



1150052300



FOP

T/UNICAMP B276e

**TEREZA DE LOURDES SCARPARI BARRICHELLO**  
CIRURGIÃ-DENTISTA

**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ESTUDO CINÉTICO DE  
FUMARASE DE CORAÇÃO DE BOVINO**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba, da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do grau de Doutor  
em Ciências (Bioquímica).

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
**BIBLIOTECA**

T 243

PIRACICABA, S. P.  
1974

A meus pais

A meu esposo

A meus filhos Cláudia e Marcos

## A G R A D E C I M E N T O S

Ao Prof. Dr. JOSÉ MERZEL, Digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas e Titular do Departamento de Morfologia dessa Faculdade, pelo apoio, estímulo e confiança em nós depositados. Agradecemos também pela leitura crítica dos originais.

Ao Prof. Dr. LADASLAV SODEK, Pesquisador Assistente de Bioquímica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, nossos sinceros agradecimentos pela dedicação e presteza com que se houve na orientação desta tese.

Ao Prof. Dr. GERALDO CLARET DE MELLO AYRES, Titular da Disciplina de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, pela nossa iniciação científica no campo da Bioquímica e pela sugestão do assunto desta tese.

Ao Prof. Dr. RUY DE ARAUJO CALDAS, Professor Adjunto de Bioquímica do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, pelo incentivo e orientação inicial, na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO, Professor Adjunto de Bioquímica da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela valiosa colaboração prestada, permitindo a realização da parte experimental deste trabalho nos laboratórios de Bioquímica do CENA. Estendemos também nossos agradecimentos - ao Prof. Dr. LUIZ CARLOS BASSO, assim como aos funcionários - dos referidos laboratórios, Srs. Lineu D. Mazonetto Delfine e Marcos Antônio Castilha pela colaboração e atenção que nos dedicaram.

Ao Prof. Dr. ANTONIO CARLOS FERRAZ CORRÊA, Chefe do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de

Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, a todos os colegas e funcionários desse Departamento pelo apoio, compreensão e estímulo a nós dedicados. Em particular, à Srta. Enori Helena Gemente, secretária, pela colaboração ao datilografar os originais deste trabalho.

Ao Sr. NELSON NASCIMENTO, sempre solícito em nos atender quando no cargo de Chefe do Almoxarifado da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

À Bibliotecária, Sra. IVANI DO CARMO GUIDOLIM GEROLA, pela parte bibliográfica.

Ao Sr. IVES ANTONIO CORAZZA responsável pela datilografia do texto.

Ao Sr. SEBASTIÃO RODRIGUES DE BARROS, pela parte gráfica e encadernação.

\*

\*

\*

## Í N D I C E

1 - INTRODUÇÃO .....	6
2 - REVISÃO DE LITERATURA .....	8
3 - MATERIAL E MÉTODOS .....	20
4 - RESULTADOS .....	34
5 - DISCUSSÃO .....	61
6 - CONCLUSÕES .....	74
7 - RESUMO .....	76
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78

\*

\*

\*

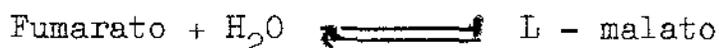
1 - INTRODUÇÃO

O ciclo dos ácidos tricarboxílicos proposto por KREBS e JOHNSON (1937) constitui um meio pelo qual os produtos do metabolismo dos carboidratos, gorduras e aminoácidos, degradados ao nível de acetato (na forma de acetil-CoA) são transformados completamente a  $\text{CO}_2$  e água.

Os enzimas que participam desse ciclo de reações metabólicas estão ligados à mitocôndria da célula, local onde ocorrem as reações de óxido-redução.

Esse ciclo de reações, de distribuição universal, se reveste de maior importância biológica quando se considera o teor de energia liberada pelo sistema, utilizada por mecanismos celulares na forma de ligações químicas de elevado conteúdo energético.

Dentre os enzimas, que constituem o sistema multi enzimático do ciclo de Krebs, fumarase é o enzima que catalisa a reação reversível de hidratação de fumarato a L-malato.



Descoberta em 1911 por Batelli e Stern tem sido encontrada em grande número de plantas, tecidos animais e microorganismos.

Pudemos observar pela literatura que fumarase de coração de suíno, cristalizada por MASSEY (1952), por FRIEDEN (1954) e por KANAREK (1964) tem sido bastante estudada, conhecendo-se bem suas propriedades físico-químicas, assim como suas características de ordem cinética.

Considerando que fumarase participa de um sistema metabólico tão importante como o ciclo de Krebs e que, a

partir de 1952, o estudo desse enzima em tecido animal tem sido realizado quase exclusivamente em coração de suíno, achamos oportuno trabalhar com fumarase de coração de bovino, fazendo propósito de nossa tese:

- a) Extrair e purificar fumarase de coração de bovino;
- b) desenvolver estudo cinético com o enzima parcialmente purificado.

\*

\*           \*

Para maior clareza de exposição subdividimos o assunto em dois tópicos:

Extração e purificação.

Estudo cinético.

Esta divisão se repete nos capítulos posteriores.

### EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

LAKI (1941) estabeleceu método para isolamento e cristalização de fumarase de coração de novilho. A purificação foi parcialmente obtida utilizando-se gel de fosfato de cálcio, seguindo-se várias eluições com tampão fosfato M/10, pH 7,30. Em seguida, utilizou fracionamento com sulfato de amônia (45 a 60% de saturação) intercalando, entre o primeiro e o segundo fracionamento, aquecimento da preparação a 40°C durante 4 a 5 minutos.

A cristalização foi obtida, colocando-se sulfato de amônia, em pequenas porções, até saturação suficiente para o enzima começar a se precipitar. Em seguida o sistema foi colocado em dessecador, à temperatura ambiente, onde depois de algumas horas os cristais começaram a aparecer em forma de finas agulhas.

SCOTT (1948a) repetiu o método de LAKI (1941) para purificar fumarase e verificou que os cristais obtidos não eram apenas fumarase, uma vez que sua atividade era apenas 10% da atividade enzimica total.

RACKER (1950) também utilizou o método de LAKI (1941) para purificar fumarase e mediu a atividade, em cada fase da purificação, por método espectrofotométrico, bastante sensível, desenvolvido por ele mesmo. Além de confirmar os

resultados obtidos por SCOTT (1948a), pôde determinar as proteínas contaminantes (aconitase e desidrogenase do ácido láctico) presentes quando se purifica fumarase por aquele método.

MASSEY (1952) estabeleceu método para isolar fumarase de coração de suíno, livre de aconitase e desidrogenase láctica. Extraiu o enzima com solução de fosfato sódico bibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), 0,01M. Depois do ajuste do pH do extrato cru para 5,20, o que permitiu eliminar fração relativamente alta de proteínas, utilizou o processo de adsorção de fumarase com gel de fosfato de cálcio, misturando-o diretamente à preparação do enzima. Em seguida eluiu fumarase através de várias extrações com tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, contendo sulfato de amônia (9% de saturação). A fase seguinte foi de fracionamento com sulfato de amônia (45 a 60%), seguida de tratamento com gel de fosfato de cálcio em quantidades suficientes apenas para adsorver proteínas que constituíam impurezas. A seguir, procedeu a novo fracionamento com sulfato de amônia (45 a 60%), para depois obter cristalização e recristalização do enzima.

MASSEY (1969) publicou novamente, porém com pequenas modificações, o método original para obtenção de fumarase na forma cristalina.

FRIEDEN (1954) estabeleceu método para isolamento e cristalização de fumarase de músculo cardíaco de suíno, por um processo diferente dos usados até aquela época. Iniciou a purificação do enzima, utilizando abaixamento do pH (para 5,30 com tampão acetato 1,0M, pH 4,60) e da temperatura (de 35°C - para 5°C). Em seguida, utilizou fracionamentos através de diálises com soluções de sulfato de amônia, que permitiram levar a preparação de 35% a 65% de saturação (concentrações inicial

e final respectivamente), no 1º fracionamento e de 45 a 60% de saturação (2º fracionamento). Cristalização e recristalização foram obtidas após diálise, durante dois dias, contra solução de sulfato de amônia a 50% de saturação. O autor obteve, por esse método, um aumento de atividade específica de 2.600 vezes, em relação ao extrato cru.

KANAREK (1964a) isolou e cristalizou fumarase de coração de suíno baseado no método de FRIEDEN (1954), com modificações. Obteve até 100 mg de fumarase/kg de músculo, enquanto que, por outros métodos, a quantidade máxima obtida era de 15 a 20 mg/kg de fumarase de tecido. O método utilizado por esse autor consistiu em três fracionamentos sucessivos com sulfato de amônia, a uma saturação máxima de 55%. Cristalização e recristalização foram obtidas por tratamento adequado com sulfato de amônia durante 3 dias, a 5°C.

Através de processo cromatográfico, estudou a composição de aminoácidos de fumarase hidrolisada. Além de outros aminoácidos, verificou que fumarase apresenta cerca de 12 resíduos de meia cistina por molécula e um igual número de grupamentos tiol livres, o que sugeriu que o enzima é destituído de pontes dissulfeto.

KANAREK (1964)b confirmou essa observação quando desenvolveu trabalho para estudar a estrutura da molécula de fumarase. Determinou o peso molecular do enzima (194.000), através de análise de equilíbrio de sedimentação. Utilizou hidrocloreto de guanidina 6M que dissociou a molécula de fumarase em 4 subunidades idênticas, de peso molecular igual a 48.500 cada uma. Se existissem pontes dissulfeto entre essas subunidades, hidrocloreto de guanidina não dissociaria a molécula do enzima. Ficou também evidente que a forma tetrâmera, enzima nativo, deve ser formado por interações não covalentes

entre as subunidades polipeptídicas. Esses resultados vieram comprovar que os doze resíduos de meia cistina por molécula, estão na forma de cisteína e que, realmente a molécula é destituída de pontes dissulfeto. Estudos preliminares desse mesmo autor mostraram que o enzima possui atividade catalítica, apenas na forma tetrâmera.

ROBINSON (1967) estudou o comportamento dos grupos tiol na fumarase utilizando três tipos diferentes de reagentes (p-cloromercuribenzoato, iodoacetato, cistina e cistamina). Os resultados obtidos desse experimento indicaram que os grupamentos tiol (três grupamentos para cada subunidade polipeptídica) não participam diretamente do centro ativo, mas estão embutidos na molécula do enzima em regiões hidrófobas, de maneira tal, que qualquer modificação desses grupos produz uma alteração molecular suficiente para destruir a atividade enzimica. A função específica dos grupamentos tiol ainda não está bem esclarecida, mas acredita-se que eles sejam de alguma forma responsáveis pela manutenção da estrutura tridimensional do enzima, inclusive pela agregação das 4 subunidades para formar a estrutura tetrâmera do enzima.

### ESTUDO CINÉTICO

A possibilidade de se obter fumarase na forma cristalina, MASSEY -(1952); FRIEDEN -(1954) e KANAREK -(1964a) e em função de certas características físico-químicas do enzima, tornou possível desenvolver bastante o seu estudo cinético.

#### Primeiros ensaios com fumarase

CLUTTERBUCK (1922), JACOBSON (1932 e 1934), desen

volveram os primeiros estudos cinéticos com fumarase. Nessa época as medições de atividade eram feitas pelo método polarimétrico, insensível para medição da velocidade a baixa concentração de substrato, o que retardou o desenvolvimento dos estudos cinéticos com fumarase.

Em 1948, SCOTT e POWELL, baseados nos estudos de STRAUB (1935), estabeleceram um método mais sensível para medição da atividade, método que consistia na titulação do ácido fumárico com permanganato de potássio; porém, somente a partir de 1950, quando RACKER (1950) publicou um método espectrofotométrico, altamente sensível para medição de velocidade inicial, é que foi possível desenvolver estudos cinéticos precisos com fumarase. Esse método baseou-se nas propriedades de absorção da luz ultravioleta por compostos de dúplice liga.

#### Efeito de anions

Anions tem um efeito acentuado na atividade de fumarase. Esse efeito varia de intensidade com o tipo de anion, sua concentração e pH. MANN e WOOLF (1930) trabalharam com células lavadas de Escherichiacoli e verificaram que sulfato inibiu ligeiramente a transformação de ácido fumárico a ácido málico, enquanto fosfato e citrato ativaram fortemente essa reação. CLUTTERBUCK (1928), QUASTEL (1931), DAVYDOVA (1947) - também verificaram que fosfato age como ativador da reação catalisada por fumarase extraída de tecidos animais.

MASSEY (1953-a) verificou a influência de anions inorgânicos na atividade da fumarase de coração de suíno. Íons fosfato, em concentrações de 0 a 6mM sob pH 6,35 e a 23°C, agiram como ativadores da reação; na faixa de concentração en-

tre 6 a 80mM, a velocidade máxima permaneceu constante e, em concentrações acima de 80mM, íons fosfato atuaram como inibidores da reação.

Outros anions como sulfato, selenato, arsenato, argenito, citrato e borato foram estudados, verificando-se que todos aceleraram a velocidade da reação. Íons monovalentes como cloreto, brometo, iodeto e tiocianato agiram como inibidores da reação, mesmo quando na presença de tampão fosfato.

ALBERTY (1954-b) verificou que a velocidade inicial máxima, de acordo com MASSEY (1953-a), foi independente da concentração de fosfato na faixa entre 5 a 50mM, sob pH 6,50. Porém, quando analisou a influência de fosfato em termos de  $K_m$  para malato, verificou que fosfato em concentração acima de 5 mM agiu como inibidor competitivo, ao passo que em concentração abaixo de 5mM, fosfato agiu como ativador.

Quando utilizou fumarato como substrato, os resultados foram um pouco diferentes, ou seja, em altas concentrações de fumarato (acima de 100mM) verificou que a velocidade inicial máxima foi independente da concentração de fosfato. A baixa concentração de substrato (faixa abaixo de 1mM), a velocidade inicial máxima foi diretamente proporcional à concentração de fosfato na faixa de 5 a 50mM sob pH 6,50. A constante de Michaelis, para valores de pH abaixo de 8,00 foi diretamente proporcional à concentração do tampão fosfato na faixa de 5 a 133mM.

MASSEY (1953-c) estudou o efeito de uma série de ácidos mono, di e tricarboxílicos na atividade de fumarase de coração de suíno. Verificou que uma série de sais sódicos de ácido D-málico, transaconítico, cítrico, mesacônico, maleico, adípico, glutárico, succínico, malônico, tartárico, L- hi-droxi- - Sulfato propriônico e glicina agiram como inibido-

res competitivos da fumarase. Tiocianato e sal sódico de ácido acetileno dicarboxílico agiram como inibidores não competitivos. Verificou ainda que uma série de compostos monocarboxílicos como sais sódicos de ácido acético, butírico, crotonico, ácidos aceto acético, não apresentaram qualquer efeito inibidor da ação enzimica.

Baseando-se nos resultados obtidos nesse trabalho, estabeleceu que a combinação do enzima com o substrato, ou do enzima com o inibidor, é de natureza puramente iônica, ou que é necessária pelo menos uma atração inicial de natureza iônica para que a combinação ocorra. Considerando-se que os inibidores competitivos possuem dois grupamentos carboxílicos, à semelhança do que ocorre com os substratos, e que os ácidos monocarboxílicos não são inibidores, o autor chegou à conclusão de que devem existir no centro ativo dois grupamentos carregados positivamente, que se ligam aos dois grupos carboxílicos do substrato ou do inibidor.

Outra evidência indicou a existência de mais dois grupamentos fracamente carregados no centro ativo, um de natureza ácida e outro de natureza básica. Baseando-se nessas conclusões, especulou sobre o mecanismo da reação e fez a seguinte suposição: quando se considera fumarato como substrato, supõe-se que os grupamentos carboxílicos dos carbonos 1 e 4 sejam primeiramente unidos por atração iônica aos grupamentos positivos, no centro ativo da molécula de fumarase. Em seguida, os carbonos 2 e 3 do substrato sofreriam um efeito de polarização por grupos ácido fraco e básico fraco da molécula do enzima, tornando-se capazes de receber uma molécula de água, na forma de  $H^+$  e  $OH^-$ , para formar o complexo fumarase-L-malato. Mecanismo análogo, porém em sentido inverso, poderia ser aplicado para explicar a formação do complexo fumarase-fu

marato.

### Efeito do pH

A investigação do efeito do pH em reações enzimáticas permite o estudo de grupos ionizáveis, que são envolvidos no centro ativo. MASSEY (1953-a) fez o primeiro estudo sobre efeito do pH na cinética da reação de fumarase, em uma faixa extensa de pH (5,0 a 8,5). Investigou a variação da atividade do enzima com o pH na presença de uma série de diferentes anions e obteve, em cada caso, gráficos simétricos em forma de sino.

Esses gráficos, de acordo com a teoria de MICHAELIS e DAVIDSHON (1911) e MICHAELIS e PECHSTEIN (1914), são obtidos quando a atividade enzimática é determinada por dois grupos ionizáveis, um ácido e um básico, na região do centro ativo.

MASSEY (1953-a) observou que numerosos anions polivalentes, tais como fosfato, citrato e sulfato, alteraram a atividade no lado alcalino da curva de pH, enquanto inibição por anions monovalentes, tais como cloreto, brometo e tiocianato, alteraram no lado ácido. Sugeriu então que o efeito desses íons, tanto **ativando** como inibindo a reação, poderia ser explicado em termos do seu efeito na ionização de grupos ácidos ou básicos, na região do centro ativo.

Em estudos posteriores, MASSEY (1953-c) se empenhou em identificar os grupos ionizáveis através do efeito do pH na constante de Michaelis ( $K_m$ ) para fumarato e malato e na constante de inibição ( $K_i$ ) para uma série de inibidores competitivos. Depois de calcular  $K_m$  ou  $K_i$  em diferentes pHs, fez gráficos de  $-\log K_m$  ou  $-\log K_i$  contra pH. Esses gráficos, de

acordo com a teoria de DIXON (1953-a), podiam revelar as constantes de ionização (pKs) dos grupos ionizáveis e, consequentemente, sua natureza.

