

CURITIBA
1975

MECANISMO DE REAÇÃO DA L-FUCOSE DESIDROGENASE
DE *PULLULARIA PULLULANS*

NEREU JACINTHO MELLO DE SOUZA

Tese de Mestrado Apresentada ao
Departamento de Bioquímica da
Universidade Federal
do
Paraná

Tese orientada pelo
Prof. Dr. Luiz Alberto Silva Veiga

Í N D I C E

INTRODUÇÃO	1
MATERIAL & MÉTODOS.....	10
Planejamento.....	11
Reagentes.....	11
Microrganismo.....	12
Preparo do Extrato Livre de Células.....	12
Purificação	12
Métodos Analíticos.....	13
Estudo Termodinâmico.....	18
RESULTADOS & DISCUSSÃO.....	20
Fluxograma do Trabalho Realizado.....	20
Purificação da Enzima	24
Propriedades Termodinâmicas	24
Testes Cinéticos.....	28
Critério de Escolha do Método Empregado.....	28
Determinação da Constante de Velocidade da Reação.....	29
Evidências Cinéticas do Mecanismo.....	36
Evidência de Complexo Binário por Espectrofotometria: Diálise no Equilíbrio.....	40
Estudo Fluorimétrico.....	42
Espectro de Fluorescência do NADH	42
Espectro de Fluorescência para a L-Fucose Desidrogenase	45
Diminuição da Intensidade Fluorescente da L-Fucose Desidrogenase, Provocada Pelos Substratos Principais da Reação: "Quenching".	47
Considerações sobre o Provável Mecanismo	50

Paralelo com a Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase	52
Sumário.....	55
Referências Bibliográficas.....	56

I N T R O D U Ç Ã O

Ainda durante a década de 1950, um significativo número de trabalhos mergulhou da literatura especializada, reportando os processos de biossíntese da L-fucose, e de outros compostos que a contem como elemento estrutural, tanto em microrganismo, como em animais (1-12).

Paralelamente, com o trabalho de GREEN & COHEN (13) em 1953, foi iniciado o estudo do mecanismo de utilização da L-fucose como fonte de carbono, seguido este, por uma série de estudos relacionados com as possíveis vias de degradação oxidativa (14-23).

A isomerização da L-fucose a L-fuculose, foi primeiramente descrita por GREEN & COHEN (13) em extrato livre de *Escherichia coli*, crescida em meio mineral contendo L-fucose como única fonte de carbono. A subsequente fosforilação à L-fuculose -1-fosfato e a clivagem desta última em dihidroxi-acetona fosfato e L-lactaldeído, foi posteriormente demonstrada por MILLER & HUANG (14), e HEATH & GHALAMBOR (15,16), no mesmo microrganismo.

A presença de desidrogenases NAD dependentes para essa desoxihexose, tem sido recentemente observadas em tecidos animais (22,23), - que oxidam a L-fucose diretamente a ácido fucônico. Esses autores sugerem que a enzima seja a responsável pela primeira etapa da via oxidativa de degradação, possivelmente por um mecanismo análogo à via de ENTNER-DOUDOROFF WOOD (28), para a degradação de aldohexoses em bactérias.

Em fungos, o mecanismo oxidativo da L-fucose permaneceu totalmente obscuro, até que em 1962, VEIGA (18), verificou que *Pullularia pullulans* podia utilizar L-fucose como única fonte de carbono, não sendo constatada nenhuma das enzimas participantes da via de degradação encontrada em *E.coli*.

Em 1973, GUIMARÃES *et al* (19) descrevem pela primeira vez a ocorrência de uma L-fucose desidrogenase em fungo (*P. pullulans*), sendo obtida uma purificação parcial e estudadas algumas das propriedades da enzima, que mostrou ser NAD-dependente, aceitando somente L-fucose e L-galactose como substratos. O produto da reação foi identificado como sendo o ácido-L-fucônico, tendo como intermediário a L-fucono-1-5-lactona (28). As constantes de Michaelis para L-fucose e NAD, foram determinadas como sendo $2,87 \times 10^{-3}M$, e $1,08 \times 10^{-4}M$, respectivamente.

A literatura consultada não indicou nenhum estudo cinético exaustivo, nem tampouco com relação a mecanismo de reação, de reações catalizadas por L-fucose desidrogenases conhecidas (1-28). Somente em 1974, foi publicado um trabalho por BUESS *et al* (29), onde a cinética de uma D-arabinose (1-fucose) desidrogenase e extraída de fígado de porco, foi estudada em profundidade. A reação foi analisada sob o ponto de vista de um sistema de dois substratos e, com base principalmente em estudos inibitórios, foi proposto um mecanismo sequencial ordenado.

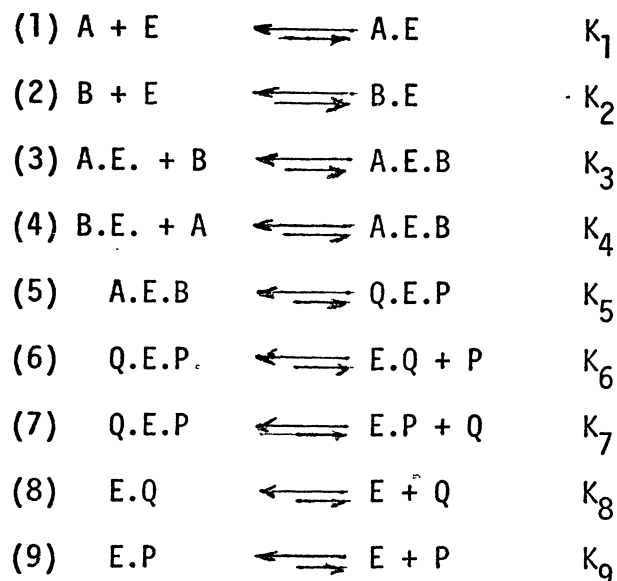
É proposição do presente trabalho, avaliar o mecanismo de reação da L-fucose desidrogenase de *P. pullulans*, catalizando uma reação de dois substratos. Este estudo, deve ser fundamentado principalmente, em critérios cinéticos e na constatação experimental de complexos intermediários da reação.

O enquadramento da reação, como um sistema bimolecular é oportuna, seja pelo fato de que são raras as reações enzimáticas unimoleculares (30), ou porque um estudo cinético dessa natureza pode fornecer informações quantitativas sobre o mecanismo envolvido (31). O sistema, quando encarado sob o aspecto simplista de um substrato-um produto, fica limitado a uma restrita e modesta idéia de mecanismo. Este aspecto, é amplamente observado por DIXON & WEBB (30).

A análise de um sistema de dois substratos, foi principalmente reportada por ALBERTY (31) e DALZIEL (32), mas os estudos de HUNTER & DOWNS (33), e KING & ALTMAN (34), também devem ser considerados.

Uma rigorosa e seleta revisão do tema, é oferecida por CLELAND (35), onde uma nomenclatura e uma sinonímia adequada foram propostas.

A análise levada a efeito por ALBERTY (31), com relação aos mecanismos mais prováveis de um sistema bimolecular, indicou uma série de mecanismos secundários possíveis, dentro do geral proposto, conforme mostra o esquema abaixo.



Dentro deste esquema geral, é sempre possível admitir vários mecanismos secundários, pelo menos hipoteticamente. Por exemplo, é possível que a sequência da reação, siga as etapas (1), (3), (5), (6), e (8). Ou, que todas as etapas sejam possíveis, com exceção da (7) e (9) e, assim por diante.

Um tratamento matemático destes mecanismos, considerando o sistema em "estado estacionário"*, fornece funções simples e lineares, quando representadas graficamente segundo LINEWEAVER & BURK (36).

**Um tratamento matemático efetuado nas condições de "estado estacionário", é fundamentado na hipótese, de que certos intermediários, tais como os complexos enzima substrato, não variem rapidamente em termos de concentração, tal que, sendo X a concentração de qualquer um desses intermediários, fique correto escrever*

$$\frac{dX}{dt} = 0$$

A e B são os substratos da reação, Q e P os produtos. A e Q no caso, podem ser as formas oxidadas e reduzida da coenzima. K_1, K_2, \dots, K_9 são as constantes de dissociação para as respectivas etapas, e E a concentração de enzima livre.

No entanto, o mecanismo geral quando analisado nessas condições (estado estacionário), não oferece relações lineares entre os recíprocos das velocidades e os recíprocos das concentrações dos substratos. Uma relação linear contudo é obtida, somente quando for considerado uma situação em que todas as etapas alcancem o equilíbrio rapidamente, exceto para a quinta etapa. A equação que exprime esta situação de rápido equilíbrio é apresentada por ALBERTY (31), - pode ser escrita:

$$-\left(\frac{dA}{dt}\right)_0 = -\left(\frac{dB}{dt}\right)_0 = \frac{V}{1 + K_A/A + K_B/B + K_{AB}/AB}$$

onde dA/dt ou dB/dt representam a velocidade inicial em termos de desaparecimento dos reagentes na unidade de tempo, K_A e K_B as constantes de Michaelis para os substratos A e B e, K_{AB} uma constante definida por ALBERTY, e que nesse caso especial de "rápido equilíbrio", $K_{AB} = K_1 \times K_2$, sendo V a velocidade máxima no sentido principal da reação.

A diferenciação dos diversos sub grupos de mecanismos, deve ser procedida através da utilização de certos critérios diferenciais, de uma maneira criteriosa e adequada. Dentre esses critérios, deve ser destacado a constatação experimental e direta dos possíveis complexos binários e ternários formados durante o curso da reação, principalmente porque será amplamente utilizado no decorrer deste trabalho.

A determinação experimental da existência e da natureza desses complexos, foi objeto de uma série de trabalhos, a maior parte deles reportando estudos envolvendo "desidrogenases" NAD ou NADP dependentes (37-47). Van EYS *et al* (39) realizaram diversos estudos em desidrogenases, caracterizando em cada um deles, um complexo de adição, resultante da combinação da enzima, coenzima, e de um composto nucleofílico.

As propriedades que possuem estas coenzimas quando reduzidas, em emitir radiações eletromagnéticas sob a forma de fluorescência, foram amplamente aproveitadas na caracterização desses complexos. A coenzima ligada a uma proteína, não possui necessariamente as mesmas propriedades fluorescentes, quando na sua forma livre. Na forma combinada, a intensidade fluorescente pode ser maior ou menor, e o espectro de excitação ou de fluorescência pode ser deslocado. (48).

As próprias propriedades fluorescentes da proteína, podem ser utilizadas na caracterização de complexos, mesmo sendo NAD o coenzima empregado, o qual não possui propriedades fluorescentes acentuadas, na faixa de emissão da proteína (46,47,48). Neste caso, o nucleotídeo pode interagir com a proteína, promovendo uma diminuição na intensidade fluorescente (quenching). Muitas reações cujas manifestações fluorescentes são enquadradas neste último tipo, representam específicas interações entre o composto fluorescente e o agente promotor do "quenching", sendo frequentemente, o único meio possível de ser detetada a combinação (48).

SHORE & PARDEE (49) foram os primeiros a reportar a fluorescência de proteínas altamente purificadas, bem como demonstraram que esta fluorescência é devida inteiramente aos amino-ácidos aromáticos tirosina e triptofano sendo que para a fenilalanina, a fluorescência é mínima. KONEV (50) mostrou para várias proteínas os dois picos característicos para o espectro de fluorescência, quando excitadas por radiações correspondentes a comprimento de onda de 280 μ . Um deles, a 313 μ relativo à tirosina, e o outro a 350 μ , correspondente ao triptofano. VELICK (46) verificou que para a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e para a lactato desidrogenase, ambas obtidas de músculo de cobaia, apresentavam um máximo de emissão aproximadamente a 350 μ , devido principalmente a fluorescência do triptofano.

Com relação ainda a constatação experimental de complexos, deve ser citado de maneira especial, o estudo realizado por CHANCE (51), que trabalhando com uma peroxidase (horseradish peroxidase) determinou por meios espectrofotométricos, não só a existência, como a concentração do complexo enzima-substrato, tendo sido o primeiro trabalho desta natureza a ser reportado.

Outros critérios contudo, devem ser referidos, como suporte na escolha ou diferenciação de mecanismos. A relação de HALDANE por exemplo (52), pode ser utilizada, sendo que neste caso a constante de equilíbrio deve ser avaliada independentemente e, confrontada com a "Relação de Haldane". ZEWE & FROMM (53), lançaram mão desse recurso, na tentativa de diferenciar três possíveis mecanismos, para a reação catalizada pela lactato desidrogenase de músculo de cobaia.

O "Critério de Dalziel" (32), permite uma diferenciação de mecanismos, por meio de uma análise cinética de oito constantes definidas por DALZIEL. Basicamente, DALZIEL examina os mesmos mecanismos estudados por ALBERTY (31), mas introduz na sua equação geral novos parâmetros cinéticos, de tal maneira que a equação possa ser escrita:

$$e/v_0 = \phi_0 + \phi_1/A + \phi_2/B + \phi_{12}/AB$$

onde ϕ_1 , ϕ_2 , ϕ_{12} são os parâmetros cinéticos introduzidos, sendo a concentração de enzima livre representada por "e". A e B são os substratos da reação.

A reação reversa é representada cineticamente por uma equação semelhante, onde P e Q seriam os substratos e os coeficientes cinéticos receberiam um sinal diferencial. DALZIEL apresenta uma série de igualdades, as quais relacionam os coeficientes cinéticos da reação principal com as da reação reversa. A análise dessas relações pode levar a uma diferenciação de mecanismos, principalmente quando suportada por um ou outro critério.

O "Critério de Inibição pelo Produto", introduzido por ALBERTY (31) e DALZIEL (32), tem sido bastante empregado na diferenciação de mecanismos (53,54,55). Em determinadas condições, a equação proposta por DALZIEL, pode ser escrita:

$$e/v_0 = \Delta_0 \phi_0 + \Delta_1 \phi_1/A + \Delta_2 \phi_2/B + \Delta_{12} \phi_{12}/AB$$

onde os valores de Δ_i são dependentes do mecanismo.

Finalmente, deve ser citado ainda o critério conhecido como "Efeito Isotópico". Este método é baseado no efeito que sofre os vários valores de ϕ_i da equação fundamental de DALZIEL, quando o hidrogênio é substituído de deutério em certos reagente e em determinadas e específicas condições (55). Em 1962, BAKER (56) utilizou este critério para uma análise de mecanismo da lactato desidrogenase.

Com relação aos testes cinéticos, o procedimento experimental que deve ser utilizado neste trabalho, é proposto por vários autores, estando FLORINI & VESTLING (57), FRIEDEN (58), DALZIEL (32), e SCHWERT & HAKALA (59), entre os principais.

Todos os métodos apresentados possuem aspectos comuns e, são fundamentados principalmente numa análise da equação da velocidade inicial em termos gráficos, onde se verifica a variação de um dos substratos, enquanto o segundo substrato permanece fixo em determinados níveis -- ambos variando sempre na mesma ordem de magnitude dos respectivos K_m . A formulação de DALZIEL é particularmente simples e sua interpretação em termos de mecanismo, foi discutida em profundidade por este autor. O método proposto por SCHWERT & HAKALA é diferenciado dos demais pela equação de velocidade em que se baseia, a qual foi proposta por SOCQUET & LAIDLER (59). A sistemática apresentada por FLO RINI & VESTLING pode ser encarada como uma extensão do método de DIXON (60), para sistemas inibitórios.

A aplicação desses métodos, permite então uma avaliação de alguns parâmetros cinéticos, bem como a idéia básica do provável mecanismo. Para a avaliação de alguns desses parâmetros - K_s ou outras constantes cinéticas DIXON (61) também sugeriu um método, especificamente para a avaliação de K_s , baseado num modelo gráfico. O método, original e elegante, é fundamentado em traçado de tangentes à curva hiperbólica de Michaelis-Menten. Esse método foi posteriormente modificado por SMITH-KYLROE (62) o qual eliminou o traçado de tangentes, por considerá-lo como possível fonte de erros. O modelo de DIXON, entretanto, parece sofrer certas restrições indicadas pelo próprio autor, e não parece ter sido utilizado até a presente data.

O propósito deste trabalho é principalmente avaliar o mecanismo de reação da L-fucose desidrogenase, ou pelo menos indicar um sub grupo particular de mecanismo, nos termos como apresentados por ALBERTY (31), os quais devem ser encarados como modelos simplificados (63).

Desses mecanismos possíveis, deve ser excluído "a priori", uma possível participação direta da enzima, isto é, o aparecimento de uma ligação estável enzima-hidrogênio (64). Através dos experimentos de VENNESLAND *et al* (65) foi confirmada a velha teoria de WIELAND (64), o qual lançou o conceito de "transferência direta", e que constitui o "dogma central" do mecanismo de hidrogenação.

A participação direta da enzima deve ser considerada como um evento de alta improbabilidade, apesar dos resultados encontrados por SCHELEMBERG (66, 67,68) o qual encontrou evidências de uma participação direta da álcool de hidrogenase de fígado, na transferência de hidrogênio - mas que praticamente constitui um caso isolado (68). Mesmo diante deste pouco provável evento, ALBERTY (31) trata matematicamente esta alternativa, onde a enzima pode ser oxidada e reduzida. Em princípio, de acordo com a idéia central do mecanismo de transferência de hidrogênio, esta deve ser direta e, pelo menos um complexo ternário deve ser formado, para que esta transferência seja facilitada.

As reações catalizadas por desidrogenases NAD ou NADP dependentes, são, na maioria das vezes, pertencentes a um determinado tipo de mecanismo (69): sequencial ordenado bi-bi, sem excluir no entanto o tipo de aleatório, ou randômico, sequencial bi-bi (mecanismo I de ALBERTY).

BLOONFIELD, PELLER & ALBERTY (70), analisando em termos de "estado estacionário" os múltiplos intermediários envolvidos em reações de dois substratos, "tipificaram" um modelo para desidrogenase. Com relação à possibilidade da não formação de complexos ternários durante o curso da reação, estes autores consideram um evento altamente improvável, por não proporcionar uma satisfatória descrição química de mecanismo. Em um trabalho posterior, ALBERTY *et al* (71), aplicam o modelo criado para uma série de reações, aceitas como pertencentes a um modelo único e especial: "mecanismo de desidrogenases".

