem como da hidrólise do ácido ribonucléico (RNA) (veja seção I.4.2).

Na maioria das espécies, à exceção dos ruminantes, o nível de ribonuclease pancreática é muito baixo (Boyer, 1971). De modo geral, é considerada uma molécula pequena, pois é formada por 124 resíduos de aminoácidos, dentre os quais 24 são carregados. A sua porção amino-terminal



é composta por uma lisina (lys¹) e a carboxi-terminal por uma valina (Val¹²⁴).

Esta proteína é formada por 1860 átomos na ausência de moléculas de água.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990)

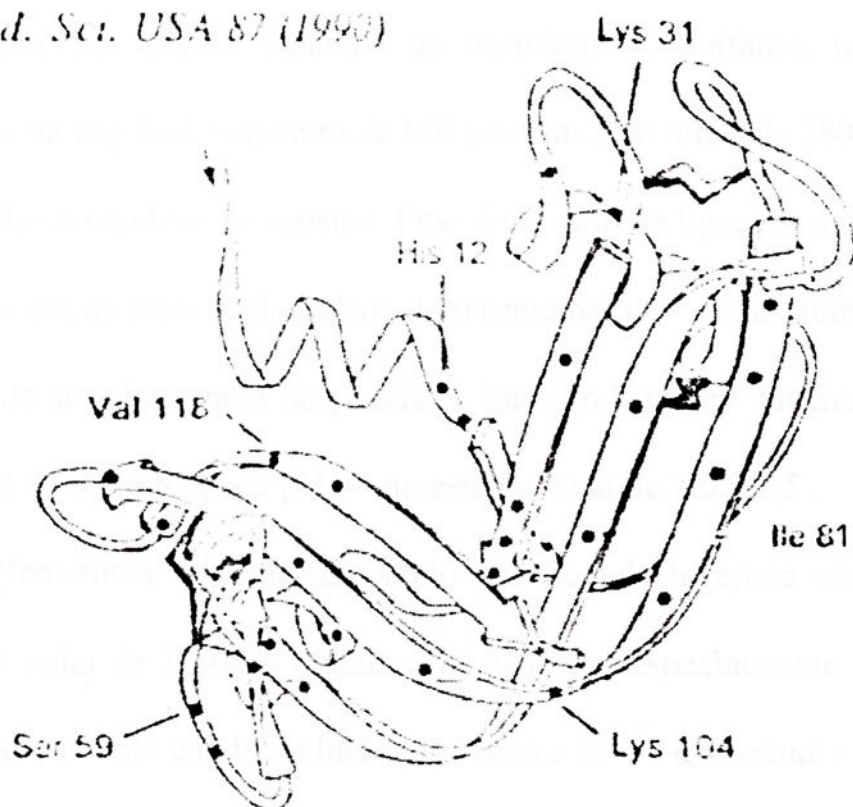


Figura 1. Representação da estrutura tridimensional da RNase A segundo Udgaonkar & Baldwin, PNAS, Vol.87, p. 8198,(1990).

Esta enzima contém quatro pontes de dissulfeto em sua estrutura terciária nativa, ligando os resíduos (26-84, 95-40, 110-58 e 65-72), o que a torna muito estável. Sua estrutura secundária apresenta (3) três α -hélices e (2)

duas β -folhas pregueadas — sendo uma composta de quatro e a outra de três fitas— e algumas porções em “randon coil”. Apresenta ponto isoelétrico em torno de 9,0 e massa molecular da ordem 13,68 Kd (Boyer, 1971).

A RNase A não possui resíduos de triptofano e, portanto, a sua absorção máxima na região do espectro de UV próximo, em torno de 280 nm, é consequência dos 6 resíduos de tirosina. Possui um sítio de ligação com alta constante de associação para nucleotídeos de pirimidina, tais como citidina e uracila. Apesar de ser sintetizada no pâncreas, que produz suco pancreático com pH variando de 8,0 a 8,3, seu pH ótimo esta na faixa de 7,0 a 7,5 .

Embora “fermentos” que afetam ácido nucléico de levedura tenham sido obtidos por volta de 1891, o trabalho de W.Jones, especialmente o de 1920, tem sido usualmente citado na literatura como o início dos estudos com ribonuclease pancreática. A moderna história desta enzima iniciou-se com os trabalhos de cristalização de Kunitz em 1939 (Boyer, 1971).

Anfinsen e White foram quem mais estudaram esta enzima antes de 1959. Posteriormente, Hirs, Stein, Hummel, Rabin e Scheraga et al começaram a realizar vários tipos de estudos com a ribonuclease. Isto, provavelmente, se deve ao seu pequeno tamanho, grande estabilidade e extenso conhecimento da sua estrutura.



1.4.1 Atividade Enzimática

Muitos métodos têm sido descritos na literatura para determinar a atividade da ribonuclease (McDonald, 1955 apud Crook, Mathias, Rabin, 1960). A maioria destes métodos empregam ácido ribonucléico (RNA) ou nucleotídeos tais como citosina monofosfato cíclico (CMP) e uracila monofosfato cíclico (UMP), como substrato.

CMP e UMP têm sido utilizados, nos estudos cinéticos mais recentes apresentados na literatura. A razão para isso é que a degradação de RNA por RNase envolve duas cinéticas distintas: **a)** a despolimerização com conseqüente formação de fosfato cíclico e **b)** a hidrólise deste produto cíclico. Já a cinética, usando nucleotídeos de pirimidina, envolve apenas a fase de hidrólise, que é mais fácil de ser acompanhada.

O primeiro trabalho intensivo para investigar o segundo passo da cinética da ribonuclease foi realizado por Herries et al, estudando a hidrólise do 2'3' CMP no qual os dados apresentam gráficos duplo-recíproco lineares.

Em 1955, Richards descreveu um método para determinar a hidrólise de uracila 2'3'ciclo fosfato (UMP) a qual depende da diferença dos espectros de absorção entre produtos e reagentes (Crook, et. al, 1960.). Nos



experimentos de Kunitz, em 1946, o decréscimo da absorbância (A) medida em 300 nm da solução de RNA comercial de levedura foi medido como uma função do tempo.

Parâmetros cinéticos, como velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x.}$) e constante de Michaelis-Menten (K_M), também podem ser obtidos em função de pH. A partir do gráfico da velocidade de clivagem da RNase A em função do pH, obtém-se uma curva em forma de sino, mostrando que há uma faixa de pH na qual a enzima apresenta uma velocidade máxima.

Estudos recentes mostraram que a razão entre as constantes de Michaelis-Menten (K_M) para poli A (rA) e poli U (rU) é da ordem de $1/10^3$ M (Boyer, 1971). Isto mostra que a enzima tem, provavelmente, maior especificidade para nucleotídeos de pirimidina em relação à nucleotídeos de purina.

Dados da literatura mostram que o RNA, além de ser clivado pela RNase A, também pode ser clivado por tampão imidazol (Breslow & Xu, 1993).



I.4.2. Mecanismo de ação da RNase A

O mecanismo de ação desta enzima, comporta-se como um modelo catalítico de ácido-base (Voet & Voet 1990).

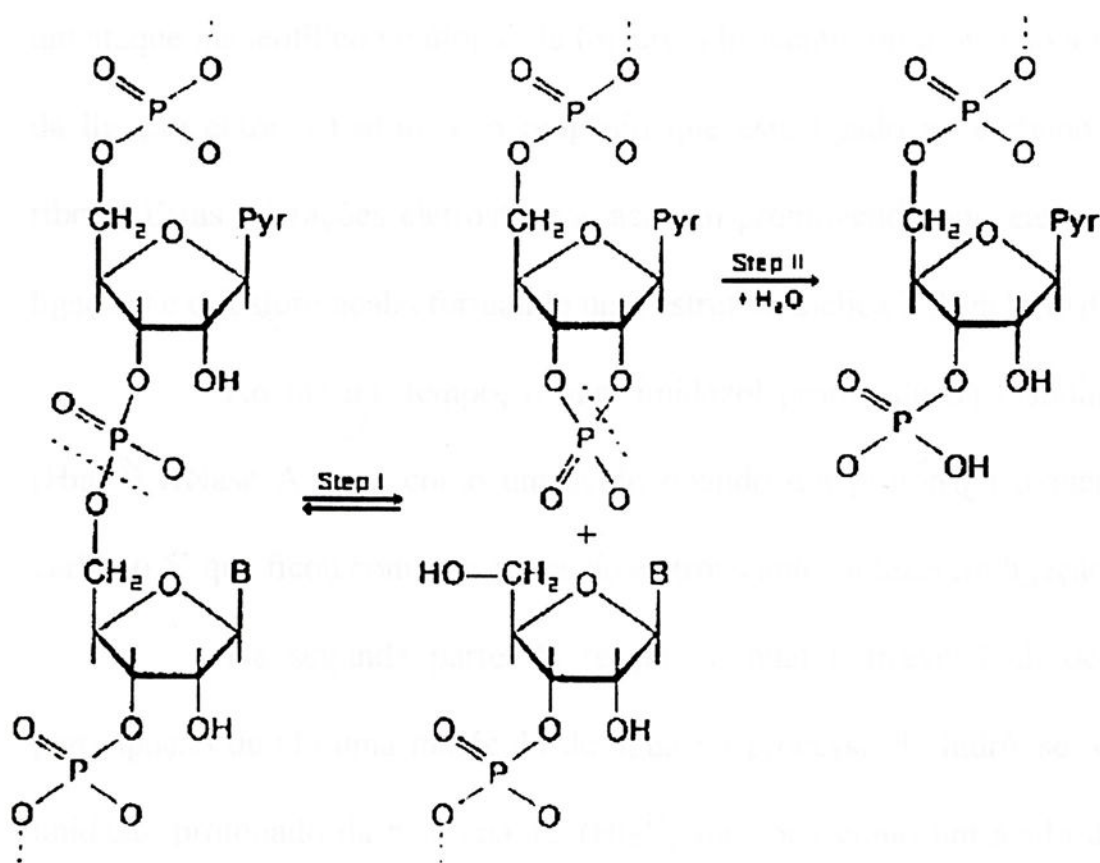


Figura 2. Representação esquemática da clivagem e hidrólise do RNA, reproduzida de Cantor & Schimmel, *Biophysical Chemistry: 'The behavior of biological macromolecules' Part III*, p. 923, 1980.

Na primeira fase da reação, a qual é reversível, o anel imidazol desprotonado da histidina 12 (His¹²) da molécula de RNase A, funciona como uma base retirando o próton do grupo hidroxila ligado ao carbono 2' da ribose do RNA.

Após a saída do próton, o oxigênio, que é mais eletronegativo que o hidrogênio, fica com excesso de carga negativa e acaba promovendo um ataque nucleofílico no átomo de fósforo adjacente, promovendo a quebra da ligação entre o fósforo e o oxigênio que está ligado ao carbono 5' da ribose. Estas interações eletrostáticas acabam promovendo um rearranjo das ligações e o fósforo acaba formando uma estrutura cíclica 2'3'ciclo fosfato.

Ao mesmo tempo, o anel imidazol protonado da histidina 119 (His¹¹⁹) RNase A, atua como um ácido doando um próton ao oxigênio do carbono 5' que ficou com dois pares de elétrons aptos a fazerem ligação.

Na segunda parte da reação, a qual é irreversível, ocorre a participação de (1) uma molécula de água no processo de hidrólise. O anel imidazol protonado da histidina 12 (His¹²) funciona como um ácido doando um próton ao oxigênio do carbono 2' da ribose, enquanto o anel imidazol da histidina 119 (His¹¹⁹) funciona como uma base retirando um próton da água. O oxigênio da hidroxila da molécula de água, se liga ao fosfato do carbono 3'



restabelecendo as quatro ligações do fosfato e acaba formando o nucleotídeo 3' fosfato.

A lisina 41(Lys⁴¹), é outro grupo funcional muito importante neste mecanismo. O seu grupo amônio se liga ao ânion fosfato do RNA, através de pontes de hidrogênio, tornando o RNA mais reativo (Breslow,1993).

Após participar de todo este mecanismo de catálise, a enzima volta a sua conformação original sem sofrer qualquer modificação na sua estrutura.

1.5 VELOCIDADE DE REAÇÃO

É razoável supor que, antes que duas ou mais moléculas possam interagir, elas devam encontrar-se. Portanto, não é surpresa evidenciar que o aumento da concentração de reagentes , acarreta um aumento de velocidade (Morris, 1972). Também, a velocidade de uma reação, é uma medida de quão rapidamente um reagente é consumido ou um produto é formado (Russel, 1981) e, ainda, uma reação química, também pode ser prevista a partir das propriedades termodinâmicas de seus reagentes e produtos. Contudo, isto não diz nada a respeito da sua velocidade ou de seu mecanismo.



Na prática, determina-se que a velocidade de uma reação pode ser expressa como uma função simples das concentrações de reagentes. Portanto, podemos analisar a velocidade de uma reação supondo que esta seja a mais simples possível ou seja, a condição de irreversibilidade de A em B como mostrado abaixo



onde (A) representa reagente e (B) produto. A taxa de reação ou velocidade (V), em qualquer instante de tempo, da formação do produto pode ser expressa como

$$V = \frac{d[B]}{dt} \quad (2)$$

isto é, pela taxa de variação da concentração de $[B]$ por unidade de tempo.

Se para cada (B) produzido, uma molécula de (A) é consumida, podemos, da mesma maneira que na equação anterior, escrever

$$V = \frac{-d[A]}{dt} = \frac{d[B]}{dt} \quad (3)$$

Como a velocidade de formação de (B), é proporcional à concentração de (A) podemos escrever que

$$V_a[A] \quad (4)$$

ou

$$V = k[A] \quad (5)$$

onde k é o fator de proporcionalidade ou a constante de velocidade da reação. Portanto podemos reescrever que

$$V = \frac{-d[A]}{dt} = k[A] \quad (6)$$

1.6 ORDENS DE REAÇÃO

Existem vários métodos para se estabelecer a equação de velocidade de reação e portanto, determinar a sua ordem. Quando se pretende saber qual a ordem de uma reação ou medir a sua constante de velocidade, é conveniente ter uma equação que descreve como a concentração do reagente varia em função do tempo. Deste modo, se considerarmos a equação (6), temos

$$\frac{-d[A]}{dt} = k[A] \quad (7)$$

rearranjando a equação acima e integrando ambos os lados da mesma temos,

$$\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]} = -k \int_{t=0}^t dt \quad (8)$$



a qual, rearranjando, resulta em

$$\ln[A] - \ln[A]_0 = -kt \quad (9)$$

ou

$$\ln \frac{[A]}{[A]_0} = -kt \quad (10)$$

Aplicando a exponencial em ambos os lados da equação temos

$$\frac{[A]}{[A]_0} = e^{-kt} \quad (11)$$

onde $[A]_0$ representa a concentração de (A) no tempo $t=0$ e $[A]$, a concentração de (A) num tempo qualquer. Da equação acima, podemos observar que $[A]$ decresce exponencialmente com o tempo e se a velocidade inicial for proporcional à concentração inicial $[A]_0$, podemos dizer que a reação é de primeira ordem.

No entanto, a maioria dos processos bioquímicos não podem ser descritos por equações simples como $A \rightarrow B$, uma vez que muitas são reversíveis. Então, se tivermos uma reação do tipo



desde que (A) está sendo consumido para a direita com uma constante de velocidade (k) e é formado a partir da esquerda com uma constante de velocidade (k_{-1}), podemos reescrever a equação acima como

$$\frac{d[A]}{dt} = (-k_1 \cdot [A]) + (k_{-1} \cdot [B]) \quad (13)$$

onde k_1 e k_{-1} , são as constantes de velocidade de primeira ordem.

Como no estado de equilíbrio, as velocidades direta e inversa da reação serão iguais, podemos escrever que

$$k_{-1} \cdot [B] = k_1 \cdot [A] \quad (14)$$

ou

$$k_{-1} \cdot [B]_{eq.} - k_1 \cdot [A]_{eq.} = 0 \quad (15)$$

Rearranjando a equação (15), temos

$$\frac{[B]_{eq.}}{[A]_{eq.}} = \frac{k_1}{k_{-1}} = K \quad (16)$$

onde K é a constante de equilíbrio da reação.

A maioria das reações bioquímicas não são de primeira ordem, mas são de segunda ordem ou ordem mais complexas (Mathews & van Hold, 1990). Uma reação de segunda ordem é obtida sempre que dois reagentes interagem entre si para formar produtos. Um exemplo simples é dado abaixo



Como a velocidade da reação é proporcional à concentração do substrato, podemos escrever

$$V = \frac{d[C]}{dt} = k \cdot [A]^2 \quad (18)$$

Se considerarmos que dois moles de (A) são consumidos para produzir um mol de (C) podemos reescrever a equação acima como

$$\frac{d[C]}{dt} = -\frac{1}{2} \cdot \frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A]^2 \quad (19)$$

ou

$$-\frac{1}{2} \cdot \frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A]^2 \quad (20)$$

Integrando ambos os lados da equação (20) temos

$$\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]^2} = -2k \int_{t=0}^{t=t} dt \quad (21)$$

ou

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + 2kt \quad (22)$$

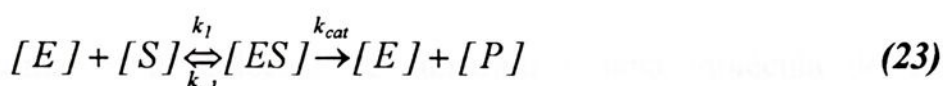
Como sabemos, as reações enzimáticas quando analisadas em detalhe, apresentam equações de velocidade muito mais complexas que as apresentadas anteriormente.

1.7 CINÉTICA ENZIMÁTICA

O estudo de cinética enzimática iniciou-se em 1902 quando Adrian Brown apresentou um trabalho sobre a velocidade de hidrólise da sacarose, quando catalisada pela invertase, hoje conhecida como β -frutofuranosidase (Voet & Voet 1995). Neste trabalho, Brown demonstrou que quando a concentração do substrato é muito maior que a da enzima, a velocidade da reação independe da concentração do substrato.

1.7.1 Análise de Michaelis-Menten

A catálise de reação enzimática, geralmente, ocorre com a formação de um complexo (ES) entre a enzima (E) e o substrato (S). Este complexo pode-se dissociar entre enzima e substrato como também pode sofrer alguma reorganização e formar produtos conforme o modelo abaixo



onde $[E]$ representa a concentração de enzima, $[S]$ a concentração de substrato, $[ES]$ a concentração do complexo e $[P]$ a concentração do produto. A constante de velocidade para a formação do complexo enzimático, é representada por k_1 , enquanto que as constantes de velocidade para a dissociação e redissociação do complexo, são representadas por k_{cat} e k_{-1} , respectivamente.

Em 1913, Leonor Michaelis e Maude Menten , tendo como referência o trabalho de Victor Henri de 1903, propõem um modelo que descreve a velocidade das reações enzimáticas, admitindo a existência de um estado de equilíbrio entre a concentração da enzima, do substrato e do complexo enzimático.



Supondo que a taxa de dissociação ($k_{cat.}$) do complexo é muito menor que a taxa de formação (k_1) e redissociação do complexo (k_{-1}), ou seja, na condição do estado estacionário, podemos admitir que há um equilíbrio entre as concentrações da enzima, substrato e complexo. Portanto, para uma reação enzimática da mais simples possível ou seja, uma molécula de enzima, uma molécula de substrato e uma molécula de complexo, podemos escrever



onde para a equação (24), a constante de dissociação do complexo (ES) pode ser definida como

$$K_d = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (25)$$

Onde K_d é a constante de dissociação no equilíbrio químico. Reescrevendo a equação (25), temos

$$[ES] = \frac{[E] \cdot [S]}{K_d} \quad (26)$$

Como na equação anterior, a concentração da enzima $[E]$, expressa somente a concentração da enzima livre, precisamos de uma equação que expresse a concentração total de enzima. Esta pode ser definida como

$$[E] = [E]_t - [ES] \quad (27)$$

Se substituirmos a equação (27) na equação (26) temos

$$[ES] = \frac{[E]_t \cdot [S]}{K_d} - \frac{[ES] \cdot [S]}{K_d} \quad (28)$$

Somando $+\frac{[ES] \cdot [S]}{K_d}$ nos dois lados da equação temos

$$\frac{[ES] \cdot (K_d + [S])}{K_d} = \frac{[E]_t \cdot [S]}{K_d} \quad (29)$$

e multiplicando ambos os lados da equação por K_d temos

$$[ES] = \frac{[E]_t \cdot [S]}{K_d + [S]} \quad (30)$$

Como a velocidade de formação de produtos ou de catálise ($V_{cat.}$) é proporcional à concentração do complexo formado, podemos escrevê-la como

$$V_{cat.} = k_{cat.} \cdot [ES] \quad (31)$$

Se inserirmos a equação (30) na equação (31), encontraremos que

$$V_{cat.} = \frac{k_{cat.} \cdot [E]_t \cdot [S]}{[S] + K_d} \quad (32)$$

onde a equação acima é denominada de “equação de Michaelis-Menten”.

A altas concentrações de substrato – condição de saturação – cada molécula de enzima esta ligada ao seu substrato e, portanto, ocupada na execução do passo catalítico. Portanto, nesta situação, a velocidade limite ($V_{m\acute{a}x.}$) é aproximada.

A situação de saturação, pode ser expressa, matematicamente, quando $[S] \gg K_d$. Portanto

$$\lim_{[S] \rightarrow \infty} V = \frac{k_{cat.} \cdot [E]_t \cdot [S]}{[S]} \quad (33)$$

Resolvendo a equação (33), temos que

$$\lim_{[S] \rightarrow \infty} V = k_{cat.} \cdot [E]_t \approx V_{m\acute{a}x.} \quad (34)$$

Portanto podemos reescrever a equação (32) como,

$$V_{cat.} = \frac{V_{m\acute{a}x.} \cdot [S]}{[S] + K_d} \quad (35)$$

1.7.2 Equação de Briggs-Haldane

Como nem sempre há um equilíbrio entre enzima, substrato e complexo, ou seja, acaba ocorrendo a formação de produtos e, além disso a $k_{cat.}$ é muito grande comparada com a k_{-1} , o mecanismo de Michaelis-Menten nem sempre ocorre. Diante dessas condições, G. E. Briggs e J. B. S. Haldane propuseram, em 1925, um modelo que ficou conhecido como “modelo de Briggs-Haldane”.

Eles se basearam no fato de que a formação do complexo ocorre muito rapidamente e posteriormente encontra um estado estacionário que permanecerá constante até que toda a concentração do substrato tenha

sendo consumida. Portanto, a taxa de variação do complexo $[ES]$ em função do tempo é dada por

$$\frac{d[ES]}{dt} = (k_1 \cdot [E] \cdot [S]) - \{(k_{-1} \cdot [ES]) - (k_{cat.} \cdot [ES])\} \quad (36)$$

Como no estado estacionário $\frac{d[ES]}{dt} \cong 0$, podemos reescrever a equação acima como

$$[ES] \cong \left(\frac{k_1}{k_{-1} + k_{cat.}} \right) \cdot [E] \cdot [S] \quad (37)$$

Se definirmos que $\left(\frac{k_1}{k_{-1} + k_{cat.}} \right) = \frac{I}{K_M}$, a equação acima é igual a equação (26). Portanto, chegaremos no mesmo resultado final de velocidade de reação e, então, podemos escrever que

$$V_{cat.} = \frac{V_{m\acute{a}x.} \cdot [S]}{[S] + K_M} = \frac{V_{m\acute{a}x.} \cdot [S]}{[S] + K_d} \quad (38)$$

Entretanto, em vez de constante de equilíbrio (K_d), a equação de velocidade de reação no modelo de Briggs-Haldane, envolve uma

razão entre as constantes de velocidade designada de (K_M) sendo expressa como

$$K_M = \left(\frac{k_{-1} + k_{cat.}}{k_1} \right) \quad (39)$$

A equação de velocidade para o modelo de Briggs-Haldane pode ser expressa como

$$V_{cat.} = \frac{V_{max.} \cdot [S]}{[S] + K_M} \quad (40)$$

A razão entre as constantes de velocidade (K_M) só será uma constante de equilíbrio verdadeira quando $k_{cat.} \ll k_{-1}$. Esta constante é freqüentemente associada com a afinidade pelo qual o substrato se liga à enzima. Se (K_M) é muito alto, a ligação do substrato à enzima é muito fraca, contudo esta constante pode ter um valor muito alto também pelo aumento da $k_{cat.}$. Portanto, a interpretação de (K_M) como uma efetiva constante de dissociação no equilíbrio, deve ser vista com um certo cuidado.

A constante catalítica ($k_{cat.}$), é uma medida direta da produção de produtos, e grandes valores desta constante de velocidade



significa que os eventos moleculares foram catalisados muito rapidamente. A unidade da k_{cat} é expressa como o inverso do tempo necessário para uma molécula de enzima catalisar uma molécula de substrato. Portanto, k_{cat} mede o número de moléculas de substrato que são catalisadas pela molécula de enzima por segundo. Esta unidade é conhecida como “turnover number”.

Quando a concentração do substrato é muito menor que a constante de Michaelis $[S] \ll K_M$, ou seja, a maioria das moléculas de enzima estão livres em solução $[E]_t \cong [E]$, podemos escrever que

$$V_{cat.} = \frac{k_{cat.} \cdot [E] \cdot [S]}{K_M} \quad (41)$$

Sob estas condições, a razão $\frac{k_{cat.}}{K_M}$ comporta-se como uma constante de velocidade de segunda ordem e nos dá uma medida de eficiência e especificidade da enzima.

Outro significado abrangente da $\frac{k_{cat.}}{K_M}$ pode ser obtido sob as condições extremas de Briggs-Haldane ou seja, $k_{cat.} \gg k_{-1}$. Nestas condições, o processo catalítico é muito mais rápido e a eficiência da enzima depende totalmente da velocidade de associação do substrato pela enzima.

$$\frac{k_{cat.}}{K_M} = k_I \quad (42)$$

A equação acima mostra que a taxa total de reação enzimática é determinada, nas condições de $k_{cat.} \gg k_{-I}$, somente pela constante de velocidade verdadeira de segunda ordem (k_I) para a combinação entre enzima e substrato.