A interpretação do gráfico segundo Dixon é a seguinte: quando a inclinação da reta é zero, significa que o número de cargas no complexo enzima-substrato é igual ao número de cargas do enzima livre mais o substrato, nessa faixa de pH. Uma inclinação negativa igual a 1 significa que o enzima livre e o substrato contêm uma carga negativa a mais do que o complexo enzima-substrato. A recíproca é verdadeira para uma inclinação positiva. Mudança de uma inclinação para outra representa constante de ionização.

Considerando que Massey trabalhou numa faixa de pH acima de pK conhecido do substrato, qualquer mudança de inclinação representaria o pK do grupo no enzima livre ou do complexo enzima-substrato. Esses estudos revelaram um grupo no enzima livre com um pK na faixa de 6,0 a 6,7. Sabendo-se que histidina é o único aminoácido com valor de pK nessa região, Massey sugeriu que esse é o grupo ionizável que ocorre no centro ativo da fumarase.

ALBERTY et al (1954-b) não puderam confirmar o trabalho de Massey porque gráficos de  $-\log K_m$  "versus" pH não permitiram obter reta com inclinação definida, ou mudanças de inclinação como MASSEY (1953-c) obteve. Chegaram à conclusão de que é difícil aplicar a teoria de Dixon para fumarase, em presença de solução tampão fosfato (como Massey usou), uma vez que fosfato age como inibidor. Aqueles autores mostraram que, ao invés de se colocar em sistema de coordenadas,  $K_m$  "versus" pH, é possível obter informações sobre os pKs dos grupos no centro ativo, fazendo-se gráficos de velocidade máxima em função do pH. Nesse caso o uso de fosfato não apresenta

nenhum inconveniente, uma vez que velocidade máxima ( $V_{\max}$ ) é independente da concentração de fosfato a baixas concentrações. Entretanto, obtem-se pK para o complexo enzima-substrato, mas não para enzima livre como quando se usaram valores de  $K_m$  no gráfico. Todavia, ALBERTY e MASSEY (1954-a) derivaram uma equação, baseada na teoria de MICHAELIS e DAVIDSON (1911) e MICHAELIS e PECHSTEIN (1914), para curvas de atividade de pH em forma de sino. Nos termos da equação aparecem  $pK_a$  e  $pK_b$  do complexo enzima-substrato. Essas constantes podem ser calculadas no gráfico de  $V_{\max}$  contra pH. MASSEY e ALBERTY (1954) mostraram que realmente gráficos de  $V_{\max}$  "versus" pH para fumarato se produziram curvas simétricas em forma de sino, para as quais aplicaram a equação de ALBERTY e MASSEY (1954-a). Por esse tipo de cálculo, os valores de  $pK_a$  e  $pK_b$  obtidos para o complexo enzima-substrato foram 7,3 e 8,5 respectivamente, quando se usou malato, e 5,8 e 7,6 respectivamente, quando se usou fumarato como substrato. Obviamente os dois substratos - malato e fumarato influíram de maneira diferente nos valores de pK do enzima livre. Considerando que não foi possível determinar, por esse método, os valores de pK para o enzima livre, os autores não puderam chegar a uma conclusão definitiva sobre a natureza dos grupos ionisáveis.

Dados mais completos a respeito das constantes de ionização foram obtidos por FRIEDEN e ALBERTY (1955), que estudaram a variação de  $V_{\max}$  com pH, determinando os pKs do complexo enzima-substrato. Da variação de  $K_m$  com o pH, calcularam os pKs do enzima livre. Tampões acetato foram utilizados para controlar o pH, ao invés de fosfato, afim de se evitarem aqueles inconvenientes apresentados por fosfato na determinação de  $K_m$ , a diferentes pHs (ALBERTY - 1954-b). Os valores das constantes de ionização para o enzima livre foram 6,2 e

6,8 para  $pK_a$  e  $pK_b$ , respectivamente. Esses valores foram os mesmos, tanto para malato como para fumarato, o que constitui um importante resultado, no sentido de evidenciar que o mesmo local ativo no enzima liga fumarato e malato. Os valores para as constantes de ionização do complexo enzima-substrato foram 5,3 e 7,3 para  $pK_a$  e  $pK_b$ , respectivamente, quando fumarato - foi o substrato e 6,6 e 8,4, respectivamente, quando malato - foi substrato. Esses valores são semelhantes ou mais baixos do que os obtidos por MASSEY e ALBERTY (1954) com tampão fosfato, mostrando que a natureza do tampão tem algum efeito na determinação da constante de ionização.

FRIEDEN (1955) determinou as constantes de ionização a diferentes concentrações de tampão acetato e verificou que as constantes foram independentes das concentrações desse tampão.

#### Efeito da temperatura

O efeito da temperatura foi estudado sob dois aspectos:

- a) sobre a velocidade da reação;
- b) sobre a constante de equilíbrio.

a) Sobre a velocidade de reação: através do estudo do efeito da temperatura sobre a velocidade da reação é possível calcular a energia de ativação (A).

SCOTT e POWELL (1948-b) estudaram a influência da temperatura na velocidade inicial da reação catalizada por fumarase de coração de novilho, utilizando ambos os substratos, fumarato e L-malato (0,1M). O pH 7,90 foi mantido constante. A energia de ativação foi calculada para fumarato igual a 8.100 cal/mol e, para malato igual a 12.200 cal/mol.

MASSEY (1953-b) estudou a influência da temperatura, sob diferentes valores de pH, na velocidade inicial da reação, utilizando soluções de L-malato e fumarato 0,0167M. Calculou os valores da energia de ativação através da equação de Arrhenius e verificou que, para L-malato, houve pequena variação da energia de ativação nos diferentes pHs utilizados. Os valores encontrados foram: para pH 7,94,  $A = 13.100$  cal/mol; para pH 7,50,  $A = 14.000$  cal/mol; e para pH 6,35,  $A = 15.600$  cal/mol. Para fumarato, a energia de ativação foi altamente dependente do pH, porém permaneceu constante (8.000 cal/mol) sob pH 7,05 e para uma faixa de temperatura de 10 a 40°C.

b) Sobre a constante de equilíbrio: SCOTT e POWELL (1948-b) estudaram a variação da constante de equilíbrio com a temperatura (10 a 40°C). Do gráfico obtido em função do  $\log K_{eq}$  "versus  $\frac{1}{T}$ " foi determinada a entalpia,  $-\Delta H = 3560$  cal/mol.

BOCK e ALBERTY (1953) trabalhando com fumarase de tecido cardíaco de suíno, determinaram a variação da constante de equilíbrio com a temperatura numa faixa de 5 a 40°C, pH 7,3 e obtiveram  $\Delta H = -3960$  cal/mol.

MASSEY (1953-b) também estudou a variação da constante de equilíbrio sob diferentes temperaturas (5 a 40°C), pHs 6,35 e 7,3, e calculou  $\Delta H = -3600$  cal/mol cujo valor está bem de acordo com os dados obtidos pelos autores supracitados.

\*

\*                   \*

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### MATERIAL

Utilizou-se tecido cardíaco de bovino (Bos taurus, Linn) obtido imediatamente após o abate do animal, por golpe occipital. O coração inteiro foi removido e transportado, em banho de gelo, para o laboratório, onde imediatamente foi lavado com água destilada, gelada, para eliminação do sangue. Em seguida, removeram-se o pericárdio e o endocárdio, de modo a se obter, tanto quanto possível, apenas tecido muscular. Este foi seccionado em pequenos pedaços, que foram lavados com água destilada, separados em lotes de aproximadamente 100g cada, embrulhados em papel aluminizado e guardados no congelador (-10°C) para uso quando necessário.

#### MÉTODOS

##### Extração

A extração foi feita pelo método de MASSEY (1952), utilizando-se 300,0 ml de solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0,01M para cada 100g de tecido. O homogeneizado foi centrifugado a 1.800 x g durante 30 minutos, em centrífuga refrigerada a 0°C. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante (extrato cru) foi submetido aos tratamentos próprios da fase de purificação.

##### Purificação

A purificação foi feita pelo método de MASSEY - (1952), com modificação. Este método envolve os seguintes pro

cessos:

- a) abaixamento do pH do extrato cru;
- b) fracionamentos com sulfato de amônia;
- c) cromatografia em coluna com gel de fosfato de cálcio.

Neste último processo é que reside a principal diferença entre o método descrito por Massey e o utilizado no presente estudo. Massey utilizou o gel de fosfato de cálcio misturando-o, em volumes crescentes, à preparação de enzima e, para eluir a fumarase adsorvida realizou várias extrações com solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,3. Em vez disto, o gel de fosfato de cálcio foi colocado em coluna cromatográfica e o enzima, eluído através de fluxo contínuo do tampão fosfato 0,15M, pH 7,0.

Antes de relacionar a sequência dos tratamentos utilizados para purificação do enzima, serão feitas algumas considerações sobre a metodologia utilizada nestes diferentes tratamentos:

#### Fracionamento com sulfato de amônia

Utilizou-se sulfato de amônia, sólido, específico para métodos enzimáticos (tratado com EDTA), finamente pulverizado. Ao sistema, mantido em banho de gelo e sob agitação magnética, acrescentou-se vagarosamente sulfato de amônia, de modo a evitar formação de espuma. O sistema permaneceu durante 15 minutos em repouso e, em seguida, foi submetido a centrifugação durante dez minutos a 1.000 x g. As frações sobrenadantes e o precipitado resultantes da centrifugação foram

designadas como "S" e "p" respectivamente.

O grau de saturação com sulfato de amônia (m/v) - foi calculado segundo a tabela de DIXON (1953-b).

#### Tratamento com gel de fosfato de cálcio

O gel fosfato de cálcio foi utilizado em coluna cromatográfica, preparado pelo método de TISELIUS (1956). Um milímetro da suspensão correspondeu a 65mg de massa seca do gel.

#### Preparo da coluna cromatográfica

Em coluna com medidas internas iguais a 26 cm de altura por 2 cm de diâmetro, foi colocada uma mistura, em suspensão, de 30 ml de gel de fosfato de cálcio e 3,0g de celulose em pó lavada com água destilada. A celulose, assim preparada, foi acrescentada ao gel com a finalidade de aumentar sua porosidade e acelerar o fluxo.

Testes prévios foram realizados e verificou-se - que foram necessários 227,50mg de gel (massa seca) para adsorver enzima contido em 1,0 ml de preparação. Após a colocação do gel na coluna, deixou-se 2 horas em repouso para decantação das partículas de hidroxapatita + celulose. Em seguida, para estabelecimento do equilíbrio, foram passados pela coluna 200 ml de água destilada e 80 ml de solução tampão fosfato 0,05M, pH 7,0, em câmara fria (4°C), onde se desenvolveu a cromatografia.

Eluição de proteínas da coluna de gel de fosfato de cálcio

## Eluição de proteínas da coluna de gel de fosfato de cálcio

A eluição de proteínas, dentre as quais fumarase, foi realizada utilizando-se soluções tampões fosfato de diferentes forças iônicas e de mesmo pH (pH = 7,0).

Um sistema de sifonamento automático permitiu a transferência, em fluxo contínuo, das soluções tampões à coluna previamente conectada ao coletor automático de amostras.

### Determinação da força iônica da solução tampão pa ra eluir fumarase

Ensaio foram realizados a fim de se determinar - qual a concentração da solução tampão fosfato necessária e suficiente para eluir o enzima adsorvido pelo gel de fosfato de cálcio, pH 7,0. Constatou-se, pelos resultados, que solução - tampão fosfato pH igual 7,0, 0,15M eluiu o enzima, enquanto soluções do mesmo tampão, porém sob concentrações de 0,10M e 0,20M, eluíram apenas as demais proteínas.

A ordem de passagem de soluções tampões pela coluna foi a seguinte:

- 1 - solução tampão fosfato 0,10M, pH 7,0: volume suficiente para eluir 34 frações de 2,00 ml cada uma;
- 2 - solução tampão fosfato 0,15M, pH 7,0: volume suficiente para eluir 35 frações de 2,00 ml;
- 3 - solução tampão fosfato 0,20M, pH 7,0: volume suficiente para eluir 35 frações de 2,00 ml cada uma.

Sequência adotada para purificação de fumarase

Abaixamento do pH do extrato cru - o pH do extrato cru igual a 6,50 sofreu abaixamento para 5,20 com solução tampão acetato 1,0M, pH 4,0. O sistema foi centrifugado a 1.800 x g durante 10 minutos, obtendo-se o precipitado que se convencionou denominar "p<sub>1</sub>" e que foi ressuspensão em 10,0 ml de solução tampão fosfato 0,05M, pH 7,0. O sobrenadante foi caracterizado como "S<sub>1</sub>".

Fracionamento com sulfato de amônia - O fracionamento com sulfato de amônia foi feito em duas etapas:

- a - fracionamento de "S<sub>1</sub>", de 0 a 38% de saturação.
- b - fracionamento de "S<sub>2</sub>", de 38 a 58,5% de saturação.

a - Fracionamento de "S<sub>1</sub>", de 0 a 38% - ao sobrenadante "S<sub>1</sub>" foram adicionados 228,0 gl de sulfato de amônia, massa que correspondeu à saturação de 38% (m/v). Obtiveram-se por centrifugação o precipitado "p<sub>1</sub>" que se desprezou e o sobrenadante "S<sub>2</sub>".

b - Fracionamento de "S<sub>2</sub>", de 38 a 58,5% de saturação - Massa igual a 380,0 gl de sulfato de amônia (38 a 58,5% de saturação) foi acrescentada à preparação "S<sub>2</sub>", obtendo-se por centrifugação o precipitado "p<sub>3</sub>" ressuspensão em solução tampão fosfato 0,05M, pH 7,0.

Diálise de p<sub>3</sub> - O precipitado "p<sub>3</sub>" foi colocado em saco próprio para diálise, previamente lavado com água destilada durante 30 minutos. A diálise se processou contra solução tampão fosfato 0,05M, pH 7,0, durante 12 horas, ha-

vendo substituição do tampão após as três primeiras horas. A diálise foi realizada em câmara fria a 4°C, sob agitação pelo uso de agitador magnético. Ao final fez-se medição do volume de "p<sub>3</sub>".

Cromatografia de p<sub>3</sub> dialisado - À coluna cromatográfica, previamente preparada, foram colocados 3,0 ml de "p<sub>3</sub>" dialisado. A seguir procedeu-se à eluição de proteínas da amostra, utilizando-se, através de fluxo contínuo, 75 ml de solução tampão fosfato 0,10M, pH 7,0 e, em seguida, com o mesmo tampão 0,15M (75 ml) eluiu-se fumarase.

As frações eluídas da coluna de gel de fosfato de cálcio, que apresentaram maiores atividades enzimáticas, foram misturadas e fracionadas com sulfato de amônia 0 - 68,5% de saturação (m/v). Foram obtidos por centrifugação o precipitado caracterizado como "p<sub>3</sub>"(\*), ressuspenso em 2,0 ml de solução tampão fosfato 0,05M, pH 7,0, e o sobrenadante "S'<sub>4</sub>", que foi desprezado.

2º fracionamento com sulfato de amônia - o fracionamento foi realizado em duas etapas:

- a) fracionamento de "p'<sub>3</sub>" de 0 a 38% de saturação;
- b) fracionamento de "S'<sub>4</sub>" de 38 a 68,5% de saturação.

a - Fracionamento de "p'<sub>3</sub>" de 0 a 38% - a preparação "p'<sub>3</sub>" foi submetida a fracionamento com sulfato de amônia (0 a 38,5%) de saturação, obtendo-se por centrifugação o precipitado -

---

(\*) Letras p e S com índice "linha", designam, respectivamente, as frações precipitado e sobrenadante obtidos por fracionamento com sulfato de amônia, depois da cromatografia.

---

"p'<sub>4</sub>" que foi desprezado e o sobrenadante "S'<sub>4</sub>".

b - Fracionamento de "S'<sub>4</sub>" de 38 a 68,5% - o sobrenadante S'<sub>4</sub> foi fracionado com sulfato de amônia (38 a 68,5%) de saturação, obtendo-se o precipitado "p'<sub>5</sub>", ressuspensão em 1,50 ml de solução tampão fosfato 0,05M, pH 7,0, e o sobrenadante "S'<sub>5</sub>".

### Dosagem de proteínas

Proteínas foram dosadas por três diferentes métodos:

- a - Método do biureto.
- b - Método do microbiureto.
- c - Método espectrofotométrico.

a - Método do biureto - pelo método do reagente de biureto, segundo GORNALL (1949), foram dosadas as proteínas das seguintes preparações: extrato cru S<sub>1</sub>, p<sub>1</sub>, p<sub>2</sub>, p<sub>3</sub> dialisado. Antes de se aplicar o método propriamente dito, as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético, a 10%.

b - Método do Microbiureto - pelo método do microbiureto segundo ITZHAKI (1964), foram dosadas as proteínas das seguintes preparações (p'<sub>3</sub>), (p'<sub>4</sub>), (p'<sub>5</sub>).

c - Método espectrofotométrico - pelo método espectrofotométrico estabelecido por WARBURG e CHRISTIAN (1941) foram dosadas as proteínas de todas as amostras eluídas da coluna de gel de fosfato de cálcio.

## Medição da atividade enzimica

A atividade enzimica foi medida em espectrofotômetro Beckman, modelo DB-G, ao comprimento de onda de 300 nm, em cubeta de sílica de 1,00 cm de passagem de luz. Uma alíquota de 0,10 ml de enzima foi colocada diretamente na cubeta contendo solução de ácido fumárico 0,019M e solução tampão fosfato 0,0576M, pH 7,30. As medições foram feitas à temperatura ambiente de 20°C aproximadamente. Em sistema de coordenadas foram colocadas os valores de densidade óptica "versus" tempo. Considerando que o gráfico obtido é linear apenas no início e que deflete gradualmente com o tempo, a velocidade inicial foi calculada traçando-se a tangente da curva, sendo zero a origem.

