

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO CINÉTICO E TERMODINÂMICO DA INIBIÇÃO
DA PAPAÍNA POR TETRACETATO DE RÓDIO(II)

Carlos Alberto Maciel de Araujo

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul para a obtenção do título de Mestre em
Química.

1990

O trabalho descrito na presente dissertação foi realizado entre março de 1987 e janeiro de 1990 no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a orientação da Professora Yeda Pinheiro Dick, inteiramente pelo autor salvo eventuais agradecimentos que apareçam no texto.

Carlos Araújo

AGRADECIMENTOS

À professora Yeda Pinheiro Dick, pela orientação.

Aos professores do Departamento de Química Inorgânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela permissão da realização desse trabalho.

Aos colegas do laboratório K-104 do Instituto de Química da UFRGS, em especial à Zóia Company, Viviane Fassina e José Ribeiro Gregório, pela amizade e colaboração.

Ao Dr. Renato Najjar da Universidade de São Paulo, pelas amostras de $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4(\text{H}_2\text{O})_2$.

Ao Dr. Diógenes Santiago Santos, diretor do Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul e ao Dr. Carlos Termignoni, pela colaboração nas cromatografias.

Ao Curso Pré-Vestibular Unificado, pela datilografia e cópias.

A todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

À Valdete, Renata, Fernanda
e Roberta, pela inspiração,
estímulo, carinho e paciên-
cia.

S U M Á R I O

	<u>página</u>
I - INTRODUÇÃO	01
1.1-Objetivos	01
1.2-Tetracetato de ródio (II) diaquo	02
1.2.1-Histórico, características e estrutura...	02
1.2.2-Reatividade do tetracetato de ródio(II)..	11
1.2.3-Aspectos bioinorgânicos	12
1.2.3.1-Atividade antitumoral	12
1.2.3.2-Complexos com substratos biológicos..	14
1.3-Papaína	16
1.3.1-Histórico.....	16
1.3.2-Propriedades físico-químicas	17
1.3.2.1-Constantes físico-químicas	17
1.3.2.2-Espectroscopia	18
1.3.2.3-Estabilidade	20
1.3.3-Estrutura	21
1.3.3.1-Estrutura primária	21
1.3.3.2-Estrutura secundária e terciária	24
1.3.3.3-O sítio ativo	26
1.3.3.4-Especificidade	32
1.3.3.5-Mecanismo de ação	33
1.3.3.6-A inibição da papaína	38
II - MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1-Reagentes e equipamentos	43
2.1.1-Reagentes	43
2.1.2-Equipamentos	44
2.2-Métodos	45
2.2.1-Ativação da papaína	45
2.2.2-Determinação da atividade enzimática	46
2.2.3-Dosagem da proteína	48
2.2.4-Determinação dos grupos -SH livres	49
2.2.5-Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos	49
2.2.6-Inibição da papaína com $Rh_2(OAc)_4(H_2O)_2$..	50

	<u>página</u>
2.2.7-Dosagem do tetracetato de ródio (II).....	52
2.2.8-Investigação da influência da força iônica..	52
2.2.9-Determinação da estequiometria da inibição..	53
2.2.9.1-Método de Scatchard	53
2.2.9.2-Via analítica	57
2.2.10-Reativação da papaína	58
III - RESULTADOS	59
3.1-Determinação dos parâmetros cinéticos	59
3.1.1-Curva de substrato	59
3.1.2-Determinação de K_m , V_m e k_{cat}	66
3.1.3-Determinação da constante de velocidade e da energia de ativação da inibição	86
3.2-Determinação das constantes de inibição	95
3.3-Determinação dos parâmetros termodinâmicos ΔG° , ΔH° e ΔS°	97
3.4-Influência da força iônica do meio reacional	99
3.5-Determinação da relação entre o número de molé- culas de $Rh_2(OAc)_4$ e o nº moléculas de papaína ...	99
3.5.1-Método gráfico	99
3.5.2-Precipitação com ácido tricloroacético	99
3.6-Determinação dos grupos -SH da papaína inativa...	109
3.7-Reativações da papaína inibida com $Rh_2(OAc)_4$	112
IV - DISCUSSÃO	115
4.1-Parâmetros cinéticos da papaína	115
4.2-Características da inibição	116
4.3-Parâmetros termodinâmicos	119
4.4-Influência da força iônica	121
4.5-Reativações	122
V - CONCLUSÃO	123
VI - SUGESTÕES PARA NOVOS TRABALHOS	124
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
VIII - ABREVIATURAS	138

ÍNDICE DE TABELAS

	<u>página</u>
Tabela 1-Dados espectrais e térmicos do tetracetato de ródio (II) diaquo	03
Tabela 2-Dados cristalográficos dos complexos $Rh_2(OAc)_4L_2$..	05
Tabela 3-Constantes físico-químicas da papaína	17
Tabela 4-Composição de aminoácidos da papaína	21
Tabela 5-Parâmetros cinéticos da papaína em diferentes temperaturas	67
Tabela 6-Constantes de velocidade e períodos de meia- vida da reação de inibição em várias temperaturas.	92
Tabela 7-Constantes de inibição em várias temperaturas.....	96
Tabela 8-Parâmetros termodinâmicos da inibição	99
Tabela 9-Dados para a determinação da relação entre o nº de moléculas de $Rh_2(OAc)_4$ e o nº de moléculas de papaína a 15 °C	100
Tabela 10-Idem, a 27 °C	101
Tabela 11-Idem, a 37 °C	102
Tabela 12-Reativações da papaína inativada com tetrace- tato de ródio (II) a 37 °C com diferentes a- gentes quelantes	112

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>página</u>
Figura 1 (a-b)-Geometria dos adutos de tetracetato de ródio (II)	02
Figura 2-Espectro de absorção ,em solução aquosa do complexo $Rh_2(OAc)_4(H_2O)_2$	04
Figura 3 (a-b)-Diagrama de orbitais moleculares para a ligação Rh-Rh	06
Figura 4-Diagrama orbital para uma ligação simples M-M ..	07
Figura 5-Diagrama orbital para uma ligação múltipla M-M	09
Figura 6-Diagrama qualitativo de orbitais moleculares da interação metal-carboxilato	10
Figura 7-Espectro de absorção da papaína em solução aquosa	19
Figura 8-A sequência dos resíduos de aminoácidos da papaína	22
Figura 9-Desenho em perspectiva da conformação da cadeia principal da papaína	25
Figura 10 (a-b)-A região do sítio ativo da papaína nas proximidades do grupo -SH	27 e 28
Figura 11-Equilíbrio tautômero sulfidril-imidazol	29
Figura 12-Os sete sub-sítios da região do sítio ativo da papaína	30
Figura 13-Mecanismo da ação catalítica da papaína sobre um substrato éster	35
Figura 14-Gráfico da variação da atividade da papaína com a concentração de BAEE em diferentes temperaturas	59
Figura 15-Gráfico da variação da atividade da papaína com a concentração de BAEE a 15 °C	60

Figura 16-Gráfico da variação da atividade da papaína com a concentração de BAEE a 22°C.....	61
Figura 17-Idem, a 27 °C	62
Figura 18-Idem, a 33 °C	63
Figura 19-Idem, a 37 °C	64
Figura 20-Idem, a 40 °C	65
Figura 21-Método gráfico de Lineweaver-Burk a 15 °C	68
Figura 22-Idem, a 22 °C	69
Figura 23-Idem, a 27 °C	70
Figura 24-Idem, a 33 °C	71
Figura 25-Idem, a 37 °C	72
Figura 26-Idem, a 40 °C	73
Figura 27-Método gráfico de Eadie-Hofstee a 15 °C	74
Figura 28-Idem, a 22 °C	75
Figura 29-Idem, a 27 °C	76
Figura 30-Idem, a 33 °C	77
Figura 31-Idem, a 37 °C	78
Figura 32-Idem, a 40 °C	79
Figura 33-Método gráfico de Hanes a 15 °C	80
Figura 34-Idem, a 22 °C	81
Figura 35-Idem, a 27 °C	82
Figura 36-Idem, a 33 °C	83
Figura 37-Idem, a 37 °C	84
Figura 38-Idem, a 40 °C	85
Figura 39-Gráfico da inativação da papaína por diferentes concentrações de Rh ₂ (OAc) ₄ a 15 °C	86
Figura 40-Idem, a 22 °C	87
Figura 41-Idem, a 27 °C	88

Figura 42-Gráfico da inativação da papaína por diferentes concentrações de $Rh_2(OAc)_4$ a 33 °C	89
Figura 43-Idem, a 37 °C	90
Figura 44-Idem, a 40 °C	91
Figura 45-Método gráfico para a determinação da energia de ativação da reação de inibição	93
Figura 46-Método gráfico para a determinação dos parâmetros termodinâmicos da inibição	98
Figura 47-Determinação da relação entre o nº de moléculas de $Rh_2(OAc)_4$ e o nº de moléculas de papaína a 15 °C	103
Figura 48-Idem, a 15 °C (com alteração de coordenadas)	104
Figura 49-Idem, a 27 °C	105
Figura 50-Idem, a 27 °C (com alteração de coordenadas)	106
Figura 51-Idem, a 37 °C	107
Figura 52-Idem, a 37 °C (com alteração de coordenadas)	108
Figura 53-Absorbâncias do tetracetato de ródio (II), da papaína e da papaína inibida eluidos com água bidestilada de uma coluna de Sephadex G-25 <u>fi</u> ne a 280 nm	110
Figura 54-Idem, a 585 nm	111
Figura 55-Gráfico da reativação da papaína por BAL a 37 °C	113
Figura 56-Gráfico da reativação da papaína por DTT a 37 °C	113
Figura 57-Gráfico da reativação da papaína por mercaptoetanol a 37 °C	114
Figura 58-Provável situação para a complexação do tetracetato de ródio (II) no sítio ativo da papaína	117

R E S U M O

Foi feita a investigação da inibição da enzima tióllica papaína com tetracetato de ródio (II) diaquo em seis diferentes temperaturas, objetivando determinar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos do processo inibitório.

A inibição verificou-se competitiva em todos os casos estudados, sendo o processo de inativação correlacionado com a temperatura do sistema, com o tempo de reação e com a concentração do inibidor.

A atividade da papaína mostrou-se parcialmente (no máximo 50%) recuperável e somente pela ação de agentes quelantes contendo o grupo sulfidrílica (p.ex. DTT, BAL, mercaptoetanol).

Foi constatado que não há influência significativa da força iônica do meio reacional sobre o processo de inativação enzimática.

Observou-se a inexistência de grupos sulfidrílicos livres após a completa inibição da papaína.

Foi demonstrado que cada molécula de enzima é inibida pela fixação de uma molécula do complexo tetracetato de ródio (II) diaquo.

Constatou-se, em cada temperatura, uma concentração relativamente alta de inibidor ($[I]_{50} = 1.10^{-4} M$) capaz de inativar 50% de papaína após uma hora de reação.

Verificou-se que a espontaneidade da reação de complexação ($\Delta G^{\circ} < 0$) está baseada no fator entálpico ($\Delta H^{\circ} < 0$) do processo de interação do $Rh_2(O_2CMe)_4(H_2O)_2$ com o sítio ativo da enzima, pois a contribuição entrópica é desfavorável ($\Delta S^{\circ} < 0$).

A B S T R A C T

The inhibition of the sulfhydryl enzyme papain with rhodium (II) tetraacetate dihydrate was investigated at six different temperatures to find the kinetic and thermodynamic parameters of the reaction.

The inhibition was competitive in all the studied cases and the process has been correlated with temperature, time of reaction and inhibitor concentration.

Of all the chelating agents tested, only those containing the thiol group (e.g. DTT, BAL, mercaptoethanol) could reactivate the inhibited enzyme. Even so the activity of papain was only partially recuperated (maximum 50%).

There was no significant influence of ionic strength on the reaction of enzymatic inactivation.

After complete inhibition, papain had no detectable free sulfhydryl groups.

Each enzyme molecule was inactivated by binding one $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4(\text{H}_2\text{O})_2$ molecule.

A high inhibitor concentration was required to inactivate 50% of papain ($[\text{I}]_{50} = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$).

The inhibition was a spontaneous process ($\Delta G^\circ < 0$) mainly because its enthalpy was negative ($\Delta H^\circ < 0$) since the entropy of the reaction was negative too ($\Delta S^\circ < 0$).

I - INTRODUÇÃO

1.1 - OBJETIVOS

Os carboxilatos de ródio (II) apresentam ação anti-tumoral e carcinostática associada à inibição de enzimas tiólicas do metabolismo celular, conforme HOWARD, SPRING e BEAR (1976).

Procurando ampliar este estudo, escolheu-se investigar a ação do tetracetato de ródio (II) diaquo sobre a papaína, uma enzima tiólica de origem vegetal cuja estrutura e modo de atuação são bem conhecidos, o que a torna ideal para ser usada como modelo desses processos inibitórios.

Objetivou-se determinar o tipo de inibição (competitiva, não-competitiva, acompetitiva ou mista) em diferentes temperaturas, bem como obter os vários parâmetros cinéticos (K_m , V_m e k_{cat}) e termodinâmicos (K_i , ΔH° , ΔS° e ΔG°) envolvidos na reação de inativação enzimática.

Buscou-se encontrar a proporção estequiométrica entre o número de moléculas de inibidor e de enzima, assim como informações sobre o processo de fixação do tetracetato de ródio (II) no sítio ativo da papaína.

Investigou-se a influência da força iônica do meio reacional e a possibilidade de reativação da proteína após a completa inibição.

1.2 - TETRACETATO DE RÓDIO (II) DIAQUO

1.2.1- Histórico, Características e Estrutura

O tetracetato de ródio (II) diaquo $[\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ é um dos carboxilatos dímicos de ródio (II) de fórmula geral $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{L}_n$ ($n=1,2$ e $\text{L} = \text{H}_2\text{O}, \text{CH}_3\text{OH}, \text{DMF}, \text{py}, \text{CH}_3\text{CN}, \text{NHET}_2, \text{DMSO}, \text{THT}, \text{CO}, \text{PPh}_3$).

As primeiras pesquisas relacionadas sobre o sistema tetracetato datam da década de 60. Em 1962, CHERNYAEV et al. prepararam tetracetato de ródio (II) hidratado através da reação de ácido acético sobre hexaclororrodato (III) de amônio em solução de etanol.

Análises de raios-X feitas por PORAI-KOSHITS e ANTSYSHKINA (1962) mostraram que este complexo possui uma estrutura dimérica, com quatro ligantes-ponte acetatos e uma ligação Rh-Rh (Figura 1 a-b).

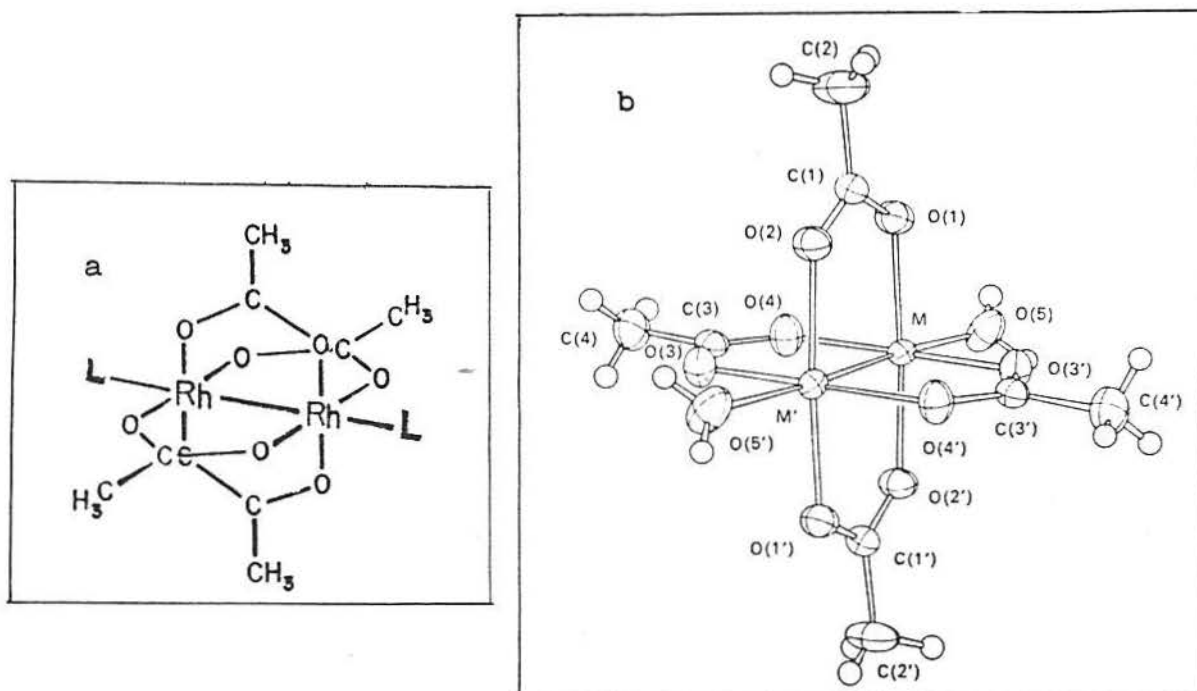


FIGURA 1 - GEOMETRIA DOS ADUTOS DE TETRACETATO DE RÓDIO (II), SEGUNDO COTTON E COL. (1971).

(a) Caso geral para ligantes axiais L .

(b) Caso do complexo diaquo, de simetria D_{2h}.

JOHNSON, HUNT e NEUMANN (1963) prepararam tetracetato de ródio(II) anidro pela ação de ácido acético glacial sobre hidróxido de ródio(III) recém precipitado. Estes autores descobriram que o complexo anidro reage com vários ligantes doadores para formar um aduto 1:2. Os adutos exibiram uma grande variedade de cor, dependendo da natureza do ligante.

Em 1964, COTTON et al. descreveram as interpenetrações de orbitais d nesses compostos binucleares de metais de transição.

KITCHENS e BEAR (1969) sintetizaram vários adutos de tetracetato de ródio(II) adicionando gotas do ligante sobre acetato de ródio(II) anidro finamente pulverizado e investigaram suas propriedades térmicas e espectrais. Os resultados para o complexo $Rh_2(O_2CCH_3)_4(H_2O)_2$ são mostrados na Tabela 1.

Cor	verde
% H ₂ O calculada	7,5
% H ₂ O encontrada	7,2
% Rh calculada	43,1
% Rh encontrada	43,6
Espectro de Absorção no Visível (*)	$\lambda_{m\acute{a}x} = 584 \text{ nm}$ $\epsilon = 197 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$
	$\lambda_{m\acute{a}x} = 441 \text{ nm}$ $\epsilon = 102 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$
Calor de decomposição (85°C) da reação: $Rh_2(OAc)_4(H_2O)_2(s) \rightarrow Rh_2(OAc)_4(s) + 2 H_2O(g)$	$\Delta H = 23,2 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$

TABELA 1 - DADOS ESPECTRAIS E TÉRMICOS DO $Rh_2(OAc)_4(H_2O)_2$, SEGUNDO KITCHENS E BEAR (1969).

(*) Corrigidos por MOSZNER et al. em 1976 para:

$\lambda_{m\acute{a}x} = 585 \text{ nm}$ e $\epsilon_{585} = 234 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ (transição $\pi^* \rightarrow \sigma^*$)
$\lambda_{m\acute{a}x} = 446 \text{ nm}$ e $\epsilon_{446} = 94 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ (trans. Rh-Rh $\pi^* \rightarrow$ Rh-O σ^*)

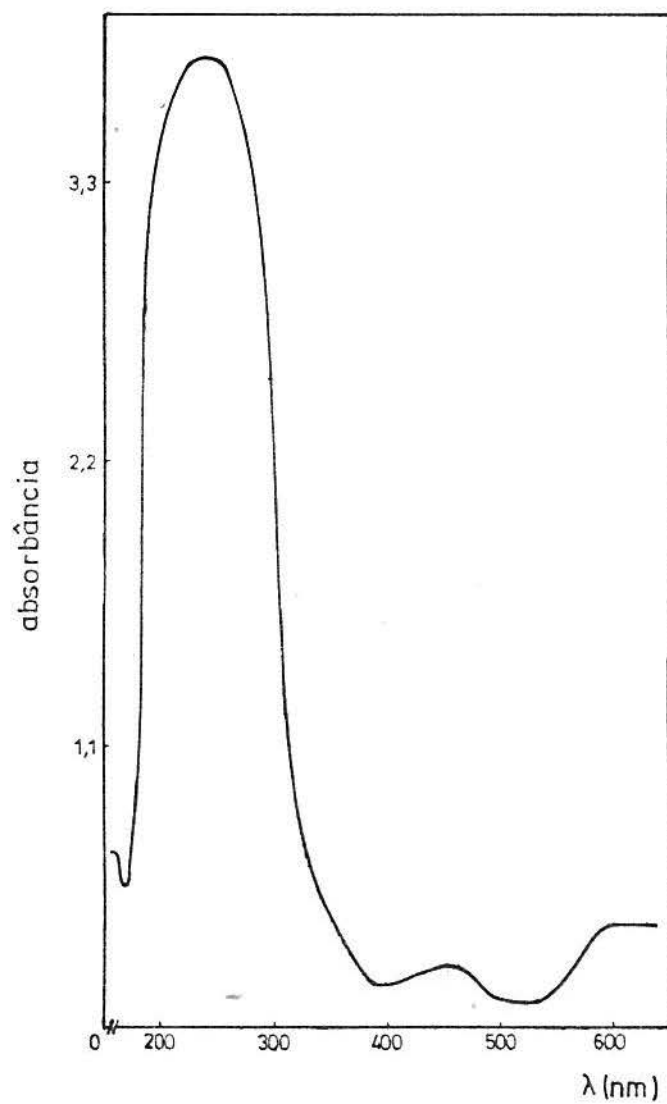


FIGURA 2 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO
 $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CMe})_4(\text{H}_2\text{O})_2$ EM SOLUÇÃO AQUOSA
DE CONCENTRAÇÃO $1,62 \cdot 10^{-3}$ M,
SEGUNDO ESTE TRABALHO.

COTTON e col. (1971) relataram dados cristalográficos re vistos para o sistema tetracetato de ródio(II) diaquo e que são apresentados na Tabela 2, conjuntamente com dados de complexos semelhantes, posteriormente estudados.

L	d_{Rh-Rh} (Å)	d_{Rh-L} (Å)	d_{Rh-O} (Å)	d_{C-O} (Å)	Rh-Rh-O (°)	Rh-O-C (°)	O-C-O (°)
CH ₃ OH	2.377	2.254					
DMF	2.383(1)	2.296(3)	2.038(3)	1.262(5)	88.33(9)	118.92(30)	126.1(44)
H ₂ O	2.3855(5)	2.310(3)	2.039(8)	1.269(4)	88.1(3)	119.9(3)	124.8(3)
CH ₃ CN	2.384	2.254					
py	2.3963(2)	2.227(3)	2.039(2)	1.266(3)	88.0(3)	119.1(3)	125.7
NHEt ₂	2.4020(7)	2.301(5)	2.038(3)	1.260(6)	87.9(1)	118.6(3)	127.0(4)
DMSO	2.406(1)	2.451(1)	2.036(3)	1.265(6)	87.82(9)	119.6(2)	125.5(4)
THT	2.413(1)	2.517(1)	2.039(3)	1.273(6)	87.83(6)	119.4(3)	125.5(4)
CO	2.419(3)	2.091(3)	2.032(2)	1.266(3)	87.6(1)	119.6(2)	125.5(2)
PPh ₃	2.449(2)	2.497(3)	2.044(4)	1.268(7)	87.1(1)	118.9(4)	126.4(4)
P(OMe) ₃	2.455	2.973					

TABELA 2-DADOS CRISTALOGRAFICOS DOS COMPLEXOS Rh₂(OAc)₄L₂, SEGUNDO MOSZNER ET AL. (1985).

Os carboxilatos dímeros de ródio(II) são classificados como sistemas d⁷-d⁷, considerando-se a estrutura eletrônica [Kr]4d⁷ para cada íon Rh²⁺ no estado fundamental.

O problema da correlação entre a distância Rh-Rh, os ligantes-ponte acetatos e os ligantes axiais L nos complexos Rh₂(O₂CCH₃)₄L₂, bem como a ordem da ligação metal-metal e sua estrutura eletrônica ainda suscitam dúvidas.

DUBICKI e MARTIN (1970) sugeriram uma ligação simples para o centro Rh-Rh, com base em resultados espectrais.

COTTON et al. (1971), baseados no comprimento da ligação metal-metal principalmente, propuseram uma ligação tripla. A ligação Rh-Rh apresenta distâncias que variam desde 2,377 Å, como em Rh₂(OAc)₄(MeOH)₂, até 2,455 Å, como no sistema Rh₂(OAc)₄[P(OMe)₃]₂, sendo, portanto, muito menor do que os 2,7 Å esperados para uma ligação simples Rh-Rh.

Na Figura 3 estão reproduzidos os esquemas de níveis energéticos de orbitais moleculares apresentados para os casos de ligação tripla e simples.

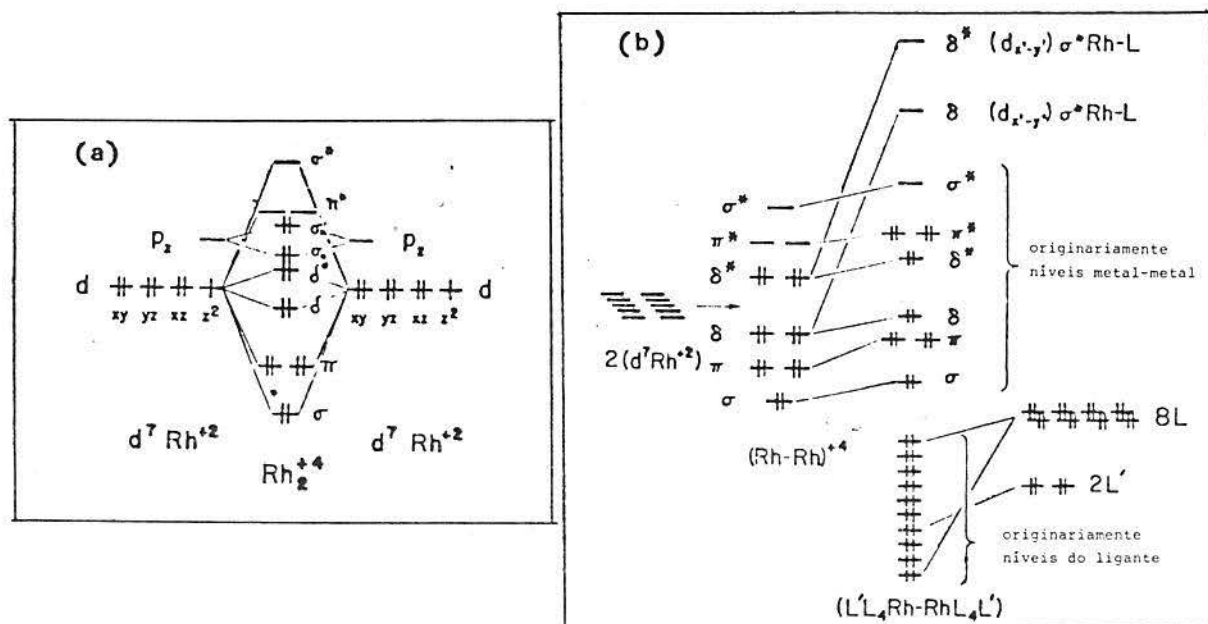


FIGURA 3-DIAGRAMA OM PARA LIGAÇÃO Rh-Rh(CHRISTOPH E KOH,1979).

(a) Formulação da Teoria da Ligação de Valência para a ligação tripla Rh-Rh d^7-d^7 . Cada ródio utiliza orbitais $d_{x^2-y^2}$, s , p_x e p_y (dsp^2) para a combinação com os oxigênios equatoriais, deixando os orbitais d_{z^2} , p_z , d_{xy} , d_{yz} e d_{xz} para a formação dos orbitais do sistema metal-metal. Os dois orbitais p_z originam as combinações não-ligantes $p_{za}+p_{zb}$ e $p_{za}-p_{zb}$ que estão preenchidas e embutidas no meio dos níveis d . Os orbitais não-ligantes σ'_n e σ''_n provêm dos orbitais $5p_z$ de cada centro metálico.

(b) Formulação da Teoria do Campo Cristalino para a ligação simples Rh-Rh d^7-d^7 . Os lóbulos do orbital $d_{x^2-y^2}$ de cada ródio orientam-se em direção aos oxigênios doadores dos carboxilatos-ponte. Estes orbitais, que poderiam, por outro lado, formar um segundo δ , δ^* par degenerado com os orbitais d_{xy} são os de mais alta energia e identificados como orbitais antiligantes Rh-O σ^* .

Um estudo RSE para um aduto 1:1 de tetra(trifluoroacetato) de ródio(II) foi divulgado por RICHMAN e col. (1977), consistente com a interpretação de ligação simples.

Em 1978, NORMAN e KOLARI, com cálculos de SCF-X α -Sw sobre tetraformiato de ródio(II) e seus diidratos, também recomendaram a formulação de ligação simples.

A distância da ligação Rh-Rh nos complexos do tipo $Rh_2(O_2CCH_3)_4L_n$ é função das propriedades doadoras-receptoras dos ligantes axiais L, relacionando-se o fato com a possibilidade de influência *trans* e de interações σ e π metal-ligante. APPLETON et al. (1973) propuseram representações qualitativas de orbitais para explicar os dados de influência *trans* obtidos em complexos binucleares metal-metal. A Figura 4 a-c corresponde a uma ligação simples e a Figura 5 a-d representa uma ligação tripla Rh-Rh, conforme estes autores.

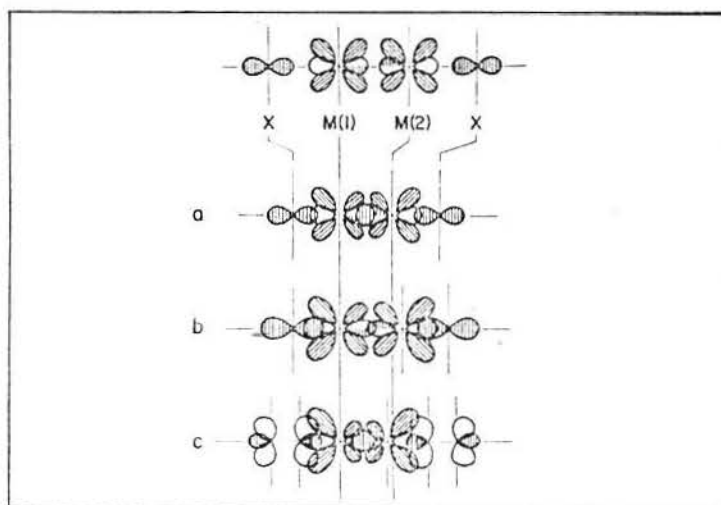


FIGURA 4 - DIAGRAMA ORBITAL PARA UMA LIGAÇÃO SIMPLES M-M, SEGUNDO APPLETON ET AL. (1973).

Segundo os referidos autores, na Figura 4 os lóbulos de orbital d cheios exercem certa repulsão mútua e estão polarizados para fora, em direção ao ligante L . A ligação metal-metal é representada pela interpenetração de duas metades cheias de orbitais d_{z^2} .

(a) As metades externas de cada orbital são mostradas vazias, pois representam a combinação σ^* antiligante, dentro da qual os ligantes doam seus elétrons. Quanto mais o orbital σ M-M é estabilizado, mais o orbital σ^* é desestabilizado e, portanto, menos efetiva é a ligação com um ligante L fraco σ -doador e fraco π -receptor (como H_2O). Os ligantes competem muito pouco pelo orbital d_{z^2} do metal. A ligação M-M é curta e forte.

(b) Os ligantes L (fortes σ -doadores e fracos π -receptores, como $:NR_3$, p.ex.) competem fortemente pela densidade orbital d_{z^2} do metal, enfraquecendo a ligação metal-metal e alongando-a relativamente ao caso (a). Note que o aumento da doação eletrônica do ligante para o metal expande os orbitais d cheios e estende a distância M-M.

(c) O ligante L é um fraco σ -doador e forte π -receptor (como, por exemplo, CO). A forte habilidade π -receptora permite a deslocalização da densidade d -orbital do metal no sistema ligante, reduzindo a repulsão M-M. A ligação metal-metal é forte (fraco σ -doador) e mais curta do que em (a) e (b).

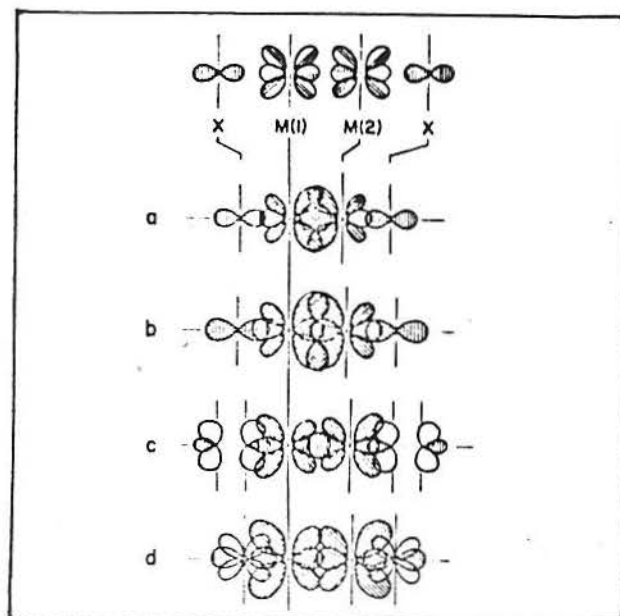


FIGURA 5-DIAGRAMA ORBITAL PARA UMA LIGAÇÃO MÚLTIPLA M-M, SEGUNDO APPLETON E COL. (1973).

- (a) O ligante L é um fraco σ -doador e fraco π -receptor (ex.: H_2O). A ligação M-M é curta e muito forte.
- (b) O ligante L é um forte σ -doador e fraco π -receptor ($:\text{NR}_3$, p.ex.). A expansão dos orbitais d do metal permite mais efetiva interpenetração orbital no sistema metal-metal, mas a ligação σ M-M é enfraquecida, alongando sua distância.
- (c) O ligante L é um fraco σ -doador e forte π -receptor (ex.: CO). A ligação M-M é forte (como no caso a) mas a habilidade π -receptora do CO enfraquece a interação π M-M, aumentando sua distância.
- (d) O ligante L é um forte σ -doador e forte π -receptor (como $:\text{PR}_3$). Ambas as ligações σ e π M-M são enfraquecidas pela competição das fosfinas axiais, alongando a distância metal-metal comparativamente aos casos (a), (b) e (c).

CHRISTOPH e KOH em 1979 mostraram um esquema de níveis energéticos para os orbitais moleculares do sistema Rh-Rh , alterado em função da extensiva interpenetração dos orbitais metálicos com os orbitais dos carboxilatos-pontes (Figura 6 a-b).

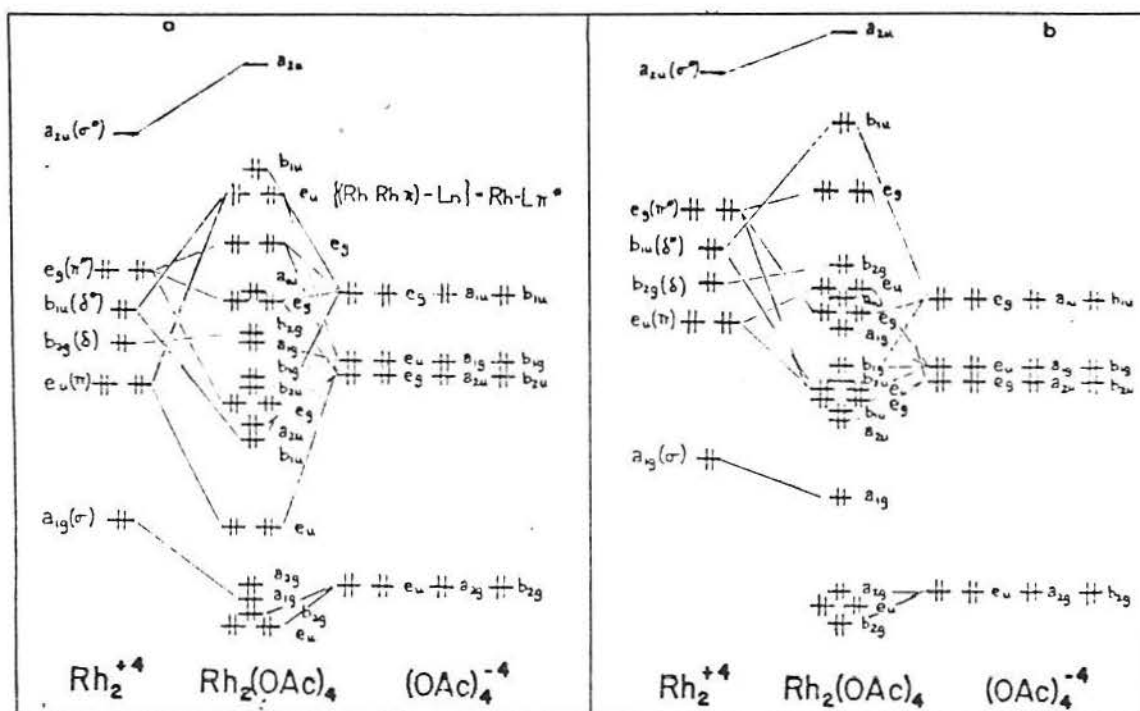


FIGURA 6-DIAGRAMA OM QUALITATIVO DA INTERAÇÃO METAL-CARBOXILATO-PONTE (CHRISTOPH E KOH, 1979).

O diagrama representa qualitativamente a extensiva interpenetração dos orbitais do carboxilato-ponte com aqueles do centro binuclear d^7-d^7 . Os níveis do carboxilato estão indicados na direita tanto em (a) como em (b), alterando-se apenas as posições dos níveis Rh-Rh em relação aos do carboxilato. As alterações na posição e sequência dos OM resultantes ilustram a grande importância do posicionamento relativo dos níveis contribuintes do metal e do ligante. A figura desconsidera os níveis não-ocupados 5s e 5p de cada ródio, os quais poderiam combinar-se com os orbitais d adequados do outro metal e com os orbitais do ligante carboxilato, levando a adicionais modificações na posição e ordenamento dos orbitais moleculares resultantes.

Estes últimos autores referidos interpretaram os resultados de suas pesquisas como correspondentes a uma ligação simples Rh-Rh de extraordinária intensidade, justificando a curta distância metal-metal pela interação ródio-carboxilato e as variações desta distância frente a diferentes ligantes axiais através da influência *trans* .

Propuseram também que o conceito de Ordem de Ligação , no seu sentido formal, poderia não ser uma medida útil das interações metal-metal nos complexos dímeros de ródio(II) e outros sistemas semelhantes. Interações do centro Rh-Rh com os vários ligantes causariam alterações nos orbitais moleculares M-M. Não mais puro Rh-Rh, um orbital ligante cheio π Rh-Rh não seria mais exatamente cancelado por um orbital antiligante cheio π^* Rh-Rh e uma contribuição residual poderia resultar na ordem total da ligação. A ordem líquida da ligação M-M poderia ser 1,0 ou fracionada (por ex.: 1,2), consistindo de componentes σ , π e mesmo δ provenientes do inexato cancelamento dos orbitais ligantes e antiligantes σ , π e δ do sistema.

Em 1983, NAKATSUJI et al. noticiaram uma configuração eletrônica $\pi^4 \delta^2 \pi^*4 \delta^*2 \sigma^2$ para os catorze elétrons do centro Rh_2^{4+} do complexo tetracetato de ródio(II) diaquo.

COTTON e WILKINSON (1988) relataram uma ordem de ligação intermetálica Rh-Rh de 1,5 para o aduto $Rh_2(OAc)_4(H_2O)_2$.

1.2.2 - REATIVIDADE DO TETRACETATO DE RÓDIO (II)

Desde as primeiras preparações dos complexos do tipo $Rh_2(O_2CCH_3)_4L_2$ já eram conhecidas as possibilidades de substituições dos ligantes axiais L por outros ligantes. A velocidade da reação de tais substituições era maior do que a dos ligantes-pontes carboxilatos.

Por outro lado, o tetracetato de ródio(II) prontamente troca os grupos acetatos na presença de outros ácidos carboxílicos.

BEAR et al. (1971), com técnicas de RMN, estudaram a reação de troca do $Rh_2(OAc)_4$ com CF_3CO_2H e observaram que, após a substituição de dois grupos acetatos, os dois grupos remanescentes reagem com uma velocidade 20 a 80 vezes menor do que a dos dois primeiros.

RAINEM e col. (1975) relataram dados termodinâmicos e cinéticos relativos à fixação de ligantes axiais nos complexos $Rh_2(O_2CR)_4$. A formação do aduto é um processo de duas etapas, originando primeiramente um complexo 1:1 e, finalmente, um complexo 2:1 com o carboxilato. Esses pesquisadores avaliaram as constantes de formação do processo e revelaram que, uma vez formado o aduto 1:1, o segundo ligante axial é muito mais lentamente fixado no outro ródio.