1.8 INTERAÇÃO DE LIGANTES

Uma extensa variedade de processos biológicos nada mais são que uma consequência da interação de ligantes com macromoléculas, especialmente com proteínas. As mais comuns são interações entre enzimas e seus substratos e outras moléculas que influenciam sua atividade. Como exemplo podemos citar a) a interação entre hormônios e seus receptores, b) entre íons e ambas proteína e ácidos nucleicos e c) entre pequenas moléculas e suas proteínas de transporte. Portanto, fica bem evidente, que os fenômenos biológicos dependem das interações de ligantes.



O estudo da interação de ligantes no estado de equilíbrio, possibilita uma diferenciação dos aspectos termodinâmicos com os de mecanismo geral. Contudo, no equilíbrio, não é possível fazer um estudo mais detalhado do mecanismo geral da interação de ligantes.

Todos os sistemas biológicos apresentam um comportamento muito dinâmico. As propriedades fisiológicas têm na sua essência, propriedades dinâmicas como é o caso das catálises enzimáticas, transporte ativo através da membrana, ativação e repressão gênica, entre outros exemplos (Cantor & Schimel, 1980).

Um modelo simples que descreve a interação de ligantes no equilíbrio, é apresentado abaixo:



onde $[P]$ representa a concentração de proteína, $[L]$ a concentração do ligante e $[PL]$ o complexo proteína/ligante.

1.9 EFEITO DE ÁGUA EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

A molécula de água, uma molécula polar, apresenta uma disposição geométrica com uma distância de ligação O-H de 0,958 Å, e um ângulo de 104,5° entre HOH. Uma característica muito importante da molécula de água, devido a sua geometria, é a capacidade de formar, muito facilmente, pontes de hidrogênio, bem como apresentar alta viscosidade, alta tensão superficial e alta constante dielétrica.

Como a água é o constituinte fundamental dos diferentes tipos de células – perfaz até 70% ou mais do peso da maioria das formas de vida –, pode-se dizer que ela é o meio natural onde ocorrem processos biológicos essenciais tais como: **a)** transporte de nutrientes, **b)** transferência de energia química e **c)** reações metabólicas catalisadas por enzimas. Portanto, tanto os aspectos estruturais quanto os funcionais das células, são adaptados às propriedades físicas e químicas da água (Lehninger, 1990).

Também pelo fato de se encontrar em todas as partes nos diferentes tipos celulares, pode-se dizer que a água deve influenciar as mais diversas reações envolvendo proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos,



carboidratos e pequenos metabólitos, desde que mudanças de hidratação macromolecular acompanhem estas reações.

A figura 3, mostra uma representação da provável participação de moléculas de água, envolvidas na reação de complexação de uma enzima com seu substrato que ocorre em meio aquoso.

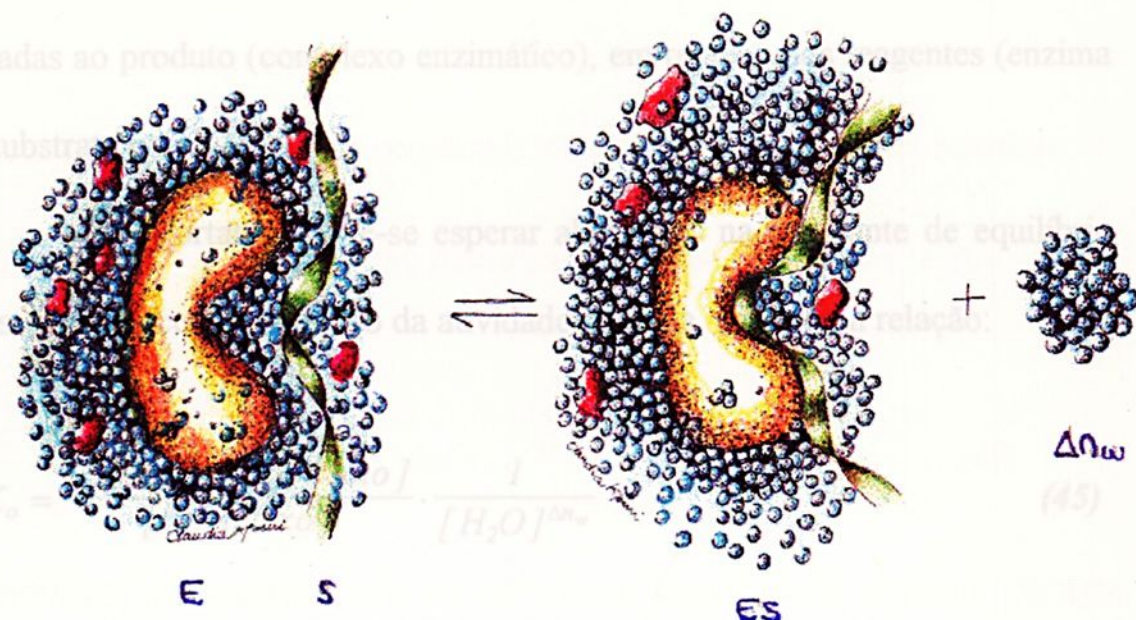
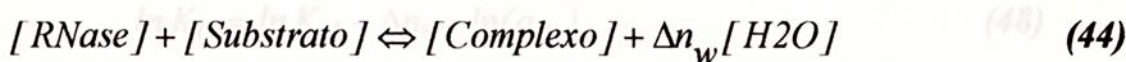


Figura 3: Representação esquemática da participação de moléculas de água envolvidas na reação de complexação entre enzima e substrato. (Figura gentilmente cedida por Cláudia Kfourri).

Neste modelo, apresentado na figura acima, supõe-se que deve haver a liberação de um grande número de moléculas de água de hidratação para a solução, quando o substrato liga-se à enzima devido à substituição de contatos enzima-água e substrato-água por contatos enzima-substrato.

A descrição deste processo, do ponto de vista do equilíbrio de reação, é mostrado abaixo:



onde Δn_w representa a diferença entre o número de moléculas de água ligadas ao produto (complexo enzimático), em relação aos reagentes (enzima e substrato).

Portanto, deve-se esperar alterações na constante de equilíbrio desta reação com a variação da atividade de água, segundo a relação:

$$K_o = \frac{[RNase] \cdot [Subtrato]}{[Complexo]} \cdot \frac{1}{[H_2O]^{\Delta n_w}} \quad (45)$$

onde K_o é a constante de dissociação no estado de referência, ou seja, onde o valor da atividade de água é unitário ($a_w = 1$). Em termos da atividade de água, a equação (45) toma a forma

$$K_o = \frac{[RNase] \cdot [Subtrato]}{[Complexo]} \cdot \frac{1}{a_w^{\Delta n_w}} \quad (46)$$

Obtendo o logaritmo em ambos os lados da equação, temos

$$\ln K_o = \ln \left(\frac{[RNase] \cdot [Subtrato]}{[Complexo]} \right) - \Delta n_w \cdot \ln(a_w) \quad (47)$$

ou

$$\ln K_o = \ln K_d - \Delta n_w \cdot \ln(a_w) \quad (48)$$

onde K_d é a constante de dissociação observada no equilíbrio entre enzima, substrato e complexo à uma dada atividade de água (a_w). Se tratarmos esta constante em função das constantes de velocidade, podemos substituir K_d por $K_M = (\frac{k_{-1} + k_{cat.}}{k_1})$. Então, rearranjando a equação anterior temos

$$\ln K_o = \ln K_M - \Delta n_w \cdot \ln(a_w) \quad (49)$$

Derivando a equação acima em relação ao logaritmo da atividade de água ($\ln a_w$), temos

$$\frac{d \ln K_M}{d \ln a_w} = \frac{d \ln K_o}{d \ln a_w} + \Delta n_w \cdot \frac{d \ln a_w}{d \ln a_w} \quad (50)$$

Como $\ln K_o$ não varia com a variação de $\ln a_w$ pois K_o é uma constante que depende apenas da pressão e da temperatura e não da atividade de água em solução, podemos reescrever a equação acima como

$$\frac{d \ln K_M}{d \ln a_w} = +\Delta n_w \quad (51)$$

Esta equação prediz que a constante de Michaelis-Menten com a atividade de água será linear se a variação de hidratação (Δn_w) entre o complexo (ES) e enzima (E) e substrato (S) livres for constante. Ademais, o coeficiente angular da reta no gráfico de $\ln K_M$ versus $\ln a_w$ fornece uma medida do número aparente de moléculas de água envolvidos no processo.

A equação acima é análoga às equações de linkage de Wyman (Wyman, 1964) e foi utilizada originalmente por Colombo (Colombo, 1992) para a obtenção da variação da hidratação que acompanha a oxigenação da hemoglobina. Desde então, este tipo de equação tem sido utilizado para o estudo do efeito da água em diversas outras reações.

Em seguida, apresentamos o método de controle da atividade de água (a_w) pela adição de osmólitos à solução de medida. Estes osmólitos atuam como tampão da atividade de água e, preferencialmente, não interagem com as macromoléculas em solução e, portanto, não participam diretamente da reação em estudo (Arakawa & Timasheff, 1985).



1.10 EFEITO DE OSMÓLITOS SOBRE A ATIVIDADE DE ÁGUA

Como sabemos, a célula –um meio aquoso– é o cenário natural para a maioria das reações bioquímicas, uma vez que apresenta temperatura e pressão relativamente baixa e constante. Neste ambiente também encontramos solutos neutros naturais tais como açúcares, polióis e aminoácidos. Estes solutos, também conhecidos por osmólitos, são acumulados na célula quando a mesma se encontra sob stress osmótico e de temperatura e, portanto, são importantes pois exercem um papel de proteção não só à própria célula como também às organelas celulares (Yancey, 1982).

Outro papel importante dos osmólitos é a estabilização de macromoléculas biológicas contra a desnaturação (Santoro et al, 1992). Esta propriedade é atribuída ao fato dos osmólitos não interagirem diretamente com as macromoléculas (Lee, Timasheff e Arakawa, 1985), mas de os mesmos serem preferencialmente excluídos da superfície e das camadas de hidratação mais próximas às macromoléculas.



Como a atividade de água (a_w) depende intrinsecamente da concentração de solutos na solução, a adição de osmólitos à solução, que potencialmente não interagem diretamente com os componentes da reação, permite o controle experimental da atividade de água (a_w).

Se considerarmos uma solução ideal, composta pela água, macromolécula e soluto e como a concentração da macromolécula é sempre muitíssimo menor que a de água e de soluto, a atividade de água é aproximadamente igual à fração molar de água (χ_w), isto é,

$$a_w = \chi_w = \frac{n_w}{n_w + n_s} \quad (52)$$

onde (n_w) e (n_s) representa, respectivamente, o número de moles de água da solução e do soluto. O logaritmo natural de a_w é dado por

$$\ln a_w \cong \ln \chi_w = \ln(1 - \chi_s) \quad (53)$$

onde $\chi_s = n_s / n_s + n_w$ é a fração molar do soluto.

Com $\chi_s \ll 1$, podemos aproximar a atividade de água.

Portanto, temos

$$\ln a_w \approx -\chi_s = -\frac{n_s}{n_s + n_w} \quad (54)$$

No entanto, para soluções reais, usa-se medir a osmolalidade (Osm) que é uma medida do número de partículas do soluto efetivamente dissolvidos em um quilograma de solução, isto é, 55,5 moles quando o solvente é a água. Portanto, $\ln a_w$ é, efetivamente, obtido pela relação abaixo

$$\ln a_w = \frac{(-Osm.)}{55,5} \quad (55)$$

1.11 OBJETIVOS DESTE ESTUDO

Grande parte dos efeitos de solutos sobre as características de ligação de ligantes às proteínas e sobre a cinética de diversas enzimas, publicados ao longo dos últimos anos, foram atribuídos a) à mudanças da constante dielétrica do meio; b) à ligação preferencial do soluto à proteína e , mais raramente, c) à variação da atividade de água.

No entanto, estudos recentes realizados por Colombo e colaboradores (Colombo et al, 1992,1994), sobre o efeito de solutos neutros e concentração salina (NaCl) (Colombo e Bonilla-Rodrigues, 1996) sobre a oxigenação da Hemoglobina, forneceram evidências de que a afinidade desta



proteína ao oxigênio é sensível à variação da atividade de água do meio. Estes autores apresentaram, também, evidências que descartam a possibilidade de que o efeito desta reação se deva à mudanças da constante dielétrica ou da ligação preferencial do soluto (Colombo e Bonilla-Rodrigues, 1996) e da força iônica da solução.

Colombo e colaboradores atribuíram esta dependência da afinidade da hemoglobina por oxigênio à diferença de hidratação entre estruturas da oxi e desoxihemoglobina, cujo equilíbrio é responsável pelo controle alostérico da ligação cooperativa do oxigênio à hemoglobina.

Por outro lado, uma série de estudos realizados principalmente por Arakawa e Timasheff têm demonstrado que a maioria dos solutos neutros, como açúcares e polióis, são excluídos da superfície protéica e promovem a hidratação preferencial de proteínas nativas (Arakawa et al, 1985).

Estes resultados implicam que a ligação preferencial destes solutos só ocorre no caso de haver algum sítio específico para o soluto na proteína e, ainda, que a constante dielétrica junto à superfície protéica deve ser pouco afetada pela presença dos solutos na solução. Eles também indicam a possibilidade de se interpretar mudanças conformacionais, mudanças de afinidade por ligantes e de características cinéticas, como reflexo das mudanças de atividade de água (a_w).



Como, provavelmente, as reações bioquímicas são sensíveis à pequenas variações de atividade de água, que podem ocorrer ao nível fisiológico, há a possibilidade de que determinadas reações possam ser controladas por água *in vivo*. Portanto, na tentativa de se encontrar um provável efeito de água em sistemas biológicos, escolhemos um sistema dinâmico, como são os enzimáticos.

Procuramos, neste trabalho, investigar o papel da água na atividade enzimática da ribonuclease A (RNase A), variando a atividade de água da solução através do acréscimo de osmólitos, em particular sacarose e sorbitol buscando quantificar a variação de hidratação (Δn_w) envolvidas na cinética de clivagem e hidrólise do ácido ribonucléico (RNA) bem como a variação de hidratação envolvida na cinética de hidrólise do 2'3' citidina monofosfato cíclico (C>p).

Nossa análise também considerou a variação da viscosidade da solução em função da adição de osmólitos, sobre os parâmetros cinéticos da reação que dependem de difusão molecular.



II. MATERIAIS E MÉTODOS

II.1 Preparações de Soluções

Todas as soluções empregadas neste trabalho, foram preparadas fazendo uso de reagentes de grau analítico, bem como o uso de água Milli-Q ultra-pura. As concentrações das diversas soluções de RNA e RNase A foram determinadas por espectrofotometria. Após a preparação, todas as soluções foram filtradas com filtro de 0,22 μm da Millipore e, posteriormente, armazenadas a uma temperatura média de 5°C a 10°C.

Na execução dos experimentos, à exceção da solução de enzima armazenada aproximadamente a 4°C, todas as demais soluções ficavam a uma temperatura ambiente de 25°C.

A solução de Ribonuclease A pâncreas bovino (RNase A) empregada nos ensaios enzimáticos quando a mesma era ensaiada com RNA, foi preparada em tampão acetato de sódio (0,05 M pH 5,0 à 25°C). Entretanto, quando a solução de RNase A era ensaiada com 2'3' citidina cíclico monofosfato (2'3'CMP), a mesma foi preparada em tampão Tris NaCl (0,1 M pH 7,0 à 25°C).



Todas as soluções de ácido ribonucléico (RNA) empregadas neste trabalho, foram preparadas em tampão acetato de sódio (0,05 M pH 5,0 à 25°C), enquanto que todas as soluções de 2'3' citidina cíclico monofosfato (2'3'CMP) foram preparadas em tampão Tris NaCl (0,1 M pH 7,0 à 25°C).

As soluções de sacarose bem como as soluções de d-sorbitol, também foram preparadas em tampão acetato de sódio (0,05 M pH 5,0 à 25°C) e tampão Tris NaCl (0,1 M pH 7,0 à 25°C).

Com exceção da Sacarose que foi adquirida da Merck Corp., todos os demais reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical Company.

II.2 Determinação de Osmolalidades

Após o término dos ensaios enzimáticos, retirávamos a solução de ensaio da cubeta de referência, cuja concentração de osmólitos era idêntica à da amostra, e obtínhamos a sua osmolalidade usando um osmômetro (osmette A).

Este procedimento foi usado para obter as osmolalidade das soluções de RNA e 2'3'CMP na presença e ausência de sacarose ou sorbitol.



II.3 Dependência da viscosidade da solução com a concentração de Sacarose, Sorbitol e Glicerol.

A figura 4 mostra o gráfico de $\ln(\eta/\eta_0)$ (viscosidade relativa) em função da osmolalidade sacarose, sorbitol e glicerol. Estes dados foram retirados do Handbook of Chemical Physics, 68th Ed., pag.D-262. Note-se que $\ln(\eta/\eta_0)$ varia linearmente com as concentrações dos diferentes solutos, segundo a equação abaixo:

$$\ln(\eta/\eta_0) = a \cdot [\text{Osmol.}] \quad (56)$$

onde a é o coeficiente angular da reta. Na tabela abaixo, apresentamos os diferentes valores do coeficiente angular para os três diferentes solutos

Tabela 1. Dependência da Viscosidade relativa com a Osmolalidade segundo a equação (56).

SOLUTO	a
Sacarose	$0,83 \pm 0,004$
Sorbitol	$0,52 \pm 0,015$
Glicerol	$0,19 \pm 0,003$



Note também que $\ln a_w$ também varia proporcionalmente à concentração osmolal conforme a equação 55.

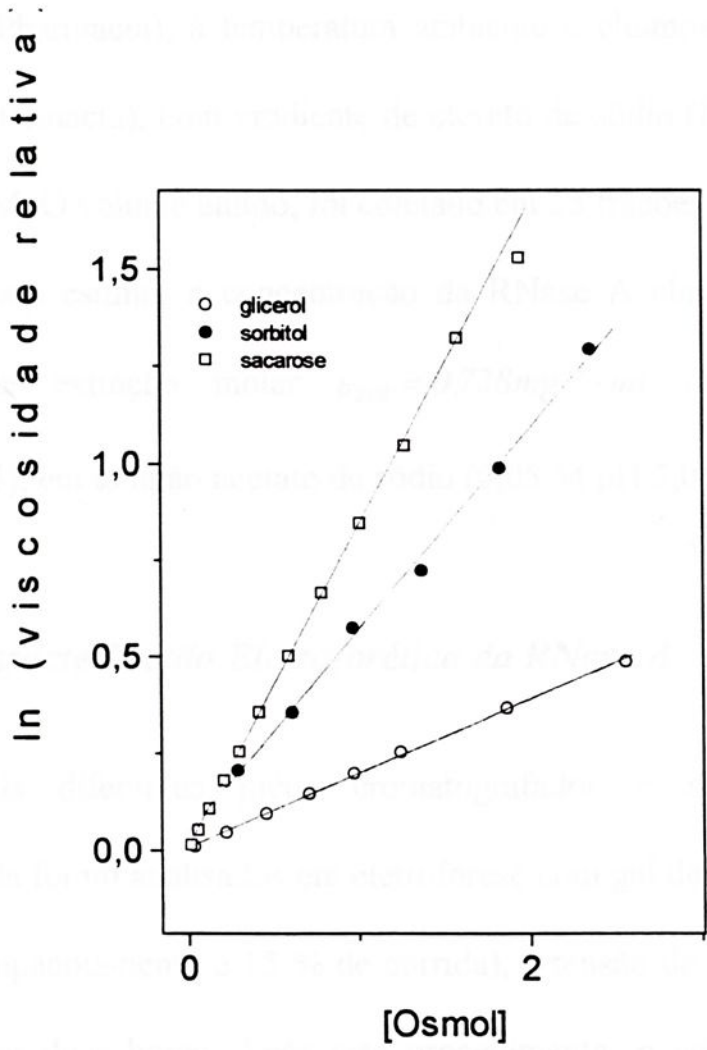


Figura 4. Dependência da viscosidade relativa com a osmolalidade.



II.4 Purificação da Ribonuclease A (RNase A)

Preparamos uma solução estoque de RNase A 3 mg/ml em tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 6,4 à 25°C, (Hirs et al, 1953). Posteriormente, aplicamos 1 ml desta solução estoque numa coluna catiônica (Resource S, Pharmacia), à temperatura ambiente e eluímos a amostra em uma FPLC (Pharmacia), com gradiente de cloreto de sódio (NaCl), variando de 0,01 a 0,5 M. O volume eluído, foi coletado em 25 frações da coluna.

Para estimar a concentração da RNase A eluída, usamos um coeficiente de extinção molar $\epsilon_{278} = 0,738 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Scott & Scheraga, 1963), em tampão acetato de sódio (0,05 M pH 5,0 à 25°C).

II.5 Caracterização Eletroforética da RNase A

Os diferentes picos cromatografados e a proteína não cromatografada foram analisados em eletroforese com gel de poliacrilamida (gel 5 % de empacotamento e 15 % de corrida), à tensão de 80 V e corrente de 37 mA, por duas horas. Após este procedimento, o gel é corado com nitrato de prata 0,1% por 1/2 hora para revelar as bandas de proteína.



II.6 Caracterização Espectral de Macromoléculas Biológicas

II.6.1 Ácido Polirribonucléico (RNA)

Os espectros de absorção ótica foram obtidos na região do ultra-violeta, em espectrofotômetro Varian Cary 3E. Foi preparado uma solução estoque de RNA de levedura a uma concentração de $2,0 \times 10^{-2}$ M/fosfato em tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 5,0 e 25°C). A solução estoque de RNase A foi de $2,27 \times 10^{-5}$ M no mesmo tampão acima.

A concentração da solução de RNA de levedura à pH 5,0 foi obtida usando o mesmo coeficiente de extinção molar para RNA à pH 7,0 $\epsilon_{258} = 7,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Friefelder, 1982). Isto é razoável pois, neste comprimento de onda ,praticamente não houve variação significativa nos espectros de absorção do RNA (258 nm) a pH 5,0 e a pH 7,0.

Para determinar os espectros de absorção ótica do RNA, conforme mostrado na figura 3, o espectrofotômetro foi zerado na faixa de 220 a 320 nm com 2,0 ml de tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 5,0 e 25°C) na cubeta de amostra e mesmo volume na de referência. Posteriormente foi acrescentado um volume de RNA, no mesmo tampão



acima, na cubeta de amostra para uma concentração final de $2,0 \times 10^{-4}$ M. A concentração final de RNase A foi de $3,75 \times 10^{-8}$ M.

II.6.2 2'3'Citidina Monofosfato Cíclico (2'3'CMP)

Herries et al (1962), nos seus estudos espectrofotométricos de cinética de hidrólise do 2'3' CMP, trabalhou com uma faixa de concentração de substrato de 0,28 a $5,54 \times 10^{-4}$ M em tampão acetato de sódio à pH5,0.

No entanto, os dados experimentais da cinética de hidrólise do 2'3' CMP apresentados neste trabalho, foram obtidos com a concentração do substrato variando na faixa de 0,37 a $6,25 \times 10^{-4}$ M em tampão (Tris-NaCl 0,1 M e pH 7,0), o qual foi o mesmo tampão empregado por Crook et al (1960) nos seus estudos cinéticos com 2'3' CMP.

A concentração da solução de 2'3'CMP foi obtida usando um coeficiente de extinção molar $\epsilon_{271} = 8,75 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e usando, como referência, o coeficiente de extinção molar do 3' CMP $\epsilon_{271}^{3'} = 9,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Cathou et al, 1964). O coeficiente de extinção molar do 2'3' fosfato cíclico foi determinado conforme a equação abaixo:



$$\frac{A_{271}^{2'3'}}{A_{271}^{3'}} = \frac{\epsilon_{271}^{2'3'} \cdot [2'3']}{\epsilon_{271}^{3'} \cdot [3']} \quad (57)$$

Os espectros de absorção ótica do 2'3'CMP e 3' CMP são apresentados na figura 16.

II.7 Determinação de Atividade Enzimática

A atividade enzimática das frações coletadas, foram determinadas espectrofotometricamente segundo o método de Kunitz (1946) como descrito abaixo:

Como o valor da absorbância (A) decresce linearmente com o tempo, pelo menos durante a fase inicial da reação, a taxa de decréscimo da absorbância será proporcional à concentração da enzima em solução.

Portanto,

$$-\frac{dA}{dt} = k \cdot [E] \quad (58)$$



onde dA é a variação infinitesimal de absorvância, dt é a variação infinitesimal do tempo, k é a constante de proporcionalidade e $[E]$ é a concentração molar da enzima em solução. Esta é uma expressão aproximada para a relação entre a mudança da absorvância com o tempo e a concentração da enzima em solução. Todavia, foi mostrado por Kunitz (1946) que a equação abaixo é mais abrangente.

$$-\frac{dA}{dt} = k \cdot [E] \cdot (A_t - A_f) \quad (59)$$

onde A_t é a absorvância num dado tempo qualquer e A_f é a absorvância quando toda a reação já se processou.



Como esta equação é do tipo unimolecular¹, uma vez que a concentração molar da enzima $[E]$ é aparentemente constante durante todo o curso da reação, podemos reescrevê-la da seguinte maneira:

$$-\frac{dA}{(A_t - A_f)} = k \cdot [E] \cdot dt \quad (60)$$

e integrando a equação (59), obtemos

$$\int_{A_0}^{A_t} -\frac{dA}{(A_t - A_f)} = \int_{t_0=0}^{t=t} k \cdot [E] \cdot dt \quad (61)$$

obtendo o logaritmo em ambos os lados da equação anterior, resulta que

¹ Uma equação do tipo unimolecular, pode ser descrita conforme o modelo abaixo:

Em um instante qualquer da reação, a absorbância pode ser definida conforme a equação abaixo

$$A_t = R \cdot \epsilon_R + C \cdot \epsilon_C$$

onde R é a concentração de RNA não clivado, C é a concentração de RNA clivado. ϵ_R e ϵ_C são os respectivos coeficientes de extinção molar.

