

QUIVO S. TAHIN

ESTUDOS SÔBRE A PROTEÓLISE PÉPTICA
DA OVALBUMINA

Campinas
-1968-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

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

1. Aos Profs. Drs. José Leal Prado de Carvalho e Antonio Cechelli de Mattos Paiva, desejo expressar meus agradecimentos pela oportunidade que me deram de começar minha carreira universitária nos laboratórios de Bioquímica e Biofísica da Escola Paulista de Medicina onde foram iniciados os trabalhos experimentais desta Tese. Ao Prof. Paiva, especialmente, pelos valiosos ensinamentos, desde o critério de limpeza de um tubo de ensaio até a redação de um trabalho científico, e pela dedicada orientação que tem me dado até hoje.
2. Agradeço, sinceramente, àqueles a quem devo direta ou indiretamente a realização deste trabalho: Morduhai Tahin, Sara S. Tahin, S. V., Djalma Augusto Gomes e Clara Pérola B. Tahin.
3. Agradeço à Dra. Therezinha Bandiera Paiva a autorização de publicar um gráfico de sua autoria.
4. Ao meu colega Maurício Gomes Lomba, agradeço as suas oportunas sugestões para a redação desta Tese.
5. À Srta. Maria do Carmo Biajoni, agradeço a sua dedicação na datilografia dos originais deste trabalho.

O autor

Í N D I C E

I. INTRODUÇÃO	1
1. A estrutura da pepsina	1
2. Especificidade	2
3. Efeito do pH sôbre a atividade péptica	4
4. Objetivos dêste trabalho	11
II. MATERIAIS E MÉTODOS	13
1. Pepsina	13
2. Ovalbumina nativa	13
3. Ovalbumina desnaturada	13
4. Reação enzimica	14
5. Determinação da Constante de Michaelis (K_m) e da velocidade máxima (V_{max}) da reação en- zimica	15
6. Determinação do efeito da temperatura sôbre a reação enzimica	15
7. Medições pH-métricas e espectrofotométricas	15
III. RESULTADOS	17
1. Efeito do pH sôbre a proteólise péptica da ovalbumina	17
2. Efeito da temperatura sôbre a proteólise péptica da ovalbumina	23
3. Efeito da temperatura sôbre a associação en- tre enzima e o substrato	31
IV. DISCUSSÃO	33
1. Efeito do pH sôbre a proteólise péptica da ovalbumina	33
2. Efeito da temperatura sôbre a proteólise péptica da ovalbumina	40
3. Formação do complexo pepsina-ovalbumina ...	41
4. Mecanismo da proteólise péptica da ovalbumi- na	44
V. RESUMO	47
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

I. INTRODUÇÃO

1. A estrutura da pepsina

A pepsina foi a primeira enzima proteolítica descrita (Schwann, 1936) e uma das primeiras obtidas em estado cristalino⁽¹⁾. Apesar disso o estudo de sua estrutura e mecanismo de ação está bastante atrasado em relação ao de outras enzimas, e apenas recentemente alguns grupos de pesquisadores voltaram a dar-lhe maior atenção.

A composição da pepsina em aminoácidos⁽²⁾ caracteriza-se pela presença de grande número de resíduos de aminoácidos dicarboxílicos e raros básicos: os resíduos de ácidos aspártico e glutâmico constituem cerca de 20%, enquanto que os resíduos de arginina, lisina e histidina representam apenas 1,4% do número total de resíduos. A pepsina também se caracteriza por possuir uma grande proporção de aminoácidos com cadeias laterais apolares⁽³⁾. A sua molécula se constitui de uma cadeia simples de 321 resíduos de aminoácidos⁽²⁾ com três pontes dissulfeto intramoleculares devidas às três cistinas presentes^(3,4).

O alto número de resíduos de ácidos aspártico e glutâmico, bem como a presença de um radical fosfato esterificado em um dos resíduos de serina⁽⁵⁾, conferem à pepsina um caráter bastante ácido. O seu ponto isoeletrico é abaixo de 1,08⁽⁶⁾ e o da pepsina desfosforilada é em pH 1,7⁽⁷⁾.

Com respeito à conformação da molécula da pepsina em solução aquosa é interessante notar a sua grande resistência a alguns dos agentes desnaturantes comuns como uréia, guanidina, tiouréia e meio ácido⁽⁸⁻¹⁴⁾. Isto indica que deve ser pequena a contribuição de estrutura do tipo alfa-hélice para a conformação da pepsina^(3,14). Pelo emprego de métodos espectrofotométricos foram evidenciadas pontes de hidrogênio intramole-

culares entre cadeias laterais de aminoácidos dicarboxílicos e da tirosina^(10,11,15). Esse tipo de interação, todavia, deve contribuir muito pouco para a manutenção da estabilidade da molécula da pepsina⁽³⁾. Por outro lado, o estudo da atividade ótica e da dispersão ótica rotatória da enzima indica que sua molécula deve apresentar, em solução aquosa, uma conformação não casual, mas favorecida e específica, mantida muito provavelmente por interações do tipo hidrofóbico⁽³⁾.

O pepsinogênio, precursor inativo da pepsina, é também uma proteína de cadeia simples de aminoácidos⁽¹⁶⁾ com três pontes dissulfeto, uma fosfoserina e a extremidade C-terminal idêntica à da pepsina. Entretanto o zimogênio possui na sua porção N-terminal 42 resíduos de aminoácidos a mais do que a pepsina⁽²⁾. A hidrólise parcial do pepsinogênio, catalisada pelo íon hidrogênio e pela própria pepsina, libera um polipeptídeo da extremidade N-terminal e a proteína cataliticamente ativa^(14,17,18). O polipeptídeo liberado possui 9 das 10 lisinas, 2 das 3 histidinas e 2 das 4 argininas da molécula do zimogênio⁽²⁾. Tal concentração de resíduos de aminoácidos básicos nesse polipeptídeo levou Herriot⁽¹⁴⁾ a propor a hipótese de que o polipeptídeo básico encobriria a região do centro ativo da enzima que seria rica em resíduos de aminoácidos ácidos através de interações de tipo eletrostático. Entretanto, como a ativação do pepsinogênio é acompanhada de uma considerável mudança na conformação da proteína⁽³⁾, é muito provável que seja essa mudança a alteração responsável pela ativação do zimogênio, e não apenas um "desmascaramento" do centro ativo antes "encoberto" pela porção N-terminal do pepsinogênio.

2. Especificidade

A pepsina catalisa a hidrólise de várias proteínas como a ovalbumina⁽¹⁹⁾, a caseína⁽²⁰⁾, a hemoglobina⁽²¹⁾, a albumina do sêro bovino^(21,22), a insulina^(23,24), a elastina⁽²⁵⁾ o fibrinogênio⁽²⁶⁾, e outras. Não hidrolisa, entretanto, proteínas do tipo da protamina⁽²⁷⁾, rica em aminoácidos básicos.

A enzima também possui atividade peptidásica, catalisando a hidrólise de vários peptídeos sintéticos como o benziloxycarbonil-L-glutamil-L-tirosina⁽²⁸⁾, o benziloxycarbonil-L-glutamil-L-fenilalanina⁽²⁹⁾, o N-acetil-L-fenilalanil-L-fenilalanina⁽³⁰⁾, o N-acetil-L-tirosil-L-tirosina⁽³¹⁾, o N-acetil-L-fenilalanil-L-tirosina⁽³²⁾, o N-acetil-L-fenilalanil-L-3,5- dibromotirosina⁽³³⁾, o éster metílico do ácido glicil-glicil-L-fenilalanil-L-fenilalanina⁽³⁴⁾, e outros. Além das atividades proteolítica e peptidásica a pepsina é ainda capaz de hidrolisar ésteres sintéticos como o éster metílico do ácido benziloxycarbonil-L-histidil-para-nitro-L-fenilalanil-beta-fenil-L-lático⁽³⁵⁾.

Analisando-se os trabalhos sobre a especificidade da pepsina sobre proteínas^(23,24,36) e sobre peptídeos sintéticos^(28-34,37) pode-se tabular as ligações peptídicas mais susceptíveis à hidrólise catalisada pela pepsina (Tabs. I e II).

TABELA I

Ligações peptídicas susceptíveis à hidrólise péptica

As mais susceptíveis	As menos susceptíveis
Leu.Tir, Leu.Glu, Glu.Asp ⁽²⁴⁾	Glu.Glu, Glu.Leu, Tir.Glu ⁽²⁴⁾
Leu.Val, Tir.Leu, Fen.Tir ⁽²³⁾	Fen.Val, Glu.Lis, Glu.Ala ⁽²³⁾
Fen.Fen ^(23,24,37)	Leu.Tir, Gli.Fen ⁽²³⁾
	Glu.Tir, Glu.Fen ⁽²⁹⁾
	Tir.Tir ⁽³¹⁾

De modo geral pode-se observar que pelo menos um dos resíduos de aminoácidos das ligações peptídicas mais susceptíveis possui cadeia lateral apolar (Tabs. I e II). A feni-

TABELA II

Aminoácidos das ligações
peptídicas mais susceptíveis

$\begin{array}{cccc} \dots & \text{HC} & - & \text{C} & - & \text{N} & - & \text{CH} & \dots \\ & & & & & & & & \\ & \text{R} & & \text{O} & & \text{H} & & \text{R}' & \end{array}$			
* (+++)	Fen		Tir (+++)
(+++)	Leu		Glu (++)
(++)	Glu		Fen (++)
(+)	Tir		Val (++)
(+)	Gli		Leu (++)
			Asp (+)
			Lis (+)
			Ala (+)

* (+++) muito frequente, (++) frequente, (+) pouco frequente, (+) muito pouco frequente.

co resíduos para cada lado da ligação peptídica susceptível⁽³⁶⁾.

lalanina^(36,37) e a leucina⁽³⁶⁾ são os aminoácidos que mais contribuem com a carboxila para a formação da ligação peptídica susceptível, enquanto que são vários os aminoácidos que contribuem comumente com o radical amina. Há exemplos, todavia, de ligações peptídicas susceptíveis à hidrólise péptica e que não possuem nenhum dos resíduos com cadeia lateral apolar. Entretanto, no caso de substratos protéicos, é interessante notar que há uma significativa ocorrência de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas na região que compreende cinco

3. Efeito do pH sobre a atividade péptica

A pepsina se caracteriza por agir ôtimamente em pH baixo, tanto sobre substratos protéicos nativos ou desnaturados, como sobre peptídeos sintéticos. No caso de substratos protéicos, o pH ótimo da proteólise péptica varia conforme a proteína atacada, e mesmo alterações químicas ou da conformação do substrato podem causar mudanças do pH ótimo (Tab. III). O pH ótimo da hidrólise péptica de peptídeos sintéticos varia de 2 a 4,5 de acôrdo com a estrutura do substrato (Tab. IV). O pH ótimo da hidrólise do éster sintético, descrita por Inouye e Fruton⁽³⁵⁾, é igual a 4,0.

Desde os primeiros trabalhos sobre a pepsina várias hipóteses foram propostas para explicar a necessidade do baixo pH para a melhor ação enzimica. Uma das hipóteses de

TABELA III

pH ótimo da atividade péptica sobre várias proteínas

Substrato	pH ótimo	Referência
albumina do sêro bovino nativa	1,7	(21)
idem, desnaturada por álcali	1,8	(21)
idem, desnaturada por ácido	1,7 a 3,2	(21)
idem, desnaturada por calor	2,0 a 2,8	(38)
idem, desaminada	1,5	(38)
ovalbumina, nativa	0,7 a 0,9	(39,40)
idem, desnaturada por ácido ou calor	1,5 a 1,7	(39,40)
hemoglobina, nativa	1,5 a 2,0	(21,39)
idem, desnaturada	2,0 a 2,5	(21)
beta-lactoglobulina	1,5 a 2,0	(39)
caseína	1,5 a 2,5	(39)
fibrinogênio	2,9	(26)
edestina	3,1	(26)

TABELA IV

pH ótimo da atividade péptica sobre vários peptídeos sintéticos

Substrato	pH ótimo	Referências
*CBZ-Glu.Tir	4.0	(28)
CBZ-Glu.Fen	4.3	(29)
Ac-Fen.Fen	2.0	(30,31)
Ac-Tir.Tir	2.0	(30,31)
CBZ-Tir.Fen	2.0	(30)
Ac-Fen.Tir	2.0	(32)
CBZ-His.Fen.Fen	3.0	(34)
CBZ-His.Fen.Fen-O-Et	4.5	(34)
CBZ-His.Fen.Tri-O-Et	4.0	(34)

*CBZ = benziloxycarbonil-; Ac = acetil-

grande receptividade foi a de Northrop⁽⁴¹⁻⁴⁶⁾ que propôs a atração eletrostática entre a pepsina, que se comportaria como um ânion, e o substrato, que se comportaria como cátion, em pH baixo. De fato, Tiselius e cols.⁽⁶⁾ demonstraram que o ponto isoeletrico da pepsina deve ser menor do que 1,08, pois neste pH e acima dele a enzima migra no campo elétrico como um ânion. Por outro lado, a maioria das proteínas que são substratos da pepsina apresentam ponto isoeletrico acima de 4,0. Portanto, nas regiões de pH em que se dá a atividade péptica, os substratos protéicos teriam predominantemente cargas positivas.

Existem, não obstante, algumas evidências experimentais que contrariam a hipótese da atração eletrostática entre a enzima e o substrato. A desfosforilação da pepsina produz um aumento do seu ponto isoeletrico para 1,7⁽⁵⁾ sem provocar alterações da sua atividade sobre a hemoglobina ou sobre o N-acetil-fenilalanil-L-dilodotirosina⁽⁷⁾, e sem modificar o pH ótimo da sua ação sobre a ovalbumina⁽⁴⁷⁾, apesar das cargas eletrostáticas globais da pepsina intacta e da desfosforilada serem diferentes. A hipótese de Northrop também não pode ser apoiada pelas verificações de que há hidrólise péptica de peptídeos sintéticos que não possuem grupos carregados positivamente⁽²⁸⁻³⁴⁾.

Uma outra hipótese para justificar o baixo pH em que se observa a atividade péptica é a de que a pepsina agiria preferencialmente sobre substratos desnaturados e que o passo limitante da proteólise seria uma mudança da conformação do substrato favorecida pelo pH ácido^(39,48). Essa hipótese é análoga à anteriormente proposta para o caso da atividade proteolítica da tripsina⁽⁴⁹⁻⁵²⁾, a qual realmente age melhor sobre substratos desnaturados do que sobre substratos nativos⁽³⁸⁾.

No caso da pepsina há várias evidências experimentais que favoreceriam essa hipótese. Os valores de pH ótimo verificados para a atividade da pepsina sobre proteínas desnaturadas e sobre peptídeos sintéticos são mais altos do que os verificados sobre proteínas nativas (Tabs. III e IV). O ácido

caprílico e outros ácidos graxos, que inibem a desnaturação de proteínas^(53,54) também inibem a proteólise da albumina do sôro bovino^(55,56). A beta-lactoglobulina é pouco susceptível à desnaturação por ácido e à proteólise péptica^(39,48). Schlamowitz e Peterson⁽²¹⁾ verificaram que os valores de pH ótimo da proteólise péptica da albumina do sôro bovino e da hemoglobina "nativas" são cerca de 2 unidades mais baixos do que os observados para os mesmos substratos desnaturados por uréia, uréia mais álcali ou uréia mais ácido. Esses autores acharam, assim, que o pH ótimo da ação da pepsina sobre a proteína prévia e tão talmente desnaturada seria bem maior do que sobre a proteína nativa. Entretanto o estudo da ação da pepsina sobre os substratos desnaturados acima mencionados foi feito na presença de uréia durante a proteólise. Assim, o grande aumento do pH ótimo por eles observado poderia ser devido à presença de uréia durante as reações enzimicas e não à desnaturação do substrato protéico. Para examinar esta possibilidade Tahin e Paiva⁽⁴⁰⁾ estudaram o efeito da uréia sobre a proteólise péptica da ovalbumina, que é um substrato facilmente obtido no estado cristalino e cuja desnaturação é irreversível (de acôrdo com o critério da insolubilidade da proteína desnaturada no ponto isoelétrico). Esses autores verificaram que a uréia provoca um aumento do pH ótimo da atividade péptica sobre a ovalbumina nativa ou previamente desnaturada por calor, ácido ou pela própria uréia (Figs. 1 e 2). No caso da ovalbumina desnaturada por uréia, a remoção do agente desnaturante por diálise ou por diluição antes da reação enzimica mostrou que o grande aumento do pH ótimo só é observado em presença da uréia (Tab. V). O aumento do pH ótimo mostrou uma dependência linear em função da concentração da uréia presente durante a reação enzimica (Fig.3).