Um breve e sucinto exame das propriedades termodinâmicas da reação será processada, através da equação de Arrhenius

$$\frac{d(\ln k)}{dT} = \frac{E_f}{RT}$$

onde k é referido à constante de velocidade da etapa responsável pela formação do complexo de mais alto conteúdo energético, E_f é a energia de ativação para a formação do complexo, R é a constante dos gases e T a temperatura na escala absoluta (72); a representação gráfica desta equação em

função dos recíprocos das temperaturas absolutas, permite uma estimativa da energia de ativação, a qual pode ser avaliada através do coeficiente angular da reta obtida. Consequentemente, fica também determinada a entalpia de formação do complexo (ΔH^\ddagger), por meio da relação:

$$\Delta H^\ddagger = E_f - RT$$

onde RT à temperatura de 30°C assume o valor aproximado de 600 cal (73).

Parece ser possível estabelecer algum paralelo entre a energia de ativação e o mecanismo de reação. As reações químicas, mesmo as catalizadas, são associadas com uma energia de ativação, a qual representa a mínima energia que o sistema deve adquirir, antes que ele possa sofrer mudanças apropriadas (72). A molécula ativada ou complexo, não só possui o mais alto conteúdo energético que qualquer outra molécula, como também esta energia extra deve estar localizada numa particular ligação, na qual a clivagem pode ocorrer subsequentemente.

Das várias alternativas pelas quais os reagentes são convertidos em produtos, a reação seguirá a via que envolve a mínima energia de ativação.

Uma típica reação enzimática, segundo EYRING *et al* (74), pode envolver os seguintes estágios: (a) difusão dos substratos para a superfície do catalizador, (b) adsorção, (c) reação na superfície catalítica, (d) desorção dos produtos e, (e) difusão. Cada um desses estágios segue a reação de ARRHENIUS, porém a velocidade global da reação fica determinada pela formação do complexo ativado de maior conteúdo energético.

M A T E R I A L & M É T O D O S

Salvo referência em contrário, as fases correspondentes ao crescimento de microrganismo e purificação da enzima, foram realizadas segundo GUIMARÃES (28). Todas as etapas do trabalho, inclusive os testes cinéticos e fluorimétricos foram realizados em pH 8,5. O termo "tampão", ou "sistema tampão" compreende o seguinte sistema: TRIS-HCl 0,05M, contendo EDTA na concentração de $2,5 \times 10^{-3}$ M e 2-mercaptoetanol na concentração de 10^{-3} M.

A determinação da concentração proteica em qualquer etapa, foi sempre segundo WARBURG & CHRISTIAN (75).

Alguns símbolos e letras devem ser frequentemente empregados durante a explanação do trabalho e são os seguintes:

FDH: L-fucose desidrogenase

A : NAD

B : L-fucose

P : L-fucono-1-4-lactona

Q : NADH

ADH: álcool desidrogenase

GPD: gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase

LDH: lactato desidrogenase

1- PLANEJAMENTO

Os testes a serem realizados durante a execução desse trabalho, podem ser esquematizados de uma maneira racional, segundo uma técnica relativamente moderna e de aplicação em qualquer setor que exija planejamento, controle e previsão (76,77). Esta técnica, conhecida pela sigla PERT/CPM (Pathway Evaluation Review Technique-Critical Path Method), pode ser resumida da seguinte maneira: todas as tarefas do trabalho, são consideradas "atividades", carentes de recursos, tais como tempo, material, recursos humanos, etc. Estas tarefas devem ser rigorosamente identificadas, e verificadas todas as dependências e inter-relacionamento existentes entre elas próprias, e os recursos necessários para executá-las. Estas atividades podem então ser dispostas numa ordem cronológica e de dependência física, de tal maneira que estas tarefas, simultâneas ou não, partam de um evento inicial e atinjam um evento final, segundo a sequência mais lógica. O esquema assim formado, uma espécie de rede onde os eventos são representados por círculos numerados e as tarefas por setas, deve indicar todo o trabalho a ser feito, acrescidas de informações úteis, tais como: (a) quais são as tarefas que podem ser executadas simultaneamente, (b) quais as tarefas cuja execução dependam fisicamente das anteriores, (c) as que dispensam recursos e denominadas como "tarefas fictícias", (d) os tempos prováveis de duração para cada uma delas, e (e) o caminho mais longo (caminho crítico) o qual deve merecer mais atenção do programador e executante, quando o tempo é um fator limitante.

As normas para o traçado da rede, as convenções e metodologia, foram segundo BELCHIOR (76).

2- REAGENTES

Todos os reagentes usados neste trabalho, estavam designados pelos seus fabricantes como quimicamente puros, salvo referência em contrário.

L-Fucose, nicotinamida adenina dinucleotídeo (sal dissódico, com 96% de pureza), dihidro-nicotinamida adenina dinucleotídeo (sal dissódico, com 98% de pureza), todos da Sigma Chemical Company. 2-mercaptoetanol, da Matheson Coleman. Tris (hidroximetil) amino metano da E. Merck. L-fucono-1-4-lactona, foi preparada segundo CLARK (78).

3- MICRORGANISMO

Amostras de *Pullularia pullulans* foram cedidas pela Dra. S.JOLY, Piracicaba, S.P. O microrganismo já adaptado ao consumo de L-fucose como única fonte de carbono (18), foi conservado em meio sólido mineral (1,75% de agar e 0,50% de L-fucose).

As condições de cultura em meio líquido mineral, foram ligeiramente modificadas daquelas descrita por GUIMARÃES (28): uma série de experimentos realizados, concluiu pela possibilidade do desenvolvimento da cultura, utilizando L-fucose na concentração de 0,25%, sem prejuízos significativos no rendimento.

As células crescidas então em meio mineral sólido, foram transferidas diretamente para frasco "erlenmayer" com 250 ml de meio mineral, contendo L-fucose na concentração de 0,25% e, incubadas aerobicamente a 28°C em agitador rotatório a 100 revoluções por minuto, durante 25 a 30 horas. Deste inóculo, alíquotas de 20 ml foram transferidas para frascos de 2 litros, contendo 500 ml de meio mineral com L-fucose a 0,25%. O meio mineral utilizado foi o descrito por VEIGA (79). L-Fucose na concentração de 25% foi esterilizada separadamente em vapor fluente e adicionada assépticamente ao meio mineral, em quantidade suficiente para uma concentração final de 0,25%.

4- PREPARO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS

Para cada preparação, 12 gramas (peso úmido) aproximadamente, de células congeladas, foram trituradas em gral com aproximadamente o mesmo peso em "glass beads" (Minnesota Mining & Manufacturing). O macerado foi suspenso em 25 ml de tampão e centrifugado (15.000g, 20 min., 4°C). A concentração proteica do extrato assim obtido (sobrenadante), foi determinada como sendo 7,6 mg/ml.

5- PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

Quantidade suficiente de solução de sulfato de protamina, pH 7, foi adicionada ao extrato bruto, de maneira a ser obtida uma concentração final de 0,3%. O precipitado foi separado por centrifugação (15.000g 20 min., 4°C).

Ao sobrenadante, foi adicionado sulfato de amônio sólido em duas etapas. Na primeira, a saturação em sulfato de amônio alcançou 40%, sendo desprezado o precipitado obtido por centrifugação (15.000g, 20 min., 4°C). Numa segunda etapa, a concentração em sulfato de amônio do sobrenadante obtido, alcançou 60% em saturação. O precipitado, obtido por centrifugação nas mesmas condições anteriores, foi dissolvido em 2,5 ml de tampão. Deste preparado enzimático obtido, 2 ml foram aplicados em coluna refrigerada de 2,0 x 60 cm de Sephadex G-100 (Pharmacia, Upsala) e a enzima eluída com o mesmo tampão, à 4°C.

As frações, de 2 ml cada, foram coletadas, e as duas frações obtidas com maior atividade específica foram reunidas, sendo a concentração proteica determinada como 0,326 mg/ml.

6- MÉTODOS ANALÍTICOS.

6-1: TESTES CINÉTICOS: Os testes cinéticos foram realizados num espectrofotômetro VARIAN TECHTRON UV-VIS MOD 635-D, com registrador acoplado. A velocidade da reação foi estimada em termos de NADH produzido, indicado pelo aparecimento de absorção a 340 m μ e assumindo como $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ o valor para o coeficiente de absorção molar do nucleotídeo, neste comprimento de onda. A velocidade inicial foi estimada pela quantidade de produto formado durante os três primeiros minutos. O sistema de reação, antes e durante as realizações dos testes, foi mantido sempre a $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$, por meio de um sistema circulante de água termostaticada.

6-1.1. Determinação da Constante de Velocidade de Reação. A equação

$$-\frac{dA}{dt} = -\frac{dB}{dt} = kC^n \quad (1)$$

para a qual dA/dt ou dB/dt indicam a taxa de variação dos substratos em relação ao tempo, k é a constante de velocidade (aparente) com relação a um dos substratos, C representa a concentração inicial com relação a um dos substratos, " n " a ordem de reação referente ao substrato em questão, quando representada segundo recomenda LAIDLER (80), fornece o valor de k pela intersecção das retas com o eixo dos logaritmos das velocidades. A equação em forma logarítmica, toma a forma geral

$$\log V = n \log C + \log k \quad (2)$$

A equação deve ser empregada com relação a ambos os substratos. Uma série de gráficos deve ser obtida, considerando um dos substratos fixos e o outro variável. Para qualquer um dos substratos tomado como fixo, C representa então a concentração inicial do substrato variável. Os valores de dA/dt ou dB/dt os quais em condições de "estado estacionário" correspondem também às quantidades de produto, dp/dt , formado por minuto, serão obtidas conforme detalhes do item posterior.

A constante k foi referida como uma constante "aparente", pois como é de se esperar pela forma da equação geral, esta é função da concentração do substrato fixo e da constante de velocidade da reação k' ; como pode ser observado pelo exame da relação (81):

$$\frac{dc}{dt} = k' A^a \cdot B^b \quad (3)$$

onde dc/dt indica a taxa de desaparecimento de um dos substratos em relação ao tempo, A e B são as concentrações dos substratos A e B; a e b representam a ordem de reação respectiva a cada substrato.

Da relação acima, é possível avaliar a constante de velocidade k' ; pela igualdade existente entre as relações (1) e (3), obtendo o seguinte

$$k_a = k' A^a \quad (4)$$

$$k_b = k' B^b \quad (5)$$

onde k_a e k_b são as constantes de velocidade aparentes quando os substratos fixos são A e B respectivamente.

As constantes k_a e k_b podem ser avaliadas através de uma série de experimentos correspondentes aos diversos níveis de substrato fixo utilizados; e o valor de k' determinado através das relações (4) e (5).

6-1-2. Verificação da Equação de ALBERTY.

As determinações de ordem cinética foram realizadas conforme as sugestões de FRIEDEN (58) e VESTLING (47). Os valores para as velocidades iniciais foram obtidos, obedecendo o seguinte critério: um dos substratos, o "substrato fixo" é ajustado para um valor inicial constante, enquanto a concentração do segundo substrato, o "substrato variável", deve variar na vizinhança da sua constante de Michaelis.

A partir desses valores, uma série de representações gráficas é obtida, segundo LINEWEAVER & BURK (36), cada uma das quais, representando uma diferente concentração do "substrato fixo". O papel de "fixo" e "variável" deve ser invertido numa segunda série de experimentos.

L-Fucose assumiu concentrações entre 1 e 5 mM e NAD como o segundo substrato variou entre 0,1 e 0,5 mM. O sistema de reação era constituído de 20 mM de tampão, 18 microgramas de enzima, NAD e L-fucose nas concentrações indicadas acima. O volume total do sistema era de 1 ml.

As leituras sempre foram efetuadas contra uma referência, onde a enzima foi substituída por água.

Não foi constatada a presença de endógenos na preparação enzimática.

6-2. TESTES ESPECTROFOTOMÉTRICOS

6.2.1. Complexo Binário. --- Diálise no Equilíbrio.

Foi montado um sistema para uma diálise no equilíbrio, com a finalidade de ser evidenciado um complexo binário tipo FDH.Q, segundo MAHLER & CORDES (82) e VESTLING (47). A membrana utilizada para a diálise, foi preparada da seguinte maneira (83): os sacos de diálise foram tratados em várias etapas. (a) fervura em água, (b) tratamento com Na HCO₃ 0,1N (c) lavagem em água, (d) tratamento com EDTA 10⁻³M, e (e) lavagem em água. Todas as etapas compreendem fervuras até à ebulição, durante 30 minutos, num volume total de aproximadamente 500 ml.

O tubo de diálise continha 72 microgramas de enzima, e tampão na concentração de 20 mM, num volume final de 1 ml. O tubo assim preparado, permaneceu "overnight" a 40C, em solução contendo 12,8 micromoles de NADH dissolvido em tampão (10 ml). Foi necessário um frasco controle de NADH dissolvido em tampão na mesma concentração da solução dializante, com a finalidade de ser observada uma possível alteração na concentração do NADH, durante o processo (84).

Os espectros das soluções dializante e controle, foram obtidas num espectrofotômetro VARIAN TECHTRON UV-VIS. MOD 635-D acoplado a registrador, sendo $3\frac{1}{3}$ cm/ min a velocidade do papel, abertura de 1 mu para a

fenda, velocidade de varredura igual a 50 mu/ min. As células utilizadas foram de quartzo, com 1 cm de caminho óptico.

6.3. TESTES FLUORIMÉTRICOS

6.3.1. Complexo Binário FDH.Q: Fluorescência do NADH

A experiência foi processada num espectrofluorímetro AMINCO SPF 125, em sala climatizada, à temperatura de aproximadamente 19°C. O procedimento experimental foi de acordo com os trabalhos de WINER & SCHWERT (40,44), THEORELL & LANGAN (45), e VESTLING (47).

Sucintamente, o método é fundamentado na possível mudança do espectro da solução que contem o composto fluorescente, quando este é ligado à proteína. A alteração espectral é observada, ou pelo deslocamento do pico máximo de fluorescência para regiões de menores comprimento de onda, ou pela alteração na intensidade de fluorescência.

Uma pequena modificação introduzida: foi constituído um sistema para Diálise no Equilíbrio, perfeitamente semelhante ao descrito no item anterior e os espectros devem ser referidos às amostras retiradas do saco de diálise (solução contendo a enzima) e da solução dializante. Os espectros obtidos são referidos à sistemas montados em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Foram utilizadas 14,4 microgramas de enzima, tampão na concentração de 20 mM, NADH na concentração de $1,65 \times 10^{-5}$ M (referente à solução dializante), e água suficiente para 2 ml. À título de comparação, - espectros referentes à enzima e tampão, também devem ser obtidos. A energia de excitação deve corresponder ao comprimento de onda de 340 mu, e a emissão deve ser registrada entre 400 e 500 mu.

6.3.2. Espectro de Fluorescência da L-fucose desidrogenase

As experiências foram montadas segundo VESTLING (47) e VELICK (46). O comprimento de onda de excitação foi de 280 mu e a emissão foi registrada entre 300 e 400 mu. As aberturas das fendas foram de 2 mm e 0,5 mm para a excitação e emissão, respectivamente. O aparelho utilizado foi um espectrofluorímetro AMINCO SPF 125 e a temperatura foi de aproximadamente 19°C, em sala climatizada.

As células utilizadas foram de quartzo, com 1 cm de caminho óptico.

Foram utilizadas 60 microgramas de enzima, tampão na concentração de 20 mM e água suficiente para 2 ml.

6.3.3. Complexo Binário FDH.A - "Quenching"

As propriedades fluorescentes da proteína, bem como a diminuição na eficiência da fluorescência (quenching), foram amplamente aproveitadas para a constatação de complexos binários. O método consiste em se poder comparar o espectro da proteína, com o espectro obtido para o sistema proteína ligada ao NAD (47).

O aparelho utilizado foi um espectrofluorímetro AMINCO SPF 125. As células eram de quartzo com 1 cm de caminho óptico e a experiência foi realizada a aproximadamente 19°C. A energia de excitação correspondeu a um comprimento de 280 mμ e a emissão foi registrada entre 300 e 400 mμ. As aberturas das fendas foram de 2 mm e 0,5 mm para a excitação e emissão, respectivamente. Os sistemas constituídos para a obtenção dos espectros continham 60 microgramas de enzima, NAD na concentração de 0,01mM, tampão na concentração de 20 mM e água suficiente para 2 ml.

6.3.4. Alteração da Fluorescência da Proteína, com a Variação de Concentração do Cofator;

Nas mesmas condições experimentais do item anterior, a alteração no "quenching" da proteína deve ser avaliada pela variação do NAD, assumindo este as seguintes concentrações: 0,05mM-0,1mM-0,25mM-0,5mM:0 volume total do sistema era de 2 ml e as quantidades de enzima, tampão e água, idênticas ao item anterior.

6.3.5. Evidência Fluorimétrica do Complexo FDH.L-Fucose.

Foram constituídos sistemas, com a finalidade de se evidenciar uma possível interação entre a enzima e o substrato principal da reação, L-fucose.

Os sistemas, montados em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, continham: 5,33 ug/ml de enzima, L-fucose na concentração de 10 mM, tampão na concentração de 20 mM e água em quantidade suficiente para 2 ml. Os espectros devem ser referidos aos sistemas contendo enzima, e L-fucose adicionada à enzima.

A obtenção de um espectro, referente a um sistema contendo tampão e L-fucose, também deve ser processada. As condições experimentais foram as mesmas dos itens anteriores.