Quando toda a reação já se processou, a absorbância pode ser reescrita conforme a equação abaixo

$$A_f = (R + C) \cdot \epsilon_C$$

Derivando a equação anterior em função do tempo, temos:

$$dA/dt = \epsilon_R \cdot dR/dt + \epsilon_C \cdot dC/dt = (\epsilon_R - \epsilon_C) \cdot dR/dt$$

e rearranjando a equação acima, temos

$$A_t - A_f = R \cdot (\epsilon_R - \epsilon_C) + C \cdot (\epsilon_C - \epsilon_C) = R \cdot (\epsilon_R - \epsilon_C)$$

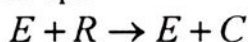
A equação anterior pode ser reescrita como

$$(\epsilon_R - \epsilon_C) \cdot dR/dt = k \cdot [E] \cdot R \cdot (\epsilon_R - \epsilon_C)$$

onde E, representa a concentração de enzima. Portanto, podemos escrever que

$$dR/dt = k \cdot [E] \cdot R$$

Esta equação descreve uma reação do tipo



que é uma reação de primeira ordem em relação a E com R fixo ou vice-versa.

$$\ln(A_t - A_f) - \ln(A_0 - A_f) = -k \cdot [E] \cdot (t - 0) \quad (62)$$

Rearranjando a equação (62), temos:

$$\log(A_t - A_f) = -\frac{k \cdot [E]}{2,3} \cdot t + \log(A_0 - A_f) \quad (63)$$

onde k , é a constante de proporcionalidade ou atividade enzimática. Esta constante é definida como:

$$k = \frac{-(\operatorname{tg} \theta) \cdot 2,3}{[E]} \quad (64)$$

onde

$$\operatorname{tg} \theta = \frac{d \log(A_t - A_f)}{dt} \quad (65)$$

Isto é, $\operatorname{tg} \theta$ é a inclinação do gráfico do logaritmo da diferença entre a absorbância no tempo (t) qualquer e a absorbância final versus o tempo.

II.8 Ensaio Enzimático do RNA

Todos os ensaios enzimáticos com RNA foram feitos em cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm em espectrofotômetro da Varian 3E uv/visível e termostatizado à $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Nestes ensaios, todas as soluções do ácido ribonucleico (RNA), ribonuclease A e sacarose foram preparadas com tampão acetato de sódio 0,05 M e pH 5,0 à 25°C . O volume final da reação de mistura sempre foi de 2,0 ml.

II.9 Ensaio enzimático do 2'3'CMP

Todos os ensaios enzimáticos com o mononucleotídeo, foram feitos em cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm em espectrofotômetro da Varian 3E uv/visível com a temperatura mantida constante à $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Nestes ensaios, todas as soluções de 2'3'citidina, sacarose e sorbitol, foram preparadas com tampão tris (0.1 M, NaCl 0.1 M e pH 7.0 à 25°C). O volume final da reação de mistura sempre foi de 2,0 ml.



II. 10 Determinação da Velocidade Inicial

II.10.1 RNA

Para a reação na qual usamos RNA como substrato para a reação enzimática com a RNase A, os cálculos de velocidade inicial foram realizadas ajustando-se a variação da densidade óptica a 300 nm com o tempo por regressão linear, no intervalo de tempo de 1 a 5 minutos. Esta velocidade é dada pelo coeficiente angular do ajuste linear da densidade óptica em função do tempo.

Foram realizados vários ensaios enzimáticos no qual a concentração da RNase A foi mantida constante a $3,75 \times 10^{-8}$ M enquanto que a concentração do RNA variou de $1,0 \times 10^{-4}$ a $18,0 \times 10^{-4}$ M.

II.10.2 2'3' CMP

Para a reação na qual usamos 2'3' CMP como substrato, os cálculos de velocidade foram obtidos de duas maneiras:) a) uma pelo mesmo método descrito para o RNA, mas com a variação espectral obtida



em 285 nm e o intervalo de tempo entre 0 (zero) e 3 (três) minutos e a outra b), emprega o método descrito por Crook et al (1960) na qual a velocidade inicial era obtida segundo a equação abaixo:

$$V_i = -2,303 \cdot A_\infty \cdot tga \quad (66)$$

onde

$$tga = \left(\frac{d \log(A_\infty - A_t)}{dt} \right) \quad (67)$$

e rearranjando a equação (59), temos

$$A_\infty = A_0 + \{[2'3'] \cdot (\epsilon^{3'} - \epsilon^{2'3'})\} \quad (68)$$

onde A_0 é a absorbância inicial, $\epsilon_{285}^{3'}$ é o coeficiente de extinção molar da citidina 3' fosfato a pH 7,0 e $\epsilon_{285}^{2'3'}$ é o coeficiente de extinção molar do 2'3'citidina a pH 7,0.

Portanto, podemos definir a velocidade inicial como:

$$V_i = -2,303 \cdot A_\infty \cdot \frac{d \log(A_\infty - A_t)}{dt} \quad (69)$$

De uma maneira geral, os valores de velocidade inicial obtidos com os dois métodos são próximos. Entretanto, os dados de



velocidade inicial, apresentados neste trabalho, foram aqueles obtidos com o método linear. Ao nosso ver, o método linear acarreta menor erro, pois, diferentemente do método de Crook (1960), não requer o cálculo da absorbância final (A_{∞}) da solução.

II.11 Análise de dados cinéticos

Uma maneira de se analisar os dados cinéticos obtidos das velocidades iniciais da reação é rearranjar a equação de Michaelis-Menten de modo que a velocidade inicial seja uma função linear da concentração de substrato. Uma forma de representar graficamente esta equação é dada pelo gráfico de “Lineweaver-Burk”, onde a equação de Michaeliana é linearizada. Esta equação é mostrada abaixo

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\text{máx.}} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{\text{máx.}}} \quad (70)$$

Esta equação prediz que o comportamento do inverso da velocidade inicial com o inverso da concentração de substrato, é linear. A constante de Michaelis-Menten pode ser obtida pela extrapolação da reta no



eixo da abscissa ($\frac{1}{S}$). A velocidade máxima é definida no intercepto da reta com o eixo da ordenada ($\frac{1}{V}$). A desvantagem de se utilizar este gráfico reside na longa extrapolação da reta para se obter K_M a partir do eixo da abscissa.

Uma outra maneira para se analisar os dados experimentais de cinética, é usar o gráfico de “Eadie-Hofstee”, que consiste em rearranjar a equação Michaeliana, diferentemente de Lineweaver-Burk. A equação é apresentada abaixo

$$V = V_{\text{máx.}} - \frac{K_M \cdot V}{[S]} \quad (71)$$

onde $\frac{V}{[S]}$ é plotado contra V . O valor de $V_{\text{máx.}}$ é obtido do pelo intercepto da reta no eixo da abscissa e K_M pelo coeficiente angular da reta.

Entretanto, a melhor maneira de se obter os parâmetros cinéticos $V_{\text{máx.}}$ e K_M , é ajustar os dados experimentais diretamente à equação Michaeliana (Di Cera, 1990).

III. RESULTADOS

III.1 Dicroísmo Circular (CD)

Os experimentos a serem apresentados neste capítulo visam determinar o efeito da variação da atividade de água sobre as características cinéticas de despolimerização de RNA e de hidrólise do 2'3' CMP catalizadas pela RNase A. Dado que o controle da atividade de água da solução de ensaio exige a adição de solutos neutros à esta solução, investigou-se a presença destes solutos neutros afeta de alguma forma a conformação ou da RNase A ou do RNA. Para tanto, o espectro de dicroismos circular (CD) da proteína e do ácido ribonucléico foram medidos na presença e ausência de sacarose. Esta técnica permite determinar possíveis mudanças na estrutura secundária destas macromoléculas.

III.1.1 CD RNA

A figura 5 apresenta os espectros de dicroísmo circular (CD) do ácido ribonucléico (RNA) na ausência e presença de 2M de sacarose. Nota-se que a adição de sacarose à solução de RNA não altera o seu espectro de dicroísmo circular. Isto mostra que a estrutura secundária do RNA não é afetada pela presença de sacarose em solução.



III.1.2 CD RNase A

A figura 6, mostra os espectros de dicroísmo circular (CD) da

ribonuclease A (RNase A) na ausência e presença de sacarose à 2.0 M. Nota-se que há um pequeno deslocamento do espectro (200 a 210 nm) da enzima, na ausência de sacarose em relação ao espectro da enzima na presença de 2.0 M de sacarose. Entretanto, esta mudança não é significativa a ponto de ser considerada como uma perturbação na sua estrutura secundária.

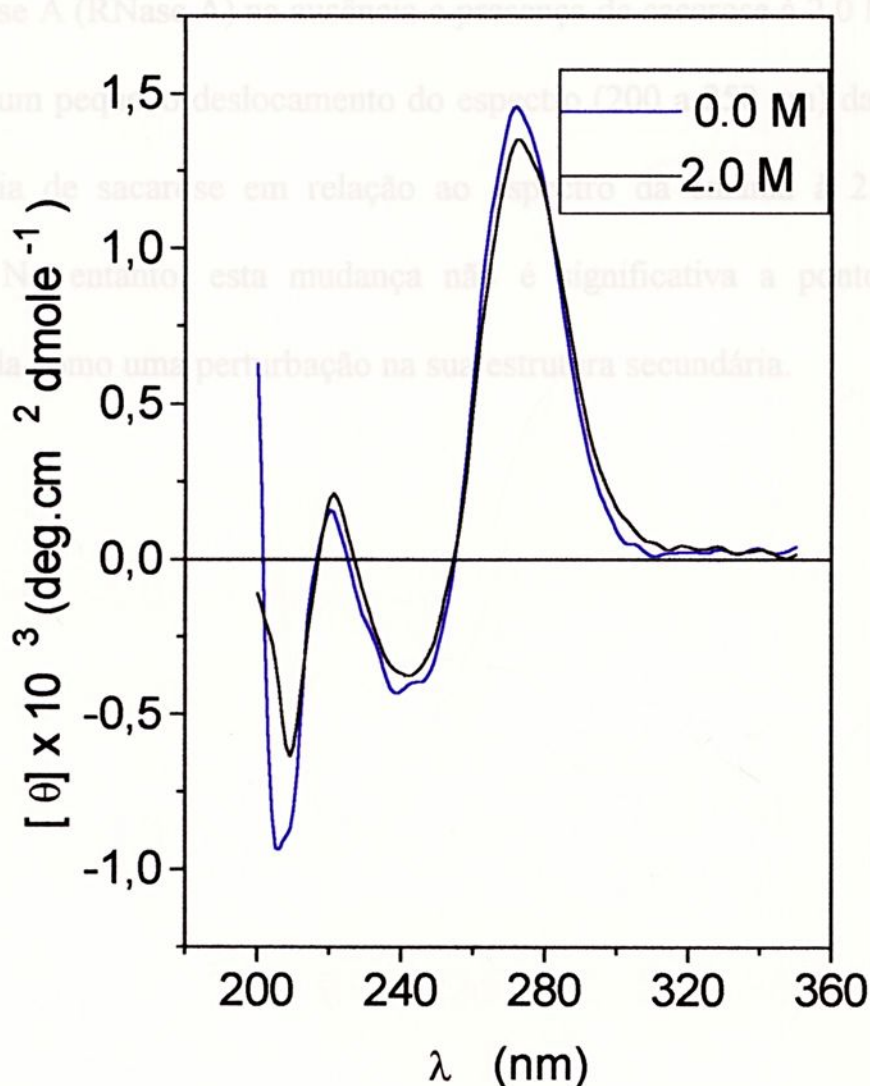


Figura 5. Espectros de Dicroísmo Circular (CD) do ácido ribonucléico (RNA) de levedura a $6,47 \times 10^{-4}$ M em tampão acetato de sódio (0,05 M pH 5,0 à 25°C), na ausência e presença de solução de sacarose à 2.0 M. Os espectros apresentados acima foram obtidos após subtração da linha de base.

III.1.2 CD RNase A

A figura 6, mostra os espectros de dicroísmo circular (CD) da ribonuclease A (RNase A) na ausência e presença de sacarose à 2,0 M. Nota-se que há um pequeno deslocamento do espectro (200 a 250 nm) da enzima, na ausência de sacarose em relação ao espectro da enzima à 2.0 M de sacarose. No entanto, esta mudança não é significativa a ponto de ser considerada como uma perturbação na sua estrutura secundária.



Figura 6. Espectros de Dicroísmo Circular (CD) da ribonuclease A (RNase A) a 10^{-4} M no tampão acetato de sódio (0,05 M) pH 5,0 a 25°C com concentração de sacarose variando de 0 a 2,0 M. Os espectros apresentados foram os obtidos após subtração do sinal de ruído.

III.2 Efeito de sacarose sobre a cinética RNase A/RNA

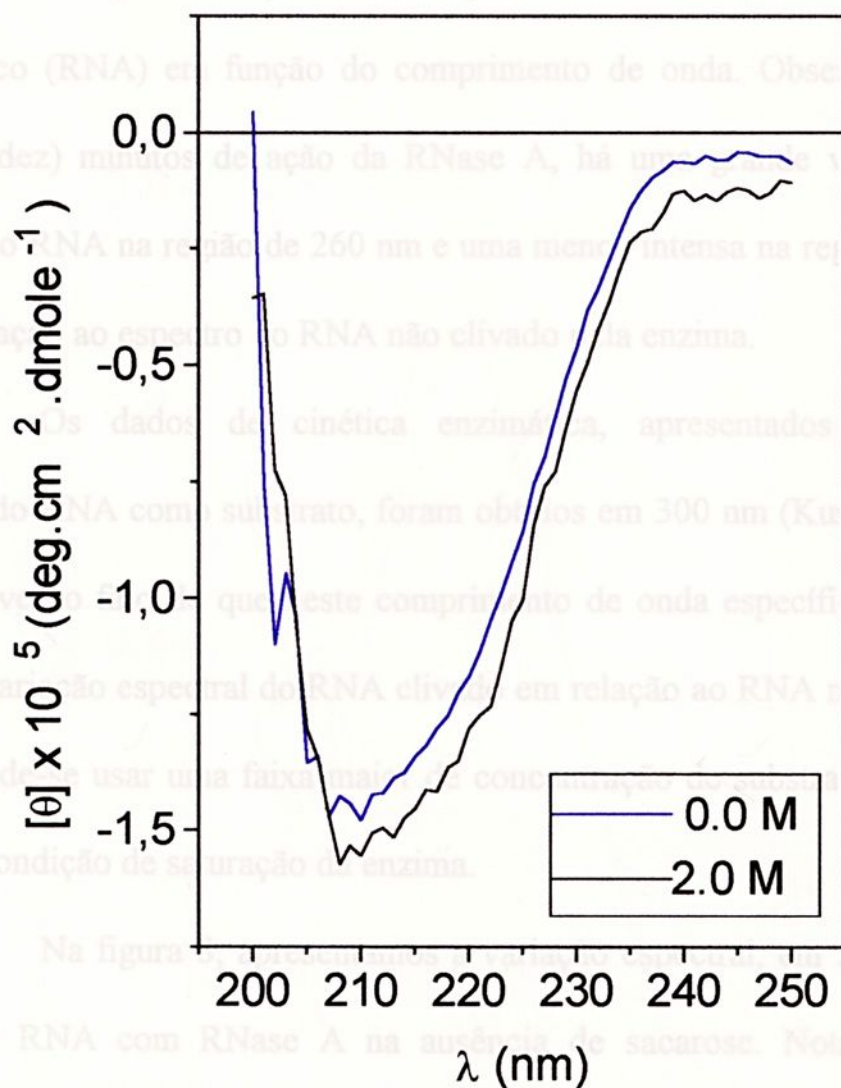


Figura 6. Espectros de Dicroísmo Circular (CD) da ribonuclease A (RNase A) à $1,4 \times 10^{-5}$ M em tampão acetato de sódio (0,05 M pH 5,0 à 25°C) com concentração de sacarose variando de 0 a 2,0 M. Os espectros apresentados acima foram obtidos após subtração da linha de base.

III.2 Efeito de sacarose sobre a cinética RNase A/RNA

A figura 7 apresenta o gráfico da absorbância do ácido ribonucléico (RNA) em função do comprimento de onda. Observa-se que, após 10 (dez) minutos de ação da RNase A, há uma grande variação no espectro do RNA na região de 260 nm e uma menos intensa na região de 300 nm em relação ao espectro do RNA não clivado pela enzima.

Os dados de cinética enzimática, apresentados a seguir, empregando RNA como substrato, foram obtidos em 300 nm (Kunitz, 1946). Isto se deve ao fato de que neste comprimento de onda específico, há uma pequena variação espectral do RNA clivado em relação ao RNA não clivado. Assim, pode-se usar uma faixa maior de concentração de substrato a fim de atingir a condição de saturação da enzima.

Na figura 8, apresentamos a variação espectral, em 300 nm, da reação de RNA com RNase A na ausência de sacarose. Nota-se que a absorbância decresce exponencialmente com o tempo. Contudo, nos primeiros 2 minutos ela varia linearmente com o tempo, como mostrado no gráfico interno.

A linha contínua representa uma regressão linear aos pontos experimentais.



A linha contínua representa uma regressão linear aos pontos experimentais.

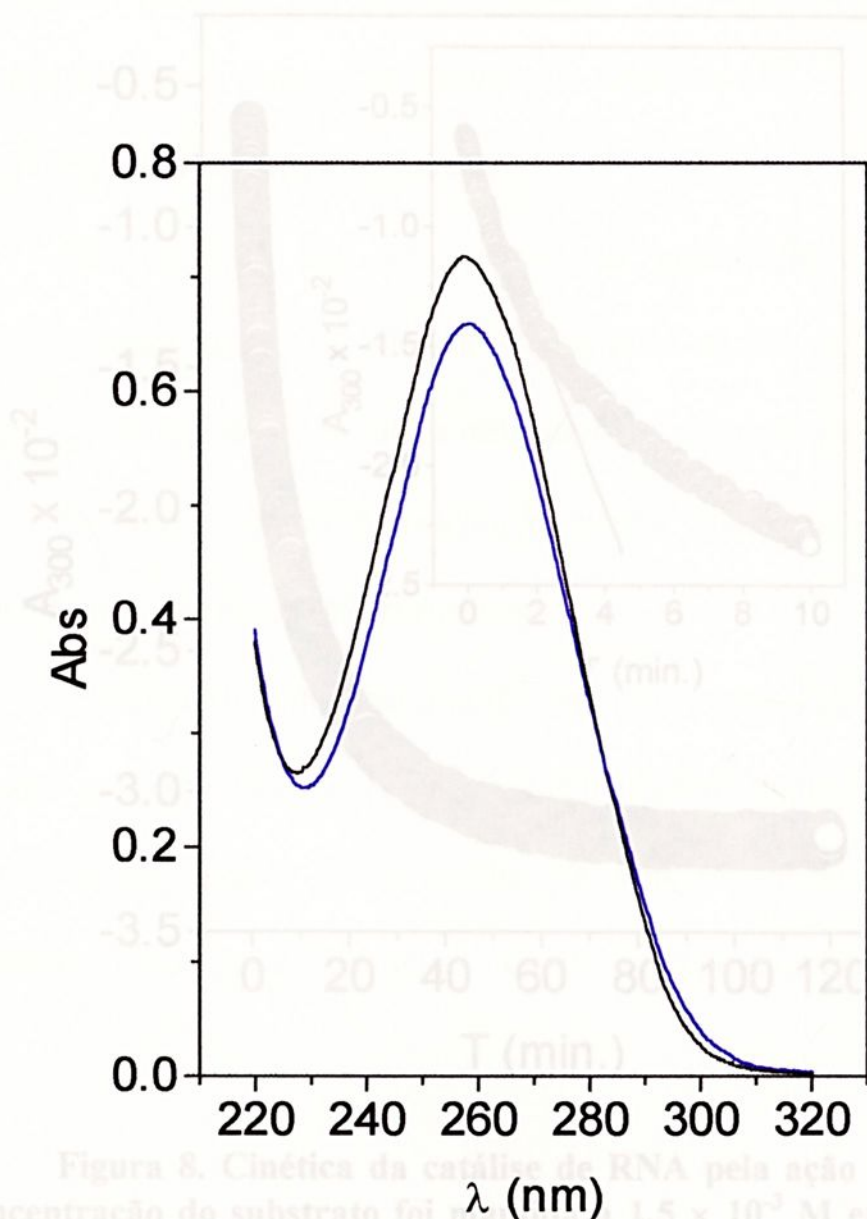


Figura 7. Variação espectral do RNA $1,35 \times 10^{-4}$ M em tampão acetato de sódio (0,05 M pH 5,0 à 25°C). A concentração da RNase A foi mantida constante a $7,8 \times 10^{-8}$ M no mesmo tampão acima.

A linha azul representa a absorção óptica do RNA na ausência da enzima e a preta, a variação espectral após (10) dez minutos de ensaio.

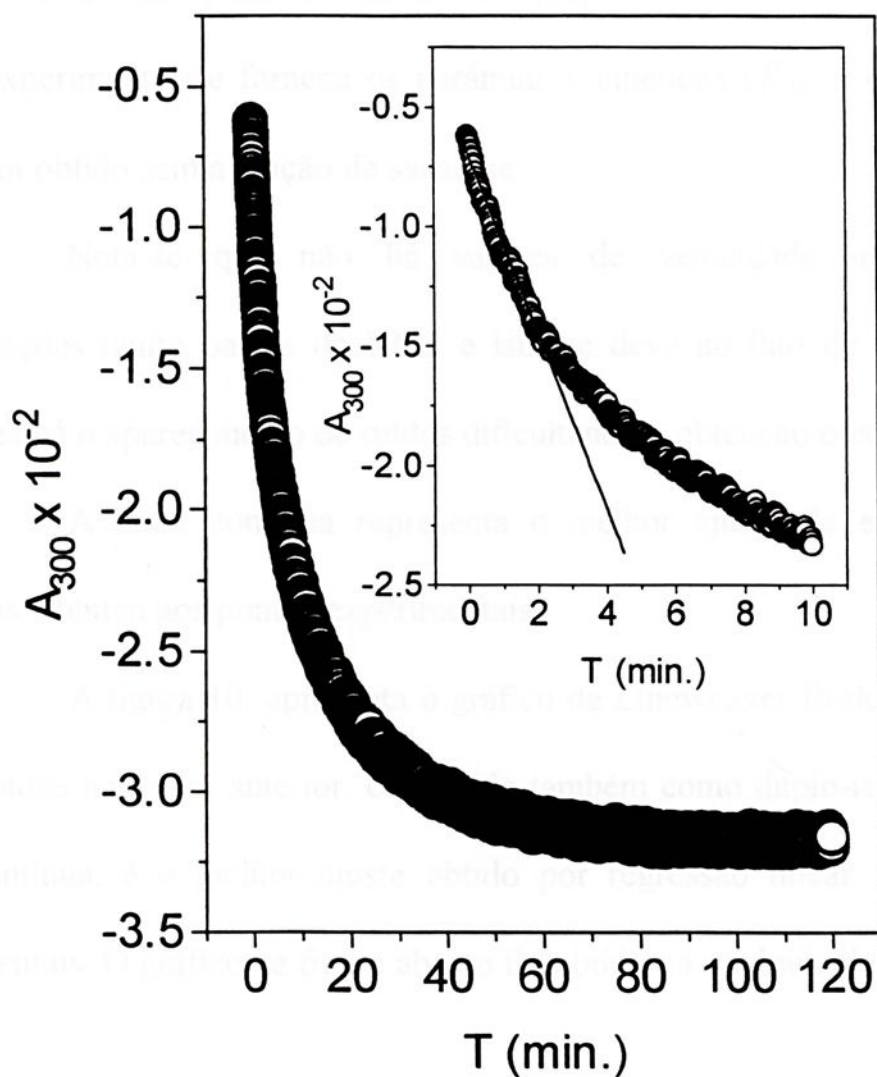


Figura 8. Cinética da catálise de RNA pela ação da RNase A. A concentração do substrato foi mantida a $1,5 \times 10^{-3}$ M em tampão acetato de sódio (0,05 M pH 5,0 à 25°C) e enzima a $1,8 \times 10^{-7}$ M, no mesmo tampão acima. O tempo de integração foi de 2 segundos.

A figura 9 mostra o gráfico da velocidade inicial em função da concentração de RNA o qual é denominado de gráfico Michaeliano. A linha contínua mostra um ajuste não linear da equação de Michaelis-Menten aos pontos experimentais e fornece os parâmetros cinéticos (K_M e $V_{máx}$). Este gráfico foi obtido sem a adição de sacarose.

Nota-se que não há valores de velocidade inicial para concentrações muito baixas de RNA e isto se deve ao fato de que nestas condições há o aparecimento de ruídos dificultando a obtenção dos dados.

A linha contínua representa o melhor ajuste da equação de Michaelis-Menten aos pontos experimentais.

A figura 10, apresenta o gráfico de Lineweaver-Burk dos dados apresentados na figura anterior, conhecido também como duplo-recíproco. A linha contínua, é o melhor ajuste obtido por regressão linear aos pontos experimentais. O gráfico na figura abaixo foi obtido na ausência de sacarose.