DAS e colaboradores (1977) descobriram que a presença de mais de um átomo doador no ligante axial aumenta a constante de velocidade da reação de fixação no centro binuclear Rh-Rh. A labilidade dos ligantes axiais, refletida estruturalmente nas distâncias Rh-L (sempre maiores do que o normal), é resultado do efeito *trans* da ligação Rh-Rh, na interpretação dos autores citados.

Tetracetato de ródio(II) é estável em relação ao O_2 .

Ligantes com enxofre doador muitas vezes conduzem à degradação da gaiola dos carboxilatos $Rh_2(O_2CR)_4$, como registraram KITCHENS e col. (1970).

1.2.3 - ASPECTOS BIOINORGÂNICOS

1.2.3.1 - Atividade Antitumoral

Em 1969, ROSENBERG e colaboradores descobriram

que o complexo *cis* -diclorodiaminoplatina(II) funcionava como poderosa droga antitumoral. Isto provocou investigações de atividade carcinostática em outros complexos de platina e metais do mesmo grupo.

HUGHES et al.(1972) observaram que os carboxilatos de ródio(II) podiam aumentar a sobrevivência de ratos portadores de tumor ascite L1210.

Estudos posteriores demonstraram que estes complexos carboxilatos também eram inibidores de tumores ascite de Ehrlich (BEAR e col.,1975) e P388 (KADISH et al.,1978) em ratos.

Em 1977, HOWARD e co-autores mostraram que as propriedades terapêuticas dos complexos $Rh_2(O_2CR)_4$ para os tumores da classe ascite Ehrlich variavam com a natureza do grupo R. Aumentando a cadeia de R, desde o grupo metil até n-butyl, ocorria um progressivo acréscimo na atividade antitumoral dos carboxilatos de ródio(II). Aumentos ainda superiores no número de carbonos do grupo alquil, entretanto, diminuíam essa atividade.

HOWARD et al.(1979) identificaram o tetrabutirato de ródio(II) como o mais potente dos carboxilatos testados. Relataram também que estes complexos inibem as sínteses de DNA e proteínas nas células do tumor, mas exibem efeito pequeno ou nulo sobre a síntese de RNA. Interpretaram o mecanismo desta inibição com base na habilidade de ligação axial dos carboxilatos de ródio(II). Grupos amino livres, como os encontrados em adenina nucleotídeos, e grupos sulfidril dos resíduos de cisteína seriam possíveis sítios ligantes (HOWARD e col.,1977).

Nos carboxilatos de ródio(II), a atividade antitumoral é paralela a sua toxicidade.

KIMBALL e col. (1976) revelaram em seus estudos que a estrutura em forma de gaiola dos grupos carboxilatos é suscetível de decomposição, verificando que o tetracetato de ródio(II), administrado a ratos, originava, após algumas horas, ródio metálico, íons acetato livres e CO₂ como produtos metabolizados.

HOWARD, SPRING e BEAR (1976) estudaram o efeito de três carboxilatos de ródio(II) - acetato, propionato e metoxiacetato - sobre a atividade de dezessete enzimas. Todas as enzimas que apresentavam grupos sulfidrila perto ou dentro do sítio ativo foram irreversivelmente inibidas, não tendo sido afetadas as demais. Medidas de RMN mostraram uma quebra na estrutura dos grupos carboxilatos.

A instabilidade dos complexos $Rh_2(O_2CR)_4L_n$ sob algumas condições fisiológicas causa efeitos deletérios e estes compostos não dão respostas em certos tipos de câncer, como informaram HALL et al. (1980) ao estudar suas propriedades antineoplásicas sobre tumores de leucemia L1210 e melanona B16 em ratos.

Significativos desenvolvimentos ainda devem ser feitos para futuras aplicações dos sistemas complexos dímeros de ródio(II) tetracarboxilatos na quimioterapia do câncer.

1.2.3.2 - Complexos com Substratos Biológicos

Após a descoberta da ação antitumoral dos carboxilatos de ródio (II) sobre certos tipos de tumores, foram feitas várias investigações das propriedades de ligação destes complexos com substratos biológicos.

O composto 5'-monofosfato de adenosina forma um aduto 2:1 com complexos $Rh_2(O_2CR)_4$ em pH fisiológico cujo espectro eletrônico indica coordenação com nitrogênio (RAINEM et al., 1975).

BEAR e DAS (1976) fizeram estudos em solução de adutos com imidazol e histidina.

PNEUMATIKAKIS e HADJILIADIS em 1979 isolaram adutos sólidos de tetracetato de ródio(II) com vários nucleosídeos e nucleotídeos de adenina.

As estruturas dos adutos 2:1 de teofilina e cafeína com tetracetato de ródio(II) servem de modelo para interações com ácidos nucléicos (AOKI e YAMAZAKI, 1980).

PNEUMATIKAKIS e PSAROULIS (1980) relataram a reação de aminoácidos contendo enxofre com $Rh_2(O_2CCH_3)_4$. Tais interações assemelham-se às mencionadas por Howard et al. para enzimas tiólicas.

Tioéter aminoácidos como S-metilcisteína, S-etilcisteína e metionina formam adutos axiais 2:1 com tetracetato de ródio(II). A ligação axial com o enxofre é confirmada por dados analíticos e espectroscópicos. Os compostos são diamagnéticos. Em contraste, alguns aminoácidos ligantes com grupo sulfidríla livre originam complexos paramagnéticos quando tratados com $Rh_2(O_2CMe)_4$. Ligantes deste tipo incluem a l-cisteína, l-cisteína metiléster e l-penicilamina, sendo os seus complexos de ródio(II) tetracoordenados e de forma quadrada. Estes ligantes coordenam-se de maneira bidentada no tetracetato de ródio(II) através dos átomos de enxofre (desprotonado) e nitrogênio (do grupo amino).

1.3 - PAPAÍNA

1.3.1 - HISTÓRICO

WURTZ e BOUCHET, em 1879, usaram pela primeira vez o termo "papaína" para designar o princípio proteolítico encontrado no látex do fruto do mamoeiro "Carica papaya L", árvore tropical existente na América do Sul, América Central e África.

Em 1905, VINES sugeriu que este látex bruto poderia conter vários componentes com atividade proteolítica, seguindo o mesmo pesquisador, em 1909, a separação de duas proteinases daquele material, através de precipitação com cloreto de sódio.

Estudos de BALLS et al. (1937) e BALLS e LINEWEAVER (1939) sobre este látex permitiram a extração de uma enzima em estado cristalino e denominada de papaína pelos autores.

O processo de obtenção da papaína sob forma cristalina a partir do extrato seco do mamão consolidou-se em 1954, na publicação de KIMMEL e SMITH, sendo, desde então, e praticamente até hoje, o processo padrão de preparação dessa proteína.

A papaína (E.C. 3.4.22.2) é a enzima tiólica de origem vegetal mais bem estudada e melhor caracterizada em seus pormenores, ultrapassando em trezentos o número de publicações a seu respeito. A literatura especializada continua publicando intensamente trabalhos de pesquisa relativos ao mecanismo de ação, estrutura, processos de inibição e aplicações dessa proteinase em vários setores (por exemplo: eliminação da turvação em cervejas, amaciante de carnes, prevenção do encolhimento de tecidos de lã, etc.).

1.3.2 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

1.3.2.1 - Constantes Físico-químicas

As principais constantes físico-químicas da papaína são apresentadas na Tabela 3.

$S_{20,w}$ (Constante de Sedimentação)	2,42 S
$D_{20,w}$ ($10^{-7} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) (Const.de Difusão)	10,23
\bar{v} ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) (Volume parc.apar.específ.)	0,723
f/f_0 (Razão Friccional)	1,16
pI (Ponto Isoelétrico)	8,75
$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ (Absorbância a 278 nm)	25,0
Massa Molecular (S,D)	21.000 D
Massa Molecular (Equil.de Sedimentação)	23.700 D
Massa Molecular (Sequência de aminoácidos)	23.406 D

TABELA 3 - ALGUMAS CONSTANTES FÍSICO-QUÍMICAS DA PAPAÍNA, SEGUNDO GLAZER E SMITH (1971).

1.3.2.2 - ESPECTROSCOPIA

A papaína não contém outros grupos cromóforos além de seus aminoácidos constituintes. Ela é rica em tirosina (19 resíduos) e triptofânio (5 resíduos).

As propriedades fluorescentes dessa proteína foram estudadas através dos trabalhos de SHINITZKY e GOLDEMAN (1967) BAREL e GLAZER (1969) e SLUYTERMAN e DE GRAAF (1970), que interpretaram o espectro de emissão obtido por excitação no comprimento de onda de 295 nm como basicamente originário dos resíduos de triptofânio da cadeia polipeptídica.

Estudos espectroscópicos de GLAZER e SMITH (1960) mostraram que os grupos fenólicos da papaína ionizam-se de forma complexa em diferentes valores de pH.

Particularmente importante para a dosagem da concentração da enzima em nossas experiências é a absorção efetuada pela solução aquosa de papaína a 280 nm (Figura 7), com um correspondente coeficiente molar de extinção (ϵ_{280}) segundo MITCHEL et al. (1970) e TANG e TANG (1976) de $58500 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

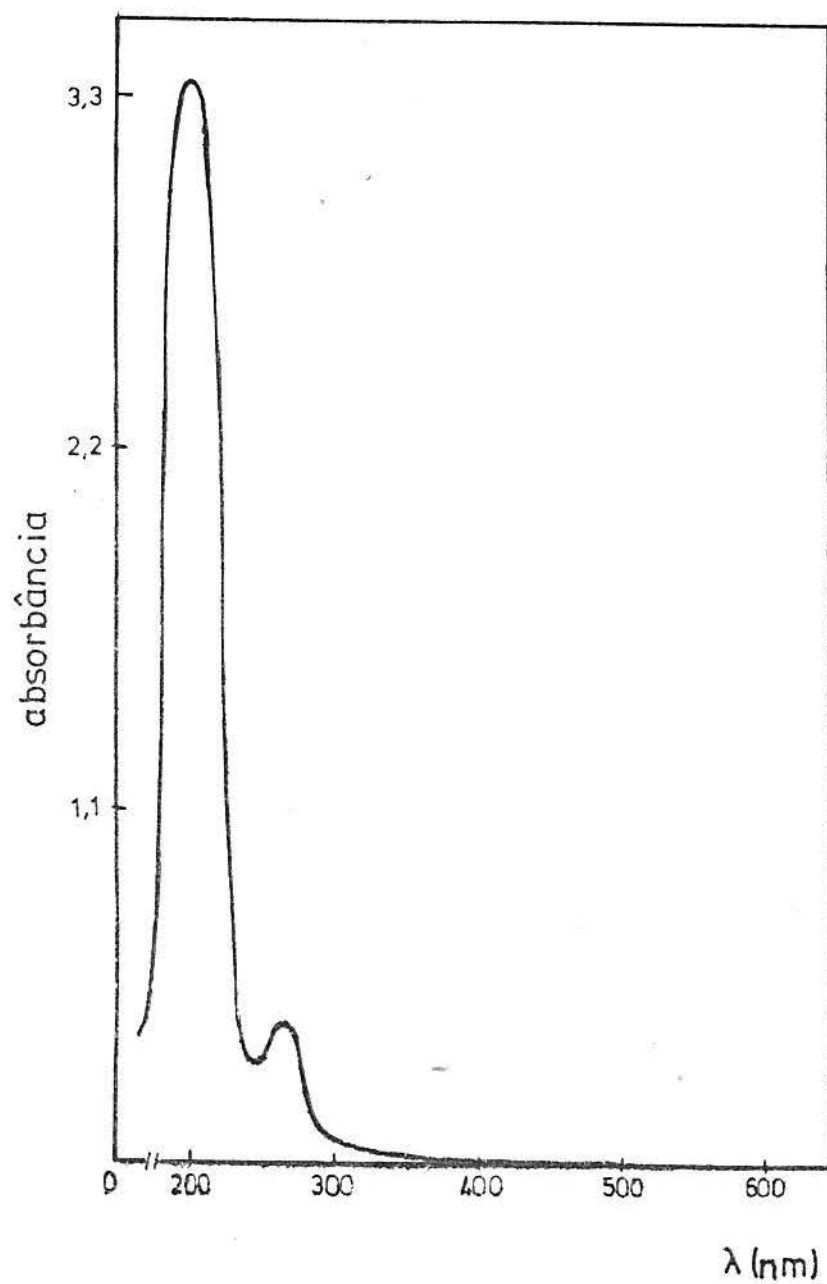


FIGURA 7 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA PAPAÍNA EM SOLUÇÃO AQUOSA $1,71 \cdot 10^{-5}$ M , SEGUNDO ESTE TRABALHO.

1.3.2.3 - Estabilidade

Desde 1941, LINEWEAVER e SCHWIMMER e posteriormente HWANG e IVY (1951) estudaram a excepcionalmente alta estabilidade da papaína em temperaturas elevadas, nas proximidades do pH neutro. A enzima mantinha-se ativa para o substrato no intervalo de 5 °C a 66 °C, conforme relataram STOCKEL e SMITH em 1957.

LINEWEAVER e SCHWIMMER (1941) observaram uma rápida e irreversível inativação acima de 40 °C quando o pH era menor do que 4,0.

Para um meio ainda mais ácido ($\text{pH} < 2$), a inativação ocorria a 25 °C, com destruição das estruturas secundária e terciária da proteína (GLAZER e SMITH, 1960).

A papaína não é afetada significativamente por solventes orgânicos ou reagentes capazes de causar mudanças conformacionais em proteínas, desnaturando-as.

Nenhuma alteração foi notada na presença de etanol a 70% (v/v), metanol a 50% e dioxano a 30% segundo relataram KIMMEL e SMITH (1958), DRENTH et al. (1968) e BAREL e GLAZER (1969).

Similarmente, a papaína mantém sua atividade em solução 8 M de uréia, como observaram LINEWEAVER e col. em 1941, GUNDLACH e TURBA (1965) e SLUYTERMAN (1967).

Como cristais em suspensão numa solução de cloreto de sódio, a papaína pode ser mantida por meses a 4°C sem detectável perda em sua atividade.

Em solução, mercúrio-papaína pode ser guardada por meses sem perder a sua atividade potencial, apesar de uma diminuição de 1% a 2% desta atividade por dia, provavelmente originária de autólise e/ou oxidação.

1.3.3 - ESTRUTURA

A papaína foi o primeiro membro identificado de uma classe de enzimas proteolíticas que necessitam de um grupo sulfidrila livre para sua atividade.

1.3.3.1 - Estrutura Primária

Esta proteína é constituída de uma única cadeia polipeptídica, isenta de carboidratos e formada por 212 resíduos de aminoácidos. A sequência desses resíduos foi estabelecida principalmente pelos trabalhos de HUSAIN e LOWE em 1969 e 1970 e de MITCHELL e col. em 1970. A Figura 8 apresenta o resultado dessas investigações.

Derivada dessa sequência, a composição de aminoácidos da papaína é mostrada na Tabela 4, onde se nota a presença de todos os aminoácidos comumente presentes nas proteínas, com exceção da metionina.

Aminoácido	Número	Aminoácido	Número
Lisina	10	Glicina	28
Histidina	2	Alanina	14
Arginina	12	Valina	18
Ácido Aspártico	6	Isoleucina	12
Asparagina	13	Leucina	11
Ácido Glutâmico	8	Tirosina	19
Glutamina	12	Fenilalanina	4
Treonina	8	Triptofânio	5
Serina	13	Cisteína	1
Prolina	10	Cisteína (meia)	6
		Total	212

TABELA 4 - A COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DA PAPAÍNA, SEGUNDO LOWE (1976).

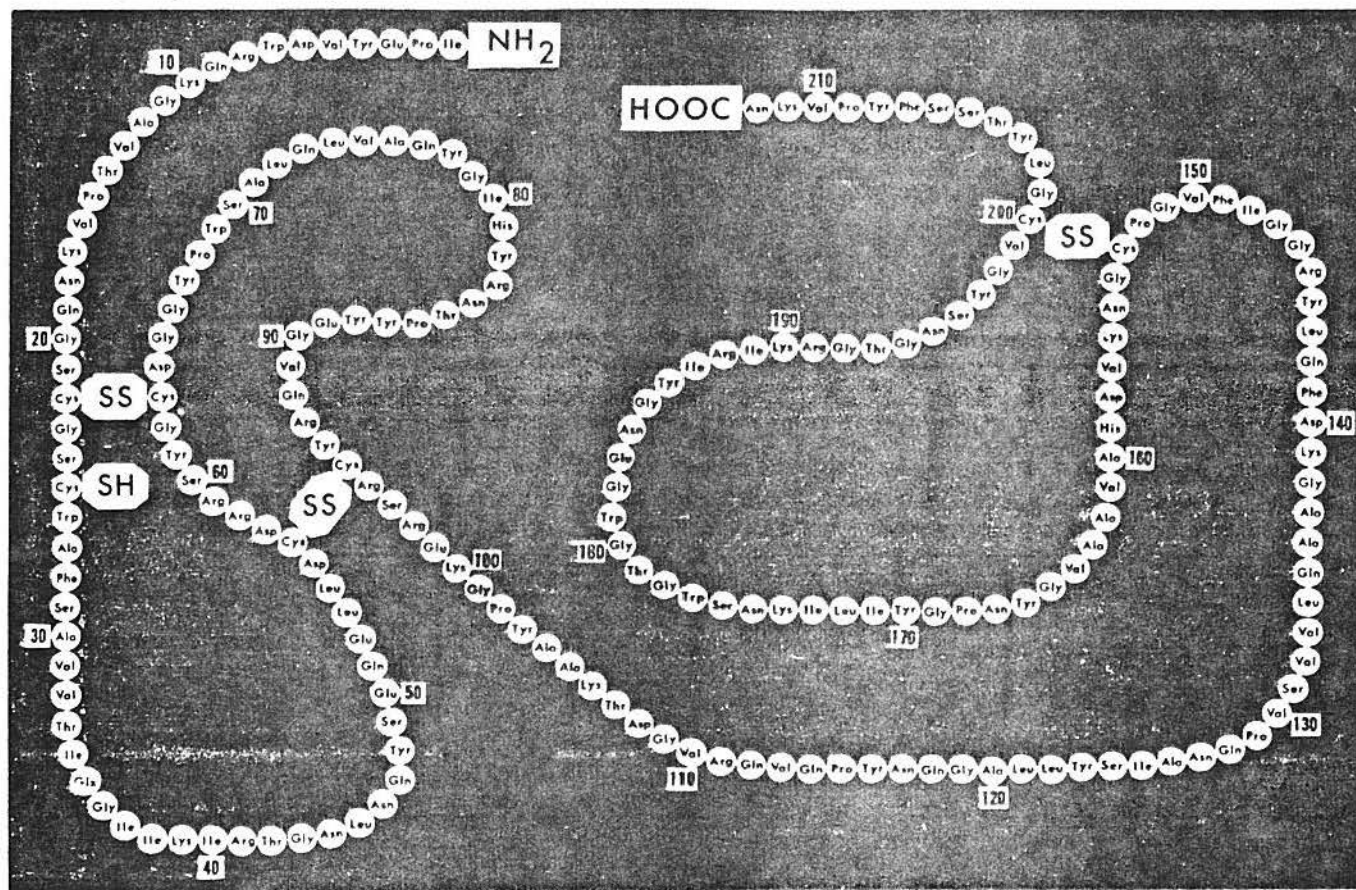


FIGURA 8 - A SEQUÊNCIA DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS DA PAPAÍNA SE-
GUNDO LOWE (1976).

Aspectos importantes a destacar na estrutura primária da enzima são:

I- Dos sete resíduos de cisteína presentes, seis estão ligados em pontes dissulfeto, sendo duas na primeira metade da cadeia (Cis-22---Cis-63 e Cis-56---Cis-95) e uma na segunda metade (Cis-153---Cis-200). O sétimo resíduo de cisteína (Cis-25) tem importantíssima participação na formação do sítio catalítico. A conformação estrutural é estabilizada pelas três pontes dissulfeto, cuja completa ruptura resulta na destruição da proteína, indicada pela perda de suas propriedades catalíticas e biológicas.

II- A soma dos resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico chega apenas a catorze, teor consideravelmente menor do que a soma dos resíduos básicos de lisina e arginina, cujo total atinge vinte e dois. Isto justifica o ponto isoelétrico elevado de 8,75 da proteína, determinado por GLAZER e SMITH (1960) em força iônica de 0,1.

III- No ponto isoelétrico somente 30 grupos (aproximadamente, 14% dos resíduos) estão na forma ionizada em solução aquosa. Assim, a papaína tem as propriedades de uma globulina e é pouco solúvel em água ou em meios de pequena força iônica.

Esse fato também pode ser interpretado pela relativamente reduzida quantidade de grupos hidrofílicos e pela abundância de resíduos hidrofóbicos da molécula de papaína, embora a maioria destes últimos encontrar-se no interior da proteína (SMITH e KIMMEL, 1960).

1.3.3.2 - ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERCIÁRIA

Cristalografias de raios-X com resolução de 0,28 nm feitas em 1967,1968 e 1971 por DRENTH et al. e , em 1971 por GLAZER e SMITH permitiram determinar em pormenores as estruturas secundária e terciária da papaína.

As dificuldades iniciais destas pesquisas justificavam-se pela presença de três formas de papaína na enzima cristalizada pelo método padrão de KIMMEL e SMITH de 1954: papaína ativa, papaína reversivelmente inativada e papaína irreversivelmente inativada (GLAZER e SMITH,1965;SLUYTERMAN,1967;DRENTH e col.,1970). Estas formas apresentam estruturas e comportamentos distintos frente às técnicas de elucidação estrutural.

Com o desenvolvimento do processo de cromatografia de afinidade foi possível obter papaína ativa cristalizada com grande grau de pureza (SLUYTERMAN e WIDJENES,1970; BLENBERG et al.,1970 ; BURK et al., 1974 ; BROCKLEHURST e LITTLE,1972 2 1973) e prontamente estabeleceram-se os dados de suas estruturas.

A molécula de papaína é globular, com dimensões aproximadas de $36 \times 48 \times 36 \text{ \AA}$ e formada por dois lóbulos de volumes quase idênticos e separados por um sulco, em cujo interior está localizada a região do sítio ativo. Uma representação esquemática é mostrada na Figura 9.

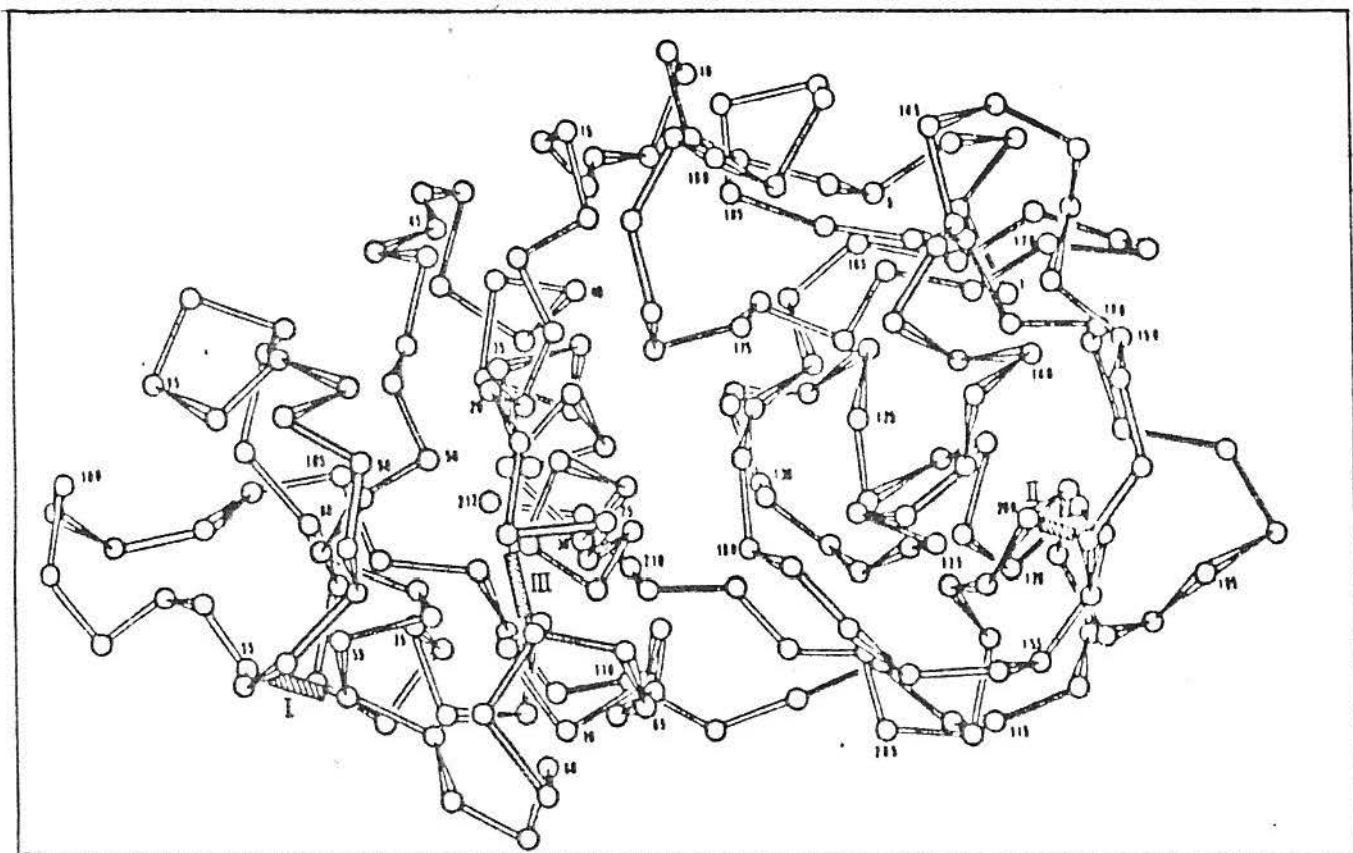


FIGURA 9 - DESENHO EM PERSPECTIVA DA CONFORMAÇÃO DA CADEIA PRINCIPAL DA PAPAÍNA, SEGUNDO DRENTH E COL. (1967).

Os círculos representam os átomos de α -C dos 212 resíduos de aminoácidos.

Dados de DRENTH e col. (1960) sobre a estrutura terciária da proteína mostram que esses dois lóbulos circundam, cada um deles, um núcleo hidrofóbico de tamanho reduzido.

Após a síntese da cadeia polipeptídica pelo ribossoma, acredita-se que tem início o seu dobramento e a formação do primeiro lóbulo a partir da extremidade aminada, circundando o primeiro núcleo hidrofóbico.

A seguir, formam-se três alfa-hélices com 41 resíduos, completando-se então o primeiro lóbulo por uma laçada hidrofílica com os resíduos 81 a 110.

A segunda parte da molécula contém apenas 19 resíduos enrolados em alfa-hélices. Nesse lóbulo existe uma estrutura distorcida de folha prequeada constituída de 30 resíduos. A cadeia sofre uma volta sobre si mesma entre os aminoácidos 165 e 172, originando uma estrutura β -antiparalela quase perfeita e constituinte de parte da parede do segundo núcleo hidrofóbico, o qual tem um diâmetro de 3 Å e é envolto por 16 grupos metilas (DRENTH et al., 1970).

Um modelo para a distribuição superficial de carga elétrica e vários detalhes da topografia interna e externa da papaína foram determinados por LAVERY e col. em 1983.

1.3.3.3 - O SÍTIO ATIVO

A interação entre a papaína e o substrato ocorre na superfície da proteína, no sulco situado entre as duas partes da molécula, constituindo o sítio ativo da enzima.

O sulco possui uma parede formada por um segmento de alfa-hélice com os resíduos de 24 a 40 e comporta, segundo LAVERY et al. (1983) poucos grupos eletricamente

te carregados, sendo assim, uma região particularmente hidrofóbica. Essa alfa-hélice estende-se do fundo da cavidade até a sua superfície, estando sua extremidade N-terminal voltada para o centro ativo.

Tal arranjo é fundamental, na interpretação dos últimos autores citados, pois nessa região está presente o grupo -SH livre da cisteína-25 e o grupo imidazol com o nitrogênio-N₁ da histidina-159, situados em paredes opostas do sulco e com possibilidade de transferência protônica.

DRENTH e col. em 1970 relataram a estreita proximidade dos dois grupos referidos (distância de Van der Waals de 0,34 nm), um importante detalhe envolvido na formação do par iônico mercapto-imidazólico conforme LOWE (1976), POLGÁR (1977) e ZANNIS e KIRSCH (1978).

Na Figura 10 a-b, proposta por DRENTH et al. em 1970, aparecem dados cristalográficos do sítio ativo da papaína.

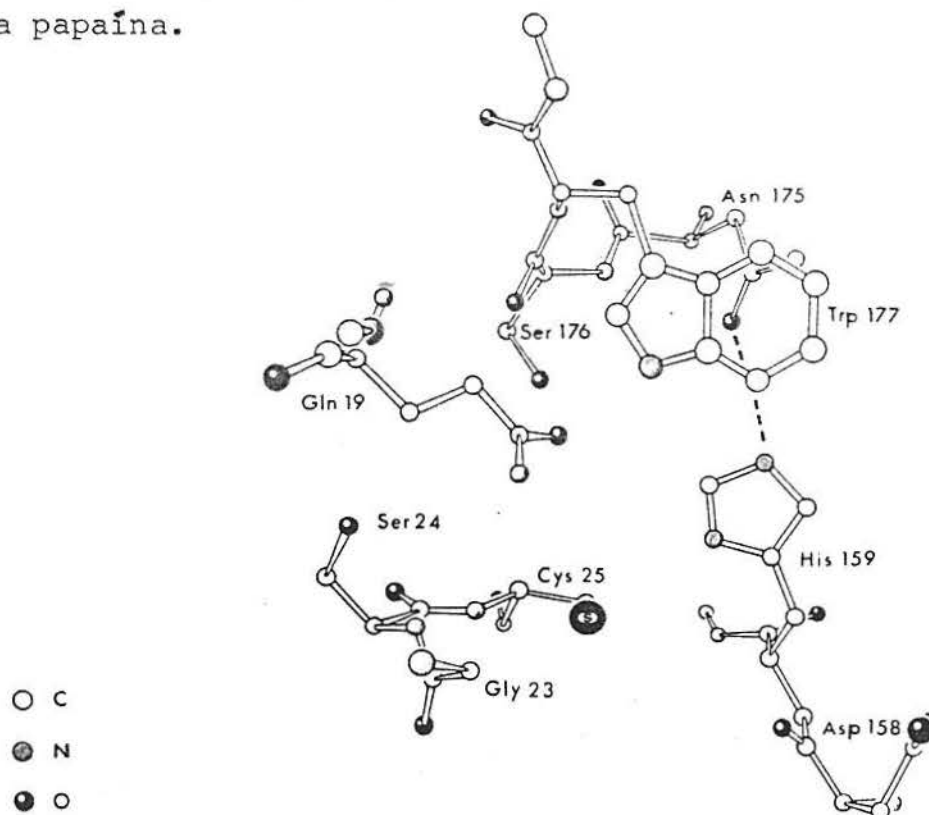


FIGURA 10 a - A REGIÃO DO SÍTIO ATIVO DA PAPAÍNA PRÓXIMA DO ESSENCIAL GRUPO -SH (DRENTH E COL., 1970)

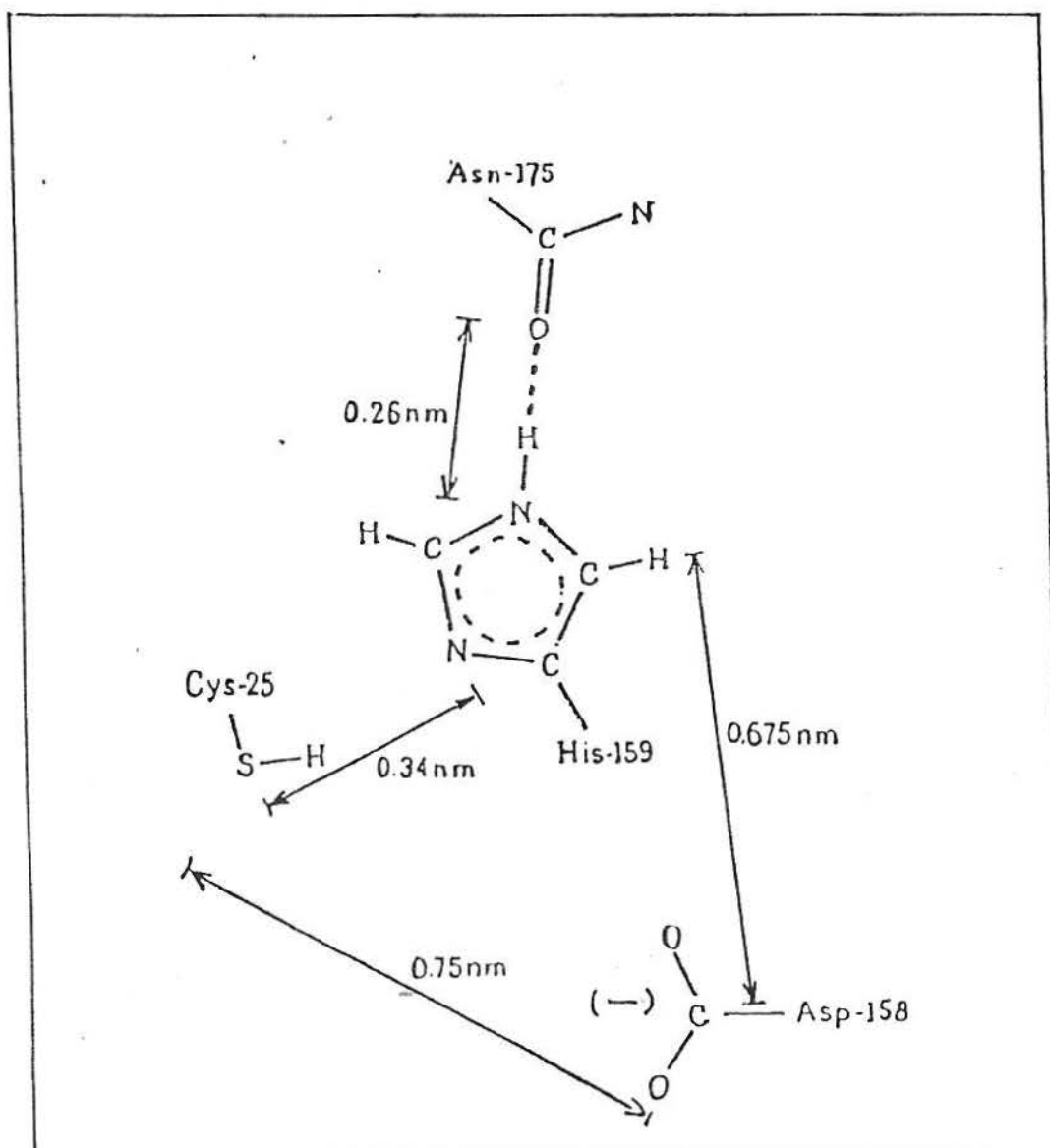


FIGURA 10 b - A REGIÃO DO SÍTIO ATIVO DA PAPAÍNA, INDICANDO AS DISTÂNCIAS ENTRE OS GRUPOS SE-GUNDO DRENTH E COL., 1970.

Há alguma incerteza na permanência da posição relativa destes átomos em solução aquosa devido à natural fluxionalidade da molécula.

LEWIS e col. em 1976 e CREIGHTON e SCHAMP em 1980 propuseram um equilíbrio tautômero (Figura 11) envolvendo os grupos sulfidril e imidazol no pH ótimo da atividade enzimática, com predominância do par iônico da estrutura II.

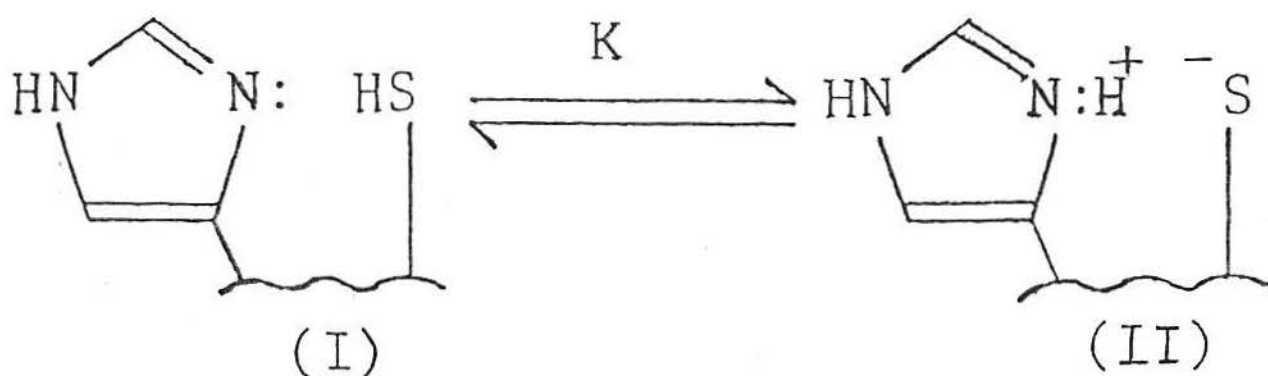


FIGURA 11- EQUILÍBRIO TAUTÔMERO SULFIDRIL-IMIDAZOL

SEGUNDO CREIGHTON E SCHAMP (1980)

Informações mais específicas da extensão e estrutura da região do sítio ativo relatadas por BERGER e SCHECHTER(1970) identificaram sete sub-sítios constituintes do centro catalítico da papaína, conforme mostra a Figura 12.

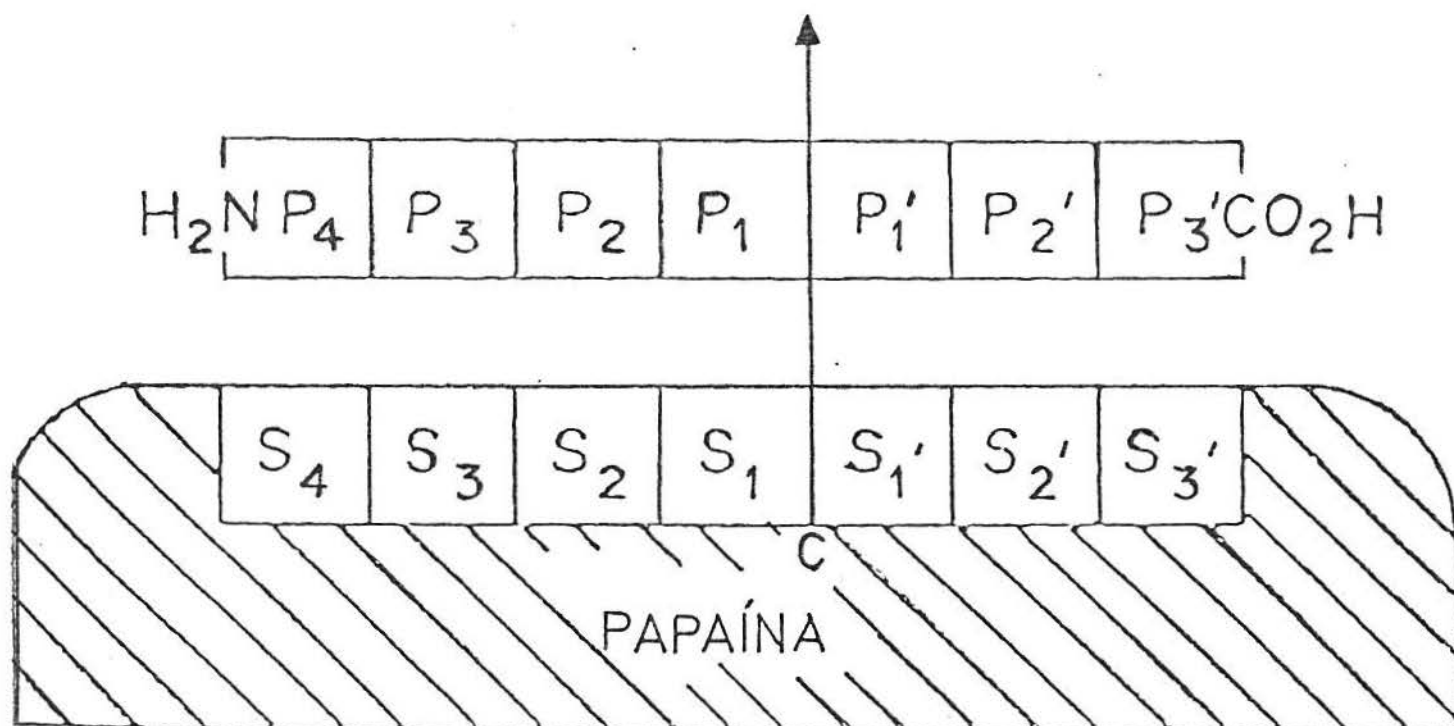


FIGURA 12 - OS SETE SUB-SÍTIOS DA REGIÃO DO SÍTIO ATIVO DA PAPAÍNA, SEGUNDO LOWE (1976).

C - Representa o centro catalítico (Cis-25) e o ponto de clivagem do substrato.

Cada um dos sub-sítios é capaz de interagir com um único resíduo de aminoácido num substrato peptídico. Quatro desses sub-sítios (S_1, S_2, S_3 e S_4) interagem com o substrato peptídico no lado N-terminal do ponto de cisão (C) enquanto os outros três sub-sítios (S_1', S_2' e S_3') ligam-se no lado contendo o grupo carboxila-terminal do substrato.