Acreditamos, portanto, que o aumento do pH ótimo das reações enzimicas observadas por Schlamowitz e Peterson tenha sido causado pela presença da uréia durante as reações e não devido a uma extensa e completa desnaturação do substrato protéico como pretendiam aqueles autores.

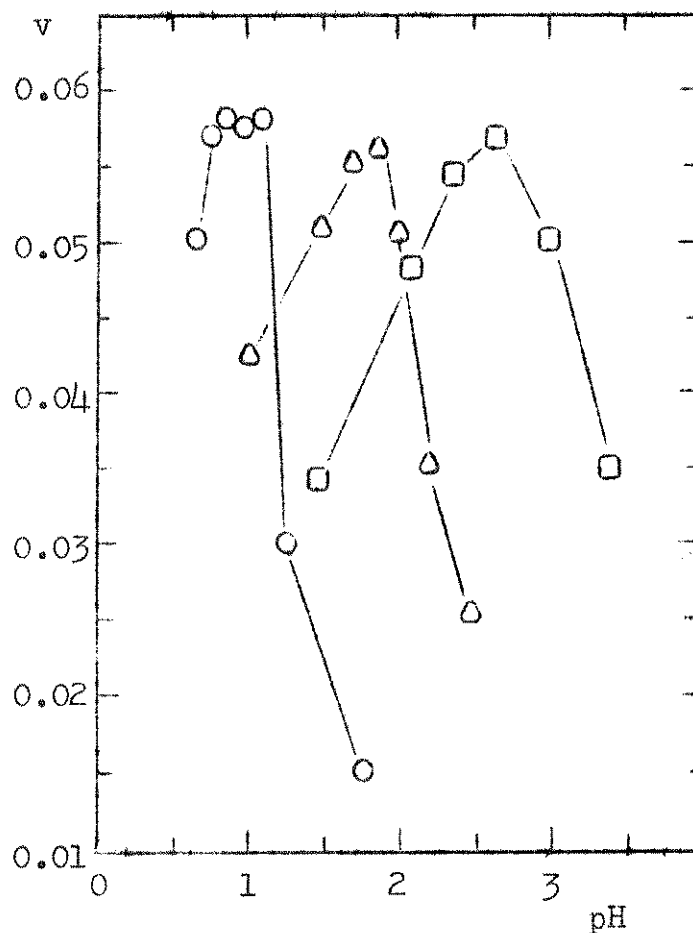


Fig. 1 - Efeito do pH sobre a proteólise péptica da ovalbumina nativa e desnaturada na presença ou ausência de uréia 5 M. (cf. Ref. 40)

O, ovalbumina nativa; Δ, ovalbumina desnaturada por ácido; □, ovalbumina desnaturada por ácido, mas a reação enzimica foi realizada na presença de uréia 5 M; v, velocidade inicial da reação.

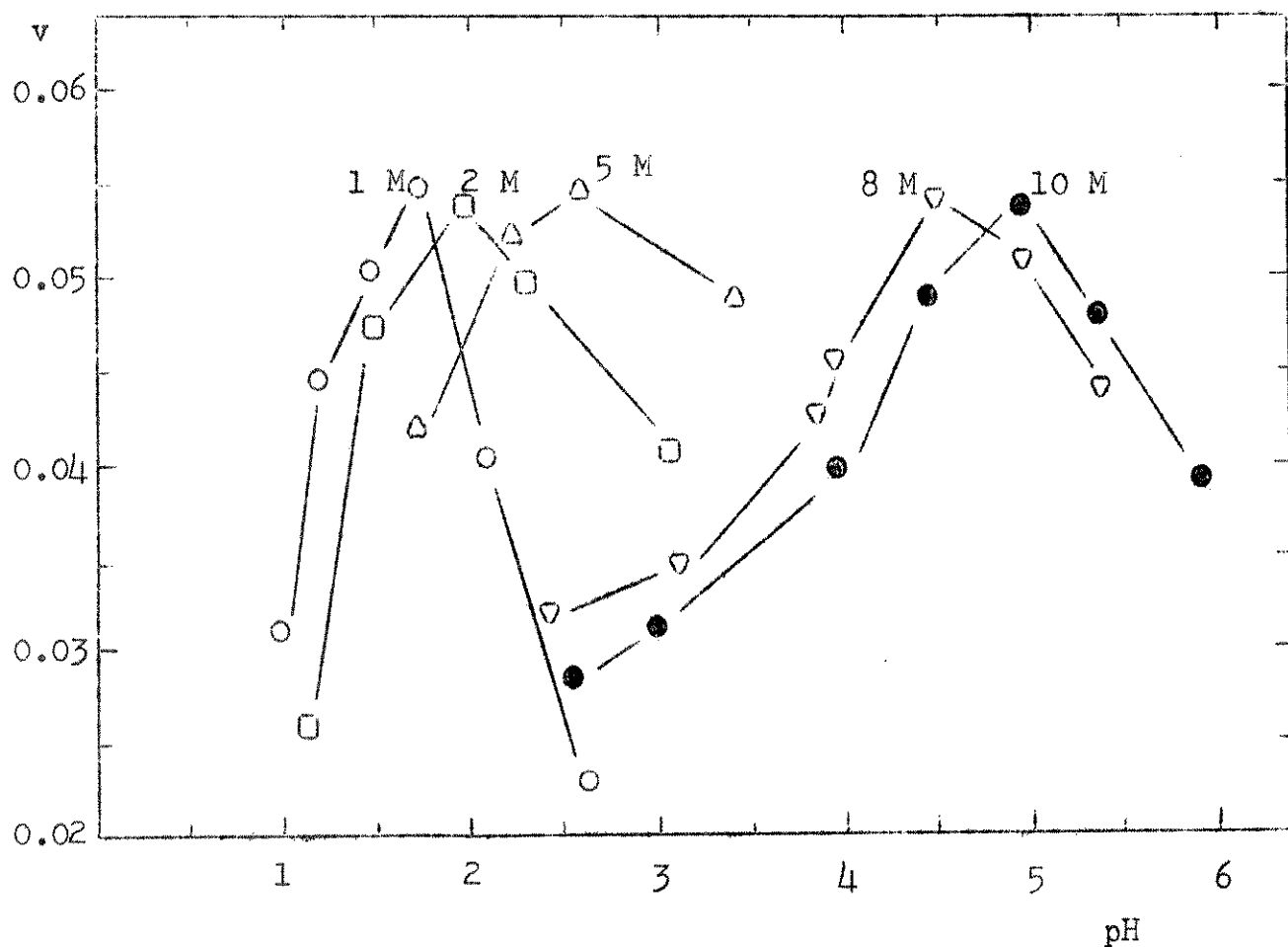


Fig. 2 - Efeito da presença da uréia sôbre a dependência do pH da proteólise péptica da ovalbumina prèviamente desnaturada por uréia (cf. Ref. 40). A molaridade da uréia presente em cada reação está indicada no gráfico; v, velocidade inicial da reação.

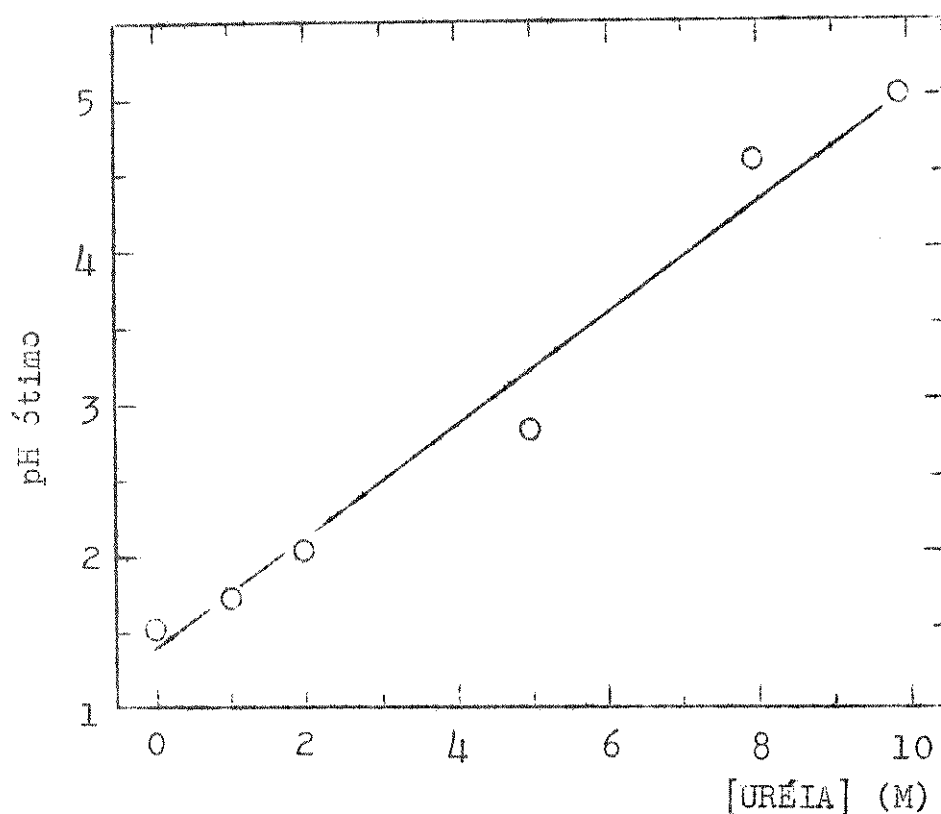


Fig. 3 - Efeito da molaridade da uréia presente na reação enzimica sobre o pH ótimo da proteólise péptica da ovalbumina previamente desnaturada por uréia (cf. Ref. 40)

TABELA V

Efeito da uréia sôbre a proteólise péptica da ovalbumina
(cf. Ref. 40)

Substrato	Uréia presente na reação enzimica	pH ótimo
nativo	0	0,7 a 0,9
desnaturado por ácido	0	1,6
idem, por calor	0	1,6
idem, por uréia 4,72 M	0*	1,6
idem, por uréia 4,72 M	0,62 M**	1,8
idem, por uréia 4,72 M	4,72 M	2,5
idem, por ácido	5,0 M	2,6
idem, por calor	5,0	2,6

* Após desnaturação a uréia foi afastada por diálise.

** A concentração de uréia foi conseguida por diluição da ovalbumina após a sua desnaturação por uréia 4,72 M.

4. Objetivos dêste trabalho

As observações acima discutidas mostram que os valores do pH ótimo da ação da pepsina sôbre proteínas desnaturadas são realmente mais altos (geralmente de 0,5 a 1,5 unidades) do que para as mesmas proteínas no estado nativo. Contudo êste fato não é suficiente justificativa para a hipótese de que a desnaturação do substrato protéico seja o passo limitante da ação enzimica, mesmo porque não há, aparentemente, diferença entre substratos nativos ou desnaturados quanto à sua susceptibilidade à proteólise péptica (ver Fig. 1 e Ref. 38).

Com a finalidade de adquirir melhor compreensão da importância do pH para a atividade proteolítica da pepsina estudamos o efeito do pH sôbre a constante de Michaelis e sôbre a velocidade máxima da proteólise péptica da ovalbumina nativa e da ovalbumina previamente desnaturada por ácido. Procuramos

também obter dados relativos ao efeito da temperatura sobre a cinética da proteólise péptica da ovalbumina nativa e da desnaturada por ácido. A partir desses dados determinamos a energia de ativação da reação enzimica, tanto em função da velocidade inicial como da velocidade máxima, e os valores da energia livre, entalpia e entropia da associação entre a pepsina e a ovalbumina nativa ou desnaturada. Baseando-nos nas evidências experimentais obtidas, procuramos estudar o tipo de associação existente entre a pepsina e a ovalbumina, a importância do pH para a cinética da reação enzimica e analisar as hipóteses que melhor descreveriam o mecanismo da proteólise péptica da ovalbumina.

II - MATERIAIS E MÉTODOS

1. Pepsina - A enzima usada foi uma preparação duas vezes cristalizada, obtida da "Nutritional Biochemicals Corporation". As soluções aquosas de pepsina $2,8 \times 10^{-4}$ M foram sempre preparadas minutos antes de cada reação enzimica. Em tôdas reações descritas neste trabalho a concentração final da pepsina foi de $2,8 \times 10^{-5}$ M.

2. Ovalbumina nativa - A ovalbumina usada foi preparada e recristalizada duas vezes segundo o método descrito por Keckwick e Cannan⁽⁵⁷⁾. Antes do seu uso como substrato da pepsina a ovalbumina era dialisada por 24 horas contra água destilada. A concentração da proteína dialisada foi determinada espectofotometricamente em 280 nm. O valor usado para a absortividade molar (para 1 cm de espessura de solução) foi de $2,85 \times 10^4$ ⁽⁵⁸⁾, e o peso molecular adotado foi de 45.000⁽⁵⁹⁾.

3. Ovalbumina desnaturada - A proteína nativa foi desnaturada por permanência em pH 1,2 durante 4 horas à temperatura ambiente. Como a proteína desnaturada é insolúvel no seu ponto isoeletrico⁽⁶⁰⁾, a velocidade ou a porcentagem de desnaturação foi determinada diluindo-se alíquotas da solução de ovalbumina em volume 40 vezes maior de tampão acetato 2 M, pH 4,75 (contendo sulfato de magnésio 0,5 M). Após a filtração em papel Whatman nº 1 ou centrifugação a concentração da proteína solúvel (nativa) era determinada pela absorbância do filtrado ou sobrenadante em 280 nm. Considerávamos a ovalbumina como desnaturada quando mais de 98% da proteína presente era insolúvel em pH 4,75.

Para a determinação da energia de ativação da desnaturação ácida da ovalbumina, estudamos a variação da concen-

tração da proteína solúvel em pH 4,75 em função do tempo, em diferentes temperaturas. Em todos os casos estudados o logaritmo da concentração da ovalbumina nativa variou linearmente com o tempo, e a constante de velocidade do processo de primeira ordem foi calculada a partir do coeficiente angular da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados. A energia de ativação foi obtida do coeficiente angular da reta (obtida pelo método dos quadrados mínimos) que expressava a dependência entre o logaritmo da constante de velocidade da desnaturação da ovalbumina em função da recíproca da temperatura absoluta (equação de Arrhenius).

4. Reação enzimica - O pH e as concentrações das soluções da enzima e do substrato, em cada reação, foram ajustados pela adição de quantidades determinadas de ácido clorídrico, hidróxido de sódio ou água. As soluções da enzima e do substrato eram mantidas num banho à temperatura desejada ($\pm 0,05^{\circ}\text{C}$) até obter o equilíbrio térmico, após o que a reação era iniciada pela mistura das duas soluções. Quando o substrato era a ovalbumina nativa e o pH da reação devia ser próximo ou abaixo de 1,0 misturava-se a solução de enzima com a do substrato em pH 4,5 e iniciava-se a reação pela adição de volume previamente determinado de solução de ácido clorídrico para se obter o pH desejado. O pH de cada reação estudada foi determinado pela medição eletrométrica de uma mistura de reação enzimica replicada especialmente para êsse fim. As reações feitas em pH 3,0 e 4,5 foram realizadas na presença de solução tampão de citrato 0,2 M. Nenhuma mudança significativa do pH da mistura de reação foi observada durante o período das reações estudadas.