## Unidade de atividade

Foi considerada como unidade de atividade a quantidade de enzima capaz de mudar a densidade óptica de 0,01 por minuto, em pH 7,30 e a 20°C medida a 300nm.

## Estudo cinético

O estudo cinético com fumarase foi desenvolvido utilizando-se 0,1 ml de preparação do enzima, fração p'<sub>5</sub> (obtido ao final da purificação), soluções de fumarato de sódio, e L-malato 0,019M, tampão fosfato 0,0576M, pH 7,30, a 20°C (aproximadamente). Qualquer variação das condições acima estabelecidas será indicada oportunamente no texto.

Influência da concentração de substrato na velocidade inicial da reação - Verificou-se a influência

da concentração do substrato utilizando-se fumarato e L-malato em concentrações que variaram de  $2 \times 10^{-2}M$  a  $1 \times 10^{-3}M$  e de  $2 \times 10^{-2}M$  a  $2 \times 10^{-3}M$ , respectivamente.

A determinação das constantes de Michaelis, para ambos os substratos, foi feita pelo processo gráfico de LINEWEAVER-BURK (1934), seguindo o seguinte raciocínio:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max} S}$$

Quando  $\frac{1}{v_i} = 0$ , tem-se que:

$$-\frac{K_m}{V_{\max} S} = -\frac{1}{V_{\max}} ; \frac{1}{-K_m} = \frac{1}{S}$$

No gráfico, quando  $\frac{1}{v_i} = 0$ , tem-se na intersecção -  $\frac{1}{K_m}$ .

Influência da concentração do enzima na velocidade inicial da reação - Verificou-se a influência

da concentração do enzima utilizando volumes crescentes (10 a 200 ul) de enzima tendo como substrato fumarato de sódio.

Influência do pH na velocidade inicial da reação-

Verificou-se a influência do pH utilizando-se solução tampão fosfato 0,0576M, obtida pela mistura das soluções de  $NaH_2PO_4$  e  $K_2HPO_4$ , em proporções que permitiram obter os diferentes pH(s) numa faixa de 5,0 a 9,0.

Inibição de fumarase por citrato de sódio - O estudo

da inibição de fumarase por citrato de sódio 0,05M (con-

centração final) foi realizada utilizando-se os substratos fumarato ( $2 \times 10^{-2}M$  a  $1 \times 10^{-3}M$ ) e L-malato ( $2 \times 10^{-2}$  a  $10^{-3}M$ ).

A constante de dissociação do complexo enzima-inibidor ( $K_i$ ) foi calculada partindo da fórmula para inibição competitiva:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{V_{\max} S} \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + \frac{1}{V_{\max}}$$

onde:

$I$  = concentração do inibidor

$K_i$  = constante de dissociação do complexo enzima-inibidor.

O ponto de intersecção na abscissa temos  $\frac{1}{v_i} = 0$

Portanto:

$$\frac{K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}{V_{\max} S} = - \frac{1}{V_{\max}}$$

$$\frac{1}{S} = - \frac{1}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}$$

$\frac{1}{S} = \frac{1}{K_p}$  onde  $K_p$  é a constante aparente de Michaelis na presença do inibidor à concentração usada.

Portanto:

$$K_p = K_m + \frac{K_m (I)}{K_i}$$

$$K_p - K_m = \frac{K_m (I)}{K_i}$$

$$K_i = \frac{K_m (I)}{K_p - K_m}$$

Influência de temperatura na velocidade inicial da reação - Verificou-se a influência da temperatura utilizando-se fumarato como substrato. O sistema foi colocado em banho-maria durante tempo suficiente para equilíbrio das temperaturas dos respectivos banhos (20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C). Em seguida foi adicionado 0,10 ml de enzima e imediatamente colocada a cubeta no espectrofotômetro para medição da atividade.

Determinação da energia de atividade (A) - Em função da velocidade da reação, determinada sob duas diferentes temperaturas, pode-se calcular a energia de ativação (A) da reação. Segundo Arrhenius:

$$\frac{d \ln K}{dt} = - \frac{A}{R \cdot T^2}$$

Integrando-se a equação tem-se:

$$\log_n \frac{K_2}{K_1} = \frac{-A}{R} \left( \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$$

$$\text{Log}_n = \log_{10} \times 2,3026; \quad R = 1,987 \text{ cal/grau/mol.}$$

$$\log_{10} \frac{K_1}{K_2} = \frac{-A}{2,3026 \times 1,987} \left( \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$$

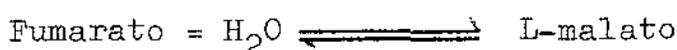
Colocando-se em sistema de coordenadas logK "versus"  $\frac{1}{T}$ , tem-se uma reta cuja tangente do ângulo é igual a

$$- \frac{A}{2,3026 \times 1,987} = - \frac{A}{4,575}$$

Determinação da constante de equilíbrio da reação catalizada por fumarase - A constante de equilíbrio foi determinada à temperatura de 25°C, usando-se fumarato e L-malato em concentrações que variaram de  $1,9 \times 10^{-2} \text{M}$  a  $9,5 \times 10^{-3} \text{M}$ . O sistema foi colocado em banho maria (25°C) e ao final de 40 minutos, tempo suficiente para a reação atingir o equilíbrio, fez-se a leitura em espectrofotômetro.

Embora o ponto de equilíbrio deva ser o mesmo, partindo em ambos os sentidos da reação, foram utilizados os substratos, fumarato e L-malato, para se comprovar, experimentalmente, esse valor.

Para a reação:



$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{Malato}]}{[\text{Fumarato}] [\text{H}_2\text{O}]}$$

Considerando que a absorvência é proporcional à concentração de fumarato presente, podemos escrever:

$$\text{Concentração de fumarato no equilíbrio} = A_f$$

$$\text{Concentração de malato no equilíbrio} = A_i - A_f$$

onde:

$A_i$  = absorvência inicial (a zero hora), quando fumarato foi substrato; quando malato foi substrato, usou-se o valor para a concentração de fumarato equivalente.

$A_f$  = absorvência final (quando a reação atingiu o equilíbrio). Desde que a concentração de água se mantém constante durante a reação, por convenção:

$$\left[ \text{H}_2\text{O} \right] = 1$$

Substituindo-se na fórmula, temos:

$$K_{\text{eq}} = \frac{A_i - A_f}{A_f}$$

Substituindo-se os valores de  $A_i$  e  $A_f$ , determinados experimentalmente, foi possível calcular o valor da constante de equilíbrio.

Determinação de  $\Delta F^0$  - a partir da constante de equilíbrio, foi calculado  $\Delta F^0$  (energia livre) através da seguinte equação:

$$\Delta F = \Delta F^0 + RT \ln \frac{\left[ \text{Malato} \right]}{\left[ \text{Fumarato} \right]}$$

No equilíbrio  $\Delta F = 0$ , portanto -  $\Delta F^0 = RT \ln K_{\text{eq}}$  ou  $\Delta F^0 = 2,3026 \times RT \log K_{\text{eq}}$

Determinação de  $\Delta H^0$  (entalpia) para reação - Determinou-se a constante de equilíbrio sob diferentes temperaturas (25, 30 e 35°C) e calculou-se a energia total da reação ( $\Delta H^0$ ) a partir da equação estabelecida por Van't Hoff:

$$\frac{d \ln K}{dt} = \frac{\Delta H^0}{RT^2}$$

Integrando-se a equação, tem-se que:

$$\text{Log}_n \frac{K_2}{K_1} = - \frac{\Delta H^{\circ}}{R} \left( \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$$

$$\text{Log}_{10} \frac{K_2}{K_1} = - \frac{\Delta H^{\circ}}{4,575} \left( \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$$

Colocando-se em sistema de coordenadas  $\log K_{eq}$  (de terminados sob diferentes temperaturas) "versus"  $\frac{1}{T}$ , obtém-se uma reta cuja tangente do ângulo é igual a

$$- \frac{\Delta H^{\circ}}{4,575}$$

\*

\*

\*

#### 4 - RESULTADOS

##### Extração

A extração do enzima com solução de fosfato de sódio bibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 0,01M (MASSEY, 1952), mostrou ser bastante adequada, uma vez que o precipitado resultante - da primeira centrifugação do homogeneizado foi desprezado por não apresentar qualquer atividade enzimica. A fim de se assegurar a inexistência de qualquer atividade enzimica, na fração desprezada, foram feitos testes de extração com soluções de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,03M e 0,05M e que resultaram negativos.

##### Purificação

Variação do pH - O extrato cru apresentou pH 6,50. Ajuste do pH para 5,20 com solução tampão acetato, 1,0M, pH 4,0, permitiu eliminar fração de proteínas admitidas como impurezas. Os resultados estão colocados na tabela I, podendo-se observar que a fração "S<sub>1</sub>" conservou a atividade enzimica - em relação ao extrato cru e que foi pequena a eliminação de proteínas (fração "p<sub>1</sub>").

Tabela I - Dados relativos às fases de extração de fumarase e abaixamento de pH do extrato cru para 5,20 com tampões acetato 1,0M, pH 4,00.

FRAÇÃO	VOLUME ml	ATIVIDADE ENZIMICA Unid. / ml	PROTEINA mg / ml	TOTAL DE PROTEINAS mg	ATIVIDADE TOTAL Unid.	ATIVIDADE ESP.	FATOR DE PURIFICAÇÃO	% DE RECUPER.
Ext. cru	280	20,00	12,75	3 570,0	5 600	1,56	1,00	100
S <sub>1</sub>	274	20,0	11,45	3 137,3	5 480	1,74	1,11	97,85
P <sub>1</sub>	6	-	43,4	260,4	-	-	-	-

Fracionamento com sulfato de amônia - apresentam-se a seguir os resultados dos ensaios realizados para se determinar qual a melhor faixa de saturação com sulfato de amônia para fracionar proteínas, dentre as quais fumarase.

Ensaio realizado com "S<sub>1</sub>" mostrou que a faixa de saturação com sulfato de amônia, compreendida entre 26 a 58%, permitiu separação do enzima em estudo. Em função desse resultado foram escolhidas as seguintes faixas de saturação (Tabela II).

Tabela II - Determinação dos limites de saturação com sulfato de amônia, para fracionamento de fumarase.

FRAÇÃO	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> %(m/v)	VOLUME* ml	ATIVIDADE ENZIMICA	ATIVIDADE TOTAL Unid.	PROTEINA mg/ml	TOTAL DE PROTEINA mg
P <sub>2</sub>	0 - 32	1,2	11,00	13,20	17,12	20,54
P <sub>3</sub>	32 - 53,4	1,3	180,00	234,00	32,64	42,43
P <sub>4</sub>	53,4-68,2	1,8	80,00	144,00	29,68	53,42
P <sub>2</sub> '	0 - 38	1,2	16,00	19,20	21,52	25,82
P <sub>3</sub> '	38 - 53,4	1,4	165,00	231,00	25,68	35,95
P <sub>4</sub> '	53,4-68,2	1,8	76,00	136,80	30,48	54,86

\* - Volume final da suspensão do precipitado em solução de tampão fosfato 0,05M, pH 7,30.

Os resultados da tabela II mostraram que existiu pequena atividade enzimica nos precipitados obtidos por fracionamento com sulfato de amônia nas faixas de 0 a 32% e de 0 a 38%.

A maior parte do enzima se precipitou nas faixas de 32 a 53,4% e de 38 a 53,4%. Em ambas, o total de atividade enzimica foi praticamente igual, porém, o teor de proteínas precipitadas nesta faixa (38 a 53,4%) foi menor do que naque-

la (32 a 53,4%). Concluiu-se, portanto, que a atividade específica da fração "p<sub>3</sub>," foi maior que a da fração "p<sub>3</sub>". Observou-se também que as frações "p<sub>4</sub>" e "p<sub>4</sub>," (53,4 - 68,2%) apresentaram atividade enzimática e teor de proteínas relativamente altos.

Esses resultados permitiram concluir que os limites de saturação com sulfato de amônia deveriam estar situados a partir de 38% e o limite mais alto, um pouco além de 53,4% .

Seguindo essa linha de orientação, novas preparações foram feitas e utilizadas as concentrações de sulfato de amônia, dentro dos limites apresentados na tabela III.

Tabela III - Determinação dos limites de saturação com sulfato de amônia, mais eficientes para fracionamento de fumarase.

FRAÇÃO	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> %(m/v)	VOLUME ml	ATIVIDADE ENZÍMICA	ATIVIDADE TOTAL Unid.	PROTEÍNA mg/ml	TOTAL DE PROTEÍNA mg
p <sub>2</sub>	0 - 38	1,1	18,00	19,80	20,72	22,79
p <sub>3</sub>	38 - 53,4	1,4	186,00	260,40	26,40	37,06
p <sub>3</sub> '	38 - 58,5	1,4	243,00	340,20	31,20	43,68
p <sub>3</sub> "	38 - 63,5	1,5	216,00	324,00	36,24	54,36
p <sub>4</sub>	53,4-72,5	1,9	64,00	121,60	29,28	55,63
p <sub>4</sub> '	58,5-72,5	1,7	21,00	35,70	28,88	49,09
p <sub>4</sub> "	63,5-72,5	1,5	10,00	15,00	23,36	35,04

Observou-se, pelos resultados apresentados na tabela III, que o precipitado "p<sub>3</sub>," (38 a 58,5%) apresentou atividade específica mais alta que as demais frações, ou seja, do que "p<sub>3</sub>" (38 a 53,4%) e "p<sub>3</sub>," (38 a 63,5%).

Considerando que houve pequena precipitação do enzima na faixa de 58,5 a 72,5%, assim como na faixa de 0 a 38%, de acordo com a tabela II, concluiu-se que os limites de saturação com sulfato de amônia que permitiram o melhor fracionamento de fumarase foram 38 a 58,5%.

Nova preparação do enzima foi realizada, desde a fase inicial de obtenção do extrato cru, até fracionamento com sulfato de amônia, nas faixas de saturação de 0 a 38% e de 38 a 58,5%, obtendo-se purificação da ordem de 3,87 vezes como se pode observar na tabela IV.

Diálise - A fração "p<sub>3</sub>" foi dialisada contra soluções tampões fosfato 0,05M, pH 7,0, a fim de torná-la passível de receber o tratamento seguinte da marcha de purificação, isto é, cromatografia.

Nessa fase as preparações sofreram perda de atividade enzimática, da ordem de 20% em sua atividade específica. Esta situação se manteve, mesmo quando se utilizou, durante a diálise, solução de 2-mercaptoetanol 6mM (concentração final) o que poderia criar condições de melhor proteção ao enzima.

Cromatografia de "p<sub>3</sub>" dialisado - As proteínas contidas na amostra de "p<sub>3</sub>" dialisado, colocado na coluna cromatográfica, foram eluídas pelas respectivas soluções tampões conforme o exposto em "Métodos" e representado no gráfico nº 1.

Pode-se observar que solução tampão fosfato 0,10M eluiu fração relativamente alta de proteínas, atingindo um teor máximo ao nível do 25º tubo. Em seguida, solução tampão fosfato 0,15M eluiu pequena fração de proteínas, dentre as quais fumarase, uma vez que as amostras, correspondentes aos

Tabela IV - Dados relativos à extração e purificação de fumarase até a fase de fracionamento com sulfato de amônia

FRAÇÃO	VOLUME ml	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	ATIVIDADE ENZÍMICA	ATIVIDADE TOTAL Unid.	PROTEÍNA mg/ml	TOTAL DE PROTEÍNA mg	ATIVIDADE ESPEC.	FATOR DE PURIFICAÇÃO
Ext. cru	284		20,00	5680	13,00	3 692,00	1,53	1,00
S <sub>1</sub>	276		20,00	5520	12,18	3 361,68	1,64	1,07
P <sub>3</sub>	7	38-58,5%	270,00	1890	45,50	318,5	5,93	3,87

tubos de números 59 a 69, apresentaram atividade enzimica (observar gráfico nº 1). À medida que aumentou a atividade enzimica, houve decréscimo no teor de proteína dessas frações, aumentando a atividade específica e, conseqüentemente, o número de purificação, calculado em função da atividade específica - (1,60) do extrato cru obtida nesse experimento.

Das amostras apresentadas na tabela V, foram retomas e misturadas, para dar continuidade ao experimento, apenas aquelas que apresentaram teores mais altos de purificação e que corresponderam às frações dos tubos nºs 63 a 68.

Fracionamento por precipitação com sulfato de amônia - os eluídos dos tubos 63 a 68, por terem apresentado os melhores níveis de purificação, foram misturados e submetidos à precipitação por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , em condições de concentrações crescentes de 0 a 68,5% (m/v) conforme já descrito anteriormente. O precipitado "p'<sub>3</sub>" apresentou 88,9% de atividade enzimica total existente antes do fracionamento.

2º Fracionamento de "p'<sub>3</sub>" com sulfato de amônia - 38 a 68,5% de saturação - a fração "p'<sub>4</sub>", que corresponde a faixa de saturação 0 a 38% apresentou pequena atividade enzimica. O precipitado "p'<sub>5</sub>" resultante do fracionamento com sulfato de amônia, na faixa entre 38 a 68,5% de saturação - apresentou cerca de 63,5% da atividade total e purificação ligeiramente maior que duas vezes, nesta etapa (Tabela VI).

Tabela V - Atividade de fumarase nas frações eluídas da coluna de gel de fosfato de cálcio.