SCHECHTER e BERGER (1968) estudaram o caráter seletivo do sub-sítio S_2 para fenilalanina e os mesmos autores, em 1970, observaram que o sub-sítio S_1 é este reoespecífico para resíduos de L-aminoácidos, apresentando preferência por resíduos hidrofóbicos (ALECIO et al. 1974; LOWBRIDGE e FRUTON, 1974).

GLAZER e SMITH (1971) relataram uma especificidade maior do sub-sítio S_1 por lisina sobre alanina.

Interpretando o modelo proposto para descrever o complexo enzima-substrato, WOLTHERS e col. (1970) localizaram o sub-sítio S_1 na região hidrofóbica situada próxima ao triptofânio-177 e à alanina-136.

O sub-sítio S_2 interage fortemente com valina e leucina, conforme demonstraram JOHANSEN e OTTESEN em 1968.

Desses e de outros estudos que pretendem analisar a completa estrutura do centro catalítico da papaína permanece a certeza da presença e da importância do resíduo de cisteína-25, com o seu grupo sulfidrila livre. Um bloqueio nesse grupo -SH através de metais ou de outros reagentes inibe totalmente a atividade enzimática da papaína.

1.3.3.4 - ESPECIFICIDADE

Trabalhos para determinar com exatidão a especificidade da papaína foram feitos desde 1957 por KIMMEL e SMITH utilizando substratos naturais e sintéticos.

O assunto não está ainda completamente esclarecido mas sabe-se que a enzima hidrolisa ligações peptídicas de proteínas e substratos com pequena massa molecular, atuando em ésteres de vários aminoácidos e em amidas alfa-substituídas de arginina, lisina, glutamina, histidina, glicina e tirosina. Particularmente sensíveis como substratos são as amidas de N- α -benzoyl-L-arginina e lisina.

Conforme mencionado no item 1.3.3.3 o sítio ativo estendido e portador de sete sub-sítios da papaína explica a grande variedade de ligações peptídicas clivadas pela endopeptidase (SCHECHTER e BERGER, 1967 e 1968; FRUTON em 1975).

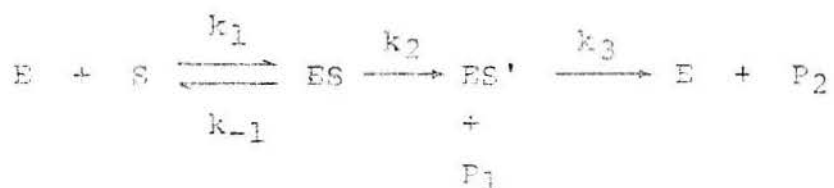
O processo cooperativo multipuntual de atuação do sítio ativo torna a ação catalítica da enzima muito específica em relação a substratos naturais como hemoglobina (KONISBERG e HILL, 1962), citocromo C (MARGOLIASH, 1962) e subtilisina BPN' (KASPER e SMITH, 1966).

A região do sítio ativo da papaína não deve ser considerada como uma estrutura rígida (LOWEBRIDGE e FRUTON, 1974) mas, ao contrário, como um sistema capaz de sofrer mudanças conformacionais durante o processo de fixação do substrato (LOWE e YUTHAVONG, 1971). Essas mudanças são compatíveis com a presença de ligações sigma na molécula protéica.

1.3.3.5 - MECANISMO DE AÇÃO

Proposto originalmente em 1955 por SMITH e col. o mecanismo de hidrólise catalisada por papaína foi revisto por GLAZER e SMITH em 1971, LOWE (1976) e POLGÁR (1977) entre vários outros.

No caso de nosso maior interesse, WHITAKER e BENDER em 1965 relataram que a hidrólise do BAEE (N- α -benzoil-L-arginina etil éster) envolve um esquema cinético de três etapas consecutivas:



onde: E = enzima livre
 S = substrato
 ES = complexo de Michaelis-Menten
 ES' = intermediário acilenzima
 P₁ = primeiro produto (álcool)
 P₂ = segundo produto (ácido carboxílico)

A primeira etapa corresponde à formação do complexo de Michaelis-Menten, a segunda etapa envolve uma acilação (com constante de velocidade k_2) e a terceira etapa implica numa desacilação (com constante de velocidade k_3).

Neste modelo proposto por WHITAKER e BENDER, os parâmetros cinéticos K_m (Constante de Michaelis-Menten) e k_{cat} (constante catalítica de velocidade) são relacionados com as constantes de velocidade mostradas no esquema através das seguintes equações:

$$k_{cat} = k_2 \cdot k_3 / (k_2 + k_3)$$

$$K_m = (k_{-1} + k_2) / (k_2 + k_3) \cdot k_1$$

O intermediário acilenzima (ES'), que envolve o grupo tiólico da Cys-25 com o grupo acila fornecido pelo substrato, teve sua existência comprovada espectroscopicamente por LOWE e WILLIAMS em 1965, dando sustentação ao mecanismo catalítico proposto.

Em 1978, ALLEN et al. propuseram um mecanismo mais detalhado para a ação hidrolítica da papaína sobre substratos sintéticos como o BAEE (Figura 13) envolvendo o par iônico formado pelo ânion tiolato da Cys-25 e o núcleo imidazólico protonado da His-159.

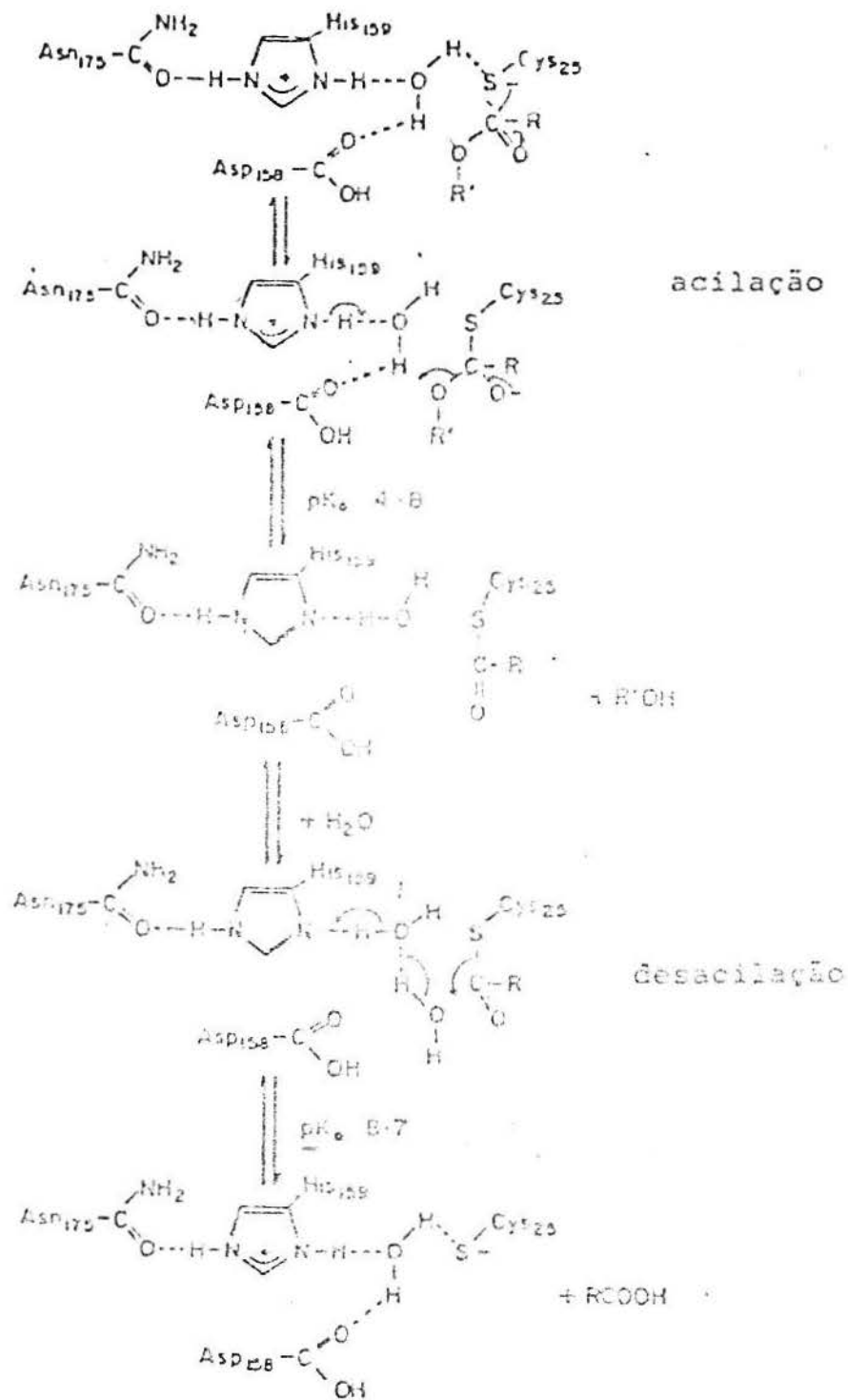


FIGURA 13 - MECANISMO PARA A AÇÃO CATALÍTICA DA PA-
PAÍNA SOBRE UM SUBSTRATO ÉSTER (ALLEN E
COL., 1978).

Conforme o mecanismo da figura 13, além do envolvimento de três grupos prototrópicos (o grupo tiol da cisteína-25, o grupo imidazol da histidina-159 e o grupo carboxila do ácido aspártico-158) ocorre também a participação de uma molécula de água adequadamente ordenada.

Na etapa de acilação, o cátion imidazólico da His-159 está ligado por pontes de hidrogênio à carbonila da asparagina-175 e ao oxigênio de uma molécula de água devidamente orientada.

Estudos cristalográficos de DRENTH et al. (1970) mostraram que a distância de 0,675 nm entre o nitrogênio N_1 da His-159 e o grupo carboxila do Asp-158 permite fácil acomodação desta molécula de água.

DRENTH e col. (1976) observaram a presença de várias moléculas de água nas proximidades do grupo -SH da Cis-25.

O papel de uma molécula de água adequadamente orientada é consistente com a natureza hidrolítica da atividade enzimática da papaína.

ALLEN e col. no esquema proposto da figura 13 sugerem que a ligação hidrogênica entre Asn-175 e His-159 tem a função de manter o anel imidazólico na orientação correta, enquanto o sistema:

Asp-158 ... Água ... His-159 ligado também por pontes de hidrogênio tem a função semelhante de posicionar favoravelmente a molécula de água para sua participação no mecanismo da hidrólise.

Os autores do esquema salientam a atuação dos dois átomos de nitrogênio da His-159 e de sua orientação na formação de pontes de hidrogênio em lados distintos do sistema.

A figura 13 mostra a formação da acilenzima e a saída de uma molécula de álcool ao final da etapa de acilação.

Na etapa seguinte, a desacilação envolve a interação com nova molécula orientada de água, formando-se ácido carboxílico e retornando o sítio ativo da papaína ao estado inicial.

A importante natureza prototrópica do processo estudada por DRENTH e col. (1970) e LEWIS e col. (1976) mostra que a histidina-159 atua como um ácido de Brønsted na etapa de acilação, doando um próton para a molécula de água (diminuindo o pK_a de 8,5 para 4,0). Na etapa seguinte porém, a desacilação mostra a His-159 como uma base de Brønsted, retirando um próton da água.

Considerando a necessidade de pelo menos três grupos funcionais iônicos para a ação catalítica da papaína, a velocidade da reação enzimática dependerá do pH do sistema. Cada intervalo de pH implica em distintas formas iônicas para os grupos envolvidos no processo e determina diferentes caminhos alternativos para a reação, cada um com a sua própria constante de velocidade.

A etapa determinante da velocidade de reação da papaína em meios de diferentes pH poderá ser a acilação, a desacilação ou ambas, dependendo do grau de ionização dos grupos constituintes do sítio ativo da enzima.

1.3.3.6 - A INIBIÇÃO DA PAPAÍNA

A atuação das enzimas em vários processos metabólicos normais e patológicos é objeto frequente de estudo por pesquisadores de diferentes áreas da ciência.

A maioria dos estudos sobre a inibição da papaína foi realizada com a pretensão de purificar a proteína, decifrar a estrutura da região do sítio ativo e interpretar o mecanismo de ação da enzima.

TANG em 1974 identificou um inibidor natural presente no látex do mamão papaya. Benzilglucosinolato, abundante no látex, sofre uma hidrólise durante a extração e origina benzilisotiocianato, composto de natureza eletrofílica que se comporta como um inibidor natural da papaína.

Pesquisa semelhante foi feita por BASÍLIO e SIMÕES (1987), caracterizando vários inativadores naturais presentes no látex do fruto da "Carica papaya L".

Íons metálicos como Cd^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} e Pb^{2+} são inibidores da papaína, como relatou SLUYTERMAN em 1967. Os complexos inibidos podiam ser totalmente reativados pela ação de cisteína e EDTA.

Em 1988, LEONARDI relatou um estudo da inibição de papaína por seis cátions metálicos divalentes e a obtenção dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos do processo inibitório. Os íons Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pd^{2+} e Zn^{2+} inibiam competitivamente a enzima, cuja atividade podia ser plenamente recuperada pela ação de vários agentes quelantes como DTT, EDTA, BAL, EDA, 1-10 fenantrolina, mercaptoetanol e acetilacetona. Essas inibições eram dependentes da força iônica do meio reacional e o grupo sulfidril da Cis-25 era bloqueado pelos diversos metais. A complexação envolveu aproximadamente onze de cada íon metálico para uma molécula de papaína (com exceção de Hg^{2+} cuja razão estequiométrica metal:enzima foi de 9:1). Os parâmetros termodinâmicos ($\Delta H^\circ < 0$ e $\Delta S^\circ > 0$) contribuíram favoravelmente para a espontaneidade do processo de inibição.

Não foi proposto até o momento um mecanismo claro e abrangente sobre a inibição da papaína por cátions de metais pesados.

Todos os reagentes sulfidrílicos atuam como inibidores da papaína.

FINKLE e SMITH (1958) observaram a formação de um complexo estável na reação de p-cloromercuribenzoato.

Ácido iodoacético ou iodoacetamida também reagem com o grupo sulfidril livre da papaína, causando uma irreversível inativação por esse meio (KIMMEL et al. 1965; SHAPIRA e ARMON, 1969).

WHITAKER e PEREZ-VILLASENOR em 1968 informaram que a reação da papaína com clorometilcetonas de fenilalanina e lisina trazia total perda da atividade enzimática. Estes reagentes agiam estequiométrica e especificamente sobre o grupo -SH ativo da papaína e

não sobre o grupo imidazol do resíduo de histidina-159 como faziam com a tripsina e a quimotripsina.

Diversas imidas cíclicas podem inativar a tiolproteíase (KANAWAWA et al., 1970), tais como succinimida, hidantoína e aloxana, entre outras.

A inibição da papaína pode ser obtida pela interação com alguns ânions, como o íon cianato (SLUYTERMAN, 1967) e o íon sulfito (FUJIMOTO e col., 1983).

Vários agentes inibidores de origem biológica foram descobertos, como por exemplo a cistatina S e a cistatina SN (ISUMURA et al., 1984 e 1986) extraídas da saliva humana e a cistatina C (BARPET e col., 1984), uma proteína de pequena massa molecular encontrada em alta concentração no fluido cérebro-espinal e no sêmen de alguns animais, capaz de comportar-se como um potente inativador da papaína.

ISHIMITSU et al. investigaram o mecanismo de inibição da papaína por ácido ascórbico na presença de íons Cu^{2+} , identificando como causa principal a ruptura de pontes S-S na estrutura protéica (1978).

Alguns derivados da quercitina encontrados em certos vegetais, quando expostos à luz, agiam como inibidores da enzima (IGARASHI e col., 1983).

A papaína pode sofrer inibições de diferentes tipos, dependendo do agente inibidor.

Em 1954, KIMMEL e SMITH descreveram a inativação da tiolproteíase com ácido carbobenzoxil-L-glutâmico, considerando-a como do tipo não-competitivo ou do tipo misto.

Inúmeros inibidores agem de forma competitiva, como por exemplo todos aqueles que contêm fenilalanina como segundo resíduo a partir da extremidade C-terminal, con-

A decomposição do complexo ES origina os produtos e o complexo ESI é considerado inativo.

Numa inibição competitiva a constante $K_{ESI} = \infty$ pois o complexo ES não interage com o inibidor I e nem o complexo EI combina-se com o substrato S.

O inibidor transforma efetivamente parte da enzima no complexo EI. Quando a concentração do substrato S é suficientemente aumentada, este efeito pode ser superado, razão pela qual o processo é denominado de "competitivo". O inibidor e o substrato competem pela ligação no mesmo sítio da enzima.

II - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - REAGENTES E EQUIPAMENTOS

2.1.1 - REAGENTES

Foram empregados os seguintes reativos:

- Acetilacetona (Merck)
- Ácido 5,5' ditiobis-2-nitrobenzôico (Reagente de Ellman) (Sigma)
- Ácido etilenodiaminotetracético (Merck)
- Ácido tricloroacético (Sigma)
- N α -benzoil-L-arginina etiléster (Sigma)
- 2,3-dimercapto 1-propanol (Sigma)
- DL-ditiotreitol (Sigma)
- 1,10-fenantrolina (Merck)
- 2-mercaptoetanol (Sigma)
- Papaína recristalizada (Sigma)
- Sephadex G-25 (Pharmacia)
- Tetracetato de ródio (II) diaquo
- Membrana de diálise "Visking tubes" (Sigma)

O tetracetato de ródio (II) diaquo foi, em parte, cedido pelo Dr. Renato Najjar do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e, em parte, adquirido de SARDI (S. Paulo).

Todos os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza "pró-análise" (p.a.) e foram obtidos, principalmente, das firmas Sigma e Merck. Não foi realizada nenhuma purificação posterior.

A água usada no preparo das soluções e também utilizada nas diálises foi bidestilada em aparelho de vidro pirex.

2.1.2 - EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético FANEM
- Balança analítica SARTORIUS, precisão $\pm 0,02$ mg
- Banhos termostáticos BIOMATIC, tipo 1, para 45 tubos, precisão de $\pm 0,5$ °C
- Bomba peristáltica - LKB - Bromma
- Coletor de frações FRACSIL-100 - INCIBRÁS
- Espectrofotômetro UV-visível DMS 80 - INTRALAB
- Potenciômetro METROHM - modelo E536 com um dosímetro METROHM - modelo E655, acoplados a um potenciômetro METROHM - modelo 605 de precisão máxima de $\pm 0,2$ % . O conjunto funciona como potenciostato com leitura digital do volume utilizado e do pH do sistema.
- Ultracentrífuga SORVALL RC-5B - DU PONT INSTRUMENTS

2.2 - MÉTODOS

2.2.1 - ATIVAÇÃO DA ENZIMA

Previamente a qualquer experimento, uma solução aproximadamente $7 \cdot 10^{-6}$ M de papaína foi ativada segundo SMITH e PARKER (1958) utilizando-se EDTA em concentração 0,02 M e cisteína em concentração 0,05 molar (ou DTT) a fim de eliminar metais contaminantes e manter o grupo tiol do sítio ativo da proteína no estado reduzido, respectivamente.

As substâncias ativadoras e possíveis impurezas foram eliminadas da solução de enzima ativada por diálise extensiva contra água bidestilada a 5 °C por três horas, trocando-se o meio dialisante de dez em dez minutos.

Após a diálise, não foi possível detectar quimicamente a presença de EDTA segundo o método de OHLWEILER (1974) nem de cisteína segundo HAWK e col. (1954) na solução obtida.

2.2.2 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade esterásica da papaína foi determinada segundo a técnica descrita por SMITH e PARKER em 1958 , empregando BAEE como substrato.

O ácido carboxílico produzido na hidrólise do éster foi titulado potenciostaticamente com NaOH a pH=6,2 sob agitação permanente,utilizando-se um acoplamento de potenciôgrafo com dosímetro digital e potenciômetro digital,conforme descrito anteriormente.

O processo foi realizado num pequeno reator de vidro com volume de 10 ml e paredes duplas por onde circulou a água do termostato nas temperaturas escolhidas.

Além dos reatantes,no interior desse recipiente estavam ajustados um eletrodo de vidro combinado com calomelano,um termômetro,a ponta da microbureta do dosímetro digital e um agitador magnético.

Em uma determinação típica da atividade enzimática,a massa de 50 mg de papaína foi pesada,dissolvida em até 25 ml de solução com água bidestilada e submetida à ativação com um volume de 25 ml de outra solução constituída de uma mistura de EDTA 0,02M e cisteína 0,05M por 30 minutos e na temperatura de 5 °C.

O volume total de 50 ml da solução resultante foi, a seguir,dialisado contra água bidestilada,conforme citado no item 2.2.1.

A concentração da solução protéica foi então determinada (item 2.2.3),fornecendo um valor de aproximadamente $3,5 \cdot 10^{-5}$ M.

Uma alíquota de 1 ml dessa solução de papaína foi pipetada para o reator termostatizado na temperatura desejada,o qual já continha,previamente misturados,0,5 ml

de solução 3 M de NaCl e 3,5 ml da solução de BAEE de concentração adequada e pH aproximadamente 6,2.

Após a adição da solução de enzima, o pH do meio foi perfeitamente ajustado a 6,2 e cronometrado exatamente um minuto de reação.

Foi, então, determinado o volume de solução padrão de NaOH (concentração em torno de 0,01 N e livre de CO₂) necessário para neutralizar o ácido produzido e reestabelecer o pH novamente em 6,2. A atividade da papaína foi obtida, dessa forma, em mililitros de NaOH por minuto.

Na medida da atividade enzimática após inibição com tetracetato de ródio (II) (veja item 2.2.6) foi usada uma variação no método, substituindo-se a solução de papaína e a solução de NaCl 3 M por 1,5 ml da mistura adequada de solução protéica e solução de inibidor em cloreto de sódio 3 molar.

O volume total no reator para o início das medidas foi sempre de 5 ml em todos os casos, sendo a força iônica do meio mantida constante e igual a 0,3.

A concentração de papaína utilizada em todos os experimentos foi de aproximadamente 0,16 mg.ml⁻¹, correspondendo a uma molaridade próxima de $7,0 \cdot 10^{-6}$ M, considerando-se o valor de 23 400 g.mol⁻¹ para a massa molar da proteína, segundo GLAZER e SMITH (1971).

As concentrações de substrato (BAEE) empregadas variaram entre 0,01 e 0,08 molar.

2.2.3 - DOSAGEM DA PROTEÍNA

A concentração de papaína foi determinada através da absorção de luz no comprimento de onda de 280 nm, característica apresentada pelas proteínas em solução e devida à presença de resíduos de aminoácidos portadores de anel aromático (tirosina, triptofânio e fenilalanina).

Foi utilizado um coeficiente molar de extinção (ϵ_{280}) igual a $58\,500\text{ cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ para a papaína, segundo MITCHEL e col. (1970) e TANG e TANG (1976).

A concentração de papaína inativada com tetraceta to de ródio (II) não pôde ser determinada por esse método, visto ocorrer superposição dos espectros de absorção da enzima e do inibidor nesse comprimento de onda e também em vários outros, conforme mostram as Figuras

Para a dosagem da proteína inibida foram tentados os conhecidos métodos de Coomassie Blue (SPECTOR, 1978), LOWRY e col. (1951) e Micro-Kjedahl (FOLIN e FARMER, 1912). Os dois primeiros métodos não apresentaram resultados adequados em vista da já mencionada superposição dos espectros da papaína e do $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$, enquanto o terceiro método possui precisão insuficiente para as condições das nossas experiências.

Empregaram-se dois métodos indiretos (item 2.2.9) para contornar o problema e obter o resultado desejado, isto é, o número de moléculas do inibidor complexadas em cada molécula da enzima.

2.2.4 - DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS SULFIDRÍLICOS LIVRES

A dosagem dos agrupamentos -SH livres presentes na enzima ativada ou na enzima inativada por tetracetato de ródio (II) foi feita pelo método descrito por ELLMAN (1959) com o emprego do reagente DTNB.

As amostras de papaína foram cromatografadas a fim de purificar a enzima e eliminar o excesso de inibidor. Foi utilizada uma coluna de Sephadex G-25 (15 x 1,5 cm) em câmara fria e água bidestilada como eluente, recolhendo-se frações de 3 ml em fluxo de 36 mililitros por hora.

2.2.5 - DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS

A constante de HENRI-MICHAELIS-MENTEN (K_m), a velocidade máxima (V_m) e a constante catalítica (k_{cat}) da papaína foram determinadas nas temperaturas de 15, 22, 27, 33, 37 e 40 °C. -

Empregou-se a via gráfica proposta pelos métodos de LINEWEAVER-BURK (1934), HANES e EADIE-HOFSTEE, segundo PRICE e DWEK (1979), para obter esses parâmetros cinéticos.

Pelos mesmos métodos gráficos citados, determinou-se a constante de inibição (K_i) do processo para cada temperatura selecionada, o que permitiu a obtenção dos demais parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°), conforme será mostrado nos itens 3.2 e 3.3.

2.2.6 - INIBIÇÃO DA PAPAÍNA COM TETRACETATO DE RÓDIO(II)

A inativação da tiolendopeptidase foi realizada por incubação com diferentes concentrações de $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CMe})_4$ variando de $4,0 \cdot 10^{-6}$ M até $3,0 \cdot 10^{-3}$ M (item 2.2.7) nas temperaturas de 15, 22, 27, 33, 37 e 40 °C e por intervalos de tempo desde dez minutos até duas horas.

As soluções de tetracetato de ródio (II) foram preparadas com solução aquosa de NaCl 3 M, ajustando-se a força iônica para 0,3 em todos os experimentos, apesar de se ter constatado que não há influência da força iônica do meio reacional sobre o processo inibitório (item 3.4).

Numa experiência típica de inibição enzimática numa temperatura escolhida (15°C p.ex.) preparou-se uma solução $6,40 \cdot 10^{-6}$ M de papaína ativada e dialisada (item 2.2.1) e várias soluções de tetracetato de ródio(II) em NaCl 3 M de concentrações $1,0 \cdot 10^{-4}$ M, $2,0 \cdot 10^{-4}$ M, $3,0 \cdot 10^{-4}$ M, $6,0 \cdot 10^{-4}$ M, $1,0 \cdot 10^{-3}$ M, $1,5 \cdot 10^{-3}$ M e $3,0 \cdot 10^{-3}$ M.

Inicialmente mediu-se a atividade da enzima pura (100 % de atividade) com BAEE 0,06 M a 15°C (item 2.2.2).

A seguir, incubaram-se 6 ml da solução de papaína com 3 ml de solução de $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CMe})_4$ $1,0 \cdot 10^{-4}$ M, retirando-se alíquotas de 1,5 ml da mistura após tempos de 10, 30, 60, 90 e 120 minutos e medindo-se a atividade da enzima com BAEE 0,06 M a 15°C e a cada intervalo de tempo.

O processo foi repetido para todas as concentrações de tetracetato de ródio (II) preparadas.

Após traçar os gráficos da atividade enzimática percentual para cada concentração de inibidor em função do tempo de incubação, escolheram-se, para prosseguir as experiências, aquelas concentrações de $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CMe})_4$ que forneceram patamares razoavelmente constantes de atividade ao

longo do tempo, a fim de evitar variações durante as medidas na etapa posterior.

Posteriormente, prepararam-se soluções de BAEE de concentrações 0,04M, 0,05M, 0,06M, 0,07M e 0,08M e mediu-se a atividade da papaína pura para cada concentração de subtrato a 15°C.

Na sequência, incubou-se em cinco tubos de ensaio, alternadamente, por 50 minutos (tempo no qual situavam-se os patamares de atividade) e a 15°C o volume de 1,4 ml de solução de papaína com 0,7 ml da solução de tetracetato de ródio (II) escolhida em cada tubo.

Mediu-se, depois, a atividade enzimática de 1,5 ml da mistura incubada do primeiro tubo com 3,5 ml de BAEE 0,04 molar e assim sucessivamente com os demais tubos e soluções do substrato preparadas, sempre na temperatura selecionada.

Todas as etapas mencionadas foram repetidas para as demais concentrações escolhidas de inibidor.

Os dados obtidos foram utilizados na determinação do tipo de inibição e dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos envolvidos no processo inibitório da papaína (item 2.2.5).

2.2.7 - DOSAGEM DO TETRACETATO DE RÓDIO (II)

A concentração do inibidor foi determinada por absorvância da luz nos comprimentos de onda de 446 e 585 nm. Utilizou-se um coeficiente molar de extinção de 94 (ϵ_{446}) e 234 (ϵ_{585}) $\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectivamente, segundo MOSZNER et al. (1976).

O espectro eletrônico UV-Vis de uma solução aquosa de tetracetato de ródio (II) é fornecido na Figura

2.2.8 - INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA FORÇA IÔNICA

Mediu-se a influência da força iônica do meio reacional sobre a inibição da papaína com tetracetato de ródio (II) em três temperaturas e diferentes concentrações do inibidor. Diferentes forças iônicas foram obtidas variando a concentração de NaCl empregada no preparo das soluções de $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CMe})_4$.

Em cada caso, determinou-se a atividade da enzima após inibição com adequada concentração de inibidor, numa temperatura selecionada e nos intervalos de tempo de incubação já citados (item 2.2.6).

Utilizou-se sempre uma solução 0,06 M de BAEE nas medidas.

Foram mantidos constantes todos os fatores em cada experimento, exceto a força iônica do meio, que variou de 0,1 até 0,4.

2.2.9 - DETERMINAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA DA INIBIÇÃO

2.2.9.1 - Método de SCATCHARD

Uma enzima, entendida como macromolécula, é um sistema complexo, com muitos grupos ligantes ao longo de suas cadeias polipeptídicas, os quais constituem sítios de interação com pequenas moléculas ou íons.

Muitas vezes, a fixação de tais espécies sobre a enzima é um processo reversível, caracterizado por um estado de equilíbrio regido pela correspondente constante de dissociação, K_i .

Muitos autores tem estudado, já de longa data e em certa extensão, esse tipo de interação, estabelecendo equações características e métodos gráficos que levam seu nome. Citam-se, a esse respeito, as equações ou os gráficos ("plots") de ADAIR (1925), KLOTZ e col. (1946), COLOWICK e WOMACK (1969), HILL (1910) e SCATCHARD (1949), como os mais conhecidos.

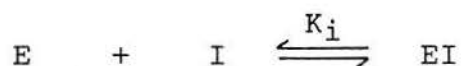
A fixação de um determinado inibidor sobre uma enzima pode ser quantitativamente caracterizada por qualquer um dos métodos anteriormente mencionados, sendo, porém, o de SCATCHARD o mais significativo e fértil em conclusões.

Um dado inibidor pode ligar-se a um único sítio da molécula de enzima ou a vários. O primeiro caso é facilmente identificável através de um gráfico de Scatchard ou de Hill. A segunda possibilidade permite distinguir três situações, a saber:

- 1) Os pontos de fixação atuam de modo completamente independente uns dos outros, sendo, portanto, os sítios equivalentes entre si, quanto à afinidade pelo ligante.
- 2) Num grande número de casos importantes, a ligação é do tipo cooperativo, isto é, a ocupação de um sítio tem influência favorável sobre a intensidade da ligação aos outros locais, facilitando a entrada dos demais ligantes.
- 3) Há casos, conhecidos como do tipo não-cooperativos ou negativamente cooperativo, em que a fixação de um grupo ligante sobre a molécula da enzima torna menos espontânea a entrada dos subsequentes.

No método gráfico de Scatchard, reconhecido pela maioria dos autores como o que melhor diagnóstico permite obter (METZLER, 1977), o tratamento matemático é bastante simples, conforme se verá a seguir.

Suponha, em primeira instância que a enzima reaja com o inibidor segundo a equação:



onde E representa a enzima; I, o inibidor; EI, o complexo enzima-inibidor e K_i , a constante de dissociação de EI, também conhecida como constante de inibição.

A constante K_i é expressa por:

$$K_i = ([E] \cdot [I]) / [EI] \quad (1)$$

onde [E] é a concentração de enzima livre no estado de equilíbrio; [I] e [EI] são as concentrações de inibidor e do complexo enzima-inibidor no equilíbrio.

Define-se o parâmetro r , chamado de "fração de saturação dos sítios da enzima", no estado de equilíbrio, pela equação:

$$r = \frac{\text{concentração de I ligado a E}}{\text{concentração total de E sob todas as formas no sistema}}$$

isto é :

$$r = [EI] / ([E] + [EI]) \quad (2)$$

A partir da equação (1), obtém-se:

$$[EI] = ([E] \cdot [I]) / K_i \quad (3)$$

Combinando a equação (2) com a equação (3):

$$r = \frac{([E] \cdot [I]) / K_i}{[E] + ([E] \cdot [I]) / K_i} \quad (4)$$

donde:
$$r = [E]/(K_i + [E]) \quad (5)$$

A relação (5) pode sofrer rearranjo para dar duas equações muito empregadas no estudo da interação de pequenos ligantes com macromoléculas, sendo, a última delas conhecida como equação de Scatchard:

$$1/r = 1 + K_i/[I] \quad (6)$$

e
$$r/[E] = 1/K_i - r/K_i \quad (7)$$

Conforme a maioria dos autores (METZLER, 1977), a equação (7) deve ser preferida à (6) para um estudo gráfico por permitir uma distribuição mais uniforme dos pontos experimentais.

Por outro lado, se a molécula de enzima contiver mais do que um local de ligação para o inibidor, por exemplo, n sítios, é necessário modificar as equações simples obtidas anteriormente. Neste caso, em vez de considerar a concentração total de enzima $[E_0]$ como indicando a concentração de sítios, deve-se empregar o termo $n[E_0]$ para representar a concentração total de locais disponíveis de ligação.

Após algumas transformações matemáticas, chega-se a :

$$r = n - rK_i/[I] \quad (8)$$

ou, alternativamente:

$$1/r = K_i/n \cdot 1/[I] + 1/n \quad (9)$$

Colocando num gráfico r versus $r/[I]$, obter-se-á uma linha reta de inclinação K_i e de intersecção com os eixos vertical e horizontal, de n e n/K_i , respectivamente, se houver mais de um sítio de ligação por macromolécula. Este tipo de gráfico também é conhecido como "plot" de Scatchard.

No caso de haver multiplicidade de sítios, um estudo gráfico de Hill permite, na maioria dos casos, distinguir entre independência de atuação, cooperatividade e não-cooperatividade.

No presente caso em estudo, iniciamos pela aplicação da alternativa mais simples, isto é, supondo uma estequiometria Enzima-Inibidor de 1:1, deixando as outras possibilidades para uma segunda etapa.

Nestas condições, e de acordo com o anteriormente exposto, foram empregadas as equações (6) e (7) para caracterizar a interação papaína-tetracetato de ródio(II) por meio de um estudo gráfico.

Nas experiências realizadas, era conhecida a concentração total de papaína (ítem 2.2.3), a concentração total do inibidor, tetracetato de ródio (II) (ítem 2.2.7) e a constante de inibição, K_i , obtida independentemente (ítem 2.2.5).

Através da atividade percentual da enzima, determinada no equilíbrio (partameres das curvas de atividade versus tempo de incubação) foi obtida a concentração da enzima livre neste equilíbrio, para cada concentração de inibidor e nas temperaturas selecionadas. Com esse dado, calculou-se a concentração do complexo enzima-inibidor e, finalmente, a concentração do tetracetato de ródio (II) no estado de equilíbrio.

As demais alternativas gráficas não foram utilizadas, tendo em vista os resultados obtidos, que serão discutidos no setor correspondente (ítem 3.5.1).

2.2.9.2-DETERMINAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA ENZIMA-INIBIDOR POR VIA ANALÍTICA

No segundo método para determinar a relação estequiométrica enzima-inibidor, empregou-se a técnica de precipitação protéica com o ácido tricloroacético (TCA) e posterior determinação espectrofotométrica da concentração de tetracetato de ródio (II) remanescente no líquido após centrifugação do precipitado sólido.

Foram misturados, até completa inativação, volumes iguais de papaína $4,07 \cdot 10^{-5}$ M e tetracetato de ródio (II) $2,65 \cdot 10^{-3}$ M.

Adicionaram-se 4 ml de TCA 1 M a 1 ml da mistura preparada, precipitando o complexo protéico durante 3 horas de incubação.

O sistema foi então centrifugado a 8000 RPM por 10 minutos, coletando-se o sobrenadante.

A concentração de $Rh_2(O_2CMe)_4$ no líquido obtido foi determinada medindo-se a absorbância a 585 nm (item 2.2.7).

Por diferença e considerando as diluições ocorridas chegou-se à concentração de inibidor consumida na complexação com a concentração conhecida de papaína.

O ácido tricloroacético não absorve no comprimento de onda de 585 nm.

2.2.10 - REATIVAÇÃO DA PAPAÍNA

Uma solução de papaína, totalmente inativada com tetracetato de ródio (II), foi incubada com diversos agentes quelantes, a saber: EDTA, BAL, DTT, mercaptoetanol, acetilacetona e 1,10-fenantrolina a fim de verificar a reversibilidade do processo de inibição.

Os experimentos foram todos realizados a 37°C e a solução de papaína $6 \cdot 10^{-6} \text{M}$ foi inativada com $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CMe})_4$ de concentração $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$.

As concentrações empregadas de cada reativador, iguais ou superiores a $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ foram incubadas com a solução inativada por tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, após os quais, mediu-se a atividade da enzima com BAEE 0,06 M.

Foi determinada a atividade da papaína pura, 100% ativada, nas mesmas condições das experiências de reativação para cada concentração de quelante, com o propósito de verificar possíveis alterações provocadas pelo novo meio reacional.

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

3.1 - DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

3.1.1 - Curva de Substrato

A ação catalítica da papaína obedece à cinética de Henri-Michaelis-Menten de saturação hiperbólica em cada uma das temperaturas estudadas (Figura 14).

Foram traçadas também as curvas obtidas após a inativação com tetracetato de ródio (II), observando-se semelhante tipo de comportamento, conforme mostram as figuras 15, 16, 17, 18, 19 e 20.

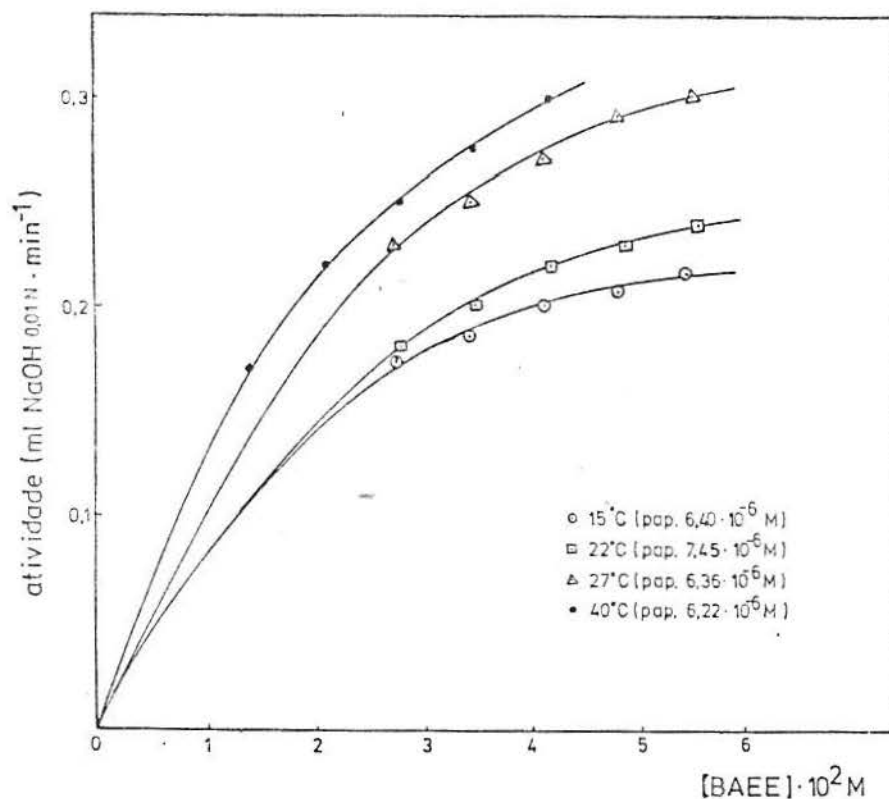


FIGURA 14-VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DA PAPAÍNA COM A CONCENTRAÇÃO DE BAE EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

As curvas correspondentes às temperaturas de 33 e 37 °C apresentam valores muito próximos e situados entre os obtidos para 27 e 40 °C e são apresentados nas figuras 18 e 19.