Tôdas as reações estudadas foram interrompidas pela adição de igual volume de ácido tricloroacético 1,22 M. Logo em seguida colocava-se cada mistura, por um minuto, em banho com água fervente para melhor precipitação da proteína não digerida. Deixava-se resfriar naturalmente até a temperatura ambiente e filtrava-se. Após a filtração em papel Whatman nº 1, determinava-se, em 275nm, a absorbância do filtrado, ou seja, dos

produtos da proteólise solúveis em ácido tricloroacético 0,61 M. Para cada reação enzimática foi feita uma mistura idêntica, porém com adição da solução de enzima após a do ácido tricloroacético; a leitura da absorbância do filtrado (obtido análogamente como o descrito acima) em 275 nm era tomada como a absorbância do tempo zero da reação. A velocidade inicial foi avaliada pelo incremento da absorbância por minuto, determinado na porção linear inicial da curva do tempo da reação, e foi expressa por ($\Delta A/\text{min}$).

5. Determinação da constante de Michaelis (K_m) e da velocidade máxima (V_{max}) da reação enzimática - O efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da proteólise péptica da ovalbumina nativa ou desnaturada foi analisado segundo a teoria de Michaelis e Menten⁽⁶¹⁾, pelo método de Lineweaver e Burk⁽⁶²⁾. Os valores de K_m e V_{max} foram determinados a partir das constantes da equação da reta ajustada, pelo método dos mínimos quadrados, à dependência entre as recíprocas da velocidade inicial e da concentração do substrato.

6. Determinação do efeito da temperatura sobre a reação enzimática - Determinamos a velocidade inicial, a velocidade máxima e a constante de Michaelis da reação em diferentes temperaturas. A energia de ativação foi calculada a partir do coeficiente angular da reta, obtida pelo método dos mínimos quadrados, que expressava a dependência entre o logaritmo da velocidade inicial ou da velocidade máxima em função da recíproca da temperatura absoluta (equação de Arrhenius). Análogamente, calculamos a entalpia normal da formação do complexo enzima-substrato a partir do coeficiente angular da reta, obtida pelo método dos mínimos quadrados, que expressava a dependência entre o logaritmo da constante de associação entre a pepsina e a ovalbumina e a recíproca da temperatura absoluta.

7. Medições pH-métricas e espectrofotométricas - As medições de pH foram efetuadas num pH-metro Beckman modelo G, com pre-

cisão para 0,01 unidade de pH. O aparelho era padronizado com a solução tampão de biftalato de potássio 0,05 M pH 4,00 (à 25°C). As determinações espectrofotométricas foram efetuadas no espectrofotômetro Beckman modelo DU, usando-se cubas de sílica com 10 mm de espessura.

III - R E S U L T A D O S

1. Efeito do pH sobre a proteólise péptica da ovalbumina

Com a finalidade de investigar a influência do pH sobre a associação entre a enzima e o substrato e sobre a decomposição do complexo enzima-substrato, estudamos o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da proteólise péptica da ovalbumina nativa e da ovalbumina desnaturada em diferentes pH (Fig. 4). A dependência da velocidade máxima e da constante de Michaelis em função do pH, observadas nas Figuras 5 e 6, está indicada nas Tabelas VI e VII e na Figura 7.

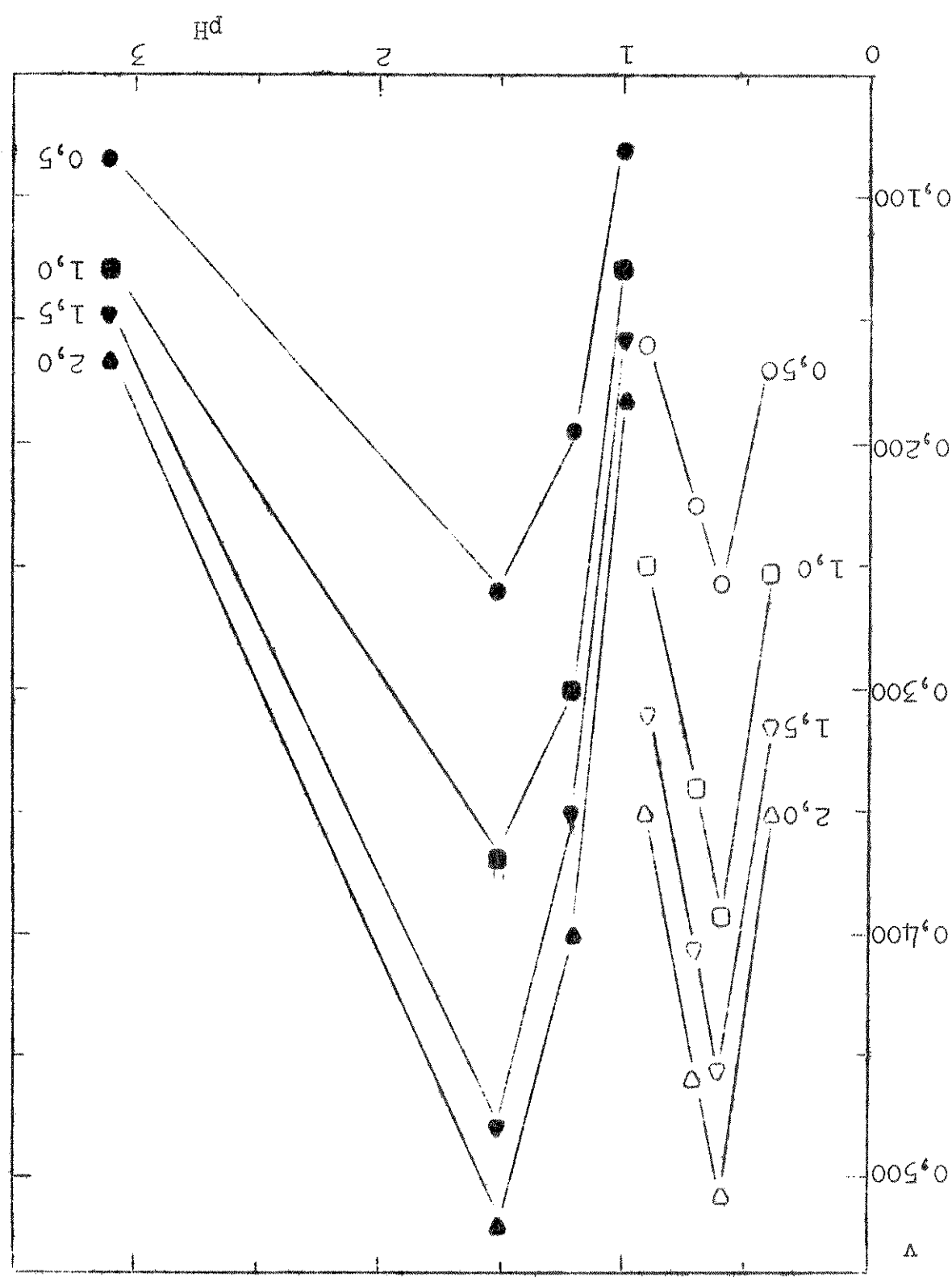
TABELA VI

Efeito do pH sobre a constante de Michaelis (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) da proteólise péptica da ovalbumina nativa

pH	$K_m \times 10^4$ (M)	V_{max} ($\Delta A/min$)
0,40	1,09 ($\pm 0,04$)*	0,538 ($\pm 0,008$)*
0,60	0,90 ($\pm 0,01$)	0,743 ($\pm 0,003$)
0,70	1,08 ($\pm 0,02$)	0,708 ($\pm 0,006$)
0,90	1,00 ($\pm 0,09$)	0,505 ($\pm 0,006$)
2,65	1,21 ($\pm 0,29$)	0,011 ($\pm 0,0005$)
3,00	0,95 ($\pm 0,26$)	0,0048 ($\pm 0,0002$)
4,50	0,90 ($\pm 0,19$)	0,0003 ($\pm 0,00003$)

* O número entre parêntesis indica o desvio padrão, obtido do erro padrão da estimativa do intercepto ou do coeficiente angular de cada reta (Fig. 5).

Fig. 4 - Efeito do pH sobre a velocidade inicial da proteólise peptica da ovalbumina. O, □, △, ▽, ovalbumina nativa; ●, ■, ▲, ▼, ovalbumina desnaturada. A concentração molar ($\times 10^4$) está indicada junto a cada curva. V, velocidade inicial ($\Delta A/\text{min}$).



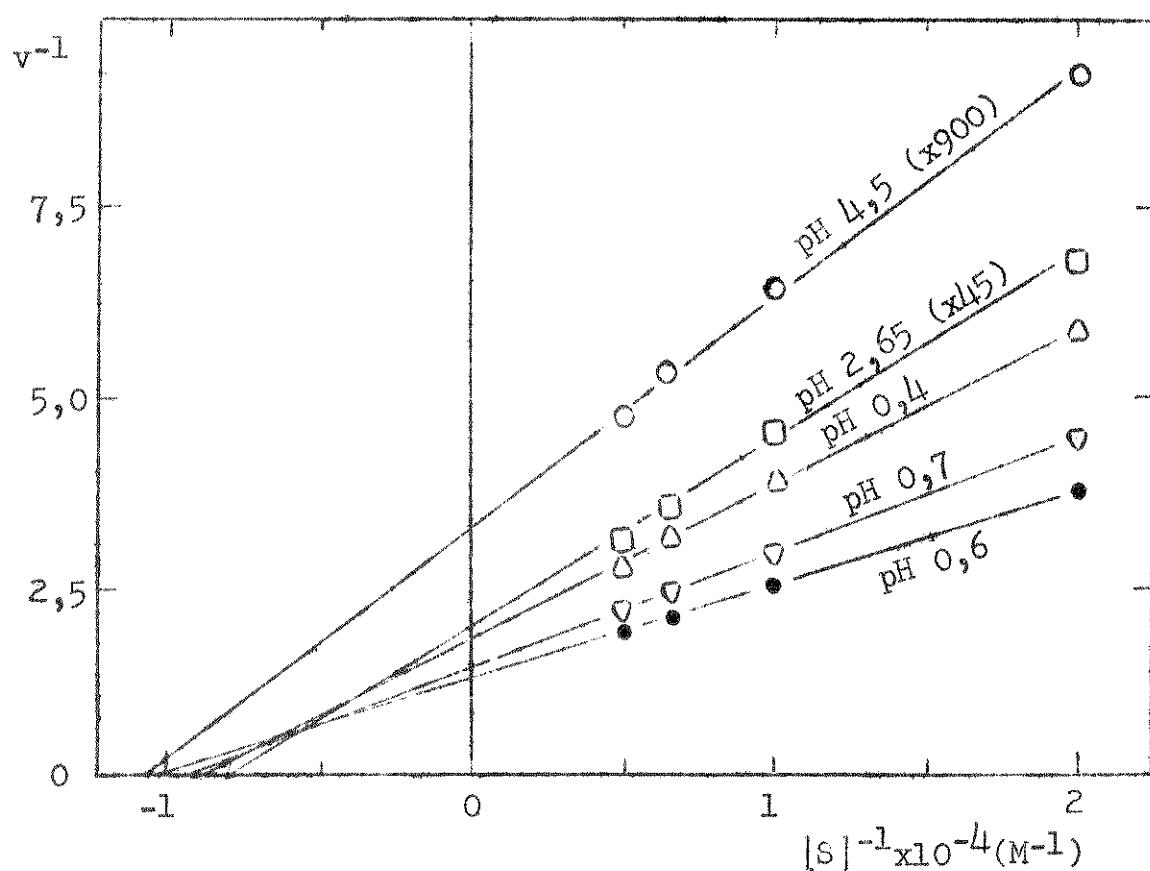


Fig. 5 - Efeito da concentração da ovalbumina nativa sobre a velocidade da proteólise péptica em vários pH. Variação da recíproca da velocidade inicial (expressa pelo incremento da absorbância por minuto) em função da recíproca da concentração do substrato, a qual foi de 5×10^{-5} a 2×10^{-4} M. Temperatura = 28°C.

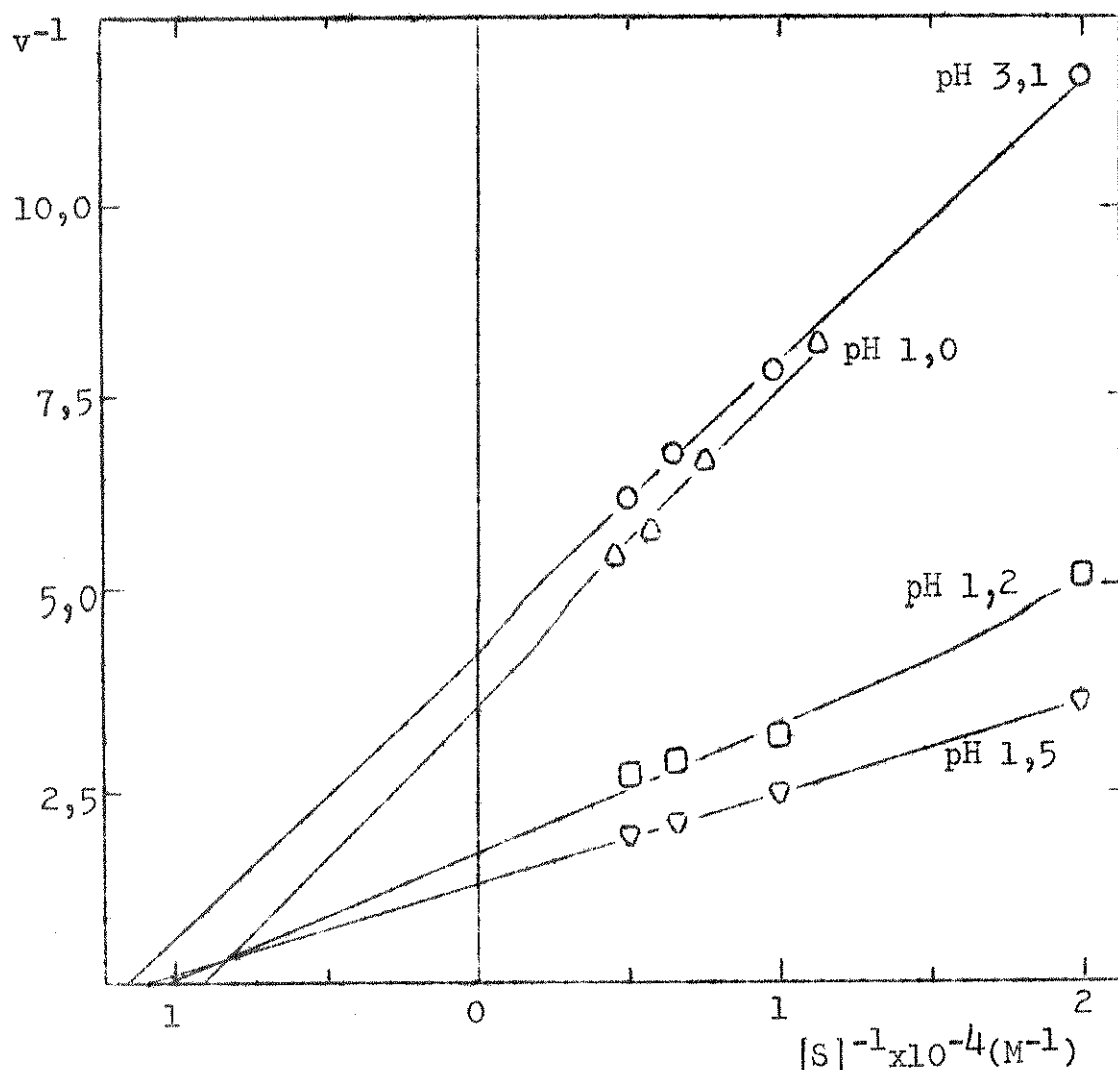


Fig. 6 - Efeito da concentração da ovalbumina desnaturada sôbre a velocidade da proteólise péptica em vários pH. Variação da recíproca da velocidade inicial em função da recíproca da concentração do substrato, a qual variou de 5×10^{-5} a 2×10^{-4} M. Temperatura = 28°C .