TUBO Nº	VOLUME ml	ATIVIDADE Unid./ ml	ATIVIDADE TOTAL Unid.	PROTEÍNA mg/ml	TOTAL DE PROTEÍNA mg	ATIVIDADE ESPECÍFICA Unid./mg	FATOR DE PURIFICAÇÃO
59	2,00	5,00	10	0,201	0,402	24,87	15,54
60	2,00	6,00	12	0,185	0,370	32,43	20,26
61	2,00	6,00	12	0,178	0,356	33,70	21,05
62	2,00	6,00	12	0,172	0,344	34,88	21,80
63	2,00	7,00	14	0,151	0,302	46,35	28,96
64	2,00	9,00	18	0,129	0,258	69,76	43,60
65	2,00	11,00	22	0,108	0,216	101,85	63,62
66	2,00	10,00	20	0,087	0,174	114,94	71,83
67	2,00	8,50	17	0,079	0,158	107,59	67,24
68	2,00	6,50	13	0,085	0,170	76,47	47,79
69	2,00	3,50	7	0,078	0,150	46,66	28,04

Tabela VI - Atividade enzimica dos precipitados obtidos por fracionamento com sulfato de amônia, depois da cromatografia

FRAÇÃO	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> %(m/v)	VOLUME ml	ATIVIDADE Unid./ml	ATIVIDADE TOTAL Unid.	PROTEÍNA mg/ml	TOTAL DE PROTEÍNA mg	ATIVIDADE ESPECÍFICA
P' 3	0 - 68	2,0	45,90	91,80	0,522	1,044	87,93
P' 4	0 - 38,5	1,5	2,60	3,90	0,109	0,163	23,85
P' 5	38,5-68,5	1,5	38,90	58,35	0,208	0,312	187,01

A tabela VII contém os resultados obtidos da extração e purificação de fumarase relativos a 100g de tecido (coração de bovino).

O enzima obtido nesse grau de purificação é que foi utilizado para desenvolvimento do estudo cinético.

### Estudo Cinético

Influência da concentração do substrato na velocidade inicial da reação - A concentração dos substratos, utilizada nos ensaios de rotina, foi igual a 0,019M, suficiente para saturar o enzima, como se pode observar nos gráficos 2 e 4.

As constantes de Michaelis determinadas pelo processo gráfico de Lineweaver-Burk, apresentaram os seguintes valores:

para fumarato:  $K_f$  igual a 2,0mM, gráfico nº 3;  
para L-malato:  $K_m$  igual a 6,7mM, gráfico nº 5.

Influência da concentração do enzima - Pode-se observar pelo gráfico correspondente (nº 6) que a velocidade inicial da reação é proporcional à concentração do enzima.

Efeito do pH - O pH ótimo para fumarase foi igual a 7,0 (gráfico nº 7)

Inibição de fumarase por citrato de sódio - Citrato de sódio inibiu a reação de fumarase através reação competitiva, como se pode observar nos gráficos correspondentes: nº 8 para fumarato e nº 9 para L-malato.

Tabela VII - Fases da extração e purificação de fumarase de coração de bovino (Bos taurus Linn)

FRAÇÃO	VOLUME ml	ATIVIDADE Unid./ml	ATIVIDADE TOTAL Unid.	PROTEÍNA mg/ml	TOTAL DE PROTEÍNA mg	ATIVIDADE ESPECÍFICA	FATOR DE PURIFICAÇÃO	% DE RECUPERAÇÃO
Ext.cru	284,0	20,00	5680	12,50	3 550,00	1,60	1,00	100
S <sub>1</sub>	280,0	20,00	5600	11,28	3 158,40	1,77	1,10	98,5
p <sub>3</sub>	7,0	280,00	1968	46,60	326,20	6,00	3,75	34,5
p <sub>3</sub> dial.	13,4	110,00	1474	22,32	299,08	4,92	3,07	25,95
Frações eluídas coluna	12,0	8,66	103,92	0,100	1,20	86,60	53,93	8,08*
p' <sub>3</sub>	2,0	45,90	91,80	0,522	1,04	87,93	54,95	7,19*
p' <sub>5</sub>	1,5	38,90	58,35	0,208	0,312	187,01	116,88	4,55*

\* multiplicado pelo fator 4,46, porque apenas 3,0 ml do volume total de p<sub>3</sub> dialisado (13,4 ml) foram colocados na coluna.

As constantes de dissociação ( $K_i$ ) foram calculadas pela fórmula

$$K_i = \frac{K_m (I)}{K_p - K_m}$$

conforme apresentada em "Método".

- para fumarato:

$$K_m = 2\text{mM}$$

$$K_p = 10\text{mM}$$

$$I = 50\text{mM}$$

Substituindo-se esses valores na fórmula de  $K_i$ , te

mos:

$$K_i = \frac{2 \times 50}{10 - 2} = 12,5\text{mM}$$

$$K_i = 12,5\text{mM}$$

- para L-malato:

$$K_m = 6,7\text{mM}$$

$$K_p = 25\text{mM}$$

$$I = 50\text{mM}$$

Substituindo-se esses valores na fórmula de  $K_i$ ,

tem-se:

$$K_i = \frac{6,7 \times 50}{25 - 6,7} = 18,3$$

$$K_i = 18,3$$

Influência da temperatura - A atividade enzimica aumentou com a elevação da temperatura, até 40°C. A 45°C houve diminuição na velocidade inicial da reação e a 50°C o enzi<sup>ma</sup> perdeu completamente a atividade. Gráfico correspondente - (nº 10).

Determinação da energia de ativação (A) - A energia de ativação "A" foi calculada conforme a equação de Arrhenius apresentada em "Métodos". Pelo gráfico nº 11, foi possível determinar o valor do ângulo  $\alpha$ .

$$-A = \text{tg } \alpha \cdot 4,575$$

$$-A = 1\,750 \times 4,575$$

$$A = 8006,25 \text{ cal/ml.}$$

Determinação da constante de equilíbrio - As constantes de equilíbrio determinadas pela fórmula

$$K_{eq} = \frac{A_i - A_f}{A_f} \quad (\text{vide "Método"})$$

para as diferentes concentrações de fumarato e de L-malato, assim como os valores dos termos de equação, encontram-se nas tabelas VIII e IX, respectivamente.

Tabela VIII - Determinação da constante de equilíbrio a 25°C, utilizando-se soluções de diferentes concentrações de fumarato.

FUMARATO	$A_i$	$A_f$	$K_{eq}$
Conc. (M)			
1,9 x 10 <sup>-2</sup>	0,939	0,187	4,02
1,66 x 10 <sup>-2</sup>	0,823	0,161	4,11
1,42 x 10 <sup>-2</sup>	0,698	0,136	4,13
1,18 x 10 <sup>-2</sup>	0,576	0,113	4,09
9,5 x 10 <sup>-3</sup>	0,468	0,094	3,98

Tabela IX - Determinação da constante de equilíbrio a 25°C, -  
pH 7,30, utilizando-se soluções de diferentes con-  
centrações de L-malato.

MALATO	$A_i$	$A_f$	$K_{eq}$
1,9 x 10 <sup>-2</sup>	0,939	0,186	4,04
1,66 x 10 <sup>-2</sup>	0,823	0,163	4,04
1,42 x 10 <sup>-2</sup>	0,698	0,136	4,13
1,18 x 10 <sup>-2</sup>	0,576	0,112	4,14
9,5 x 10 <sup>-3</sup>	0,468	0,093	4,03

A constante de equilíbrio foi considerada como -  
sendo a média dos valores obtidos, ou seja,  $K_{eq}$  igual a 4,07.

Determinação de  $\Delta F^{\circ}$ : A energia livre da reação  
( $\Delta F^{\circ}$ ) foi determinada pela fórmula:

$$-\Delta F^{\circ} = 2,3026 \times RT \log K_{eq}$$

como apresentada em "Método".

$$K_{eq} = 4,07$$

$$R = 1,987 \text{ cal/grau/mol (constantes dos gases)}$$

$$-\Delta F^{\circ}_{298} = 2,3026 \times 1,987 \times 298 \times \log 4,07$$

$$-\Delta F^{\circ}_{298} = 830,96 \text{ cal/mol}$$

$$-\Delta F^{\circ}_{298} = -830,96 \text{ cal/mol}$$

Determinação de  $\Delta H^{\circ}$  - Os valores das constantes  
de equilíbrio determinadas sob diferentes temperaturas estão  
colocadas na tabela X.

Tabela X - Determinação das constantes de equilíbrio, sob diferentes temperaturas, pH 7,30 utilizando-se como substrato solução de fumarato 0,019M.

Temperatura	$K_{eq}$
°C	
25	4,02
30	3,79
35	3,57

Pelo gráfico (nº 12) foi possível calcular a tangente do ângulo  $\alpha$

Substituindo-se na fórmula

$$t_g \alpha = - \frac{\Delta H^{\circ}}{4,575}, \text{ tem-se:}$$

$$- \Delta H^{\circ} = t_g \alpha \cdot 4,575$$

$$- \Delta H^{\circ} = 480 \times 4,575$$

$$\Delta H^{\circ} = - 2196 \text{ cal/mol.}$$

\*

\*            \*

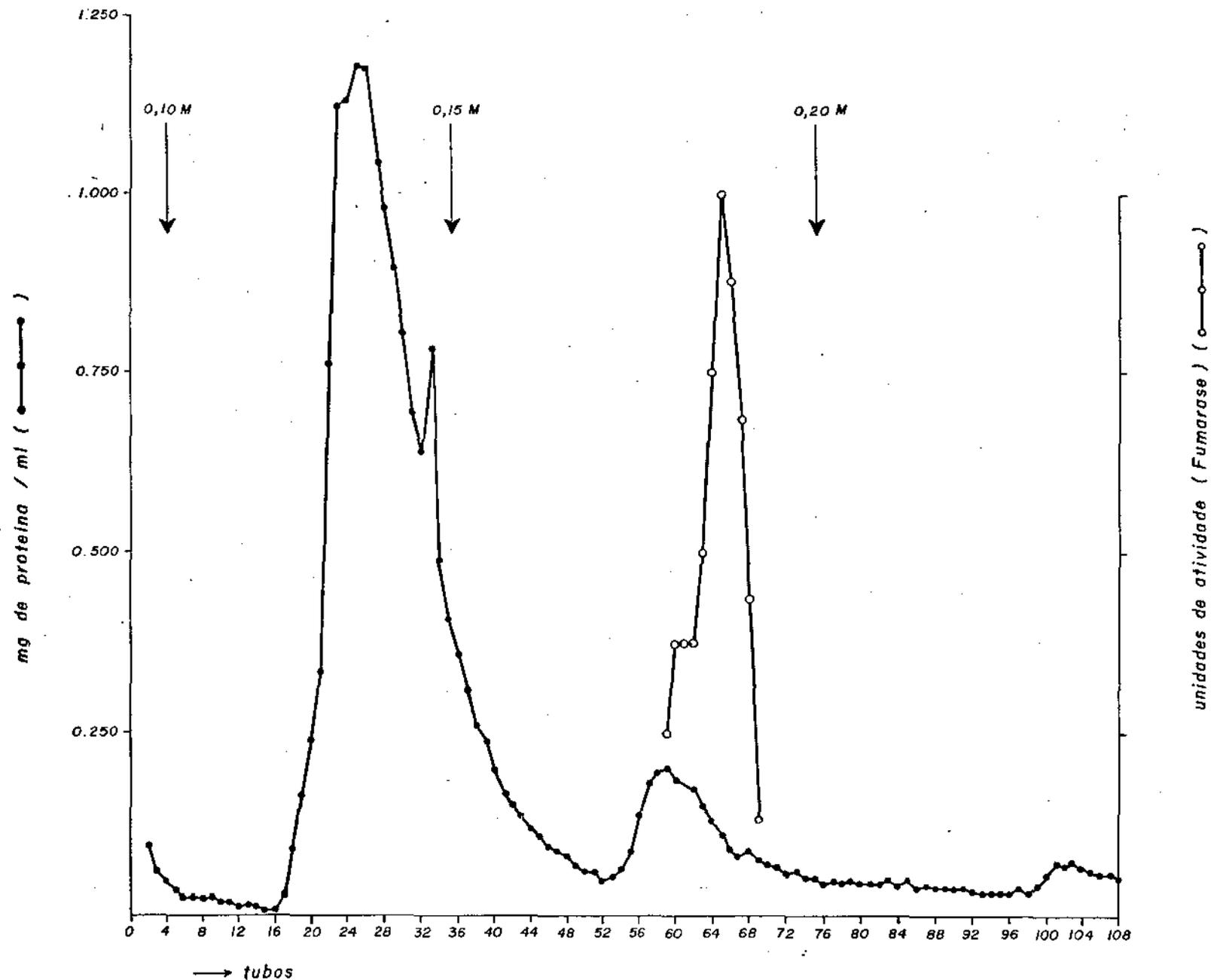


GRÁFICO Nº 1 - ELUIÇÃO DE FUMARASE E OUTRAS PROTEÍNAS DA COLUNA DE GEL DE FOSFATO DE CÁLCIO COM SOLUÇÕES TAMPÕES FOSFATO DE DIFERENTES FORÇAS IÔNICAS (0,10M, 0,15M e 0,20M) (●—●). ATIVIDADE ENZÍMICA DE FRAÇÕES ELUIDAS COM TAMPÃO FOSFATO 0,15M (○—○).

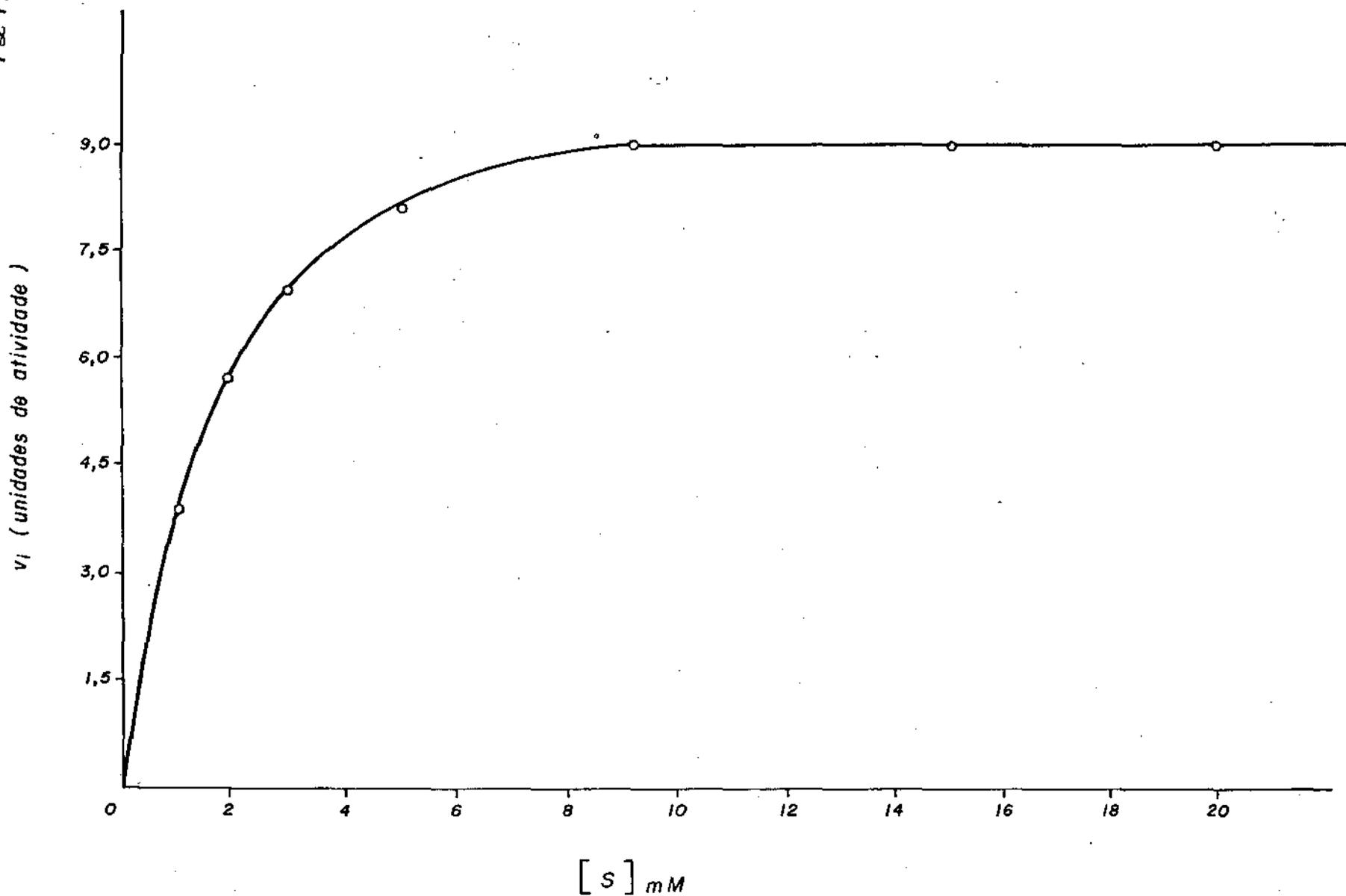


GRÁFICO Nº 2 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA VELOCIDADE INICIAL DA REAÇÃO UTILIZANDO-SE SOLUÇÕES DE FUMARATO E TAMPÃO FOSFATO 0,0576M, pH 7,30, 20°C.