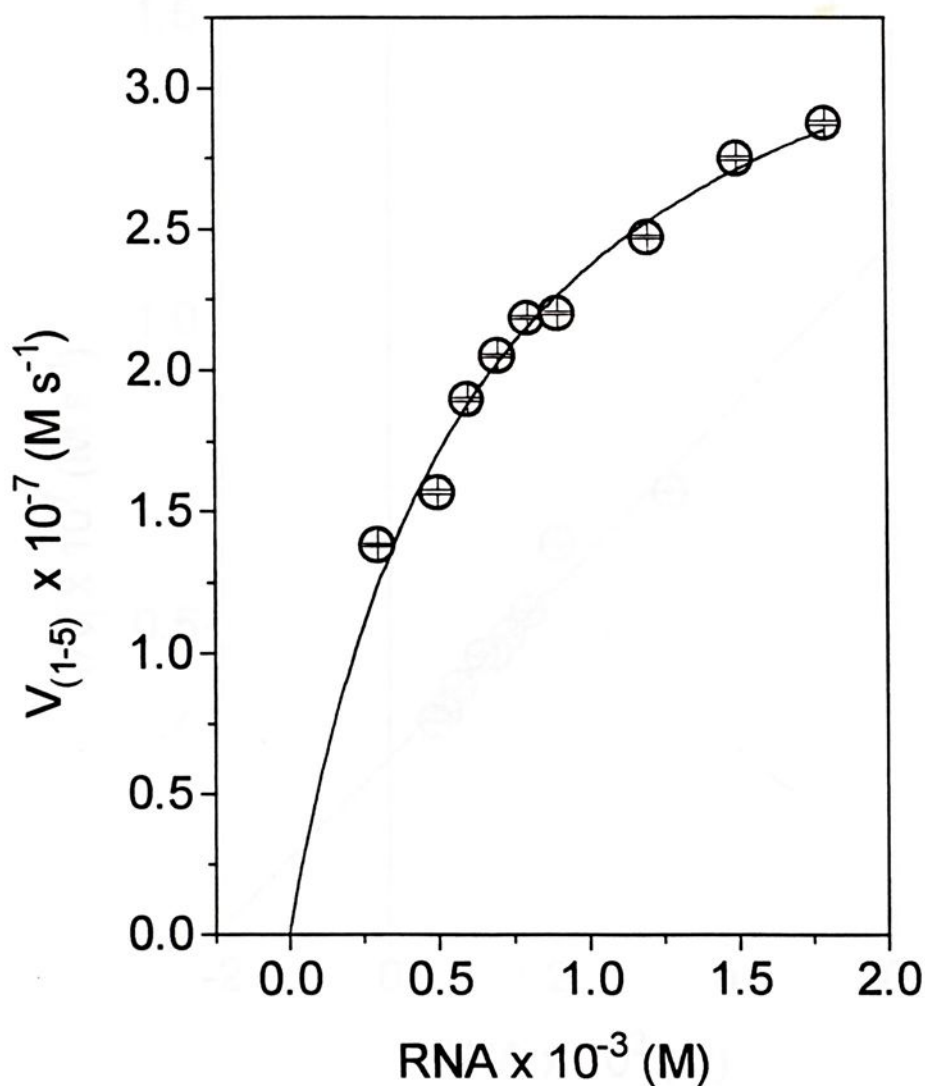


Figura 9. Gráfico de Michaelis-Menten que mostra a variação da velocidade inicial em função da concentração do RNA. A concentração da RNase A foi mantida constante a $3.75 \times 10^{-8} \text{ M}$ e a do substrato variou de 1×10^{-4} a $18 \times 10^{-4} \text{ M}$. Todas as soluções acima, foram preparadas em tampão acetato de sódio 0.05 M e pH 5,0.

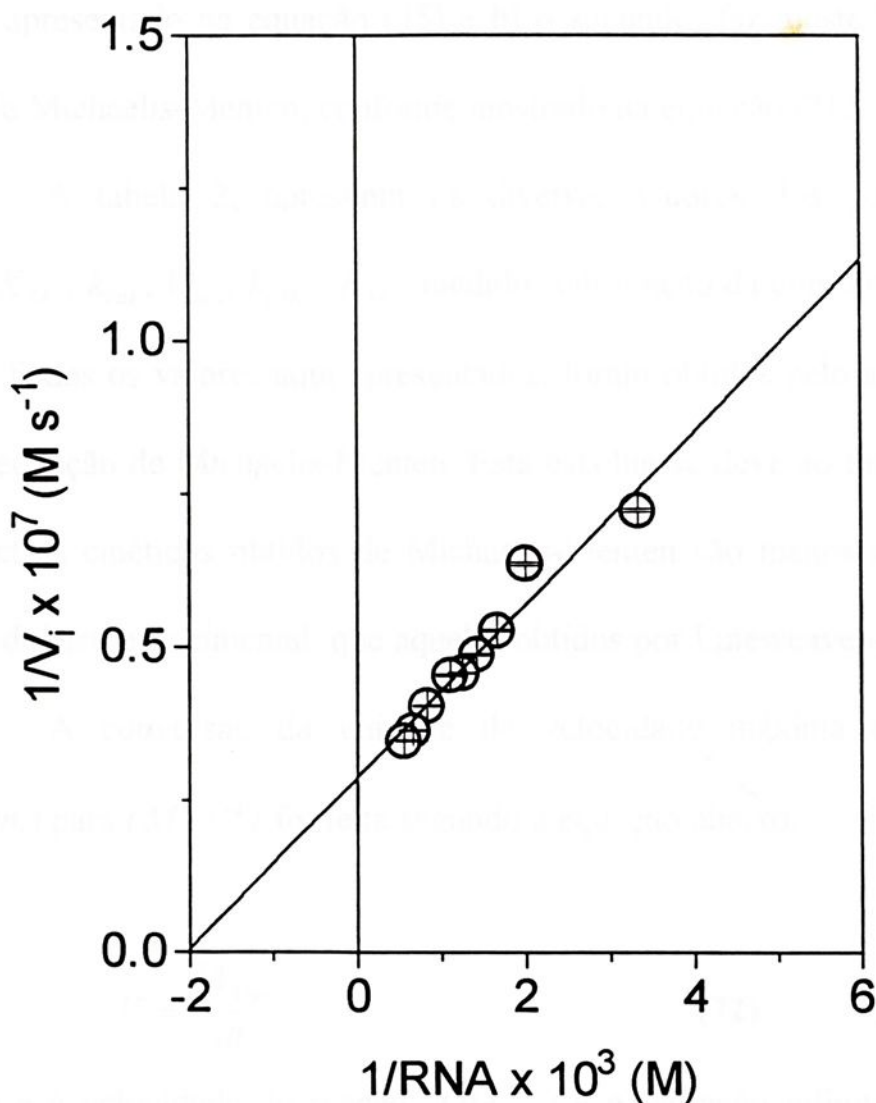


Figura 10. Gráfico de Lineweaver-Burk mostrando o inverso da velocidade inicial em função do inverso da concentração de substrato. A concentração da RNase A foi mantida constante a $3,75 \times 10^{-8} \text{ M}$ e a do substrato variou de 1×10^{-4} a $18 \times 10^{-4} \text{ M}$. Todas as soluções acima, foram preparadas em tampão acetato de sódio 0.05 M e $\text{pH } 5.0$.

A determinação de K_M e $V_{máx}$ foi feita utilizando-se dois métodos: **a)** o primeiro, faz ajuste não linear da equação de Michaelis-Menten conforme apresentado na equação (35) e **b)** o segundo, faz ajuste linear da equação de Michaelis-Menten, conforme mostrado na equação (71).

A tabela 2, apresenta os diversos valores dos parâmetros cinéticos K_M , k_{cat} , $V_{máx}$, k_{cat}/K_M , medidos em função da concentração de sacarose. Todos os valores aqui apresentados, foram obtidos pelo ajuste não linear da equação de Michaelis-Menten. Esta escolha se deve ao fato de que os parâmetros cinéticos obtidos de Michaelis-Menten são menos sujeitos à expansão do erro experimental, que aqueles obtidos por Lineweaver-Burk.

A conversão da unidade de velocidade máxima ($V_{máx}$) de ($Abs/min.$) para ($M \cdot s^{-1}$) foi feita segundo a equação abaixo:

$$V = \frac{dA_{300}}{dt} \quad (72)$$

onde (V) é a velocidade de reação, (dA_{300}) é a variação infinitesimal da absorbância e (dt) a variação infinitesimal do tempo.

A absorbância (A) é definida segundo a lei de Beer-Lambert como mostrado abaixo



$$A_{300} = C \cdot \epsilon_{300} \cdot l$$

Para a reação de clivagem do RNA à 2'3' CMP, num dado instante qualquer, a absorbância pode ser definida conforme a equação abaixo

$$A = (C_{RNA} \cdot \epsilon_{300}^{RNA}) - (C_{RNA} \cdot \epsilon_{300}^{2'3'}) \quad (73)$$

onde ($\epsilon_{300}^{RNA} = 318,6 \times M^{-1} \cdot cm^{-1}$) é o coeficiente de extinção molar do RNA à 300 nm.; ($\epsilon_{300}^{2'3'} = 121,1 \times M^{-1} \cdot cm^{-1}$) é o coeficiente de extinção molar do 2'3' CMP à 300 nm e (C_{RNA}) é a concentração do RNA na amostra.

Portanto, podemos reescrever a equação da velocidade como apresentado abaixo

$$V_{máx} = \frac{A_{300} / \epsilon_{300}^{RNA} - \epsilon_{300}^{2'3'}}{60} \quad (74)$$

Tabela 2

<i>Sacarose</i> (M)	<i>Osmolal.</i> (Osm.)	<i>ln (a_w)</i> × 10 ⁻³ (M)	<i>K_M</i> × 10 ⁻⁴ (M)	<i>V_{máx.}</i> × 10 ⁻⁷ (M.s ⁻¹)	<i>k_{cat.}</i> (s ⁻¹)	<i>k_{cat.}/K_M</i> × 10 ⁴ (M ⁻¹ .s ⁻¹)
0,0	0,110	-1,98	6,2	5,79	15,44	2,49
0,1	0,176	-3,17	5,7	5,29	14,10	2,47
0,2	0,286	-5,15	4,8	4,78	12,74	2,65
0,3	0,404	-7,28	3,5	4,39	11,70	3,34
0,4	0,531	-9,56	2,9	3,78	10,08	3,47
0,5	0,664	-11,96	2,3	3,51	9,36	4,06

A tabela 2 apresenta os parâmetros cinéticos: constante de Michaelis-Menten (K_M); velocidade máxima de reação ($V_{máx.}$); eficiência catalítica da enzima ($k_{cat.}/K_M$) e constante catalítica ($k_{cat.}$) obtidos com diversas concentrações de sacarose. O logaritmo neperiano da atividade de água ($\ln a_w$), as osmolalidades da solução e as diversas concentrações de sacarose também são apresentados. A concentração de RNase A usada na obtenção de todos os dados apresentados acima foi de $3,75 \times 10^{-8} M$ em tampão (Acetato de Sódio 0,05M pH 5,0).

A figura 11, mostra o comportamento da velocidade máxima ($V_{máx.}$), medido com RNA em função da osmolalidade. Nota-se que a velocidade máxima diminui com o aumento da concentração de sacarose. Isto indica que ou a diminuição da atividade de água ou o aumento da viscosidade da solução, devido ao aumento da concentração da sacarose na solução de ensaio, desfavorece o passo catalítico propriamente dito.



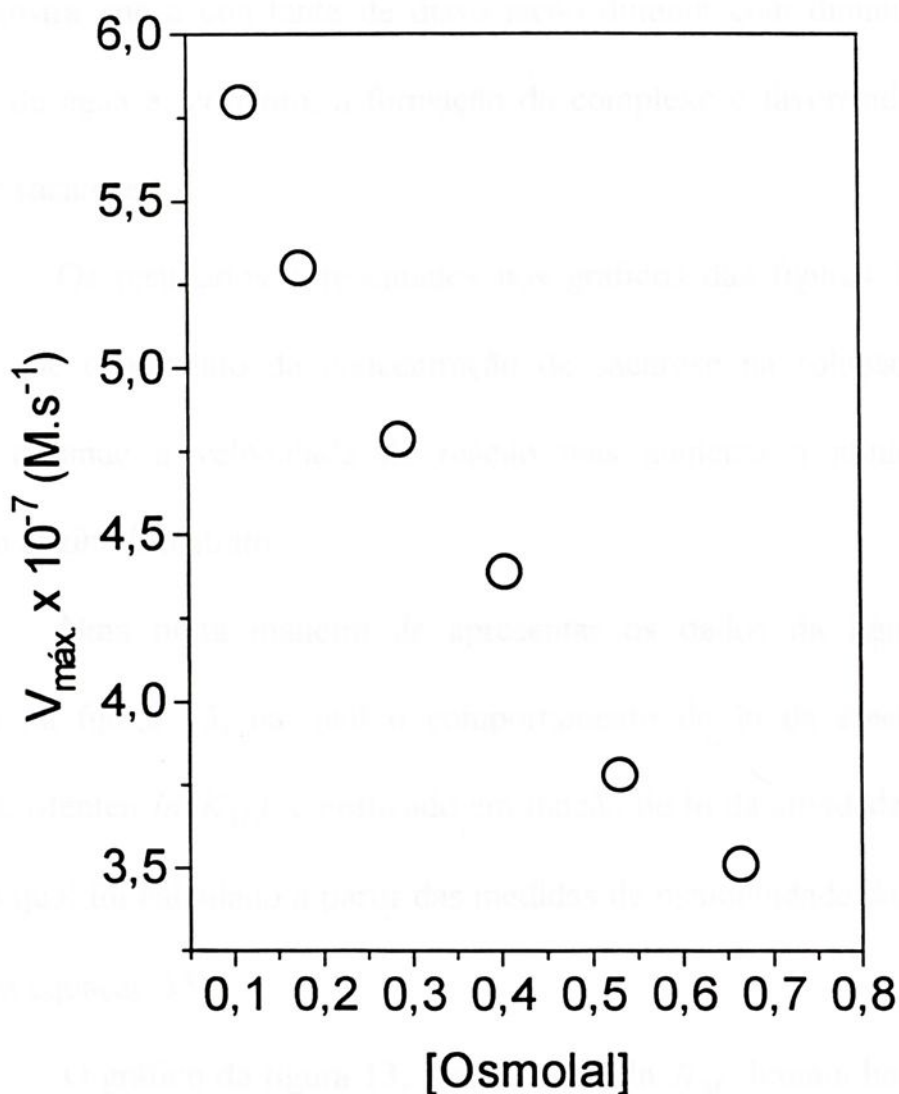


Figura 11. Velocidade Máxima em função da osmolalidade da solução. Na obtenção destes dados, a concentração da enzima foi fixada em $3,75 \times 10^{-8}$ M e a concentração de RNA variou de $1,0 \times 10^{-4}$ a $18,0 \times 10^{-4}$ M. As soluções de RNase A, RNA e Sacarose, foram preparadas em tampão acetato de sódio 0.05 M pH 5,0.

A figura 12 mostra o comportamento da constante de Michaelis-Menten (K_M), medido com RNA, em função da atividade de água. Este gráfico mostra que a constante de dissociação diminui com diminuição da atividade de água e, portanto, a formação do complexo é favorecida com a adição de sacarose.

Os resultados apresentados nos gráficos das figuras 11 e 12, mostram que o aumento da concentração de sacarose na solução RNase A/RNA, diminui a velocidade de reação mas aumenta a afinidade do complexo enzima/substrato.

Uma outra maneira de apresentar os dados da figura 12 é mostrada na figura 13, na qual o comportamento do $\ln$ da constante de Michaelis-Menten $\ln(K_M)$, é graficado em função do $\ln$ da atividade de água $\ln(a_w)$ o qual foi calculado a partir das medidas de osmolalidade da solução, segundo a equação 55.

O gráfico da figura 13, mostra que o $\ln K_M$ diminui linearmente com a diminuição de $\ln(a_w)$. De acordo com a equação de linkage

$$\frac{d \ln K}{d \ln(a_w)} = \Delta n_w$$

a inclinação deste gráfico fornece a variação do número de

moléculas de água associadas à formação do complexo enzimático, isto é,

$$\frac{d \ln K}{d \ln(a_w)} = + \left(n_w^E + n_w^S - n_w^{ES} \right) = \Delta n_w \quad (75)$$

onde n_w^{ES} , n_w^S e n_w^E , são os números de moléculas de água aparente, associadas ao complexo enzimático (ES), à enzima (E) e ao (S) livres em solução, respectivamente.

Note que a constante de dissociação diminui com a diminuição da atividade de água, em consequência do aumento da concentração de soluto na solução, o que indica que a formação do complexo RNA/RNase A é favorecida.

Neste caso estamos considerando que a constante de Michaelis-Menten descreve, apropriadamente, a constante de equilíbrio de dissociação entre a enzima e o substrato. Portanto, ela não estaria sujeita à modificações devido à mudanças na viscosidade.

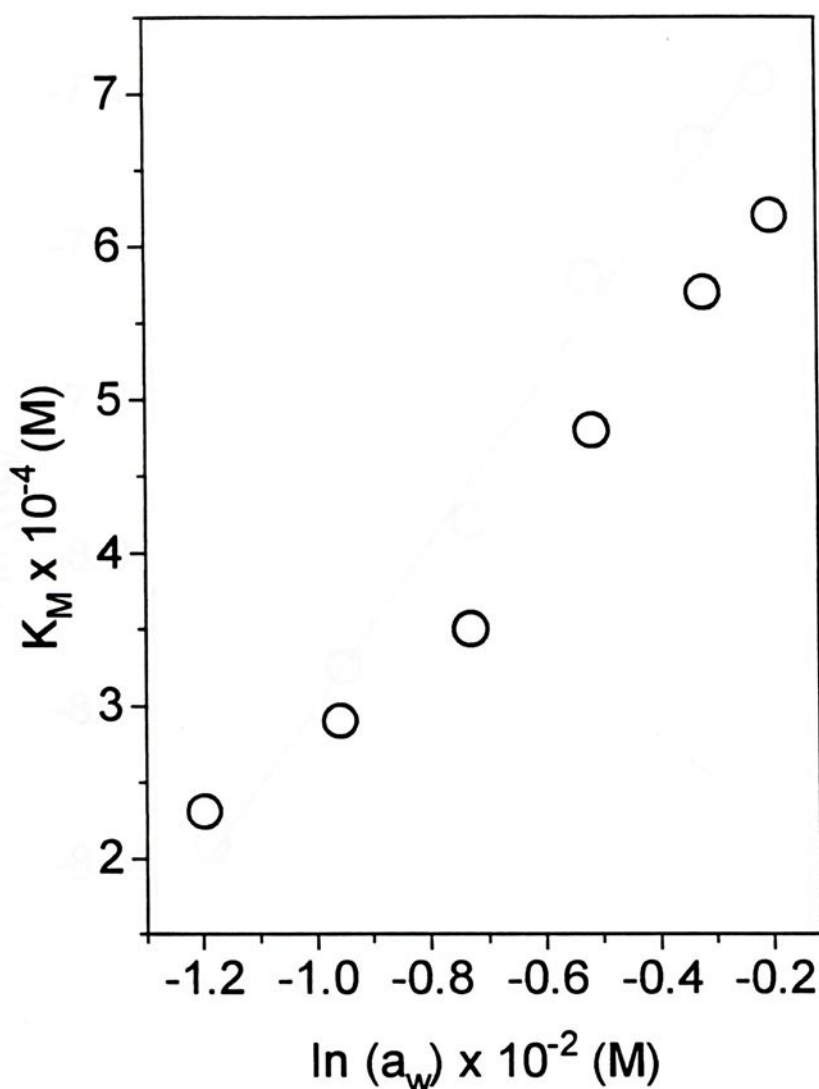


Figura 12. Comportamento da constante de Michaelis-Menten (K_M) em função da atividade de água. Na obtenção destes dados, a concentração da enzima foi fixada em $3,75 \times 10^{-8}$ M e a concentração de RNA variou de $1,0 \times 10^{-4}$ a $18,0 \times 10^{-4}$ M. As soluções de RNase A, RNA e Sacarose, foram preparadas em tampão acetato de sódio 0.05 M, pH 5,0 à 25°C.

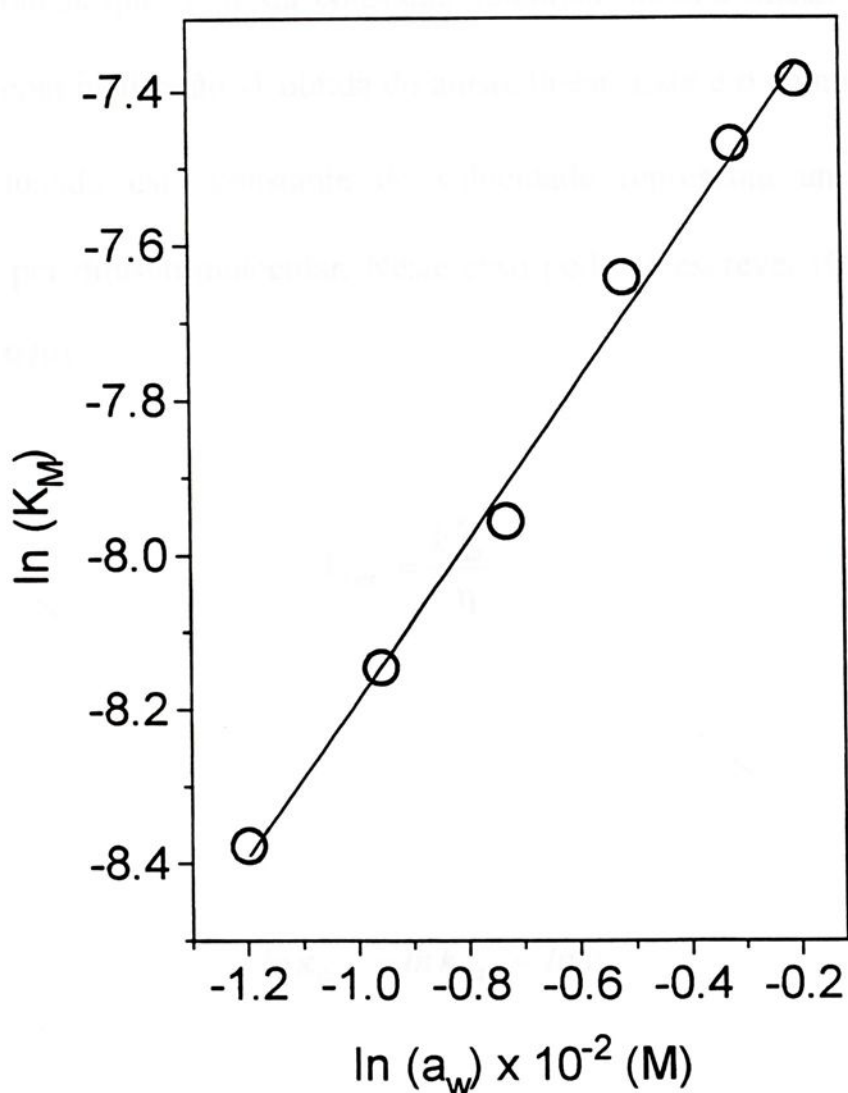


Figura 13. Dependência da constante de Michaelis-Menten com a atividade de água. O coeficiente angular da reta expressa a variação do número de moléculas de água liberadas para a solução. A variação do número de moléculas de água (Δn_w) para a reação de complexação entre RNA/RNase A foi de 103 ± 4 .

A figura 14 apresenta o gráfico do logaritmo neperiano da constante catalítica em função do logaritmo da viscosidade relativa da solução. Nota-se que o $\ln$ da constante catalítica diminui linearmente com $\ln(\eta/\eta_0)$ com inclinação -1 obtida do ajuste linear. Este é o comportamento esperado quando esta constante de velocidade representa um processo controlado por difusão molecular. Neste caso pode se escrever (Nakatani & Dunford, 1979)

$$k_{cat.} = \frac{k_{cat.}^*}{\eta}$$

e portanto

$$\ln k_{cat.} = \ln k_{cat.}^* - \ln \eta$$

onde $k_{cat.}^*$ é a constante para $\eta/\eta_0 = 1$.

O efeito combinando a variação da constante de dissociação (K_M) com a atividade de água (a_w), e da constante catalítica ($k_{cat.}$) com a

viscosidade de meio reflete os efeitos da solução na atividade catalítica da enzima.

A figura 15 apresenta o gráfico do $\ln$ da eficiência catalítica ($\ln[k_{cat.}/K_M]$) para a despolimerização do RNA em função da concentração de sacarose. Nota-se que há um aumento linear da eficiência catalítica com a diminuição da atividade de água da solução de reação. Este efeito reflete a maior susceptibilidade da constante de dissociação (K_M) com a variação da atividade de água, que da constante catalítica ($k_{cat.}$) com a viscosidade. Apesar destas variáveis cinéticas terem taxas de variação opostas com a concentração do soluto, o aumento da afinidade da enzima pelo substrato para a formação do complexo enzimático (ES) predomina no efeito observado.

Este resultado é representado no gráfico da figura 15 que mostra o aumento da eficiência catalítica com a diminuição de $\ln(a_w)$.

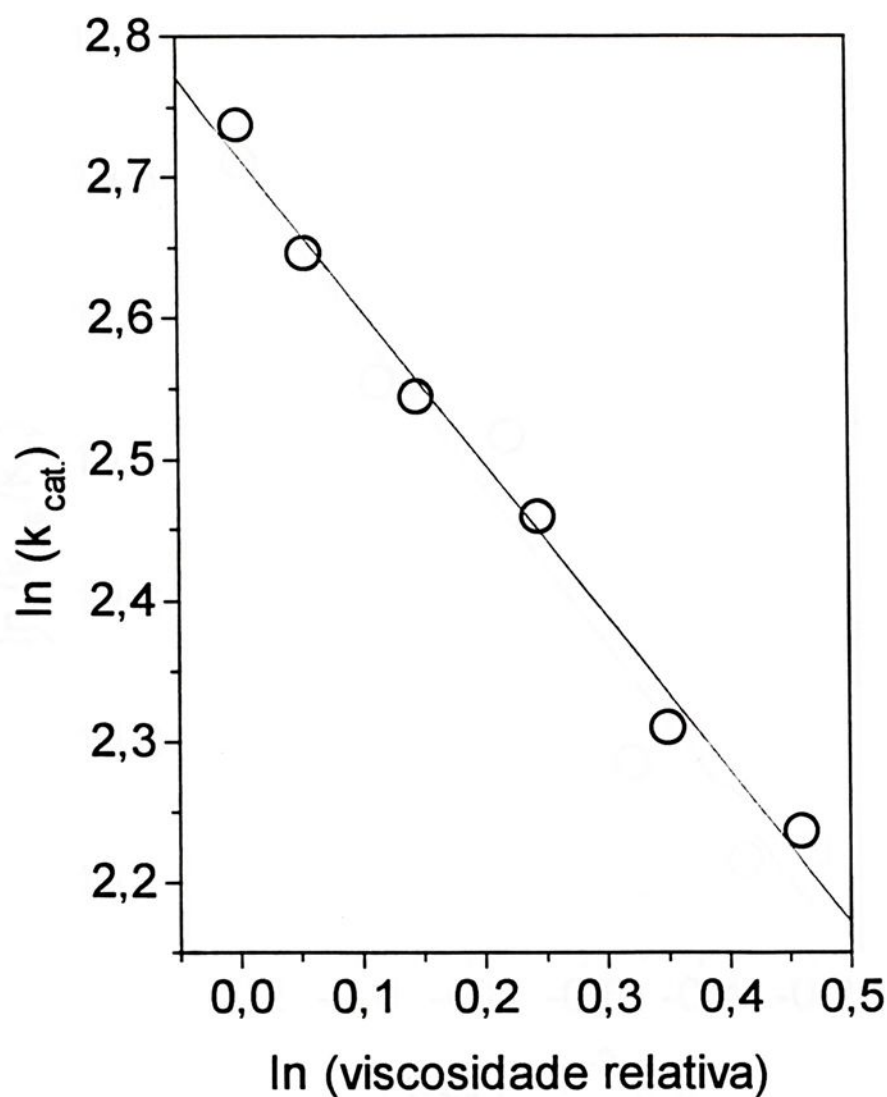


Figura 14. Dependência da constante catalítica com o $\ln$ da viscosidade relativa. O coeficiente angular da linha contínua, que representa uma regressão linear aos pontos experimentais, fornece inclinação igual à -1,09.