7- ESTUDO TERMODINÂMICO

7.1. Energia de Ativação do Complexo.

Foi verificada a influência da temperatura sobre a velocidade de reação, através de experimentos realizados num espectrofotômetro - VARIAN TECHTRON UV-VIS MOD 635-D, acoplado a registrador. O sistema de reação continha NAD na concentração de 1 mM, L-fucose na concentração de 20 mM e tampão na concentração de 20 mM. Água foi adicionada em quantidade suficiente para 1 ml. O sistema, menos a enzima, foi pré incubado à temperatura desejada e a reação iniciada pela adição da enzima, sendo a velocidade registrada durante os três primeiros minutos. As temperaturas puderam ser rigorosamente controladas, por meio de um sistema circulante de água termostaizada, e o intervalo de variação, foi entre 24°C e 31°C. Concentração de enzima: 18 u g. Os resultados obtidos foram representados segundo ARRHENIUS (72,73), tal que o eixo das abcissas indicasse os logaritmos das velocidades, e o eixo das ordenadas, os recíprocos das temperaturas, na escala absoluta. O valor da energia de ativação E_f , foi avaliada pelo coeficiente angular da reta, obtida segundo a maneira descrita acima.

7.2. Estimativa da Entalpia de Formação do Complexo.

Conhecido o valor de E_f , a entalpia de formação do complexo pertencente a etapa determinante da reação pode ser avaliada pela relação (73):

$$\Delta H^\ddagger = E_f - RT$$

onde ΔH^\ddagger representa a entalpia de formação, R a constante dos gases, e T a temperatura expressa em graus Kelvin. A entalpia de formação foi verificada à temperatura de 30°C, sendo o produto RT à esta temperatura.

7.3. Estimativa do Valor do Q_{10}

O Q_{10} da reação, definido como "o quociente entre a velocidade da reação à temperatura $t+10$ e a velocidade a temperatura t ", foi estimado a partir da reta obtida segundo ARRHENIUS, pela determinação do quociente entre duas velocidades, sendo a primeira referente a uma temperatura de dez graus centígrados acima, com relação a segunda (73).

R E S U L T A D O S & D I S C U S S Ã O

1-FLUXOGRAMA DO TRABALHO REALIZADO.

Na figura 1 é apresentado um fluxograma do trabalho, segundo as normas e convenções do planejamento PERT/CPM(76), com a finalidade de introduzir um aspecto prático, utilizável para a maioria dos trabalhos desta natureza.

Esta técnica de planejamento, quando aplicada à purificação e estudo das propriedades de uma desidrogenase, já foi bastante discutida sob o ponto de vista teórico(77), porém ainda não foi aplicada a nenhum caso real.

O diagrama de flechas que é apresentado, constitui um quadro sucinto de atividades pertencentes ao trabalho, onde fica expressa a sequência de tarefas realizadas. Algumas das tarefas indicadas no diagrama e representadas por flechas, são tarefas somatórias, que englobam outras de menor vulto. Por exemplo, sob a denominação principal de "crescimento de células" (tarefas A e D da relação abaixo), está submetido uma série de atividades menores, tais como: preparo do meio mineral, esterilização, centrifugação, etc.

Os principais resultados que podem ser alcançados através de um planejamento desse tipo, são a determinação do tempo mais provável para a realização do projeto, e a indicação do "caminho crítico", isto é, aquele que deve merecer maior atenção por parte do pesquisador(77). No entanto, esses propósitos foram abandonados, principalmente pela dificuldade de obtenção de informações sobre tempo de duração referentes à várias atividades.

A relação abaixo mostra as tarefas principais do trabalho, designadas por letras maiúsculas do alfabeto, e uma descrição resumida das atividades, é também apresentada. No fluxograma, deve ser observado, que o evento nº6 constitui um marco importante para o trabalho, não só pelo númer

ro relativamente grande de tarefas simultâneas que partem deste evento, como também pela divisão que fica estabelecida, entre este trabalho e o anterior (28), no qual esta pesquisa teve a sua origem.

Deve ser dito também, que muitas tarefas executadas, porém não bem sucedidas-- tais como as tentativas empregadas na determinação de - complexos ternários - Não estão incluídos no diagrama. Evidentemente, quando a finalidade é outra, e melhor, quando positivamente o objetivo é traçar o planejamento no sentido global da palavra, também as tarefas mal sucedidas deveriam ser inseridas e seus tempos de duração, computados.

FLUXOGRAMA DO TRABALHO REALIZADO *

TAREFAS	DESCRIÇÃO SUMÁRIA
A	Crescimento de células, visando a possibilidade de uso de menores concentrações de açúcar, sem prejuízo apreciável no rendimento.
B	Testes preliminares cinéticos, com a finalidade de observar o sistema sob o ponto de vista de "dois substratos-dois produtos".
C	Preparo de material para a fase de purificação.
D	Crescimento celular (L-fucose a 0,25%)
E	Preparo de material e reagentes para testes. Montagem dos sistemas.
F	Purificação. Precipitação por sulfato de protamina, sulfato de amônio e cromatografia em gel.
G	Testes cinéticos.
H	Diálise no equilíbrio. Complexo binário.
I	Testes fluorimétricos para NADH
J	Testes fluorimétricos para a proteína.
K	Equação de Arrhenius: determinação da energia de ativação, entalpia e Q_{10}
L	Conclusões e discussão

* As atividades relacionadas acima como "principais", compreendem que outras tarefas estão subtendidas dentro da denominação principal. Assim por exemplo, "testes cinéticos", compreender: verificação da equação de Alberty e determinação da constante k'

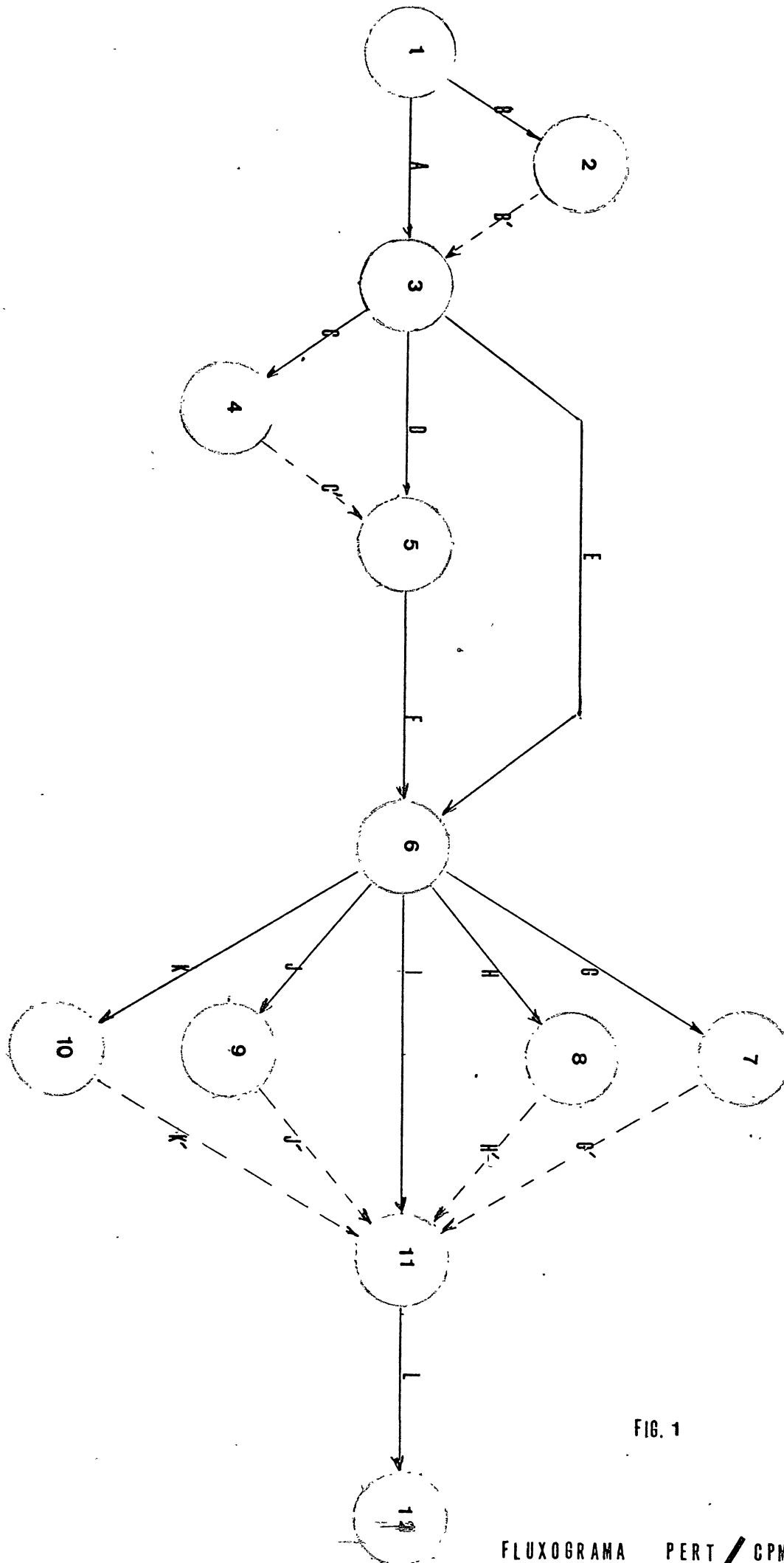


FIG. 1

FLUXOGRAMA PERT / CPM

2- PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

Após a eluição da enzima pela coluna de Sephadex G-100, as duas frações obtidas com maior atividade específica foram reunidas, e os cálculos indicaram uma purificação de aproximadamente 45 vezes.

3- PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS

A figura 2 mostra a variação da velocidade máxima de reação com a temperatura, representada segundo ARRHENIUS, devido à modificação do valor da constante de velocidade pertencente à etapa responsável pela formação do complexo enzima-substrato, ou "intermediário de Arrhenius"(72,73).

A equação fundamental representativa do processo, tal como foi apresentada na Introdução, pode tomar o seguinte aspecto:

$$\log V = E_f/2,3RT + \log C$$

onde V é a velocidade máxima da reação, em condições saturantes com relação a ambos os substratos.

A energia de ativação E_f , calculada a partir do coeficiente angular $E_f/2,3R$, da reta representativa da equação acima, é de aproximadamente 8.000 cal/mol, e a entalpia ΔH^\ddagger , estimada em 7.400 cal/mol.

Outra propriedade característica, Q_{10} , que foi definida como a "razão entre as velocidades máximas de reação, à temperatura $t+10$, e à temperatura t ", é estimada como 1,78. O valor de Q_{10} , embora tenha sido estimado através da reta obtida conforme mostra a figura 2, e esta não contém a faixa experimental de 10°C, concorda bastante com os resultados apresentados, quando pela primeira vez esta mesma enzima foi estudada(28); apesar dos objetivos e condições experimentais terem sido diferentes, o gráfico que foi apresentado possibilitaria uma estimativa do valor de Q_{10} em torno de 1,60, dentro da faixa experimental de 10°C.

Os valores de entalpia para formação de complexos, para reações enzimáticas, são em geral menores que 16.000 cal/mol, sendo que para certas enzimas esses valores são muito baixos, como é o caso da emulsina, estimado em 2.600 cal/mol(78).

O Q_{10} para a maioria das reações enzimáticas, escilam em torno de 2,0 (72). Q_{10} parece estar elacionado com a entalpia ΔH^\ddagger , de tal maneira que, para baixos valores de entalpia, corresponde baixos valores para Q_{10} (78) (73).

Assim, para a emulsina Q_{10} é 1,15 ($\Delta H^\ddagger = 2.600$ cal/mol), e para a invertase cuja entalpia é 7.400 cal/mol e que corresponde a um Q_{10} de 1,50.

A relação experimental que traduz esta interdependência entre Q_{10} e ΔH^\ddagger , é :

$$Q_{10} \approx e^{\Delta H^\ddagger / 18000}$$

sendo e, a base dos logaritmos naturais (83). Para a L-fucose desidrogenase, o valor de Q_{10} obtido por esta relação, é de 1,51.

Como foi dito na parte referente à INTRODUÇÃO, a energia de ativação pode estar relacionada com o tipo de mecanismo de reação, extendendo os conceitos aceitos para uma reação enzimática. Um valor de 3.000 cal para a energia de ativação, pode significar que a etapa determinante da reação seja o processo de difusão (72), ou se as observações sobre E_f indicarem uma variação quando variam também as relativas concentrações do substrato e catalizador, isto pode indicar as etapas de adsorção, ou desorção, como etapas determinantes. Para o caso da L-fucose desidrogenase, o valor para E_f está na mesma ordem de magnitude da maioria das reações enzimáticas. LAIDLER (86) apresenta uma tabela onde uma série de valores de E_f estão relacionados para diversas enzimas. No entanto, parece difícil relacionar esses valores com o provável tipo de complexo formado, i.é., binário ou ternário. Por exemplo, para algumas reações tipicamente unimoleculares, e que do ponto de vista de MICHAELIS (30) devem formar apenas complexos binários os valores de E_f são muito contraditórias a catalase, E_f foi estimado como sendo 1700 cal/mol (87), mas para a pepsina o valor é 20.700 cal/mol (86).

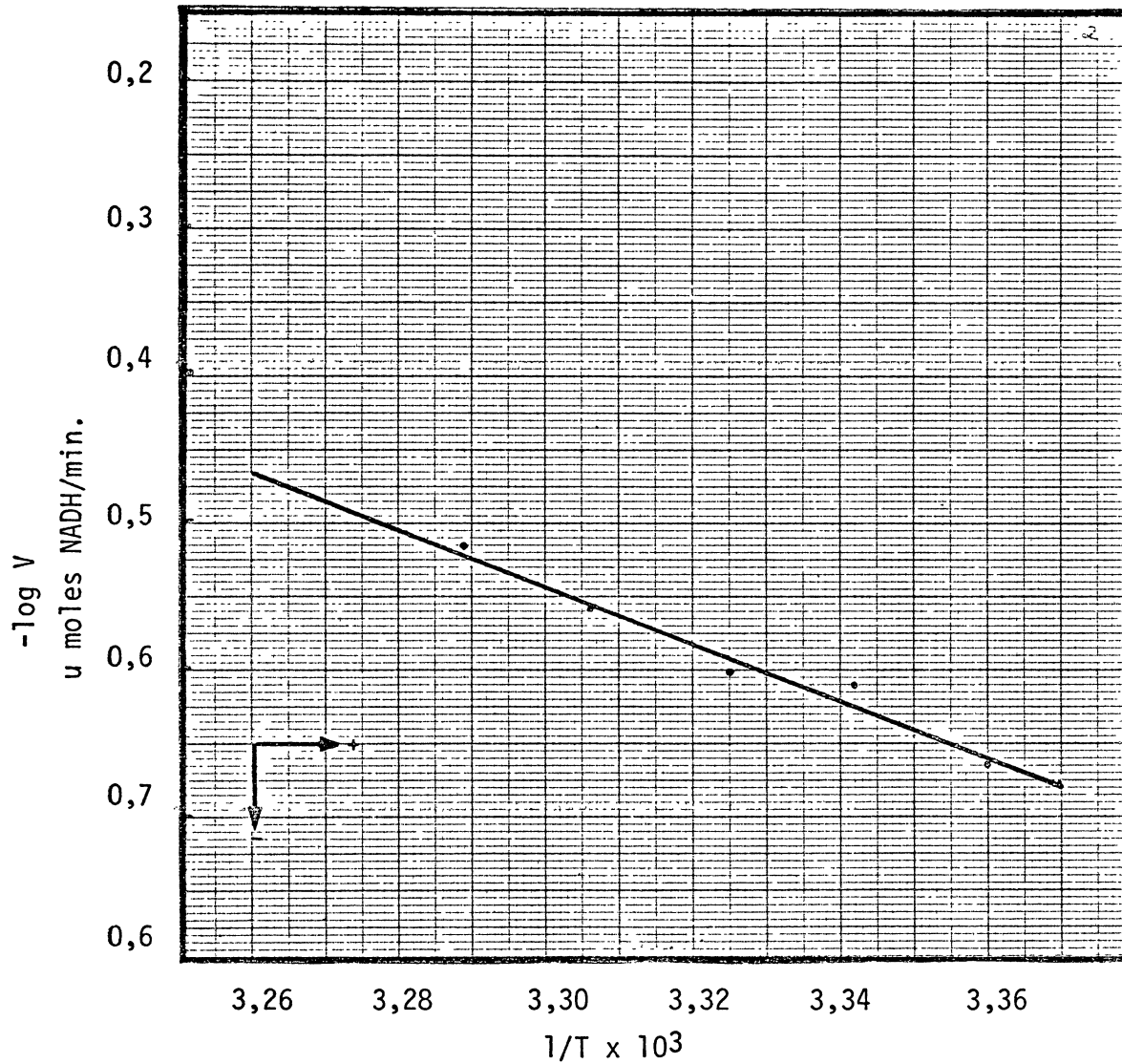
Seria interessante uma compilação bibliográfica, onde estatisticamente, fosse possível estabelecer alguma relação entre as reações que são cinética caracterizadas pela formação de complexos ternários e binários, com os valores de energia de ativação, para cada uma delas. Porém, os dados

compilados neste sentido, foram insuficiente para qualquer conclusão.

Com relação à natureza do complexo formado, parece existir alguma confusão sobre o exato significado de "intermediário de Arrhenius". Segundo SIZER (72), THEORELL *et al* (87), e LAIDLER (86), a energia de ativação é referente à etapa de formação do complexo enzima substrato ES, enquanto DAWNS (73) distingue bem uma fase que antecede a formação do complexo ES e que determina a energia de ativação total da reação, por conseguinte a etapa determinante da reação, conhecida como "complexo em estado de transição".

O valor de E_f para sistemas enzimáticos é um dado característico para a enzima, independe do substrato e é constante para uma faixa de temperatura, relativamente grande, até que seja alcançado o valor da temperatura de inativação da enzima (88).

FIG.2: DETERMINAÇÃO DE ALGUMAS PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS.-
GRÁFICO DE ARRHENIUS.



Sistema de Reação(1 ml): enzima, NAD, L-fucose, tampão e água. as quantidades utilizadas, foram:enzima, 18 microgramas;NAD, 1 mM;L-fucose, 20 mM; tampão, 20 mM, e água em quantidade suficiente.A temperatura variou entre 24 e 31º C, estando indicada na figura, na escala absoluta.