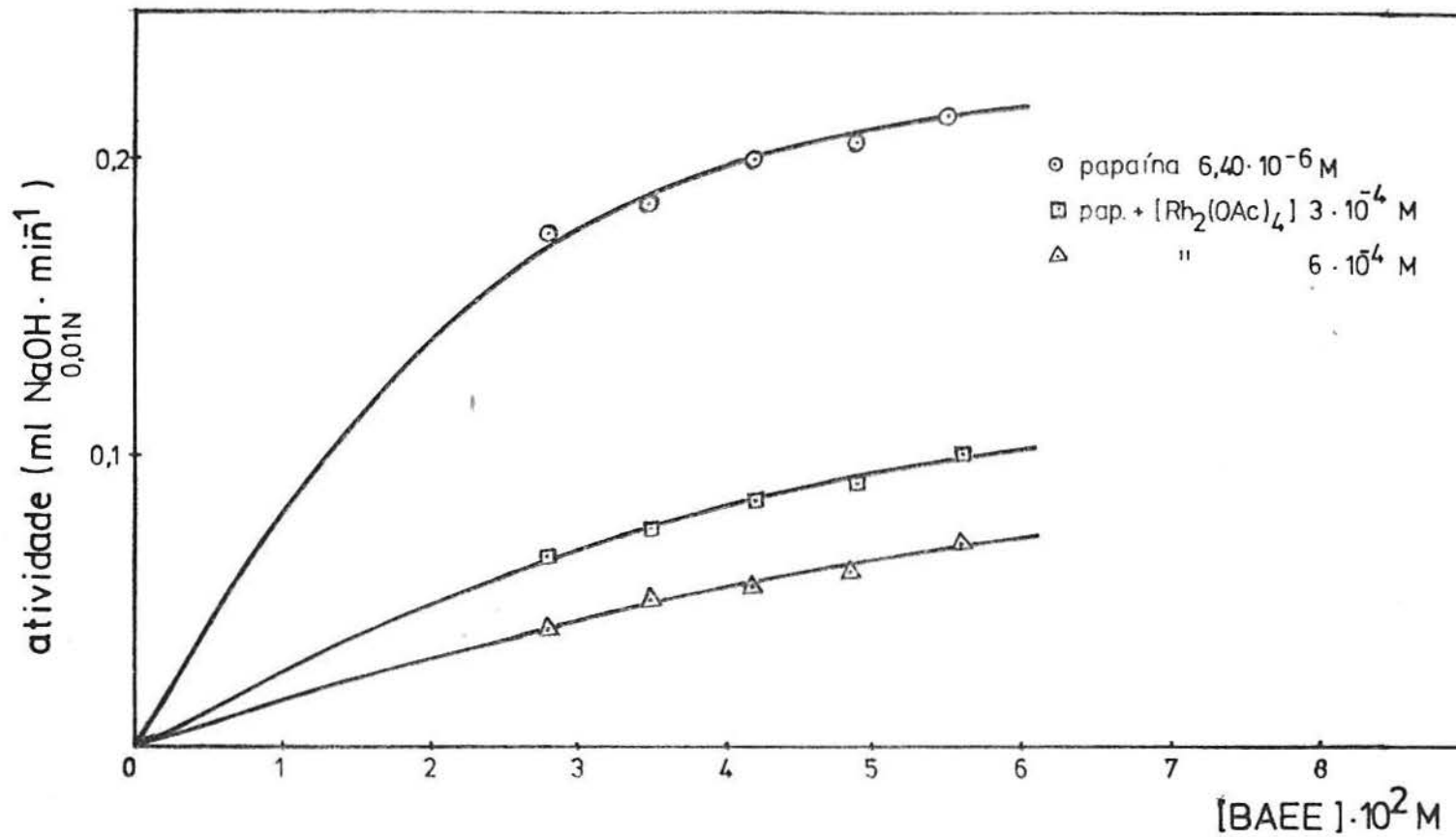


FIGURA 15 - VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DA PAPAÍNA COM A CONCENTRAÇÃO DE BAE A 15 °C EM PRESENÇA DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE INIBIDOR; pH=6,2 ; I=0,3(NaCl) .

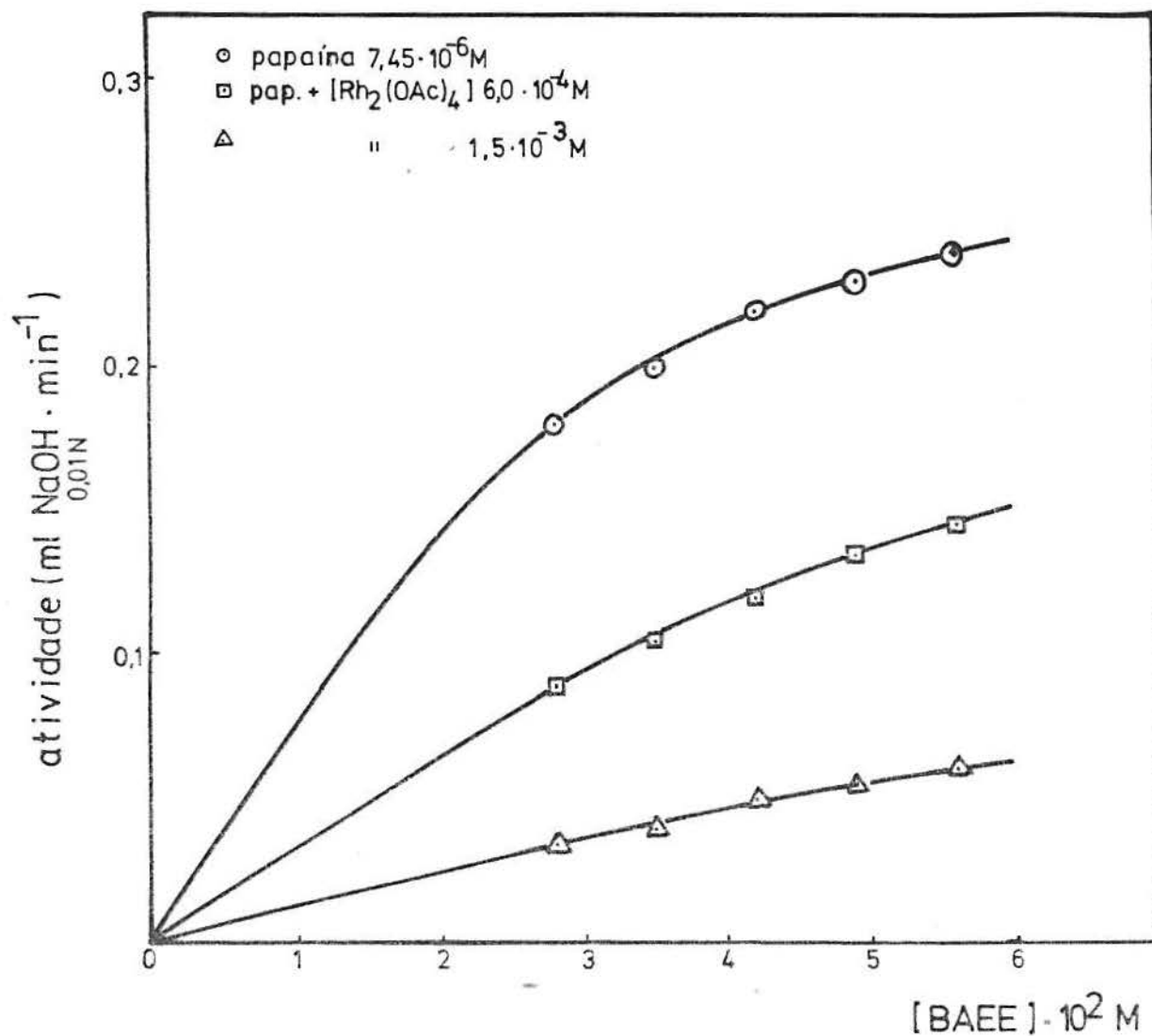


FIGURA 16 - VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DA PAPAÍNA COM A CONCENTRAÇÃO DE BAE E A 22 °C EM PRESENÇA DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE INIBIDOR; pH=6,2; I=0,3 (NaCl).

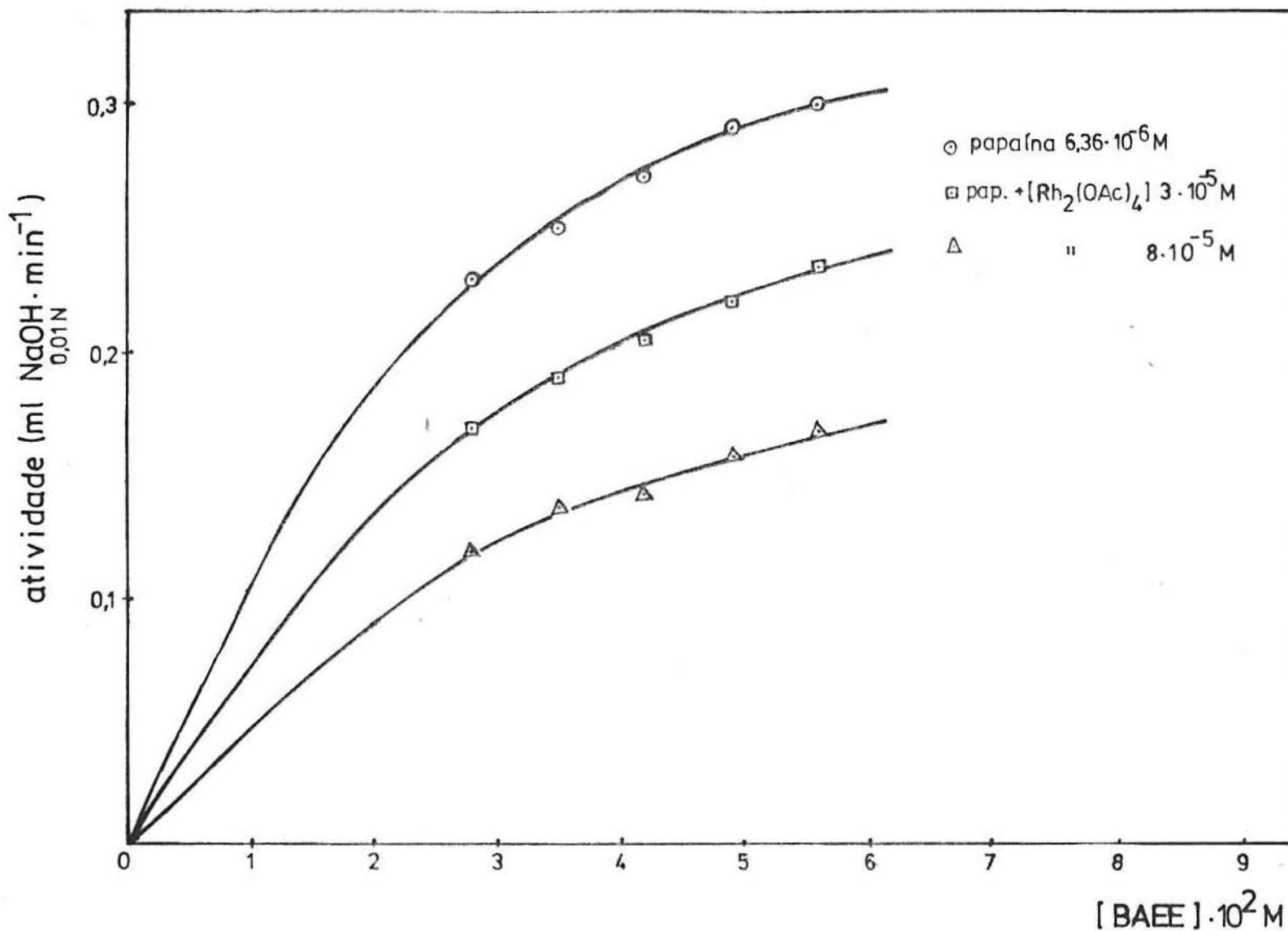


FIGURA 17 - VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DA PAPAÍNA COM A CONCENTRAÇÃO DE BAE A 27 °C EM PRESENÇA DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE INIBIDOR; pH=6,2; I=0,3 (NaCl).

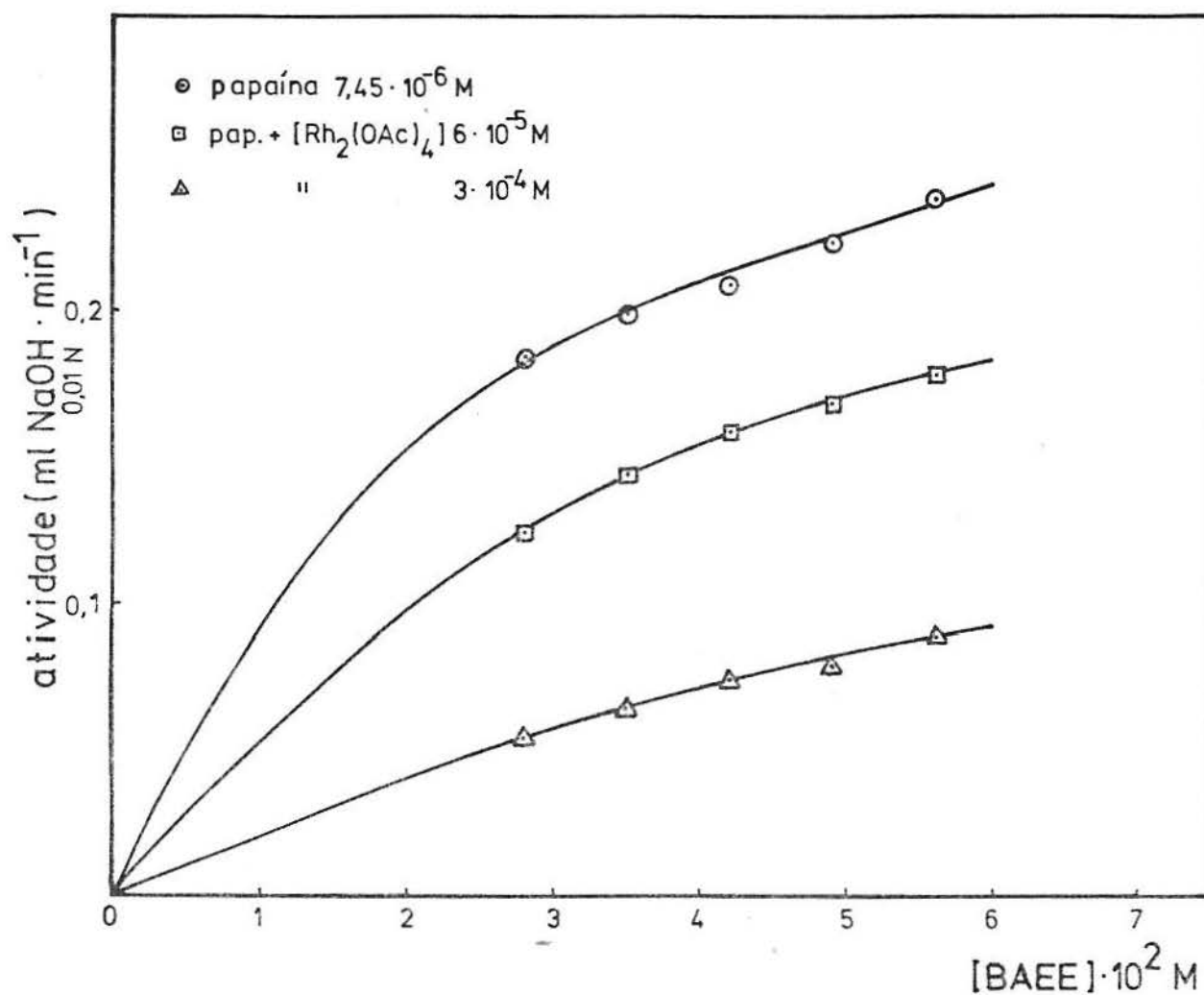


FIGURA 18 - VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DA PAPAÍNA COM A CON-
 CENTRAÇÃO DE BAEE A 33 °C EM PRESENÇA DE
 DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE INIBIDOR; pH=6,2;
 I=0,3 (NaCl).

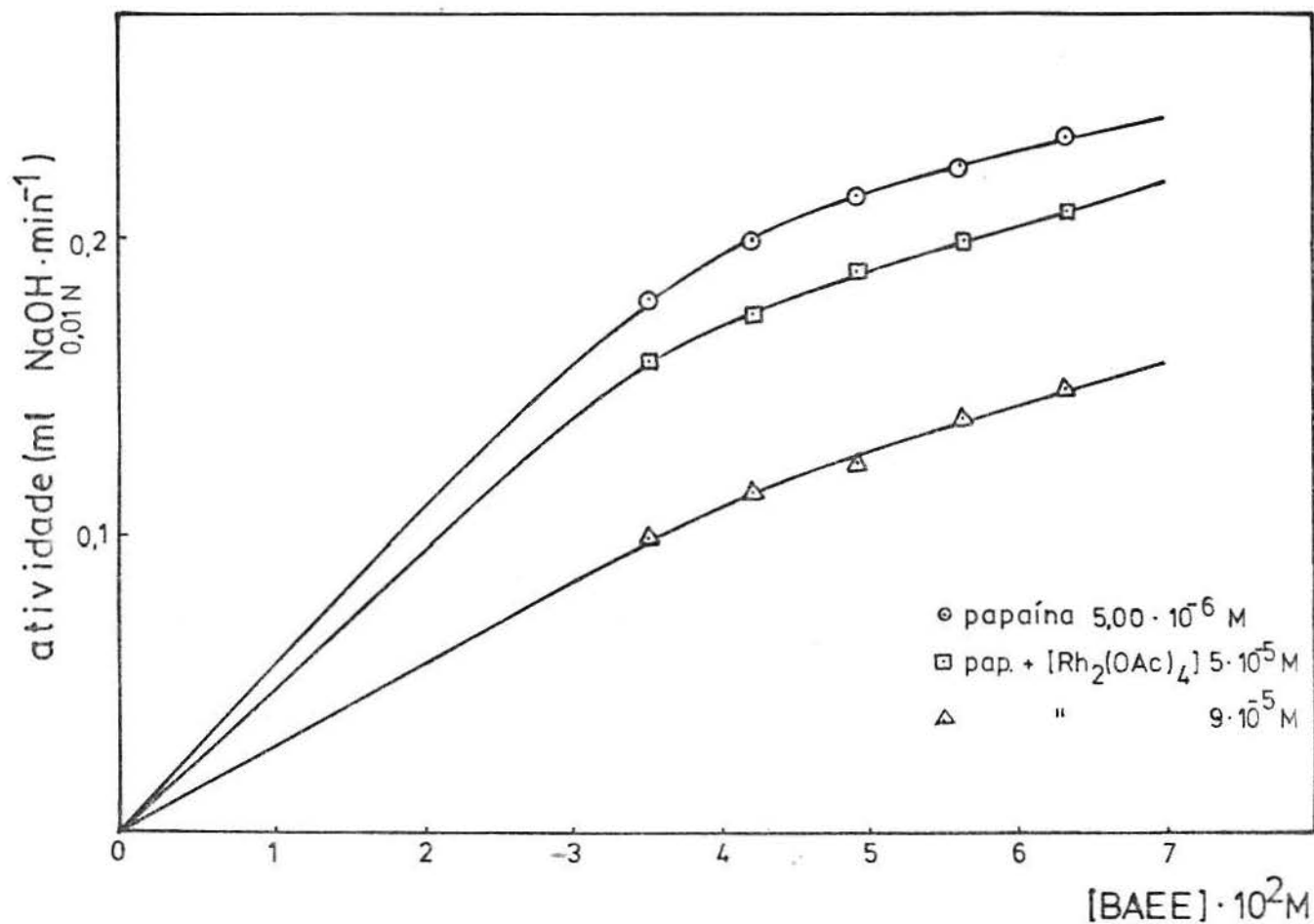


FIGURA 19 - VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DA PAPAÍNA COM A CONCENTRAÇÃO DE BAE E A 37 °C EM PRESENÇA DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE INIBIDOR; pH=6,2; I=0,3 (NaCl).

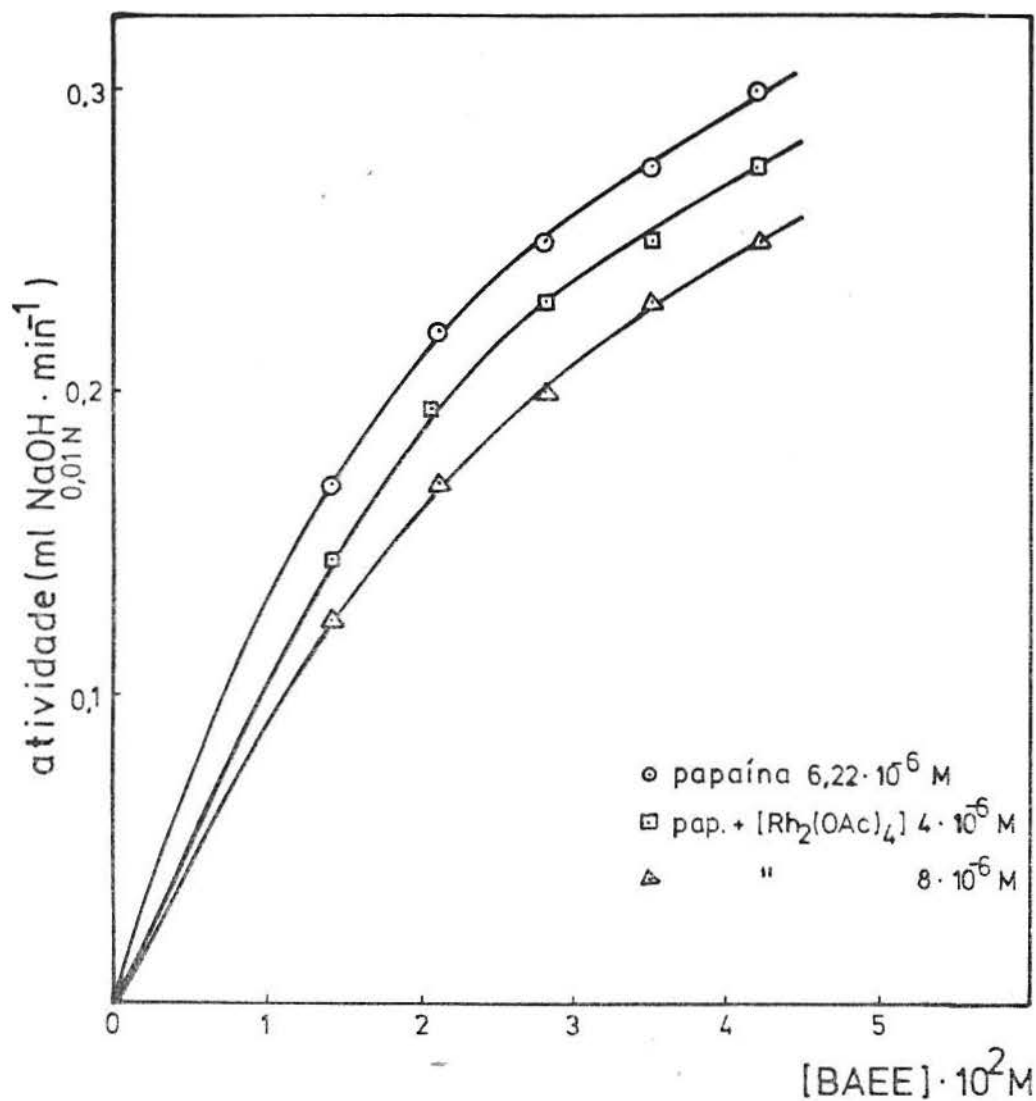


FIGURA 20 - VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DA PAPAÍNA COM A CONCENTRAÇÃO DE BAEE A 40 °C EM PRESENÇA DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE INIBIDOR; pH=6,2 I=0,3 (NaCl).

3.1.2. - DETERMINAÇÃO DE K_m , $V_{m\acute{a}x.}$ E $k_{cat.}$

Os valores obtidos para a constante de Henri-Michaelis-Menten (K_m), para a velocidade máxima (V_m) e para a constante catalítica (k_{cat}) do processo são mostradas na Tab.5. As determinações foram feitas pelos métodos gráficos de LINEWEAVER-BURK (Fig.21,22,23,24,25 e 26), EADIE-HOFSTEE (Fig.27, 28,29,30,31 e 32) e HANES (Fig.33,34,35,36,37 e 38) nas temperaturas estudadas.

A constante catalítica de primeira ordem (k_{cat}) da reação foi calculada, a cada temperatura, através da expressão:

$$k_{cat.} = V_{m\acute{a}x.} / [E_0]$$

Nessa expressão, $V_{m\acute{a}x.}$ é a velocidade máxima do processo e $[E_0]$ é a concentração inicial da enzima.

Pelos mesmos métodos citados e expressando os resultados nos mesmos gráficos, determinou-se o tipo de inibição da papaína por tetracetato de ródio (II) e o valor da constante de inibição (K_i), conforme o item 3.2.

Os resultados gráficos dos três métodos aplicados indicaram um processo de inibição classificado como COMPETITIVO, no qual o inibidor e o substrato ligam-se no mesmo sítio da enzima.

Constatou-se que o caráter competitivo da inibição mantém-se nas seis temperaturas estudadas.

Temp.	Constante de Michaelis - K_m (M)				Velocidade Máxima - $V_{m\acute{a}x}$ (meq.ml ⁻¹ .min ⁻¹)				Constante Catalítica - k_{cat} (min ⁻¹)			
	Lineweaver-Burk	Eadie-Hofstee	Hanes	Média	Lineweaver-Burk	Eadie-Hofstee	Hanes	Média	Lineweaver-Burk	Eadie-Hofstee	Hanes	Média
15°C	$1,60 \cdot 10^{-2}$	$1,66 \cdot 10^{-2}$	$1,70 \cdot 10^{-2}$	$1,65 \cdot 10^{-2}$	$5,09 \cdot 10^{-4}$	$4,89 \cdot 10^{-4}$	$4,73 \cdot 10^{-4}$	$4,90 \cdot 10^{-4}$	79,55	76,41	73,91	76,62
22°C	$2,08 \cdot 10^{-2}$	$2,50 \cdot 10^{-2}$	$2,20 \cdot 10^{-2}$	$2,26 \cdot 10^{-2}$	$5,78 \cdot 10^{-4}$	$6,14 \cdot 10^{-4}$	$5,59 \cdot 10^{-4}$	$5,84 \cdot 10^{-4}$	77,58	82,42	75,03	78,34
27°C	$2,22 \cdot 10^{-2}$	$2,50 \cdot 10^{-2}$	$2,50 \cdot 10^{-2}$	$2,41 \cdot 10^{-2}$	$7,12 \cdot 10^{-4}$	$7,60 \cdot 10^{-4}$	$7,75 \cdot 10^{-4}$	$7,49 \cdot 10^{-4}$	111,95	118,95	121,83	117,57
33°C	$2,70 \cdot 10^{-2}$	$2,50 \cdot 10^{-2}$	$2,60 \cdot 10^{-2}$	$2,60 \cdot 10^{-2}$	$6,46 \cdot 10^{-4}$	$5,96 \cdot 10^{-4}$	$5,78 \cdot 10^{-4}$	$6,07 \cdot 10^{-4}$	86,71	80,00	77,58	81,43
37°C	$3,45 \cdot 10^{-2}$	$3,80 \cdot 10^{-2}$	$3,45 \cdot 10^{-2}$	$3,56 \cdot 10^{-2}$	$6,85 \cdot 10^{-4}$	$6,76 \cdot 10^{-4}$	$6,98 \cdot 10^{-4}$	$6,86 \cdot 10^{-4}$	137,00	135,30	139,57	137,29
40°C	$3,85 \cdot 10^{-2}$	$3,80 \cdot 10^{-2}$	$3,70 \cdot 10^{-2}$	$3,78 \cdot 10^{-2}$	$1,09 \cdot 10^{-3}$	$9,57 \cdot 10^{-4}$	$1,09 \cdot 10^{-3}$	$1,04 \cdot 10^{-3}$	175,24	153,86	176,28	158,46

TABELA 5 - PARÂMETROS CINÉTICOS DA PAPAÍNA EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

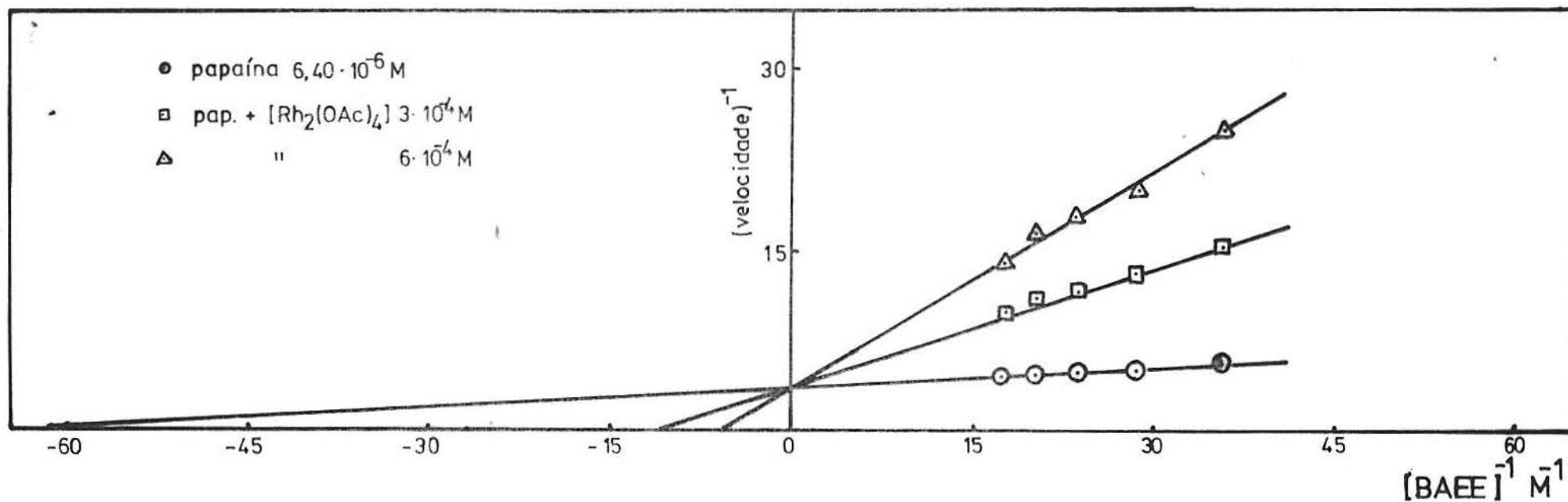


FIGURA 21 - MÉTODO GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK A 15 °C ; pH=6,2 ; I=0,3(NaCl).

Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrárias (ml de NaOH 0,01N . min⁻¹).

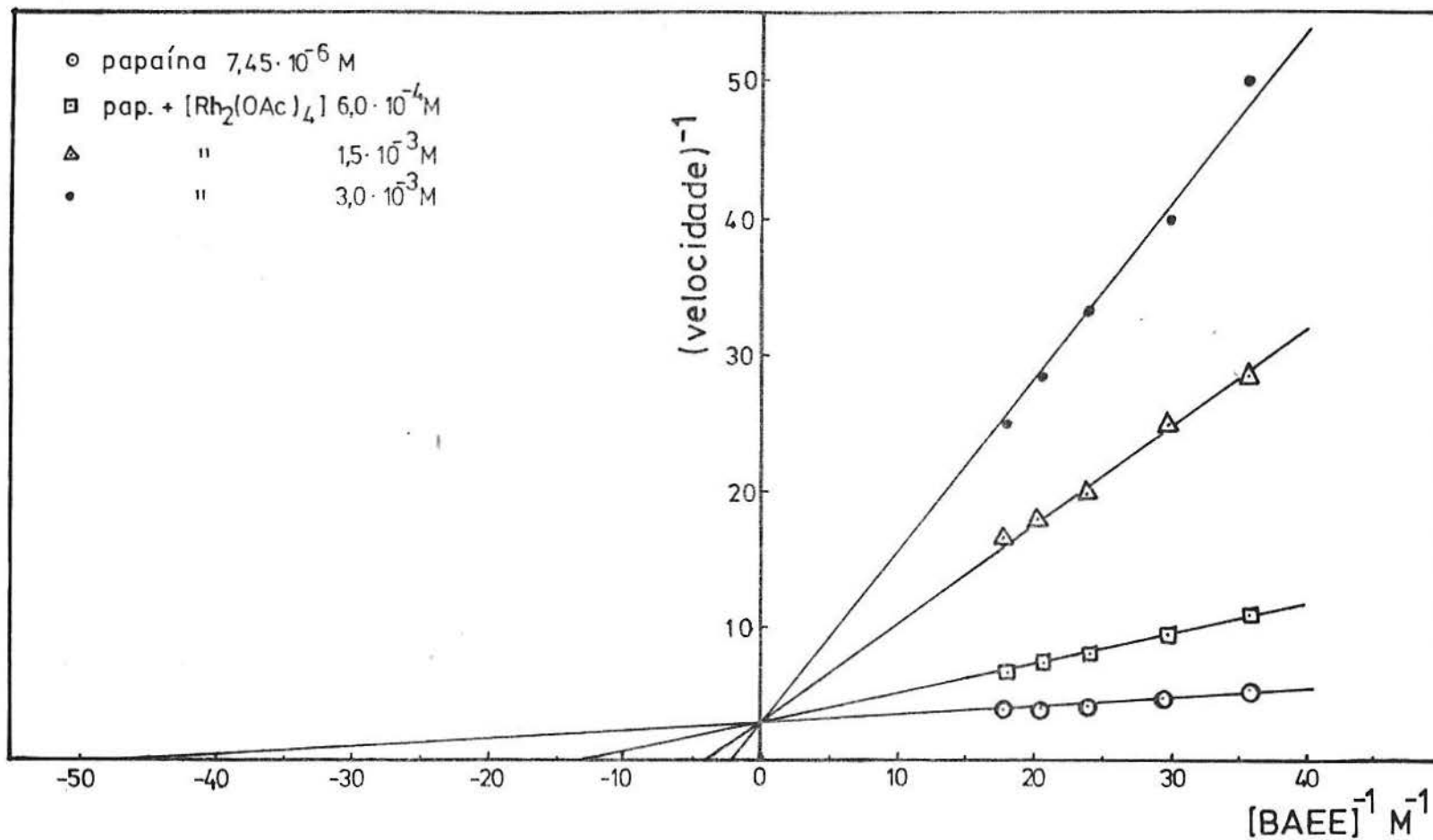


FIGURA 22 - MÉTODO GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK A 22 °C ; pH=6,2 ; I=0,3 (NaCl).

Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrárias (ml de NaOH 0,01N . min⁻¹).

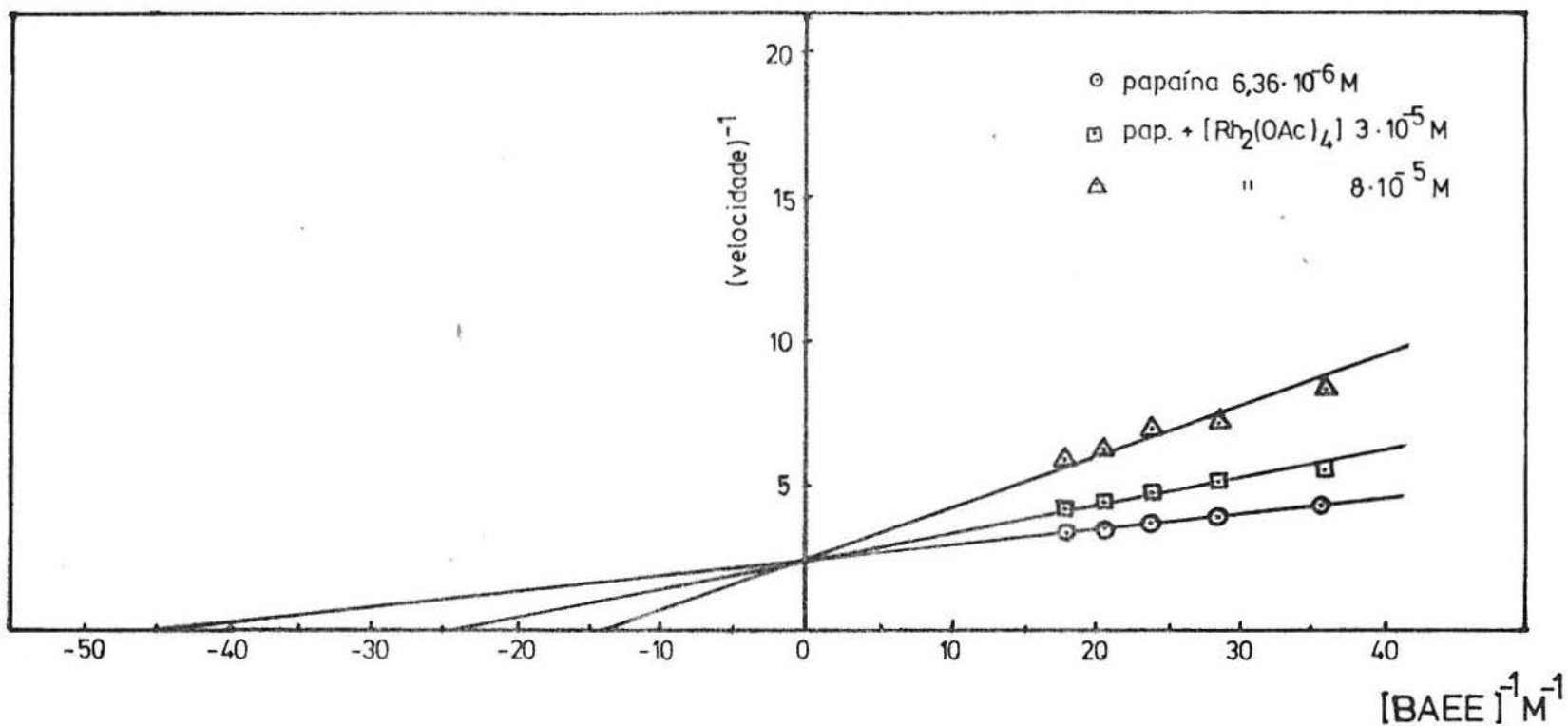


FIGURA 23 - MÉTODO GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK A 27 °C ; pH=6,2 ; I=0,3 (NaCl).

Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrárias (ml de NaOH 0,01N . min⁻¹).

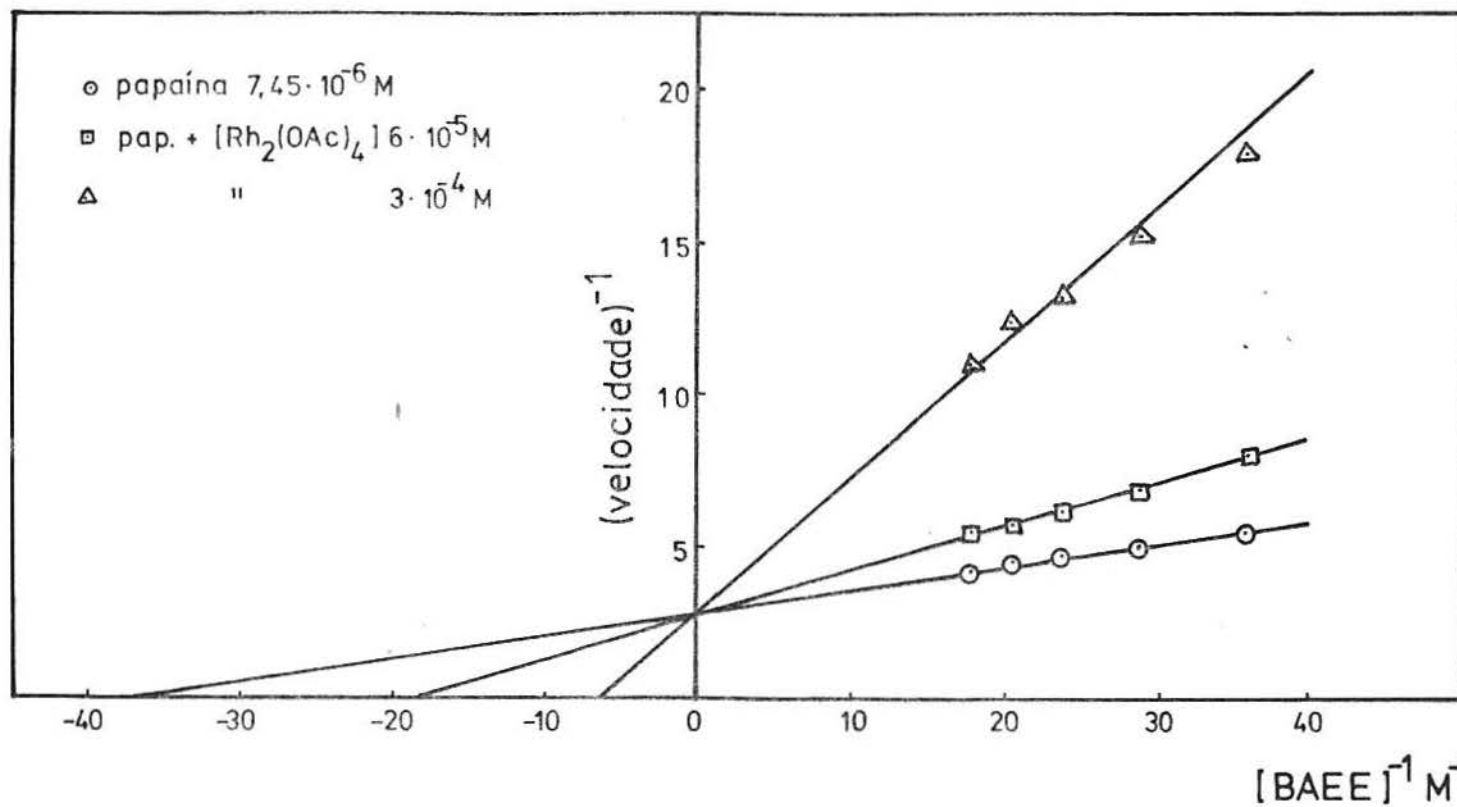


FIGURA 24 - MÉTODO GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK A 33 °C ; pH=6,2 ; I=0,3 (NaCl).
 Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrárias (ml NaOH 0,01N . min⁻¹).