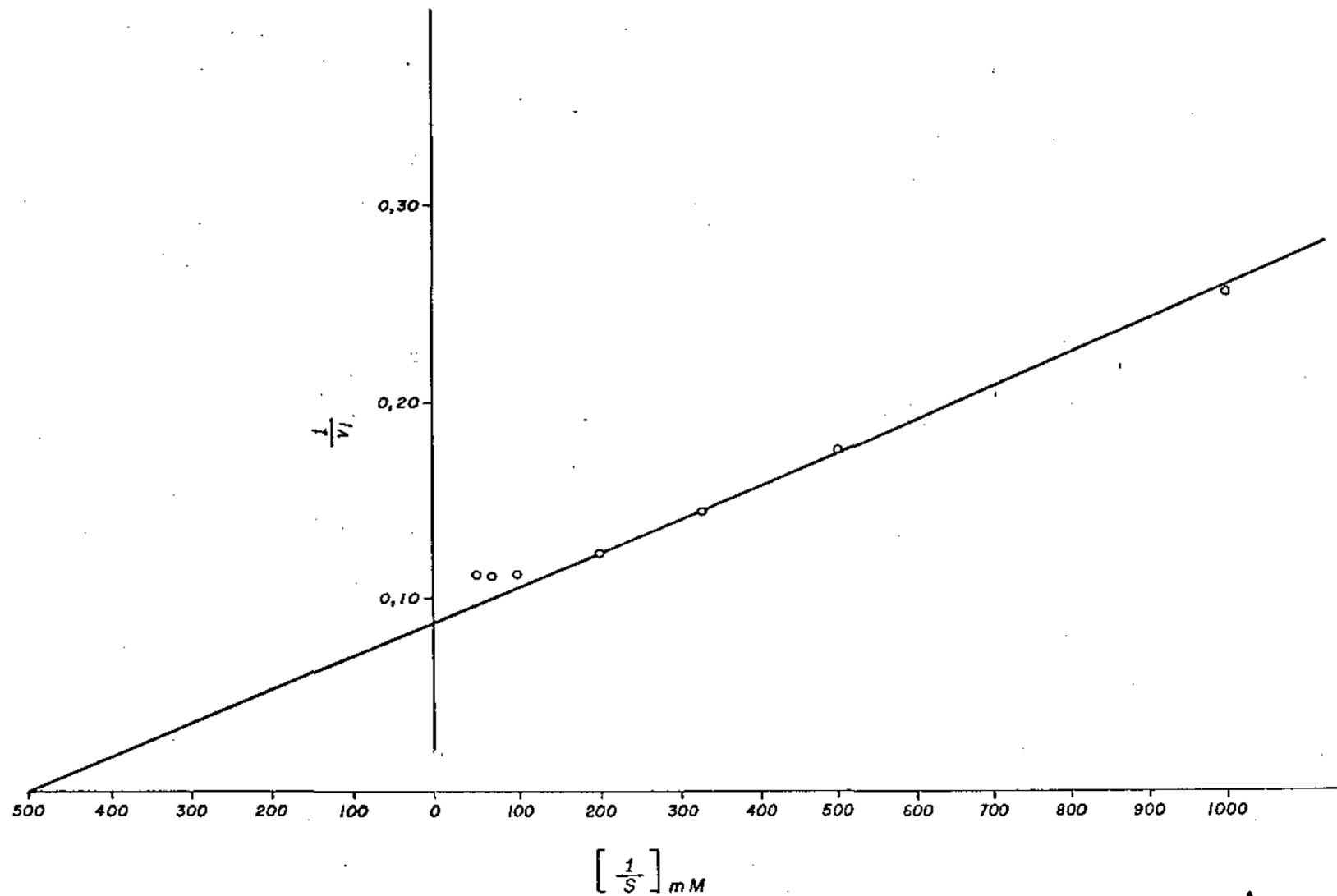


GRÁFICO Nº 3 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA VELOCIDADE INICIAL DA REAÇÃO UTILIZANDO-SE SOLUÇÕES DE FUMARATO E TAMPÃO FOSFATO 0,0576M, pH 7,30, 20°C. DE ACORDO COM LINWEAVER-BURK (1934).

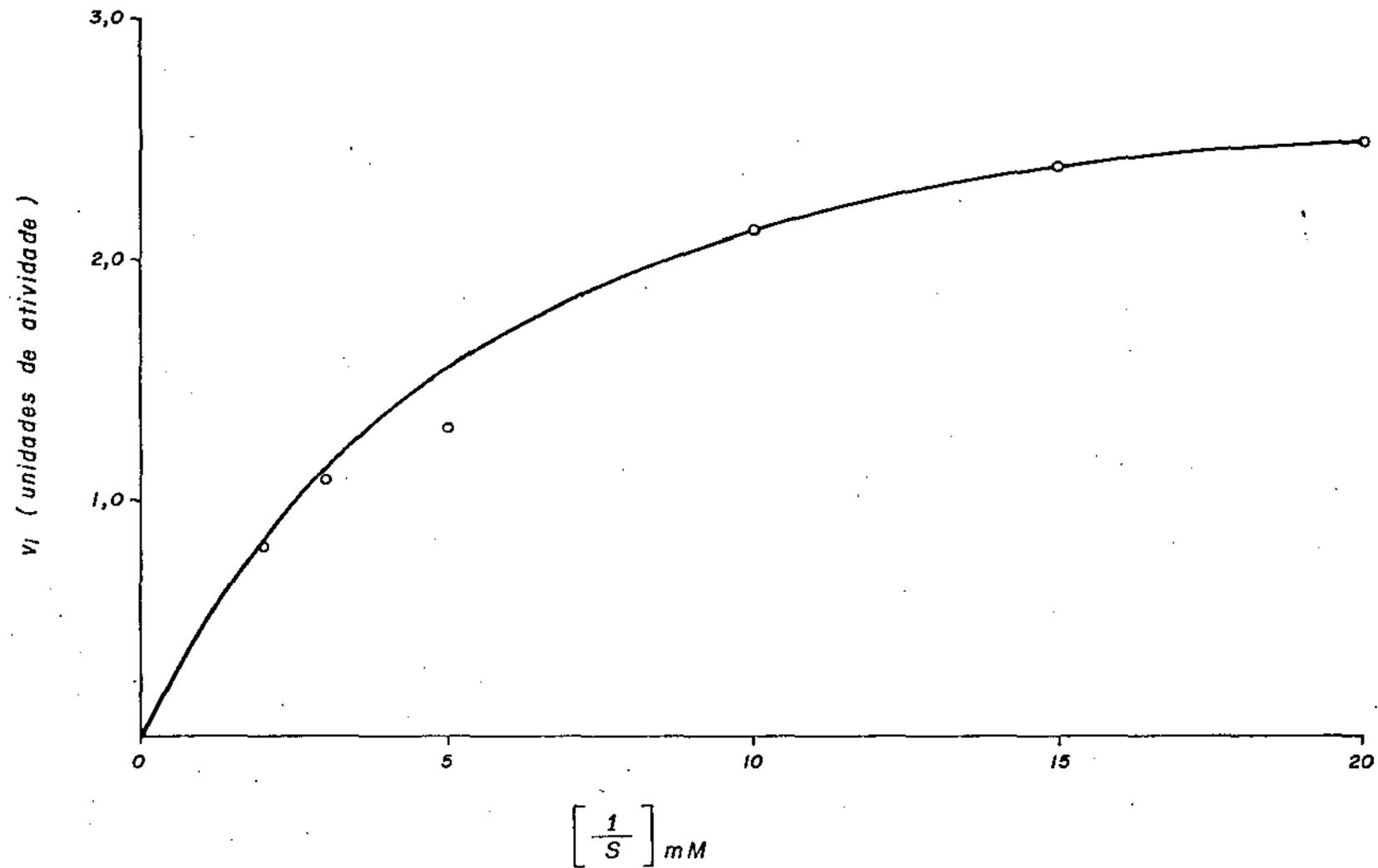


GRÁFICO Nº 4 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA VELOCIDADE INICIAL DA REAÇÃO, UTILIZANDO-SE SOLUÇÕES DE L-MALATO E TAMPÃO FOSFATO 0,0576M, pH 7,30, 20°C.

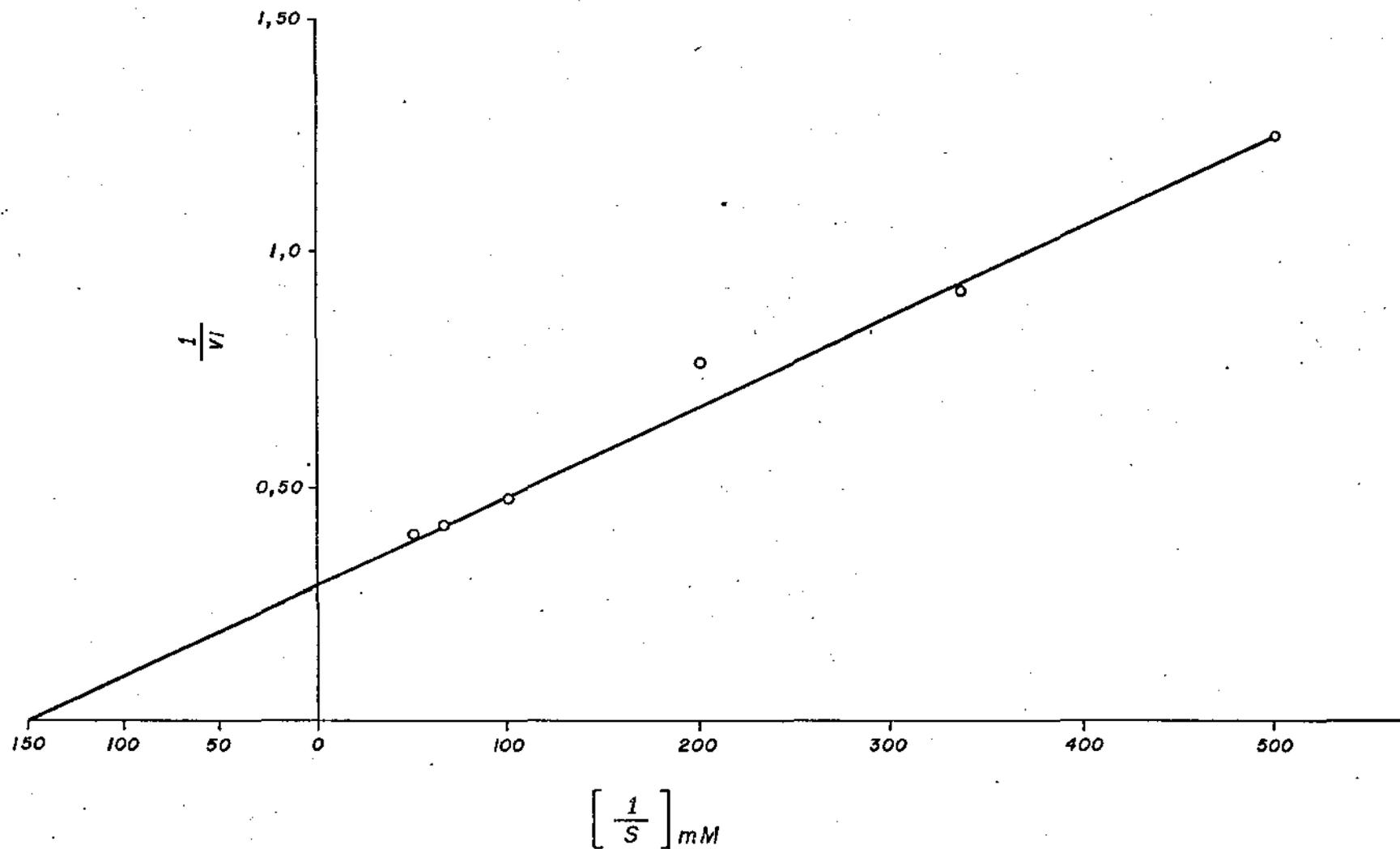


GRÁFICO Nº 5 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA VELOCIDADE INICIAL DA REAÇÃO UTILIZANDO-SE SOLUÇÕES DE L-MALATO E TAMPÃO FOSFATO 0,0576M, pH 7,30, 20°C. DE ACORDO COM LINEWEAVER-BURK (1934).

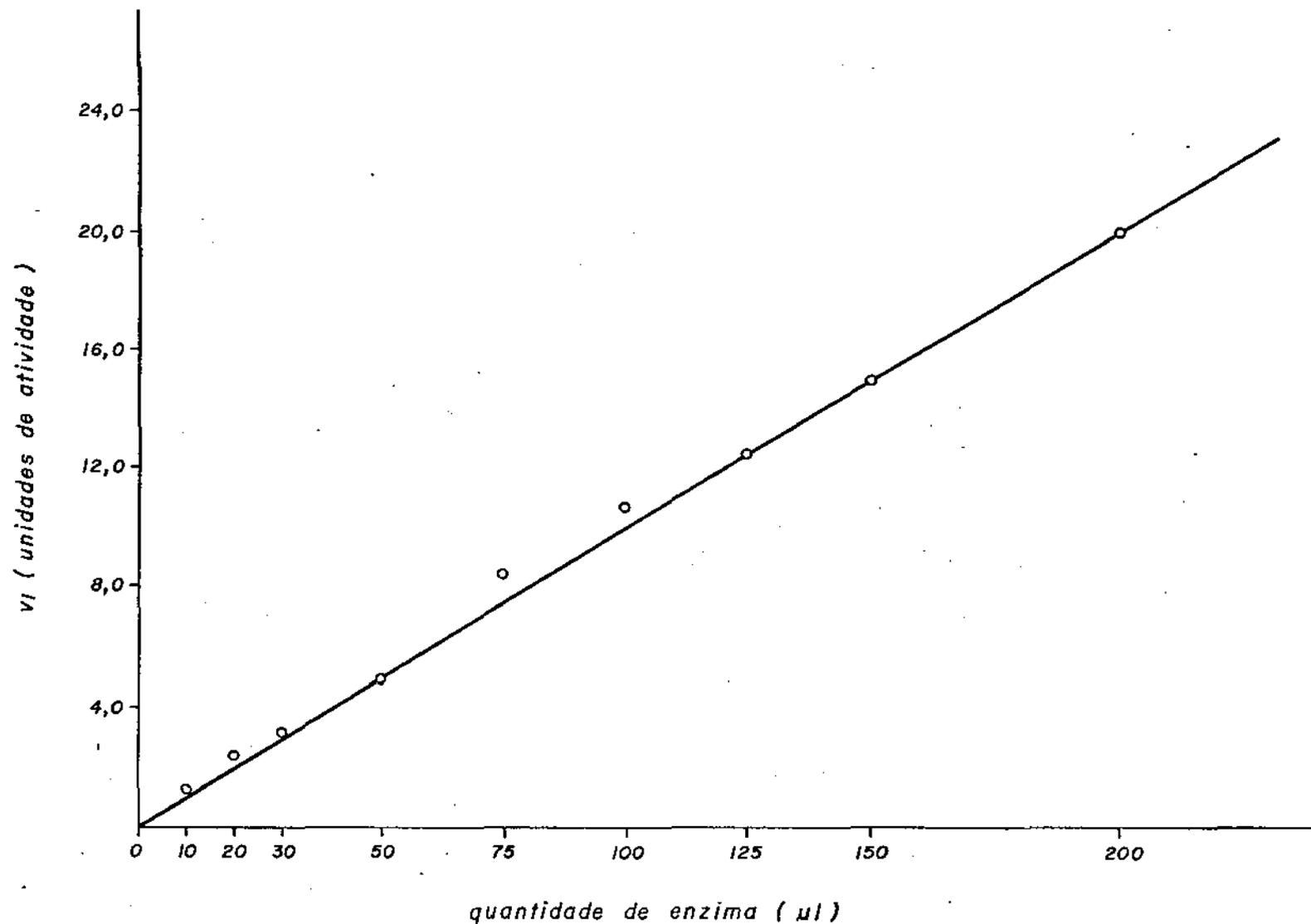


GRÁFICO Nº 6 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO ENZIMA NA VELOCIDADE INICIAL DA REAÇÃO, UTILIZANDO-SE SOLUÇÕES DE FUMARATO 0,01% e TAMPÃO FOSFATO 0,0576M, pH 7,30, 20°C.

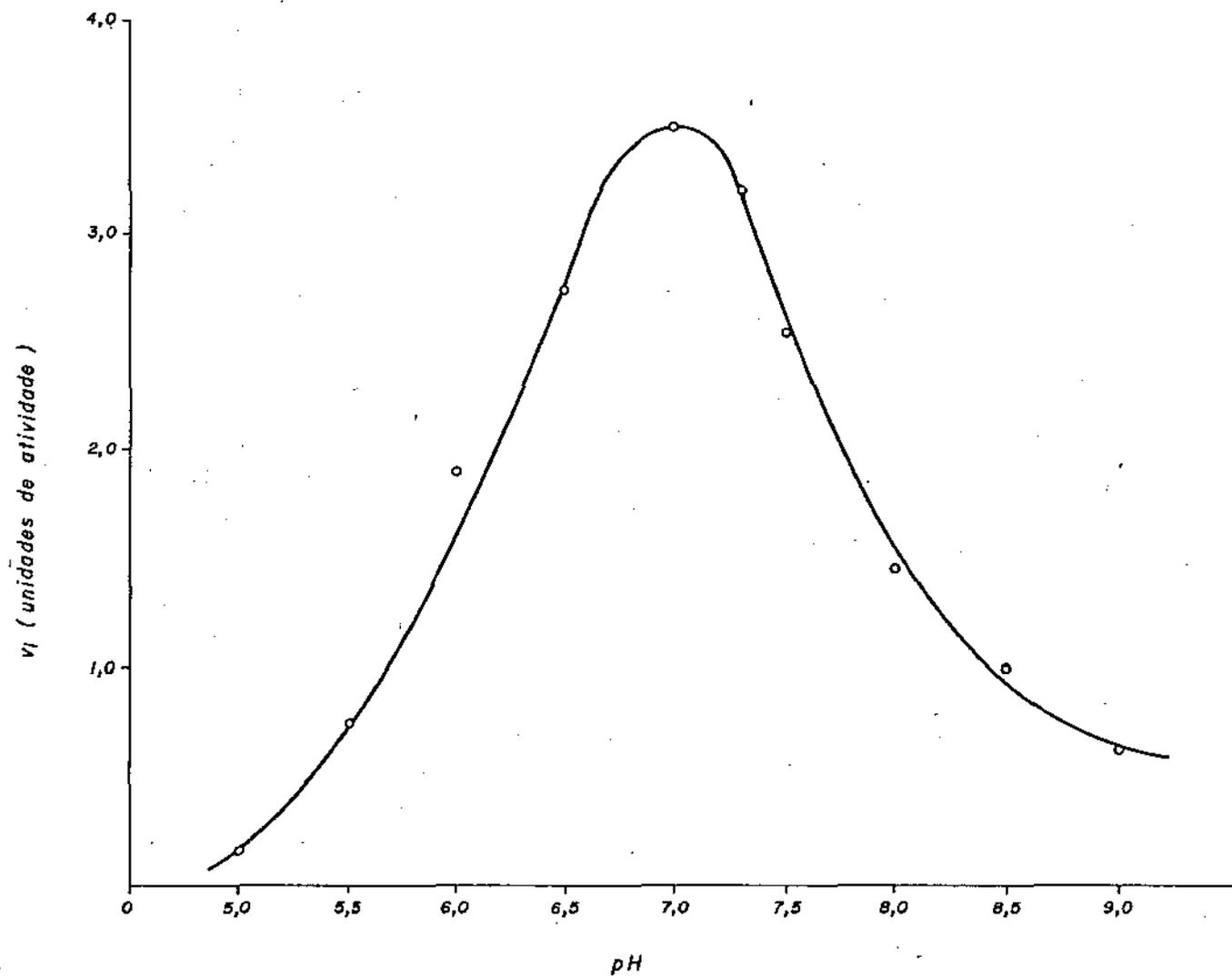


GRÁFICO Nº 7 - EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DE FUMARASE UTILIZANDO-SE SOLUÇÕES DE FUMARATO 0,019M e TAMPÃO FOSFATO 0,0576M, 20°C.