4- TESTES CINÉTICOS

4.1. Critério de Escolha do Método Empregado

Parece ser necessário considerar alguns aspectos sobre o método experimental empregado, visto que, o número destes é relativamente grande. Pode, até certo ponto, parecer indiferente a referência ao método empregado, pois todos os consultados guardam bastante semelhança entre si. De qualquer maneira, a maioria destes trabalhos são referidos sempre às equações de ALBERTY (31).

Por exemplo, o método apresentado por FLORINI & VESTLING (57), estabelece certo procedimento baseado na equação de ALBERTY e também em suas próprias sugestões.

DALZIEL (32) equaciona os mesmos mecanismos abordados por ALBERTY, apresentando funções perfeitamente equivalentes. Sua originalidade reside no fato de sua equação fundamental ser expressa em termos de coeficientes cinéticos, não dependentes das constantes de Michaelis. A conveniência do uso desta equação parece óbvia, pois uma análise cuidadosa destas constantes pode levar a uma diferenciação de mecanismo, desde que os dois sentidos da reação sejam estudados. No entanto, a enzima utilizada deve estar num estado absoluto de pureza, devendo ainda ser conhecido seu peso molecular, bem como o número de sítios ativos.

FRIEDEN (58) apresenta sugestões bastante semelhantes às anteriores. Nosso trabalho é referenciado principalmente nos estudos de FRIEDEN, visto que, este coloca em segundo plano o estado de pureza da enzima; não é essencial que a enzima esteja na sua forma absolutamente pura "desde que, fique certo que os contaminantes possíveis, não exerçam efeitos sobre a velocidade de reação." Os gráficos obtidos segundo as sugestões de FRIEDEN, podem trazer também esclarecimentos sobre o mecanismo de reação, pois o fundamento básico do seu método é a equação de ALBERTY.

A preparação enzimática obtida, indicou uma purificação de aproximadamente 45 vezes com relação à L-fucose desidrogenase, sendo portanto necessário considerar os eventuais contaminantes, nos termos observado por FRIEDEN. Os testes de endógeno realizados e a característica do gráfico obtido segundo ARRHENIUS, parece indicar o afastamento desta possibilidade. Este

tipo de gráfico, segundo SMITH (89), pode ser utilizado como critério de ausência de reações paralelas, que possam afetar as medidas de velocidades.

4.2. Determinação da Constante de Velocidade k' da Reação

O método analítico empregado neste trabalho, para a determinação da constante de velocidade k', parece ser original, não tendo a literatura consultada, indicado nenhum processo semelhante.

A tabela I mostra a dependência da velocidade de reação, quando o cofator assume valores diferentes para cada experimento. Idêntica observação é válida, quando L-fucose é o substrato fixo, conforme indica a tabela II. As figuras 3 e 4 são curvas representativas da equação

$$dP/dt = kC^n$$

em função dos dados das tabelas I e II, os quais foram tomados como dP/dt, e C é referido como a concentração inicial do substrato variável. Um breve exame das figuras 3 e 4, pode indicar que a constante k é aparente, e depende da concentração do substrato fixo.

As constantes de velocidades (pseudo constantes), são então representadas pelos vários segmentos do eixo das velocidades, ou melhor, pelos coeficientes lineares das várias retas. Os valores destes segmentos foram encontrados analiticamente, em função da equação da reta encontrada para cada concentração de substrato fixo.

As tabelas III e IV abaixo, mostram as equações encontradas, bem como os valores encontrados para as constantes de velocidade k e k'. Nas tabelas abaixo, deve ser lembrado que k corresponde a k_a ou k_b , dependendo de ser A ou B o substrato fixo. Deve ser observado ainda que as velocidades referidas nas tabelas I e II são velocidades iniciais, e que portanto a reação foi considerada como totalmente irreversível, para efeitos de cálculo.

TABELA I: Variação da Velocidade da Reação Catalizada pela L-Fucose Desidrogenase, em Quantidades Sub-Saturantes do Substrato fixo (NAD)

velocidade de reação: μ moles de NADH/min.

L-Fucose 10 ⁻³ M	NAD x 10 ⁴ M			
	1,0	3,0	4,0	5,0
1,0	0,0324	0,0630	0,0824	0,1175
2,0	0,0428	0,0800	0,1060	0,1390
3,0	0,0487	0,0870	0,1075	0,1640
4,0	0,0515	0,0952	0,1125	0,1560
5,0	0,0540	0,0980	0,1175	0,1610

O sistema de reação (1 ml) continha: 1 μ g microgramas de enzima, tampão na concentração de 20 mM, NAD e L-fucose nas quantidades indicadas acima. A velocidade da reação foi medida em termos de micromoles de NADH formado por minuto. Temperatura de reação, 30 \pm 0,5 $^{\circ}$ C.

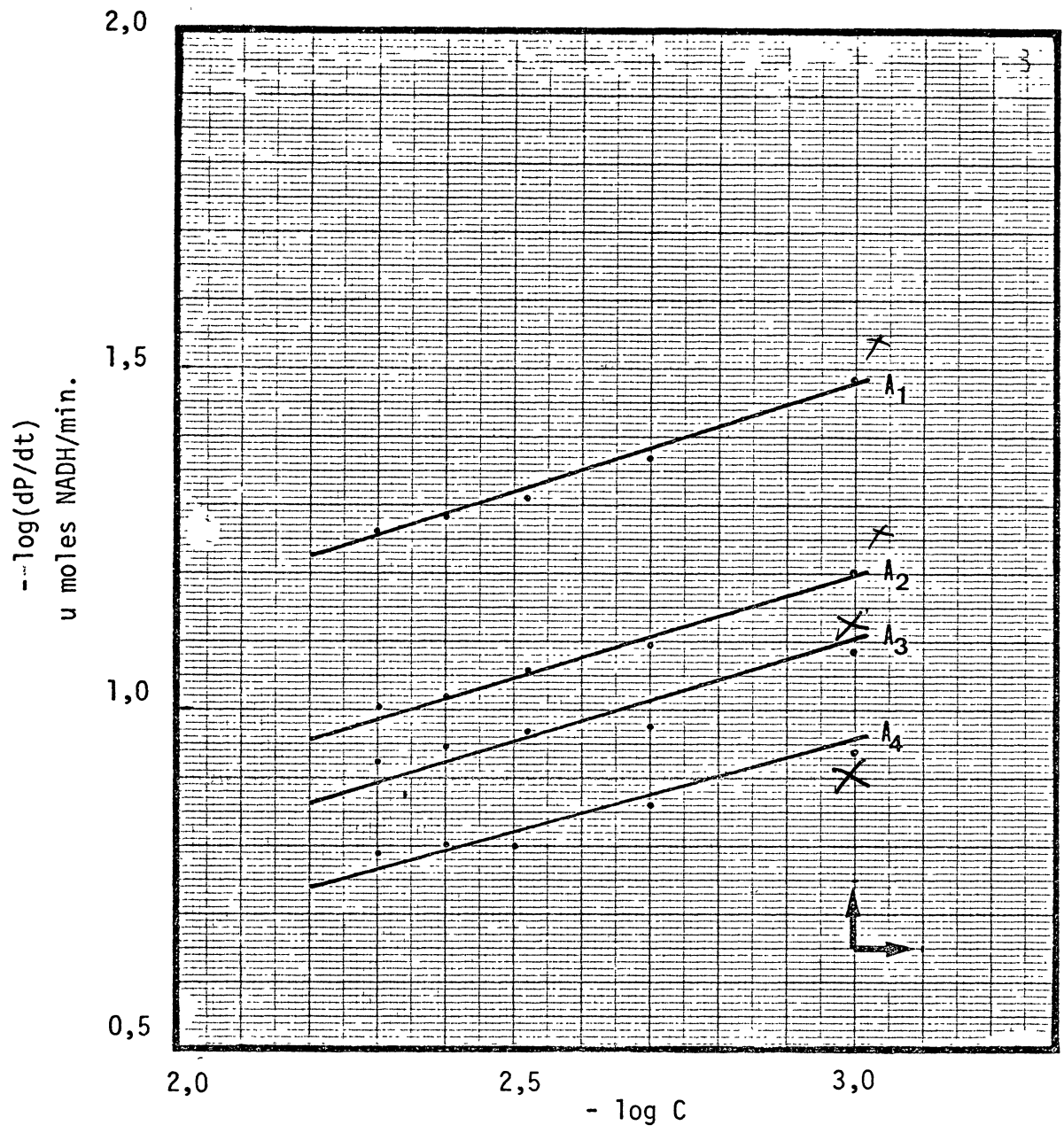
TABELA II: Variação da Velocidade da Reação Catalizada pela L-Fucose Desidrogenase, em Quantidades Sub-Saturantes do Substrato Fixo.

velocidade de reação: umoles de NADH/min.

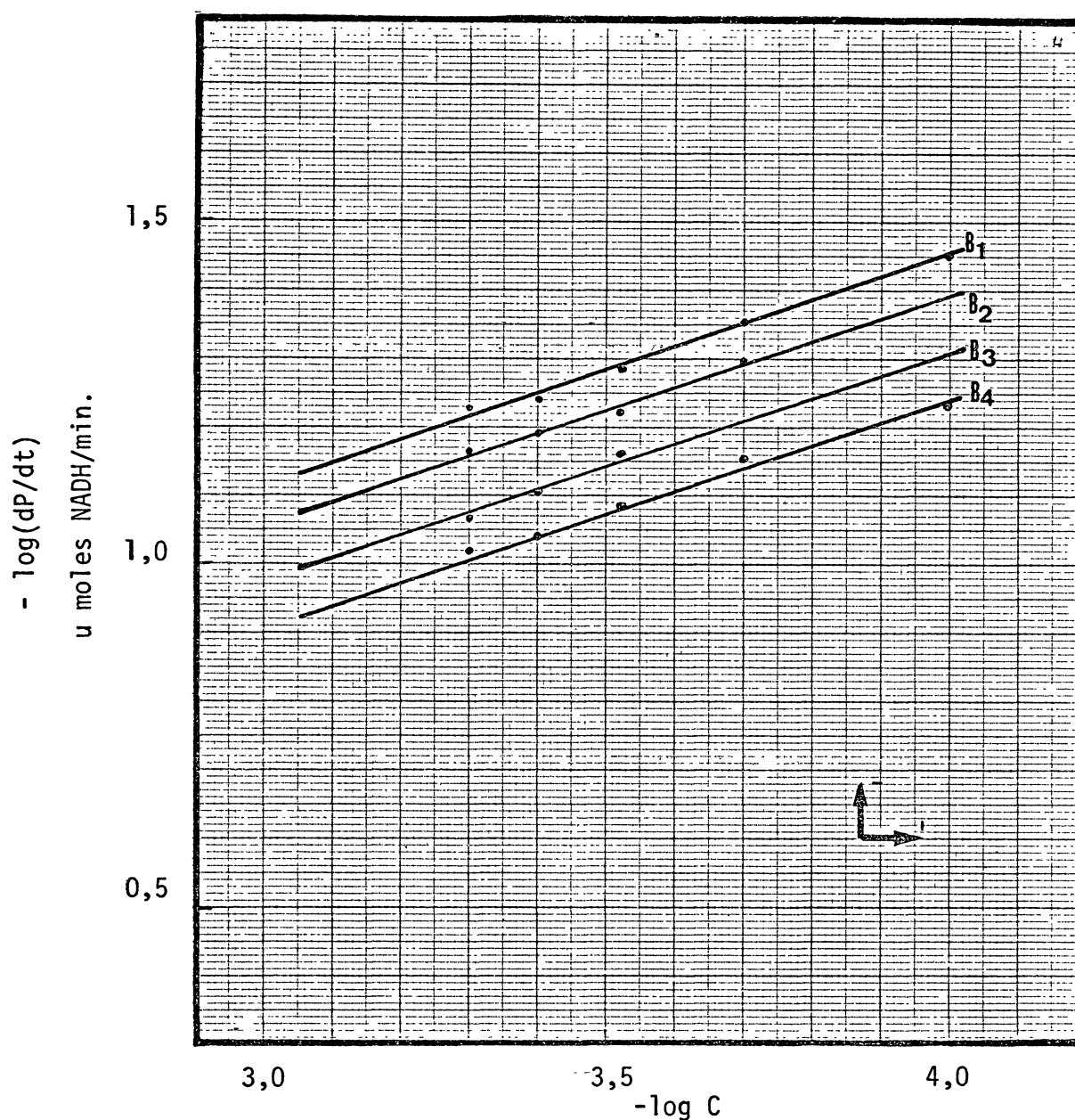
NAD $10^{-4}M$	L-Fucose x 10^3M			
	2,0	3,0	4,0	5,0
1,0	0,0320	0,0350	0,0425	0,0595
2,0	0,0446	0,0500	0,0614	0,0695
3,0	0,0520	0,0600	0,0690	0,0825
4,0	0,0580	0,0645	0,0781	0,0925
5,0	0,0595	0,0680	0,0865	0,0960

Na tabela acima, L-Fucose é o substrato fixo. O sistema de reação (1 ml) continha: 18 microgramas de enzima, tampão na concentração de 20 mM, NAD e L-Fucose nas quantidades indicadas acima. A velocidade da reação foi medida em termos de micromoles de NADH por minuto. Temperatura de reação, $30 \pm 0,5^{\circ}C$.

FIG.3: VARIAÇÃO DA CONSTANTE k_a . (SUBSTRATO FIXO: NAD).



Representação grãfica dos dados obtidos na tabela I,segundo a relação $\log dP/dt = \log k + n \log C$. NAD assumiu as seguintes concentrações: A_1 (0,1 mM), A_2 (0,3 mM), A_3 (0,4mM) e A_4 (0,5 mM). L-Fucose variou entre 1 e 5 mM. Os sistemas de reação (1 ml), continham:18 microgramas de enzima, tampão 20 micromoles, e agua. Os substratos assumiram as concentrações indicadas acima.Temperatura de reação, $30 \pm 0,5^\circ C$.

FIG.4: VARIAÇÃO DA CONSTANTE k_b . (SUBSTRATO FIXO:L-Fucose).

• Representação gráfica dos dados obtidos na tabela II, segundo a relação $\log d(P)/dt = \log k + n \log C$. L-Fucose assumiu as seguintes concentrações: B_1 (2 mM), B_2 (3 mM), B_3 (4 mM) e B_4 (5 mM). NAD variou entre 0,1 mM e 0,5 mM. Os sistemas de reação (1 ml), continham: 18 microgramas de enzima, tampão 20 micromoles, e água. Os substratos assumiram as concentrações indicadas. Temperatura da reação, $30 \pm 0,50$ C.

TABELA III: Variação da Constante de Velocidade Aparente k , em Função da Concentração de NAD.

I NAD I 10^{-4} M	Equação da reta	$\log k_a$	k_a	k'
1,0	$y = 0,33x - 0,500$	-0,500	0,316	6,80
3,0	$y = 0,33x - 0,190$	-0,190	0,645	9,80
4,0	$y = 0,33x - 0,130$	-0,130	0,740	10,00
5,0	$y = 0,33x - 0,010$	-0,010	0,975	12,20

x e y correspondem a $\log(dP/dt)$ e $\log C$ respectivamente, com relação à figura 3, e a constante k' foi calculada como segue no texto. L-Fucose variou de 1 a 5 mM.

TABELA IV: Variação da Constante de Velocidade Aparente k , em Função da Concentração de L-Fucose.

I L-Fucose I 10^{-3} M	Equação da reta	$\log k_b$	k_b	k'
2,0	$y = 0,33x - 0,130$	-0,130	0,740	5,88
3,0	$y = 0,33x - 0,070$	-0,070	0,850	5,90
4,0	$y = 0,33x + 0,010$	0,010	1,020	6,45
5,0	$y = 0,33x + 0,090$	0,090	1,230	7,22

x e y correspondem a $\log(dP/dt)$ e $\log C$ respectivamente, com relação à figura 4, e a constante k' foi calculada como segue no texto. NAD variou entre 0,1mM e 0,5mM.

A constante de velocidade k' , é avaliada a partir da equação geral de velocidade

$$dP/dt = k'A^a.B^b$$

sendo a e b a ordem de reação com relação aos respectivos substratos e, no presente caso, $a = b = n = 1/3$. Na equação acima, os fatores $k'A^a$ ou $k'B^b$, podem então ser identificados como k_a ou k_b respectivamente, que são as constantes aparentes, perfeitamente identificáveis com a constante k da equação

geral,

$$dP/dt = kC^n.$$

Os sub-índices a e b apenas relacionam a constante aparente k, quando A ou B são os substratos fixos. Então, por intermédio das tabelas acima apresentadas, conhecidos os valores para k_a e k_b , e assumindo A e B os valores correspondentes como substratos fixos, k' pode ser estimado pelas relações k_a/A^a ou k_b/B^b . O valor encontrado para k' foi de 8,04* e que responde a uma média aritmética dos resultados encontrados pelas duas tabelas mmh

À título de ilustração, este valor encontrado para k', quando levado à equação

$$dP/dt = k' \cdot A^{1/3} \cdot B^{1/3}$$

indica resultados coerentes com as tabelas I e II. Por exemplo, para NAD e L-fucose assumindo as concentrações de $3 \times 10^{-4}M$ e $3 \times 10^{-3}M$ respectivamente, a velocidade obtida é de 0,0781 micromoles de NADH/min.. O valor obtido, não difere substancialmente daquele indicado pela tabela I(0,0870) e pela tabela II(0,0600).

k' também pode ser estimado, pelo uso das seguintes equações,

$$\log k_a = a \log A + \log k'$$

$$\log k_b = b \log B + \log k'$$

as quais, quando representadas graficamente, podem fornecer o valor de $\log k'$, pela intersecção da reta com o eixo das ordenadas, sendo o ponto de intersecção, comum para ambas as retas.