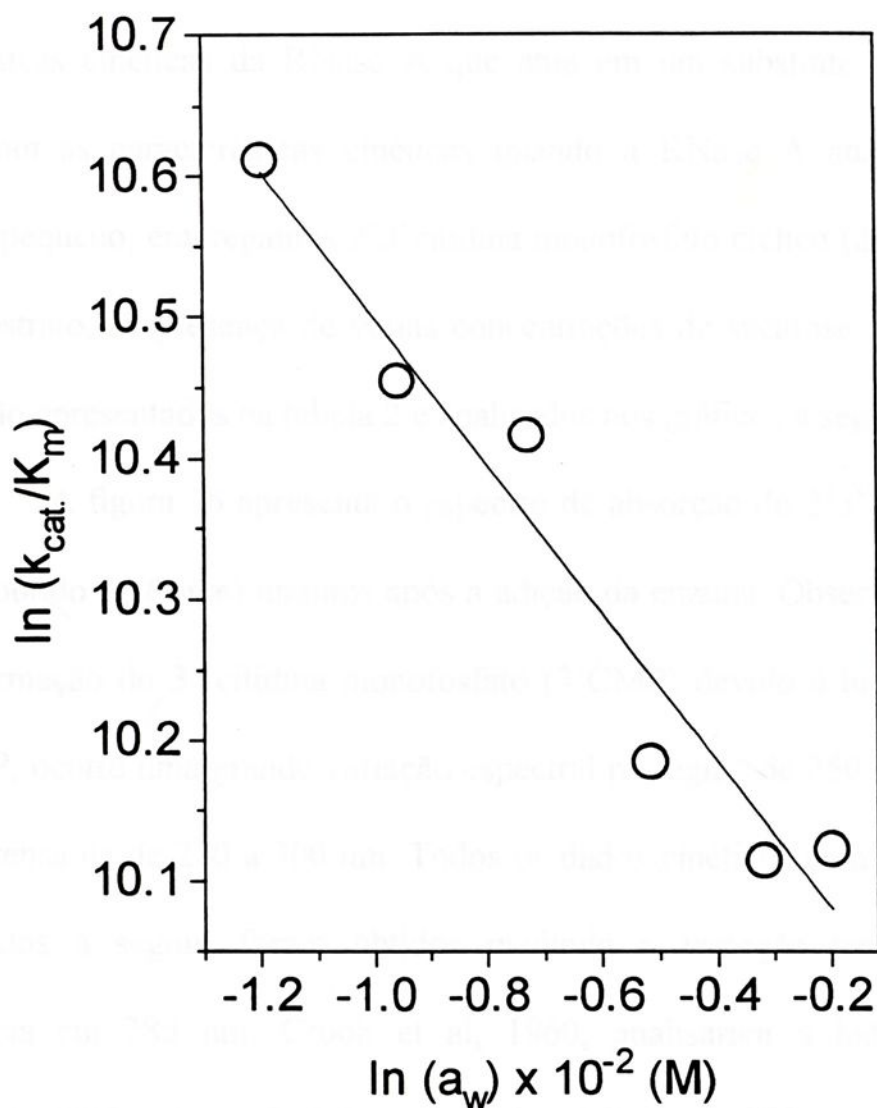


Figura 15. $\ln$ da eficiência catalítica da RNase A com RNA, na presença de sacarose, em função da atividade de água.

III.3 Efeito de sacarose sobre a cinética RNase A/2'3' CMP

Com o objetivo de poder comparar o efeito de água nas características cinéticas da RNase A que atua em um substrato volumoso (RNA) com as características cinéticas quando a RNase A atua em um substrato pequeno, empregamos 2'3'citidina monofosfato cíclico (2'3' CMP) como substrato, na presença de várias concentrações de sacarose. Os dados obtidos são apresentados na tabela 2 e analisados nos gráficos a seguir.

A figura 16 apresenta o espectro de absorção do 2'3' CMP e o espectro obtido 20 (vinte) minutos após a adição da enzima. Observa-se que, com a formação do 3' citidina monofosfato (3'CMP) devido à hidrólise do 2'3' CMP, ocorre uma grande variação espectral na região de 250 nm e uma menos intensa na de 270 a 300 nm. Todos os dados cinéticos com 2'3'CMP apresentados a seguir, foram obtidos medindo a variação temporal da absorbância em 285 nm. Crook et al, 1960, analisaram a hidrólise do 2'3'CMP medindo a variação temporal da absorbância em 284 nm.



Na figura 17, apresentamos a variação espectral, em 285 nm, da

reação de 2'3'CMP com RNase A na ausência de sacarose. Nota-se que a

absorbância tem uma variação hipotética em função do tempo. Contudo,

observa-se que nos primeiros 5 minutos a variação da absorbância é

aproximadamente linear com o tempo, como mostrado pela linha contínua no

gráfico interno representando o melhor ajuste linear aos pontos

experimentais.

A figura 18 apresenta o gráfico de Michaelis-Menten para a

reação de RNase A com 2'3' CMP na presença de 0,3 M de sacarose. Nota-

se que, para a faixa de concentração de substrato utilizado não há uma curva

hiperbólica característica indicando que a condição de saturação da enzima

não tenha sido atingida.

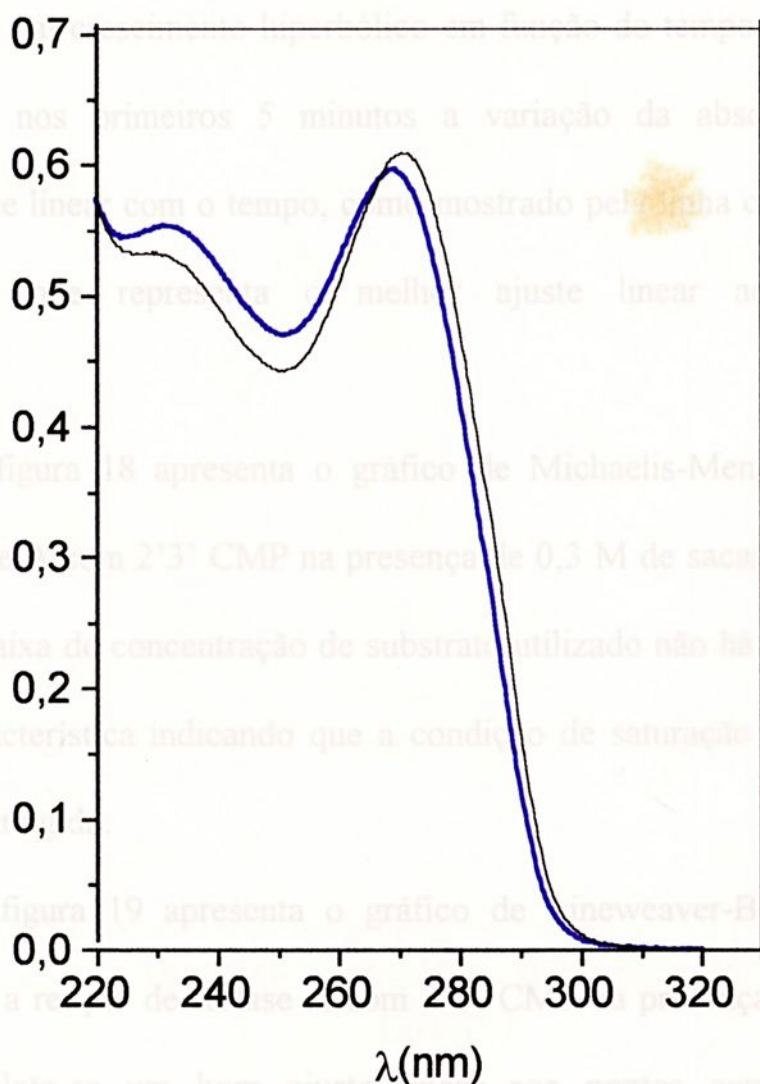
A figura 19 apresenta o gráfico de Lineweaver-Burk (duplo

recíproco) para a reação de RNase A com 2'3' CMP na presença de 0,3 M

de sacarose. Nota-se um bom ajuste linear aos pontos experimentais,

representando a inibição não competitiva da RNase A pela sacarose.

Figura 16. Espectros de absorção do 2'3'CMP a $6,81 \times 10^{-5}$ M em tampão tris NaCl 0,1 M, pH 7,0 à 25°C e RNase A a $7,8 \times 10^{-8}$. A Linha azul representa o 2'3'CMP não hidrolisado e a preta, o produto da ação da RNase A após vinte (20) minutos da hidrólise.



Na figura 17, apresentamos a variação espectral, em 285 nm, da reação de 2'3'CMP com RNase A na ausência de sacarose. Nota-se que a absorbância tem um crescimento hiperbólico em função do tempo. Contudo, observa-se que nos primeiros 5 minutos a variação da absorbância é aproximadamente linear com o tempo, como mostrado pela linha contínua no gráfico interno que representa o melhor ajuste linear aos pontos experimentais.

A figura 18 apresenta o gráfico de Michaelis-Menten para a reação de RNase A com 2'3' CMP na presença de 0,3 M de sacarose. Nota-se que, para a faixa de concentração de substrato utilizado não há uma curva hiperbólica característica indicando que a condição de saturação da enzima não tenha sido atingida.

A figura 19 apresenta o gráfico de Lineweaver-Burk (duplo recíproco) para a reação de RNase A com 2'3' CMP na presença de 0,3 M de sacarose. Nota-se um bom ajuste linear aos pontos experimentais, representado pela linha contínua.



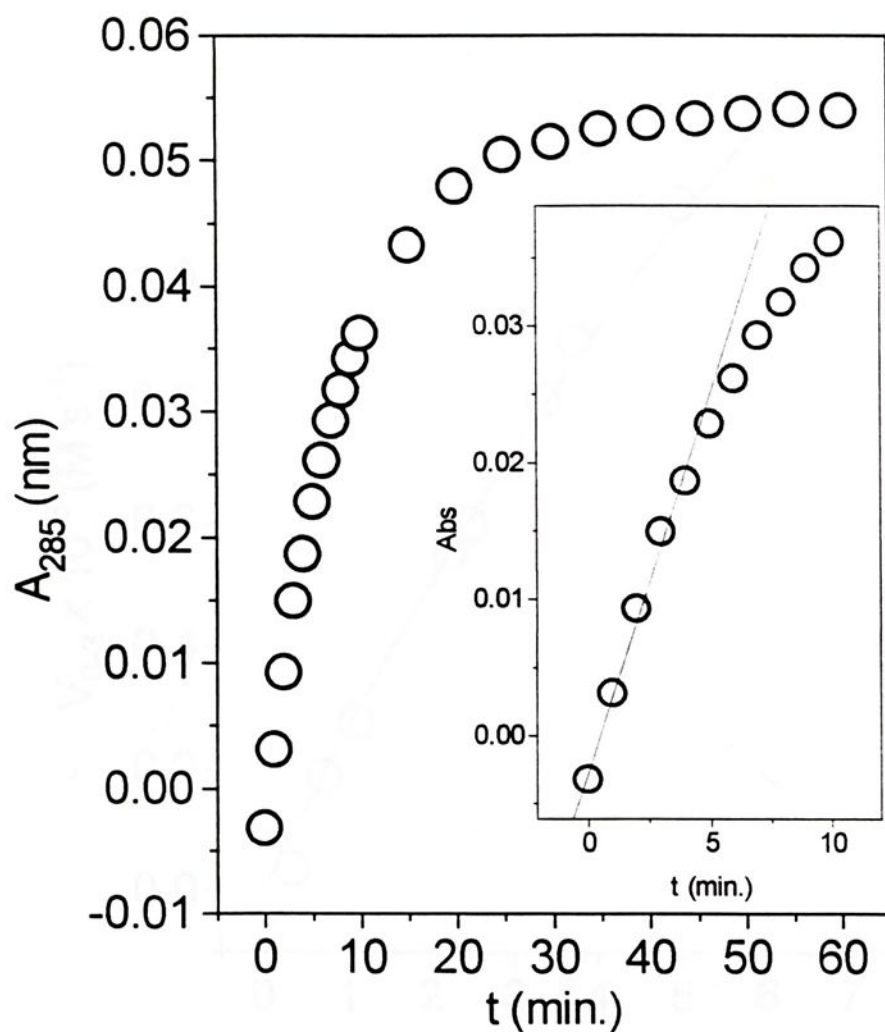


Figura 17. Cinética da catálise de 2'3'CMP pela ação da RNase A. A concentração do substrato foi mantida a $4,5 \times 10^{-4}$ M em tampão tris NaCl (0,01 M pH 7,0 à 25°C) e enzima a uma concentração de $1,4 \times 10^{-6}$ M.

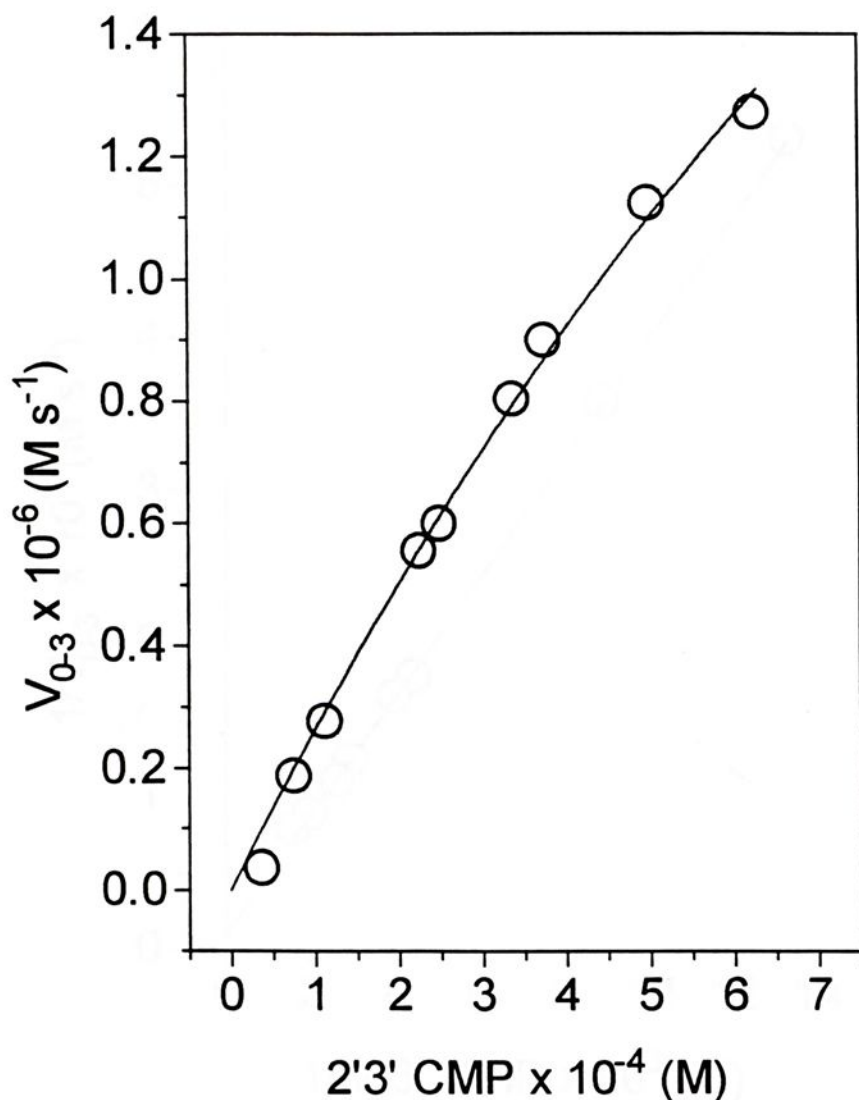


figura 18. Gráfico de Michaelis-Menten que mostra a variação da velocidade inicial em função da concentração do 2'3'CMP. A concentração da RNase A foi mantida constante a $6.86 \times 10^{-7} \text{ M}$ e a do substrato variou de $0,37 \times 10^{-4}$ a $6.25 \times 10^{-4} \text{ M}$. Todas as soluções acima, foram preparadas em tampão tris 0.1 M, NaCl 0.1 M e pH 7.0.

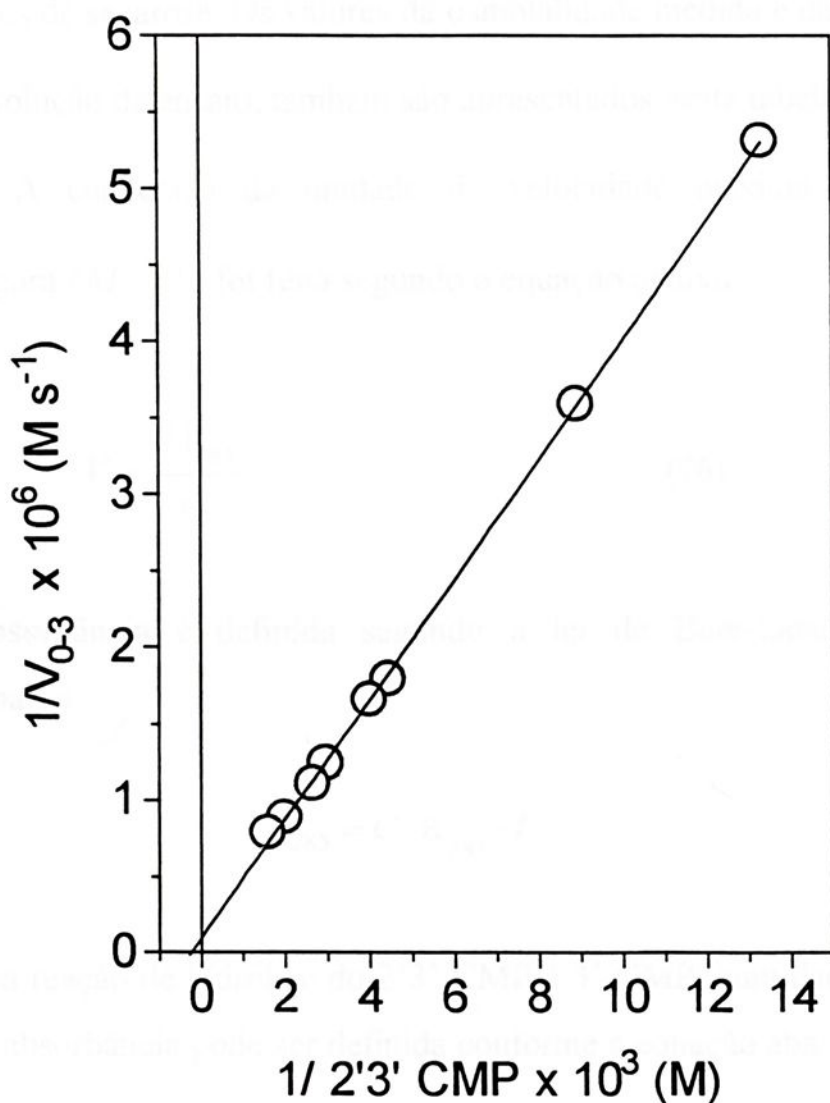


Figura 19. Gráfico de Lineweaver-Burk mostrando o inverso da velocidade inicial em função do inverso da concentração de substrato. A concentração da RNase A foi mantida constante a $6.86 \times 10^{-7} \text{ M}$ e a do substrato variou de $0,37 \times 10^{-4}$ a $6.25 \times 10^{-4} \text{ M}$. Todas as soluções acima, foram preparadas em tampão tris 0.1 M, NaCl 0.1 M e pH 7.0.

A tabela 3, mostra os valores dos parâmetros cinéticos, obtidos pelo ajuste não linear da equação de Michaelis-Menten, em função das diversas concentrações de sacarose. Os valores da osmolalidade medida e da atividade de água da solução de ensaio, também são apresentados nesta tabela.

A conversão da unidade de velocidade máxima ($V_{máx}$) de $Abs / min.$ para $(M \cdot s^{-1})$ foi feita segundo a equação abaixo:

$$V = \frac{dA_{285}}{dt} \quad (76)$$

A absorvância é definida segundo a lei de Beer-Lambert como mostrado abaixo

$$A_{285} = C \cdot \epsilon_{285} \cdot l$$

Para a reação de hidrólise do 2'3' CMP à 3' CMP, num dado instante qualquer, a absorvância pode ser definida conforme a equação abaixo

$$A = (C_{2'3'} \cdot \epsilon_{285}^{3'}) - (C_{2'3'} \cdot \epsilon_{285}^{2'3'}) \quad (77)$$

onde $\epsilon_{285}^{3'} = 5.08 \times 10^3 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ é o coeficiente de extinção molar do 3' CMP em 285 nm e pH 7,0; $\epsilon_{285}^{2'3'} = 4.32 \times 10^3 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ é o coeficiente de



extinção molar do 2'3' CMP em 285 nm e pH 7,0 e $C_{2'3'}$ é a concentração do 2'3' CMP na amostra.

Portanto, podemos reescrever a equação de velocidade como apresentado abaixo

$$V_{máx} = \frac{A_{285} / \epsilon_{285}^{3'} - \epsilon_{285}^{2'3'}}{60} \tag{78}$$

Tabela 3

<i>Sacarose</i>	<i>Osmolal</i>	<i>ln (a_w)</i>	<i>K_M</i>	<i>V_{máx}</i>	<i>k_{cat}</i>	<i>k_{cat}/K_M</i>
(<i>M</i>)	(<i>Osm.</i>)	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-6}$	(<i>s⁻¹</i>)	$\times 10^4$
		(<i>M</i>)	(<i>M</i>)	(<i>M.s⁻¹</i>)		(<i>M⁻¹.s⁻¹</i>)
0,0	0,361	-6,5	1,9±0,5	5,2±1,1	7,6±1,6	0,40±0,2
0,1	0,433	-7,8	1,8±0,2	5,5±0,4	7,9±0,6	0,44±0,1
0,3	0,709	-12,77	1,5±0,4	5,0±0,9	7,3±1,3	0,47±0,2
0,4	0,828	-14,92	1,5±0,3	5,0±0,8	7,3±1,1	0,49±0,2
0,6	1,126	-20,28	1,8±0,7	6,3±1,8	9,2±2,7	0,51±0,3
0,9	1,640	-29,55	1,9±0,6	7,6±1,8	11,2±2,7	0,59±0,3
1,0	1,805	-32,52	1,4±0,2	6,6±0,6	9,6±0,8	0,68±0,1

A tabela 3 apresenta os parâmetros cinéticos: constante de Michaelis-Menten (K_M), velocidade máxima de reação ($V_{máx}$); eficiência catalítica da enzima (k_{cat}/K_M) e constante catalítica (k_{cat}) obtidos com diversas concentrações de sacarose. O logarítmo neperiano da atividade de água ($\ln a_w$), as osmolalidades da solução e as diversas concentrações de sacarose também são apresentados. A concentração de RNase A usada na obtenção de todos os dados apresentados acima foi de $6,86 \times 10^{-7} M$ em tampão (Tris Nacl 0,1 M pH 7,0).



A figura 20, mostra a velocidade máxima, obtida por Michaelis-Menten, em função da atividade de água quando empregou-se 2'3'CMP como substrato para a RNase A. Nota-se um pequeno aumento da velocidade máxima com o aumento da concentração de sacarose, que não excede o erro experimental indicado pelas barras de erro. É difícil decidir, a par destes dados, se esta variação da velocidade máxima de hidrólise do mononucleotídeo é significativa.

A figura 21, mostra o comportamento da constante de Michaelis-Menten em função da atividade de água. Nota-se que a variação da constante de Michaelis-Menten (K_M) com a diminuição da atividade de água da solução não excede ao erro experimental indicado pelas barras de erro. Provavelmente, esta pequena variação da constante de dissociação não é significativa.



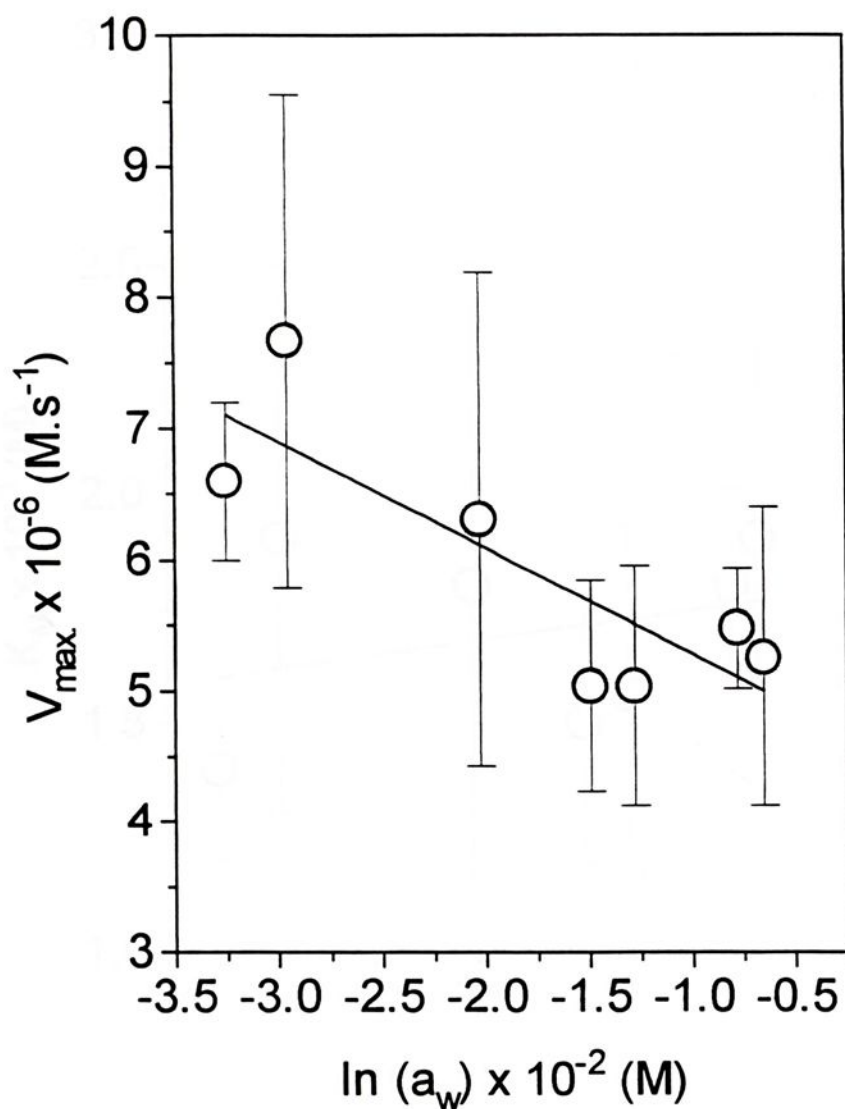


Figura 20. Velocidade máxima em função da atividade de água. Para a obtenção destes dados, foi usado 2'3'CMP como substrato. A concentração da RNase A foi mantida constante a $6.86 \times 10^{-7} M$ e a do substrato variou de $0,37 \times 10^{-4}$ a $6.25 \times 10^{-4} M$. Todas as soluções acima foram preparadas em tampão tris 0.1 M, NaCl 0.1 M e pH 7.0.