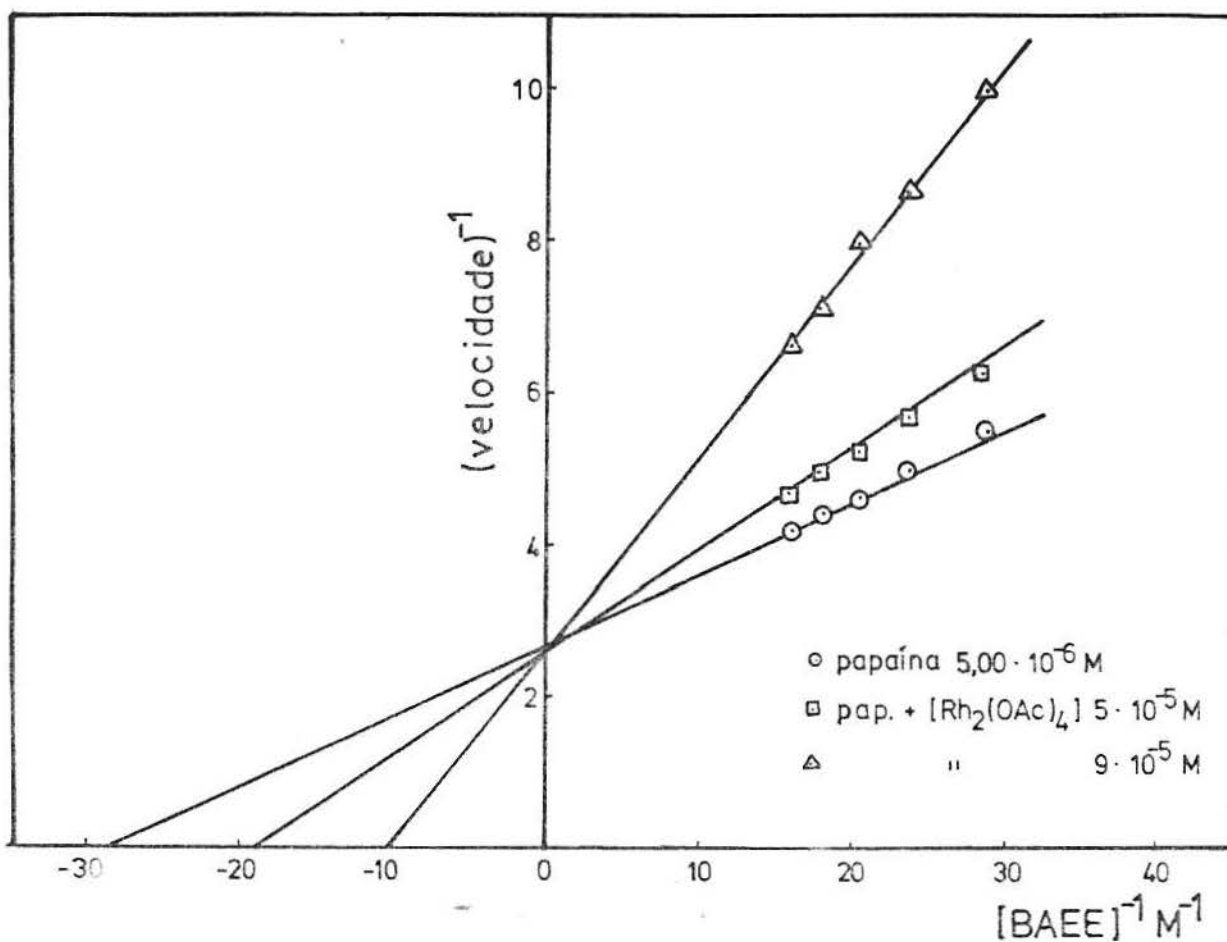


FIGURA 25 - MÉTODO GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK A $37 \text{ }^\circ\text{C}$;
 $\text{pH} = 6,2$; $I = 0,3$ (NaCl).

Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrárias
 (ml de NaOH $0,01\text{N}$. min^{-1}).

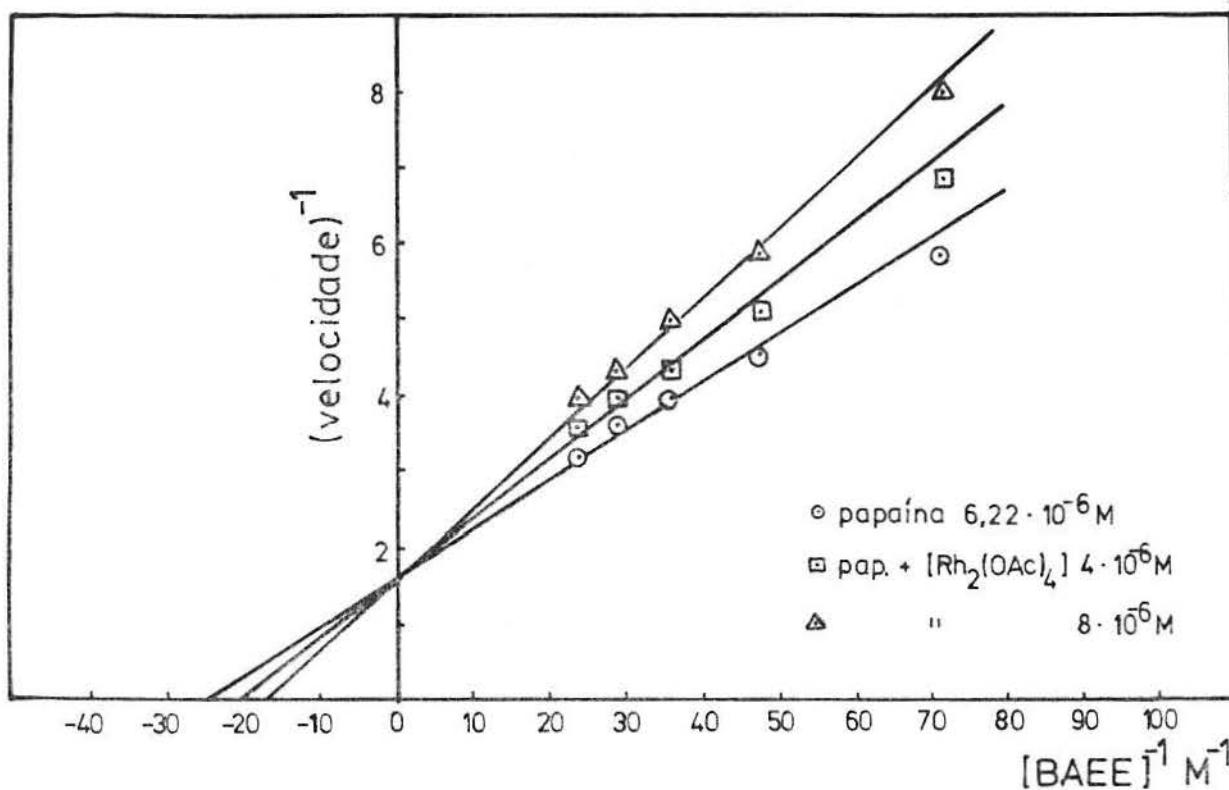


FIGURA 26 - MÉTODO GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK A 40 °C ;
 pH = 6,2 ; I = 0,3 (NaCl).

Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrárias
 (ml de NaOH 0,01N . min⁻¹).

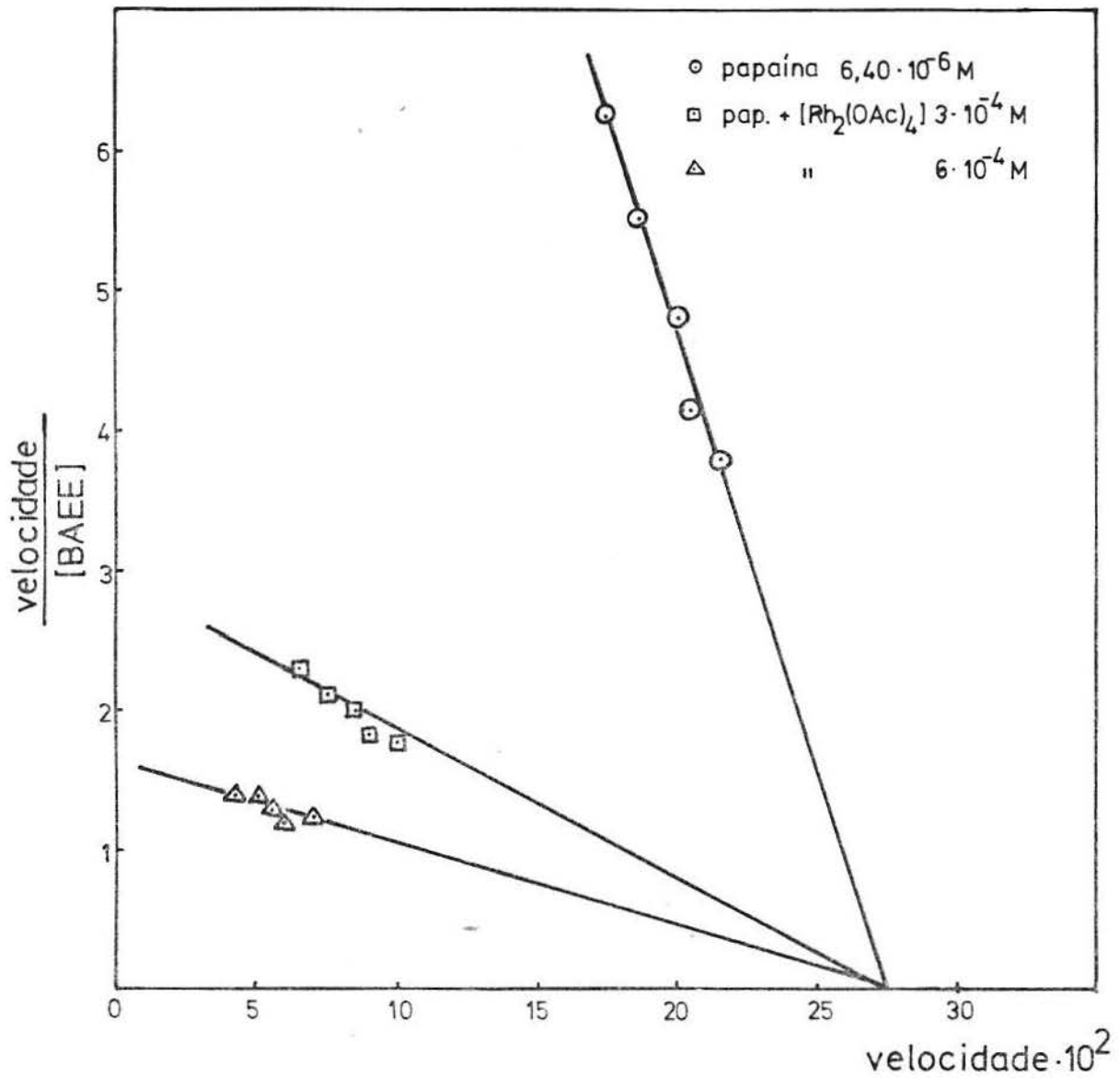


FIGURA 27 - MÉTODO GRÁFICO DE EADIE-HOFSTEE A 15 °C ;
pH = 6,2 ; I = 0,3 (NaCl).

Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrárias (ml NaOH 0,01N . min⁻¹).

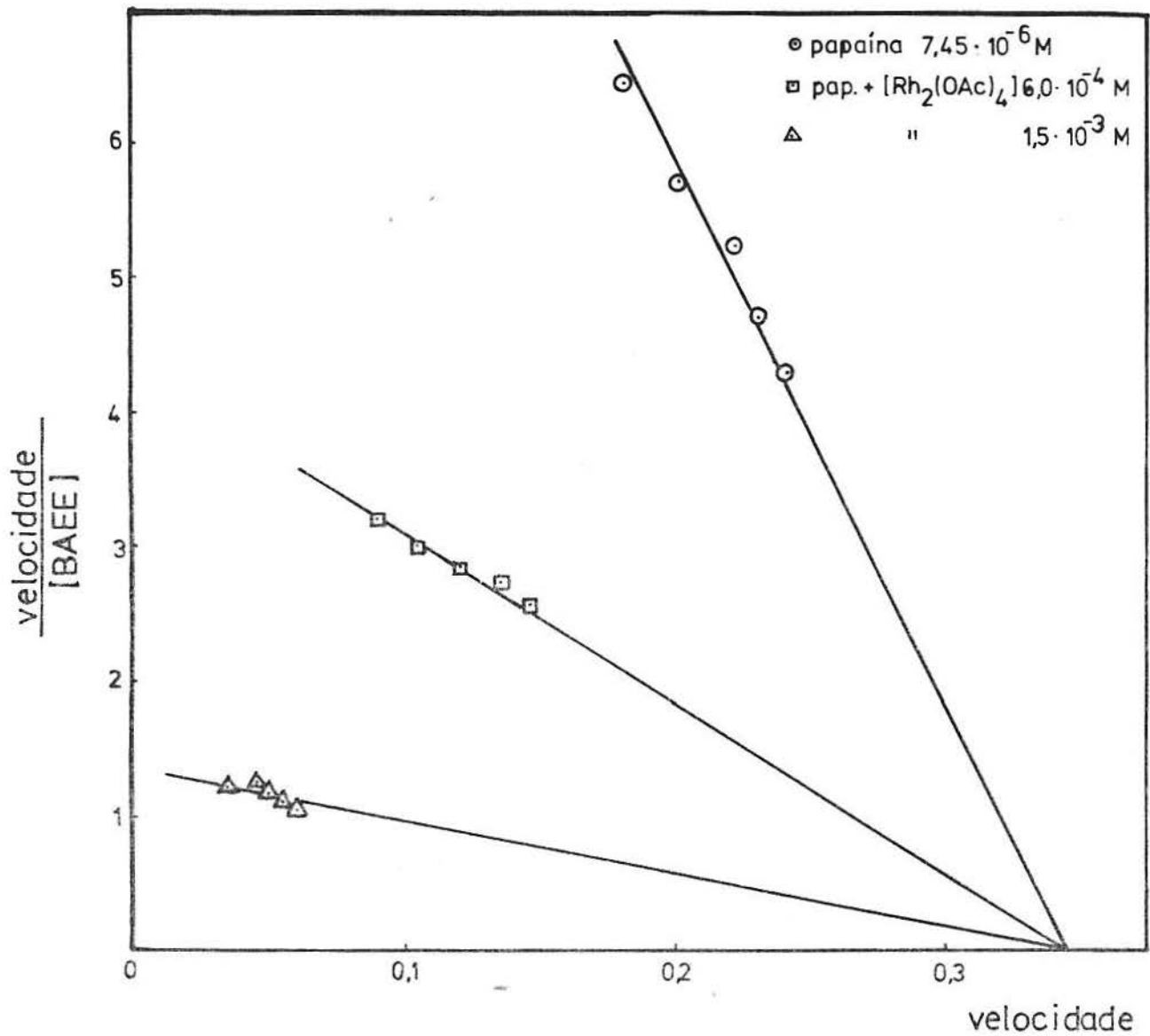


FIGURA 28 - MÉTODO GRÁFICO DE EADIE-HOFSTEE A $22 \text{ }^\circ\text{C}$;
 pH = 6,2 ; I = 0,3 (NaCl).

Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrárias (ml de NaOH 0,01N . min⁻¹).

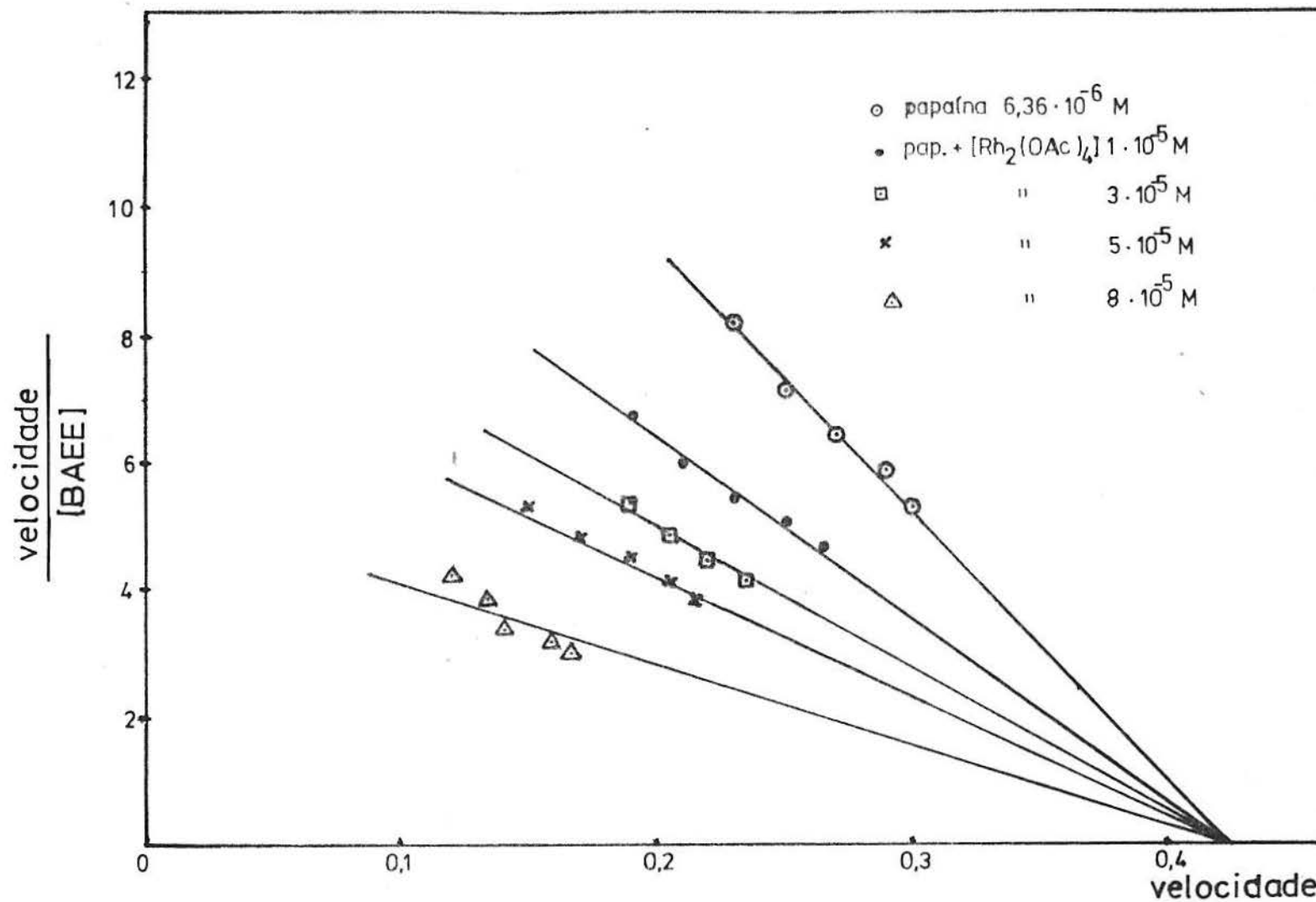


FIGURA 29 - MÉTODO GRÁFICO DE EADIE-HOFSTEE A 27 °C ; pH=6,2 ; I=0,3 (NaCl).

Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrárias (ml NaOH 0,01N . min⁻¹).

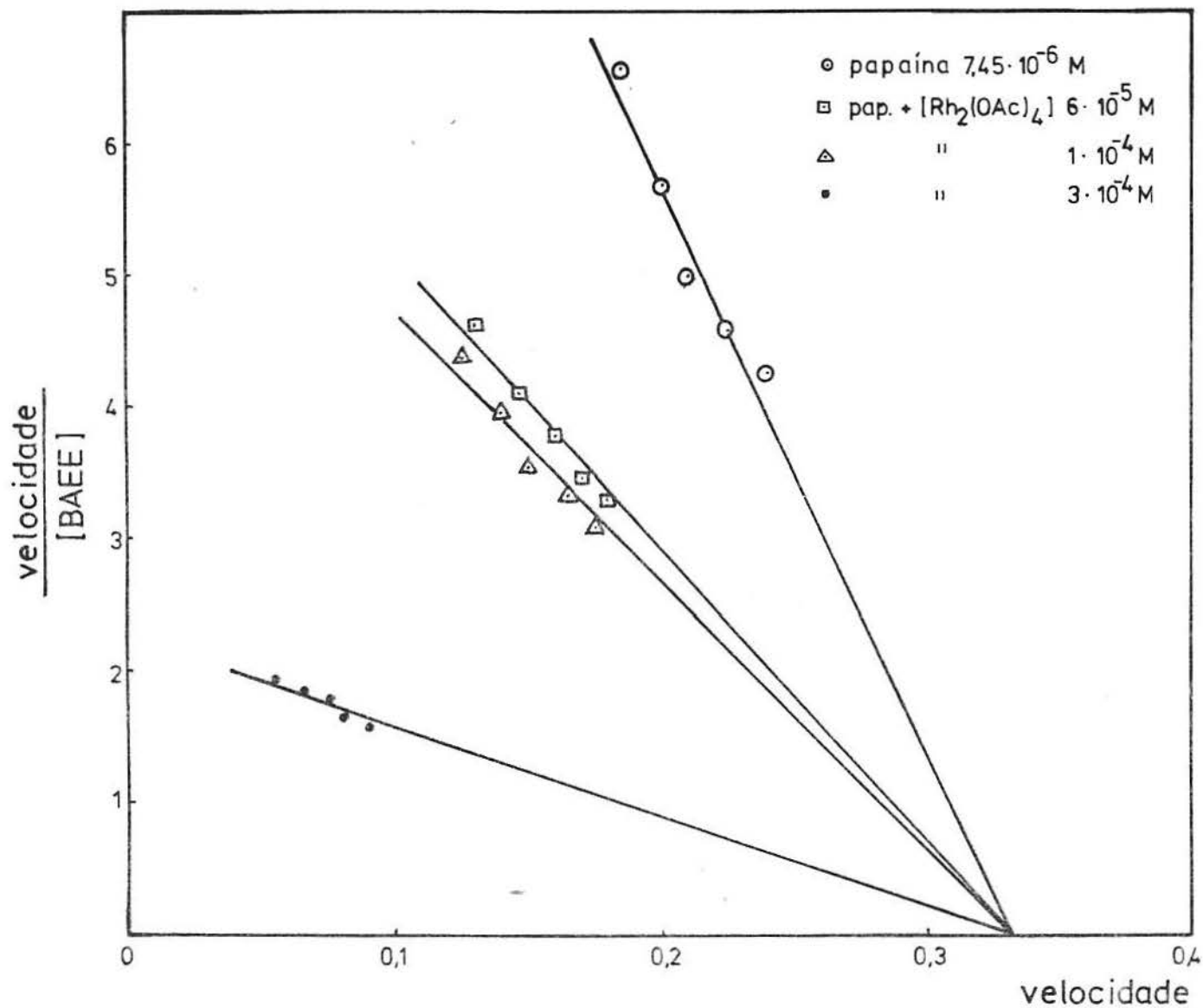


FIGURA 30 - MÉTODO GRÁFICO DE EADIE-HOFSTEE A $33 \text{ }^\circ\text{C}$;
 $\text{pH} = 6,2$; $I = 0,3$ (NaCl).

Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrárias (ml de NaOH $0,01\text{N}$. min^{-1}).

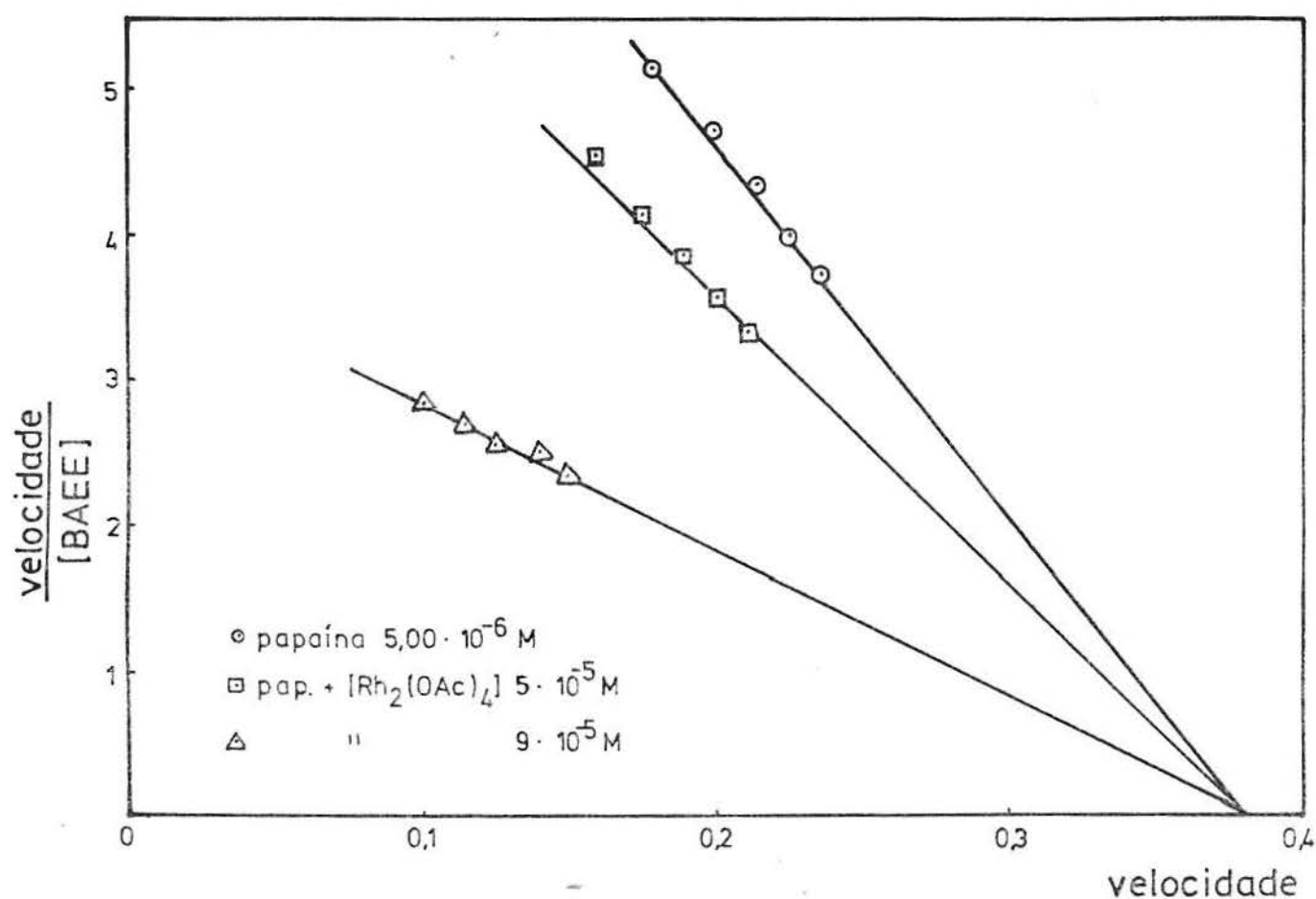


FIGURA 31 - MÉTODO GRÁFICO DE EADIE-HOFSTEE A 37 °C ;
pH = 6,2 ; I = 0,3 (NaCl).

Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrá-
rias (ml de NaOH 0,01N . min⁻¹).

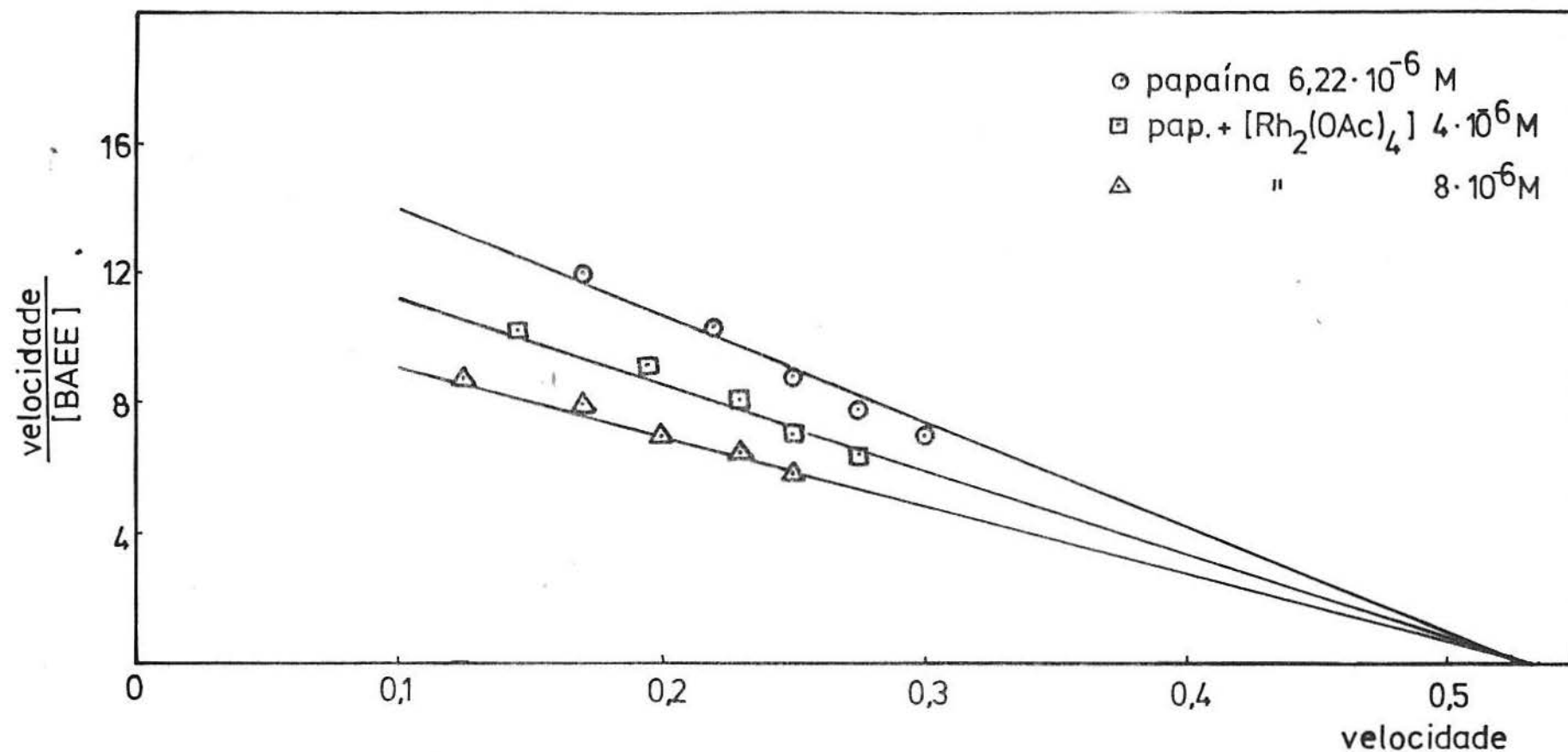


FIGURA 32 - MÉTODO GRÁFICO DE EADIE-HOFSTEE A 40°C ; $\text{pH}=6,2$; $I=0,3$ (NaCl).

Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrárias ($\text{ml NaOH } 0,01\text{N} \cdot \text{min}^{-1}$).

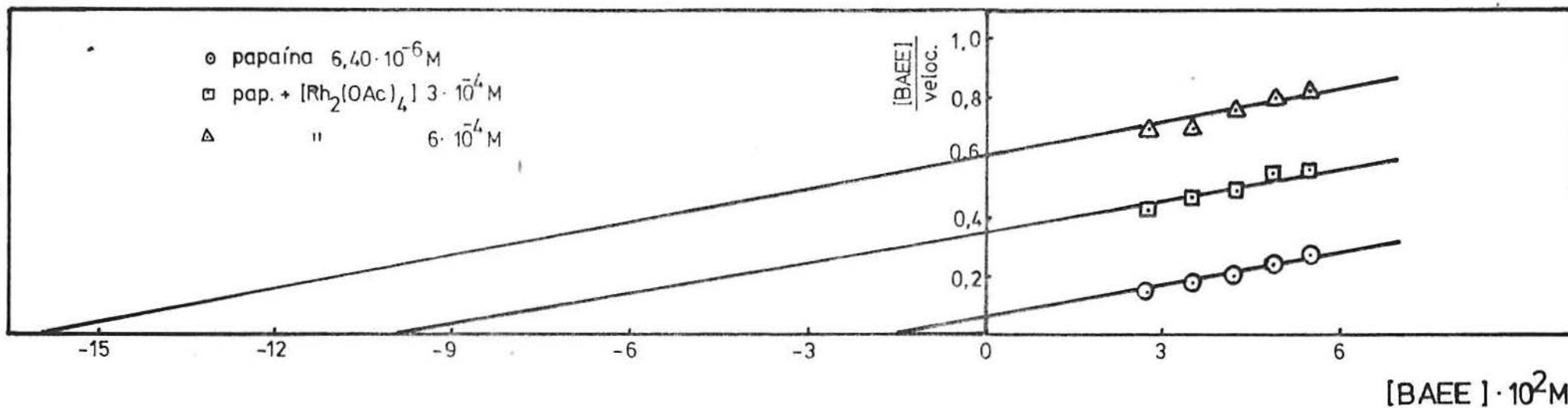


FIGURA 33 - MÉTODO GRÁFICO DE HANES A 15 °C ; pH = 6,2 ; I = 0,3 (NaCl).

Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrárias (ml NaOH 0,01N . min⁻¹).

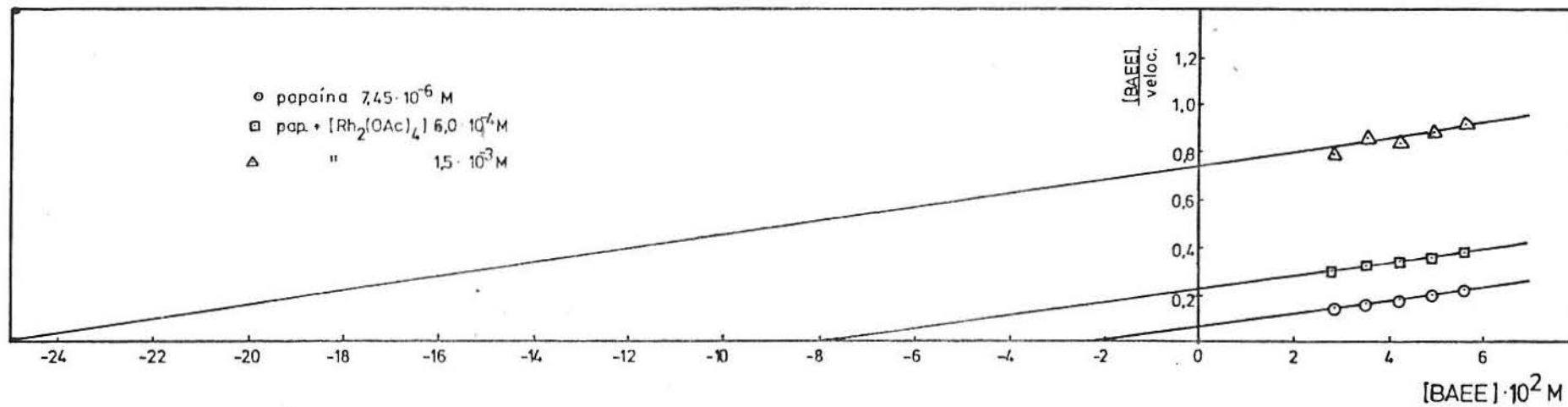


FIGURA 34 - MÉTODO GRÁFICO DE HANES A 22 °C ; pH = 6,2 ; I = 0,3 (NaCl).

Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrárias (ml de NaOH 0,01N . min⁻¹).

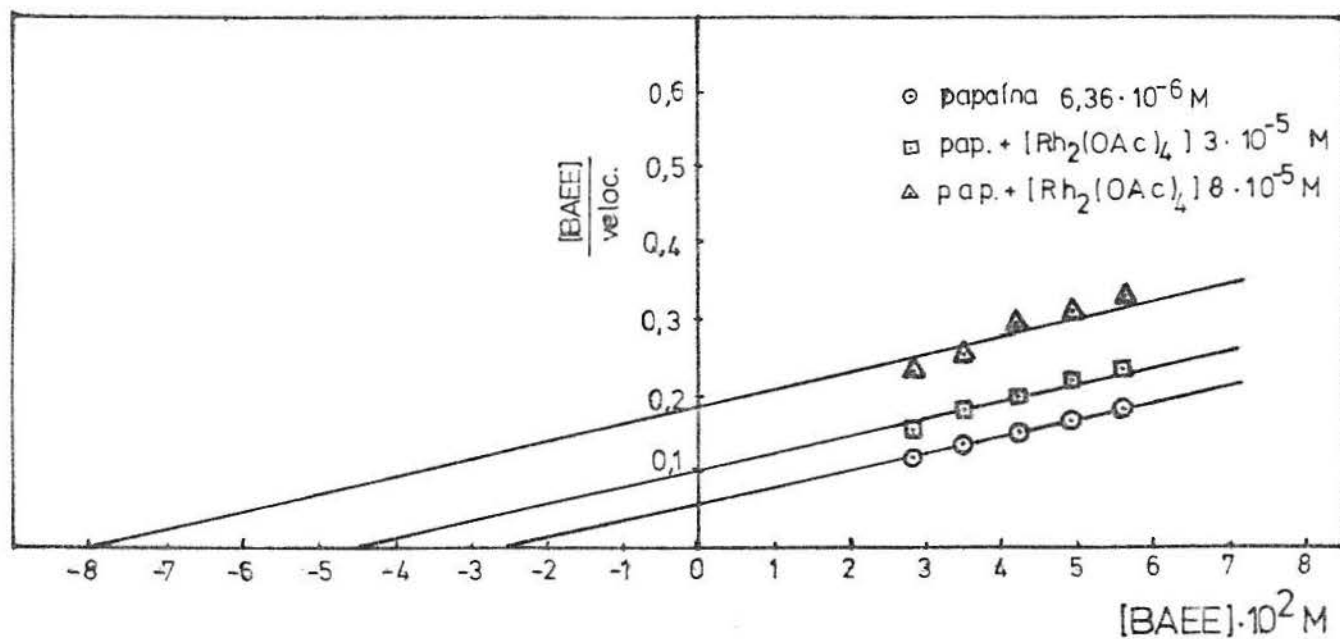


FIGURA 35 - MÉTODO GRÁFICO DE HANES A 27 °C ; pH = 6,2 ;
I = 0,3 (NaCl).

Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrárias
(ml de NaOH 0,01N . min⁻¹).

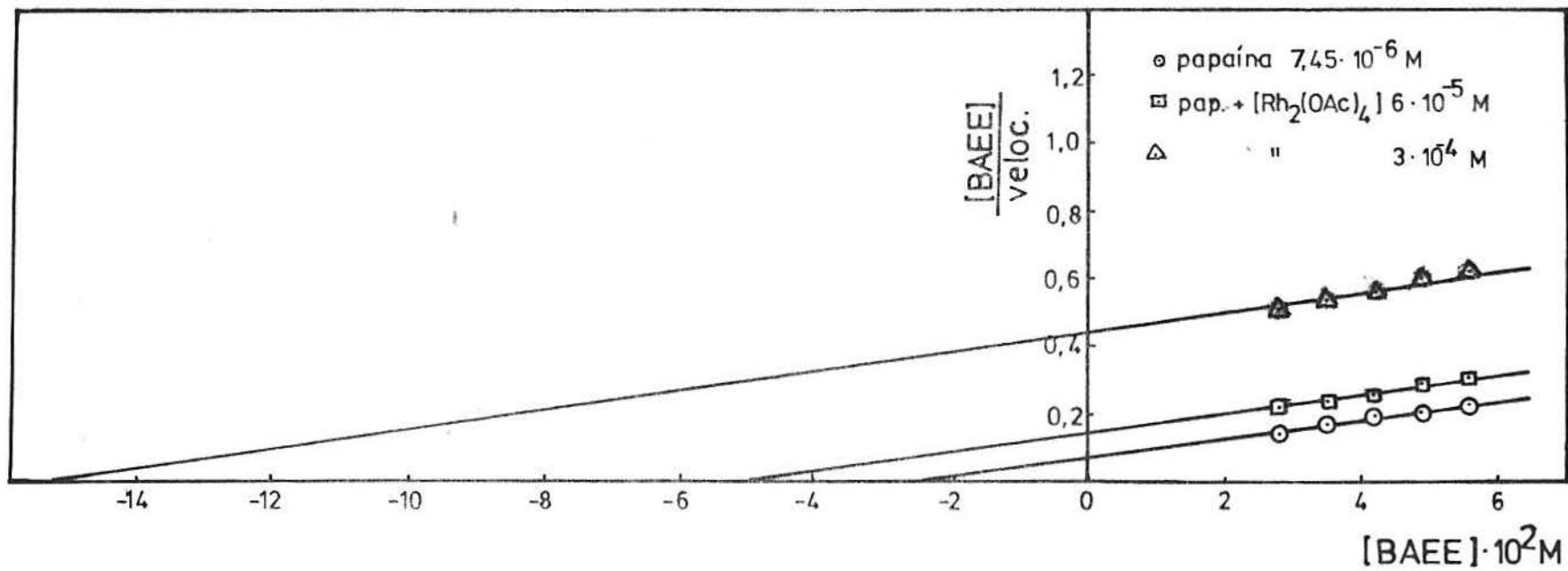


FIGURA 36 - MÉTODO GRÁFICO DE HANES A 33 °C ; pH = 6,2 ; I = 0,3 (NaCl).

Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrárias (ml NaOH 0,01N . min⁻¹).

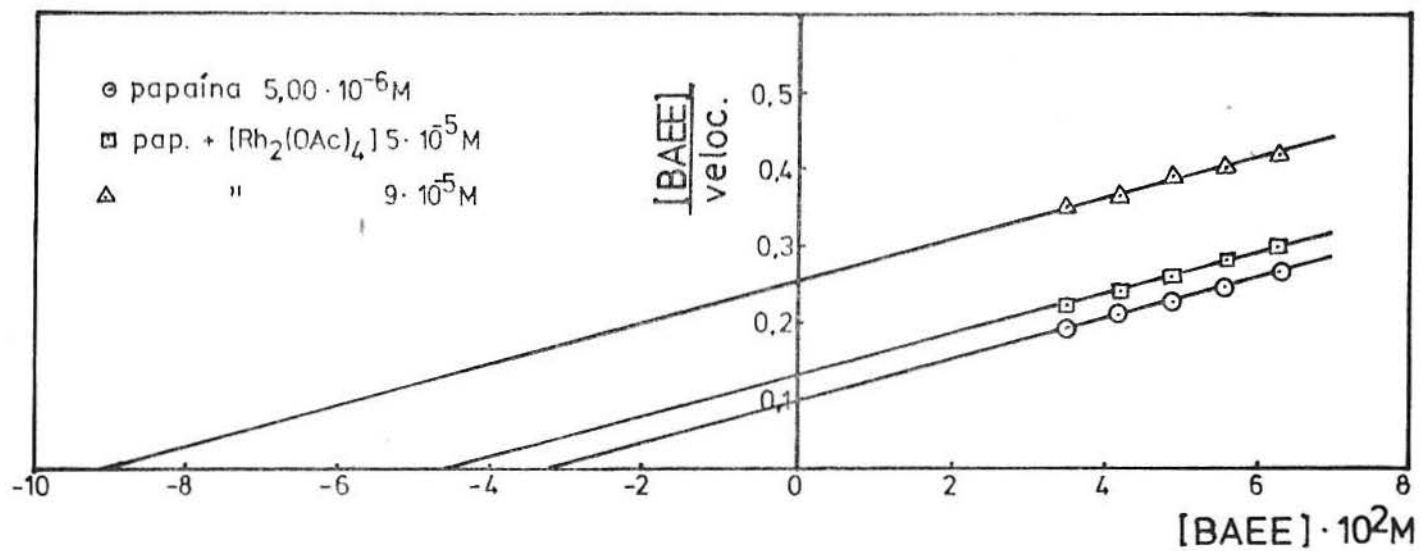


FIGURA 37 - MÉTODO GRÁFICO DE HANES A 37 °C ; pH=6,2 ; I=0,3 (NaCl).

Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrárias (ml NaOH 0,01N.min⁻¹).

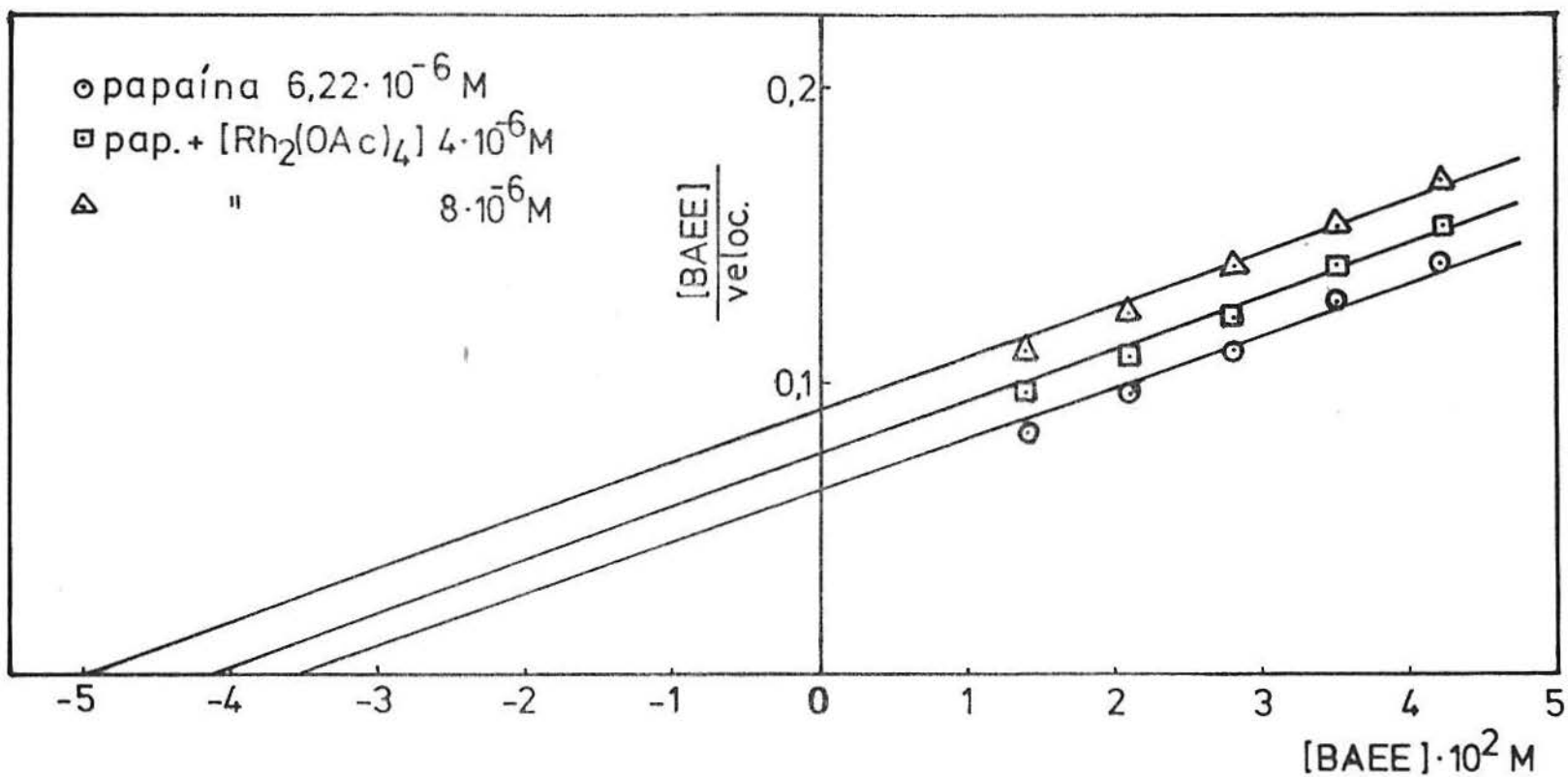


FIGURA 38 - MÉTODO GRÁFICO DE HANES A 40 °C ; pH = 6,2 ; I = 0,3 (NaCl).

Observação: Velocidade expressa em unidades arbitrárias (ml NaOH 0,01N . min⁻¹).

3.1.3 - DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE VELOCIDADE E DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO DO PROCESSO DE INIBIÇÃO

A intensidade da inibição da papaína por tetracetato de ródio (II) depende do tempo de incubação da enzima com o inibidor, da concentração do $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ e da temperatura (Figuras 39, 40, 41, 42, 43 e 44).

O processo inibitório é lento, sendo necessário, conforme a concentração de inibidor e a temperatura, um período de até três horas para que o sistema alcance o estado de equilíbrio, situação ilustrada nos gráficos das figuras 39 a 44 já mencionadas.

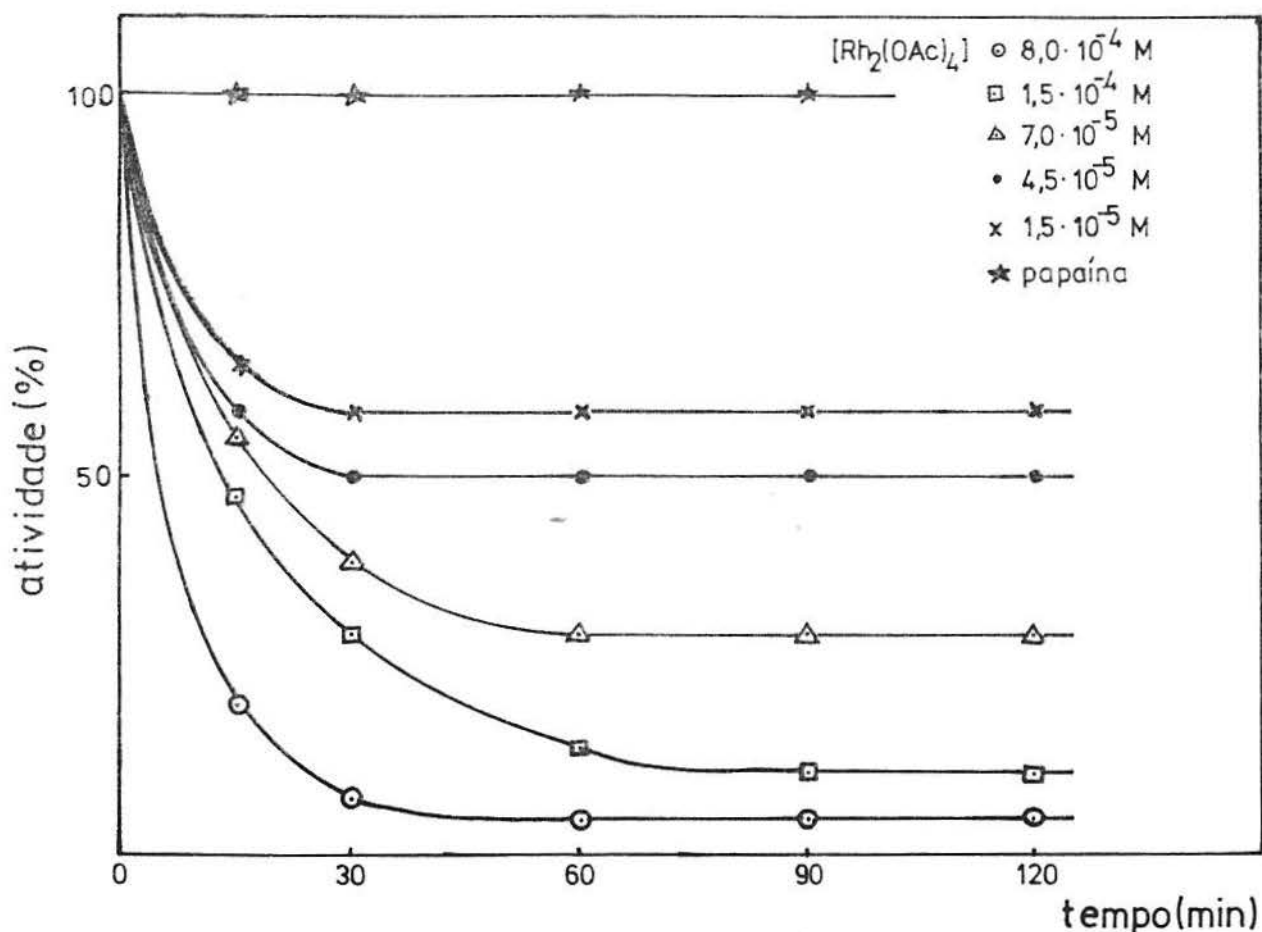


FIGURA 39 - INATIVAÇÃO DA PAPAÍNA POR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ A 15 °C; pH=6,2; I=0,3.

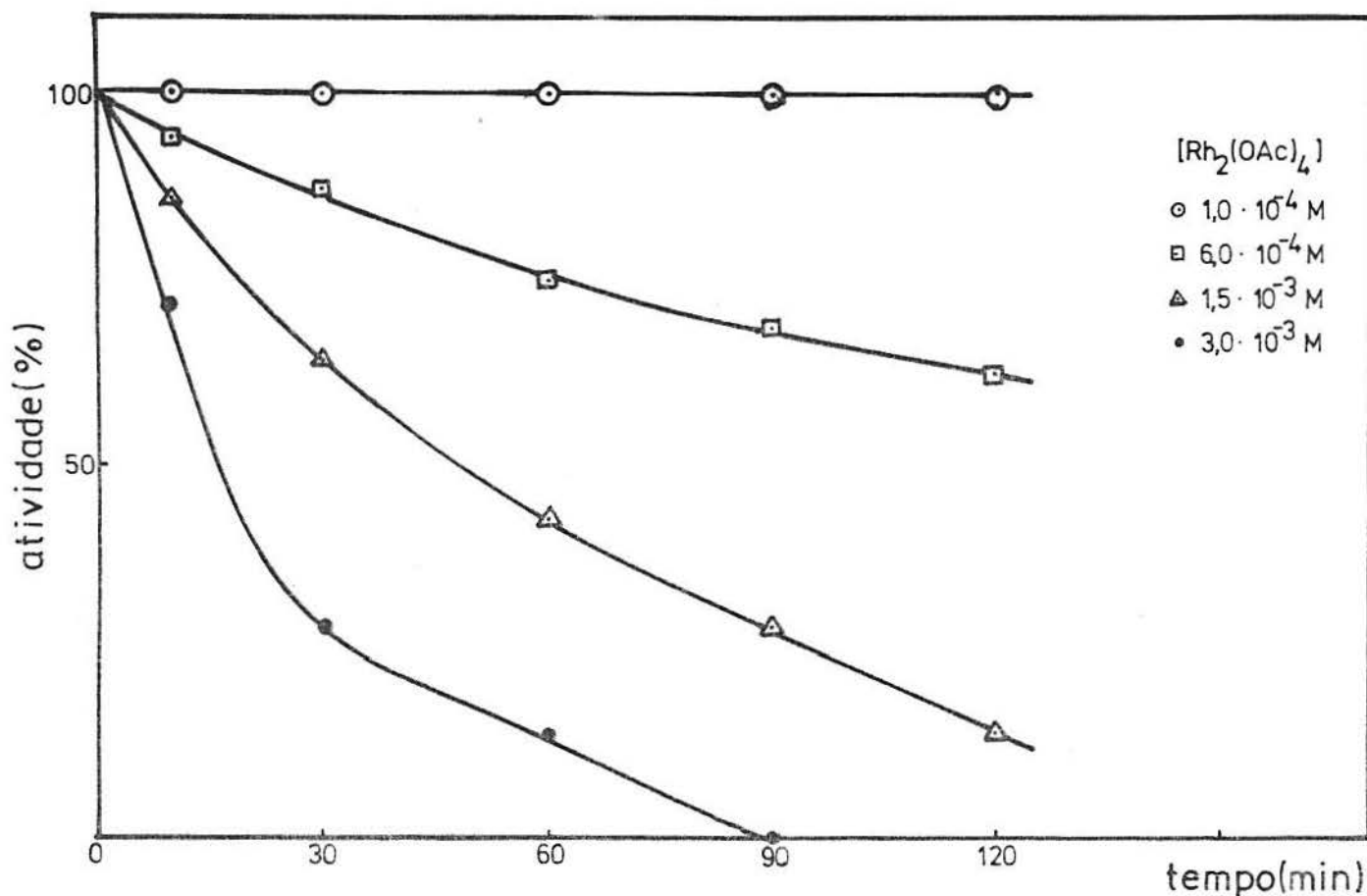


FIGURA 40 - INATIVAÇÃO DA PAPAÍNA POR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ A $22 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH}=6,2$; $I=0,3$

Observação: Conforme se mostra no gráfico, a concentração $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ de $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ não causou inibição na papaína nos tempos estudados, sobrepondo-se ao controle feito com a enzima pura durante a experiência.

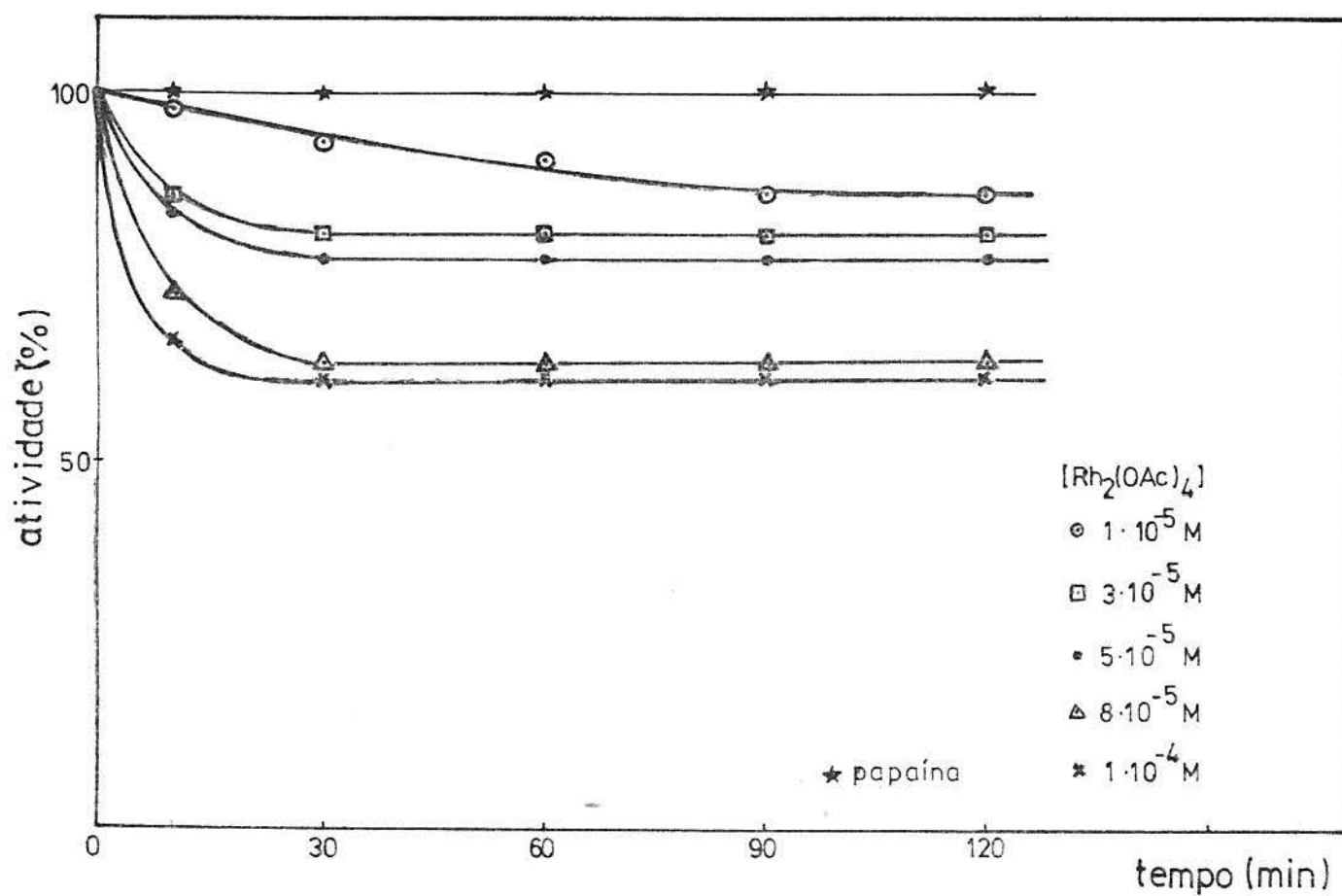


FIGURA 41 - INATIVAÇÃO DA PAPAÍNA POR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $Rh_2(OAc)_4$ A $27 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH}=6,2$; $I=0,3$.

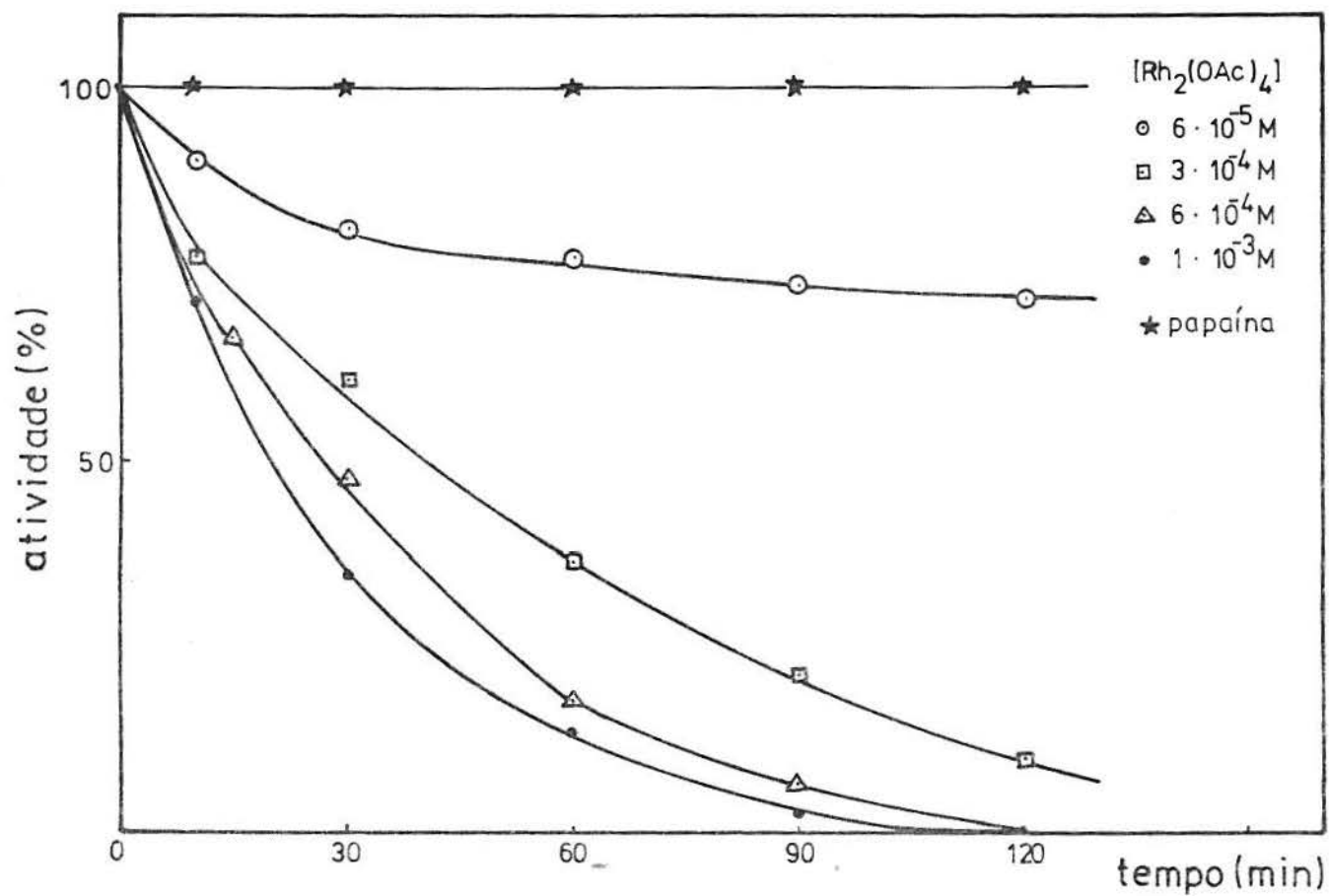


FIGURA 42 - INATIVAÇÃO DA PAPAÍNA POR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ A $33 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH}=6,2$; $I=0,3$.

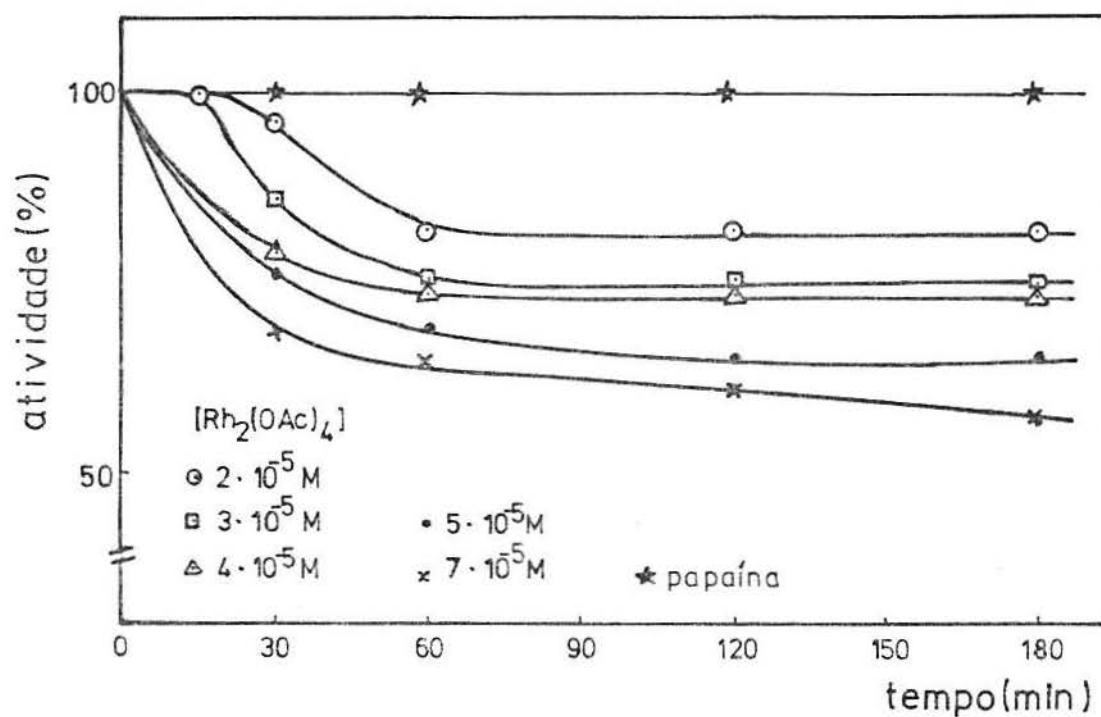


FIGURA 43 - INATIVAÇÃO DA PAPAÍNA POR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $Rh_2(OAc)_4$ A $37 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH}=6,2$; $I=0,3$.

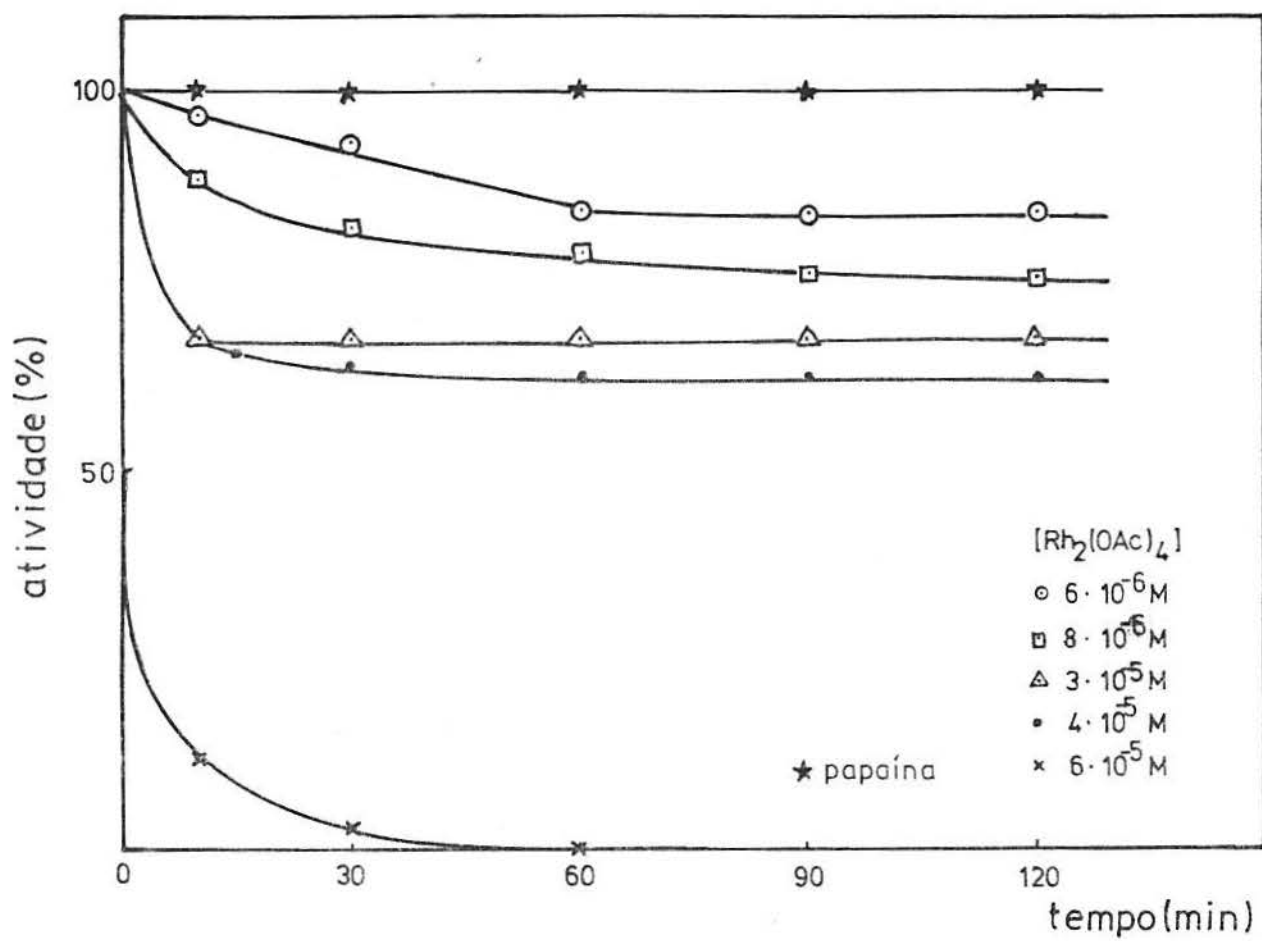


FIGURA 44 - INATIVAÇÃO DA PAPAÍNA POR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE Rh₂(OAc)₄ A 40 °C; pH=6,2; I=0,3.

O estudo cinético da inibição da papaína por tetracetato de ródio (II) indica uma provável reação de pseudo-primeira ordem em relação à concentração de enzima, quando na presença de um excesso aproximadamente cem vezes maior de inibidor.

Nessas condições, as constantes de velocidade da reação de inativação, a cada temperatura, podem ser determinadas pela expressão :

$$k = (1/t) \ln C_{E_0} / C_E$$

onde k = constante de velocidade da reação de inibição.

t = tempo de reação.

C_{E_0} = concentração inicial de papaína.

C_E = concentração de papaína após um tempo " t " de reação.

Através da atividade percentual da papaína, medida em diversos tempos de reação (figuras de nº 39 a 44) podemos obter a concentração de enzima ainda ativa (C_E) naquele ponto.

Os valores das constantes de velocidade da reação de inibição nas várias temperaturas estudadas são fornecidos na Tabela 6, junto com os respectivos períodos de meia-vida.

TEMPERATURA	CONSTANTE DE VELOCIDADE k (min^{-1})	MEIA-VIDA (min) $T_{1/2} = (\ln 2) / k$
15 °C	0,0336 ± 0,0044	20,63 ± 2,71
22 °C	0,0359 ± 0,0050	19,31 ± 2,65
27 °C	0,0362 ± 0,0061	19,15 ± 2,55
33 °C	0,0366 ± 0,0038	18,94 ± 2,78
37 °C	(0,0425)	(16,31)
40 °C	(0,0555)	(12,49)

TABELA 6 - CONSTANTES DE VELOCIDADE DA REAÇÃO DE INIBIÇÃO DA PAPAÍNA POR $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ EM VÁRIAS TEMPERATURAS.

Nas temperaturas de 37 °C e 40 °C, as concentrações de tetracetato de ródio (II) utilizadas não correspondem a um excesso cem vezes superior à concentração enzimática. Nesses casos, conforme se verá a seguir, a reação não se comporta como de pseudo-primeira ordem.

Quantitativamente, a constante de velocidade (k) de uma reação está relacionada com a energia de ativação (E_a) do processo e com a temperatura absoluta (T) do sistema pela conhecida equação de Arrhenius:

$$k = A \cdot e^{-E_a/RT}$$

ou na forma logaritmada:

$$\ln k = -E_a/RT + \ln A$$

onde "A" é a constante denominada "fator de frequência".

A relação gráfica entre $\ln k$ e $1/T$ é linear e permite a determinação da energia de ativação da reação, conforme demonstrado pela Figura 45.

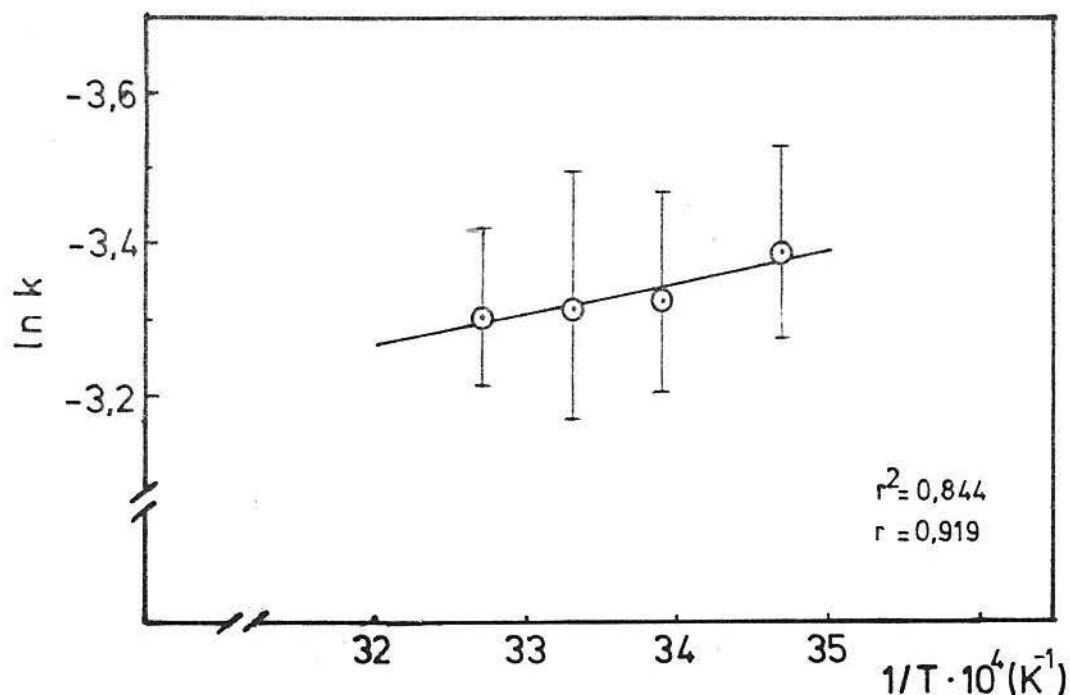


FIGURA 45 - DETERMINAÇÃO DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO DA REAÇÃO DE INIBIÇÃO DA PAPAÍNA POR $Rh_2(OAc)_4$.

Nas temperaturas de 37 °C e 40 °C ocorrem grandes desvios da linearidade, pois, conforme já foi mencionado, a concentração de inibidor empregada não corresponde ao excesso necessário para considerar uma pseudo-primeira ordem de reação. Estes pontos não foram representados na figura nº 45.

A energia de ativação determinada pelo gráfico da figura nº 45 tem o valor abaixo citado:

$$E_a = + 823,4 \text{ cal}$$

3.2 - DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE INIBIÇÃO

As constantes de inibição (K_i) da papaína inativa da por tetracetato de ródio (II) foram determinadas, nas várias temperaturas empregadas, utilizando-se os métodos já citados de LINEWEAVER-BURK , EADIE-HOFSTEE e HANES .

Considerando que os resultados dos três métodos apontaram para uma inibição competitiva, foi possível de terminar os valores das constantes de inibição, a cada temperatura, pela expressão:

$$K_{m(ap)} = K_m (1 + [I] / K_i)$$

onde: $K_{m(ap)}$ corresponde ao aumento aparente da constante de Henri-Michaelis-Mentem originado pela inibição.

$[I]$ é a concentração de $Rh_2(O_2CMe)_4(H_2O)_2$.

Os valores encontrados são fornecidos na tabela 7.

TEMPERATURA	CONSTANTE DE INIBIÇÃO (K_i) $\times 10^{-5}$
15 °C	6,54 \pm 0,16
22 °C	8,90 \pm 1,48
27 °C	10,20 \pm 2,40
33 °C	11,90 \pm 3,00
37 °C	13,60 \pm 3,10
40 °C	2,16 \pm 0,31

TABELA 7 - CONSTANTES DE INIBIÇÃO DA PAPAÍNA COM $Rh_2(OAc)_4$ EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

3.3 - DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS ΔG° , ΔH° E ΔS°

Através das constantes de inibição (item 3.2) foram determinados os valores médios da entalpia (ΔH°), da entropia (ΔS°) e da energia livre (ΔG°) do processo de inativação da papaína por tetracetato de ródio(II).

Utilizou-se a conhecida equação de VAN'T HOFF, adaptada às características da inibição:

$$\ln 1/K_i = -(\Delta H^{\circ} / R T) + \Delta S^{\circ}/R \quad (1)$$

O grau de inibição ($\ln 1/K_i$) apresentou boa correlação linear com o inverso da temperatura absoluta, conforme mostrado no gráfico da figura 46 exceto na temperatura de 40 °C.

Os parâmetros termodinâmicos ΔG° e ΔS° envolvidos na inativação foram determinados a partir das equações fundamentais :

$$\Delta G^{\circ} = RT \ln K_i \quad (2)$$

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T \Delta S^{\circ} \quad (3)$$

A constante de inibição (K_i) que aparece nas equações 1 e 2, vale lembrar, corresponde ao inverso da constante de equilíbrio da reação, pois o processo tratou da complexação do tetracetato de ródio (II) com as bases de Lewis da papaína.

Os resultados encontrados são mostrados na tabela 8 .

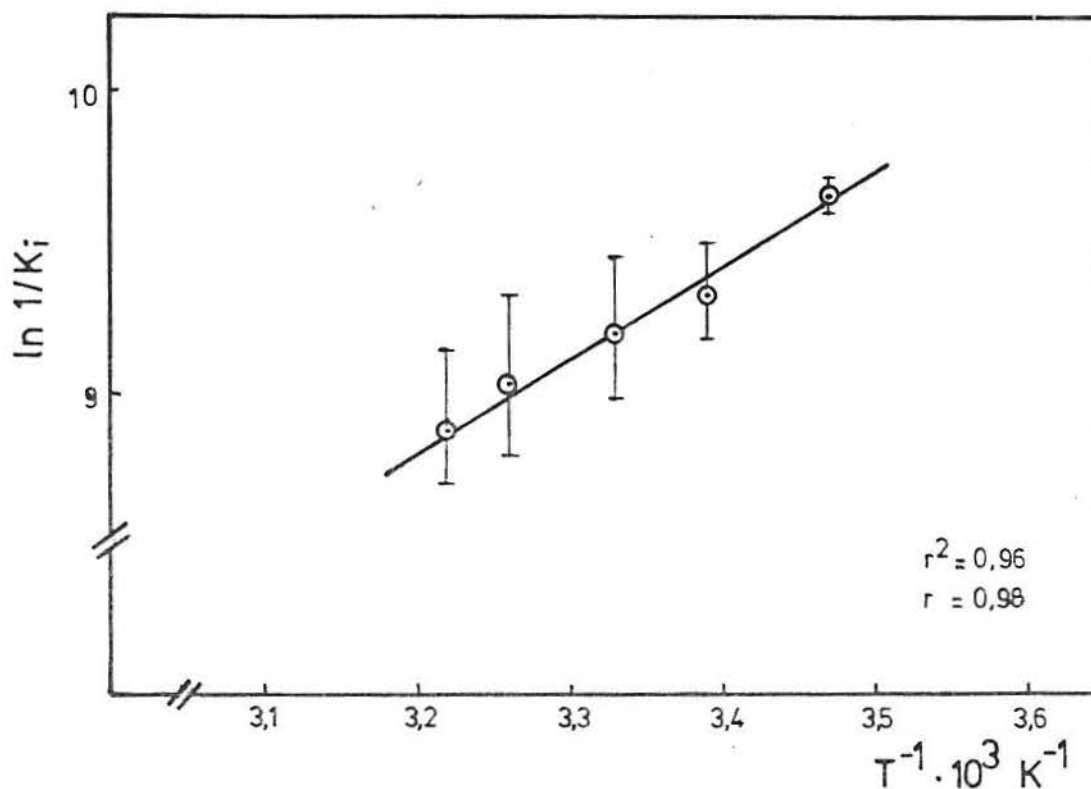


FIGURA 46 - DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DA INIBIÇÃO DA PAPAÍNA POR $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$.

O gráfico indica uma variação de entalpia média cujo valor é citado abaixo:

$$\Delta H^\circ' \text{ (média)} = - 5,69 \text{ kcal}$$

TEMPERATURA	ΔG° (kcal)	ΔS° (cal.K ⁻¹)
15 °C	- 5,51	- 0,60
22 °C	- 5,47	- 0,74
27 °C	- 5,48	- 0,69
33 °C	- 5,49	- 0,63
37 °C	- 5,48	- 0,65
40 °C	- 6,68	+ 3,18

TABELA 8 - PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DA INIBIÇÃO DA PAPAÍNA POR TETRACETATO DE RÓDIO (II).