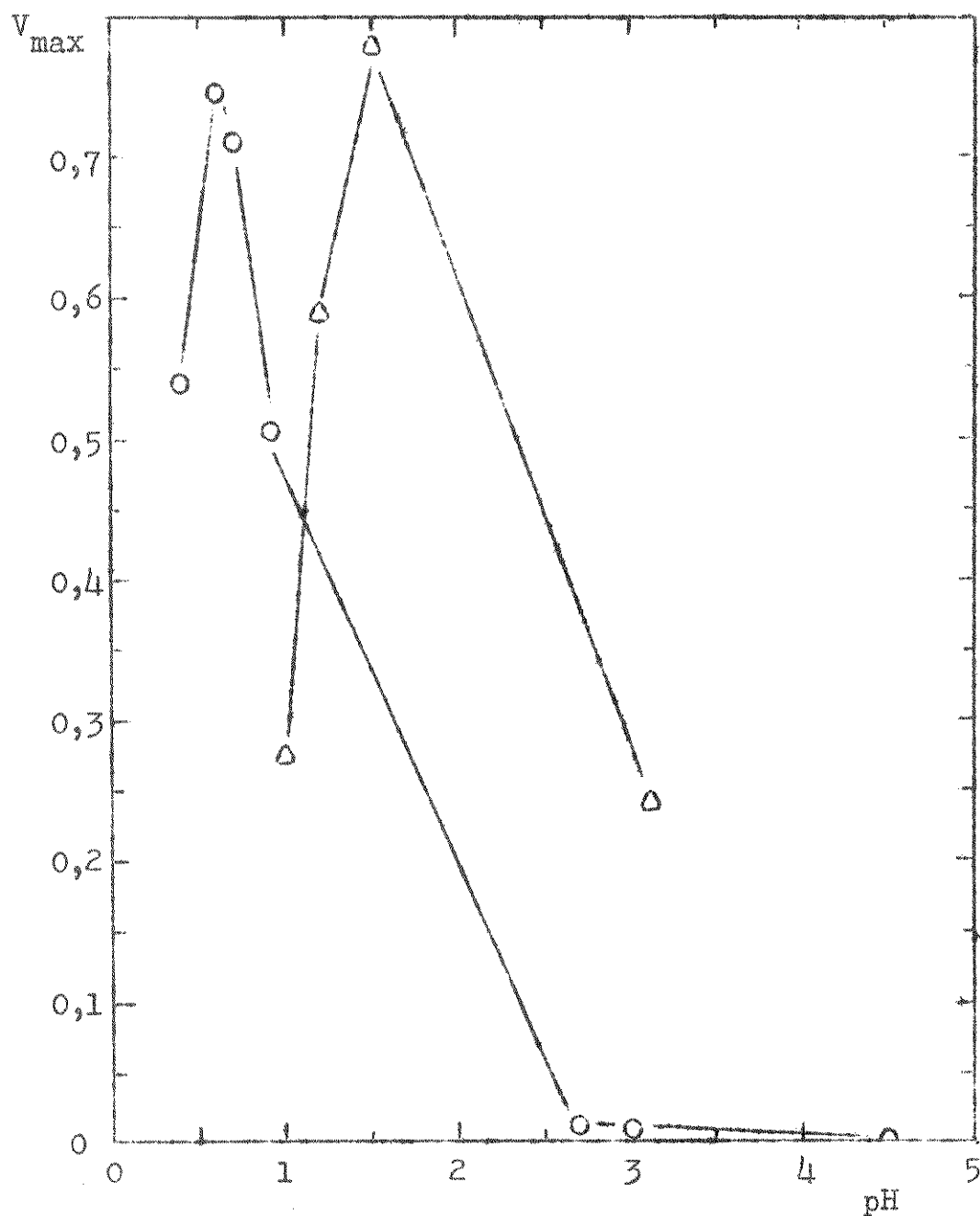


Fig. 7 - Dependência da velocidade máxima da proteólise péptica da ovalbumina em função do pH. (cf. Tabelas VI e VII); O, ovalbumina nativa; Δ, ovalbumina desnaturada. Temperatura = 28°C.

TABELA VII

Efeito do pH sôbre a constante de Michaelis e a velocidade máxima da proteólise péptica da ovalbumina desnaturada

pH	$K_m \cdot 10^4$ (M)	V_{max} ($\Delta A/min$)
1,00	1,10 ($\pm 0,22$)*	0,275 ($\pm 0,007$)*
1,20	1,00 ($\pm 0,12$)	0,588 ($\pm 0,026$)
1,50	0,95 ($\pm 0,08$)	0,775 ($\pm 0,033$)
3,10	1,13 ($\pm 0,21$)	0,238 ($\pm 0,008$)

* O número entre parentesis indica o desvio padrão, obtido do erro padrão da estimativa do intercepto ou do coeficiente angular de cada reta. (Fig. 6).

Os valores da constante de Michaelis em função do pH, tanto da proteólise péptica da ovalbumina nativa como da desnaturada, não diferiram significativamente do valor médio de $K_m = 1,02(\pm 0,11) \times 10^{-4}$ M para o substrato nativo e de $K_m = 1,03(\pm 0,07) \times 10^{-4}$ M para o substrato desnaturado. A velocidade máxima, todavia, variou muito em função do pH, principalmente no caso da ovalbumina nativa. Esta observação sugere que a constante de Michaelis deva ser aproximadamente igual à constante de dissociação (K_s) do complexo enzima-substrato. Com efeito, na reação da enzima(E) com o substrato (S) para a formação do complexo (ES),



a constante de Michaelis é relacionada com as três constantes de velocidade pela expressão:

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

e, para uma determinada concentração da enzima a velocidade máxima depende apenas da constante k_3 ($V_{\max} = k_3[E]_{\text{total}}$). O fato de K_m se mostrar praticamente inalterada enquanto k_3 foi consideravelmente afetada pelo pH, indicaria que k_2 deva ser muito maior que k_3 e portanto,

$$K_m \approx \frac{k_2}{k_1} = K_s$$

2. Efeito da temperatura sobre a proteólise péptica da ovalbumina

O efeito da temperatura sobre a ação da pepsina sobre a ovalbumina nativa e a desnaturada foi estudado com a finalidade de se obter dados sobre a validade da hipótese de que a desnaturação seja o passo limitante da proteólise péptica. As figuras 8 e 9 mostram o efeito da temperatura sobre a velocidade inicial da reação enzimática. A influência da temperatura sobre a velocidade máxima da proteólise foi estudada pelo efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação enzimática em várias temperaturas (Figuras 10 a 12 e Tabela VIII).

TABELA VIII

Variação da velocidade máxima da proteólise péptica da ovalbumina em função da temperatura

Ovalbumina nativa		Ovalbumina desnaturada	
Temperatura	$V_{\max}$ (Δ A/min)	Temperatura	$V_{\max}$ (Δ A/min)
20,0	0,340 ($\pm$ 0,026)*	19,0	0,173 ($\pm$ 0,007)*
25,0	0,530 ($\pm$ 0,035)	29,0	0,416 ($\pm$ 0,018)
30,0	0,763 ($\pm$ 0,033)	33,3	0,476 ($\pm$ 0,006)
35,0	1,130 ($\pm$ 0,015)	40,0	0,675 ($\pm$ 0,006)

* O número entre parêntesis indica o desvio padrão, obtido do erro padrão da estimativa do intercepto de cada reta (Figs. 10 e 11) com eixo das ordenadas.

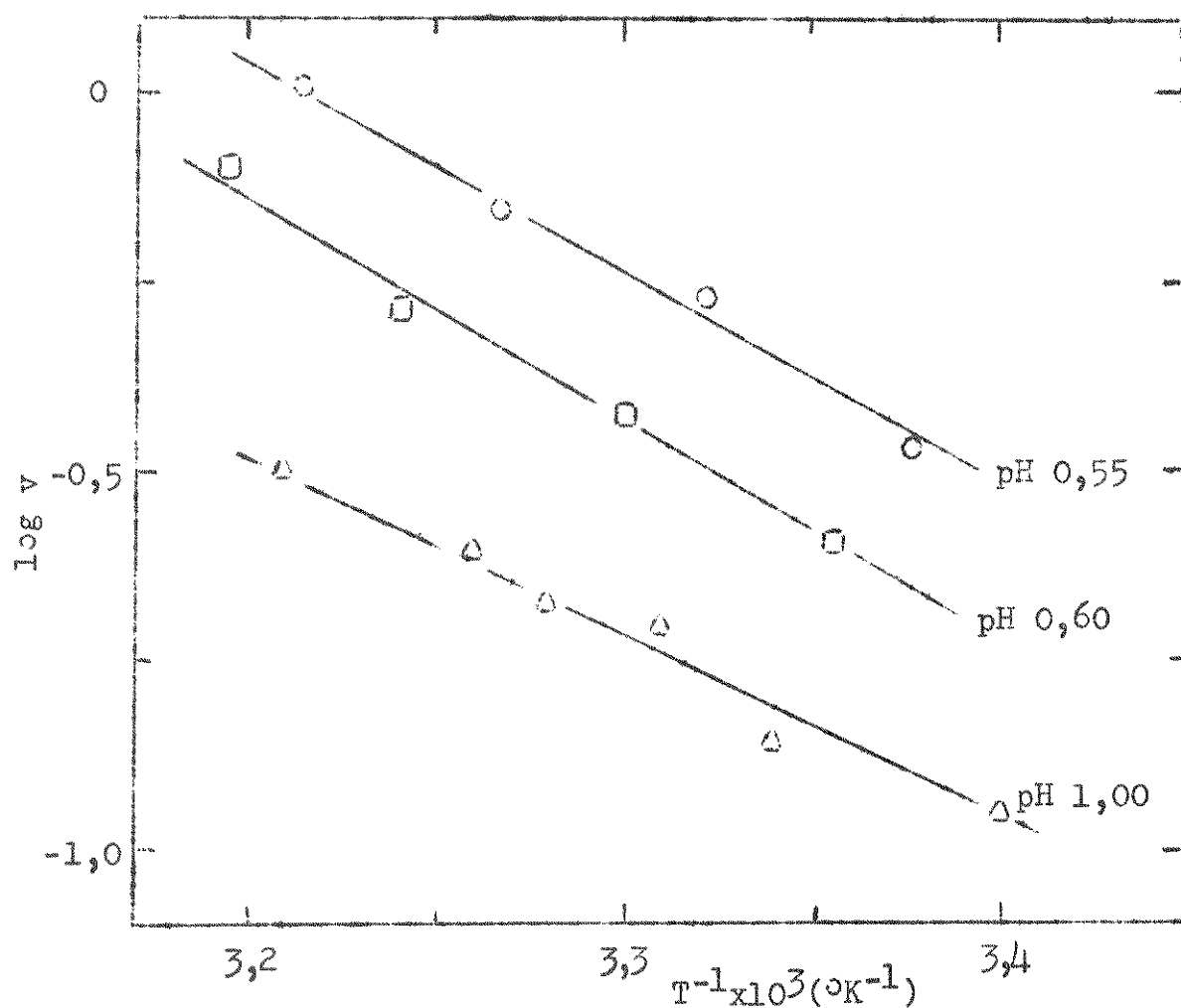


Fig. 8 - Efeito da temperatura sôbre a velocidade inicial da proteólise péptica da ovalbumina nativa. Variação do logaritmo decimal da velocidade inicial em função da recíproca da temperatura absoluta, entre 294 e 313°K. Os valores da energia de ativação encontram-se na Tabela X. A concentração da ovalbumina nativa foi de $2,5 \times 10^{-4}$ M. O pH de cada reação está indicado no gráfico.

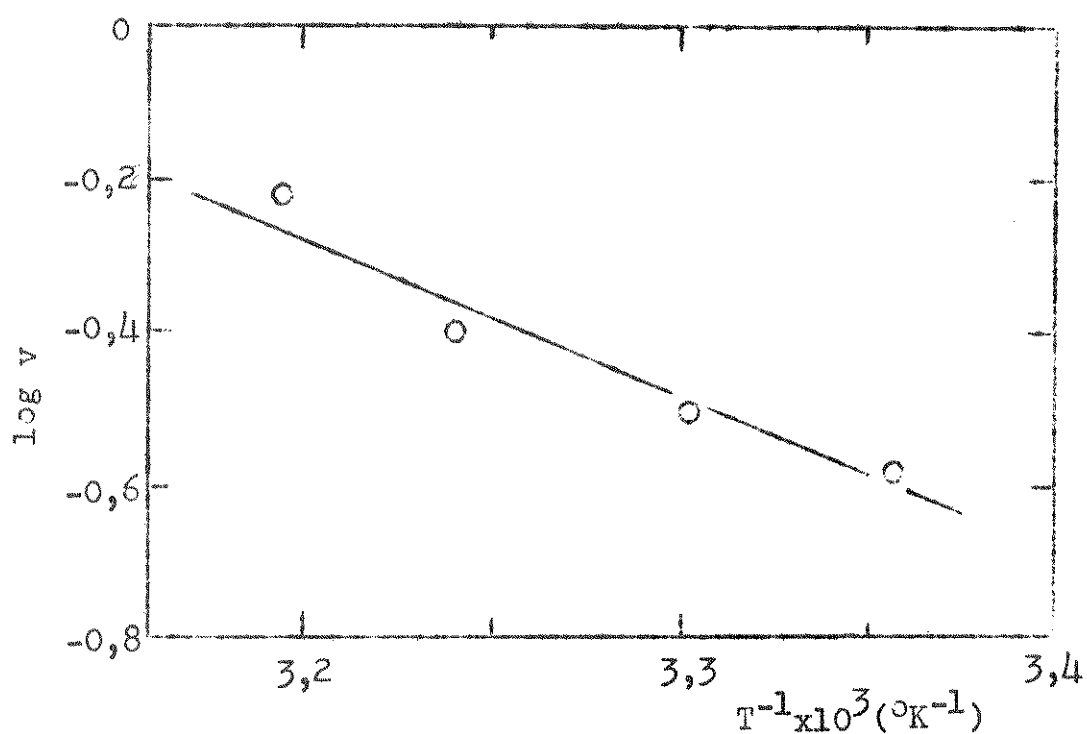


Fig. 9 - Efeito da temperatura sôbre a velocidade inicial da proteólise péptica da ovalbumina desnaturada. Variação do logarítmo decimal da velocidade inicial em função da recíproca da temperatura absoluta, entre 298 e 313°K. pH 1,65. O valor da energia de ativação encontra-se na Tabela X. A concentração da ovalbumina desnaturada foi de $2,5 \times 10^{-4}$ M.

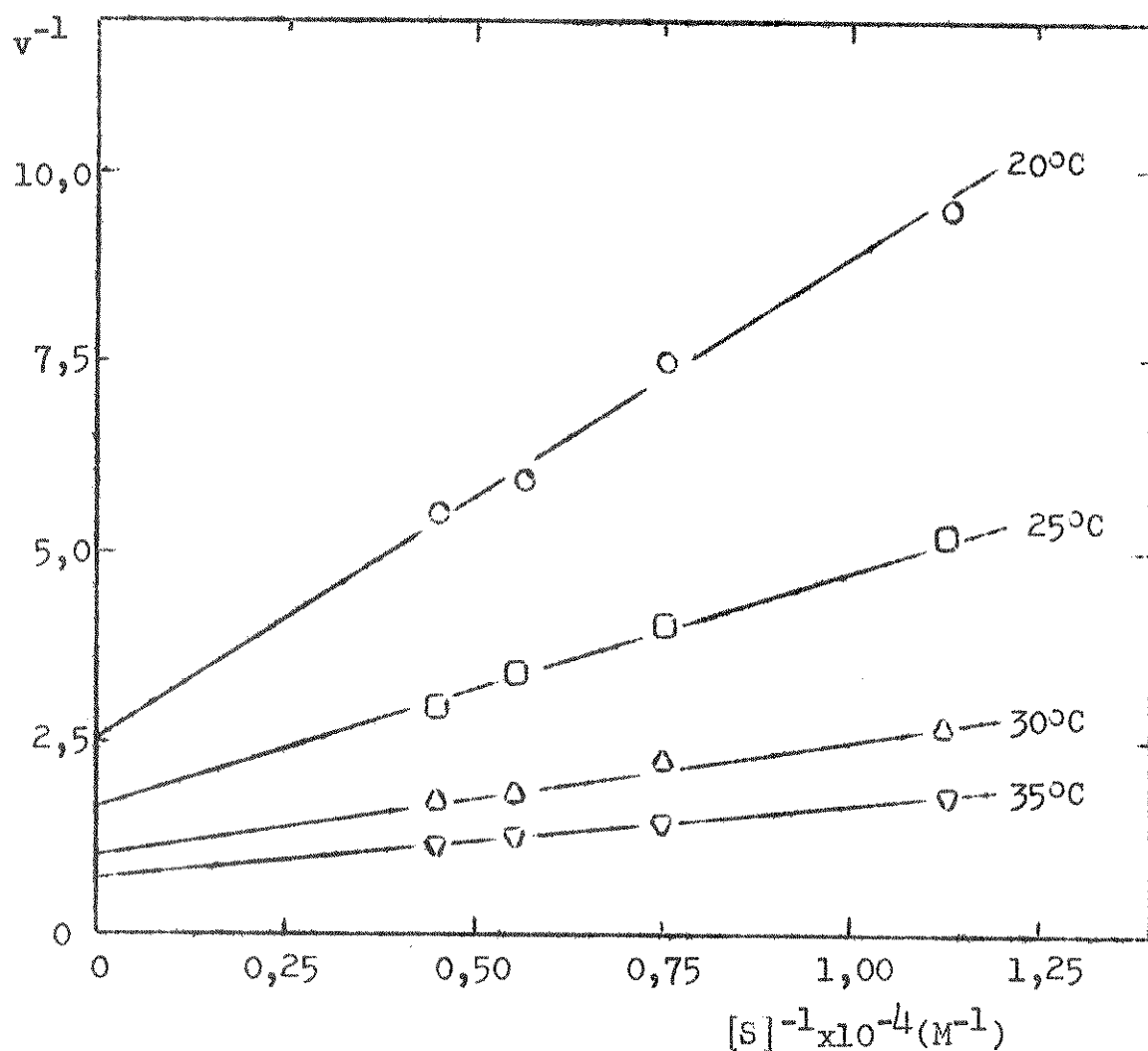


Fig. 10 - Efeito da concentração do substrato sôbre a velocidade da proteólise péptica da ovalbumina nativa em diferentes temperaturas. Variação da recíproca da velocidade inicial em função da recíproca da concentração do substrato. pH = 0,80.