Parece haver uma sensível diferença entre a constante de velocidade k' para uma reação enzimática e para uma reação não catalizada. Enquanto esta última depende apenas da temperatura, a primeira depende também da quantidade de enzima utilizada, tal que seja possível escrever

*A constante de velocidade k' possui as dimensões de (concentração)^{1/3} (tempo)⁻¹ e que por uma questão de simplificação, será omitida durante a explanação do texto.

$$k' = k^* \cdot f$$

onde f é um fator qualquer dependente da concentração de enzima, e k^* uma nova constante, e que deve ser considerada como o objetivo principal do método sugerido, pois parece ser característica para a reação e depende apenas da temperatura da reação.

f deve ser então relacionado com a concentração de enzima utilizada, e será identificado como "unidades de enzima" empregadas, sendo uma unidade de L-fucose desidrogenase, "a quantidade de enzima capaz de catalizar a redução de 1 micromol de NAD por minuto", em condições especificadas(28).

Desta maneira, sendo f as unidades de enzima utilizadas, e tendo sido empregado nos experimentos 0,020 unidades (o preparado enzimático continha 0,395 unidades/ml), a constante k^* assume o valor

$$k^* = 4,02 \times 10^2 \text{ unidades}^{-1}$$

4.3. Evidências Cinéticas do Mecanismo

As tabelas I e II mostram a concordância dos dados experimentais obtidos, com a equação geral de ALBERTY. As figuras 5 e 6 são respectivamente, os resultados das tabelas I e II, quando representados segundo LINEWEAVER & BURK(36).

A falta de paralelismo entre as retas exclue portanto um tipo de mecanismo "ping-pong"(69). Três tipos de mecanismos são compatíveis com as figuras: (a) uma sequência obrigatória de adição entre os substratos e a enzima, envolvendo dois complexos binários, (b) uma sequência obrigatória de adição envolvendo dois ou mais complexos terciários e (c) um tipo de mecanismo aleatório (randômico) onde a enzima pode combinar com qualquer um dos substratos, indistintamente, levando à formação de quatro complexos binários e dois complexos terciários, ou mais(31,32,53).

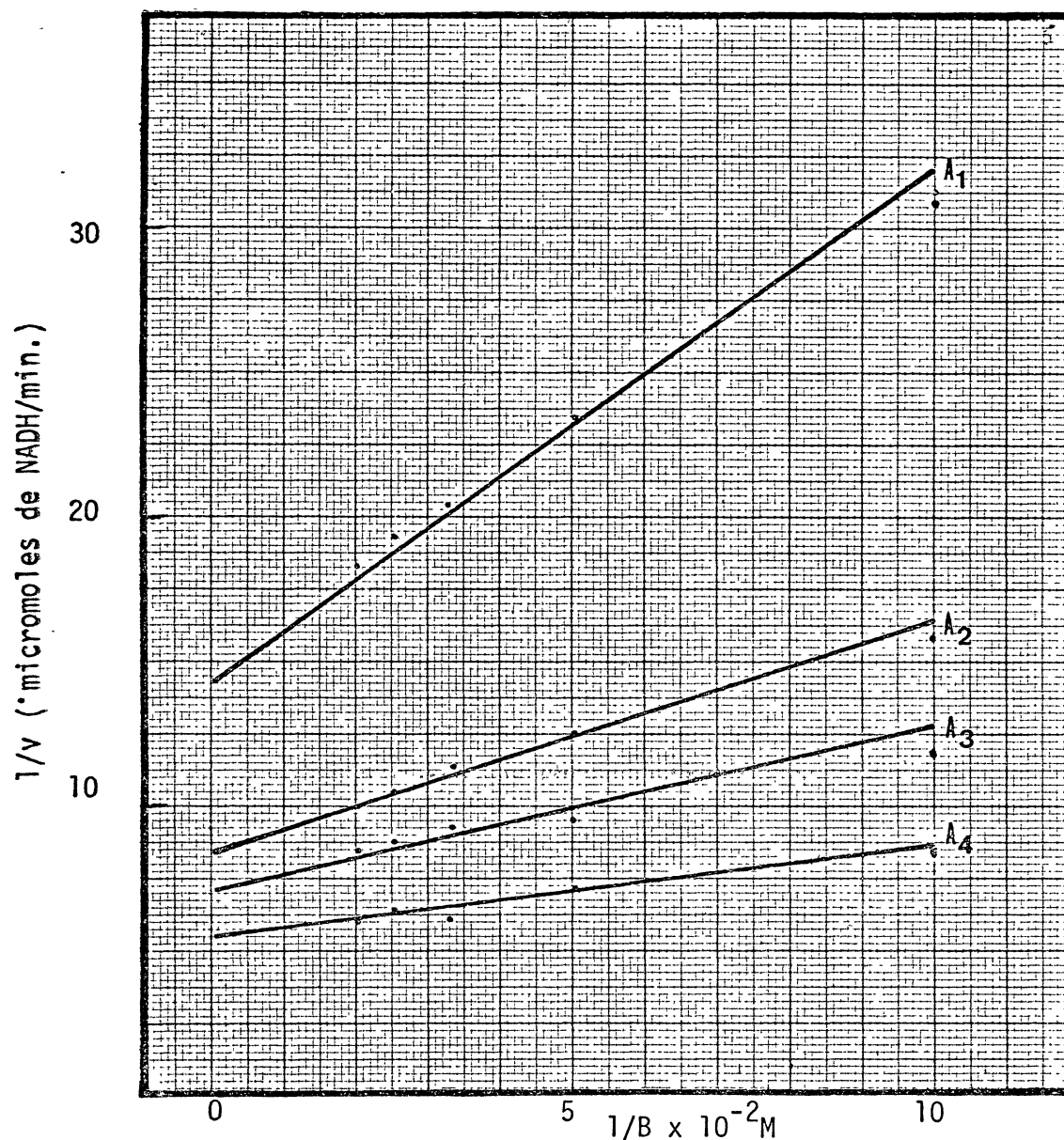
O critério adotado em geral, para uma diferenciação destes mecanismos, é fundamentado em estudos de inibição pelos produtos(54,55). A confrontação com o "Critério de Haldane" é teoricamente aceitável, mas por

mas por envolver um certo número de constantes pode levar a resultados falsos(52), e principalmente para este caso especial onde a constante de equilíbrio da reação deve ser avaliada, e para esta ainda não foi demonstrada a reversibilidade(28). FROMM *et al*(53), utilizando este critério no sentido de diferenciar o mecanismo da lactato desidrogenase de músculo de co-baia, encontrou resultados ambíguos.

O produto imediato da reação foi admitido (28) como sendo a L-fucono-1-5-lactona, a qual seria espontaneamente hidrolizada para ácido fucônico, evento este, que dificulta um estudo de inibição por este produto. A reação pode ser estudada e o foi, apenas com relação à inibição pelo NADH, cujo resultado indicou uma inibição linear competitiva quando o NAD era substrato variável e, uma inibição não competitiva, quando L-fucose era o substrato variável, mesmo em quantidades saturantes do cofator.

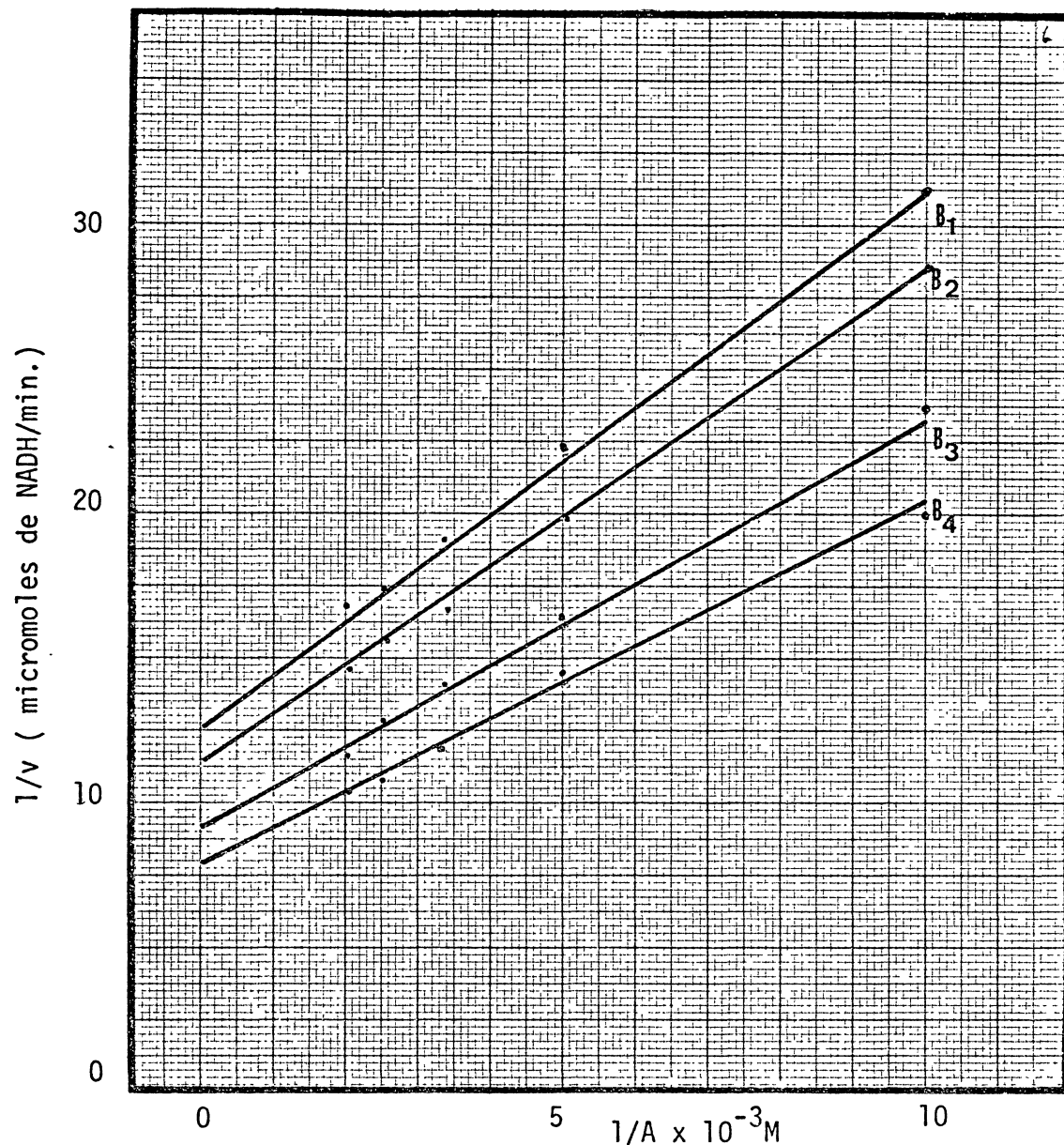
Segundo CLELAND (35), estes resultados são consistentes com os três padrões de mecanismos citado anteriormente. A diferença fundamental entre os dois primeiros tipos e o último, é que neste não existe uma ordem ou sequência na adição dos substratos à enzima (31). O mecanismo de Theorell Chance, por sua vez, não admite a existência de complexos ternários cineticamente distinguíveis (31,32). Portanto, a escolha do mecanismo adequado fica dependente da obrigatoriedade ou não da ordem de adição dos substratos e da natureza e número de complexos intermediários.

FIG.5: VERIFICAÇÃO DA EQUAÇÃO DE ALBERTY (SUBSTRATO FIXO NAD)



Representação gráfica dos resultados obtidos na tabela I. Sistema de reação (1 ml): enzima, NAD, L-fucose, tampão e água. NAD assumiu as seguintes concentrações: A₁ (0,1mM), A₂ (0,3mM), A₃ (0,4 mM) e A₄ (0,5 mM). L-Fucose variou entre 1 e 5 mM. Tampão sempre esteve presente na concentração de 20 mM. Quantidade adicionada de enzima: 18 microgramas. Temperatura de reação, 30 ± 0,5° C.

FIG.6:VERIFICAÇÃO DA EQUAÇÃO DE ALBERTY(SUBSTRATO FIXO, L-FUCOSE).



Representação gr̃afica dos resultados da tabela II.Sistema de reaçaõ(1 ml):enzima, NAD,L-fucose, tampãõ e agua. L-Fucose assumiu as seguintes concentrações: B_1 (2mM), B_2 (3mM), B_3 (4 mM) e B_4 (5 mM). NAD variou entre 0,1 e 0,5mM. Tampãõ sempre esteve presente na concentraçãõ de 20 mM. Quantidade adicionada de enzima,18 microgramas. Temperatura de reaçaõ, $30 \pm 0,5^\circ C$.

5- EVIDÊNCIA DE COMPLEXO BINÁRIO POR ESPECTROFOTOMETRIA- DIÁLISE NO EQUILÍBRIO.

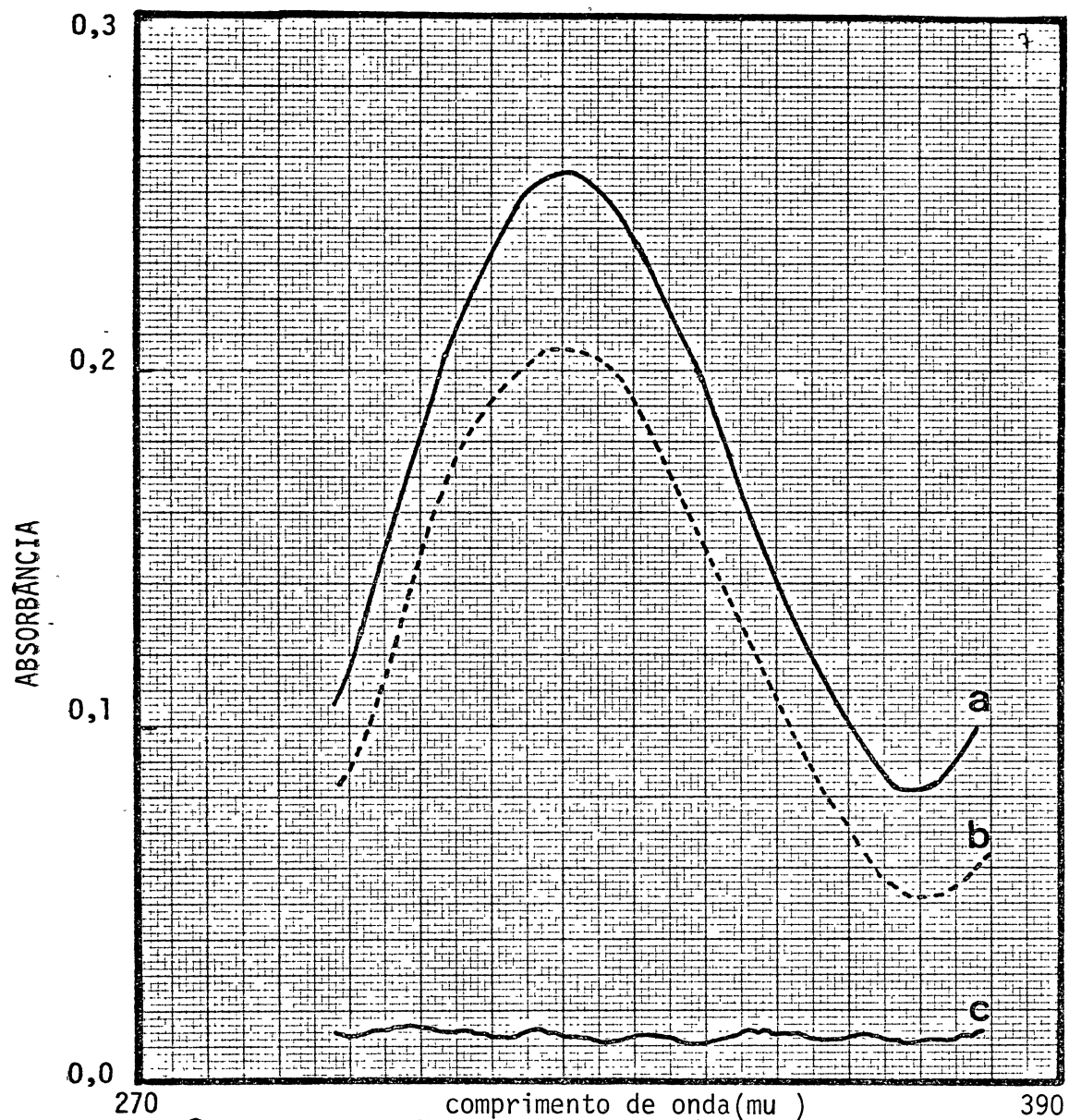
As tentativas empregadas no sentido de se demonstrar a existências de complexo FDH.Q por meios espectrofotométricos, baseadas nas sugestões de Van EYS *et al* (37) e FROMM (42), não obtiveram sucesso. No entanto, como mostra a figura 7, quando a técnica de diálise no equilíbrio é empregada, fica evidente a interação entre a enzima e NADH.

Na figura 7, a curva superior representa o espectro da solução controle, contendo apenas NADH na concentração de 0,205 micromoles/ml, tampão e água. A curva inferior é referida à solução dializante, contendo somente NADH em tampão, na concentração de 0,181 micromoles/ml. A diferença entre as duas absorções máximas mostra a interação existente, como pode também indicar a quantidade de NADH ligado.

O valor de 0,181 micromoles/ml, indicado como a concentração de NADH na solução dializante, foi calculado levando em consideração o efeito de diluição, provocado pela introdução do saco de diálise; porém, não foi levado em consideração os efeitos devido ao Equilíbrio de Donnan.

Estes resultados indicam que a interação entre a enzima e NADH é possível, sem a necessidade da presença de um segundo substrato.

FIG.7: COMPLEXO BINÁRIO FDH-NADH. DIÁLISE NO EQUILÍBRIO



Evidência de formação de complexo binário. Os sistemas estão assim constituídos (volume, 1 ml): (a), NADH (solução controle), tampão e água; (b), NADH (sol. dializante), tampão e água; (c), enzima, tampão e água. NADH estava presente nas concentrações de $4,1 \times 10^{-5} \text{M}$ (sol. controle) e $3,3 \times 10^{-5} \text{M}$ (sol. dializante) e tampão na concentração de 20 mM. A curva c contém enzima na concentração de 36 microgramas/ml.