3.4 - INFLUÊNCIA DA FORÇA IÔNICA DO MEIO REACIONAL

A atividade da papaína inibida por $Rh_2(OAc)_4(H_2O)_2$ não sofreu nenhuma variação quando medida em meios reacionais com forças iônicas variando de 0,1 a 0,4.

3.5 - DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE MOLÉCULAS DE $Rh_2(OAc)_4$ E O NÚMERO DE MOLÉCULAS DE PAPAÍNA

3.5.1 - MÉTODO GRÁFICO

Através do método gráfico de Scatchard (item 2.2.9) foi estabelecida uma relação estequiométrica do tipo 1:1, isto é, cada molécula protéica foi inibida por uma molécula de tetracetato de ródio (II) nas temperaturas de 15, 27 e 37 °C. As Tabelas 9, 10 e 11 apresentam os dados utilizados na construção dos gráficos correspondentes às Figuras 47, 48, 49, 50, 51 e 52.

3.5.2 - PRECIPITAÇÃO COM ÁCIDO TRICLOROACÉTICO

Foi obtida uma relação entre o número de moléculas de papaína e o número de moléculas de $Rh_2(OAc)_4$ variando de 1 : 1,1 a 1 : 1,3. A precisão do método e a adsorção do inibidor livre sobre o precipitado formado justificam a variação dos resultados encontrados. Verificou-se também que o TCA provoca uma alteração de aproximadamente 10% na absorvância do tetracetato de ródio (II), provavelmente por substituição de grupos acetatos, tal como ocorre com CF_3CO_2H (BEAR e col., 1971).

[papaína] _{total} = $5,32 \cdot 10^{-6}$ M		$\langle K_i \rangle = 6,54 \cdot 10^{-5}$			
[Rh ₂ (OAc) ₄] _{total}	$1,5 \cdot 10^{-5}$ M	$4,5 \cdot 10^{-5}$ M	$7,0 \cdot 10^{-5}$ M	$1,5 \cdot 10^{-4}$ M	$8,0 \cdot 10^{-4}$ M
Ativ.pap.equil.	58,8 %	50,0 %	29,4 %	11,8 %	5,9 %
r	0,164	0,393	0,503	0,689	0,924
1/r	6,109	2,546	1,988	1,451	1,082
[Rh ₂ (OAc) ₄] _{eq}	$1,28 \cdot 10^{-5}$ M	$4,23 \cdot 10^{-5}$ M	$6,62 \cdot 10^{-5}$ M	$1,45 \cdot 10^{-4}$ M	$7,95 \cdot 10^{-4}$ M
1/[Rh ₂ (OAc) ₄] _{eq}	$78125,0M^{-1}$	$23618,3M^{-1}$	$15105,7M^{-1}$	$6881,9M^{-1}$	$1257,9M^{-1}$
r/[Rh ₂ (OAc) ₄] _{eq}	$12812,5M^{-1}$	$9290,8M^{-1}$	$7598,2M^{-1}$	$4751,7M^{-1}$	$1162,3M^{-1}$

TABELA 9 - DADOS PARA A DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O Nº DE MOLÉCULAS DE Rh₂(OAc)₄ E O Nº DE MOLÉCULAS DE PAPAÍNA A 15 °C.

Observação: "r" = parâmetro definido como "fração de saturação dos sítios da enzima".

$[\text{papaína}]_{\text{total}} = 6,36 \cdot 10^{-6} \text{ M}$		$\langle K_i \rangle = 1,02 \cdot 10^{-4}$			
$[\text{Rh}_2(\text{OAc})_4]_{\text{total}}$	$1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$8,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$3,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
Ativ.pap.equil.	62,0 %	63,6 %	77,3 %	81,0 %	86,4 %
r	0,489	0,432	0,323	0,220	0,082
1/r	2,045	2,315	3,099	4,541	12,159
$[\text{Rh}_2(\text{OAc})_4]_{\text{eq}}$	$9,76 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$7,77 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$4,86 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$2,88 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$9,14 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
$1/[\text{Rh}_2(\text{OAc})_4]_{\text{eq}}$	$10245,9 \text{ M}^{-1}$	$12872,5 \text{ M}^{-1}$	$20593,1 \text{ M}^{-1}$	$34732,4 \text{ M}^{-1}$	$109468,6 \text{ M}^{-1}$
$r/[\text{Rh}_2(\text{OAc})_4]_{\text{eq}}$	$5010,2 \text{ M}^{-1}$	$5559,8 \text{ M}^{-1}$	$6646,1 \text{ M}^{-1}$	$7638,8 \text{ M}^{-1}$	$8971,5 \text{ M}^{-1}$

TABELA 10 - DADOS PARA A DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE MOLÉCULAS DE $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ E O NÚMERO DE MOLÉCULAS DE PAPAÍNA A 27 °C.

Observação: "r" = parâmetro definido como a "fração de saturação dos sítios da enzima".

[papaína] _{total} = 5,0.10 ⁻⁶ M (5,47.10 ⁻⁶ M para [I] _{total} = 2 e 3.10 ⁻⁵ M)					<K _i > = 1,36.10 ⁻⁴
[Rh ₂ (OAc) ₄] _{total}	2,0.10 ⁻⁵ M	3,0.10 ⁻⁵ M	4,0.10 ⁻⁵ M	5,0.10 ⁻⁵ M	7,0.10 ⁻⁵ M
Ativ.pap.equil.	82,1 %	76,0 %	73,7 %	65,4 %	61,5 %
r	0,122	0,174	0,221	0,262	0,333
1/r	8,158	5,738	4,514	3,816	2,997
[Rh ₂ (OAc) ₄] _{eq}	1,90.10 ⁻⁵ M	2,87.10 ⁻⁵ M	3,87.10 ⁻⁵ M	4,83.10 ⁻⁵ M	6,81.10 ⁻⁵ M
1/[Rh ₂ (OAc) ₄] _{eq}	52573,8M ⁻¹	34858,9M ⁻¹	25839,8M ⁻¹	20716,8M ⁻¹	14689,7M ⁻¹
r/[Rh ₂ (OAc) ₄] _{eq}	6421,0M ⁻¹	6062,7M ⁻¹	5710,6M ⁻¹	5424,4M ⁻¹	4889,8M ⁻¹

TABELA 11 - DADOS PARA A DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE MOLÉCULAS DE Rh₂(OAc)₄ E O NÚMERO DE MOLÉCULAS DE PAPAÍNA A 37 °C.

Observação: "r" = parâmetro definido como a "fração de saturação dos sítios da enzima".

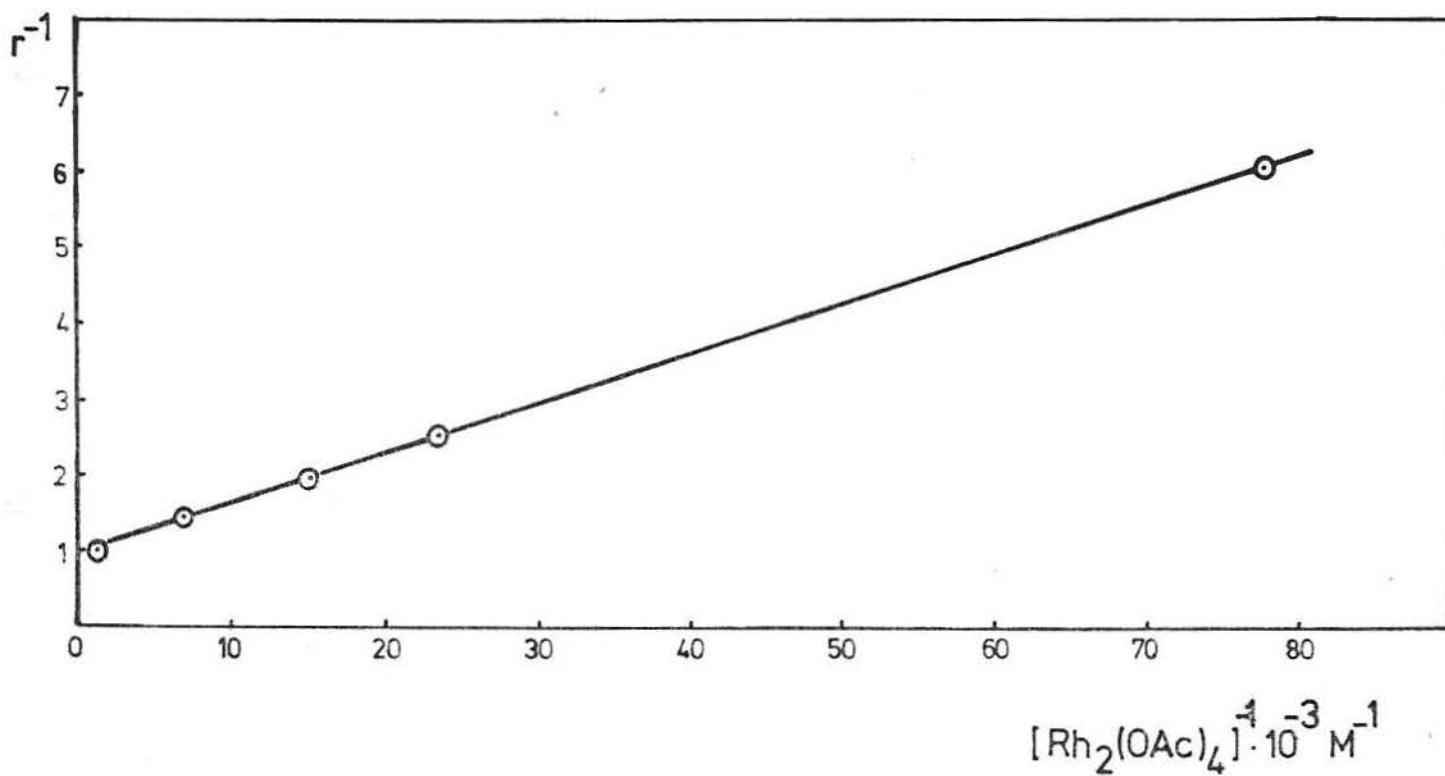


FIGURA 47 - DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE MOLÉCULAS DE $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ E O NÚMERO DE MOLÉCULAS DE PAPAÍNA A 15 °C (MÉTODO DE SCATCHARD).

Observação: "r" = fração de saturação dos sítios da papaína.

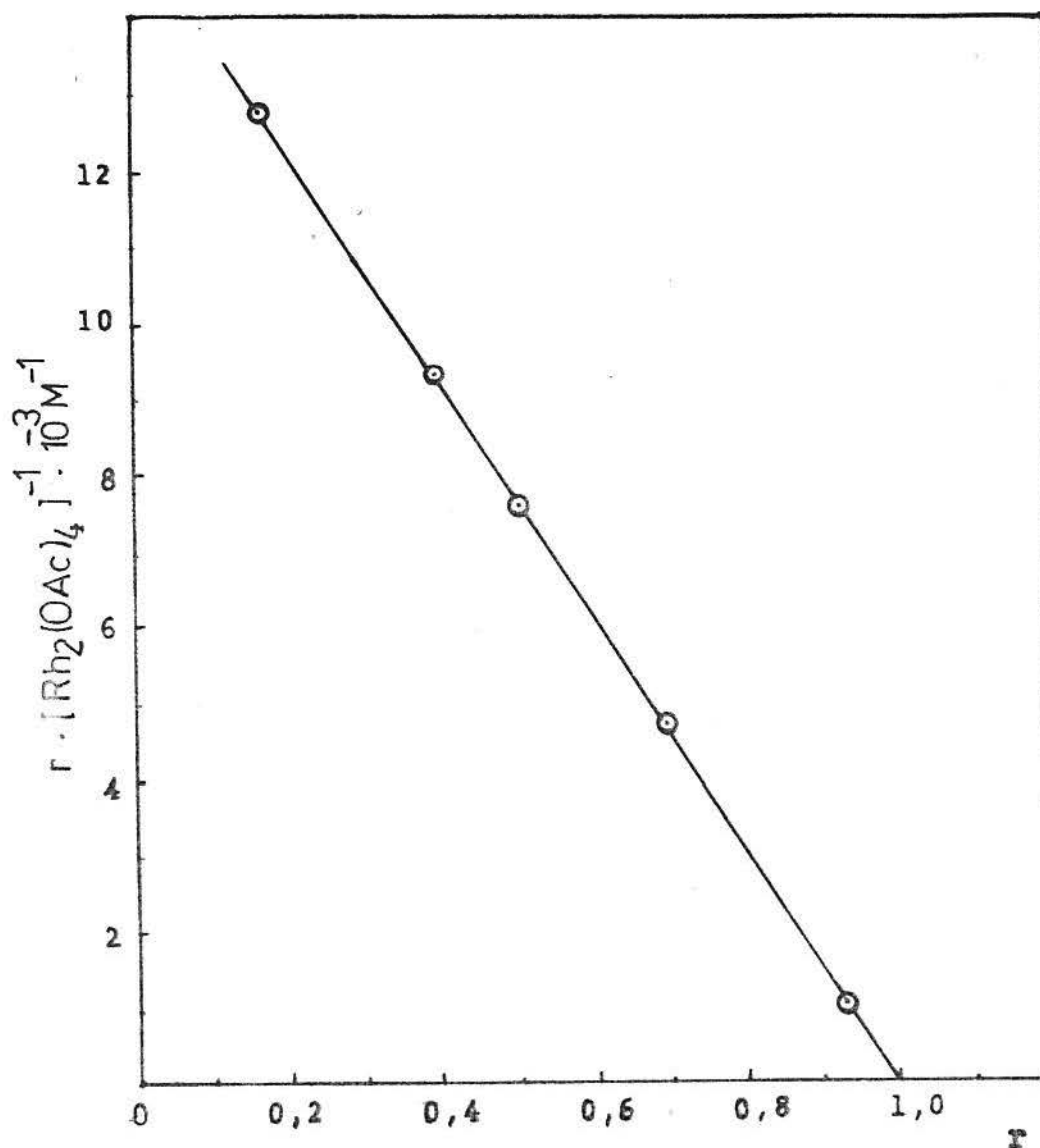


FIGURA 48 - DETERMINAÇÃO GRÁFICA DA RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE MOLÉCULAS DE $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ E O NÚMERO DE MOLÉCULAS DE PAPAÍNA A 15 °C (MÉTODO DE SCATCHARD).

Observação: "r" = fração de saturação dos sítios da papaína.

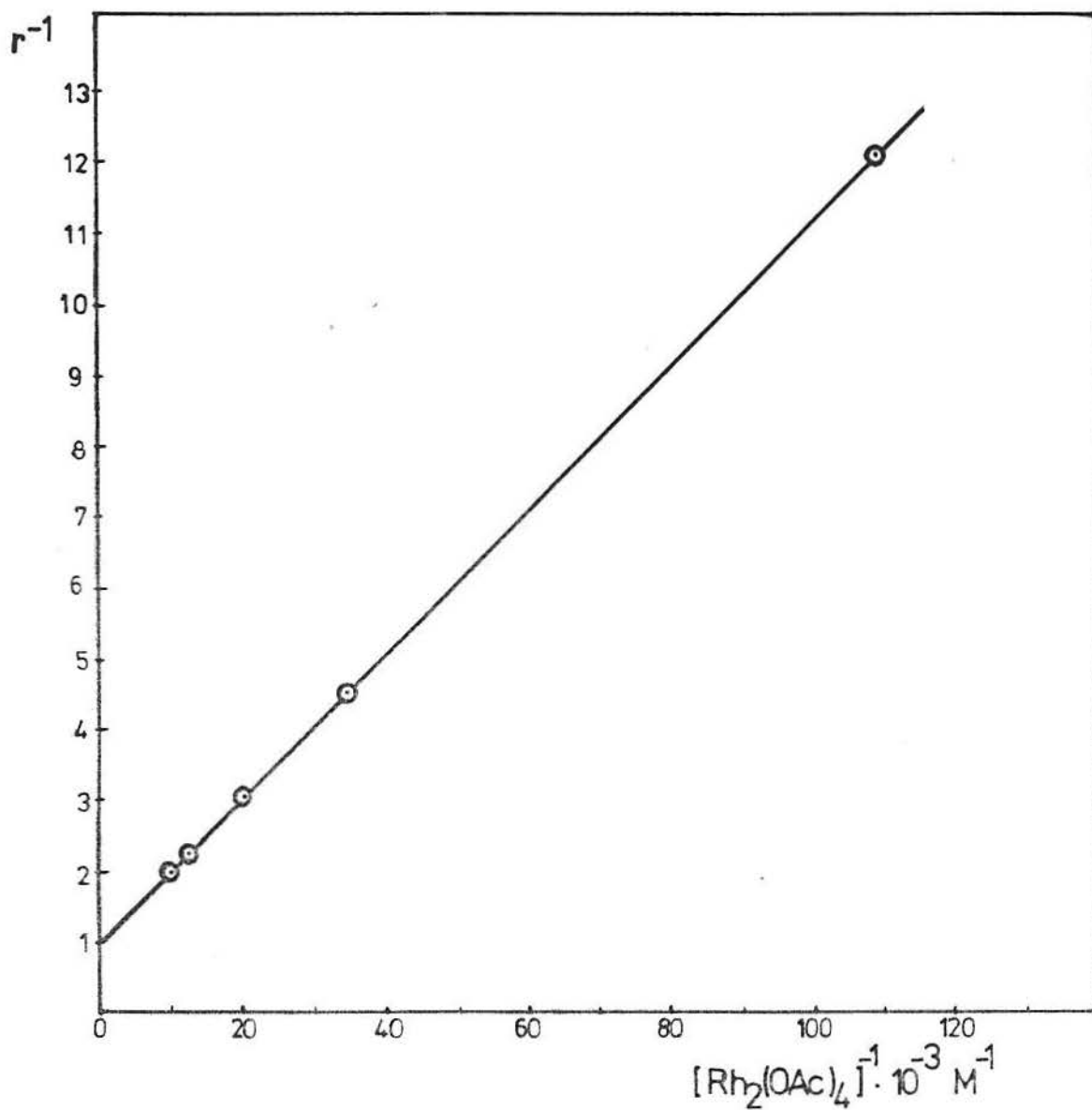


FIGURA 49 - DETERMINAÇÃO GRÁFICA DA RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE MOLECULAS DE $Rh_2(OAc)_4$ E O NÚMERO DE MOLECULAS DE PAPAÍNA A 27 °C (MÉTODO DE SCATCHARD).

Observação: "r" = fração de saturação dos sítios da papaína.

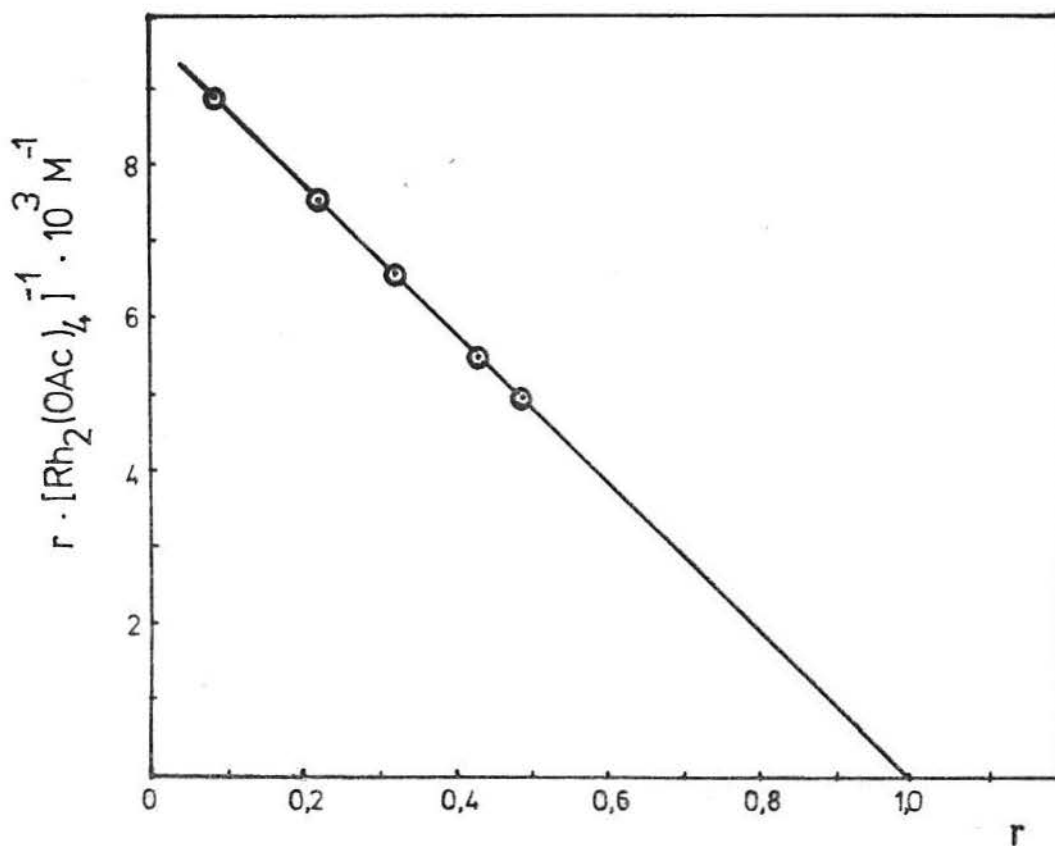


FIGURA 50 - DETERMINAÇÃO GRÁFICA DA RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE MOLÉCULAS DE $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ E O NÚMERO DE MOLÉCULAS DE PAPAÍNA A 27 °C (MÉTODO DE SCATCHARD).

Observação: "r" = fração de saturação dos sítios da papaína.

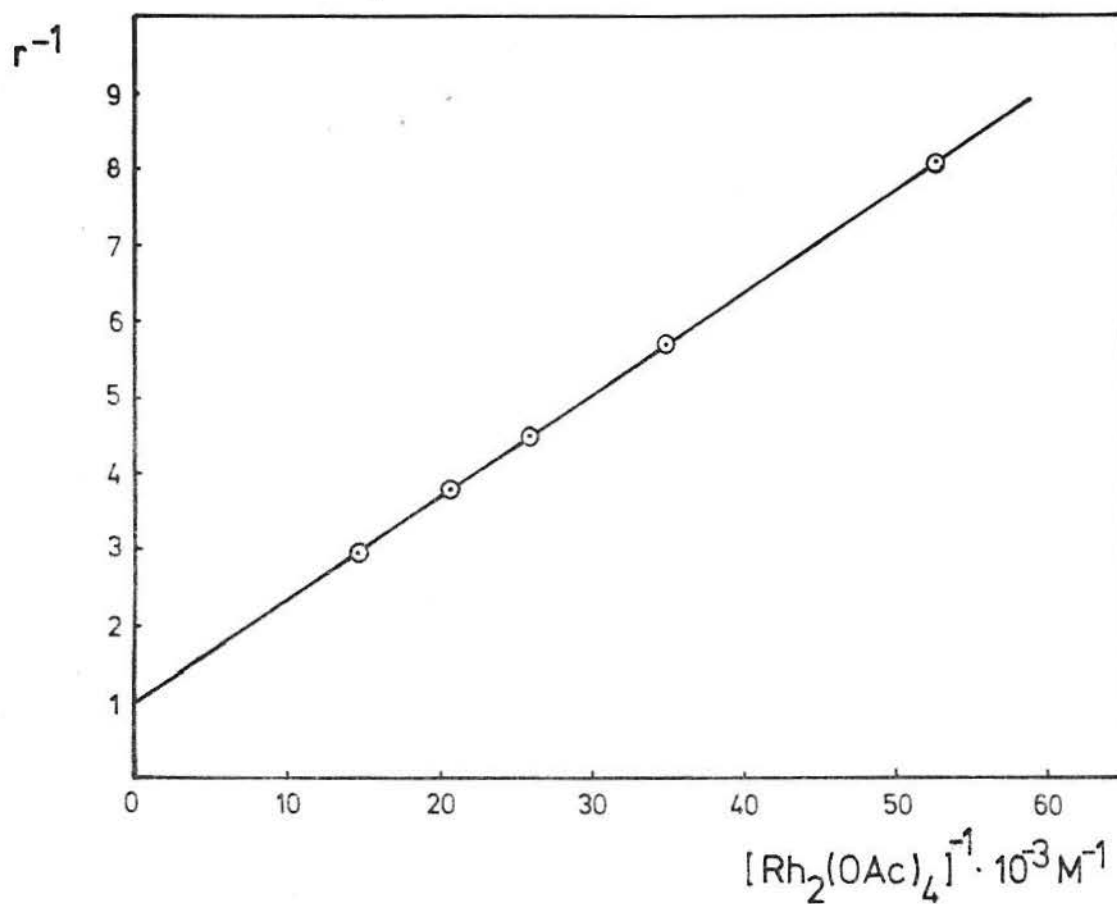


FIGURA 51 - DETERMINAÇÃO GRÁFICA DA RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE MOLÉCULAS DE $Rh_2(OAc)_4$ E O NÚMERO DE MOLÉCULAS DE PAPAÍNA A 37 °C (MÉTODO DE SCATCHARD).

Observação: "r" = fração de saturação dos sítios da papaína.

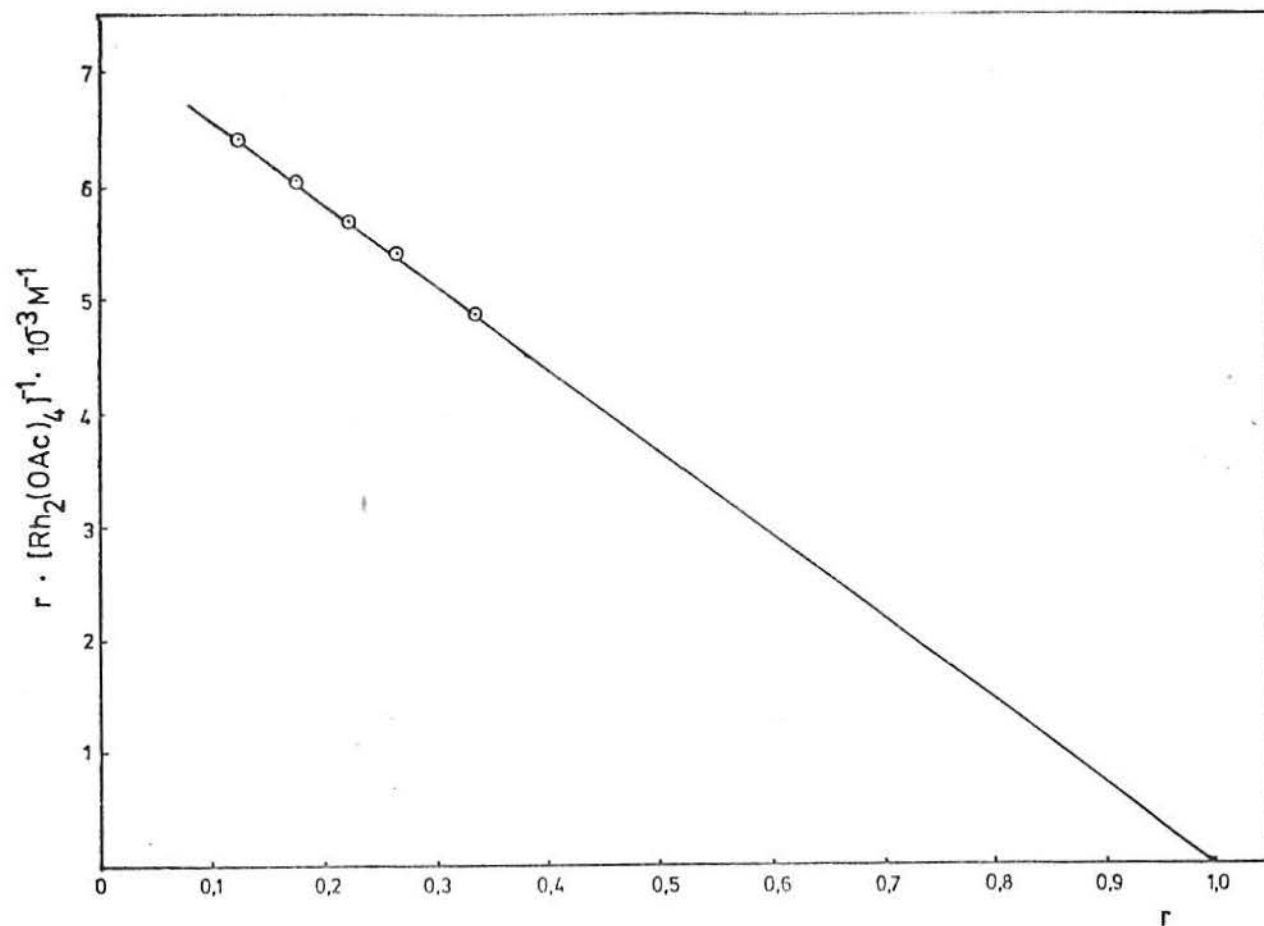


FIGURA 52 - DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O N° DE MOLÉCULAS DE $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ E O N° DE MOLÉCULAS DE PAPAÍNA A 37 °C (MÉTODO DE SCATCHARD).

Observação: "r" = fração de saturação dos sítios da papaína.

3.6 - DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS -SH DA PAPAÍNA INATIVADA

As medidas feitas pelo método de Ellman indicaram a ausência completa de grupos sulfidríla na papaína inativada por tetracetato de ródio (II).

As figuras 53 e 54 mostram os resultados da cromatografia efetuada para selecionar as amostras de papaína inibida isentas do excesso de $Rh_2(O_2CMe)_4$ não-complexado.

Foram feitas duas experiências prévias de eluição em cromatografia, respectivamente com papaína pura e com tetracetato de ródio (II) a fim de determinar as absorvâncias das amostras e compará-las com aquelas da solução de papaína inibida com $Rh_2(OAc)_4$.

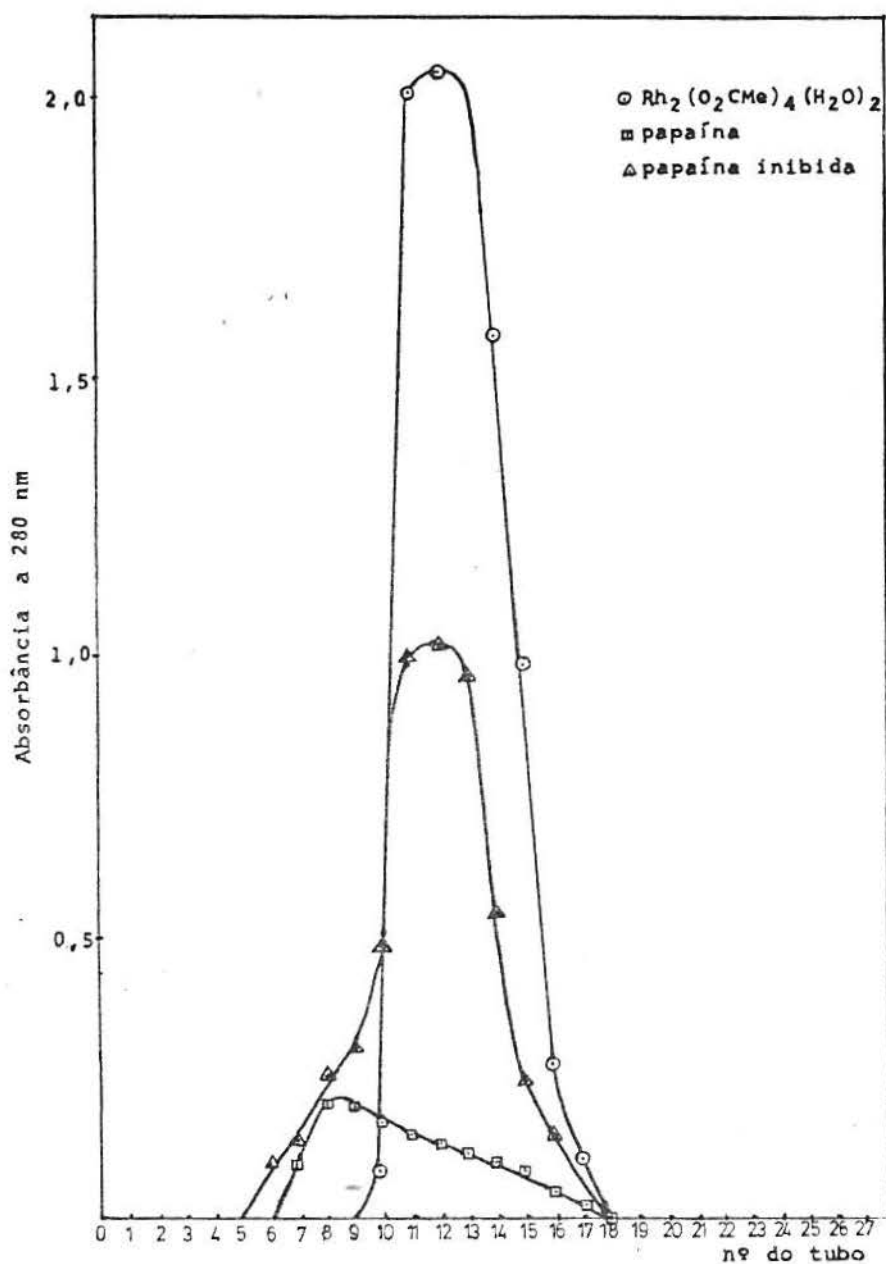


FIGURA 53 - ABSORBÂNCIAS DO TETRACETATO DE RÓDIO (II), DA PAPAÍNA E DA PAPAÍNA INIBIDA COM Rh₂(OAc)₄ ELUÍDOS COM ÁGUA BIDEISTILADA DE UMA COLUNA DE SEPHADEX G-25 FINE (15 X 1,5 cm) A 280 nm.

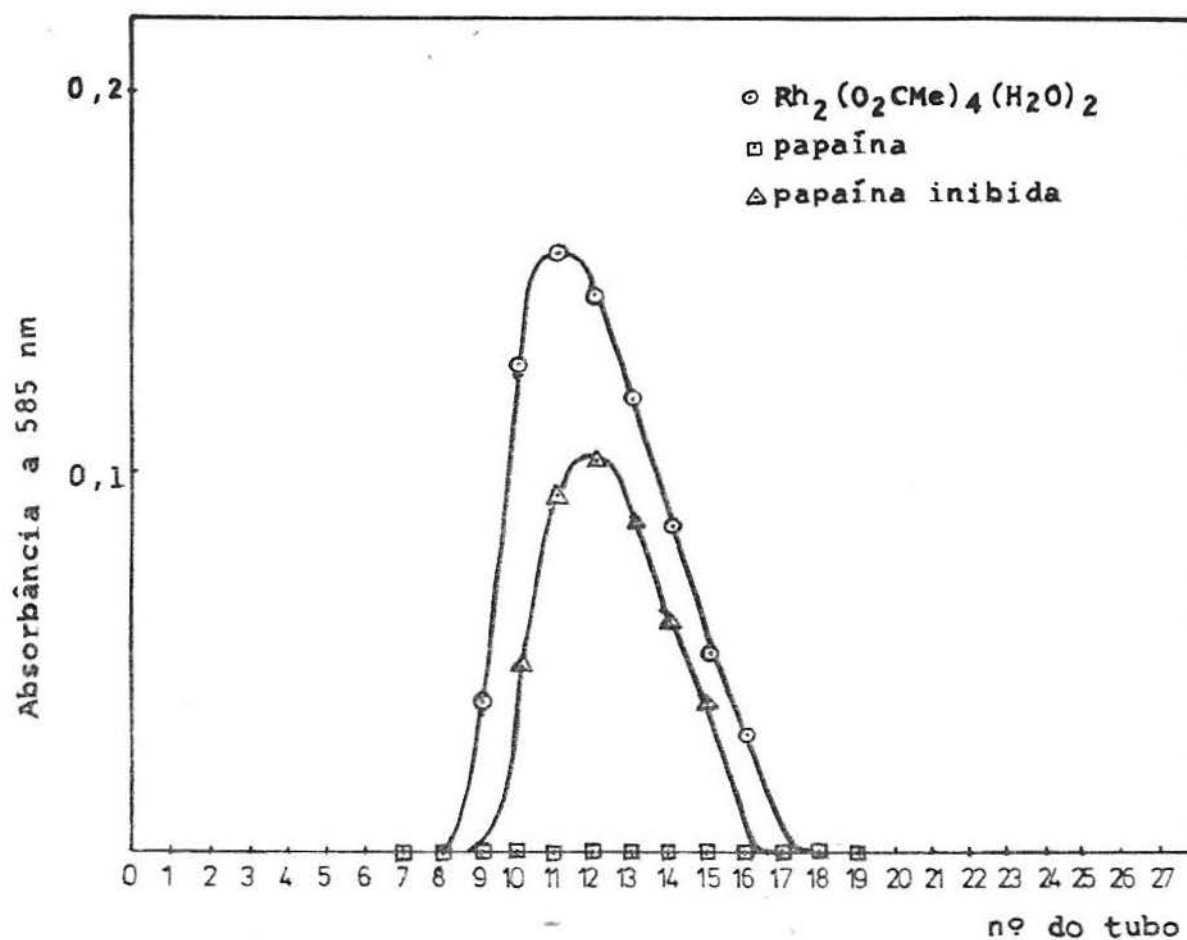


FIGURA 54 - ABSORBÂNCIAS A 585 nm DO TETRACETATO DE RÓDIO (II), DA PAPAÍNA E DA PAPAÍNA INIBIDA COM $Rh_2(O_2CMe)_4$ ELUÍDOS COM ÁGUA BIDEUTILADA DE UMA COLUNA DE SEPHADEX G-25 FINE (15 X 1,5 cm).

3.7 - REATIVAÇÕES DA PAPAÍNA INIBIDA COM $Rh_2(O_2CMe)_4$

Constatou-se que somente alguns complexantes eram capazes de restituir parte da atividade enzimática a 37°C, num máximo de 50%, aproximadamente, do seu valor original e no intervalo de tempo de 30-60 minutos de incubação, decaindo posteriormente.

Os resultados obtidos são mostrados na tabela 12 e nos gráficos das figuras 55, 56 e 57.

Observou-se também que nenhum dos reativadores alterava a atividade da papaína pura a 37°C.

REATIVADOR	RESULTADOS
EDTA	Não ocorreu reativação com nenhuma concentração empregada em qualquer tempo de incubação.
BAL(2,3 dimer-capto 1propanol)	Reativação máxima de 56,7% com concentração $5,0 \cdot 10^{-2}$ molar após incubação de 30 minutos.
DTT(1,4dimer-capto 2,3-butanodiol)	Reativação máxima de 50,0% com concentração $5,0 \cdot 10^{-2}$ molar após incubação de 30 minutos.
Orto-fenantrolina	Não ocorreu reativação com nenhuma concentração empregada em qualquer tempo de incubação.
Mercaptoetanol	Reativação máxima de 50,0% com concentração $5,0 \cdot 10^{-2}$ molar após incubação de 30 minutos.
Acetilacetona	Não ocorreu reativação com nenhuma concentração empregada em qualquer tempo de incubação.

TABELA 12 - REATIVAÇÕES DA PAPAÍNA INATIVADA COM $Rh_2(OAc)_4$ A 37 °C COM DIFERENTES AGENTES QUELANTES.

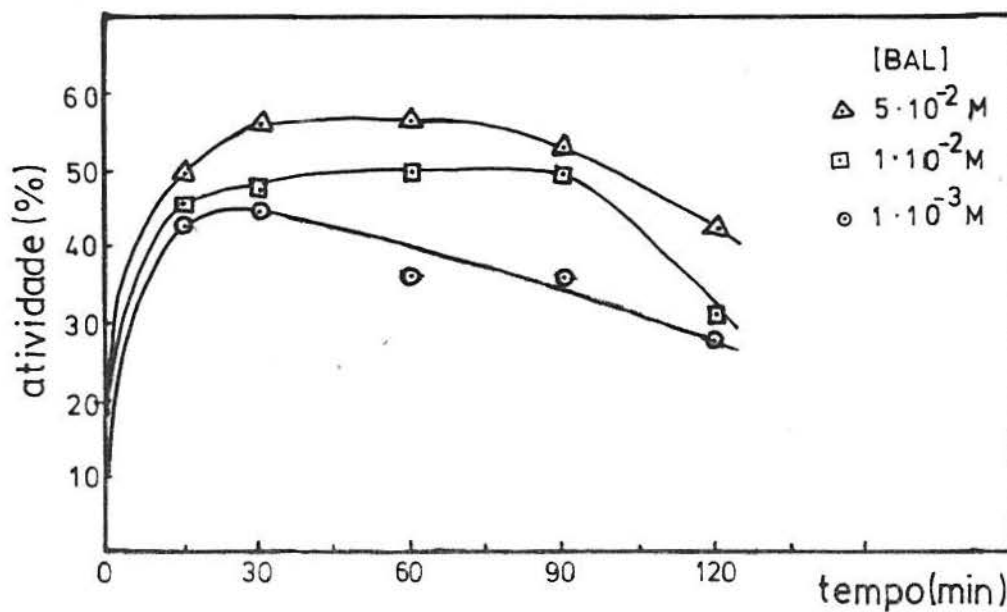


FIGURA 55 - REATIVAÇÃO DA PAPAÍNA ($5,54 \cdot 10^{-6} M$) POR BAL
A $37^{\circ}C$.