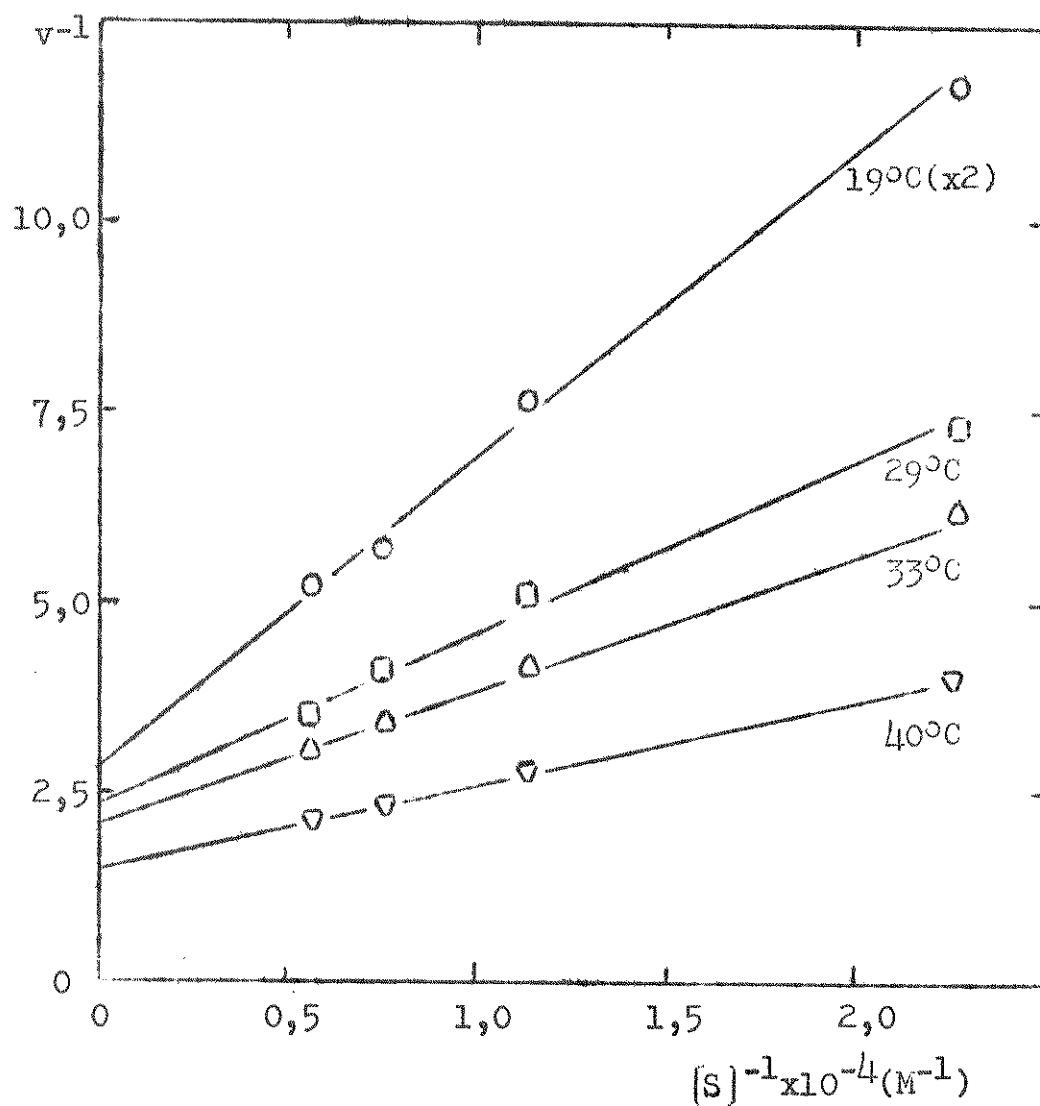


Fig. 11 - Efeito da concentração do substrato sobre a proteólise da ovalbumina desnaturada em diferentes temperaturas. Variação da recíproca da velocidade inicial em função da recíproca da concentração do substrato. pH = 1,65.

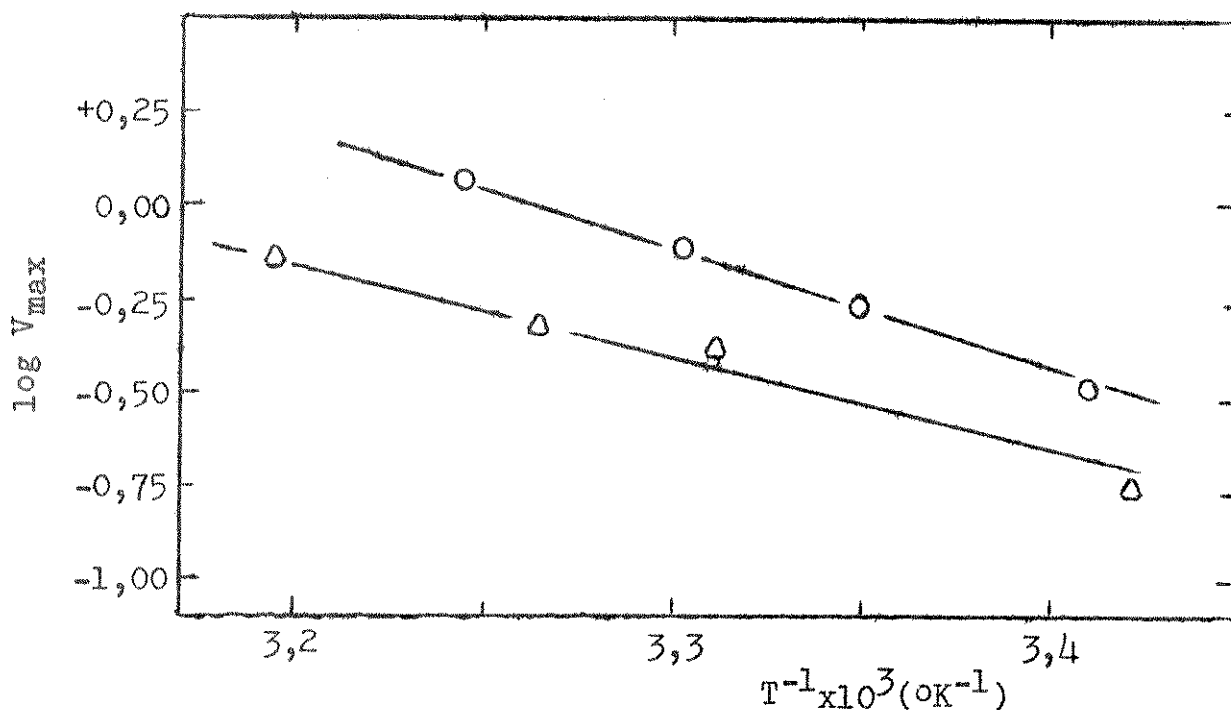


Fig. 12 - Efeito da temperatura sôbre a velocidade máxima da proteólise da ovalbumina. Variação do logarítmo decimal da velocidade máxima em função da recíproca da temperatura absoluta, entre 292 a 313°K. $\circ$, ovalbumina nativa, pH 0,80; $\triangle$, ovalbumina desnaturada, pH 1,65. Os valores encontrados para energias de ativação acham-se na Tabela X.

Para permitir a comparação dos valores da energia de ativação da reação enzimica com o da desnaturação ácida do substrato estudamos também a influência da temperatura sobre a velocidade da desnaturação da ovalbumina em pH 0,60. Nas tempe-

TABELA IX

Efeito da temperatura sobre a constante de velocidade (k) da desnaturação da ovalbumina em pH 0,60.

Temperatura (°K)	k x 10 ³ (min ⁻¹)
25,0	7
30,0	20
35,0	55
40,0	130

Concentração inicial de ovalbumina nativa: $2,5 \times 10^{-4}$ M.

raturas por nós estudadas a desnaturação se comportou como processo de primeira ordem e os valores obtidos das constantes de velocidade são dados na Tabela IX. A partir de um gráfico de Arrhenius, com tais dados (Fig. 13) obteve-se a energia de ativação igual a 33,9 ($\pm 3,6$) Kcal/mol, a qual está de acordo com os valores em pHs mais altos (60,63). Os valores encontrados para a energia de ativação da proteólise péptica da ovalbumina são dados na Tabela X.

TABELA X

Energia de ativação da proteólise péptica da ovalbumina

Ovalbumina	pH	Energia de ativação (Kcal/mol)	
		Para v	Para V _{max}
Nativa	0,55	12,0 ($\pm 1,4$)*	-
	0,60	12,6 ($\pm 2,7$)	-
	0,80	13,5 ($\pm 2,5$)	13,7 ($\pm 1,0$)
	1,00	11,9 ($\pm 1,0$)	-
Desnaturada	1,65	10,1 ($\pm 1,8$)	12,7 ($\pm 1,4$)

* O número entre parêntesis indica o desvio padrão, obtido do erro padrão do coeficiente angular da reta utilizada para determinar a energia de ativação de cada processo.

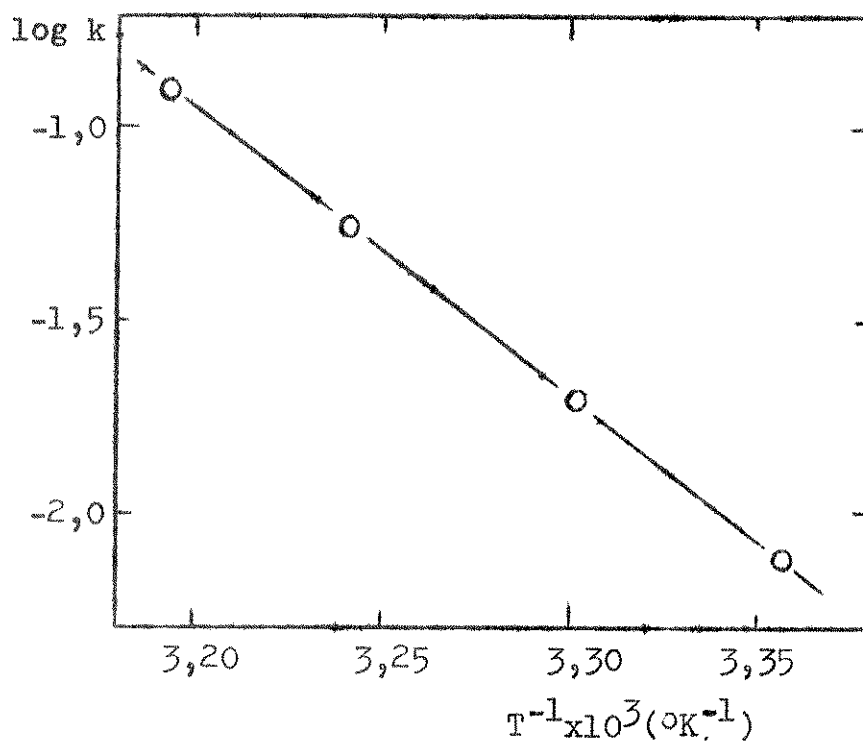


Fig. 13 - Efeito da temperatura sôbre a velocidade da desnaturação da ovalbumina em pH 0,60. Variação do logarítmo decimal da constante de velocidade de primeira ordem (k) em função da recíproca da temperatura absoluta, entre 298 e 313°K. A concentração inicial da ovalbumina nativa foi de $2,5 \times 10^{-4} M$.

3. Efeito da temperatura sobre a associação entre a enzima e o substrato

O efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação enzimática em várias temperaturas, descrito anteriormente (Figuras 10 e 11), permitiu determinar o efeito da temperatura sobre a constante de Michaelis da proteólise péptica da ovalbumina nativa e da desnaturada (Tabela XI).

Admitindo-se que a constante de Michaelis da ação da pepsina sobre a ovalbumina nativa ou desnaturada representa a constante de dissociação do complexo Enzima-substrato, conforme nossa conclusão anterior (pág. 22), a respectiva constante de associação será $K_{ass} = K_m^{-1}$. A partir do efeito da temperatura sobre o valor de K_{ass} (Tabela XI e Figura 14) foi determinada a variação da entalpia normal (ΔH^0) da associação entre a enzima e o substrato. A variação da energia livre normal (ΔG^0) para a mesma reação, à 28°C, foi obtida do valor de K_{ass} para essa temperatura e a variação da entropia normal (ΔS^0), à 28°C, foi determinada a partir dos valores ΔG^0 e ΔH^0 . Os valores desses parâmetros termodinâmicos encontram-se na Tabela XII.

TABELA XI

Variação da constante de Michaelis da proteólise péptica da ovalbumina e da constante de associação entre a enzima e o substrato em função da temperatura

Ovalbumina nativa			Ovalbumina desnaturada		
Temp. (°C)	$K_m \times 10^4$ (M)	$K_{ass} \times 10^{-4}$ (M ⁻¹)	Temp. (°C)	$K_m \times 10^4$ (M)	$K_{ass} \times 10^{-4}$ (M ⁻¹)
20,0	2,00(±0,19)*	0,50(±0,05)	19,0	1,47(±0,13)	0,68(±0,08)
25,0	1,43(±0,25)	0,69(±0,10)	29,0	0,97(±0,09)	1,03(±0,09)
30,0	1,00(±0,11)	1,00(±0,11)	33,3	0,83(±0,08)	1,20(±0,12)
35,0	0,88(±0,23)	1,13(±0,23)	40,0	0,74(±0,05)	1,35(±0,09)

* O número entre parêntesis indica o desvio padrão, obtido do erro da estimativa do coeficiente angular de cada reta (Figs. 10, 11).