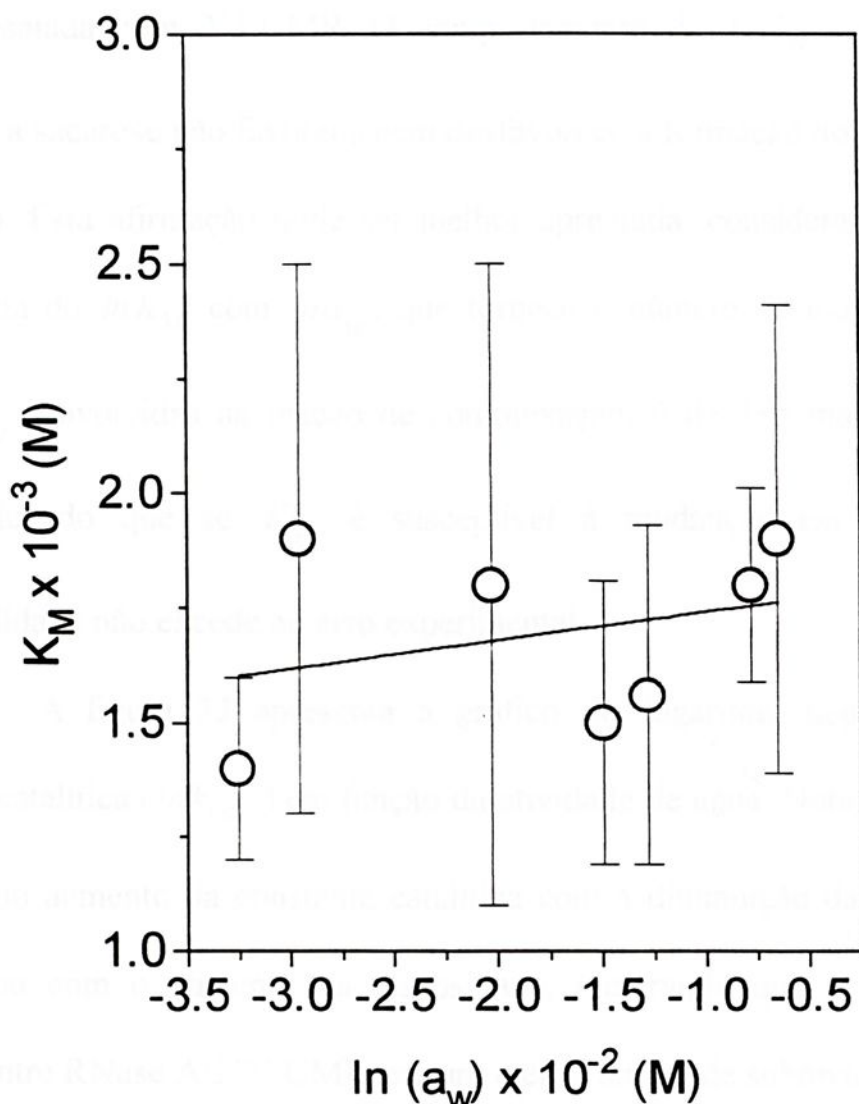


Figura 21. Efeito da constante de Michaelis-Menten em função da atividade de água, quando empregamos 2'3'CMP como substrato. A concentração da RNase A foi mantida constante a $6.86 \times 10^{-7} \text{ M}$ e a do substrato variou de $0,37 \times 10^{-4}$ a $6.25 \times 10^{-4} \text{ M}$. Todas as soluções acima, foram preparadas em tampão tris 0.1 M, NaCl 0.1 M e pH 7.0.

A figura 22, mostra a dependência do $\ln$ da constante de Michaelis-Menten ($\ln K_M$) com o $\ln$ da atividade de água ($\ln a_w$), para a enzima ensaiada com 2'3'CMP. O comportamento de $\ln K_M$ com $\ln a_w$ indica que a sacarose não favorece nem desfavorece a formação do complexo enzimático. Esta afirmação pode ser melhor apreciada, considerando que a dependência do $\ln K_M$ com $\ln a_w$, que fornece o número de moléculas de água (Δn_w) envolvidas na reação de complexação, é de 4 ± 5 moléculas de água, indicando que se K_M é susceptível à mudanças em a_w esta susceptibilidade não excede ao erro experimental.

A figura 23 apresenta a gráfico do logaritmo neperiano da constante catalítica ($\ln k_{cat.}$) em função da atividade de água. Nota-se que há um pequeno aumento da constante catalítica com a diminuição da atividade de água ou com o aumento da viscosidade, mostrando que o complexo formado entre RNase A/2'3' CMP tem um menor tempo de sobrevivência.

É importante notar, ainda, que caso $k_{cat.}$ nesta reação fosse uma constante de velocidade determinada só por difusão, como é o caso com RNA, deveríamos esperar a diminuição de $k_{cat.}$ com o aumento da concentração do soluto e não o aumento observado.



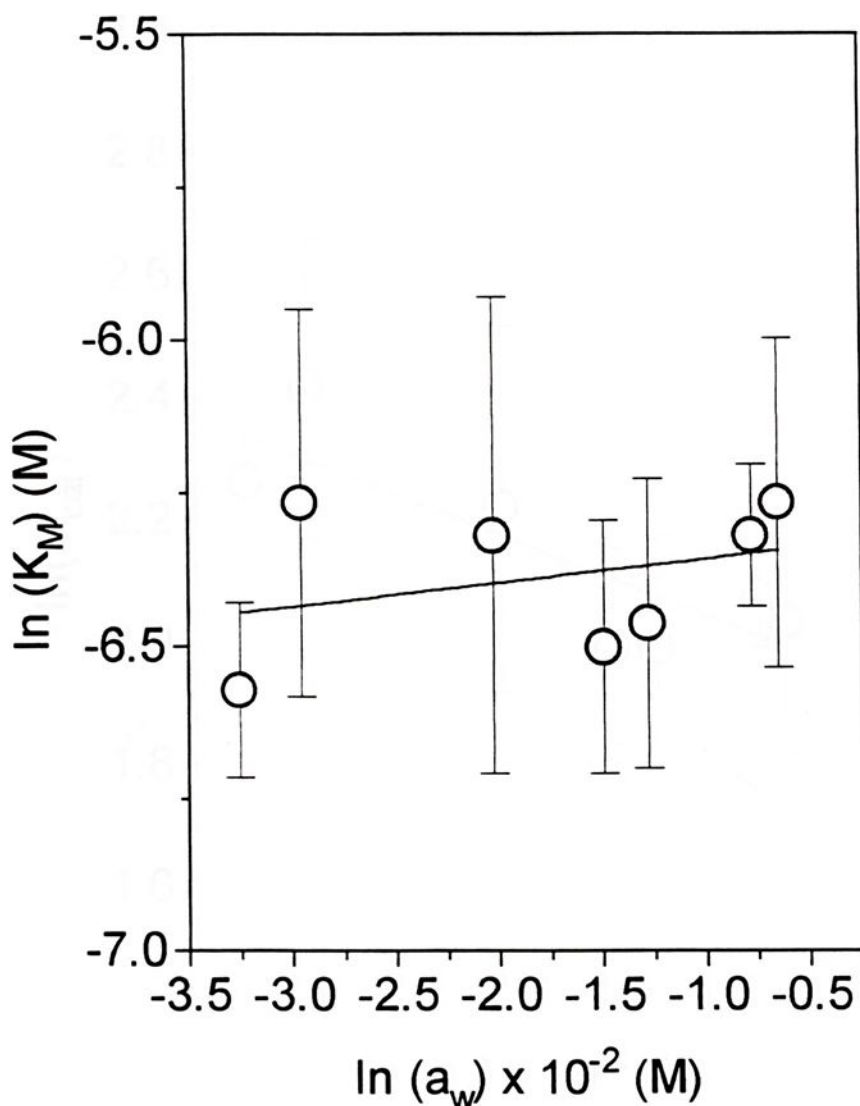


Figura 22. Dependência da constante de Michaelis-Menten com a atividade de água, quando a RNase A foi ensaiada com 2'3'CMP e sacarose. $\Delta n_w = (4 \pm 5)$.

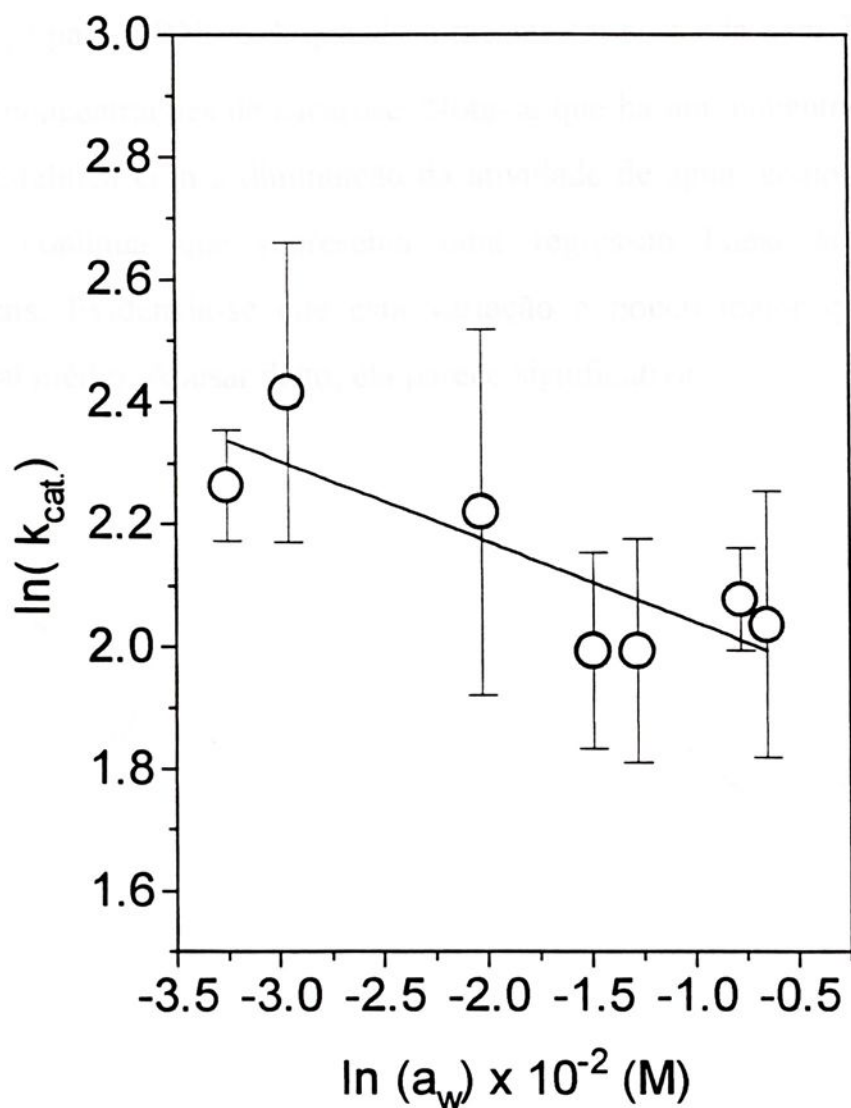


Figura 23. Gráfico do $\ln$ da constante catalítica em função do $\ln$ da atividade de água.

O efeito geral de água sobre a eficiência catalítica, também foi quantificado para esta reação.

A figura 24 apresenta o gráfico do ln da eficiência catalítica ($\ln k_{cat.} / K_M$) para a RNase A quando a mesma foi ensaiada com 2'3' CMP com várias concentrações de sacarose. Nota-se que há um aumento linear da eficiência catalítica com a diminuição da atividade de água, como mostrado pela linha contínua que representa uma regressão linear aos pontos experimentais. Evidencia-se que esta variação é pouco maior que o erro experimental médio. Apesar disto, ela parece significativa.



Figure 24. ln of catalytic efficiency of RNase A with 2'3' CMP vs. ln of the activity of water in presence of sucrose at various concentrations ($a_w = 10^{-3}$ M).

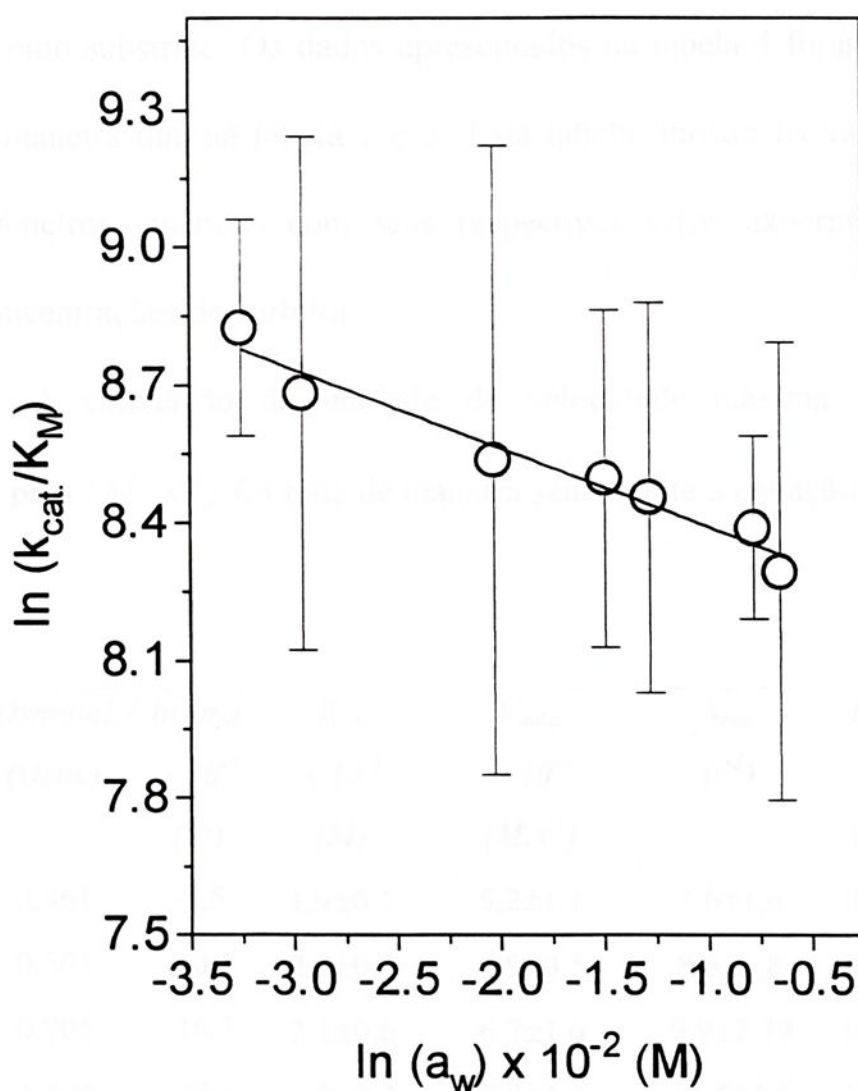


Figura 24. $\ln$ da eficiência catalítica da RNase A com 2'3' CMP em função da atividade de água na presença de sacarose a várias concentrações $\Delta n_w = (17 \pm 2)$.

III.4 Efeito de sorbitol sobre a cinética RNase A/2'3' CMP

Analizamos, também, o efeito de sorbitol quando empregamos 2'3'CMP como substrato. Os dados apresentados na tabela 4 foram obtidos da mesma maneira que na tabela 2 e 3. Esta tabela, mostra os valores dos vários parâmetros cinéticos com seus respectivos erros experimentais, à diversas concentrações de sorbitol.

A conversão da unidade de velocidade máxima ($V_{máx}$) de $Abs / min.$ para $(M \cdot s^{-1})$ foi feita de maneira semelhante à equação (78).

Tabela 4

Sorbitol (M)	Osmolal (Osm.)	$\ln(a_w)$ $\times 10^{-3}$ (M)	K_M $\times 10^{-3}$ (M)	$V_{máx}$ $\times 10^{-6}$ (M.s ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M $\times 10^4$ (M ⁻¹ .s ⁻¹)
0,0	0,361	-6,5	1,9±0,5	5,2±1,1	7,6±1,6	0,40±0,2
0,2	0,565	-10,1	2,0±0,2	5,9±0,5	8,6±0,8	0,43±0,1
0,5	0,906	-16,3	2,1±0,6	6,7±1,6	9,9±2,39	0,47±0,2
1,0	1,504	-27,1	2,0±0,3	7,8±1,1	11,5±1,6	0,57±0,2

A tabela 4 apresenta os parâmetros cinéticos: constante de Michaelis-Menten (K_M), velocidade máxima de reação ($V_{máx}$); eficiência catalítica da enzima (k_{cat}/K_M) e constante catalítica (k_{cat}) obtidos com diversas concentrações de sorbitol. O logaritmo neperiano da atividade de água ($\ln a_w$), as osmolalidades da solução e as diversas concentrações de sorbitol também são apresentados. A concentração de RNase A usada na obtenção de todos os dados apresentados acima foi de $6,86 \times 10^{-7} M$ em tampão (Tris Nacl 0,1 M pH 7,0).



A figura 25, mostra a velocidade máxima em função da atividade de água. Apesar de haver um aparente aumento de V_{max} com a diminuição da atividade de água da solução e aumento da concentração de sorbitol e este aumento parece encontrar-se dentro do erro experimental. Entretanto, a variação da velocidade máxima encontrada aqui é da ordem da observada na figura 20 onde sacarose foi utilizada como soluto adicionado. A par destes dados esta variação de velocidade de hidrólise, apesar de não ser grande, parece significativa.

A figura 26, mostra a constante de Michaelis em função da atividade de água. Como no caso em que a atividade de água (a_w) foi tamponada com sacarose, a K_M praticamente não se altera quando a atividade de água é tamponada com sorbitol. Isto indica que está constante independe da atividade de água da solução.

A figura 27 mostra o $\ln$ da constante de Michaelis ($\ln K_M$) em função do $\ln$ da atividade de água ($\ln a_w$) do meio. Novamente, parece não haver uma variação significativa do $\ln$ da constante de Michaelis, indicando que provavelmente não há liberação de água para a solução. Caso esta liberação ocorra, ela é muito pequena.



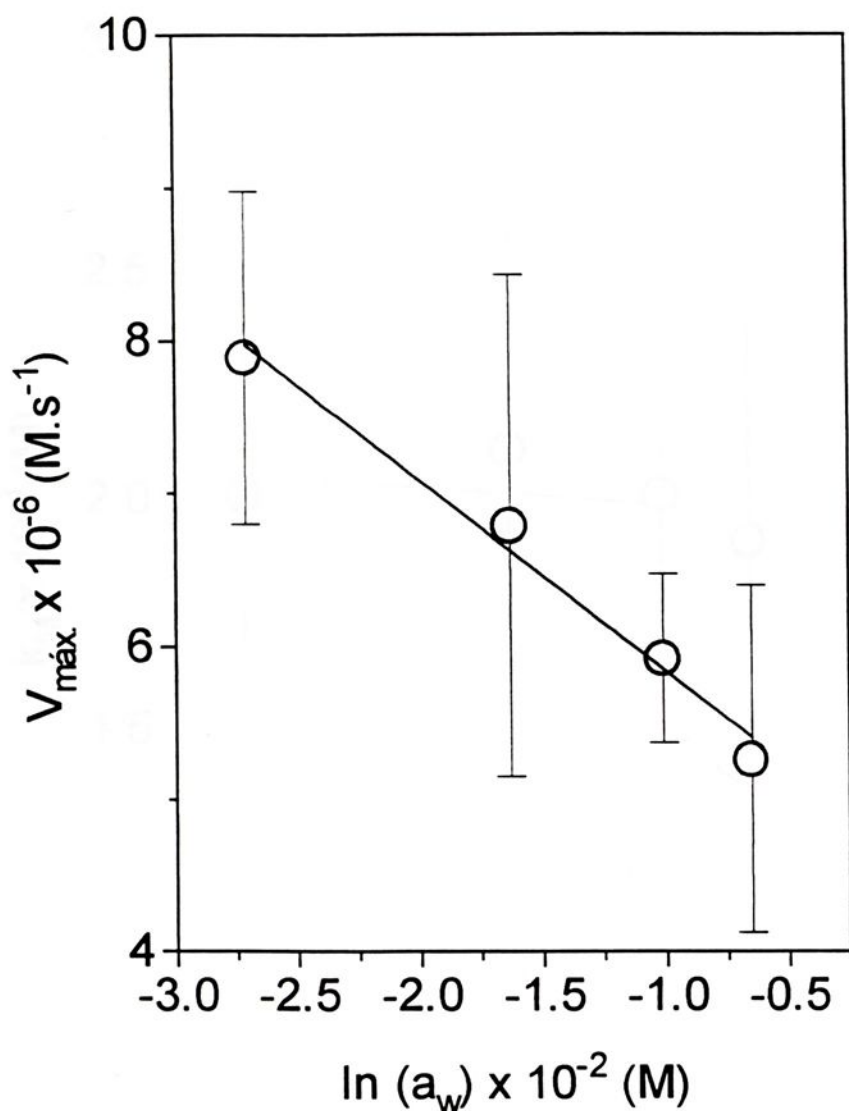


Figura 25. Velocidade máxima em função da atividade de água. Para a obtenção destes dados, foi usado 2'3'CMP como substrato. A concentração da RNase A foi mantida constante a $6.86 \times 10^{-7} \text{ M}$ e a do substrato variou de $0,37 \times 10^{-4}$ a $6.25 \times 10^{-4} \text{ M}$. Todas as soluções acima, foram preparadas em tampão tris 0.1 M, NaCl 0.1 M e pH 7.0.

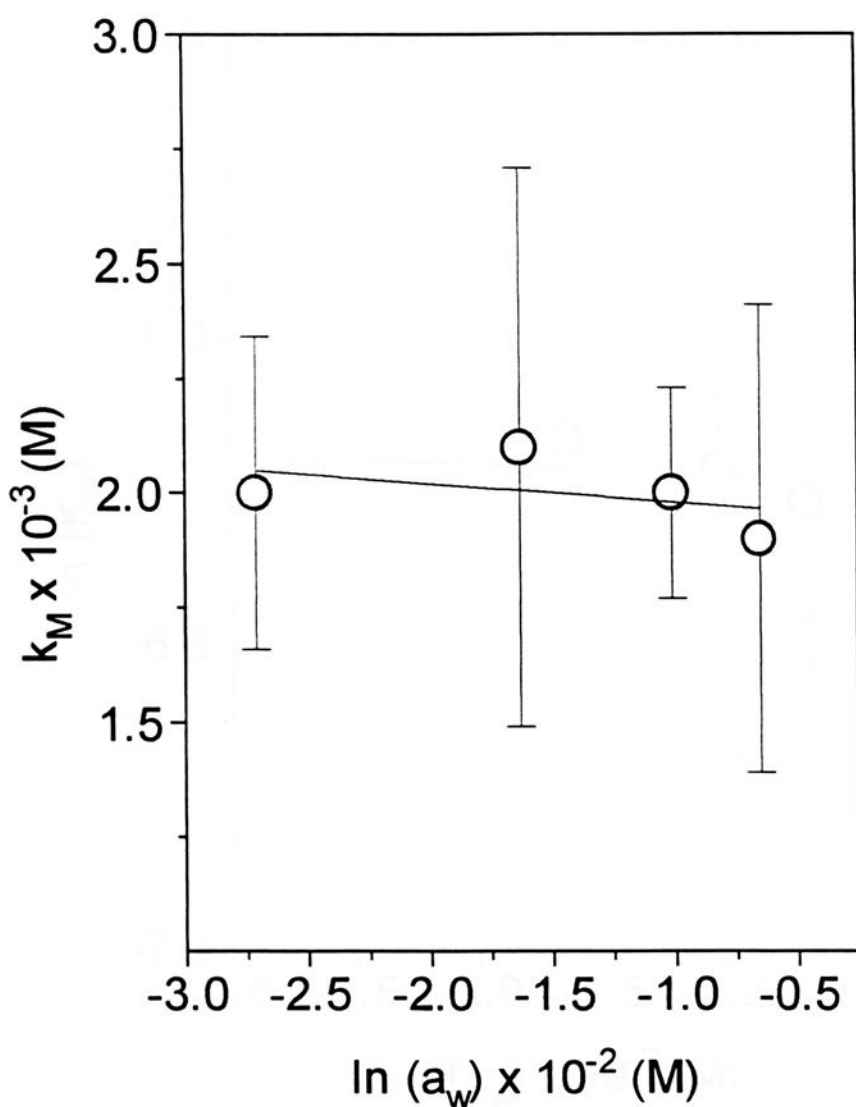


Figura 26. Efeito da constante de Michaelis-Menten em função da atividade de água, quando empregamos 2'3'CMP como substrato. A concentração da RNase A foi mantida constante a $6.86 \times 10^{-7} \text{ M}$ e a do substrato variou de $0,37 \times 10^{-4}$ a $6.25 \times 10^{-4} \text{ M}$. Todas as soluções acima, foram preparadas em tampão tris 0.1 M, NaCl 0.1 M e pH 7.0.