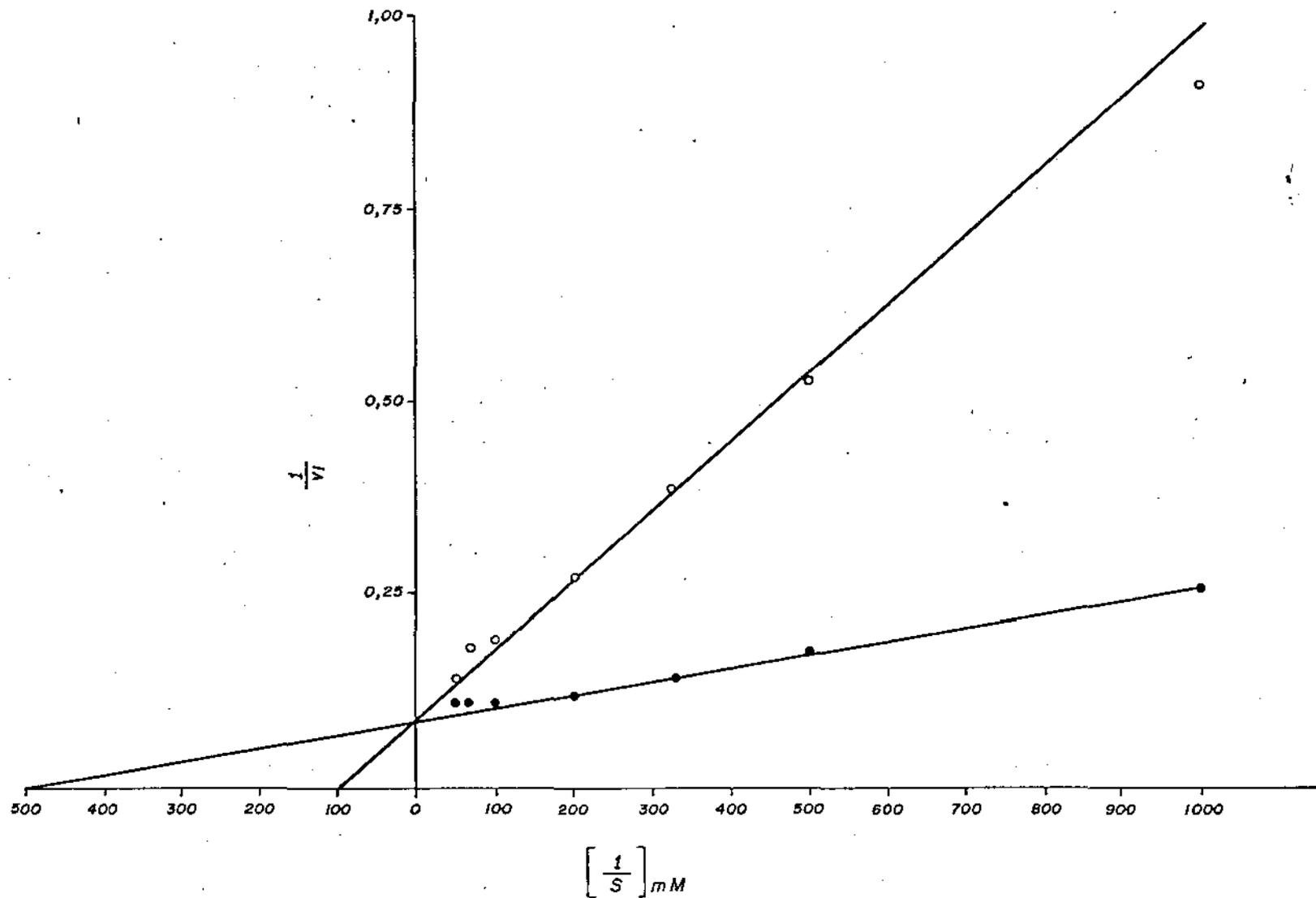


GRÁFICO Nº 8 - INIBIÇÃO DE FUMARASE POR CITRATO DE SÓDIO 0,05M (○—○—○) E, EM AUSÊNCIA DE CITRATO DE SÓDIO (●—●—●), UTILIZANDO-SE SOLUÇÕES DE FUMARATO E TAMPÃO FOSFATO 0,0576M, pH 7,30, 20°C. DE ACORDO COM LINEWEAVER-BURK (1934).

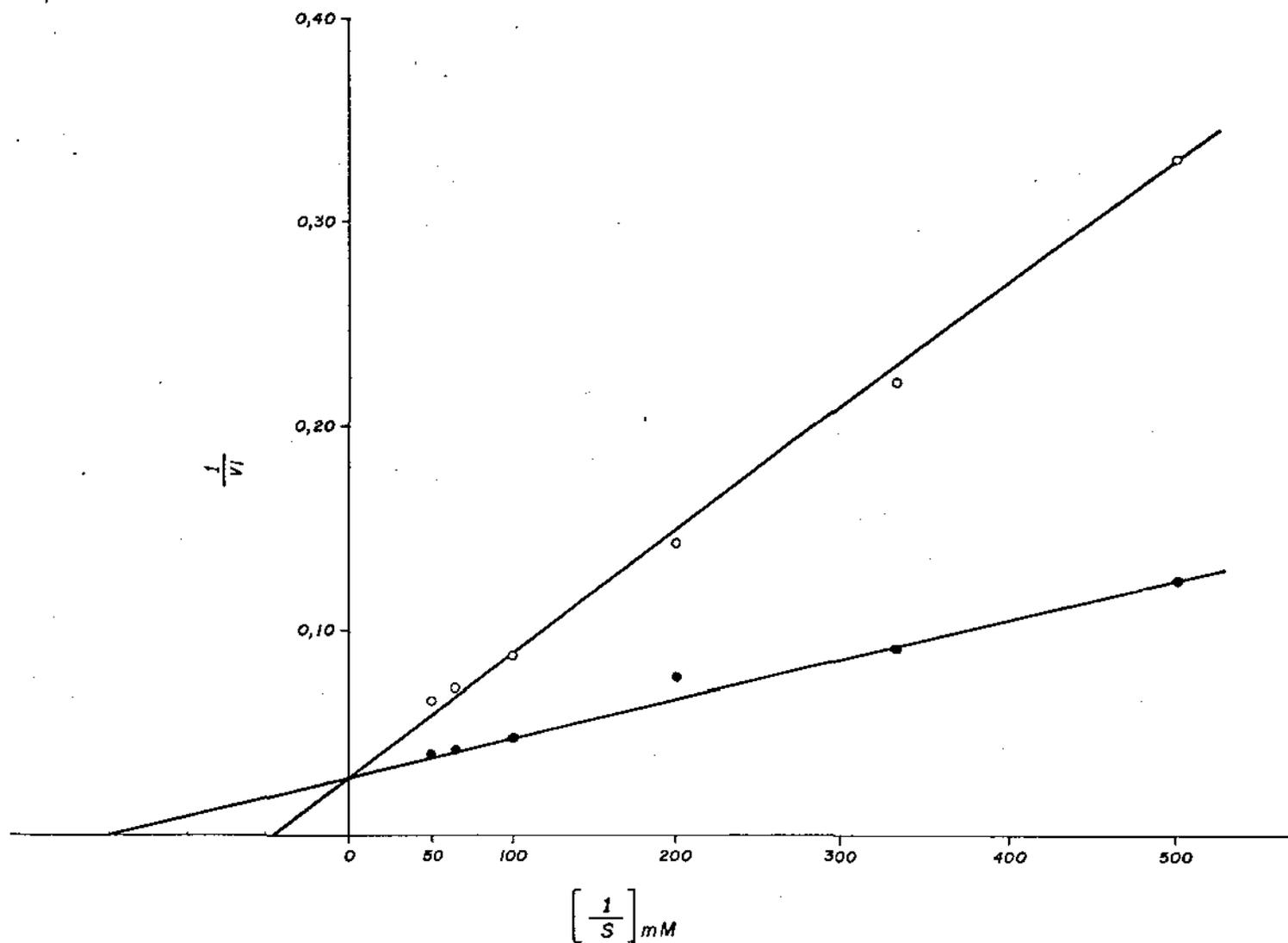


GRÁFICO Nº 9 - INIBIÇÃO DE FUMARASE POR CITRATO DE SÓDIO 0,05M (o—o—o) E, EM AUSÊNCIA DE INIBIÇÃO (•—•—•), UTILIZANDO-SE SOLUÇÕES DE L-MALATO E TAMPÃO FOSFATO 0,0576M, pH 7,30, 20°C. DE ACORDO COM LINEWEAVER-BURK (1934).

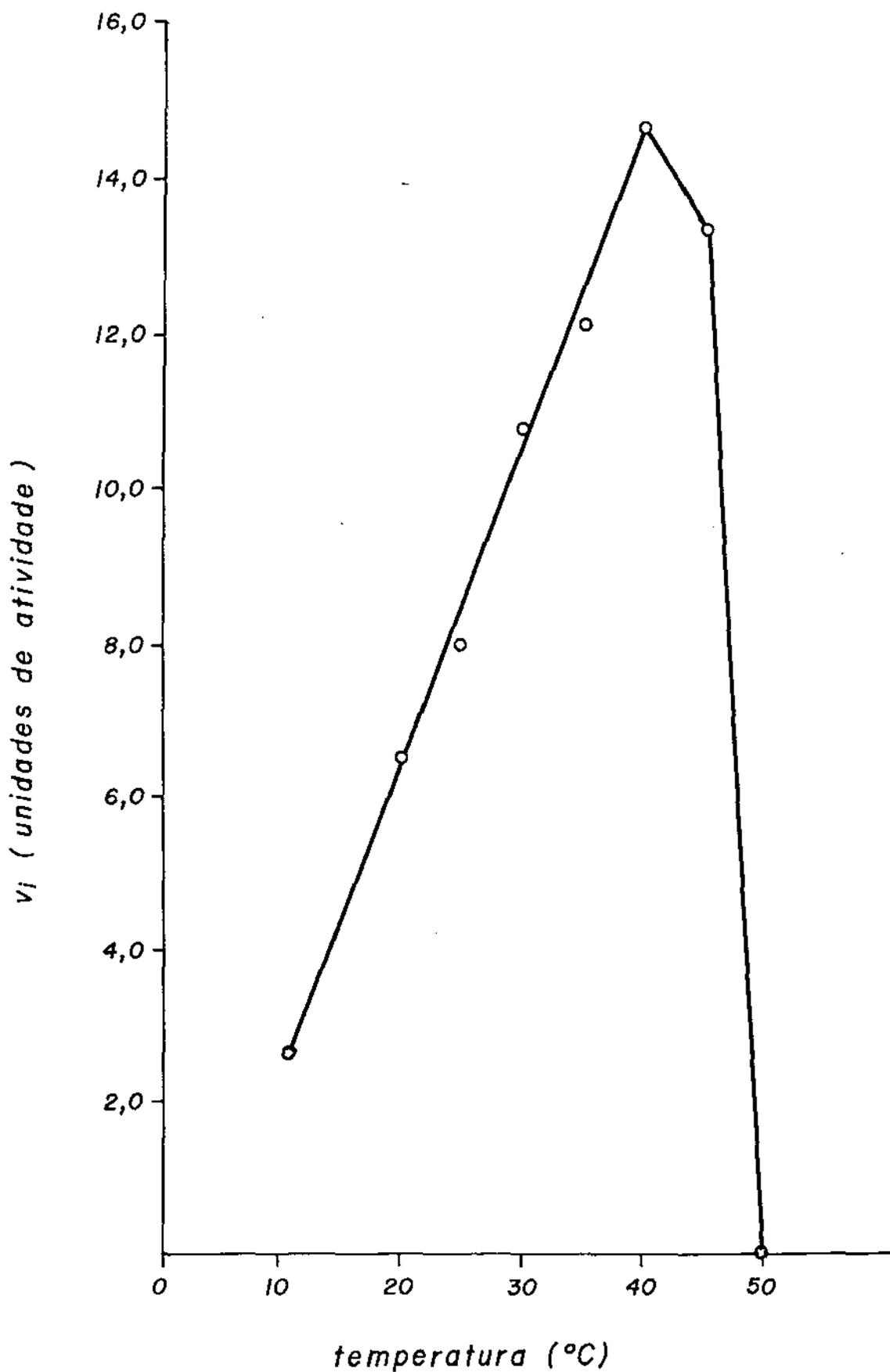


GRÁFICO Nº 10 - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DE FUMARASE, UTILIZANDO-SE SOLUÇÕES DE FUMARATO 0,019M E TAMPÃO FOSFATO 0,0576M, pH 7,30.

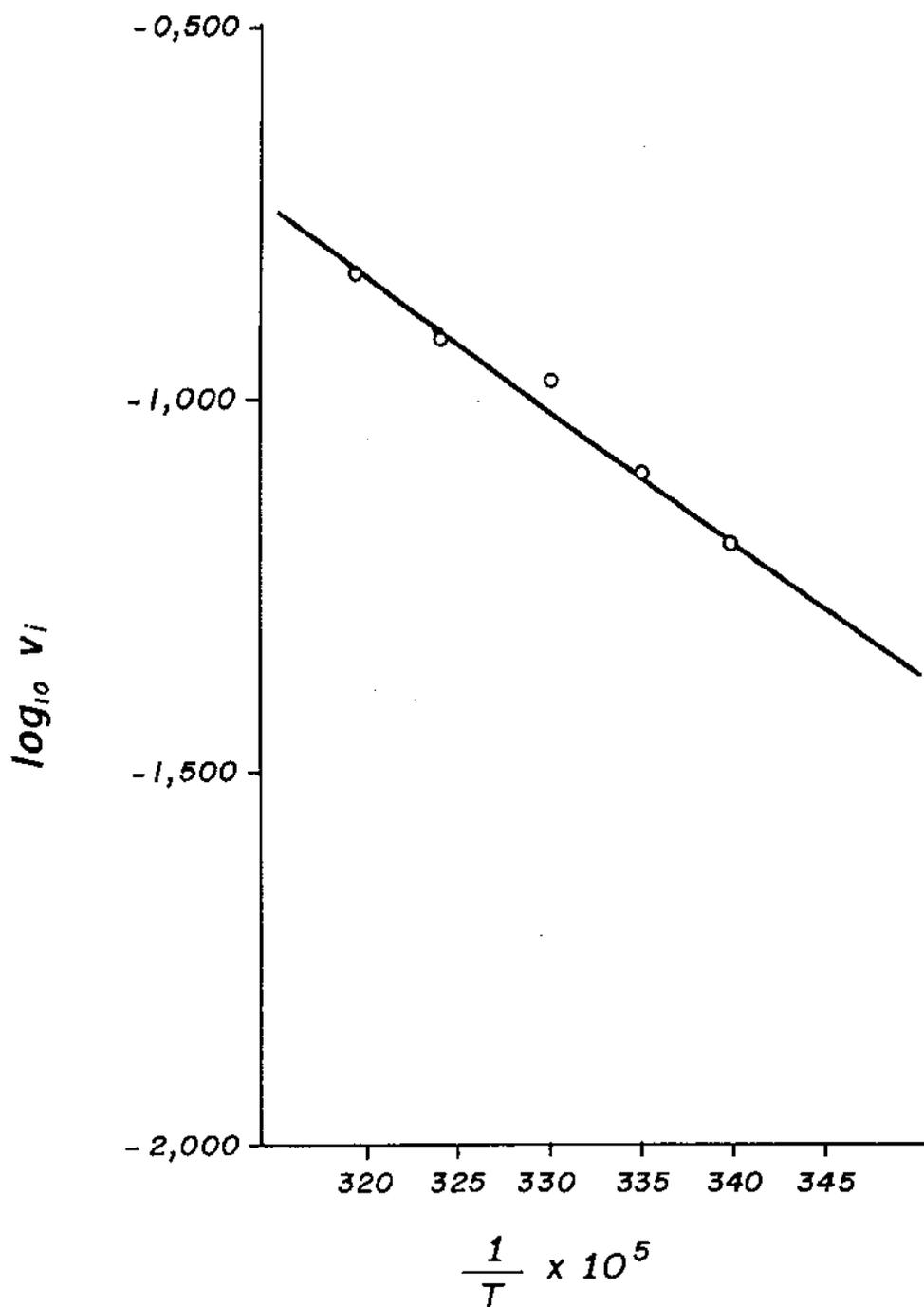


GRÁFICO Nº 11 - EFEITO DA TEMPERATURA NA VELOCIDADE DA REAÇÃO CATALIZADA POR FUMARASE, UTILIZANDO-SE SOLUÇÕES DE FUMARATO 0,019M, TAMPAO FOSFATO 0,0576M, pH 7,30.