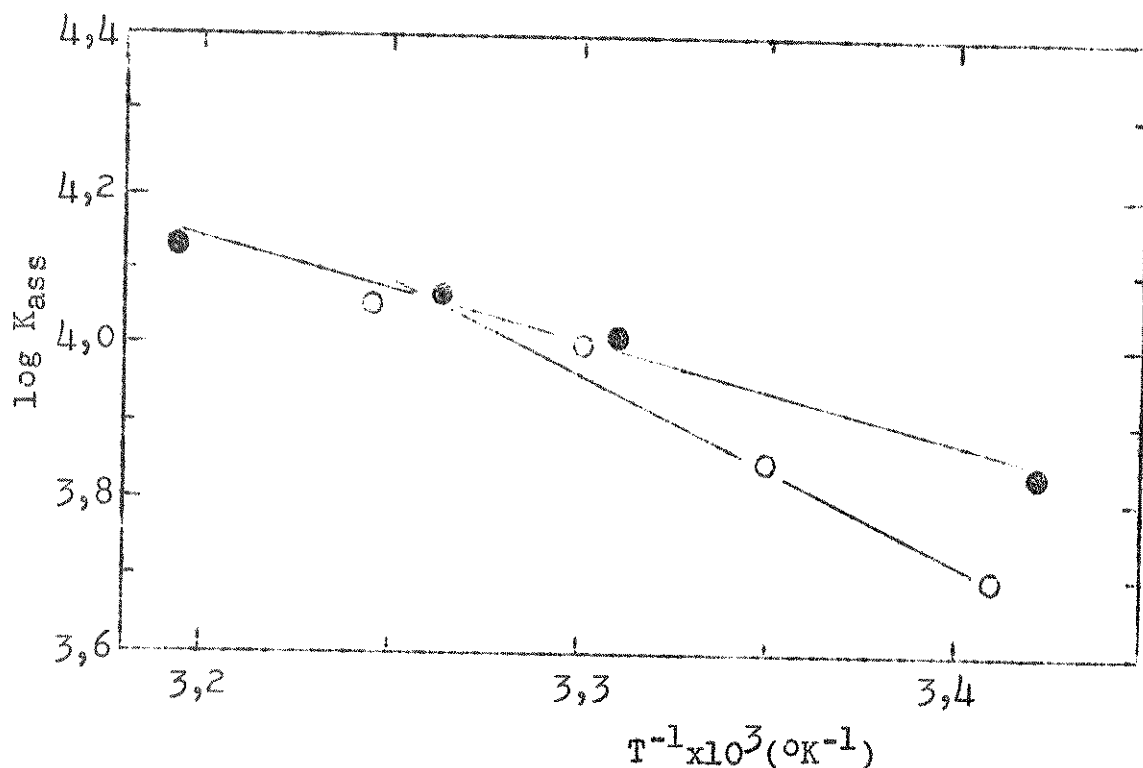


Fig. 14 - Efeito da temperatura sobre a constante de associação entre a enzima e o substrato. Variação do logaritmo decimal de K_{ass} em função da recíproca da temperatura absoluta; O, ovalbumina nativa; ●, ovalbumina desnaturada.

TABELA XII

ΔG^0 , ΔH^0 e ΔS^0 da associação entre a pepsina e a ovalbumina A 28°C

Ovalbumina	$K_{ass} \times 10^{-4}$ (M^{-1})	ΔG^0 (Kcal/mol)	ΔH^0 (Kcal/mol)	ΔS^0 (cal/°/mol)
Nativa	0,98(± 0,10)*	-5,5(±0,5)	10,0(±2,3)	51 (± 8)
Desnaturada	0,97(± 0,07)	-5,5(±0,3)	6,5(±1,1)	40 (± 4)

* O número entre parêntesis indica o desvio padrão de cada estimativa calculado para cada caso.

IV - D I S C U S S Ã O

1. Efeito do pH sôbre a proteólise péptica da ovalbumina

A ação enzimica da pepsina dá-se òtimamente em soluções ácidas. De um modo geral, o ânion do ácido não tem grande efeito sôbre a velocidade ou sôbre o pH ótimo da proteólise⁽¹⁹⁾. Entretanto, nas reações em que a pepsina catalisa a hidrólise de altas concentrações de proteínas, exigindo maiores quantidades de ácido para abaixar o pH do meio, o ânion pode causar inibição da proteólise péptica^(64,65).

As principais hipóteses que tentam explicar a necessidade de baixo pH para a atividade péptica baseiam-se na influência do pH sôbre a associação entre a enzima e o substrato. Isto vale tanto para a hipótese da atração eletrostática entre a enzima e o substrato (Northrop) como para a hipótese de que haja necessidade de desnaturação prévia do substrato protéico. As evidências até agora acumuladas não favorecem a hipótese de Northrop, e permitem mesmo afastá-la definitivamente tanto quanto à carga global da enzima ou do substrato (pág. 6) como quanto à carga do centro ativo da pepsina. Com efeito, não observamos influência significativa do pH sôbre o valor da constante de Michaelis da proteólise péptica da ovalbumina, enquanto que a velocidade máxima variou muito em função do pH (Tabs. VI e VII), indicando que $K_m = K_s$ (pág. 22). Isto sugere que a associação da enzima com o substrato para formar o complexo específico não dependa da ionização de algum grupo do centro ativo, e que o efeito do pH sôbre a proteólise seja somente sôbre a reação de decomposição do complexo enzima-substrato originando os produtos. A observação de que a forma da curva da atividade em função do pH não depende da concentração do substrato (Fig. 4) é um argumento adicional nêsse sentido⁽⁶⁶⁾.

Nossos resultados quanto ao efeito do pH sôbre K_m

e $V_{\max}$ diferem muito dos apresentados por Bull e Currie⁽⁶⁷⁾ que descrevem uma dependência entre o K_m e o pH da proteólise péptica da ovalbumina. Estes autores encontraram, para a constante de Michaelis, valores que variaram de $6,7 \times 10^{-5}$ a $8,3 \times 10^{-4}$ M em função da variação do pH entre 1,34 e 2,80, a 30°C, e de $3,94 \times 10^{-4}$ a $5,82 \times 10^{-4}$ M em função da variação do pH entre 2,00 a 2,85, a 45°C. Provavelmente a divergência entre os nossos resultados e os daqueles autores seja devida ao fato de terem eles trabalhado em condições que propiciavam a desnaturação do substrato durante a proteólise e, principalmente, porque usaram concentrações de substrato relativamente altas ($1,1 \times 10^{-4}$ a $1,32 \times 10^{-3}$ M) pois a atividade da pepsina sobre a ovalbumina é muito alterada pelo emprégo de concentrações de substrato superiores a $2,5 \times 10^{-4}$ M. A Figura 15 mostra que há uma aparente inibição da proteólise por excesso de ovalbumina, provavelmente causada pelas altas concentrações do íon cloreto proveniente do ácido clorídrico empregado para abaixar o pH das soluções⁽⁶⁴⁾

Além das evidências experimentais deste trabalho, já citadas, mostrando que o pH não tem efeito sobre o valor da constante de Michaelis da proteólise péptica da ovalbumina, parece-nos que o mesmo deva ocorrer com outros substratos. De fato, Cann e Klapper⁽⁶⁸⁾ evidenciaram, por método eletroforético, a formação de um complexo ES específico entre a pepsina e a albumina do sêro bovino, durante a proteólise em pH 5,35 (bem mais alto que o pH ótimo da atividade enzimica). A constante de equilíbrio medida para a dissociação desse complexo, em pH 5,35, foi igual à constante de Michaelis para a atividade enzimica no pH ótimo próximo a 2,0. Anteriormente havia sido verificado⁽⁶⁹⁾ que a pepsina e a ovalbumina formam um complexo insolúvel em pH 4,0, e é bem possível que este complexo também corresponda ao complexo ES específico, embora isto não tenha sido demonstrado experimentalmente. Outra verificação pertinente é a de que a constante de Michaelis da atividade esterásica da pepsina medida em pH 2,0 não difere significativamente da medida em pH 4,0, enquanto que a constante de velocidade da decomposição (k_3) de ES varia muito em função do pH⁽³⁵⁾. Isto indica que, também para a atividade esterásica da pepsina, o pH te

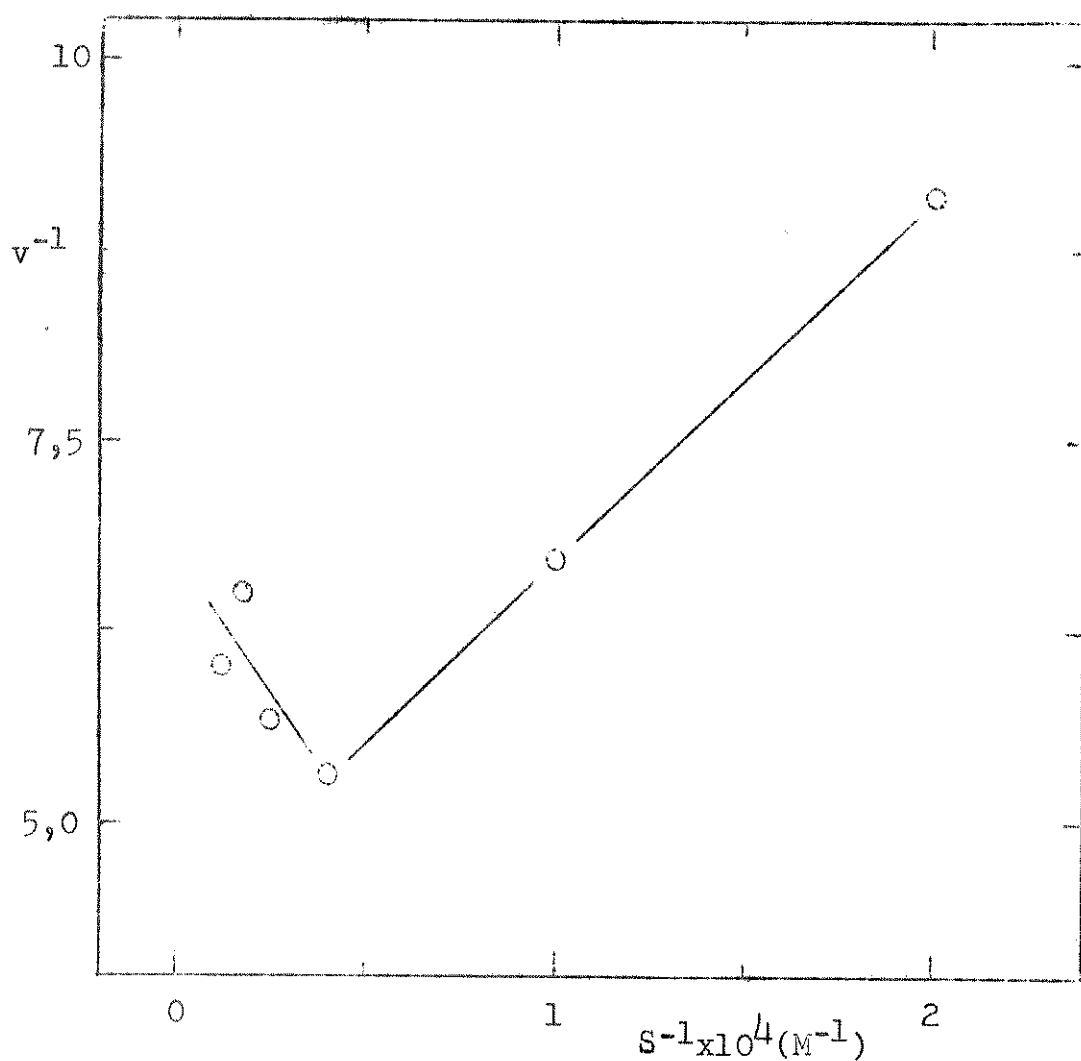
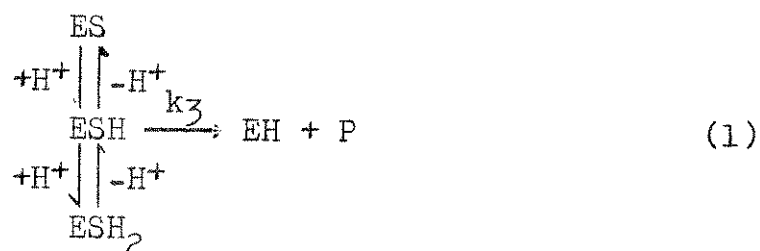


Fig. 15 - Variacão da recíproca da velocidade da proteólise péptica da ovalbumina nativa em funo da recíproca da concentrao do substrato. Aparente inibio por altas concentrao de substrato (cf. Paiva e Bergsten referência 64). Temperatura = 37°

ria efeito apenas sobre k_3 e que $K_m \approx K_s$. Um outro exemplo de reação enzimática em que o efeito do pH é apenas sobre a velocidade de decomposição do complexo ES e para a qual, portanto, $K_m \approx K_s$ é o da hidrólise do éster metílico do ácido hidrocianico pela alfa-quimotripsina^(70,71).

Usualmente se interpreta o efeito do pH sobre a atividade enzimática considerando-se a ionização de dois grupos do centro ativo, admitindo-se que a atividade da enzima dependa de um deles se apresentar protonado e o outro na forma da base conjugada. Assim, cada ramo da curva da variação da atividade enzimática em função do pH dependeria, em última análise, da curva de titulação de cada um daqueles dois grupos. Tal ionização poderia ser importante para a formação do complexo enzima-substrato, ou para a reação de decomposição desse complexo, ou para ambas reações. Tratando da maneira usual o efeito do pH sobre a atividade péptica, poderíamos sugerir que os dois grupos importantes para a catálise seriam duas carboxilas, e que a forma ativa apresentaria uma delas ionizadas e a outra protonada. Como a atividade péptica ocorre em pH baixo o estado de ionização de grupos com cargas positivas não deve influir, teoricamente, sobre a catálise. Admitindo-se que o pH é importante apenas para a reação de decomposição do complexo pepsina-ovalbumina (ES), podemos limitar nossa análise do efeito do pH sobre a proteólise péptica às seguintes reações:



Chamando, respectivamente, de K_a e K_b as constantes de dissociação da forma monoprotionada e diprotionada do complexo ES temos:

$$K_a = [ES][H^+]/[ESH] \quad \text{e} \quad K_b = [ESH][H^+]/[ESH_2] \quad (2)$$

e fazendo-se um tratamento de estado de fluxo constante teremos, para cada velocidade em função de cada pH⁽⁷²⁾, segundo a equação de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{k_3[E]_t}{(1+[H^+]/K_a + K_b/[H^+])(1+K_m/[S])} \quad (3)$$

sendo k_3 a constante de velocidade da decomposição do complexo ESH e $[E]_t$ a concentração total de enzima; no pH ótimo a velocidade máxima ($V_{\max}^0$) será atingida quando toda a enzima presente estiver na forma ESH e então $V_{\max}^0 = k_3 [E]_t$. Dessa forma a velocidade máxima aparente ($V_{\max}$) variará em função do pH segundo a seguinte equação:

$$V_{\max} = \frac{V_{\max}^0}{1 + \frac{[H^+]}{K_a} + \frac{K_b}{[H^+]}} = \frac{V_{\max}^0}{K_a [H^+] + [H^+]^2 + K_a K_b} \quad (4)$$

A partir da equação (4) pode-se calcular que a concentração hidrogeniônica correspondente ao pH ótimo, $[H^+]_0$, será:

$$[H^+]_0 = \sqrt{K_a K_b} \quad (5)$$

Pode-se obter experimentalmente K_a e K_b a partir da curva da dependência entre a velocidade máxima e o pH^(73,74) empregando-se as equações (4) e (5), e sabendo-se que $V_{\max}$ aparente poderá adquirir o valor da metade da $V_{\max}^0$ quando a concentração hidrogeniônica obedecer à seguinte condição:

$$\frac{V_{\max}^0}{2} = \frac{V_{\max}^0 \cdot K_a [H^+]}{K_a [H^+] + [H^+]^2 + [H^+]_0^2}, \text{ isto é:} \quad (6)$$

$$[H^+]^2 - (K_a + 4[H^+]_0)[H^+] + [H^+]_0^2 = 0 \quad (7)$$

A equação (7) tem duas soluções reais para $[H^+]$, às quais chamaremos de $[H^+]_1$ e $[H^+]_2$. Estes dois valores representariam as concentrações hidrogeniônicas em que se verificam valores de $V_{\max}$ iguais à metade da $V_{\max}^0$ respectivamente no ramo esquerdo, e no ramo direito da curva da dependência da velocidade máxima em função do pH. A soma de $[H^+]_1$ e $[H^+]_2$ será:

$$[H^+]_1 + [H^+]_2 = K_a + 4[H^+]_0 \quad (8)$$

Esta equação permite calcular K_a a partir de $[H^+]_1$, $[H^+]_2$ e $[H^+]_0$ obtidos experimentalmente, e a equação (5) permite obtermos K_b a partir de $[H^+]_0$ e K_a . Dessa forma calculamos, aproximadamente, os valores de K_a e K_b e os respectivos pK_a e pK_b , da atividade péptica sobre diferentes substratos.