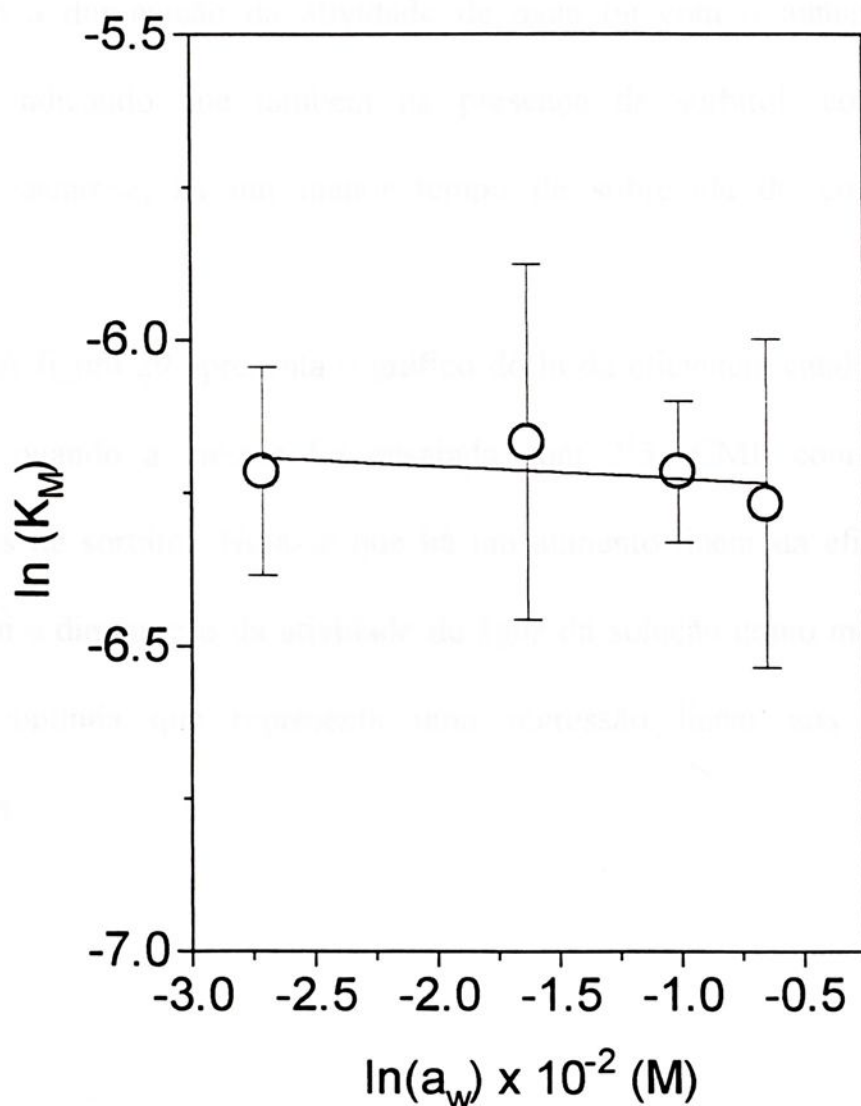


Figura 27. Dependência da constante de Michaelis-menten com a atividade de água, quando a RNase A foi ensaiada com 2'3'CMP e sorbitol. A variação do número de moléculas de água envolvidas na reação de complexação foi de $\Delta n_w = (2 \pm 3)$.

A figura 28 apresenta o gráfico do duplo log da constante catalítica em função da atividade de água. Nota-se que a constante catalítica aumenta com a diminuição da atividade de água ou com o aumento da viscosidade, indicando que também na presença de sorbitol, como na presença de sacarose, há um menor tempo de sobrevida do complexo formado.

A figura 29 apresenta o gráfico do ln da eficiência catalítica da ribonuclease quando a mesma foi ensaiada com 2'3' CMP com várias concentrações de sorbitol. Nota-se que há um aumento linear da eficiência catalítica com a diminuição da atividade de água da solução como mostrado pela linha contínua que representa uma regressão linear aos pontos experimentais.

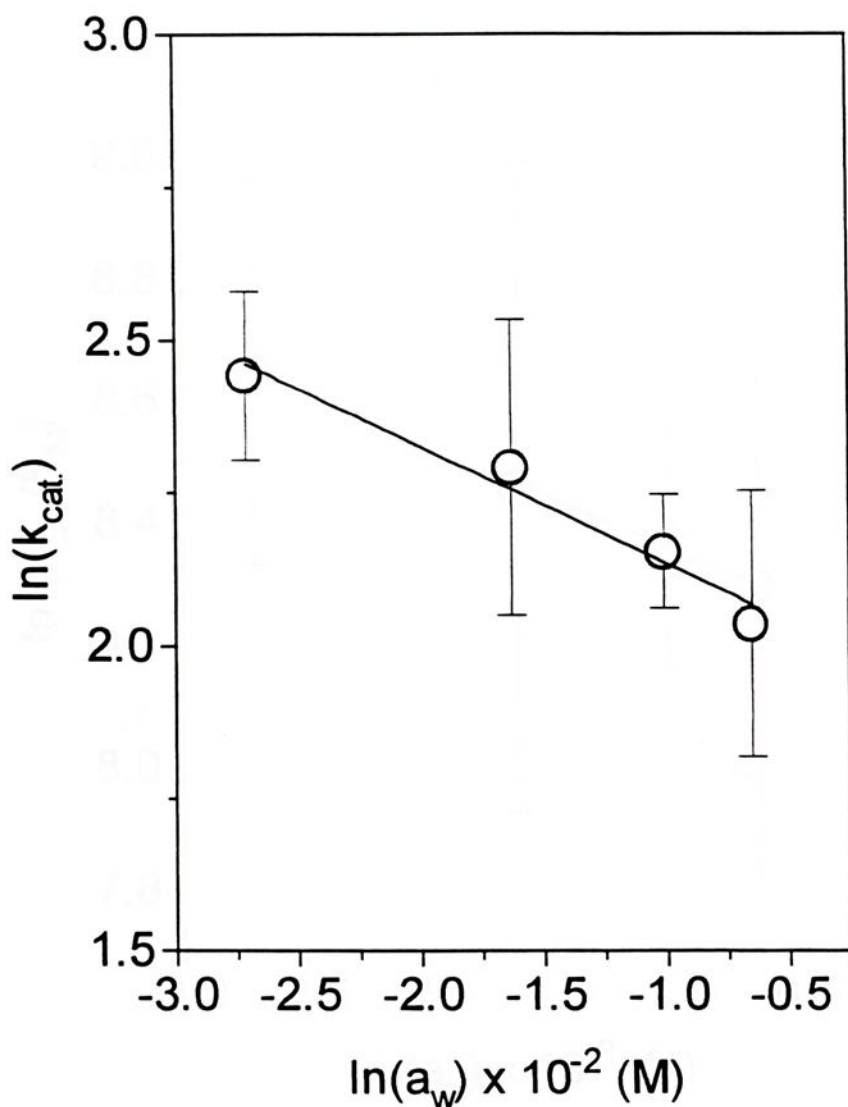


Figura 28. Dependência da constante catalítica em função da atividade de água quando RNase A foi ensaiada com 2'3' CMP na presença de sorbitol. $\Delta n_w = (19 \pm 2)$

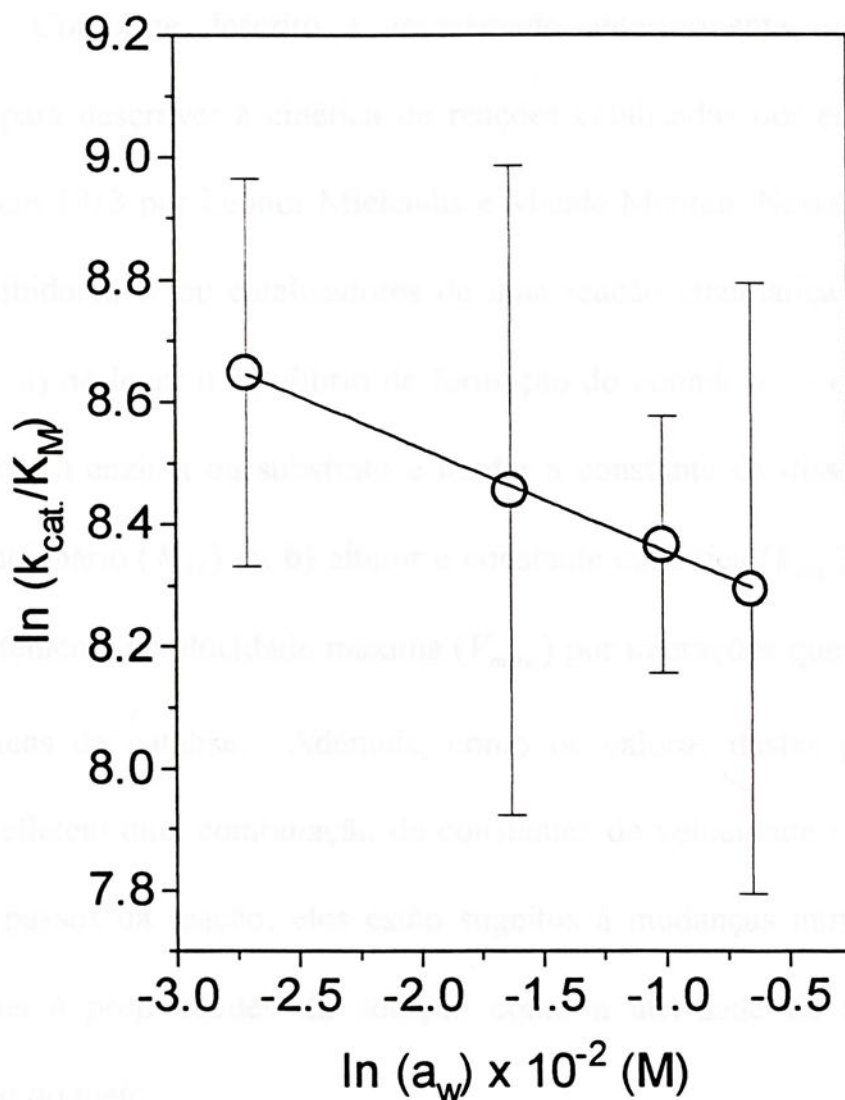


Figura 29. $\ln$ da eficiência catalítica da RNase A com 2'3' CMP , na presença de sorbitol, em função da atividade de água $\Delta n_w = (17 \pm 1)$.

IV. DISCUSSÃO

Conforme descrito e apresentado anteriormente, um modelo muito útil para descrever a cinética de reações catalisadas por enzimas, foi proposto em 1913 por Leonor Michaelis e Maude Menten. Neste modelo, a ação de inibidores e/ ou catalisadores de uma reação enzimática, atuam no sentido de: **a)** deslocar o equilíbrio de formação do complexo, e deste modo interagir com a enzima ou substrato e mudar a constante de dissociação no estado estacionário (K_M) ou **b)** alterar a constante catalítica ($k_{cat.}$), mudando conseqüentemente a velocidade máxima ($V_{max.}$) por interações que alteram as características da catálise. Ademais, como os valores destes parâmetros cinéticos refletem uma combinação de constantes de velocidade referentes à diferentes passos da reação, eles estão sujeitos à mudanças intrinsicamente relacionadas à propriedades da solução como a atividade da água ou a viscosidade do meio.

A variação do primeiro destes parâmetros, a atividade de água, é esperada alterar as constantes de velocidade dos passos que envolvam mudanças conformacionais e/ou de associação da proteína e seu substrato. De maneira geral, um equilíbrio entre duas formas macromoleculares reativas



deve ser deslocado para a espécie menos hidratada em resposta à diminuição da atividade de água da solução. A quantificação deste efeito é possível via a determinação da dependência da constante de equilíbrio da reação com a atividade de água através equação de “Linkage” de Wyman, como mostrado por Colombo (Colombo et al., 1992) em seus estudos sobre o efeito de solvatação na reação de oxigenação da hemoglobina. Esta relação é dada por

$$\frac{d \ln K}{d \ln a_w} = +\Delta n_w \quad (79)$$

onde (K) representa a constante de equilíbrio aparente de reação; (a_w) representa a atividade de água em solução e (Δn_w) a diferença de hidratação entre o estado final (produtos) e o estado inicial (reagentes) da reação.

Esta mesma relação, deve também se aplicar à constante de Michaelis (K_M), pois no estado estacionário esta aproxima-se do valor da constante de dissociação do complexo (ES). Portanto, a equação acima prediz que o $\ln K_M$ varia linearmente com $\ln a_w$, uma vez que todos os sítios expostos aos solvente devem estar completamente hidratados quando em solução aquosa.

Já, a variação da viscosidade da solução afeta diretamente as constantes de velocidade que são determinadas por difusão molecular, como por exemplo nos passos de formação ou dissolução do complexo enzima-substrato ou no de liberação do produto da reação.

Dado que solutos neutros são utilizados como tampões da atividade de água e, conseqüentemente, a viscosidade da solução também varia, a análise do efeito de solutos sobre a energética de catálise deve considerar o efeito destas duas propriedades de solução sobre os parâmetros cinéticos.

IV.1 Diferenciando o efeito de viscosidade do de solvatação sobre os parâmetros cinéticos K_m e k_{cat} .

A diferenciação entre o efeito de mudanças na viscosidade e na atividade de água sobre os parâmetros cinéticos K_m e k_{cat} medidos na presença de solutos neutros pode ser realizada reconhecendo quais passos do mecanismo dependem de difusão molecular. Neste caso, as constantes de velocidade individuais afetadas por difusão variam, segundo a teoria do movimento Browniano de Stokes-Einstein, com o inverso da viscosidade



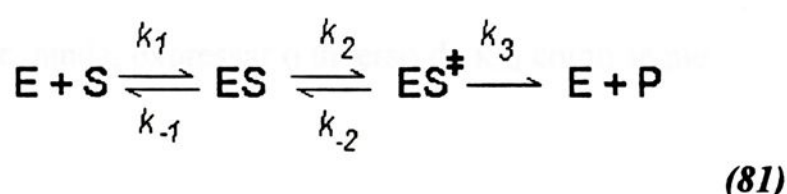
relativa (η_{rel}) da solução, conforme a expressão (Nakatani e Dunford 1979, apud, Wells e Di Cera, 1992)

$$k' = k/\eta_{\text{rel}} \quad (80)$$

onde k é a constante de velocidade na solução de referência, água por exemplo. Portanto, a análise dos dados cinéticos apresentados requer considerarmos, explicitamente, o mecanismo de catálise da Rnase. Deve se destacar que a adição de sacarose à reação tem sido utilizada como um método, método viscosogênico (Di Cera, et.al. 1995), para a determinação da constantes de velocidade envolvidas em esquemas de mecanismo da ação de determinadas enzimas. Estes estudos, entretanto, não tem considerado o possível efeito de solvatação via ligação deferencial de água à diferentes espécies moleculares, como passaremos a fazer.

IV.2. Sobre o mecanismo de ação da Rnase revelado pela adição de solutos neutros.

O mecanismo de ação da Ribonuclease utilizado para a análise do efeito da adição de solutos sobre os parametros de estado estacionário da clivagem de RNA e hidrolise de 2'3'Cmp é representado abaixo



Este mecanismo considera a formação inicial do complexo enzima substrato, ES, e que a catálise ocorre propriamente no estado de transição $\text{ES}^\ddagger$. Destas cinco constantes de velocidade três são provavelmente afetadas por difusão molecular, k_{-1} , k_1 e k_3 . Já as constantes de velocidade associadas à transição de ES para $\text{ES}^\ddagger$ não devem depender da viscosidade por ser este um processo unimolecular.

A resolução do mecanismo de ação enzimática representado pela equação (78) fornece os parametros K_m e k_{cat} dados por

$$K_m = \frac{k_{-1}k_2 + k_3(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_{-2} + k_2 + k_3)} \quad (82)$$

$$k_{cat} = \frac{k_2k_3}{k_{-2} + k_2 + k_3} \quad (83)$$

É conveniente, ainda, expressar o inverso de k_{cat} como segue

$$\frac{1}{k_{cat}} = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3} \frac{k_{-2} + k_2}{k_2} = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3} \cdot \left[\frac{K^\# + 1}{K^\#} \right] \quad (84)$$

Para obter esta expressão definimos a constante de equilíbrio de entre o complexo $ES^\#$ e o complexo ES , $K^\#$ dada por $K^\# = k_2 / k_{-2} \cdot K^\#$, portanto, corresponde à constante de equilíbrio referente à diferença de energia livre associada à formação do estado de transição $ES^\#$.

Na equação (84) só k_3 depende da viscosidade segundo a expressão (80) enquanto a contribuição da atividade de água para k_{cat} é dada pelo termo de equilíbrio $(K^\# + 1/K^\#)$. Tanto a atividade de água quanto a viscosidade da solução são diretamente proporcionais à concentração do

soluto adicionado à solução. Portanto, a inspeção de como o inverso de k_{cat} varia com a concentração do soluto pode nos fornecer maneiras de aferir o efeito destas variáveis sobre a cinética da reação. Por exemplo, se explicitarmos na equação (84), a dependência de k_3 com a viscosidade, o inverso de k_{cat} fica dado pela equação a seguir

$$\frac{1}{k_{cat}} = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3} \cdot \left[\frac{K^\# + 1}{K^\#} \right] \cdot \eta_{rel} \quad (85)$$

Portanto, se pudermos desprezar o efeito de adição de solutos sobre $[(K^\# + 1)/K^\#]$, esta relação prediz que o inverso da constante catalítica aumenta linearmente com a viscosidade relativa do meio (k_{cat} diminui). Nesta circunstância o valor de $[1/k_{cat}]$ extrapolado para viscosidade zero fornece o valor de k_2 . Por outro lado se o efeito da adição de solutos, e portanto da variação da atividade de água sobre $[(K^\# + 1)/K^\#]$ não puder ser desprezado, o comportamento de $[1/k_{cat}]$ com a concentração do soluto neste caso diferirá daquele em que só a viscosidade do meio importa. Com o uso da equação (85) poderemos, portanto, avaliar k_2 e $K^\#$ e diferenciar efeitos de solvatação e de viscosidade nas reações analisadas.



IV.3 Sobre o efeito de água e de viscosidade na reação de RNase com RNA.

O gráfico dos dados apresentados na tabela 2, do inverso de k_{cat} medidos na cinética de clivagem de RNA em função da viscosidade relativa da solução, revelou um valor para o inverso de k_2 de - 0.002. Este valor indica que a constante de velocidade para a formação do complexo ativado $ES^\#$ é muito maior que k_3 , uma vez que o valor de $1/k_2$ é muito próximo à zero na escala de tempo de $1/k_3$ (dezena de segundos). O valor negativo encontrado para $1/k_2$ deve, inclusive, refletir o erro experimental ao tentarmos determinar um valor muito pequeno $1/k_2$ na escala de tempo muito maior determinada pelo baixo valor relativo de k_3 . Este resultado implica na não necessidade de considerarmos um estado de transição para a catálise da clivagem do RNA, ou porque ele não existe ou, porque se ele existir o equilíbrio entre ES e $ES^\#$ esta fortemente deslocado na direção do estado ativado. Este resultado implicaria ainda em que $K^\# \gg 1$. Com $K^\# \gg 1$ e $k_3 \ll k_2$, a constante catalítica para a clivagem do RNA pode ser equacionada como



$$\frac{1}{k_{cat}} = \frac{1}{k_3} \cdot \eta_{rel} \quad (86)$$

A interpretação que leva à esta equação pode ser reafirmada com o auxílio do gráfico do logaritmo de k_{cat} em função do logaritmo da viscosidade relativa. Pela equação acima a inclinação deste gráfico deve ser igual à menos 1 caso as condições de $K^{\#} \gg 1$ e $k_3 \ll k_2$ forem verdadeiras. De fato, este gráfico mostrado na figura 11, forneceu inclinação igual à - 1.09, o que concorda muito bem com a nossa predição. Portanto, podemos concluir desta análise que o passo limitante da clivagem do RNA pela RNase é o passo representado pela liberação dos produtos à solução e, que o equilíbrio entre a RNase e RNA está fortemente deslocado para o complexo ativado. Formalmente, podemos então concluir que $k_3 \ll k_2$ e $K^{\#} \gg 1$ para a reação de clivagem do RNA por RNase.

Vamos avaliar agora o possível efeito da viscosidade e atividade de água sobre a constante de Michaelis. Com este objetivo, podemos reescrever a equação (82) tendo em conta que $k_3 \ll k_2$ como



$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} \cdot \frac{k_2}{(k_{-2} + k_2)} + \frac{k_3}{k_1} \cdot \frac{k_2}{(k_{-2} + k_2)} \quad (87)$$

ou, utilizando a definição da constante de equilíbrio entre ES e ES[#],

$K^{\#} = k_2 / k_{-2}$, como

$$K_m = \left[\frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_3}{k_1} \right] \cdot \frac{K^{\#}}{K^{\#} + 1} = \frac{k_{-1} + k_3}{k_1} \cdot \frac{K^{\#}}{K^{\#} + 1} \quad (88)$$

Como podemos notar, esta equação obtida com a condição de que $k_3 \ll k_2$ é composta por dois termos. O primeiro termo à direita, que corresponde formalmente à K_m para o mecanismo mais simples possível, é composto pela razão entre as constantes de velocidade k_1 , k_{-1} e k_3 . Como uma destas três constantes são inversamente proporcionais à viscosidade, a razão entre elas independe desta propriedade da solução. O segundo termo na equação (88) é, segundo nossa análise do efeito de sacarose sobre k_{cat} , próximo a um. Com esta condição, temos que a constante de Michaelis, medida para a clivagem do RNA é dada pela equação (89),

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_3}{k_1} \quad (89)$$

Caso k_3 seja muito menor que k_{-1} , o que é de se esperar, K_m acima pode ser considerado como a constante de equilíbrio para a formação do complexo enzima substrato. Portanto, a dependência de K_m , medida com a adição de sacarose refletirá a variação de hidratação nesta reação.

Desta análise podemos concluir que a causa mais provável de mudanças de K_m nesta reação de clivagem de RNA por RNase se deve à diferenças de solvatação entre a enzima e substrato livre em relação ao complexo enzima/substrato e ao seu complexo ativado.

Esta diferença de hidratação medida via a análise de linkage entre a constante de dissociação ($\ln K_M$) para a reação entre RNase A e RNA com $\ln(a_w)$ revela que cerca de 103 ± 4 moléculas de água são liberadas para a solução com a formação do complexo ($RNaseA \cdot RNA$).

Este resultado indica que com a complexação, uma ampla superfície de contato entre a porção do RNA e o sítio ativo da RNase A excluem moléculas de solvente. Esta interpretação é concordante com os dados cristalográficos (McPherson et al., 1986) do complexo $RNaseA \cdot polIA$

onde se nota um grande número de contatos entre a proteína e DNA de fita simples sem a participação de água.

E interessante notar que a diminuição da atividade de água da solução ou o aumento da concentração de osmolitos na solução, diminui K_M da reação de RNase A com RNA. Portanto, a formação do complexo ($RNaseA \cdot RNA$) é favorecida à atividades de água menores. Isto evidencia que, possivelmente, a água possa funcionar como um inibidor da enzima com relação a este substrato. Rand et al (1993), que estudou o efeito da adição de polietileno glicol de diferentes tamanhos sobre a cinética e o equilíbrio de hexoquinase com glicose e, analisou seu dados segundo a metodologia proposta por Colombo et.al. (1992), também observou este possível caráter inibidor da água naquela enzima.

IV.4 Sobre o efeito de água e de viscosidade na reação de RNase A com C>p.

A dependência de K_M , e de k_{cat} , com a concentração de sacarose e de sorbitol, medida para a hidrólise de C>p, é distinta daquela observada para a clivagem de RNA. A constante de Michaelis não se altera



com adição destes solutos enquanto o valor da constante catalítica aumenta com o aumento da concentração de soluto. Estes efeitos sobre K_m indicam que na reação de hidrólise de $C>p$:

a) não há uma variação de hidratação aparente entre o complexo $RNase \bullet C>p$ e RNA e $C>p$ livres e que o efeito da viscosidade sobre as constantes de velocidade que contribuem para o K_m observado se combinam de forma à anular a contribuição líquida desta variável, ou, ainda,

b) os efeitos de viscosidade e atividade de água sobre K_m são opostos e se compensam; e

c) já o aumento de k_{cat} com o aumento da concentração de soluto indica uma contribuição da atividade de água sobre o valor de k_{cat} observado. Isto é indicado pelo fato de que k_{cat} deveria, segundo a equação (85), diminuir e não aumentar com o aumento da viscosidade.

Com o objetivo de traçar o mecanismo de hidrólise do $C>p$ compatível com estes dados experimentais, vamos analisar o comportamento de K_m e k_{cat} , dados pelas equações (82) e (85), respectivamente, em dois limites extremos: 1) $k_3 \ll k_2$, e; 2) $k_3 \gg k_2 + k_2$.



IV.4.1 Caso 1: a hidrólise de C>p por RNase segue o mecanismo expresso pelo esquema (81) com $k_3 \ll k_2$.

Esta condição, aplicada à constante de Michaelis representada pela equação (82), permite escrevermos a aproximação representada pela equação (88)

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_3}{k_1} \cdot \frac{K^\#}{K^\# + 1} \quad (88)$$

Como comentado anteriormente: a) esta expressão não depende da viscosidade e; b) o primeiro termo do lado direito da igualdade aproxima-se da constante de dissociação K_d do complexo ES para formar E e S livres. Caso, ainda, $K^\# \gg 1$, a equação (88) resume-se à K_d e, portanto, a ausência do efeito da atividade de água sobre K_m mediria a variação de hidratação entre ES e E + S. Entretanto, como visto na análise da clivagem do RNA, quando $K^\# \gg 1$ a constante catalítica (k_{cat}) depende exclusivamente da viscosidade, equação (86). Portanto, esta condição para $K^\#$ não explica nossas observações para a hidrólise do C>p.