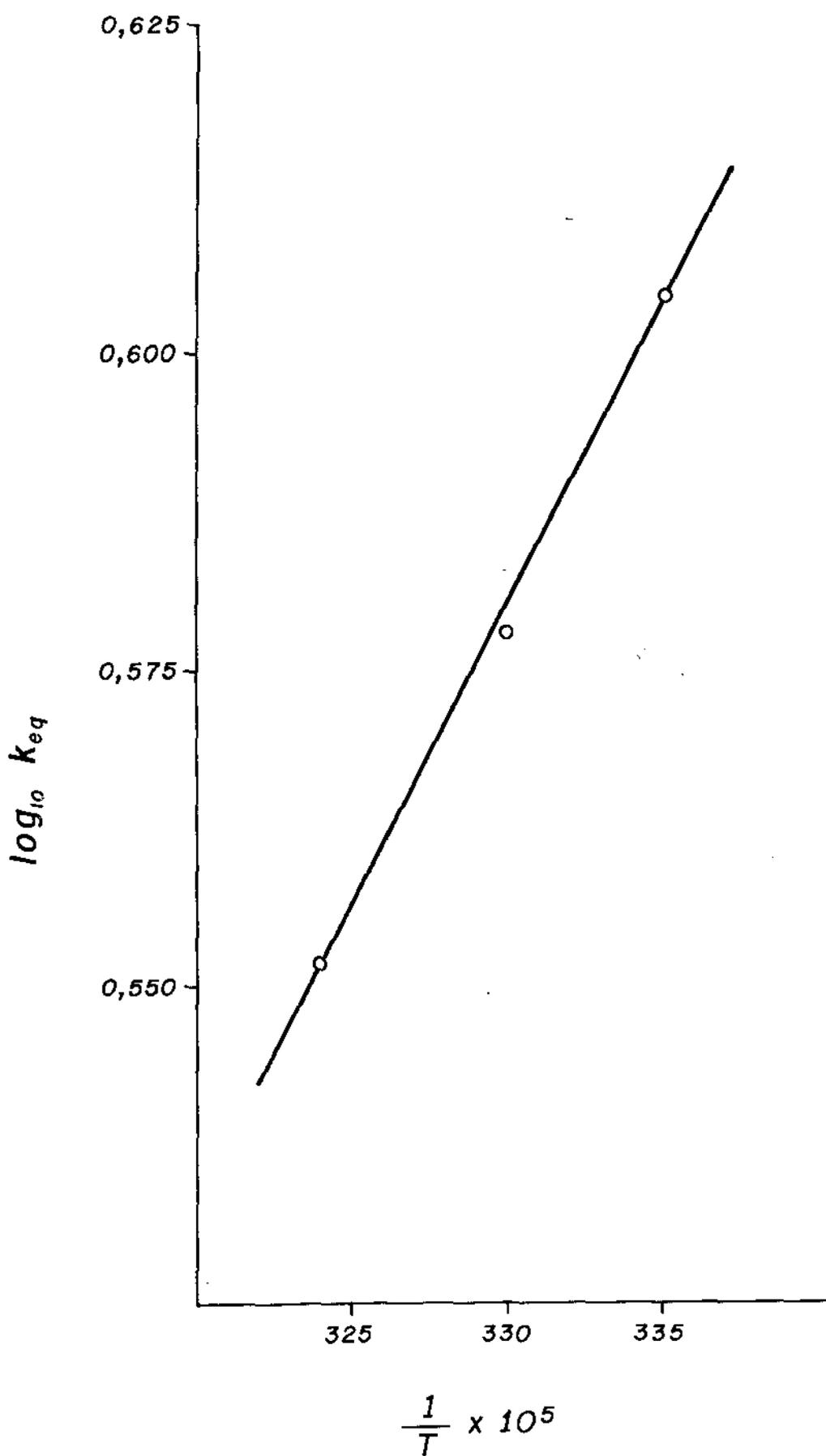


GRÁFICO Nº 12 - EFEITO DA TEMPERATURA NA CONSTANTE DE EQUILÍBRIO, UTILIZANDO-SE SOLUÇÕES DE FUMARATO 0,019M e TAMPÃO FOSFATO 0,0576M, pH 7,30.

## 5 - DISCUSSÃO

### Extração e purificação

O método por nós utilizado para extração e purificação de fumarase de coração de bovino foi baseado no processo utilizado por MASSEY (1952), com modificação.

As fases iniciais do método, até ajuste do pH do extrato cru para 5,20 com tampão acetato 1,0M, pH 4,0, obedeceram à metodologia utilizada por aquele autor. Massey obteve por esse processo precipitação de 86 a 90% de proteínas - que não fumarase, uma vez que o precipitado não apresentou - qualquer atividade enzimica.

Frieden também utilizou abaixamento do pH inicialmente para pH 6,0 com tampão acetato 1,0M, pH 4,60 eliminando proteínas que não fumarase. Em etapa seguinte, prosseguiu o abaixamento do pH para 5,30 com o mesmo tampão, obtendo precipitação de teor relativamente alto de fumarase.

O resultado que obtivemos pelo abaixamento do pH do extrato cru para 5,20 foi a precipitação de apenas 10% de proteínas sem atividade enzimica.

Como se pode observar, os resultados obtidos por aqueles autores diferem entre si, assim como o resultado que obtivemos não está em concordância com os de Massey e Frieden.

### Fracionamentos com sulfato de amônia

A fase subsequente da purificação foi fracionamento do enzima com sulfato de amônia (38 a 58,5% de saturação), que permitiu purificar o enzima 3,75 vezes. Esse resultado - foi semelhante ao obtido por MASSEY (1952) que utilizou sulfa

to de amônia (45 a 60%) de saturação, para fracionamento das proteínas, e obteve purificação igual a 3,8 vezes em relação ao passo imediatamente superior.

FRIEDEN (1953) achou mais conveniente utilizar sulfato de amônia na faixa de 35 - 68% de saturação, obtendo purificação aproximadamente igual a 8 vezes. Resultado semelhante foi obtido por KANAREK (1964) que utilizou sulfato de amônia na faixa de 35 a 55% de saturação e obteve purificação igual a 8,6 vezes.

A faixa de saturação com sulfato de amônia por nós utilizada (38 a 58%) foi semelhante à utilizada por KANAREK (35 a 55%). No entanto, esse autor obteve resultados melhores de purificação, nessa fase, possivelmente devido à diferença dos tratamentos previamente realizados com a preparação do enzima.

### Instabilidade do enzima

Durante a diálise contra tampão fosfato 0,05M, pH 7,0, houve perda de aproximadamente 20% da atividade enzimática. MASSEY (1952) também submeteu à diálise a preparação do enzima, obtida após o fracionamento com sulfato de amônia, e não obteve qualquer perda de atividade do mesmo.

Como nos referimos no capítulo "Resultados", utilizamos 2-mercapto-etanol (6mM), na solução tampão da diálise que poderia criar condições de proteção ao enzima, pela presença de grupamentos - SH. Entretanto, não houve nenhuma melhora na obtenção dos resultados, no sentido de se diminuir essa perda de atividade.

MASSEY (1953-c) utilizou vários compostos bloqueadores do grupamento -SH, tais como, iodoacetato, p-cloromercu

ribenzoato, iodoacetamida e outros, porém, não obteve efeito inibidor da ação enzimica de fumarase. Esse resultado sugeriu, segundo o autor, que grupamentos -SH não participam diretamente da atividade.

ROBINSON (1967) utilizou compostos bloqueadores do grupamento -SH e constatou inibição do enzima, tanto mais alta quanto maior o número de grupamentos tiol modificados. Verificou também que a reação foi bastante lenta e que inibição total ocorreu somente depois de 40 horas. Observou que o bloqueamento dos grupos -SH foi mais lento em fumarase no estado nativo (enzima ativo) do que em fumarase tratada com uréia 8M, ou seja, completamente inativa e com as quatro cadeias polipeptídicas totalmente dissociadas.

Esses resultados mostraram que os grupamentos tiol não estão associados ao centro ativo do enzima mas estão embutidos em regiões hidrófobas da molécula de proteína. Porém, permanece ainda não completamente esclarecida a função específica desses grupamentos na molécula de fumarase. Sabe-se, entretanto, que eles são importantes na atividade da reação, uma vez que Robinson, nesse experimento, conseguiu reativar, com 2-mercaptoetanol, até 88% de uma reação de fumarase inativada por p-cloromercuribenzoato.

Considerando que utilizamos esse composto em nosso experimento, o fato de não podermos constatar diminuição da perda de atividade do enzima, parece mesmo indicar a existência de outro fator responsável pela instabilidade.

Como se pode observar na tabela VII, em cada passo da purificação, principalmente nas fases de fracionamento com sulfato de amônia ( $S_1$  a  $p_3$ ) e de cromatografia, houve perda acentuada da atividade enzimica. Acreditamos que além das perdas de enzima que normalmente ocorrem durante o fraciona-

mento, houve também perda de atividade por instabilidade do enzima.

### Cromatografia em coluna com gel de fosfato de cálcio

O processo de purificação de fumarase com gel de fosfato de cálcio utilizado por MASSEY (1952) permitiu purificar o enzima 3,1 vezes em relação à etapa anterior de purificação.

O processo por nós utilizado através de cromatografia em coluna, com esse gel, se mostrou muito mais eficiente, uma vez que permitiu purificar o enzima 18 vezes aproximadamente. Esse resultado provavelmente teria sido ainda melhor se o enzima não tivesse perdido parte de sua atividade, (65%) em relação à fase anterior, possivelmente por instabilidade.

### Estudo cinético

#### Mecanismo da reação

Os primeiros estudos cinéticos de fumarase (SCOTT e POWELL, 1948b)(JACOBSON, 1934) foram baseados na equação da velocidade da reação, para as reações reversíveis de primeira ordem.



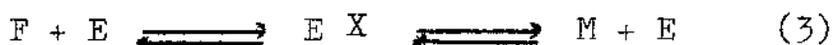
onde  $K_1$  e  $K_2$  são constantes de velocidade de primeira ordem, para reações que se realizam em ambos os sentidos, ou seja, para a direita e para a esquerda; F e M representam os substratos fumarato e L-malato. Essas constantes poderiam ser re-

lacionadas para a constante de equilíbrio como:

$$K_{eq} = \frac{K_1}{K_2} \quad (2)$$

Entretanto aqueles autores não puderam demonstrar tal reação, sugerindo que tão simples mecanismo não era o correto.

Segundo BOCK e ALBERTY (1953), o mecanismo mais simples, de acordo com o qual a reação de catalização poderia ocorrer, seria:



onde E representa o enzima livre e E X, o complexo enzima-substrato. Esse mecanismo é realmente uma combinação das reações que se verificam em ambos os sentidos:



onde S e P representam o substrato e produto de uma reação catalizada por enzima. MICHAELIS e MENTEN (1913) e mais tarde BRIGGS e HALDANE (1925) estabeleceram uma expressão para a velocidade desse tipo de reação, em termos da concentração do substrato e constante de velocidade:

$$v = \frac{V_{max.} S}{K_m + S}$$

onde v é velocidade inicial da reação,  $V_{max}$  é velocidade máxima,  $K_m$  a constante de Michaelis e S concentração do substrato.

LINEWEAVER-BURK (1934) expressaram essa equação - de uma forma mais conveniente, ou seja, tomando as recíprocas

de ambos os membros:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max.} S} + \frac{1}{V_{\max.}} \quad (6)$$

que permite de um modo mais simples determinar  $K_m$ , experimentalmente, através de um gráfico (uma linha reta) que relaciona a velocidade recíproca e a concentração recíproca do substrato.

Examinando-se os gráficos 3 e 5 vê-se que a linha que relaciona a velocidade e a concentração do substrato existiu tanto para fumarato como para L-malato. Portanto os dados cinéticos estão de acordo com o mecanismo da equação (4), para ambos os sentidos da reação, e sugerem que a equação (3) pode mais especificamente representar o mecanismo da reação.

Outra maneira de verificar se o mecanismo da reação é aquele representado pela equação (3) é através da equação de Haldane.

HALDANE (1925) derivou uma expressão adequada para calcular a constante de equilíbrio de reações do tipo mostrado em (3), onde:

$$K_{eq} = \frac{V_F K_M}{V_M K_F}$$

onde  $V_M$  e  $K_M$  são a velocidade máxima e a constante de Michaelis obtidas com malato como substrato;  $V_F$  e  $K_F$  são a velocidade máxima e a constante de Michaelis obtidas com fumarato como substrato.

Essa relação torna-se difícil de ser verificada experimentalmente para muitos enzimas que catalizam reações, cujo ponto de equilíbrio é deslocado para a direita. Entretanto, a reação catalizada por fumarase é um bom sistema para verificar a equação de Haldane, uma vez que o ponto de equilíbrio

é aproximadamente 80% da conversão de fumarato a malato.

De nossos dados:

$$K_M = 6,7\text{mM} \qquad K_F = 2,0\text{mM}$$

$$\frac{K_M}{K_F} = 3,35$$

$$\frac{V_F}{V_M} = 1,19 \text{ (segundo Bock e Alberty)}$$

$$K_{eq} = 3,35 \times 1,19 = 3,99$$

Esse resultado (3,99) está bem de acordo com a  $K_{eq}$  determinada experimentalmente, onde o valor encontrado - foi 4,07, confirmando que a relação de Haldane foi obtida. Portanto os dados sugerem que o mecanismo da reação (3) é o provável.

Em retrospecto, talvez SCOTT e POWELL (1948b) pudessem ter obtido o relacionamento entre a constante de equilíbrio e a constante de velocidade de acordo com a equação(2), se tivessem usado concentrações mais baixas dos substratos. À baixa concentração de substrato o termo  $K_m + S \approx K_m$  a equação de Michaelis (5) tornar-se-ia:

$$v = \frac{V_{max.} S}{K_m}$$

Em outras palavras, obter-se-ia a reação da primeira ordem ( $v \propto S$ ) conforme se esperava. Entretanto a insensibilidade dos métodos utilizados na época não permitiu fazer estudos a concentrações muito baixas de substratos.

#### Constantes de Michaelis

Os valores que encontramos para as constantes de

Michaelis ( $K_F = 2\text{mM}$ ;  $K_M = 6,7\text{mM}$ ) podem ser comparados àqueles obtidos por BOCK e ALBERTY (1953) ( $K_F = 1,37\text{mM}$ ;  $K_M = 4,8\text{mM}$ ), - por MASSEY (1953a) ( $K_F = 2,25\text{mM}$ ;  $K_M = 4,5\text{mM}$ ), medidos em condições similares.

Os valores calculados para aparente  $K_m$ , tanto para malato como para fumarato, são válidos estritamente para as condições sob as quais foram medidos; comparações não podem ser feitas sob diferentes condições.

Por exemplo, o  $K_m$  é modificado pelo pH como mostra MASSEY (1953-b) para ambos os substratos, mas especialmente para fumarato. O  $K_m$  é também dependente da força iônica do tampão, seja ele fosfato ou não.

ALBERTY (1954b) mostrou que  $K_m$  para fumarato e malato são diretamente proporcionais à concentração de tampão - fosfato, na faixa de 5 a 133mM. Isso mostra que, por extrapolação, à concentração nula de fosfato, a afinidade do enzima para fumarato e malato é muito maior do que a indicada pelos valores de  $K_m$  obtidos com tampão fosfato, na faixa abaixo de 0,1mM.

FRIEDEN (1957) calculou esses valores acuradamente, usando tampão tris-acetato 0,005M. Considerando que acetato é inibidor competitivo muito mais fraco que tampão fosfato, justificam-se os valores encontrados pelo autor:  $K_M$  igual a 10uM e  $K_F$  igual a 2,4uM, dados cerca de 1.000 vezes abaixo daqueles obtidos com tampão fosfato 60mM.

### pH Ótimo

O pH ótimo igual a 7,0, por nós encontrado, está bem de acordo com o pH 6,95, encontrado por MASSEY (1953b), em condições similares, ALBERTY (1954b) encontrou pH ótimo igual

a 6,80 utilizando tampão fosfato 133mM enquanto ALBERTY (1954a) obteve pH ótimo igual a 6,70 utilizando tampão fosfato 33mM.

Entretanto, à semelhança do que acontece com  $K_m$ , o pH ótimo é influenciado pelas condições sob as quais é medido. MASSEY (1953a) por exemplo, mostrou que fosfato e muitos outros sais inorgânicos têm um considerável efeito na curva de pH. Nesse experimento Massey mostrou que, na ausência de sais inorgânicos, o pH ótimo foi 5,60 quando se utilizou fumarato de sódio como substrato. Fosfato e um número de outros anions polivalentes causam um aumento elevado na atividade no lado alcalino da curva, resultando na mudança do pH ótimo para um pH mais alcalino.

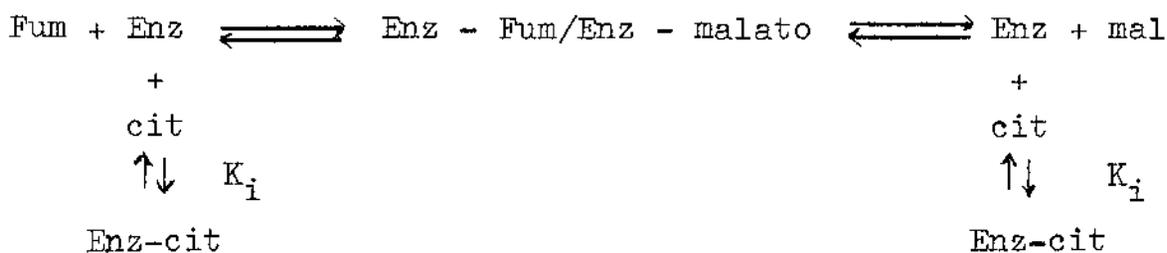
O fato da curva de pH ter sido obtida em forma de sino pode ser explicada em termos da teoria de MICHAELIS e DAVIDSOHN(1911) e MICHAELIS e PECHSTEIN (1914), segundo as quais a ionização de dois grupos, um ácido e outro básico, determina a atividade do enzima. De acordo com essa teoria, a atividade ótima é obtida a valores de pH onde é máxima a dissociação dos dois grupos responsáveis pela atividade.

Entretanto, como MASSEY (1953b) sugeriu, a teoria não elimina a possibilidade de que mais de um grupamento ácido ou básico esteja envolvido; teoricamente dois ou mais grupamentos com valores de pH semelhantes poderiam produzir o mesmo tipo de curva. MASSEY e ALBERTY (1954) determinaram os valores de  $pK_a$  igual a 5,7 e  $pK_b$  igual a 7,7, respectivamente, para o complexo enzima fumarato na presença de tampão fosfato 60mM.