A Tabela XIII mostra os valores de K_a e K_b obtidos da dependência entre a atividade e o pH observada tanto em nossos resultados como nos relatados por vários outros autores com diferentes substratos protéicos ou peptídeos sintéticos. Para isso foi necessário realizar interpolações e extrapolações com os dados experimentais das referências citadas nessa Tabela, de modo que os valores de pK_a e pK_b aí apresentados devem ser considerados apenas como aproximações. Apesar disto, o exame de tais valores sugere que o pH ótimo, observado com diferentes substratos e em diferentes condições, varia à custa da variação do pK_b , visto que a maioria dos valores de pK_a estão próximos de $pH=1$ enquanto que o pK_b varia desde 1,2 até 8,0. Esta grande variação do pK_b indicaria que o ramo direito da curva da dependência da atividade em função do pH não repre

TABELA XIII

Estimativa de pK_a e pK_b da atividade péptica sobre diferentes substratos e sua variação em função da concentração de uréia

Substrato	pK_a	pH ótimo	pK_b	Ref.
Ac-Fen.Dilodo-Tir	1,6	2,0	3,8	30
Ac-Fen.Tir	1,3	2,1	3,6	30
albumina bovina nativa	0,6	2,1	3,3	38
idem, "nativa"	1,0	1,7	2,2	21
idem, desnaturada por álcali	1,0	1,7	3,0	21
idem, idem, por ácido	0,8 a 1,0	1,7 a 2,7	4,0	21
idem, idem, por uréia	0,8 a 1,0	1,8 a 3,2	4,0	21
idem, acetilada				21
hemoglobina "nativa"	1,2	2,0	2,8	38
idem, desnaturada por ácido	0,8	2,3	4,5	21
idem, idem, por uréia	0,9	2,3	4,1	21
idem, idem, por uréia + ácido	1,0	1,8 a 3,2	4,1	21
β-lactoglobulina desnat. por uréia	1,0	3,8	6,4	21
ovalbumina nativa	1,0	1,6	2,2	39
idem, nativa	0,5	1,0	1,5	39
idem, desnaturada por ácido	0,5	0,8	1,2	40
idem, idem, por uréia; (uréia 1M)*	0,7	1,6	2,5	40
idem, idem, por uréia; (uréia 5M)*	1,1	1,7	2,7	40
idem, idem, por uréia; (uréia 8M)*	1,1	2,7	4,6	40
idem, idem, por uréia; (uréia 10M)*	1,1	4,8	7,8	40
idem, idem, por uréia; (uréia 10M)*	1,2	5,0	8,2	40

* Entre os parêntesis está indicada a concentração de uréia presente durante a incubação enzimica.

senta a titulação de um grupo ionizável do centro ativo da enzima pois não se poderia esperar variação tão grande do pK desse grupo causada apenas pelas diferenças de substrato ou modificações do solvente nas observações citadas. Outra evidência favorável a esta interpretação é a verificação de que o pH ótimo da atividade péptica sobre a ovalbumina se desloca muito na presença de crescentes concentrações de uréia (Fig. 2) sem variação significativa da atividade no pH ótimo. Se os valores de pK_a e pK_b estimados representassem constantes de dissociação de dois grupos ionizáveis de ES a teoria⁽⁷²⁾ prediz que deveríamos observar um grande aumento da atividade no pH ótimo à medida que o pK_b se distanciasse do pK_a .

Tais evidências sugerem que a catálise péptica possa depender de uma carboxila do centro ativo embora o pK_a indique se tratar de um grupo bastante ácido, e que provavelmente, os valores encontrados para o pK_b não correspondam à titulação de um grupo ionizável definido.

2. Efeito da temperatura sobre a proteólise péptica da ovalbumina

A pepsina age ôtimamente em pH s mais altos sobre substratos protéicos desnaturados ou sobre peptídeos do que sobre substratos protéicos nativos. Vários autores^(21,47,39,48,55) tomam esse fato como base para a hipótese de que o passo limitante da proteólise péptica deva ser a desnaturação ácida do substrato. Para analisar essa hipótese estudamos o efeito da temperatura sobre a velocidade inicial, sobre a velocidade máxima e sobre a constante de Michaelis da proteólise péptica da ovalbumina nativa ou previamente desnaturada por ácido. Nossos dados confirmam um aumento de cerca de 0,80 a 1 unidade de pH do pH ótimo da reação enzimica sobre o substrato desnaturado em relação ao substrato nativo, porém, os valores da energia de ativação da proteólise péptica tanto da ovalbumina nativa como da desnaturada previamente por ácido são significativamente próximos, e bem menores do que o valor encontrado para a energia de ativação da desnaturação da ovalbumina em pH 0,6 (Tab. X).

Não encontramos diferença significativa entre os valores da energia de ativação da proteólise da ovalbumina em função da velocidade inicial ou da máxima, tanto para o substrato nativo como para o desnaturado (Tab. X). Além disso, a 28°C os valores da constante de Michaelis da proteólise péptica da ovalbumina nativa e da **desnaturada**, respectivamente iguais a $1,02 (\pm 0,11) \times 10^{-4}$ M e $1,03 (\pm 0,07) \times 10^{-4}$ M, também não diferem significativamente. Da mesma forma, não encontramos diferença significativa entre os valores de ΔH° , ΔG° e ΔS° da reação de associação entre a pepsina e a ovalbumina nativa ou desnaturada (Tab. XII). A verificação de que $k_2 \gg k_3$ (pág. 22) indica que a energia livre de ativação da reação de dissociação do complexo enzima-substrato (ΔG_2^*) seja bem menor do que a da reação de sua decomposição originando os produtos (ΔG_3^*). O valor de ΔG_3^* , estimado a partir da velocidade máxima da reação por nós observada a 28°C, foi de 19,7 kcal/mol. Estes dados, juntamente com a observação do valor de -5,5 kcal/mol para a variação de energia livre da associação da enzima com substrato (ΔG_{ass}^*) estão representados da forma esquemática na Fig. 16. A observação desta figura mostra que a energia livre de ativação da associação da enzima com o substrato (ΔG_1^*) deve ser muito menor do que 14,2 kcal para $k_2 \gg k_3$. Como a energia livre de ativação da desnaturação da ovalbumina é maior do que 22 kcal/mol este processo não poderia estar incluído como um passo limitante da associação entre enzima e o substrato. Por outro lado, o simples fato de que $k_2 \gg k_3$ já indica que a reação de associação da enzima com o substrato não deve ser um passo limitante do processo enzimático total.

3. Formação do complexo pepsina-ovalbumina

A Tabela XII mostra que os valores negativos de ΔG° para a associação da pepsina com a ovalbumina nativa ou desnaturada resultam de uma predominância dos valores positivos de ΔS° sobre os valores também positivos de ΔH° . Isto é análogo ao que ocorre nas interações hidrofóbicas, como as verificadas entre as cadeias laterais apolares de aminoácidos⁽⁷⁵⁾ sugerindo que as forças responsáveis pela interação entre enzima e o substrato possa ser do tipo hidrofóbico. Essa suposição es

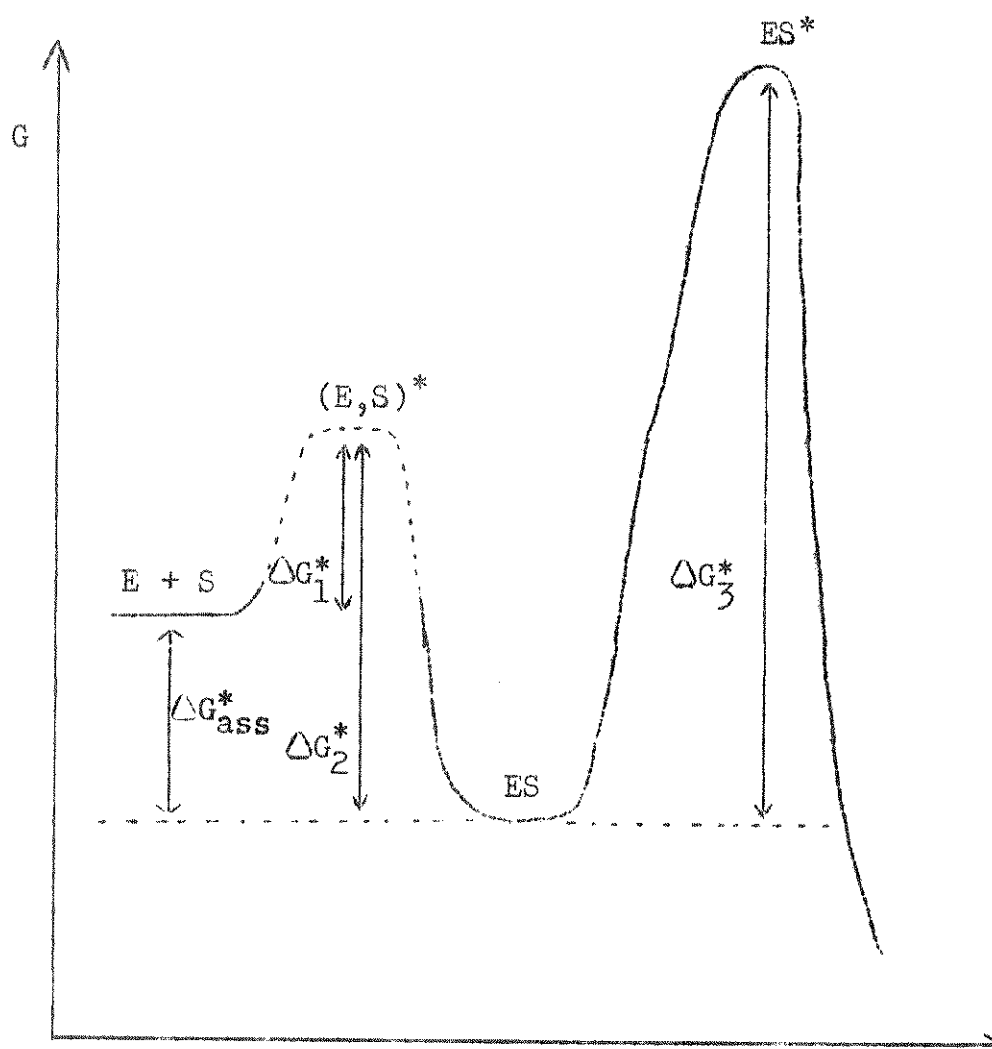
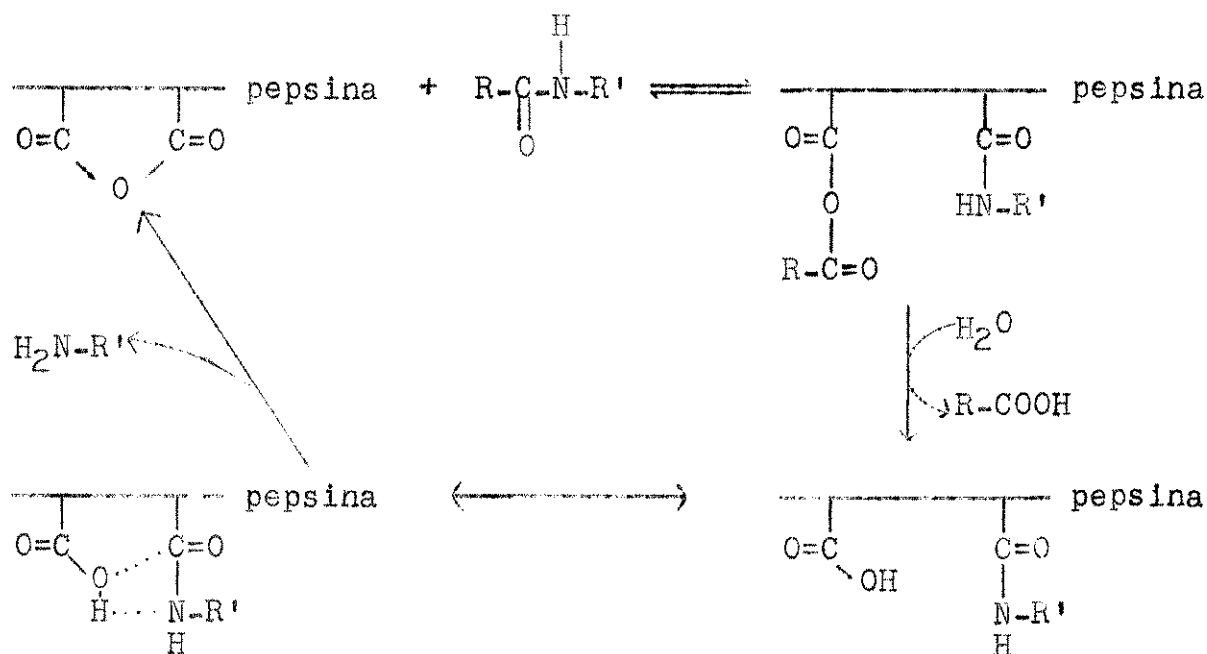


Fig. 16 - Diagrama esquemático da variação da energia livre no processo da proteólise péptica da ovalbumina.

tá de acôrdo com a hipótese de Tang^(36,76) de que o primeiro passo do mecanismo da proteólise péptica seria uma interação hidrofóbica entre a enzima e o substrato protéico. Este tipo de interação entre a pepsina e a ovalbumina não deve ser exclusivo para este substrato e deve afetar diretamente a região do centro ativo da pepsina. De fato, álcoois alifáticos inibem competitivamente a atividade da pepsina sôbre a hemoglobina e sôbre a benziloxycarbonil-L-glutamil-L-tirosina, provavelmente por interações hidrofóbicas entre o álcool alifático e a enzima, e quanto maior a cadeia lateral do álcool maior é a inibição⁽⁷⁶⁾. O benzeno é cêrca de 2 a 2,5 vêzes mais solúvel em solução aquosa de pepsina do que em água pura⁽⁷⁷⁾ e provoca uma inibição de 40 a 70% da atividade proteolítica devida à possível interação hidrofóbica com o centro ativo da enzima⁽⁷⁸⁾. A N-acetil-L-fenilalanina inibe competitivamente a atividade peptidásica da pepsina^(31,33), e peptídeos contendo D-fenilalanina (portanto resistentes à hidrólise catalisada pela pepsina) são inibidores competitivos tanto da atividade peptidásica como da esterásica⁽³⁵⁾. O éster metílico do ácido N-acetil-D-fenilalanil-D-tirosina é inibidor competitivo da hidrólise péptica da N-acetil-L-fenilalanil-L-tirosina, independentemente do pH⁽⁷⁹⁾. É interessante observarmos que, de modo geral, os valores das constantes de inibição verificadas com os compostos acima citados são aproximadamente iguais aos das constantes de Michaelis das respectivas reações enzimicas em ausência de inibidor.

A inibição da atividade péptica por ácidos graxos tem sido usada como um argumento em defesa da hipótese da necessidade da desnaturação prévia do substrato protéico pois os ácidos graxos protegem as proteínas contra a desnaturação⁽⁵⁶⁾. Entretanto, achamos que este fato favorece a hipótese de associação hidrofóbica entre a enzima e o substrato protéico, seja ele nativo ou previamente desnaturado. Com efeito, as cadeias alifáticas dos ácidos graxos podem ligar-se por interações hidrofóbicas com as cadeias laterais apolares de resíduos de aminoácidos de proteínas⁽⁸⁰⁾, e os ácidos graxos protegem as proteínas contra a desnaturação apenas quando em pequenas concentrações, pois, em concentrações maiores os mesmos ácidos gra-

tro ativo da pepsina e na demonstração de que há formação tanto da acil-enzima como da amino-enzima^(90,91) (isto é, a pepsina ligada, respectivamente, com a carboxila e com a amina da ligação peptídica do substrato susceptível à hidrólise péptica), propuseram um mecanismo de ação enzimática envolvendo a reação do substrato com um possível anidrido de duas carboxilas do centro ativo da enzima:



A hidrólise da acil-enzima seria seguida de um ataque nucleofílico do grupo carbonil da amino-enzima pela carboxila vizinha, de modo análogo ao que ocorre na hidrólise do ácido ftalâmico⁽⁹²⁾, regenerando o anidrido. Contudo os valores estimados para o "pK_b" do ES em diferentes condições (Tab. XIII) não podem ser atribuídos a um grupo carboxílico definido, parece-nos por isso que se deva procurar outras hipóteses sobre o mecanismo de ação da pepsina que possam explicar melhor o ramo direito das curvas de atividade em função do pH. Tais hipóteses deveriam permitir explicar nossa verificação de que o íon hidrônio se comporta como um ativador da atividade péptica nos pHs acima do ótimo, e como um inibidor não competitivo em pHs abaixo do ótimo.