Uma outra hipótese seria supor $K^\# \ll 1$, i.é, que o equilíbrio entre o estado ES e o estado de transição $ES^\#$, esta grandemente deslocado na direção de ES. Neste caso, a expressão (88) se aproxima da equação (89), dada por

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_3}{k_1} \cdot K^\# = K_d \cdot K^\# \quad (89)$$

Como o efeito da variação da atividade de água é medido pela relação de “linkage” entre $\ln(K_m)$ com $\ln(a_w)$, dada por

$$\frac{\partial \ln(K_m)}{\partial \ln(a_w)} = \frac{\partial \ln(K_d)}{\partial \ln(a_w)} + \frac{\partial \ln(K^\#)}{\partial \ln(a_w)} = \Delta n_w \quad (90)$$

A observação de que K_m é insensível à variações de a_w , implica que $\Delta n_w = 0$ na equação acima. Portanto, a soma da variação de hidratação associada à K_d , devido à dissociação de ES para E+S, com a variação de hidratação associada $K^\#$, devido à transição de ES para $ES^\#$, deveriam se anular. Este resultado implica que na associação de E + S para formar o

complexo ES e na transição de ES para ES[#], o número de moléculas de água envolvidas seja o mesmo. Como se espera que na complexação de ES haja liberação de água, devemos julgar a possibilidade de haver liberação de água na transição de ES para ES[#].

Para julgar esta possibilidade vamos analisar o efeito da adição de solutos sobre k_{cat} para C>p, a partir da equação (85) com a condição de que $k_3 \ll k_2$ e $K^\# \ll 1$

$$\frac{1}{k_{cat}} = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3} \cdot \left[\frac{K^\# + 1}{K^\#} \right] \cdot \eta_{rel} \quad (85)$$

Com estas aproximações k_{cat} vem dada pela equação (91) abaixo

$$k_{cat} = \frac{k_3}{\eta_{rel}} \cdot K^\# \quad (91)$$

Esta expressão demonstra que k_{cat} diminua com o aumento da concentração do soluto em consequência do aumento da viscosidade e, que o aumento de k_{cat} só seria possível caso $K^\#$ crescer mais rapidamente que



k_3/η decrescer com o aumento da concentração do soluto. Como o aumento de $K^\#$ implica no deslocamento do equilíbrio para a forma $ES^\#$, é de se esperar que $ES^\#$ seja menos hidratado que ES . Este resultado é compatível com nossa análise do efeito de viscosidade e solvatação sobre K_m e pode, em princípio, explicar nossos dados experimentais.

IV.4.2 Caso 2: a hidrólise de $C>p$ por Rnase segue o mecanismo expresso pelo esquema (81) com $k_3 \gg k_{-2} + k_2$.

A outra possibilidade para explicar os dados experimentais é considerar que $k_3 \gg k_{-2} + k_2$. Esta condição é sugerida pela análise do efeito da viscosidade sobre K_m expresso pela equação (82)

$$K_m = \frac{k_{-1}k_2 + k_3(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_{-2} + k_2 + k_3)} \quad (82)$$

quando a dependência k_{-1} , k_1 e k_3 com a viscosidade é explicitada, escrevendo

$$k_{-1}=k_{-1}/\eta_{rel}, \quad k_1=k_1/\eta_{rel}, \quad e \quad k_3=k_3/\eta_{rel}$$

Substituindo estes valores em (82) resulta a equação (92)

$$K_m = \frac{k_2(k_{-1} + k_3) \cdot \eta_{rel} + k_{-1}k_3}{k_1(k_{-2} + k_2) \cdot \eta_{rel} + k_1k_3} \quad (92)$$

Como K_m para a hidrólise de C>p independe da viscosidade, a condição sugerida por esta equação é que tanto no numerador quanto no denominador os termos que multiplicam a viscosidade sejam muito menores, ou muito maiores, que o termo independente da viscosidade. Esta última condição de desigualdade leva ao Caso 1 já analisado. Portanto, a condição a ser analisada agora é aquela quando o termo dependente de viscosidade no dividendo da equação (92) for muito menor que o não dependente. Esta análise demonstra a origem da suposição original, isto é, que

$$k_3 \gg (k_{-2} + k_2)$$

A condição de desigualdade aplicada ao numerador de (92) é dada por

$$k_{-1}k_3 \gg k_2(k_{-1} + k_3) \equiv k_2k_{-1} + k_2k_3$$

permite, ainda, concluir que $k_{-1} \gg k_2$. Esta condição de desigualdade implica que o complexo é favorecido em relação à sua

redissociação. Estabelecidas estas desigualdades, a constante de Michaelis, dada pela equação (92) reduz-se à equação (93)

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (93)$$

que mostra que se $k_3 \gg (k_{-2} + k_2)$ para a hidrólise do C>p, então K_m representa integralmente a constante de equilíbrio de dissociação do complexo ES em E + S. A constância de K_m com a atividade de água indicaria, portanto, que a ligação do C>p à RNase ocorre com uma variação de hidratação praticamente nula.

Vamos analisar agora a consequência de $k_3 \gg (k_{-2} + k_2)$ sobre a constante catalítica k_{cat} dada pela equação (83)

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_{-2} + k_2 + k_3} \quad (83)$$

Com a condição acima, podemos desprezar $k_{-2} + k_2$ frente à k_3 , e, k_{cat} se aproxima à



$$k_{cat} = k_2 = k_{-2} \cdot K^{\#} \quad (94)$$

onde, a definição da constante de equilíbrio para a formação do estado estacionário $K^{\#} = [ES^{\#}/ES] = k_2/k_{-2}$ foi utilizada. Como nem k_{-2} nem $K^{\#}$ dependem da viscosidade, a condição $k_3 \gg (k_{-2} + k_2)$ leva à uma expressão para k_{cat} que independe da viscosidade. Assim, a variação da constante catalítica para a hidrólise de C>p com a concentração do soluto deve-se, exclusivamente, ao efeito da variação da atividade da água sobre $K^{\#}$. Desda maneira, a inclinação do gráfico de $\ln(k_{cat})$ com $\ln(a_w)$ forneceria a variação de hidratação associada à formação do estado de transição. Como aquela inclinação é negativa, isto implica que o estado de transição da enzima é menos hidratado que o complexo RNase•C>p.

IV.4.3 Comparação entre os mecanismos de hidrólise de C>p por Rnase associados aos Casos 1, onde $k_3 \ll k_{-2} + k_2$, e, 2, onde $k_3 \gg k_{-2} + k_2$.

O quadro I resume as possibilidades de analisar, consistentemente, a dependência de K_m e k_{cat} , obtidos para a hidrólise de

C>p catalizada pela RNaseA, com a concentração de sacarose e de sorbitol na solução.

Em ambos os casos, a comparação dos dados experimentais com a viscosidade relativa e a atividade de água leva à conclusão de que o passo limitante da hidrólise de C>p catalizada por RNaseA é a formação do estado ativado ES[#]. Esta conclusão é óbvia para o Caso 1, pois, dado $k_3 \gg k_2$ a única maneira de se explicar o aumento observado de k_{cat} com o aumento da

Quadro I - Comparação entre os mecanismos de hidrólise de C>p por RNaseA sugeridos pelo efeito de adição de solutos neutros á solução.

<u>Caso 1</u>	<u>Caso 2</u>
$k_3 \ll k_2$	$k_3 \gg k_{-2} + k_2$
$K^\# \ll 1$	$k_{-1} \gg k_2$
$K_m = K_d \cdot K^\#$	$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1}$
$k_{cat} = \frac{k_3}{\eta_{rel}} \cdot K^\#$	$k_{cat} = k_2 = k_{-2} \cdot K^\#$

concentração do soluto na solução foi considerar $K^{\#} = ES^{\#}/ES \ll 1$. No caso 2, obtivemos a condição $k_{-1} \gg k_2$ ao analisarmos o comportamento de K_m com a viscosidade. Dado que k_{-1} , a constante de redissociação de ES , é muito maior que k_2 , a constante de velocidade de formação do estado ativado a partir de ES , o equilíbrio está deslocado para a esquerda no mecanismo representado pelo esquema (81). Portanto, podemos concluir que o passo limitante da hidrólise de $C \rightarrow p$ é a formação do estado de ativação. Esta conclusão está de acordo com o mecanismo proposto por Hammes a partir de seus estudos com cinética rápida (Cantor & Schimmell, pp. 924 e Richards & Wyckoff, pp. 766). Este autor propôs que este passo limitante correspondente à transição entre um isômero do complexo $E \bullet C \rightarrow p$ e um isômero do complexo $E \bullet 3' \text{CMP}$, onde $3' \text{CMP}$ é o substrato $C \rightarrow p$ hidrolisado.

A análise do comportamento de K_m para a hidrólise de $C \rightarrow p$ com η e a_w não permite especificar qual dos mecanismos, Caso 1 ou 2, é aquele que determina o comportamento enzimático da RNaseA. Entretanto, a análise do comportamento de k_{cat} com estas variáveis pode distinguir entre estes dois mecanismos. No Caso 1, k_{cat} depende explicitamente de η e, implicitamente de a_w através de $K^{\#}$. No Caso 2 k_{cat} só depende de a_w . Estas diferenças podem ser avaliadas, então, ao utilizarmos solutos distintos que



alteram diferentemente a viscosidade da solução. Uma tentativa foi usar sacarose e sorbitol. À mesma concentração, o primeiro produz uma solução mais viscosa que o segundo. Portanto, se sómente a viscosidade alterasse k_{cat} , a diminuição de k_{cat} com sacarose seria mais pronunciada que com sorbitol. Entretanto, k_{cat} aumenta com os dois solutos, um efeito que interpretamos como devido ao aumento de $K^{\#}$ com a diminuição de a_w . O resultado líquido destas variações contrapostas, caso o efeito de a_w independa do soluto, seria k_{cat} variar menos na presença de sacarose que na de sorbitol. Este parece ser o caso, pois a inclinação de $\ln(k_{cat})$ com $\ln(a_w)$ medida na presença de sacarose é de -13 ± 4 e na presença de sorbitol de -19 ± 2 . Este resultado deve, entretanto, ser considerado com cautela, pois o erro experimental associado à estas medidas é bastante grande (vide Figuras 24 e 29). Na hipótese de que a diferença entre estas inclinações não sejam estatisticamente significantes, os resultados indicariam que só o efeito de a_w sobre $K^{\#}$ seria o responsável pela variação observada de k_{cat} com estes dois solutos. Esta hipótese é a que é prevista no Caso 2 onde $k_{cat} = k_{-2} \cdot K^{\#}$.

Os dados ora apresentados não nos permitem, portanto, distinguir qual dos dois mecanismos, aquele no qual $k_3 \ll k_2$ ou aquele em que $k_3 \gg k_2 + k_{-2}$ melhor descreveria a catálise de hidrólise do C>p por RNaseA.



Entretanto, esta análise parece permitir estabelecer, via o mecanismo no qual $k_3 \gg k_2 + k_{-2}$ um valor mínimo para a variação de hidratação entre o estado ES e o estado de transição $ES^\#$. Isto é possível porque neste caso k_{cat} não depende da viscosidade do meio. Este valor de variação de hidratação é obtido da inclinação do gráfico de $\ln(k_{cat})$ versus $\ln(a_w)$, que, como mencionado, é de $\Delta n_w = -13 \pm 4$ para sacarose e $\Delta n_w = -19 \pm 2$ para sorbitol. Como Δn_w corresponde à diferença do número de moléculas de água associadas ao estado $ES^\#$ e ES, o sinal negativo implica na liberação de, no mínimo, cerca de 10 a 20 moléculas de água com a formação do estado de transição.

Estudos principalmente conduzidos por G.G.Hammes e seus colaboradores da interação de RNaseA com mononucleotídeos cíclicos indicaram que o mecanismo desta interação envolve, inicialmente, a associação da enzima ao substrato e, a qual é seguida pela isomerização ou uma mudança conformacional do complexo $RNaseA \bullet C > p$ (E.J.del Rosario e G.G.Hammes, 1970). Os resultados ora apresentados, mostrando que K_m não depende da atividade de água e, o aumento de k_{cat} com a diminuição da atividade de água indicam a ocorrência de liberação de moléculas de água na transição do estado ES para o estado $ES^\#$. Estes nossos resultados são



compatíveis com o mecanismo proposto por Hammes et.al. a partir de seus estudos com métodos de relaxação.

Os dados cristalográficos do análogo do estado de transição (Wlodawer et al, 1983) mostram que a uridina 2'3' cíclico vanadato (U>p) faz vários contatos moleculares com o sítio ativo da RNase A. Estes resultados cristalográficos demonstram que o complexo é menos hidratado que a enzima e o substrato livres. Decidir em qual, ou em quais passos da reação estas mudanças de hidratação ocorrem depende de se decifrar o mecanismo de hidrólise do C>p. Se o mecanismo for aquele em que $k_3 \ll k_2$ a formação do estado de transição poderia acontecer em dois passos subsequentes de desidratação com cerca de 50% da água sendo liberada na formação do complexo ES e 50% na transição para o estado ES[#]. Caso $k_3 \gg k_2 + k_{-2}$ a liberação de moléculas de água do complexo ocorreria principalmente com a complexação de E + S para forma ES. Neste caso, os fatores moleculares responsáveis pela formação do estado de transição não envolveriam um grande rearranjo do complexo à ponto de alterar significativamente a sua hidratação.



IV.5 Considerações finais.

Findlay et al (1960), mostrou que a atividade da ribonuclease pancreática bovina (RNase), permanece ativa a altas concentrações de solventes orgânicos. Posteriormente, num trabalho de 1962, os próprios autores investigaram o efeito de álcool e solventes inertes na atividade da RNase. Estes autores concluíram que a RNase é ativa na presença de altas concentrações daqueles solutos e, que álcool é um inibidor não competitivo da hidrólise em relação ao 2'3' CMP, mas, é um inibidor competitivo em relação à água. Em trabalho mais recente, Santoro et al estudaram o efeito de sarcosina sobre a estabilidade termica da RNaseA e, em experimentos controle observaram que a adição de 4 molar de sarcosina pouco altera os parâmetros cinéticos da hidrólise do C>p pela RNase A (Santoro et al, 1992). Os resultados agora apresentados concordam, qualitativamente, com aqueles publicados por Santoro, especialmente os valores de Km.

Outros trabalhos tem sido publicados na literatura mostrando o efeito da adição de solutos sobre a atividade de diversas enzimas. Em muitos



destes trabalhos busca-se demonstrar o efeito estabilizador da estrutura e atividade destas proteínas promovido por esta classe de solutos. Em alguns outros casos, a adição de sacarose é utilizada como agente viscosogênico, com o objetivo de se determinar os valores das constantes de velocidade que contribuem para os parâmetros cinéticos de estado estacionário observados (Di Cera, et.al. 1992). Nestes estudos, entretanto, a possível contribuição do potencial químico da água para as variações de energia livre de associação e dissociação nos diversos estágios da cinética de estado estacionário não tem sido analisada. Neste trabalho, estendemos a análise do efeito da adição de solutos sobre K_m e k_{cat} medidos para a clivagem de RNA e hidrólise de 2'3'Cmp, considerando, explicitamente, efeitos de potencial químico de água e de viscosidade do meio. Isto nos permitiu propor, independentemente, mecanismos da ação da RNaseA sobre estes substratos e começar a quantificar o papel da solvatação na ação desta enzima.



V. CONCLUSÃO

Em vista aos resultados apresentados, pode-se concluir que:

a) a diminuição da velocidade máxima (V_{max}) da reação de clivagem do RNA catalisada pela RNase A com o aumento da concentração de sacarose é um efeito que pode ser integralmente atribuído ao aumento da viscosidade com a adição do soluto;

b) a diminuição da constante de dissociação (K_M) na reação acima, com o aumento da concentração de sacarose, deve-se à diminuição da atividade de água (a_w). Como determinado, a associação de RNase A com o RNA é acompanhada pela liberação de cerca de (103 ± 4) moléculas de água, processo este que é favorecido à valores menores da atividade de água;

c) a eficiência catalítica ($k_{cat.}/K_M$) da reação de clivagem aumenta com a diminuição da atividade de água (a_w), e que o passo limitante nesta reação é a liberação dos produtos para a solução.

d) a cinética de clivagem do fosfato ciclico do complexo C>p por Rnase é um processo no qual o passo limitante da reação é representado pela transição do complexo enzima substrato para o estado ativado deste complexo. Esta transição

é, entretanto, favorecida pela diminuição da atividade de água pois o estado ativado é menos hidratado que o complexo enzima substrato. A variação de hidratação medida nesta transição é de no mínimo cerca de 10 a 20 moléculas de água.

e) a variação de hidratação associada à reação de complexação da RNase A com C>p na presença de sacarose e na presença de sorbitol é praticamente nula a julgar pela independência do valor K_M com a concentração destes solutos. O mecanismo proposto para explicar estes dados indicou que, ou a associação do substrato à esta enzima ocorre com variação de hidratação nula ou, a variação de hidratação que acompanha a redissociação do complexo enzima substrato é igual à que acompanha a formação do complexo ativado a partir do complexo enzima substrato.

f) a tendência de aumento da constante catalítica ($k_{cat.}$) de hidrólise de C>p catalizada por RNase A reflete a menor hidratação do complexo ativado em relação ao complexo enzima substrato. Não foi possível decidir, entretanto, se só a atividade de água (a_w) ou a atividade de água e viscosidade do meio contribuem para $k_{cat.}$ observado.

g) como efeito líquido, a eficiência catalítica ($k_{cat.}/K_M$) da RNase A em hidrolisar C>p aumenta com o aumento da concentração de sacarose ou sorbitol.



Como o aumento da viscosidade tende a diminuir a eficiência de catalise este aumento observado deve ser atribuído à água. O número mínimo de moléculas de água envolvidas entre RNase A e C>p livres em solução e o complexo ativado $(RNaseA \cdot C > p)^{++}$ foi de (17 ± 2) na presença de sacarose e (17 ± 1) na presença de sorbitol.



VI.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arakawa, T., Timasheff, S. N., Biochemistry, **24**, 6536, (1985).
2. Asimov, I. "*O Universo da Ciência*", vol.3, Ed. Editorial Presença, (1987).
3. Bonafe, C.F.S., Vilas-Boas, M., Suarez, M.C., Silva, J.L., J. Biol. Chem., **266**, 13210, (1991), "*Reassembly of a Large Multisubunit Protein Promoted by Nonprotein Factors; Effects of Calcium and Glycerol on the Association of Extracellular Hemoglobin*".
4. Boyer, P. D., "*in The Enzymes : Kinetics and Mechanism*", Ed. (Academic Press, New York, ed. 3, 1970), vol. 2.
5. Breslow, R., and Xu, R., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol.90, pp. 1201-1207 (1993), "*Recognition and catalysis in Nucleic Acid Chemistry*".
6. Cantor, C.R. and Schimmel, P.R. "*Biophysical Chemistry - Part III*", Freeman, São Francisco, (1980).
7. Castellan, G. "*Fundamentos de Físico-Química*" Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. Rio de Janeiro R.J.
8. Cathou R. E. and G. G. Hammes, Journal American Chemical Society, **86**, 3240-3245, (1964), "*Relaxation Spectra of Ribonuclease; I. The Interaction of Ribonuclease with Cytidine 3'-Phosphate*".
9. Changeux, J. P., Scientific American, (1965), "*The Control of Biochemical Reactions*".
10. Colombo, M. F., Rau, D.C., Parsegian, V.P., Science, **256**, 655, (1992), "*Protein Solvation in Allosteric Regulation: A Water Effect on Hemoglobin*".



11. Colombo, M. F., Rau, D.C., Parsegian, V.P., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 91, 10517-10520, (1994), ***“Reevaluation of chloride’s regulation of hemoglobin oxygen uptake: the neglected contribution of protein hydration in allostery”***.
12. Crook, E.M., Mathias, A.P., Rabin, B.R., Biochemical J., vol. 74(b), (1960), ***“Spectrophotometric Assay of Bovine Pancreatic Ribonuclease by the use of Cytidine 2’:3’-Phosphate”***.
13. de Meis, L., Martins, O.B., Alves, E.W., Biochemistry, 19, 4252, (1980), ***“Role of Water, Hydrogen Ion and Temperature on the Synthesis of Adenosine Triphosphate by the Sarcoplasmic Reticulum Adenosine Triphosphate in the Absence of a Calcium Ion Gradient”***.
14. Di Cera, E., De Cristofaro, R., J. Mol. Biol., 216, pp. 1077-1085, (1990), ***“Effect of protons on the Amidase Activity of Human α -Thrombin; Analysis in Terms of a General Linkage Scheme”***.
15. Di Cera, E., & Wells, C., M., Biochemistry, 31, pp. 11721-11730, (1992), ***“Thrombin Is a Na^+ -Activated Enzyme”***.
16. Dreyfus, M., Fries, J., Tauk, P., Herve, G., Biochemistry, 23, 4852, (1984), ***“Solvent Effects on Allosteric Equilibria: Stabilization of T and R Conformations of Escherichia coli Aspartate Transcarbamylase by Organic Solvents”***.
17. Findlay, D., Mathias, A.P. and Rabin, B.R. Biochem. J., 85, pp. 134-139, (1962). ***“The Active Site and Mechanism of Action of Bovine Pancreatic Ribonuclease; 4) The activity in inert organic solvents and alcohols”***.



18. Findlay, D., Mathias, A.P. and Rabin, B.R. Nature, Vol. 187, (1960),
"Activity of Bovine pancreatic Ribonuclease A in Mixed Solvent Systems".
19. Freifelder, D. ***"Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology"***, Second Edition, Ed. Freeman, (1982).
20. Ghélis, C. and Yon, J. ***"Protein Folding"***, pp. 173-175, (1982), Ed. Academic Press Inc.
21. Haire, R.N., e Hedlund, B.E., Biochemistry, 22, 327, (1983), ***"Hemoglobin Function in the Water-Ethylene Glycol Cosolvent System: Linkage Between Oxygen Binding and Hydration"***.
22. Hammes, G., G., & del Rosario, E., J., Journal of the Chemical Society, 92, pp. 1750-1753, (1970), ***"Relaxation Spectra of Ribonuclease 'The Interaction of Ribonuclease with Uridine 2'3'-Cyclic Phosphate'"***.
23. Hammes, G., G., Advances Protein Chem., 23, pp.1 , (1968).
24. Herries, D.G., Mathias, A.P. and Rabin, B.R. Biochem. J., 85, pp.127-134, (1962), ***"The Active Site and Mechanism of Action of Bovine Pancreatic Ribonuclease; 3) The pH-dependence of the kinetic parameters for the hydrolysis of cytidine 2'3'-phosphate"***.
25. Highsmith, S., Duignan, K., Cooke, R., and Cohen, J. Biophysical Journal, Vol. 70, pp. 2830-2837, (1996), ***"Osmotic Pressure Probe of Actin-Myosin Hydration Changes During ATP Hydrolysis"***.
26. Hirs, C.H.W., Moore, S. and Stein, W.H., J. Biol. Chemistry, 200, (1953), ***"A Chromatographic Investigation of Pancreatic Ribonuclease"***.
27. Koshland, D. E. Jr., Scientific American, 229(4), pp. 52-64, (1973),
"Protein Shape and Biological Control" .



28. Kunitz, M., J.Biol.Chem., 164,pp.563-568 (1946), "***A Spectrophotometric Method for the Measurement of Ribonuclease Activity***".
29. Lehninger, A., L. "***Princípios de Bioquímica***" Editora Sarvier, São Paulo, 6ª Edição (1990).
30. Mathews and K., E., van Holde, "***Biochemistry***", The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1990.
31. McDonald, M.R., "***Methods in Enzymology***" Vol.2, pp. 427, (1955), Ed. by Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., New York: Academic Press Inc.
32. McPherson, A., Brayer, G., Cascio, D. and Williams, Roger. Science, **232**, (1986), "***The Mechanism of Binding of a Polynucleotide Chain to Pancreatic Ribonuclease***".
33. Medina,R.,Aragon,J.J.,Sols, A., FEBS, Vol.180, pp.77,(1985),"***Effect of Polyethylene Glycol on the Kinetic Behaviour of Pyruvate Kinase and Other Potentially Regulatory Liver Enzymes***".
34. Michaelis, M. and Menten, M.L; Biochemische Zeitschrift, Vol.49, pp.333-369, (1913), "***Die Kinetik der Invertinwirkung***".
35. Morris, John Gareth, "***Físico-Química para Biólogos***", Ed. Polígono, 1972, São Paulo.
36. Rand, R.P., Fuller, N.L., Butko, P., Francis, G., Nicholls, P., Biochemistry, **32**, 5925-5929, (1993), "***The Measured Change in Protein Solvation With Substrate Binding and Turnover***".
37. Richards and H. Wyckoff, "***in The Enzymes***" , P. D. Boyer, Ed. (Academic Press, New York, ed. 3, 1971),vol. 4.
38. Richards, F., M., C. R. Lab. Carlsberg (Ser.Chem.),**29**, 315, (1995).
39. Russel, John Blair, "***Química Geral***", Ed. McGraw-Hill, 1981, São Paulo.



40. Scott, R.A. and Scheraga, H.A. Scheraga, Journal American Chemical Society, **85**, 3866-3873, (1963), "**Structural Studies of Ribonuclease; XI. Kinetics of Denaturation**".
41. Udgaonkar, J. B. and Baldwin, R.L., PNAS, Vol. **87**, pp. 8197-8201, (1990), "**Early Folding intermediate of Ribonuclease A**".
42. Victor H., "**Lois Générales de l'action des Diastases**", Paris 1903
Biochemische Zeitschrift Band 49.
43. Voet, D. and Voet, J., "**Biochemistry**", 1st Ed., John Wiley & Sons, 1990.
44. Voet, D. and Voet, J., "**Biochemistry**", 2^{sd} Ed., John Wiley & Sons, 1995
45. Wlodaver, A., Jurnak, F.A. and McPherson, A. "**in Biological Macromolecules and Assemblies**". Ed. Wiley, New York, (1984), Vol.2, pp. 393-440.
46. Wyman, J. Advan. Protein. Chem., **19**, 223, (1964).
47. Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. and Somero, G.N. Science, **217**, (1982), "**Living With Water Stress: Evolution of Osmolyte systems**".