Identificação dos grupos de ionização não foi feita, mas a evidência sugere que eles possuem um grupo carboxil e imidazol, respectivamente.

Inibição por citrato

Nossos dados mostraram (gráficos nºs 8 e 9) que citrato foi um inibidor competitivo da fumarase para os substratos fumarato e L-malato. Os dados estão portanto de acordo com o modelo:



O inibidor combina com o enzima livre mas não com o complexo enzima-substrato. Citrato pode combinar no mesmo lugar com o substrato natural ou pelo menos num lugar muito próximo ao centro ativo. Por essa razão não é possível a combinação do inibidor com o complexo enzima-substrato, nem do substrato com o complexo enzima inibidor. MASSEY (1953c) verificou que muitos ácidos di e tricarboxílicos, inclusive citrato, são inibidores competitivos. Considerando que ácidos monocarboxílicos não têm nenhum efeito, inclusive o monometil derivado de fumarato. O autor sugeriu que fumarase contém dois grupos carregados positivamente no centro ativo que liga o substrato. Além disso, apenas ácidos dicarboxílicos, que possuem os grupamentos  $\text{COO}^-$  separados por uma determinada distância semelhante à do ácido fumárico, é que podem combinar com o enzima.

As constantes de dissociação ( $K_i$ ) do complexo enzima-inibidor foram 12,5mM na presença de fumarato, e 18,3 mM na presença de malato. O fato desses valores terem sido praticamente iguais evidenciou que o mesmo centro ativo no enzi-

ma foi envolvido pelas reações em ambos os sentidos. Este resultado importante significa que tanto fumarato como malato combinam com o enzima no mesmo centro ativo.

FRIEDEN e ALBERTY (1955) também evidenciaram essa situação quando obtiveram valores de  $pK_a$  semelhantes aos de  $pK_b$ , utilizando fumarato ou L-malato.

MASSEY (1953c) encontrou  $K_i$  para citrato igual a 20mM, a pH 7,30, valor favoravelmente comparável ao que encontramos. Notou que certos ácidos tricarbóxicos, como o citrato, comportam-se como inibidores mais fortes (valores de  $K_i$  mais baixos) do que os ácidos dicarbóxicos. Uma possibilidade é que três pontos de ligação ocorram com o ácido tricarbóxico, para explicar sua maior afinidade para o enzima.

Entretanto, esse fato não tem maior importância - no caso, uma vez que os verdadeiros substratos possuem apenas dois pontos de ligação.

### Energia de Ativação

O valor encontrado por nós foi 8.006 cal/mol e está de excelente acordo com o valor encontrado por SCOTT e POWELL (1948b), para fumarase de coração de novilho, e por MASSEY (1953b) para coração de suíno. Os valores encontrados por esses autores foram 8.100 e 8.000 cal/mol respectivamente.

### Constante de equilíbrio da reação

Considerando que o enzima não altera o ponto de equilíbrio de uma reação, mas somente diminui o tempo para que ela alcance o equilíbrio, evidentemente o enzima não deve alterar o valor dessa constante.

Muitos valores são encontrados na literatura: por exemplo, 4,8 - BOCK e ALBERTY (1953); 4,03 - SCOTT e POWELL - (1948b); 3,1 - (BORSOOK e SCHOTT (1931); 4,6 e 4,1 - ALBERTY (1954b); 4,1 - MASSEY (1953b). Essas diferenças, indubitavelmente, são devidas a diferenças de força iônica dos tampões usados.

BOCK e ALBERTY (1953) mostraram que a constante de equilíbrio depende da concentração do tampão fosfato, mas que a variação de concentração pode ser eliminada, mantendo-se constante a força iônica, pela adição de cloreto de sódio. Esses autores determinaram a constante de equilíbrio da reação catalizada por fumarase de coração de suíno sob as condições de pH 7,30, 25°C e a uma força iônica igual a 0,5. O valor de  $K_{eq}$  encontrado foi igual a 4,8.

Utilizamos tampão fosfato 0,0567M e encontramos  $K_{eq}$  igual a 4,07 a 25°C, valor favoravelmente comparável ao 4,1 encontrado por MASSEY (1953b), que usou tampão com a mesma força iônica.

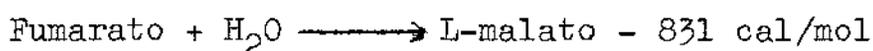
É de se notar que ALBERTY (1954b) verificou que o valor de  $K_{eq}$  é extremamente sensível à concentração de ions ( $PO_4$ ) entre os níveis de 50 e 60mM, faixa dentro da qual fizemos nossas medições.

Os valores das constantes de equilíbrio, por nós encontrados, quando utilizamos substratos (fumarato e L-malato), em cinco diferentes concentrações, foram muito semelhantes entre si. Esse resultado vem comprovar que realmente a constante de equilíbrio é independente da concentração do substrato.

### Energia livre padrão ( $\Delta F^\circ$ )

A energia livre padrão a 25°C, da reação foi -

831 cal/mol, que pode ser escrita:



O valor negativo significa que a energia é liberada na direção da formação de malato. A reação poderá entretanto tender para a esquerda, desde que malato tenha energia de 831 cal/mol mais do que fumarato em seu estado padrão.

Esse resultado se compara bem ao valor de - 826 cal/mol determinado por SCOTT e POWELL (1948b).

Entalpia (  $\Delta H^\circ$  )

O valor de  $\Delta H^\circ$  que encontramos foi igual a -2196 cal/mol. MASSEY (1953b) encontrou  $\Delta H^\circ$  igual a -3.600 cal/mol, resultado semelhante ao obtido por SCOTT e POWELL (1948b) cujo valor de  $\Delta H^\circ$  foi igual a -3560 cal/mol. BOCK e ALBERTY (1953) encontraram  $\Delta H^\circ$  igual a -3960 cal/mol.

\*

\*

\*

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram - obter as seguintes conclusões:

### Extração e Purificação

a) Apenas 10% das proteínas do extrato cru de coração de bovino foram susceptíveis de precipitação por abaixamento do pH para 5,2 com tampão acetato 1,0M, pH 4,0;

b) a melhor faixa de saturação com sulfato de amônia para fracionamento de proteínas foi 38 - 58,5%;

c) durante a diálise de  $p_3$ , contra tampão fosfato 0,05M, pH 7,0, houve perda de aproximadamente 20% da atividade enzimática, mesmo utilizando-se solução de 2-mercaptoetanol (6mM), no tampão de diálise;

d) gel de fosfato de cálcio utilizado em coluna cromatográfica permitiu purificar o enzima 17,6 vezes, valor maior ao obtido por Massey;

e) a força iônica do tampão fosfato necessária para eluir fumarase adsorvida em gel de fosfato de cálcio foi 0,15M;

f) o enzima perdeu grandemente sua atividade durante as fases de purificação; parte dessa perda foi devida, possivelmente, ao fator instabilidade;

g) o número total de purificação obtido foi igual a 116,85 vezes.

### Estudo cinético

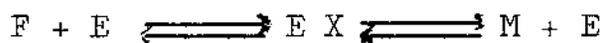
a) Resultados obtidos do estudo cinético com fumarase de coração de bovino, parcialmente purificada, foram com

paráveis aos resultados obtidos de estudos cinéticos realizados com fumarase cristalina obtida de coração de suíno;

b) o valor da constante de equilíbrio determinada experimentalmente ( $K_{eq} = 4,07$ ) foi semelhante ao valor da constante de equilíbrio calculada (3,99) através da expressão

$$K_{eq} = \frac{V_F \cdot K_M}{V_M \cdot K_F}$$

estabelecida por Haldane. Esse resultado permitiu deduzir sobre o mecanismo da reação catalizada por fumarase:



c) os valores encontrados para as constantes de Michaelis foram: 2,0mM, quando fumarato foi substrato, e 6,7mM quando L-malato foi substrato;

d) o pH ótimo da reação foi igual a 7,0;

e) a velocidade inicial da reação aumentou com a elevação da temperatura até 40°C;

f) citrato de sódio comportou-se como inibidor competitivo de fumarase para ambos os substratos. As constantes de dissociação ( $K_i$ ) do complexo enzima-inibidor foram  $K_i = 12,5mM$  (fumarato) e  $K_i = 18,3mM$  (L-malato). A semelhança dos valores das constantes sugere que ambos os substratos se ligam no mesmo local do enzima;

g) a energia livre padrão ( $\Delta F^0$ ), determinada a 25°C, foi igual a -830,96 cal/mol;

h) a entalpia da reação ( $\Delta H^0$ ) foi igual a -2196 cal/mol;

i) energia de ativação (A) foi igual a -8006,25 cal/mol.

A extração e purificação de fumarase de coração de bovino foi feita pelo método de MASSEY, com modificação, - que consistiu no uso de gel de fosfato de cálcio em coluna cromatográfica para purificar o enzima. Este processo permitiu purificar o enzima 18 vezes em relação à fase anterior, ao invés de 3,1 vezes como o obtido por MASSEY. O número total de purificação foi da ordem de 116 vezes em relação ao extrato cru. A atividade enzimática foi medida espectrofotometricamente, a 300 nm.

Com o enzima purificado foi desenvolvido estudo cinético que permitiu determinar:

a) que as constantes de Michaelis (determinadas pelo processo gráfico de Lineweaver-Burk) foram iguais a 2,0 mM para fumarato e 6,7mM para L-malato, utilizados numa faixa de concentração que variou de  $2 \times 10^{-2}M$  a  $1 \times 10^{-3}M$  e de  $2 \times 10^{-2}M$  a  $2 \times 10^{-3}M$ , respectivamente;

b) que a velocidade inicial da reação aumentou - proporcionalmente à concentração do enzima e à temperatura a  $40^{\circ}C$ ;

c) que o pH ótimo para a reação foi igual a 7,0;

d) que citrato de sódio 0,05M agiu como inibidor competitivo da fumarase. Foram determinadas as constantes de dissociação para ambos os substratos, fumarato ( $K_i = 12,5mM$ ) e L-malato ( $K_i = 18,3mM$ ), utilizados numa faixa de concentração que variou de  $2 \times 10^{-2}M$  a  $1 \times 10^{-3}M$  e de  $2 \times 10^{-2}M$  a  $2 \times 10^{-3}M$ , respectivamente;

e) que energia de ativação (A) foi igual a -8006,25 cal/mol, determinada pela equação de Arrhenius;

f) que a constante de equilíbrio da reação determinada a  $25^{\circ}C$  foi igual a 4,07;

g) que a energia livre padrão ( $\Delta F^{\circ}$ ) foi igual a -830,96 cal/mol;

h) que a entalpia ( $\Delta H^{\circ}$ ) foi igual a -2196 cal/mol.

\*

\*

\*

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - ALBERTY, R. A. Kinetic effects on the ionization of groups in the enzyme molecule. J. cell comp. Physiol., Philadelphia, 47:245-80, 1956.
- 02 - \_\_\_\_\_ & BOCK, R.M. Alteration of the kinetic properties of an enzyme by the binding of buffer, inhibitor, or substrate. Proc. natn. Acad. Sci., U.S.A., - 39: 895-900, 1953.
- 03 - \_\_\_\_\_ & MASSEY, V. On the interpretation of the pH variation of the maximum initial velocity of an enzyme - catalyzed reaction. Biochim. biophys. Acta, 13: 347-52, 1954a.
- 04 - \_\_\_\_\_ et alii. Studies of the enzyme fumarase. III. The dependence of the kinetic constant at 25°C upon the concentration and pH of phosphate buffers. - J. Am. Chem. Soc., Easton, Pa, 76:2485-93, 1954b.
- 05 - BATELLI, F. & STERN, L. Die oxydation der citronem-äpfel und fumarssäure durch tiergewebe. Biochem. Z., Berlin, 31: 478, 1911.
- 06 - BOCK, R.M. & ALBERTY, R.A. Studies of the enzyme fumarase. I. Kinetics and equilibrium. J. Am. chem. Soc., Easton, Pa, 75:1921-5, 1953.
- 07 - CLUTTERBUCK, P.W. Succinodehydrogenase and fumarase. - Biochem. J., Liverpool, 22: 1193-205, 1928.
- 08 - DAVYDOVA, S.I. Biokemia, Leningrad, 12: 135, 1947 Apud SCOTT, E.M. Estimation and purification of fumarase. Archs. Biochem., New York, 18: 131-5, 1948.
- 09 - DIXON, M. The effect of pH on the affinities of enzymes for substrates and inhibitors. Biochem. J., Liverpool, 55: 161-71, 1953a.

- 10 - DIXON, M. Monogram for ammonium sulphate solution. Biochem.J., Liverpool, 54: 457-8, 1953b.
- 11 - FASOLD, H.; GUNDLACH, G. & TURBA, F. Chromatography of proteins. In: HEFTMANN, E. ed. Chromatography, New York, Reinhold, 1964 cap 15, p. 378-423.
- 12 - FRIEDEN, C. & ALBERTY, R. A. The effect of pH on fumarase activity in acetate buffer. J. biol. Chem., Baltimore, 212: 859-68, 1955.
- 13 - \_\_\_\_\_; BOCK, R.M.; ALBERTY, R. A. Studies on the enzyme fumarase. II - Isolation and physical properties of crystalline enzyme. J. Am. chem. Soc., Easton, Pa, 76(2): 2482-4, 1954.
- 14 - \_\_\_\_\_; WOLFE, R.G.; ALBERTY, R. A. Studies on the enzyme fumarase. IV - The dependence of the kinetic constant at 25°C on buffer concentration, composition and pH. J. Am. chem. Soc., Easton, Pa, 79(7): 1523-5, 1957.
- 15 - GILES, C.H. Adsorption In: HEFTMANN, E., ed Chromatography, New York, Reinhold, 1964, cap. 4, p. 33-54.
- 16 - GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.S. & DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem., 177:751, 1949.
- 17 - HAGDAHL, L. Techniques of solid liquid adsorption chromatography In: HEFTMANN, E., ed Chromatography, New York, Reinhold, 1964, cap. 5 p. 56-91.
- 18 - ITZHAKI, R.F. & GILL, D.M. A micro-biuret method for estimating proteins. Anal. Biochem., 9:401-10, 1964.
- 19 - JACOBSON, K.P.; PEREIRA, F.B.; TAPADINHAS, J. Zur Kinetik der fumarase. Biochem Z., Berlin, 254: 112-137, 1932.

- 20 - JACOBSON, K.P. Zur thermodynamik des systems der fumarase. Biochem. Z., Berlin, 274: 167-80, 1934.
- 21 - KANAREK, L. & HILL, R.L. The preparation and characterization of fumarase from swine heart muscle. J. biol. Chem., Baltimore, 239: (12): 4202-6, 1964a.
- 22 - \_\_\_\_\_ et alii. The subunits of fumarase. J. biol. Chem., Baltimore, 239 (12): 4207-10, 1964b.
- 23 - LAKI, E. & LAKI K. Crystalline fumarase. Enzymologia, 9: 139, 1941.
- 24 - LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. chem. Soc., Easton, Pa. 56: 658-66, 1934.
- 25 - MANN, P.J.G. & WOOLF, B. The action of salts on fumarase. Biochem. J., Liverpool, 24: 427-34, 1930.
- 26 - MASSEY, V. The crystalization of fumarase. Biochem. J., Liverpool, 51: 490-4, 1952.
- 27 - \_\_\_\_\_ Studies on fumarase 2-The effects on inorganic anions on fumarase activity. Biochem. J., Liverpool, 53: 67-71, 1953a.
- 28 - \_\_\_\_\_ Studies on fumarase 3-The effect of temperature. Biochem. J., Liverpool, 55: 72-9, 1953b.
- 29 - \_\_\_\_\_ Studies on fumarase 4-The effects on inhibitors on fumarase activity. Biochem. J., Liverpool, 55: 172-7, 1953c.
- 30 - \_\_\_\_\_ Fumarase. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. Methods in Enzymology. New York, Academic Press, - 1969, V.1, p. 729-35.
- 31 - \_\_\_\_\_ & ALBERTY, R. A. Ionization constants of fumarase. Biochem. biophys. Acta, 13: 354-8, 1954.

- 32 - MICHAELIS, L. & DAVIDSOHN, H. Die wirkung der wassertoffionen auf das invertin. Biochem. Z., Berlin, 35: 386, 1911.
- 33 - \_\_\_\_\_ & MENTEN, M.L. Die Kinetik der invertinwirkung. Biochem. Z., Berlin, 49: 333, 1913.
- 34 - \_\_\_\_\_ & PECHSTEIN, H. Die wirkungsbedingungen der speicheldiastase. Biochem. Z., Berlin, 59: 77-99, 1914.
- 35 - RACKER, E. Spectrophotometric measurements of the enzymatic formation of fumaric and cis aconitic acids. - Biochem. biophys. Acta., 4:211-4, 1950.
- 36 - ROBINSON, G.W. et alii The thiol groups of fumarase J. Biol. Chem., Baltimore, 242(11): 2709-16, 1967.
- 37 - SCOTT, E.M. Estimation and purification of fumarase. - Archs. Biochem., New York, 18: 131-5, 1948a.
- 38 - SCOTT, E.M. & POWELL, R. Kinetics on the fumarase system. J. Am. chem. Soc., Easton, Pa, (1): 1104-7, 1948b.
- 39 - STRAUB, Z. Z. physiol. Chem., 236: 43, 1935 Apud SCOTT E.M. & POWELL, R. Kinetics on the fumarase system. J. Am. chem. Soc., Easton, Pa, 70 (1): 1104-7, 1948.
- 40 - TISELIUS, A. et alii Protein chromatography on calcium phosphate columns. Archs. Biochem. Biophys., New York, 65: 132-55, 1956.
- 41 - WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. Biochem. Z., 310: 384, 1941. Apud LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring protein. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. Methods in Enzymology. New York, Academic Press, 1957 vol III.