6- ESTUDO FLUORIMÉTRICO

6.1. Espectro de Fluorescência do NADH.

Uma adicional prova de complexo binário é apresentado na figura 8, a qual é representativa dos dados obtidos através de um experimento semelhante ao anterior, quando descrito os resultados obtidos através de uma diálise no equilíbrio. As provas fluorimétricas de complexos binários alcançadas por diversos autores (40,47), parece que foram obtidas sem a necessidade de idêntico recurso. Porém, as tentativas empregadas neste trabalho, baseado nas sugestões desses autores, não foram bem sucedidas. Não foi possível observar nenhuma diferença entre o espectro fluorescente do NADH livre e daquele que continha enzima e NADH na mesma concentração, mesmo quando as concentrações para ambos os componentes variaram. No entanto, outros recursos, tais como, variação de temperatura ou mudança de tampão, não foram tentados.

Na figura 8, a curva superior é referente ao espectro da solução dializante, com NADH na concentração de $2,10 \times 10^{-6}M$, e a curva imediatamente inferior é o espectro da solução proteica contida no tubo de diálise, a qual mostrou uma sensível diminuição de fluorescência em termos de NADH. A outra curva, mostra o espectro da proteína dissolvida em tampão e água, na mesma concentração da anterior. Para uma análise comparativa, deve ser levado em consideração a pequena, mas sensível fluorescência do sistema enzima-tampão (curva c) e que estes componentes praticamente não absorvem radiações com comprimento de onda de 340 mu e que portanto, não deve estar influenciando no "quantum" de energia absorvida pelo grupamento cromóforo do nucleotídeo.

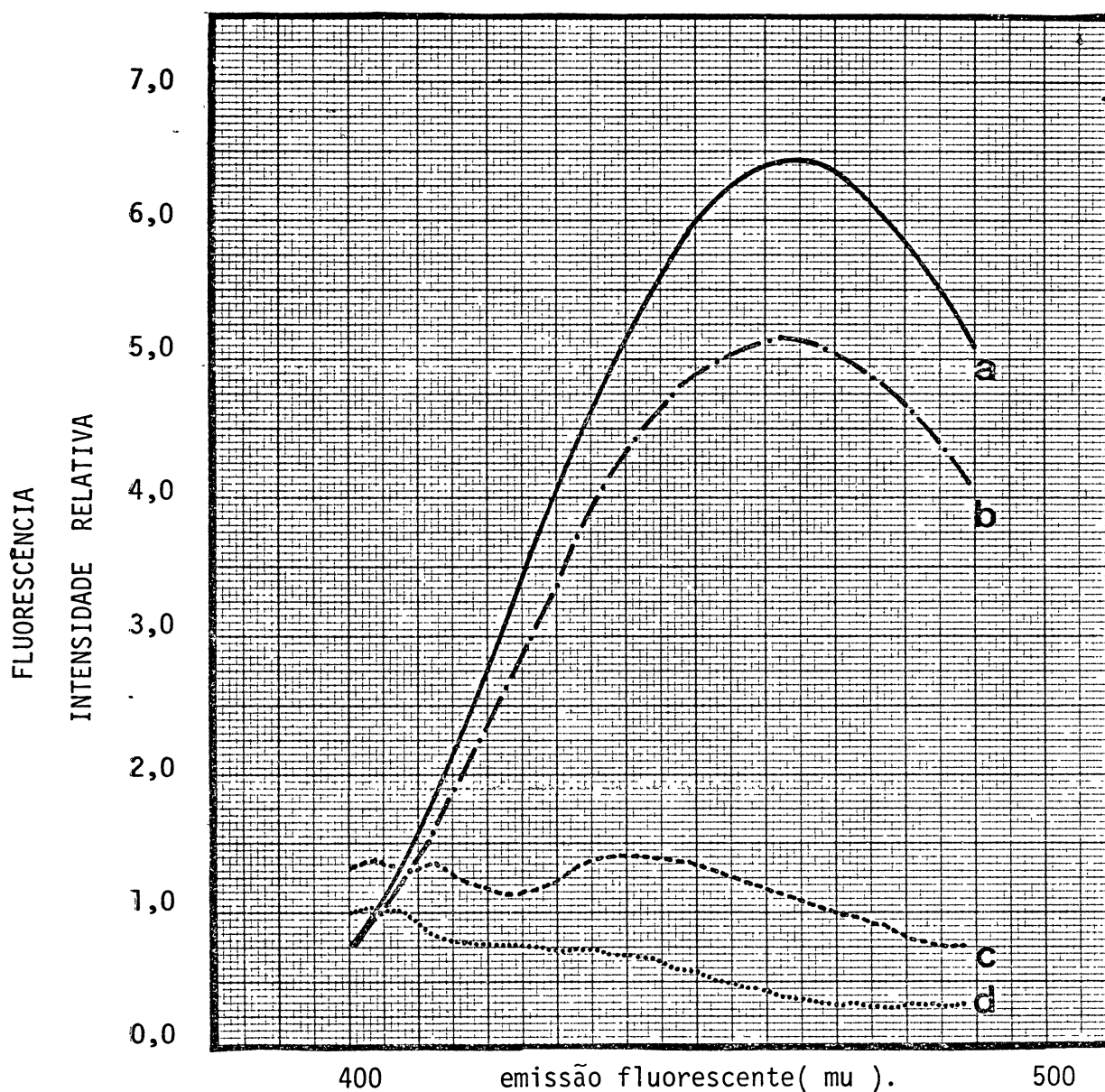
A alteração na eficiência fluorescente como mostra a figura, revela um fato bastante singular: a literatura indica a gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase, como a única enzima capaz de provocar uma diminuição de fluorescência do NADH, sendo que, todos os outros casos estudados, indicaram um aumento de fluorescência (64). Neste particular, a L-fucose desidrogenase apresenta um raro comportamento.

Pode ser observado também através da figura 8, que o espectro correspondente ao complexo binário, não sofreu alteração quanto ao comprimento de onda característico de emissão, ou em outras palavras, não houve deslocamento para a região do azul. Para ambos os espectros, os picos de emissão máxima corresponderam ao comprimento de onda de 463 mμ.

Para a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, foi observado também, que praticamente inexistiu deslocamento de comprimento de onda característico, para regiões do azul.

Esta última observação, a diminuição na intensidade fluorescente e outros fatos coincidentes entre a L-fucose desidrogenase e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, serão discutidos adiante.

FIG.8: COMPLEXO BINÁRIO FDH-NADH. TESTE FLUORIMÉTRICO.



Evidência de formação de complexo binário. Comprimento de onda para excitação 340 μ m e emissão registrada conforme a figura. Abertura da fenda para excitação e emissão, 2 mm. Os sistemas, eram assim constituídos (2 ml): (a), 0,2 ml da solução dializante, tampão 20 mM, e água; (b), 0,2 ml do preparado dializável, tampão 20 mM e água; (c), 14,4 microgramas de enzima, tampão 20 mM e água e (d), tampão na concentração de 20 mM e água. A quantidade de enzima em (c) é a mesma em (b).

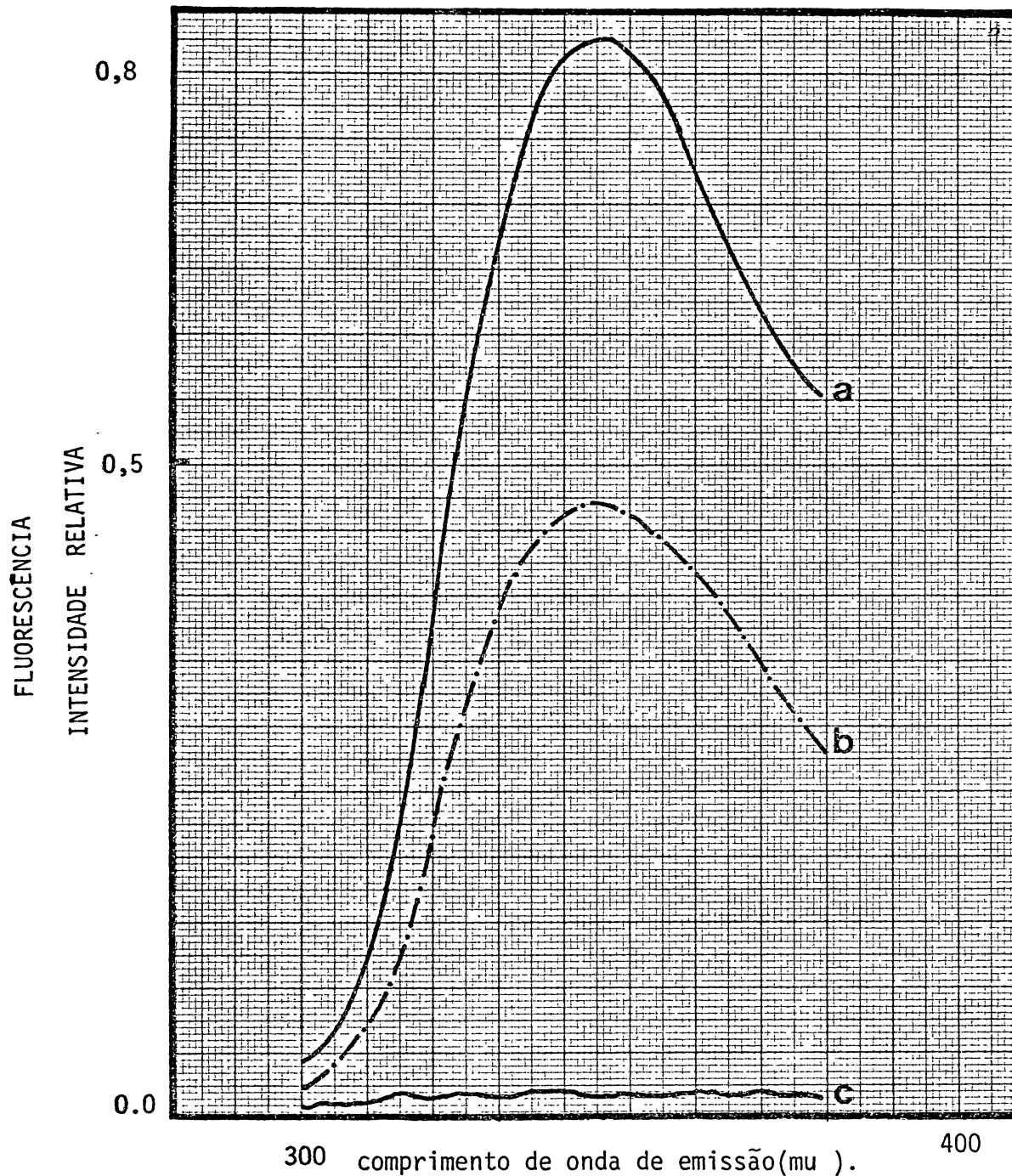
6-2. Espectro de fluorescência para a L-fucose desidrogenase

O espectro de absorção da enzima, indicou como sendo de 284 mu o comprimento de onda de absorção máxima. Este resultado foi utilizado para a excitação da proteína.

O espectro da proteína como é apresentado na figura 9, não apresentou nenhum aparecimento acentuado de fluorescência em 313 mu, característico para a tirosina. Idênticos resultados foram encontrados por VELICK (46), apesar do número de resíduos de tirosina existentes na GPD, ser maior do que o número de resíduos de triptofano, numa proporção de duas vezes.

Evidentemente, como para a FDH não é conhecido o número de resíduos com relação a qualquer amino-ácido, fica difícil especular nesse sentido. No entanto, parece ser possível formular duas hipóteses: ou o número de resíduos de triptofano está numa proporção suficientemente capaz de mascarar o efeito da tirosina, reforçado pela possibilidade de existir ainda qualquer efeito devido a uma interação dentro da molécula de proteína, ou o pH em que foi processado os experimentos, produziu algum efeito enganoso. De qualquer maneira, nas condições experimentais descritas, não foi notado efeito algum devido à tirosina.

FIG.9: COMPLEXO BINÁRIO FDH-NAD. TESTE FLUORIMÉTRICO.



Evidência de formação de complexo binário. Comprimento de onda para excitação 284 μ e para emissão, registrada conforme a figura. Abertura da fenda para excitação e emissão 2 mm e 0,5 mm, respectivamente. Os sistemas (2 ml) eram assim constituídos: (a), enzima (60 microgramas), tampão e água; (b), enzima (60 microgramas), 0,05mM de NAD, tampão e água; (c), 0,05mM de NAD, tampão e água. Tampão sempre esteve presente na concentração de 20 mM.

6-3. Diminuição da Intensidade Fluorescente da L-Fucose Desidrogenase, Provocada pelos Substratos Principais da Reação - Quenching

As características de "quenching" da proteína, foram amplamente aproveitadas no sentido de evidenciar a existência de complexos binários do tipo FDH.A e FDH.B. Ainda com relação à figura 9, seu aspecto qualitativo mostra a perda em eficiência fluorescente, ao ser adicionado NAD. O efeito na diminuição de fluorescência à medida que a concentração de NAD varia, pode ser observado na figura 10.

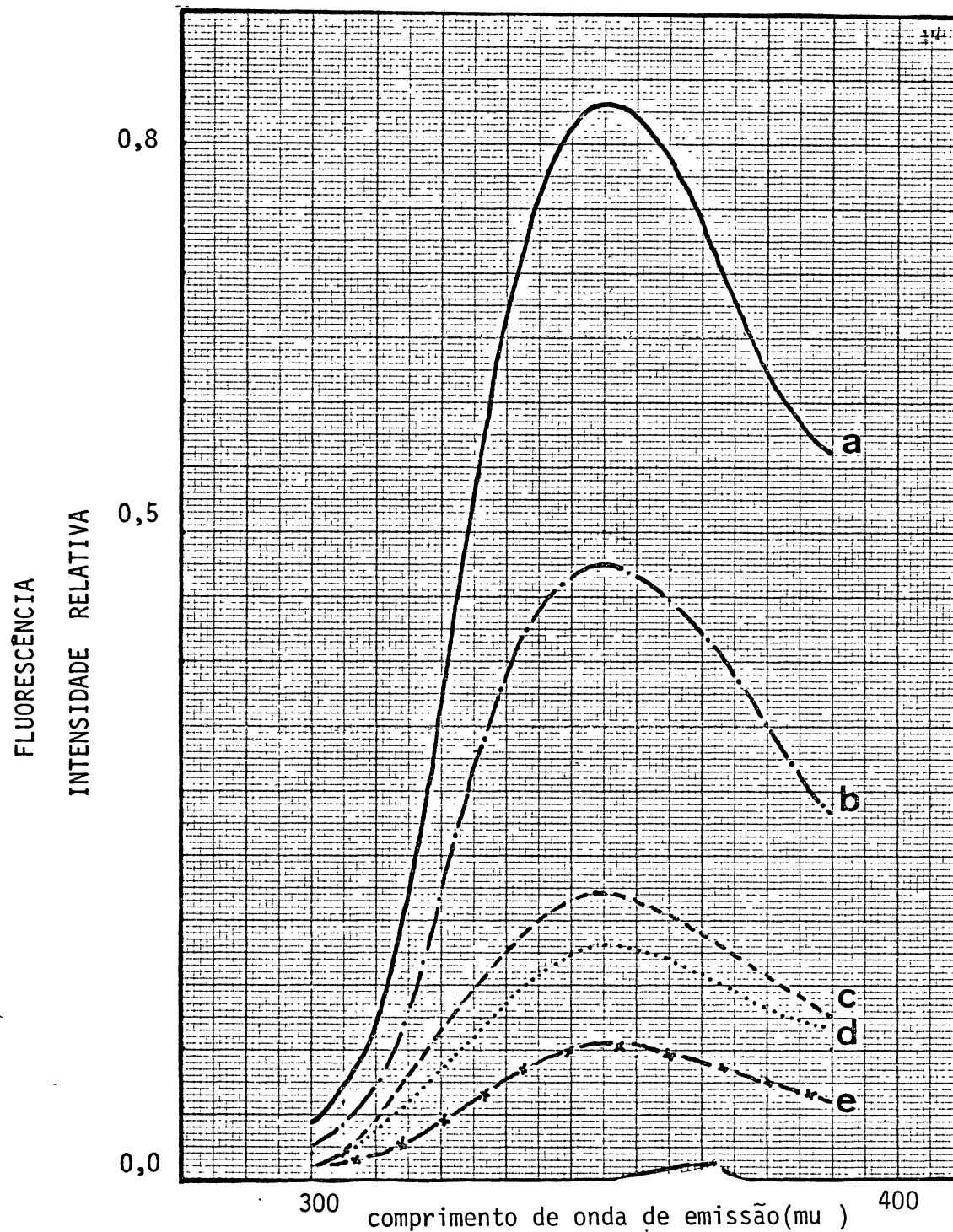
Este comportamento frente ao NAD parece difícil de ser explicado. Este nucleotídeo não absorve e não emite fluorescência na faixa de absorção e emissão do triptofano(49). Ainda segundo VELICK(46), poderiam ser levantadas algumas hipóteses, porém todas de caráter especulativo: uma mudança de conformação da proteína ao ser ligado o cofator, a localização, ou o sítio de ligação do coenzima, logo acima ou abaixo de uma região bastante concentrada de resíduos de triptofano, estas entre as principais alternativas oferecidas.

Idênticos resultados podem ser observados, quando o agente responsável pelo "quenching" é L-fucose, porém em intensidades bem menores, oferecendo evidências de uma interação entre a enzima e o substrato, possivelmente através de grupamentos tióis (28). A figura 11 mostra o espectro da enzima livre e quando ao sistema é adicionado L-fucose. A possibilidade de L-fucose livre alterar significativamente no espectro de emissão deve ser excluída, pois este açúcar não absorve naquela faixa de comprimento de onda.

O aspecto mais importante desta última experiência, é o fato da possibilidade que tem a enzima de interagir com a L-fucose, sem a necessidade da presença do cofator.