A interação hidrofóbica entre a pepsina e cada um dos diferentes substratos ocasiona, possivelmente, na região

xos tornam-se potentes agentes desnaturantes⁽⁸¹⁾.

4. Mecanismo da proteólise péptica da ovalbumina

Nossos resultados e os da literatura, levam-nos a aceitar que o primeiro passo para o mecanismo da proteólise péptica da ovalbumina deva ser a formação do complexo específico através de interações hidrofóbicas entre cadeias laterais a polares de resíduos de aminoácidos do centro ativo da pepsina com os da ovalbumina, seja o substrato nativo ou desnaturado previamente por ácido. Após a formação do complexo específico, os passos seguintes seriam os correspondentes à reação hidrolítica propriamente dita cuja compreensão estará baseada fundamentalmente no conhecimento dos grupos do centro ativo da pepsina responsável pela reação enzimica.

Sabe-se que resíduos de tirosina com a hidroxila fenólica livre são importantes para a atividade péptica^(82,83), porém a maioria dos trabalhos referentes a elucidação do centro ativo da pepsina procuram demonstrar a existência e importância de resíduos de ácido aspártico e glutâmico no centro ativo: a) o difenildiazometano, reagente de carboxilas, reduz a atividade proteolítica e peptidásica da pepsina, e se for incubada com o pepsinogênio este perde a sua capacidade de se transformar em pepsina⁽⁸⁴⁾; porém é curioso notar que a velocidade da inativação da pepsina por aquele reagente é aumentada na presença de certos peptídeos susceptíveis à hidrólise péptica⁽³⁴⁾; b) o éster metílico do diazoacetil-DL-norleucina, na presença de íon cúprico, esterifica um resíduo de aminoácido dicarboxílico causando inativação da enzima⁽⁸⁵⁾; c) Erlanger e cols.^(86,87), através de vários métodos, demonstraram a importância de um resíduo de ácido aspártico para a atividade da pepsina e isolaram um pentapeptídeo com aminoácidos vizinhos à aquele resíduo com a seguinte composição: $\text{Gli}_2, \text{Asp}, \text{Ser}, \text{Glu}$; d) o brometo de parabromofenacila esterifica a beta-carboxila de um resíduo de ácido aspártico causando uma inativação da pepsina, reversível pela remoção do reagente⁽⁸⁸⁾.

Bender e Kézdy⁽⁸⁹⁾ e Clement e Snyder⁽⁷⁹⁾, baseados principalmente na existência de grupos carboxílicos no cen

de contacto entre o substrato e o centro ativo da pepsina, uma organização do solvente que produziria mudanças consideráveis da atividade dos íons hidrônio nessa região. É sabido, por exemplo, que a mobilidade dos protons hidrogênio na água cristalina é cerca de cem vezes maior do que na água líquida⁽⁹³⁾. Acreditamos, portanto, que deva merecer consideração a hipótese de que o ramo direito das curvas de atividade péptica em função do pH dependa do grau de organização do solvente na região de contacto de ES, o que poderia explicar os diferentes pHs ótimos observados com diferentes substratos em diferentes condições e mesmo a diferença existente entre o pH ótimo da atividade péptica sobre substratos protéicos nativos e os da proteólise péptica de substratos desnaturados.

V - R E S U M O

A composição de aminoácidos da pepsina caracteriza-se pelo grande número de resíduos dicarboxílicos e de resíduos com cadeias laterais apolares, e de raros resíduos básicos. Devido a isso, e à presença de uma fosfoserina, a enzima apresenta ponto isoelétrico menor do que 1,08. A atividade enzimica da pepsina (tanto a proteolítica como a peptidásica, como a esterásica) dá-se òtimamente em pHs ácidos. A proteólise péptica de substratos nativos dá-se em pHs ótimos mais baixos do que os da proteólise péptica de substratos desnaturados e também mais baixos do que os verificados para a hidrólise péptica de peptídeos sintéticos ou de ésteres sintéticos. Uma das hipóteses para explicar a necessidade dos baixos pHs para a melhor ação catalítica da pepsina baseia-se na possível atração eletrostática entre a enzima, que em meio ácido se comportaria como um ânion, e o substrato protéico, que em meio ácido se comportaria como um cátion (pois geralmente o ponto isoelétrico dos substratos é acima de 4,0). Outra hipótese é a de que o passo limitante da proteólise péptica seria a desnaturação do substrato, favorecida pelo pH ácido. Estudamos neste trabalho o efeito do pH e da temperatura sôbre a cinética da ação da pepsina sôbre a ovalbumina nativa ou prèviamente desnaturada por ácido. Foi demonstrado que o pH não tem efeito significativo sôbre o valor encontrado, a 28°C, para a constante de Michaelis (K_m) da proteólise péptica da ovalbumina nativa ($1,02 \pm (0,11) \times 10^{-4} M$) e da ovalbumina desnaturada por ácido ($1,03 \pm (0,07) \times 10^{-4} M$) enquanto que a velocidade máxima da reação enzimica varia muito em função do pH. Êste fato indica que K_m é praticamente igual à constante de equilíbrio da dissociação de ES (K_s) e que a constante de velocidade de decomposição (k_3) de ES deve ser bem menor do que a constante de velocidade da sua dissociação (k_2). O estudo do efeito da temperatura sôbre

a ação da pepsina sobre a ovalbumina, não mostrou diferença significativa entre a energia de ativação da reação enzimica sobre o substrato nativo e sobre o substrato desnaturado. Por outro lado, a energia de ativação do processo de desnaturação ácida da ovalbumina é cerca de três vezes maior do que a da reação enzimica. Estes resultados indicam que o passo limitante da ação proteolítica da pepsina deva ser a reação de decomposição entre a enzima e o substrato. Os valores estimados para ΔG^0 , ΔH^0 e ΔS^0 , para a associação da pepsina com ovalbumina nativa ou desnaturada, indicam que as principais forças de interações entre a enzima e o substrato, para formarem o complexo específico ES, devem ser do tipo hidrofóbico.

A análise de curvas da dependência da atividade da pepsina sobre diferentes substratos e em várias condições, em função da variação da pH, sugeriu que dificilmente os ramos direitos das referidas curvas representem, em última análise, a curva de dissociação de uma carboxila do centro ativo da enzima. Isto sugere que se deva modificar o esquema proposto por Bender e outros para o mecanismo da hidrólise catalisada pela pepsina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Northrop, J.H., J.Gen.Physiol. 13(1930)739.
2. Rajagopalan, T.G., Moore, S. e Stein, W.H., J.Biol.Chem. 241(1966)4940.
3. Perlmann, G.E., Advances in Chemistry Series nº 63(1967)268.
4. Blumenfeld, O.O. e Perlmann, G.E., J.Biol.Chem. 236(1961)2472
5. Perlmann, G.E., Advan.Protein Chem. 10(1955)1.
6. Tiselius, A., Henschen, G.E., Svensson, H., Biochem.J., 32
(1938)1814.
7. Perlmann, G.E., J.Gen.Physiol. 41(1958)441.
8. Northrop, J.H., J.Gen.Physiol. 2(1920)465.
9. Steinhardt, J., J.Biol.Chem. 123(1938)543.
10. Perlmann, G.E., Arch.Biochem.Biophys. 65(1956)210.
11. Edelhoch, H., Biochem.Biophys.Acta 22(1956)401.
12. Edelhoch, H., J.Am.Chem.Soc. 78(1956)2644.
13. Blumenfeld, O.O., Léonis, J. e Perlmann, G.E. J.Biol.Chem.
235(1960)379.
14. Herriot, R.M., J.Gen.Physiol. 45, nº 4, parte 2 (1962)57.
15. Blumenfeld, O.O. e Perlmann, G.E., J.Gen.Physiol. 42(1959)
563.
16. Anfisen, C.B. e Redfield, R.R., Advan. Protein Chem. 11(1956)1
17. Hartley, B.S., Ann.Rev.Biochem. 29(1960)45.
18. Ottesen, M., Ann.Rev.Biochem. 36, part I(1967)55.
19. Northrop, J.H., J.Gen.Physiol. 1(1919)607.
20. König, A., Biochem.Z. 110(1920)266.
21. Schlamowitz, M. e Peterson, L.U., J.Biol.Chem. 234(1959)3137
22. Prellwitz, W., Krug, E. e Lang, K., Biochem.Z. 333(1960)236.
23. Sanger, F. e Tuppy, H., Biochem.J. 49(1951)463.
24. Sanger, F. e Thompson, E.O.P., Biochem.J. 53(1953)366.
25. Fisher, E.R., Rosenthal, T.B. e Lansing, A.I., J.Histochem.
and Cytochem. 8(1960)102; cf. Chemical Abstrats 55: 23617a
26. Buchs, S. e Freudenberg, E., Experientia 17(1961)21.
27. Katchalski, E., Advan.Protein Chem. 6(1951)123.
28. Fruton, J.S. e Bergmann, M., Science 87(1938)557.
29. Fruton, J.S. e Bergmann, M., J.Biol.Chem. 127(1939)627.

30. Baker, L.E., J.Biol.Chem. 193(1951)809.
31. Baker, L.E., J.Biol.Chem. 211(1954)701.
32. Silver, M.S., Denburg, J.L. e Steffens, J.J., J.Am.Chem.Soc. 87(1965)886.
33. Zeffrem, E. e Kaiser, E.T., J.Am.Chem.Soc. 88(1966)3129.
34. Inouye, K., Voynick, I.M., Delpierre, G.R., Fruton, J.S., Biochemistry 5(1966)2473.
35. Inouye, K. e Fruton, J.S., J.Am.Chem.Soc. 89(1967)187.
36. Tang, J., Nature 199(1963)1094.
37. Inouye, K. e Fruton, J.S., Biochemistry 6(1967)1765.
38. Sri Ram, J. e Maurer, P.H., Arch.Biochem.Biophys. 70(1957) 185.
39. Christensen, L.K., Arch.Biochem.Biophys. 57(1955)163.
40. Tahin, Q.S. e Paiva, A.C.M., An.Acad.Bras.Ci. 34(1962)351.
41. Northrop, J.H., J.Gen.Physiol. 2(1920)595.
42. Northrop, J.H., J.Gen.Physiol. 3(1920)211.
43. Northrop, J.H., Science 53(1921)391.
44. Northrop, J.H., J.Gen.Physiol. 5(1922)263.
45. Northrop, J.H., Naturwissenschaften 11(1923)713.
46. Northrop, J.H., J.Gen.Physiol. 7(1925)603.
47. Rocha, T.L., Paiva, T.B. e Paiva, A.C.M., (comunicação pessoal).
48. Christensen, L.K., Compt.rend.trav.lab.Carlsberg, Sér.Chem. 28(1952)37.
49. Linderstrøm-Lang, K., Hotchkiss, R.D. e Johansen, G., Nature 142(1938)996.
50. Linderstrøm-Lang, K., Cold Spring Harbor Symposia Quant.Biol. 14(1949)117; Chemical Abstracts 44:6901i.
51. Linderstrøm-Lang, K. e Møller, K.M., Ann.Rev.Biochem. 22 (1953)57.
52. Chrstensen, L.K., Nature 163(1949)1003.
53. Putman, F.W., "The Protein" (Ed. por H. Neurath e K. Bailey) (1953) vol. I,B, pág. 807.
54. Boyer, P.D., Lum, F.G., Ballou, G.A., Luck, J.M. e Rice, R. G., J.Biol.Chem. 162(1946)181.
55. Cann, J.R., J.Biol.Chem. 237(1962)707.
56. Klapper Jr. J.A. e Cann, J.R., Arch.Biochem.Biophys. 108 (1964)531.

57. Kekwick, R.A. e Cannan, R.K. Biochem.J. 30(1936)227.
58. Crammer, J.L. e Neuberger, A., Biochem.J. 37(1943)302.
59. Fevold, H.L., Advan.Protein Chem. 6(1951)187.
60. Gribbs, R.J., Bier, M. e Nord, F.F., Arch.Biochem.Biophys. 33(1951)345.
61. Michaelis, L. e Menten, M.L., Biochem.Z. 49(1913)333.
62. Lineweaver, H. e Burk, D., J.Am.Chem.Soc. 56(1934)659.
63. Cubin, H.K., Biochem.J. 23(1929)25.
64. Paiva, T.B. e Bergsten, G. (comunicação pessoal).
65. Schlamowitz, M. e Peterson, L.U., Biochem.Biophys.Acta 46(1961)381.
66. Kuhn, R., Z.Physiol.Chem. 125(1923)28 (cf. ref. 71, pág.122).
67. Bull, H.B. e Currie, B.T., J.Am.Chem.Soc. 71(1949)2758.
68. Cann, J.R. e Klapper Jr., J.A., J.Biol.Chem. 236(1961)2446.
69. Yasnoff, D.S. e Bull, H.B., J.Biol.Chem. 200(1953)619.
70. Laidler, K.J. e Barnard, M.L., Trans.Faraday Soc. 52(1956)497.
71. Laidler, K.J., em "The Chemical Kinetics of Enzyme Action" ed. pela Oxford University Press, em 1958 (págs. de 118 a 149).
72. Alberty, R.A., Advan. in Enzymol. XVII(1956)1, ed. pela Interscience Publishers, Inc.
73. Dixon, M. e Webb, E.C., em "Enzymes", ed. pela Longmans, Green and Co., Ltd., em 1958 (págs. de 120 a 133).
74. Alberty, R.A. e Massey, V., Biochem.Biophys.Acta 13(1954)347.
75. Némethy, G. e Scheraga, H.A., J.Phys.Chem. 66(1962)1773.
76. Tang, J., J.Biol.Chem. 240(1965)3810.
77. Pchelín, V.A., Izmailovna, V.N. e Bol'shova, G.P., Dokl. Akad.Nauk.SSSR 142(1962)950; cf. Chemical Abstracts 57:1274e
78. Pchelín, V.A., Izmailovna, V.N. e Bol'shova, G.P., Vysokomolekul.Soedin 4(1962)938; cf. Chemical Abstracts 58:14366e.
79. Clement, G.E. e Snyder, S.L., J.Am.Chem.Soc. 88(1966)5338.
80. Bull, H.B. e Breese, K., Arch.Biochem.Biophys. 120(1967)303.
81. Bull, H.B. e Breese, K., Arch.Biochem.Biophys. 120(1967)309.
82. Herriot, R.M., J.Gen.Physiol. 19(1935)283.
83. Herriot, R.M., J.Gen.Physiol. 20(1937)335.

84. Delpierre, G.R. e Fruton, J.S., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 54
(1965)1161.
85. Rajagopalan, T.G., Stein, W.H. e Moore, S., J.Biol.Chem. 241
(1966)4295.
86. Erlanger, B.F., Vratsanos, S.M., Wassermann, M. e Cooper, A.
G., J.Biol.Chem. 240(1965)PC3447.
87. Erlanger, B.F., Vratsanos, S.M., Wassermann, M. e Cooper, A.
G., Biochem.Biophys.Res.Comm. 23(1966)243.
88. Gross, E. e Morell, J.L., J.Biol.Chem. 241(1966)3638.
89. Bender, M.L. e Kézdy, F.J., Ann.Rev.Biochem. 34(1965)49.
90. Fruton, J.S., Fujii, S. e Knappenberger, M.H., Proc.Natl.
Acad.Sci.U.S. 47(1961)759.
91. Neumann, H., Levin, Y., Berger, A. e Katchalski, E., Biochem.
J. 73(1959)33.
92. Bender, M.L., Chow, Y-L., e Chloupek, F., J.Am.Chem.Soc. 80
(1958) 5380.
93. Eigen, M. e De Maeyer, L., Proc.Royal Soc.A. 247(1958)505.