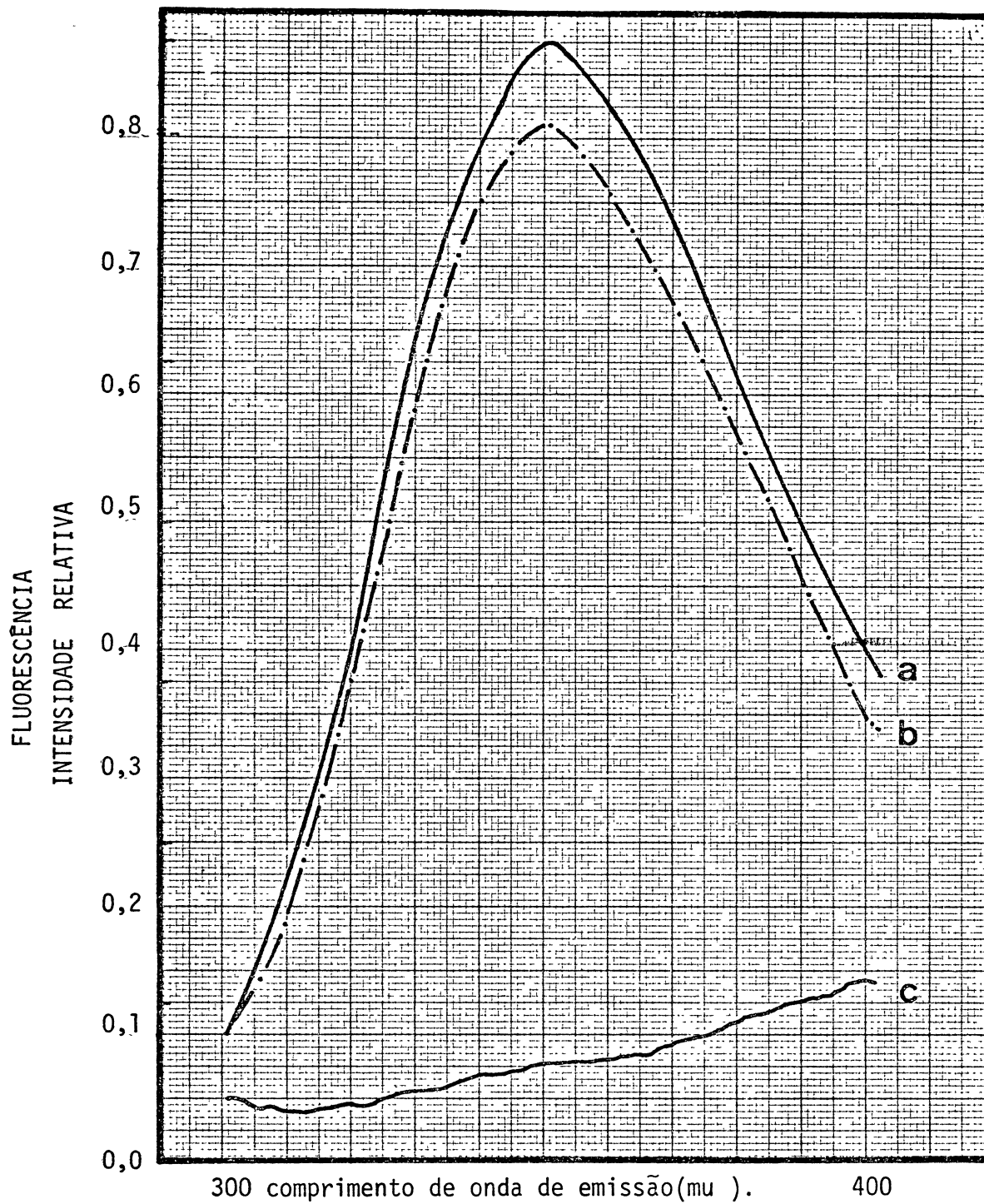
As tentativas com base em experimentos fluorimétricos, empregadas com a finalidade de detectar a presença de complexos ternários do tipo FDH.A.B e do tipo abortivo FDH.Q.B, não tiveram sucesso.

FIG.10: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO NAD NO "QUENCHING" DA PROTEÍNA.



Alteração no "quenching" da proteína, ocasionada por adições sucessivas do cofator(NAD), o qual assumiu as seguintes concentrações:0,05 mM, 0,10 mM, 0,25 mM e 0,5 mM, respectivamente às curvas b,c, d, e. A curva a é referente ao espectro da enzima(60 microgramas). Os sistemas continham sempre tampão na concentração de 20 mM e água para um volume total de 2 ml. Excitação da proteína a 284 mu e emissão conforme a figura. Abertura da fenda para excitação e emissão, 2 mm e 0,5 mm respectivamente.

FIG. 11: EVIDÊNCIA FLUORIMÉTRICA DO COMPLEXO FDH-L-FUCOSE



Evidência fluorimétrica da interação de L-fucose com a proteína. Comprimento de onda para excitação, 284 μ m e emissão registrada conforme a figura. Abertura da fenda para excitação e emissão, 2 mm e 0,5 mm, respectivamente. Sistemas de reação (2 ml) contendo: (a) enzima (66 microgramas), tampão e água; (b) enzima (66 microgramas), L-fucose (10 mM), tampão e água; (c) L-fucose (10 mM), tampão e água. Concentração em tampão: 20 mM.

7- CONSIDERAÇÕES SOBRE O PROVÁVEL MECANISMO

Os últimos testes fluorimétricos considerados, reforçam as observações de GUIMARÃES (28), que por meio de estudos de inibição, sugere a interação da enzima com L-fucose, possivelmente através de grupamentos tióis de resíduos cisteína. Vale aqui fazer um paralelo com a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, para a qual BOYER & SEGAL (90) descrevem comportamento semelhante, tendo demonstrado a formação de um complexo acil-enzima, entre a GPD e o gliceraldeído-3-fosfato.

Estas observações constituem uma "questão-chave" para a elucidação e diferenciação dos mecanismos propostos, pois sugerem a não existência de uma ordem compulsória na ligação da enzima com os substratos.

Diante dos fatos experimentais discutidos, um tipo de mecanismo sequencial aleatório em rápido equilíbrio bi-bi, parece ser a melhor opção. São consistentes com esta hipótese os seguintes fatos:

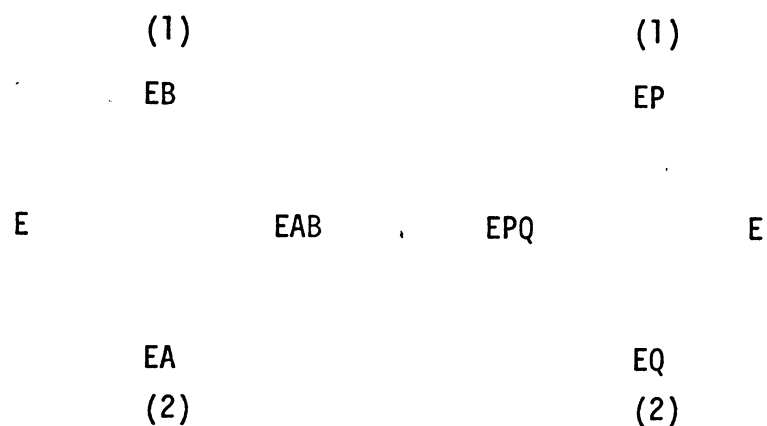
1- A equação fundamental de ALBERTY satisfaz os dados experimentais.

2- As provas experimentais de fluorimetria demonstram a existência de dois tipos de complexos formados, no sentido principal da reação: FDH-NAD, FDH-L-fucose.

3- A ordem de adição dos substratos à enzima não é compulsória.

4- Os testes de inibição com relação ao produto NADH e as observações com respeito à interação da L-fucose com grupamentos tióis (28), são coerentes com o mecanismo.

O mecanismo proposto admite uma ordem aleatória na interação da enzima com os substratos, podendo haver formação de quatro complexos binários e pelo menos dois ternários, admitindo ser simétrica a reação reversa. Todas as etapas estão em rápido equilíbrio, com exceção da interconversão do complexo ternário.



No esquema acima, E representa a L-fucose desidrogenase, e os outros símbolos já foram definidos. Para o esquema proposto, não foram obtidas evidências com relação à via preferida, (1) ou (2). Embora não tenha sido evidenciada a presença de complexos ternários, sua existência é aceita como dogma.

O tipo de mecanismo proposto não constitui modelo comum aceito para desidrogenases, conforme foi ressaltado na Introdução. Por exemplo, uma enzima bastante semelhante e estudada por BUESS *et al* (29), com relação a mecanismo de reação, segue um outro modelo.

FURFINE & VELICK (91) concluíram por um mecanismo idêntico para a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de cobaia, com base em estudos inibitórios. SILVERSTEIN & BOYER (94), verificaram que pelo menos em determinadas condições, a lactato desidrogenase de bovino deve obedecer o mesmo modelo. Recentemente (1974), KUBY *et al* (93), sugeriram um mecanismo sequencial aleatório bi-bi para a glicose-6-fosfato desidrogenase. A álcool desidrogenase de levedura pertence ao mesmo tipo de mecanismo (94), e também a álcool desidrogenase de fígado, com certas restrições (94,95).

A álcool desidrogenase constitui um exemplo ilustrativo, (ADH de fígado), não só porque pode ser enquadrada como uma das exceções, mas também porque a evolução dos estudos concernentes ao mecanismo, dá uma idéia da magnitude e complexibilidade do problema. É interessante neste sentido, lembrar que WRATTEN & CLELAND (54) ao estudar o mecanismo da ADH, mostram a po-
lêmica científica levantada sobre o assunto. Desde 1951 (96,97) a questão vem

sendo estudada. Enquanto alguns autores liderados por THEORELL admitem um mecanismo sequencial mas não necessariamente ordenado(54), outros aceitam um mecanismo estritamente compulsório. Em 1963, WRATTEN & CLELAND discutem os trabalhos realizados e concluem com bases em estudos inibitórios, por um mecanismo sequencial ordenado. Um ano mais tarde, SILVERSTEIN & BOYER (98) apresentaram evidências que a reação não segue um modelo estritamente sequencial ordenado, discordando assim dos resultados alcançados pelos dois últimos autores.

8. *PARALELO COM A GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE.*

Foi ressaltado neste trabalho, o fato singular da diminuição de fluorescência emitida pelo NADH, quando este é ligado à L-fucose desidrogenase, ocorrência rara, são encontrando paralelo com a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase(64). Esta observação e outras que foram relatadas no decorrer do trabalho, induzem à apresentação de alguns pontos coincidentes que unem as duas enzimas.

<i>OBSERVAÇÕES</i>	<i>REF. FDH</i>	<i>REF. GPD</i>
1- Possível interação entre o substrato e a enzima através de grupamentos tióis ativos	(28)	(46)
2- Diminuição na intensidade de fluorescência com relação ao NADH ligado.	—	(46)
3- Espectro fluorescente da proteína apresentando apenas um pico de emissão máxima	—	(46)
4- Ausência apreciável de deslocamentos dos picos de emissão máxima, relativos aos espectros dos complexos.	—	(46)
5- Afinidade da enzima pelo NAD parece ser bem maior do que pelo NADH.	(28)	(46)
6- A enzima pode interagir com o substrato sem a necessidade da presença do cofator, possivelmente através de um mecanismo de reação semelhante.	—	(90,95)

Vale lembrar que na relação acima, os itens 2, 5, e 6, constituem exceções às desidrogenases, quando comparadas de uma maneira geral, e principalmente quanto ao item 2, para o qual seria interessante levantar algumas hipóteses que possam explicar este comportamento, baseado principalmente no estudo realizado por VELICK(46).

O aumento na intensidade de fluorescência do NADH, geralmente observado quando este é ligado à proteína, deve ser resultante de uma "transferência de energia", função dos amino-ácidos aromáticos da proteína, os quais inicialmente absorveram esta energia; a eficiência do processo parece não ser somente dependente do número de resíduos amino-ácidos participantes, triptofano principalmente, como também da própria orientação e distribuição desses amino-ácidos, relativo ao sítio de ligação do nucleotídeo.

Entretanto, uma outra hipótese que pode ser aceita como fator promotor para o aumento em fluorescência, é a possibilidade da existência de uma interação entre a enzima e o nucleotídeo, capaz de aumentar o nível de energia do primeiro estado eletrônico excitado. Uma interação desse tipo, representa uma rígida interação entre a enzima e o anel reduzido do nucleotídeo, segundo VELICK.

Para a L-fucose desidrogenase, ocorre justamente o contrário, o que poderia ser interpretado como uma fraca interação entre a enzima e o nucleotídeo reduzido, mesmo admitindo ser a enzima capaz de promover uma excitação do anel reduzido da piridina.

Realmente, os fatos experimentais indicam que a interação entre a enzima e o NADH não é bem pronunciada, ou pelo menos esta observação é encarada assim com relação ao NAD, porque o estudo que foi realizado e que visava obter um certo grau de relação com relação à afinidade da enzima pelo cofator, nas formas oxidada e reduzida, levou a conclusão que a afinidade da enzima pelo NAD é maior(28).

S U M Á R I O

- 1- A reação catalizada pela L-fucose desidrogenase, segue a equação de ARRHENIUS, sendo que os valores de energia livre, entalpia e Q_{10} , foram estimados como 8.000 cal/mol, 7.400 cal/mol e 1,78 respectivamente.
- 2- A velocidade de reação foi identificada experimentalmente como dependente de dois substratos; a ordem da reação e a constante de velocidade k^* , foram estimadas em 2/3 e $4,02 \cdot 10^2$ por unidade de enzima. Um novo método para a determinação da constante de velocidade de uma reação enzimática, foi apresentado.
- 3- Foram demonstrados complexos binários entre os substratos, e a L-fucose desidrogenase.
- 4- A enzima L-fucose desidrogenase, apresentou um espectro de fluorescência, cuja emissão máxima foi registrada em aproximadamente 345 m μ . Não foi registrada emissão em 313 m μ .
- 5- A enzima quando ligada ao NADH, foi capaz de produzir uma diminuição da fluorescência deste nucleotídeo, sem provocar contudo, deslocamento para a região do azul. Este resultado encontra paralelo somente com a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.
- 6- A reação catalizada pela L-fucose desidrogenase, deve seguir um modelo de mecanismo sequencial, randômico, pelo menos nas condições dos experimentos.

R E F E R E N C I A S B I B L I O G R Á F I C A S

- 1- HEATH, E.C. & ROSEMAN, S. The Conversion of D-Glucose to L-Fucose by *Aerobacter Cloacae*. *J. Biol. Chem.*, 230(1):511-19, 1958.
- 2- SEGAL, S. & TOPPER, Y.J. On the Biosynthesis of L-Fucose by *Aerobacter aerogenes*. *Biochim. Biophys. Acta*, 25 :419-20, 1957.
- 3- SEGAL, S. & TOPPER, Y.J. On the Biosynthesis of L-Fucose and L-Fucose Metabolism in Man. *Biochim. Biophys. Acta*, 42:147-51, 1960.
- 4- GINSBURG, V. Studies on the Biosynthesis of Guanosine Diphosphate L-Fucose. *J. Biol. Chem.*, 236 (9):2.389-93, 1961.
- 5- DENNAMUR, R.; FAUCONNEAU, G. & JARRIGE-GUNTZ, G. *apud* FOSTER, D.W. & GINSBURG, V. Biosynthesis of L-Fucose by Mammalian Tissue. *Biochem. Biophys. Acta*, 54 :376-8, 1961
- 6- CARLSON, D.M. & HANSEN, R.G. Isolation and Synthesis of Guanosine diphosphate hexoses from bovine mammary gland. *Fed. Proc.*, 20 (1):
- 7- ISHIHARA, H. & HEATH, E.C. The Metabolism of L-Fucose.IV. The Biosynthesis of Guanosine Diphosphate L-Fucose in Porcine Liver. *J. Biol. Chem.*, 243
- 8- FOSTER, D.W. & GINSBURG, V. Biosynthesis of L-Fucose by Mammalian Tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, 54:376-8, 1961
- 9- GROLLMAN, A.P.; HALL, C.W. & GINSBURG, V. Biosynthesis of Fucosyllactose and other Oligosaccharides found in Milk. *J. Biol. Chem.*, 240: 975-81, 1965.
- 10- COFFEY, J.W.; MILLER, O.N. & SELLING, O.Z. The Metabolism of L-Fucose in the Rat. *J. Biol. Chem.*, 239(2):4.011-7, 1964.
- 11- SHEN, L.; GROLLMAN, E.F. & GINSBURG, V. An Enzymatic Basis for Secretur Status and Blood Group Substances Specifity in Humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 59(1):224-30, 1968
- 12- BEKESI, J.G. & WINZLER, R.J. The Metabolism of Plasma Glycoproteins; Studies on the Incorporation of L-Fucose-1-c¹⁴ into Tissue and Serum in the Normal. *J. Biol. Chem.*, 242(17):3.873-9, 1967
- 13- COHEN, S.S. Studies on D-Ribulose and its Enzymatic Conversion to D-Arabinose. *J. Biol. Chem.*, 201(1):71-84, 1953.
- 14- HUANG, P.C. & MILLER, O.N. The Metabolism of Lactaldehyde.V.Metabolism of L-Fucose. *J. Biol. Chem.*, 231(1):201-5, 1958.
- 15- GHALAMBOR, M.A. & HEATH, E.C. The Metabolism of L-Fucose.II.The Enzymatic Cleavage of L-Fucose-1-phosphate. *J. Biol. Chem.*, 237(8): 2.427-33, 1962
- 16- HEATH, E.C. & GHALAMBOR, M.A. The Metabolism of L-Fucose.I.The Purification and Properties of L-Fucose Kinase. *J. Biol. Chem.*, 237(8): 2423-6, 1962.

- 17- MOBLEY, P.A.; METZER, R.P. & WICK, A.N. The Occurrence of L-Fucose (D-Arabinose) Dehydrogenase in Selected Vertebrate Species. In: *Biol. Abstracts*, 55(9): 4958, 1953, nº 48536.
- 18- VEIGA, L.A. Informações pessoais. Departamento de Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná.
- 19- GUIMARÃES, M.F. & VEIGA, L.A. L-Fucose Dehydrogenase from Pullularia - Pullulans. *IRCS Medical Sciences.*, 1(5):(73-7) 3-7-11, 1973.
- 20- CLINE, A.L. & HU, A.S. Enzymatic Characterization and Comparison of the Sugar Dehydrogenases from a Pseudomonad. *J. Biol. Chem.*, 240(11): 4493-97, 1965.
- 21- SCHACHTER, H.; SHIRNEY, J.; McGUIRE, E.J. & ROSEMAN, S. Isolation of Diphosphoryridine Nucleotide- Dependent L-Fucose Dehydrogenase from Pig Liver. *J. Biol. Chem.*, 244(17): 4785-91, 1969.
- 22- MOBLEY, P.W.; METZER, R.P. & WICK, A.N. NAD-Dependent L-Fucose Dehydrogenase from Sheep Pig Liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, 139(1):83-6, 1970.
- 23- AXELROD, B. Other pathways of Carbohydrate Metabolism. III Oxidative Metabolism of non-phosphorylated glucose. In: GREENBERG, D.M. *Metabolic pathways*. N.York, Academic, 1960, v.1,p.222-4.
- 24- DAHMS, A.S. & ANDERSON, R.L. D-Fucose Metabolism in Pseudomonad. I. Oxidation of D-Fucose to D-Fucono- -Lactone by A D-Aldohexose Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 247(7):2222-7, 1972.
- 25- DAHMS, A.S. & ANDERSON, R.L. D-Fucose Metabolism in Pseudomonad. II. Oxidation of D-Fucose to D-Fucono- -Lactonase. *J. Biol. Chem.*, 247(7): 2228-32, 1972.
- 26- DAHMS, A.S. & ANDERSON, R.L. D-Fucose Metabolism in a Pseudomonad. III. Conversion of D-Fuconate to 2-keto-3-deoxy-D-fuconate by Dehydratase. *J. Biol. Chem.*, 247(7):2233-7, 1972.
- 27- DAHMS, A.S. & ANDERSON, R.L. D-Fucose Metabolism in a Pseudomonad. IV. Cleavage of 2-keto-3-deoxy-D-fuconate to Pyruvate and D-Lactaldehyde by keto-3-deoxy-L-arabonate aldolase. *J. Biol. Chem.*, 247(7):2238-41, 1972.
- 28- GUIMARÃES, M.F. Tese de Mestrado, Departamento de Bioquímica da U.F.P., 1973.
- 29- CARPER, W.R.; CHANG, K.W.; THORPE, W.G.; CARPER, M.A. & BUESS, C.M. Arabinose (fucose) Dehydrogenase from Pig Liver. II. Steady-state kinetics. *Biochim. Biophys. Acta.*, 358: 49-56, 1974.
- 30- DIXON, M & WEBB, E.C. Enzyme kinetics; effect of substrate concentration. In _____ . *Enzymes*. 2.ed. New York, Academic, 1964. p.63-109.
- 31- ALBERTY, R.A. The Relationship between Michaelis constants, Maximum Velocities and Equilibrium Constant for an Enzyme-Catalyzed Reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 75(8):1928-32, 1953.
- 32- DALZIEL, K. Initial Steady State Velocities in the Evaluation of Enzyme-Coenzyme-Substrate Reaction Mechanisms. *Acta. Chem. Scand.*, 11(10): 1706-23, 1957.

- 33- HUNTER, A. & DOWNS, C.E. The Inhibition of arginase by amino-acids. *J. Biol. Chem.*, 157(2):427-46, 1945.
- 34- KING, E.L. & ALTMAN, C. *apud* DIXON, M. & WEBB, E.C. Enzyme Kinetics; General Methods for writing steady-state equations. In: _____
Enzymes. 2ed. N.York, Academic, 1964. p.94-8.
- 35- CLELAND, W.W. The Kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrate or products. I. Nomenclature and rate equations. *Biochim. Biophys. Acta*. 67:104-37, 1963.
- 36- LINEWEAVER, H. & BURK, D. The Determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56:658-66, 1934.
- 37- Van EYS, J.; STOLZEMBACH, S.L. & KAPLAN, N.O. The Enzyme-coenzyme-substrate Complexes of Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta.*, 27:63-83, 1958.
- 38- PFLEIDERER, G. & AURICCHIO, F. The DPNH-Binding Capacity of Various Dehydrogenases. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 16(1):53-9, 1964.
- 39- BOYER, P.D. & THEORELL, H. The Change in Reduced Diphosphopyridine Nucleotide (DPNH) Fluorescence upon Combination With Liver Alcohol Dehydrogenase (ADH). *Acta. Chem. Scand.*, 10(3):447-50, 1956.
- 40- WINER, A.D. & SCHWERT, G.W. Fluorescence Spectra of Ternary Complexes of Lactic Dehydrogenase, Reduced Diphosphopyridine Nucleotide and Carboxylic Acids. *J. Biol. Chem.*, 234(5):1155-61, 1959.
- 41- DUYSSENS, L.M. & KRONENBERG, G.H.M. The Fluorescence Spectra of the Complex of Reduced Diphosphopyridine Nucleotide from Yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, 26:437-8, 1957
- 42- FROMM, H.J. Evidence of Ternary Complex Formation with Rabbit-Muscle Lactic Acid Dehydrogenase, Diphosphopyridine Nucleotide and Pyruvic Acid. *Biochim., Biophys. Acta*, 52:199-200, 1961
- 43- CARLSTROM, A. Fluorimetric Studies of the Coupling of Reduced Diphosphopyridine Nucleotide to Lactic Dehydrogenase from Rabbit Skeletal Muscle. *Acta Chem. Scand.*, 15(10):2.049-51, 1961
- 44- WINER, A.D. & SCHWERT, G.W. Fluorescence Spectra of Ternary Complexes of Dehydrogenases with Reduced Diphosphopyridine Nucleotide and Reduced Substrates. *Biochim. Biophys. Acta*, 29:424-5, 1958.
- 45- THEORELL, H. & LANGAN, T.A. Fluorimetric Observation of Binary and Ternary complexes formed with Malic Dehydrogenase, Coenzyme, and D-Malic Acid. *Acta Chem. Scand.*, 14(4):933-4, 1960
- 46- VELICK, S.F. Fluorescence Spectra and Polarization of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and Lactic Dehydrogenase Coenzyme Complexes. *J. Biol. Chem.*, 233(6):1455-67, 1958
- 47- VESTLING, C.S. Determination of Dissociation Constants for two Substrates. Enzyme Systems. In: GLICK, D. (ed). *Methods of Biochemical Analysis*. N. York, J. Wiley, 1962. v.10, p. 137-73.
- 48- UNDEFRIEND, S. Proteins. In: _____ *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*. N. York, Academic, 1962. p. 191-227.

- 49- SHORE, V.G. & PARDEE, A.B. Fluorescence of Some Proteins, Nucleic Acids and Related Compounds. *Arch. Biochem. Biophys.*, 160(1):100-7, 1956.
- 50- KONEV, S.V. *apud* UNDEFRIEND, S. Fluorescence of Simple proteins. In: _____ . Fluorescence assay in biology and medicine. N.York, Academic, 1962. p.202-3.
- 51- CHANCE, B. The Kinetics of the Enzyme-Substrate Compound of Peroxidase. *J. Bio. Chem.*, 151(2):553-77, 1943.
- 52- HALDANE, J.B.S. *apud* DALZIEL, K. In: _____ . Initial Steady State Velocities in the Evaluation of Enzyme-Coenzyme-Substrate Reaction Mechanism. *Acta. Chem. Scand.*, 11(10):1706-23, 1957.
- 53- ZEWE, V. & FROMM, H.J. Kinetics Studies of Rabbit Muscle Lactate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 237(5):1668-75, 1962.
- 54- WRATTEN, C.C. & CLELAND, W.W. Product Inhibition Studies on Liver Alcohol Dehydrogenases. *Biochemistry.*, 2(5):935-41, 1963.
- 55- BAKER, R.H. & MAHLER, H.R. Studies on the Mechanism of Enzyme-Catalyzed Oxidation Reduction Reactions.II. Methods for Characterization of the Mechanism for two-Substrate Systems. *Biochemistry.*, 1:35-40, 1962.
- 56- BAKER, R.H., Jr., Studies on the Mechanism of Enzyme-Catalyzed Oxidation Reduction Reactions.III. A Characterization on the Mechanism of the Liver Alcohol Dehydrogenase Reaction. *Biochemistry.*, 1:41-47, 1962.
- 57- FLORINI, J.R. & VESTLING, C.S. Graphical Determination of the Dissociation Constants for two Substrate-Enzyme Systems. *Biochim. Biophys. Acta.*, 25:575-78, 1957.
- 58- FRIEDEN, C. The Calculation of an Enzyme-Substrate Dissociation Constant from the Overall Initial Velocity for Reactions Involving two Substrates. *J. Am. Chem. Soc.*, 79(8):1894-6, 1957.
- 59- SCHWERT, G.W. & HAKALA, M.T. Lactic Dehydrogenase. I. Kinetics. *Arch. Biochem. Biophys.*, 38(1):55-65, 1952.
- 60- DIXON, M. The Determination of Enzyme Inhibitor Constants. *Biochem. J.*, 55:170-1, 1953.
- 61- DIXON, M. Graphical Determination of Equilibrium Constants. *Biochem. J.*, 94:760-2, 1965.
- 62- KILROE-SMITH, J.A. A Modified Graphical Method for Determination of Equilibrium Constants. *Biochem. J.*, 100:334-5, 1966.
- 63- GUTFRIEND, H. Two-Substrate Systems. *Enzymes:physical principles*. London, J.Wisley, 1972. p.136-43.
- 64- COLLOWICK, S.P.; Van EYS, J. & PARK, J.H. Dehydrogenation. In: FLORKIN, M. & STOTZ, E.H. (eds). *Comprehensive Biochemistry*. Amsterdam, Elsevier, v.14, 1966. p.1-88.
- 65- FISCHER, H.F.; CONN, E.E.; VENNESLAND, B. & WESTHEIMER, F.H. The Enzymatic Transfer of Hydrogen.I.The Reaction Catalyzed by Alcohol Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 202(2):687-97, 1953
- 66- SCHELEMBERG, K. Evidence for the Participation of Tryptophan as intermediate in Transfer of Hydrogen between Diphosphopyridine Nucleotide and Substrate in Yeast Alcohol Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 240(3):1.165-74, 1965

- 67- SCHELEMBERG, K. Tryptophan as Intermediate in Hydrogen Transfer in Pyridine Nucleotide-Linked Dehydrogenases. *Fed. Proc.*, 24:233, 1965
- 68- SCHELEMBERG, K. The Mechanism of Hydride Transfer. In: SUND, H. (ed.). *Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases*. Heidelberg, 1970. p.15-29
- 69- MAHLER, H.R. & CORDES, E.H. Enzyme Kinetics. In: *Biological Chemistry*. 2. ed. N. York, Harper & Row, 1971. p. 219-77.
- 70- BLOONFIELD, V. ; PELLER, L. & ALBERTY, R.A. Multiple Intermediates in Steady-State Enzyme Kinetics.II. Systems Involving two Reactants and two Products. *J. Am. Chem. Soc.*, 84(23): 4367-74, 1962
- 71- BLOONFIELD, V. ; PELLER, L. & ALBERTY, R.A. Multiple Intermediates in Steady-State Enzyme Kinetics.III. Analysis of the Kinetics of some Reactions Catalyzed by Dehydrogenases. *J. Am. Chem. Soc.* 84(23): 4375-81, 1962
- 72- SIZER, I.W. Effects of Temperature on Enzyme Kinetics. In: NORD, F.F. & WERKMAN, C.H.(eds.). *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*. N. York, Interscience, 1943. v.3, p.35-62
- 73- DAWES, E.A. Reaction Kinetics; Effect of Temperature on Reaction Rates. In: *Quantitative Problems in Biochemistry*. 2.ed. Edimburgh, E. & S. Livingstone, 1962. p. 105-7.
- 74- GLASSTONE, S; LAIDLER, K.J. & EYRING, H. *apud* SIZER, I.W. Effects of temperature on enzyme Kinetics. In: NORD, F.F. & WERKMAN, C.H.(eds). *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*. N.York, Interscience, 1943. v.3, p.35-62
- 75- WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. *Biochem. Z.* 310:384, 1941.
- 76- BELCHIOR, P.O. *PERT CPM. Técnica de Avaliação, Revisão e Controle de Projetos*. Rio de Janeiro, Tecnoprint, 1970. 270 p.
- 77- SOUZA, N.J.; GUIMARÃES, M. & VEIGA, L.A. Planejamento Científico: PERT CPM Aplicado à Purificação e Estudos das Propriedades de uma Desidrogenase. *Arq. Biol. Tecnol.*, 17:3-10, 1974.
- 78- CLARK, E.P. The Structure of fucose. *J. Biol. Chem.*, 54(1):65-73, 1922.
- 79- VEIGA, L.A. Polyol Dehydrogenase in *Candida Albicans*. I. Reduction of D-Xylose to Xylitol. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 14:65-78, 1968.
- 80- LAIDLER, K.J. General Kinetic Principles. In: *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*. Oxford, Clarendon, 1958. pg.20-54.
- 81- PRUTTON, C.F. & MARON, S.H. Kinetics of Homogeneous Reactions In: *Principles of Physical Chemistry*. N. York, MacMillan, 1968. p.548-97.
- 82- MAHLER, R.R. & CORDES, E.H. Proteins: Classification, Properties, Purifications. Proteins as Electrolytes. *Biological Chemistry*. 2 ed. N. York HARPER & ROW, 1971. p.50-63.
- 83- ALGRANATTI, I. Comunicação Pessoal.
- 84- FAWCETT, C.P.; CIOTTI, M.M. & KAPLAN, N.O. Inhibition of Dehydrogenase Reaction by a Substance Formed from Reduced Diphosphopyridine Nucleotide. *Biochim. Biophys. Acta.*, 54:210-2, 1961.

- 85- SETLOW, R.B. & POLLARD, E.C. Enzymes. In: _____ . *Molecular Biophysics*. Massachusetts, Pergamon, 1962. p.239-64.
- 86- LAIDLER, K.J. The Molecular Kinetics of Enzyme Action. In: _____ . *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*. Oxford, Clarendon, 1958. p.187-209.
- 87- BONNICHSEN, R.; CHANCE, B. & THEORELL, H. Catalase Activity. *Acta Chem. Scand.*, 1:685-709, 1947.
- 88- GOULD, B.S. & SIZER, I.W. The Mechanism of Bacterial Dehydrogenase Activity in Vivo. *J. Biol. Chem.*, 124(1):269-79, 1938.
- 89- SMITH, J.M. Kinetics; Theoretical Studies of Reaction Rate. In: _____ . *Chemical Engineering Kinetics*. Tokyo, Kogakusha, 1956. p.81-86.
- 90- BOYER, P.D. & SEGALL, H.L. Sulphydryl Groups of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and Acyl Enzyme formation. In: McELROY, W.D. & GLASS, B. (eds). *The Mechanism of Enzyme Action*. Baltimore, J.Kopkins, 1954. p.520-532.
- 91- FURFINE, C.S. & VELICK, S.F. The Acyl-Enzyme Intermediate and The Kinetic Mechanism of the Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase Reaction. *J. Biol. Chem.*, 240(2):844-855, 1965.
- 92- SILVERSTEIN, E. & BOYER, P.D. Equilibrium Reaction Rates and the Mechanism of Bovine heart and Rabbit Muscle Lactate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 239(11):3901-07.
- 93- KUBY, S.A.; WU, J.T. & ROY, R.N. Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from Brewer's yeast (Zwischenferment). Further Observation on the Ligand-Induced Macromolecular Association Phenomenon. Kinetics Properties of the two Chain Proteins Species and Studies on the Enzyme-Substrate Interaction. *Arch. Biochem. Biophys.*, 165(1):153-177, 1974.
- 94- SUND, H. & THEORELL, H. Alcohol Dehydrogenases. In: BOYER, P.D.; LARDY, H. & MYRBACK, K. *The Enzymes*. 2 ed. N. York, Academic. v.7, 1963. p.26-82.
- 95- STRITTMATTER, P.H. Dehydrogenases and Flavoproteins. In: BOYER, P.D. (ed). *Annual Review of Biochemistry*. Palo Alto, Annual Reviews, v.35, 1966. p.125-56.
- 96- THEORELL, H. & CHANCE, B. The Kinetics of the Compound of Horse Liver Alcohol Dehydrogenase and Reduced Diphosphopyridine Nucleotide. *Acta Chem. Scand.*, 15:1127-44, 1951.
- 97- THEORELL, H. & BONNICHSEN, R. Equilibria and Initial Reaction Velocities. *Acta Chem. Scand.*, 5:1105- , 1951.
- 98- SILVERSTEIN, E. & BOYER, P.D. Equilibrium Reaction Rates and the Mechanism of Liver and Yeast Alcohol Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 239(11): 3908-14, 1964.

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

A todos aqueles, que de uma maneira ou outra, deram um pouco de si para a elaboração desta Tese, principalmente aos meus pais e esposa, e para os quais eu dedico este trabalho.

Ao Dr. Luiz Alberto Silva Veiga e ao Prof. Manoel Francisco Guimarães, que souberam quebrar o hiato surgido em dias ainda incertos e que antecederam a este Estudo, quando havia uma vontade, uma idéia e uma razão, mas faltava a oficina de trabalho. Ao Dr. Luiz Alberto S. Veiga, de uma maneira especial, pela orientação, estímulo e confiança.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela faculdade de uso de seus laboratórios e condições oferecidas.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) e ao Banco Nacional de Desenvolvimento (BNDE)/Fundo Técnico Científico (FUNTEC), pelo suporte financeiro recebido