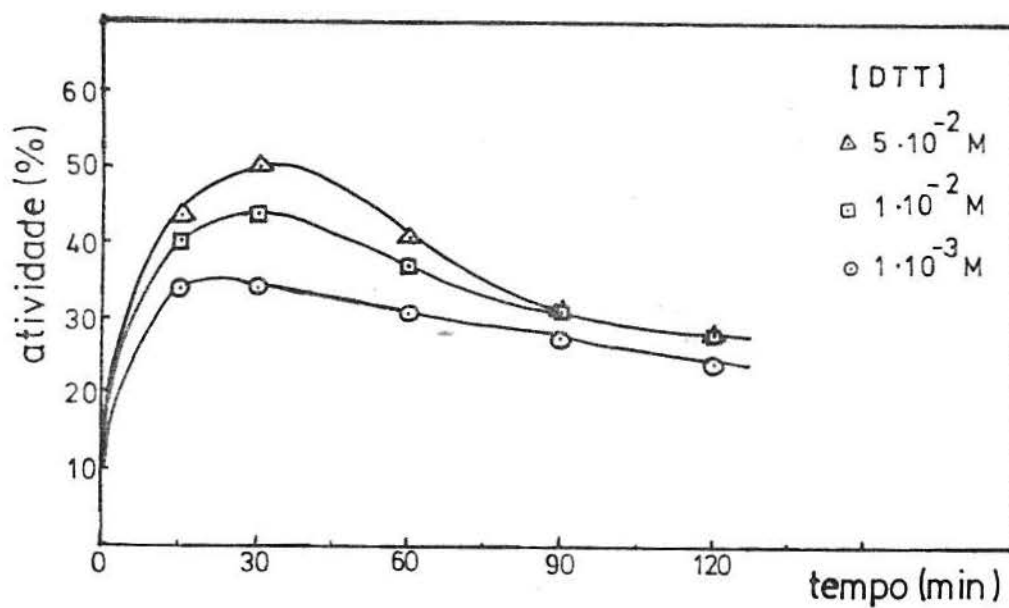


FIGURA 56 - REATIVAÇÃO DA PAPAÍNA ($5,76 \cdot 10^{-6} M$) POR DTT
A $37^{\circ}C$.

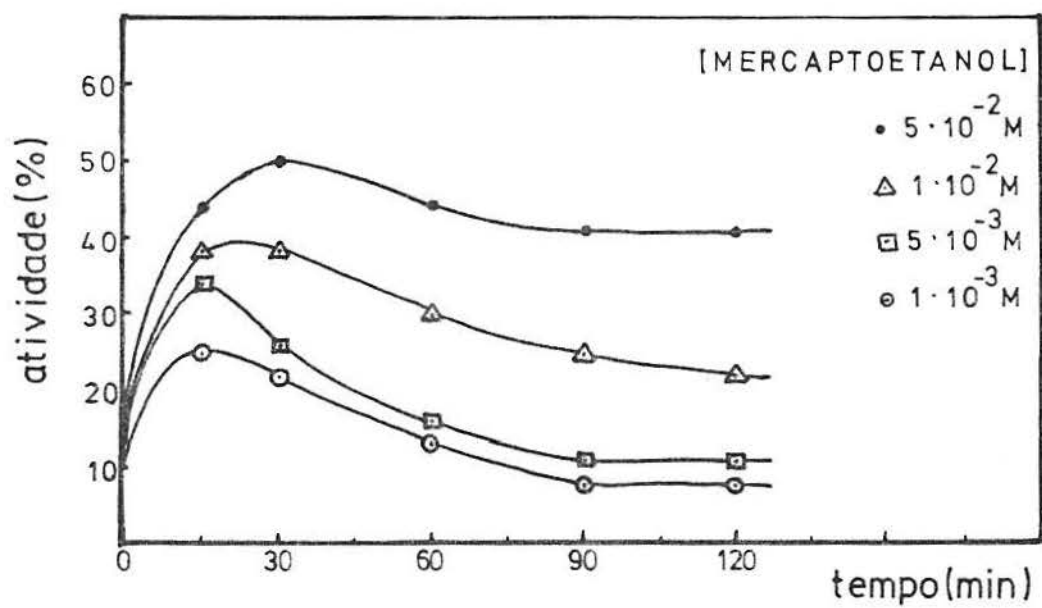


FIGURA 57 - REATIVAÇÃO DA PAPAÍNA ($6,44 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) POR MERCAPTOETANOL A $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

IV - D I S C U S S Ã O

O presente estudo cinético e termodinâmico da inibição da enzima proteolítica papaína pelo tetracetato de ródio (II) diaquo teve como objetivo o esclarecimento da interação "in vitro" deste complexo com uma enzima tiólica.

Conforme mencionado na introdução desse trabalho, a atividade antitumoral e carcinostática do $Rh_2(OAc)_4(H_2O)_2$ está associada ao processo de inativação de enzimas sulfidrílicas existentes no metabolismo celular, através de um mecanismo que ainda permanece pouco conhecido.

O adequado conhecimento da estrutura e das propriedades da papaína, uma enzima contendo o grupo sulfidrílica na região do sítio ativo, ofereceu uma alternativa, inexplorada na literatura até o momento, para uma investigação molecular do processo inibitório causado pelo tetracetato de ródio (II).

4.1 - PARÂMETROS CINÉTICOS DA PAPAÍNA

Os valores obtidos para os parâmetros cinéticos K_m , $V_{máx}$ e k_{cat} (Tabela 5) relativos ao substrato BAEE apresentam boa concordância com os valores da literatura (SMITH e PARKER, 1958 ; WHITAKER e BENDER, 1965). Pequenas diferenças podem ser justificadas pelas condições do meio reacional : pH, natureza do tampão, temperatura e força iônica.

A obtenção desses valores foi feita pela média dos resultados dos três métodos gráficos empregados : HANES, LINEWEAVER-BURK e EADIE-HOFSTEE, admitindo igual confiabilidade a cada um.

4.2 - CARACTERÍSTICAS DA INIBIÇÃO

A inibição da papaína por tetracetato de ródio (II) pode ser classificada como um processo competitivo, de acordo com os resultados gráficos dos três métodos utilizados e mostrados nas figuras de nº 21 a 38. Esse caráter competitivo mantém-se nas seis temperaturas estudadas.

A energia de ativação da reação da papaína com o complexo $Rh_2(OAc)_4(H_2O)_2$ foi determinada em condições onde há uma cinética de pseudo-primeira ordem e apresenta um valor relativamente baixo, correspondendo, essencialmente, à energia necessária para a ruptura das ligações axiais entre as duas moléculas de água e o centro intermetálico Rh-Rh.

O período de meia-vida da inativação, determinado para as condições citadas anteriormente, aproxima-se de vinte minutos, tempo justificado pelas características estereoquímicas da inibição, que serão discutidas mais adiante.

Através dos resultados experimentais obtidos em nosso trabalho, consubstanciados com os dados da literatura, reunimos várias evidências que permitem considerar a inativação da papaína pelo tetracetato de ródio (II) como um processo de fixação de uma única molécula do complexo na região do sítio ativo da enzima, especificamente ligada ao átomo de enxofre desprotonado do grupo sulfidril da Cis-25 e ao átomo de nitrogênio-N₁ do grupo imidazol da His-159 (Figura 58).

Estas evidências são enumeradas a seguir :

1) A inibição competitiva corresponde a uma situação na qual o inibidor e o substrato ligam-se no mesmo sítio da enzima. Conforme mencionado no item 1.3.3.3, o sítio ativo da papaína contém o grupo -SH livre do resíduo de Cis-25 a uma distância de 0,34 nm do átomo de nitrogênio-N₁ do grupo imidazol do resíduo de His-159 (Figura 10-b).

Esses grupos citados, segundo ALLEN e col. (1978), estão essencialmente envolvidos no mecanismo de ação da papaína sobre um substrato éster como o BAEE, conforme é mostrado na figura 13. Assim, os mesmos referidos grupos devem também participar do mecanismo de inibição da proteína pelo tetracetato de ródio (II).

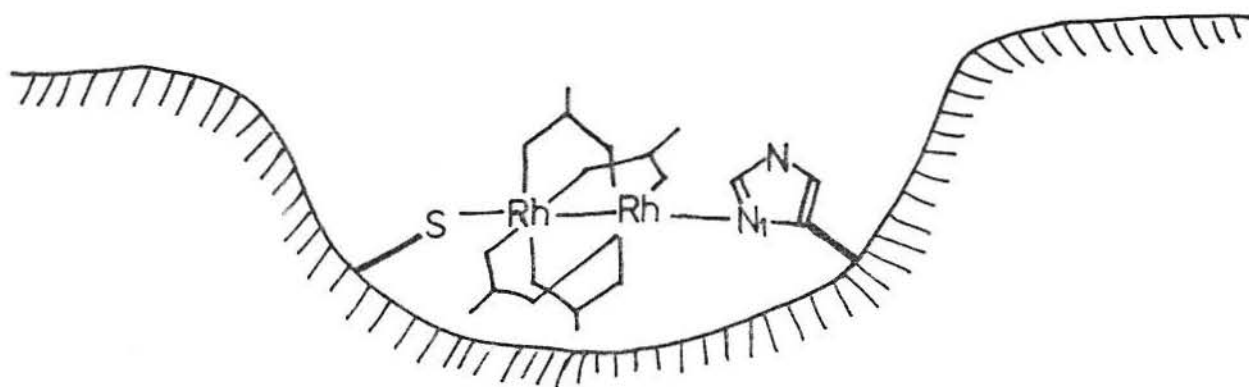


FIGURA 58 - PROVÁVEL SITUAÇÃO PARA A COMPLEXAÇÃO DO TETRACETATO DE RÓDIO (II) NO SÍTIO ATIVO DA PAPAÍNA, SEGUNDO ESTE TRABALHO.

2) Após a completa inibição da enzima com o tetracetato de ródio (II) não resta nenhum grupo -SH livre (item 3.6), indicando o envolvimento da sulfidrila no processo inibitório.

3) A reativação parcial da papaína inativada com o complexo $Rh_2(OAc)_4$ foi possível somente com agentes quelantes sulfidrílicos (item 3.7), demonstrando a grande afinidade do tetracetato de ródio (II) pelo grupo -SH.

4) A inativação enzimática ocorre na proporção de uma molécula do complexo $Rh_2(OAc)_4$ para cada molécula de papaína (item 3.5), fato que pode ser explicado, entre outros aspectos, pelas dimensões da região envolvida do sítio ativo da enzima (0,34 nm, conforme a figura 10-b) e pelas dimensões do carboxilato de ródio (0,238 nm, conforme a Tabela 2), considerando, no último caso, a distância Rh-Rh e admitindo ligação através das posições axiais.

5) Segundo APPLETON e col. (1973), considerando o sistema $Rh_2(OAc)_4$, a presença de um ligante axial do tipo H_2O (fraco σ -doador e fraco π -receptor) origina uma fraca ligação com o centro intermetálico e permite, neste caso, uma ligação Rh-Rh curta e muito forte.

A substituição da água por grupos ligantes axiais por tadores de átomos de enxofre (como o -SH da Cis-25) ou nitrogênio (como o N_1 do grupo imidazol da His-159) enfraquece a ligação metal-metal, enquanto, ao contrário, intensifica a ligação metal-ligante, conforme se pode interpretar a partir dos trabalhos de APPLETON e col. (1973) e de MOSZNER e col. (1984). Tais dados justificam a especificidade do complexo pela região do sítio ativo da papaína.

6) HOWARD et al. (1977) relataram a ação antitumoral e carcinostática dos carboxilatos de ródio (II) e interpretaram o efeito através de um mecanismo de inibição da síntese de DNA e de proteínas nas células do tumor. Grupos contendo átomos de nitrogênio e grupos sulfidrílicos existentes nos substratos orgânicos seriam possíveis sítios ligantes.

RAINEM e col. (1975) relataram a coordenação dos carboxilatos de ródio (II) ao nitrogênio do sistema 5' monofosfato de adenosina.

BEAR e DAS (1976) estudaram adutos de $Rh_2(OAc)_4$ com imidazol e histidina, enquanto AOKI e YAMAZAKI (1980) investigaram as estruturas dos adutos do tetracetato de ródio (II) com teofilina e cafeína, todos indicando ligações com átomos de nitrogênio.

PNEUMATIKAKIS e PSAROULIS (1980) relataram interações do complexo $Rh_2(OAc)_4$ com tioéter-aminoácidos efetuadas através de uma ligação axial com o enxofre. Relataram, também, uma coordenação axial bidentada no tetracetato de ródio (II) através dos átomos de enxofre e nitrogênio desses ligantes.

7) O processo de inibição, a cada temperatura, depende do tempo de incubação da papaína com o tetracetato de ródio (II) e também da concentração do inibidor (item 3.1.2), sugerindo dificuldades estéricas no processo de fixação do complexo no sítio ativo da enzima. Essas dificuldades são compatíveis com as considerações anteriores: uma única molécula de inibidor, volumosa, devidamente orientada e competindo por uma específica região do sítio ativo da proteína.

4.3 - PARÂMETROS TERMODINÂMICOS

O tetracetato de ródio (II) comporta-se como um inibidor competitivo, não se alterando este caráter em todo o intervalo de temperatura investigado.

O gráfico da Figura 46 não considerou os dados obtidos na temperatura de 40 °C, cujas coordenadas afastam-

se da linearidade encontrada para as outras temperaturas. Interpretamos tal desvio como decorrência de alterações na estrutura protéica capazes de modificar o processo de inibição nessa temperatura relativamente alta.

LINEWEAVER e SCHWIMMER (1941) observaram uma rápida e irreversível inativação da papaína acima de 40 °C e pH menor do que 4,0. No presente caso, mesmo mantendo-se o pH em torno de 6,0, não está excluída a possibilidade de modificações na posição de alguns resíduos de aminoácidos. Este fato, embora não acarretando desnaturação da proteína, pode afetar a sua reatividade a 40 °C.

Obtiveram-se valores negativos para todos os parâmetros termodinâmicos, o que leva a concluir que a energia livre de inativação (ΔG°), isto é, a espontaneidade do processo resulta unicamente da elevada contribuição entálpica ($\Delta H^{\circ} = -5,69$ kcal).

A entalpia dessa reação pode ser considerada como a soma algébrica das seguintes parcelas :

- 1) A retirada do próton do grupo sulfidrila previamente à ligação do inibidor ao sítio ativo é um processo endotérmico ($\Delta H_1^{\circ} > 0$).
- 2) A saída das moléculas de água unidas axialmente ao centro Rh-Rh anteriormente à fixação do tetracetato sobre o enxofre da Cis-25 e sobre o nitrogênio da His-159 é também um processo endotérmico ($\Delta H_2^{\circ} > 0$).
- 3) Por fim, a complexação do sistema intermetálico com o átomo de enxofre do grupo sulfidrila e com o átomo de nitrogênio-N₁ do grupo imidazol na região do sítio ativo da papaína é altamente exotérmica ($\Delta H_3^{\circ} < 0$).

O resultado do balanço energético fornece um ΔH° bastante negativo.

Por outro lado, a contribuição entrópica é negativa, o que pode ser interpretado pelos seguintes fatos :

- 1) O inibidor não tem carga elétrica líquida e, além disso, sua molécula apresenta uma hidrofobicidade superficial, o que garante sua não-solvatação no meio solvente.

- 2) O processo de fixação do tetracetato de ródio (II) sobre a enzima reduz a entropia translacional do sistema em três graus de liberdade, o que ainda é posteriormente acentuado pela diminuição dos movimentos de flexibilidade dos resíduos de aminoácidos da papaína próximos ao sítio ativo em função da entrada do inibidor no sulco que o contém.
- 3) Um pequeno aumento de entropia é provocado pela passagem ao meio solvente do próton destacado do grupo -SH da cisteína-25. Este acréscimo, entretanto, não chega a ter valor apreciável, porquanto a formação do íon hidrônio resulta em posterior organização da água em sua vizinhança.
- 4) Ocorre também um pequeno aumento de entropia por modificação no arranjo das moléculas de água ao redor do complexo $Rh_2(OAc)_4$ previamente a sua ligação à enzima. Em solução aquosa, a molécula hidrofóbica do complexo está envolvida por camadas de moléculas de água, organizadas de forma semelhante ao gelo. A fixação do tetracetato no sítio ativo da papaína desorganiza esse arranjo.

Resumindo, o balanço entrópico resulta em um $\Delta S^\circ'$ negativo, representando um fator desfavorável à espontaneidade da reação de inativação enzimática, a qual é garantida pela elevada contribuição entálpica.

4.4 - INFLUÊNCIA DA FORÇA IÔNICA

A inibição da papaína por cátions divalentes (LEONARDI, 1988) está relacionada com a força iônica do meio reacional. Estes cátions, por serem espécies carregadas eletricamente, têm sua ação inibitória bastante atenuada com o aumento da força iônica, por efeito da diminuição dos respectivos coeficientes de atividade.

Como a molécula do tetracetato de ródio (II) não tem carga elétrica líquida e é superficialmente hidrofóbica, meios com diferentes forças iônicas (variando de 0,1 até 0,4) não causaram alterações no processo de inibição da papaína, conforme o esperado.

4.5 - REATIVAÇÕES

A reativação da enzima, tendo sido obtida exclusivamente com agentes quelantes tiólicos, consiste numa importante evidência experimental da especificidade do tetracetato de ródio (II) pelo grupo -SH, justificando nossas interpretações anteriores a respeito do processo de fixação desse complexo na papaína.

A necessidade de um tempo relativamente longo (30 a 60 minutos) para a incubação e de uma concentração relativamente alta de complexante são fatores coerentes com uma reação que apresenta dificuldades em vista da estereoquímica da inibição e da estabilidade da ligação inibidor-enzima.

O máximo valor de 50% de reativação encontrado pode ser correlacionado com uma possível alteração na estrutura do sítio ativo da papaína verificada após a retirada do $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ pelo complexante sulfidrílico. Essa modificação estrutural irreversível provocada pela saída do tetracetato de ródio (II) acentua-se com o tempo, como demonstra a diminuição da atividade enzimática depois de atingir seu valor máximo.

V - C O N C L U S Ã O

A inibição da enzima tiólica papaína (E.C.3.4.22.2) pelo complexo tetracetato de ródio (II) diaquo foi estudada sob o ponto de vista cinético e termodinâmico, permitindo a obtenção das seguintes conclusões :

- 1) A inibição é do tipo competitivo no intervalo de temperatura de 15, 0C a 40,0C, conforme demonstram os métodos de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee e Hanes.
- 2) O processo de inativação está correlacionado com a temperatura do sistema, com a concentração do tetracetato de ródio (II) diaquo e com o tempo de reação, sendo independente da força iônica do meio reacional.
- 3) Somente uma molécula do complexo $Rh_2(OAc)_4$, devidamente orientada, fixa-se no sítio ativo da papaína, ligando-se axialmente ao átomo de enxofre desprotonado do grupo sulfidrila da Cis-25 de um lado e, no outro lado, ao átomo de nitrogênio-N₁ do grupo imidazol da His-159, provavelmente e em substituição das duas moléculas de água. Não há grupos -SH livres na enzima inativa.
- 4) A atividade da papaína após completa inibição com o tetracetato de ródio (II) é recuperável parcialmente, num máximo de 50%, somente pela ação de complexantes sulfidrílicos e após tempos de reação compreendidos entre 30 e 60 minutos. Essa atividade diminui com o tempo, sugerindo prováveis alterações na estrutura do sítio ativo da enzima após a retirada do $Rh_2(OAc)_4$.
- 5) A espontaneidade ($\Delta G^{\circ} < 0$) da reação de complexação do tetracetato de ródio (II) diaquo com a papaína está baseada no fator entálpico ($\Delta H^{\circ} < 0$) do processo de interação do complexo com os ligantes do sítio ativo da enzima e a subsequente formação de ligações mais estáveis, pois a contribuição entrópica, considerando a soma das várias etapas envolvidas, é desfavorável ($\Delta S^{\circ} < 0$).

VI - SUGESTÕES PARA NOVOS TRABALHOS

O estudo da inibição da papaína com o complexo tetracetato de ródio (II) diaquo poderia ser ampliado através de análises espectroscópicas adequadas, como, por exemplo, a espectroscopia Raman, inacessível durante a realização desta pesquisa.

Seria possível, dessa forma, obter pormenores relativos ao processo de fixação da molécula do complexo $Rh_2(OAc)_4(H_2O)_2$ na região do sítio ativo da enzima.

Uma investigação cinética e termodinâmica semelhante para a interação da papaína com outros carboxilatos de ródio (II) (como, por exemplo: formiato, propionato, butanoato, etc.) permitiria um estudo comparativo com o nosso trabalho, capaz de contribuir para o fortalecimento e/ou maior esclarecimento de algumas de nossas conclusões.

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

ADAIR, G.S.- The oxygen dissociation curve of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 63, p. 529, 1925.

ALECIO, M.R.; DANN, M.L.; LOWE, G.-The specificity of the S₁ subsite of papain. *J. Biochem.*, v. 141, p. 495, 1974.

ALLEN, K.G.D.; STEWART, J.A.; JOHNSON, P.E.; LAUFER, D.G.W. - Identification of the functional ionic groups of papain by pH/rate profile. *J. Biochem. Analysis Eur.*, v. 87, p. 575, 1978.

AOKI, K.; YAMAZAKI, H.-Interactions of tetrakis(η -carboxylato)dirhodium(II), an antitumor agent, with nucleic acid bases. X-ray crystal structures of [Rh₂(acetato)₄(theophylline)₂] and [Rh₂(acetato)₄(caffeine)₂]. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, p. 186, 1980.

APPLETON, T.G.; CLARK, H.C.; MANZER, L.E.-Trans-influence. Its measurement and significance. *Coord. Chem. Rev.*, v. 10, p. 335, 1973.

ARNON, R.- Papain. *Methods in Enzymology*, v. 29, p. 226, 1970.

BALLS, A.K.; LINEWEAVER, H.; THOMPSON, R.R.-The proteolytic systems of papain. *Science*, v. 86, p. 379, 1937.

BALLS, A.K.; LINEWEAVER, H.-Isolation and properties of crystalline papain. *J. Biol. Chem.*, v. 130, p. 669, 1939.

BAREL, A.O.; GLAZER, A.N.-Isolation and characterization of fig lysosyme. *J. Biol. Chem.*, v. 244, p. 3583, 1969.

BARRET, A.J.; DAVIS, M.E.; GRUBH, A.-The place of human Υ -trace (cystatin C) amongs the cysteine proteainase inhibitors. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v.120, p.631, 1984.

BASILIO, C.A.; SIMÕES, A.A.-Purification of chymopapains A and B and a low molecular weight inhibitor present in *Carica papaya* latex. *Arq.Biol.Tecnol.*, v.30, p.49, 1987.

BEAR, J.L.; GRAY Jr., H.B.; RAINEM, L.; CHANG, I.M.; HOWARD, R. ; SERIO, G.; KIMBALL, A.P.-Interation of rhodium(II) carboxylates with molecules of biologic importance. *Cancer Chemoter.Rep.*, v.59, p.611, 1975.

BEAR, J.L.; KITCHENS, J.; WILCOTT III, M.R.-Kinetic study of the reaction of rhodium (II) acetate with trifluoroacetic acid. *J.Inorg.Nucl.Chem.*, v.33, p.3479, 1971

BERGER, A.; SCHECHTER, I.-Mapping of the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors. *Phil.Trans.Roy.Soc.London Ser.*, v.257, p.249, 1970.

BLUMBERG, S.; SCHECHTER, I.; BERGER, A.-A novel reactivity of papain and a convenient active site titration in the presence of other thiols. *Eur.J.Biochem.*, v.15, p.97, 1970.

BROCKLEHURST, K.; LITTLE, G.-Reactivities of the various protonic states in the reactions of papain and L-cysteine with 2,2'-and with 4,4'-dipyridyl disulphide. *J.Biochem.*, v.128, p.471, 1972.

BROCKLEHURST, K.; LITTLE, G.-Reactions of papain and low molecular weight thiols with some aromatic disulphides. 2,2'-dipyridyl disulphide as a convenient active-site titrant for papain even in the presence of other thiols. *J.Biochem.*, v.133, p.67, 1973.

- BURK, D. E.; LENOIS, S. D.; SHAFER, J. A. - A two-step procedure for purification of papain from extract of papaya latex. *Arch. Biophys. Biochem.*, v. 164, p. 30, 1974.
- CHERNYAEV, I. I.; SHENDERETSKAYA, E. V.; NAZAROVA, L. A. ; ANTSYSHKINA, A. S. - Abstracts, International Conference on Coordination Chemistry, Stockholm, v. 7, 1962.
- CHRISTOPH, G. G.; KOH, Y. B. - Metal-metal bonding in dirhodium tetracarboxylates. Trans influence and dependence of the Rh-Rh bond distance upon the nature of the axial ligands. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 101, p. 1422, 1979.
- COLOWICK, S. P.; WOMACK, F. C. - Binding of diffusible molecules by macromolecules measurement by rate of dialysis. *J. Biol. Chem.*, v. 244, p. 774, 1969.
- COTTON, F. A.; CURTIS, N. F.; HARRIS, C. B.; JOHNSON, B. F. G. ; LIPPARD, S. J.; MAGUE, J. T.; ROBINSON, W. R.; WOOD, J. W. - Mononuclear and polynuclear chemistry of rhenium(III): its pronounced homophilicity. *Science (Wash. D. C.)*, v. 145, p. 1305, 1964.
- COTTON, F. A.; DEBOER, B. G.; LAPRADE, M. D.; PIPAL, J. R.; UCKO, D. A. Crystal and molecular structures of dichromium tetraacetate dihydrate and dirhodium tetraacetate dihydrate. *Acta Cryst., Sect. B*, v. 27, p. 1664, 1971.
- COTTON, F. A.; WILKINSON, G. - *Advanced Inorganic Chemistry* N.Y.: J. Wiley and Sons, 1988. p. 913.
- CREIGHTON, D. J.; SCHAMPS, D. J. - Solvent isotope effects on tautomerization equilibria of papain and model thiolamines. *Febs. Letters*, v. 110, n. 2, p. 313, 1980.
- DAS, K.; SIMMONS, E. L.; BEAR, J. L. - Thermodynamics and kinetics of some tetra- μ -carboxylatodirhodium(II) adduct formation reactions. *Inorg. Chem.*, v. 16, p. 1268, 1977.

- DICK, Y. P.; LEONARDI, S. M. - The binding of heavy metals by papain: a kinetic study. *Arq. Biol. Tecnol.*, v. 29, n. 1, p. 100, 1986.
- DIXON, M.; WEBB, M. J. - *Enzymes*. London: Longman Green, 1979. p. 47.
- DRENTH, J.; JANSONIUS, J. N.; KOEKOEK, R.; SLUYTERMAN, L. A. A.; WALTHERS, B. G. - Cysteine Proteinase. *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, v. 257, p. 231, 1970.
- DRENTH, J.; JANSONIUS, J. N.; KOEKOEK, R.; SWEN, H. M.; WALTHERS, B. G. - Structure of papain. *Nature*, v. 218, p. 929, 1968.
- DRENTH, J.; JANSONIUS, J. N.; KOEKOEK, R.; WALTHERS, B. G. - Papain, X-ray structure. *The Enzymes* N. Y.: P. D. Boyer, Academic Press, 1971. v. 3, p. 485.
- DRENTH, J.; JANSONIUS, J. N.; WALTHERS, B. G. - The crystal structure of papain. *J. Mol. Biol.*, v. 24, p. 449, 1967.
- DRENTH, J.; KALK, K. H.; SWEN, H. M. - Binding of chloromethyl ketone substrate analogs to crystalline papain. *Biochemistry*, v. 15, p. 3731, 1976.
- DRENTH, J.; SWEN, H. M.; HOOGENSTRAATEN, W. - A mechanism of papain action. *J. Pharm. Sci.*, v. 58, p. 491, 1960.
- DUBICKI, L.; MARTIN, R. L. - The metal-metal bond in binuclear rhodium(II) acetate monohydrate. *Inorg. Chem.*, v. 9, p. 673, 1970.
- ELLMAN, G. L. - Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 82, p. 70, 1959.

- FELTHOUSE, T.R.-The chemistry, structure and metal-metal bonding in compounds of rhodium(II). *Progress in Inorg. Chem.*, v.29, p.73, 1982.
- FINKLE, B.J.; SMITH, E.L.-Crystalline papain: number and reactivity of thiol groups, chromatographic behavior. *J. Biol. Chem.*, v.230, p.669, 1958.
- FOLIN and FARMER-Micro-Kjedahl method principle. *J. Biol. Chem.*, v.11, p.493, 1912.
- FRUTTON, J.S.-Proteases and biological control. *Cold Spring Harbour Conferences on Cell Proliferation*, v.2, p.33, 1975.
- FRUTTON, J.S. *The Enzymes*. N.Y.: P.D. Boyer ed., 1960. p.233.
- FUJIMOTO, S.; NAKAGAWA, T.; OSHIMITSU, S.; OHARA, A.-On the mechanism of inactivation of papain by bisulfite. *Chem. Pharm. Bull.*, v.31, n.3, p.992, 1983.
- GLAZER, A.N.; SMITH, E.L.-Effect of denaturation on the ultraviolet absorption spectra of proteins. *J. Biol. Chem.*, v.235, p.43, 1960.
- GLAZER, A.N.; SMITH, E.L.-The sulfur distribution of papain. *J. Biol. Chem.*, v.240, p.201, 1965.
- GLAZER, A.N.; SMITH, E.L.-Papain and other plant sulfhydryl proteolytic enzymes. *The Enzymes*. N.Y.: P.D. Boyer ed., 1971. v.3, p.501.
- GUNDLACH, G.; TUBA, F.-Use of reporter groups in structure-function studies of proteins. *J. Biochem.*, v.342, p.303, 1965.
- HALL, L.M.; SPEER, R.J.; RIDGWAY, H.J.-Synthesis and anti-tumor activity of certain rhodium(II) carboxylates. *J. Clin. Hematol. Oncol.*, v.10, p.25, 1980.

- HAWK, P. B. ; OSER, B. L. ; SUMMERSON, W. H. - *Practical Physiological Chemistry*. N.Y.: The Blakiston Co. Inc., 1954. p. 141.
- HILL, A. V. - *J. Physiol. London*, v. 40, p. 4, 1910.
- HOWARD, R. A. ; RAO, P. N. ; SMITH, M. L. ; PATHAK, S. ; BEAR, J. L. - Rhodium(II) butyrate: a potential anticancer drug with cell cycle phase-specific effects in Hela cells. *Curr. Chemother. Infect. Dis., Proc. Int. Congr. Chemother., Wash. D.C.*, p. 1627, 1979.
- HOWARD, R. A. ; SHERWOOD, E. ; ERCK, A. ; KIMBALL, A. P. ; BEAR, J. L. - Hydrophobicity of several rhodium(II) carboxylates correlated with their biologic activity. *J. Med. Chem.*, v. 20, p. 943, 1977.
- HOWARD, R. A. ; SPRING, T. G. ; BEAR, J. L. - The interaction of rhodium(II) carboxylates with enzymes. *Cancer Research*, v. 36, p. 4402, 1976.
- HUGHES, R. G. ; BEAR, J. L. ; KIMBALL, A. P. - *Proc. Am. Cancer Res.*, v. 13, p. 120, 1972.
- HUSAIN, S. S. ; LOWE, G. - Evidence for histidine in the active site of papain. *J. Biochem.*, v. 108, p. 855, 1970 a.
- HUSAIN, S. S. ; LOWE, G. - Completion of the amino acid sequence of papain. *J. Biochem.*, v. 114, n. 2, p. 279, 1969.
- HUSAIN, S. S. ; LOWE, G. - The amino acid sequence around the active site cysteine and histidine residues of stem bromelain. *J. Biochem.*, v. 117, p. 341, 1970 b.
- HWANG, K. ; IVY, A. C. - Histochemical demonstration of protein-bound sulphhydryl groups. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 54, p. 161, 1951.

- IGARASHI, K.; TSUNEKUNI, T.; YASUI, T. - Inhibition of proteolytic activity of papain by Browning reaction of quercetin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v. 29, p. 227, 1983.
- ISHIMITSU, S.; FUJIMOTO, S.; OHARA, A. - Studies on inactivation of papain by ascorbic acid in the presence of cupric ions. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 26, n. 11, p. 3289, 1979.
- ISUMURA, S.; SAITOH, E.; SANADA, K. - New interpretation of secondary structure in the protein. *J. Biochem.*, v. 96, p. 1311, 1984.
- ISUMURA, S.; SAITOH, E.; SANADA, K. - Characterization of a new cysteine proteinase inhibitor of human saliva, cystatin SN, which is immunologically related to cystatin S. *Febs. Lett.*, v. 198, p. 145, 1986.
- JOHANSEN, J. T.; OTTHESEN, M. - The proteolytic degradation of the β -chain of oxidized insulin by papain. Chymopapain and papaya peptidase. *Compl. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, v. 36, p. 265, 1968.
- JOHNSON, S. A.; HUNT, H. R.; NEUMANN, H. M. - Preparation and properties of anhydrous rhodium (II) acetate and some adducts thereof. *Inorg. Chem.*, v. 2, p. 960, 1963.
- KADISH, K. M.; DAS, K.; HOWARD, R.; DENNIS, A.; BEAR, J. L. - Redox reactions and antitumor activity of tetra- μ -carboxylato-dirhodium(II). *Bioelectrochem. Bioenerg.*, v. 5, p. 741, 1978.
- KANAZAWA, H.; ISHIMITSU, S.; SHIMIZU, Y.; TANAKA, S. TAMAI, T. OHARA, A.; YOSHIOKA, M. - Studies on the active site of papain. III. Inhibition by dibasic acids. *Chem. Pharm. Bull.* v. 18, n. 19, p. 1918, 1970.

- KASPER, C.B.; SMITH, E.L.- Subtilisin BPN'. III. Isolation and sequence of 10 peptides from the tryptic digest. *J. Biol. Chem.*, v. 241, p. 3754, 1966.
- KIMBALL, A.P.; ERCK, A.; SHERWOOD, E.; BEAR, J.L.-The metabolism of rhodium(II) acetate in tumor-gearing mice. *Cancer Res.*, v. 36, p. 2204, 1976.
- KIMMEL, J.R.; SMITH, E.L.-Properties of papain. *Advanc. Enz.*, v. 19, p. 267, 1957.
- KIMMEL, J.R.; SMITH, E.L.-Sulfur distribution of papain and related studies. *Biochem. Prep.*, v. 6, p. 61, 1958.
- KIMMEL, J.R.; SMITH, E.L.-Crystalline papain. I. Preparation, specificity and activation. *J. Biol. Chem.*, v. 207, p. 515, 1954.
- KITCHENS, J.; BEAR, J.L.-A study of some rhodium(II) acetate adducts. *J. Inorg. Nucl. Chem.*, v. 31, p. 2415, 1969.
- KITCHENS, J.; BEAR, J.L.-Thermal decomposition of some rhodium(II) carboxylate complexes. *Thermochim. Acta*, v. 1, p. 537, 1970.
- KLOTZ, J.M.; WALKER, F.M.; PIVAN, R.B.-The binding of organic ions by proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 68, p. 1486, 1946.
- KONIGSBERG, W.; HILL, R.J.-The structure of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 237, p. 2547, 1962.
- LAVERY, R.; PULLMAN, A.; WEN, Y.K.-On the electrostatic properties of papain in relation to its enzymatic activity. *Int. J. Quant. Chem.*, v. 24, p. 353, 1983.

LEWIS, S. D. ; ALLEN, J. F. ; SHAPER, J. A. - Effect of cysteine-25 on the ionization of histidine-159 in papain as determined by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Evidence for a histidine-159, cysteine-25 im pair and its possible role in catalysis. *Biochemistry*, v. 20, n. 1, p. 48, 1976.

LINEWEAVER, H. ; BURK, D. - Determination of enzyme activity by a linear measurement. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 56, p. 658, 1934.

LINEWEAVER, H. ; SCHWIMMER, S. *Papain and other plant sulphhydryl proteolytic enzymes*. N. Y. : EDN, Bayer, Acad. Press, 1941. v. 3, p. 505.

LOWBRIDGE, J. ; FRUTON, J. S. - Studies on the extended active site of papain. *J. Biol. Chem.*, v. 249, n. 21, p. 6754, 1974.

LOWE, G. - The cysteine proteinases. *Tetrahedron*, v. 32, p. 291, 1976.

LOWE, G. ; WILLIAMS, A. - Direct evidence for an acylated thiol as an intermediate in papain and ficin-catalysed hydrolyses. *J. Biochem.*, v. 96, p. 189, 1965a.

LOWE, G. ; YUTHAVONG, Y. - Kinetic specificity in papain-catalysed hydrolyses. *J. Biochem.*, v. 124, p. 107, 1971.

LOWRY, O. H. ; ROSEBROUGH, N. J. ; FARR, A. L. ; RANDALL, R. J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265, 1951.

MARGOLIASH, E. - Amino acid sequence of chymotryptic peptides from horse heart cytochrome C. *J. Biol. Chem.* v. 237, p. 2161, 1962.

METZLER, D. - *Biochemistry. The chemical reactions of living cells*. N. Y. : Acad. Press, 1977. p. 187.

MITCHELL, R.E.J.; CHAIKEN, I.M.; SMITH, E.-The complete amino acid sequence of papain. *J. Biol. Chem.*, v. 245, p. 3485, 1970.

MOSZNER, M.; GLOWIAK, T.; ZIOLKOWSKI, J.J.-The crystal and molecular structure of $\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{CO}_2)_4[\text{HCON}(\text{CH}_3)]_2$ - Effect of ligands on metal-metal bonding. *Polyhedron*, v. 4, n. 8, p. 1413, 1985.

MOSZNER, M.; ZIOLKOWSKI, J.J.-The electronic structure of tetra- μ -acetate-rhodium(II)=rhodium(III) perchlorate. *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Chim.*, v. 24, p. 433, 1976.

NAKATSUJI, H.; ONISHI, Y.; USHIO, J.; YONEZANA, T.-Ab initio electronic structure of the Rh-Rh bond in dirhodium tetracarboxylate complexes and their cations. *Inorg. Chem.* v. 22, p. 1623, 1983.

NORMAN Jr., J.G.; KOLARI, H.J.-Strength and trans influence of the Rh-Rh bond in rhodium(II) carboxylate dimers. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 100, p. 791, 1978.

OHLWEILER, O.A.- *Química Analítica Quantitativa*. R. Janeiro: Livros Técnicos e Cient., 1974. v. 2, p. 498.

PILLA, L.- *Físico-Química*. R. Janeiro: Livros Técn. e Cient., 1979. v. 1, p. 390.

PNEUMATIKAKIS, G.; HADJILIADIS, N.-Interactions of tetrakis- μ -acetatodirhodium(II) with adenine nucleosides and nucleotides. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, p. 596, 1979.

PNEUMATIKAKIS, G.; PSAROULIS, P.-Interactions of tetra- μ -acetatodirhodium(II) with sulfur-containing amino acids. *Inorg. Chim. Acta*, v. 46, n. 2, p. 97, 1980.

- POLGAR, L.-Deuterium isotope effects on papain acylation. *Eur. J. Biochem.*, v. 98, p. 369, 1979.
- POLGAR, L.-The mechanism of action of thiolenzymes. *Int. J. Biochem.*, v. 8, p. 171, 1977.
- PORAI-KOSHITS, M. A.; ANTSYSHKINA, A. S.-Structure of rhodium acetate complexes. *Dokl. Akad. Nauk. USSR*, v. 146, p. 1102, 1962. *Proc. Acad. Sci. USSR Chem. Sect.*, v. 146, p. 902, 1962.
- PRICE, N. C.; DWEK, R. A.- *Principles and problems in physical chemistry for biochemistry*. London: Clarendon Press Oxford, 1979. p. 178.
- RAINEN, L.; HOWARD, R. A.; KIMBALL, A. P.; BEAR, J. L.-Complexes of rhodium(II) carboxylates with adenosine 5'-mono-5'-di-, and 5'-triphosphates. *Inorg. Chem.*, v. 14, p. 2752, 1975.
- RICHMAN, R. M.; KUECHLTER, T. C.; TANNER, S. P.; DRAGO, R. S. Electron paramagnetic resonance study of the adduct of a nitroxide and rhodium trifluoroacetate dimer. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 99, p. 1055, 1977.
- ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; TROSKO, J. E.; MANSOUR, V. H.-Platinum compounds, a new class of potent antitumor agents. *Nature*, v. 222, p. 385, 1969.
- SCATCHARD, G.-The attraction of proteins for small molecules and ions. *Am. N. Y. Acad. Sci.*, v. 51, 460, 1949.
- SCHECHTER, I.; BERGER, A.-On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 27, n. 2, p. 157, 1967.
- SCHECHTER, I.; BERGER, A.-The catalytic oxidation of dithiols by a semi syntetic enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 32, p. 898, 1968.

- SHAPIRA, E.; ARNON, R.-Cleavage of one specific disulfite bond in papain. *J. Biol. Chem.*, v. 244, p. 1026, 1969.
- SHINITZKY, M.; GOLDEMAN, R.-Stabilizing enzyme compositions. *Eur. J. Biochem.*, v. 3, p. 139, 1967.
- SLUYTERMAN, L.A.AE.-Product inhibition of papain action. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 85, p. 316, 1963.
- SLUYTERMAN, L.A.AE.-Reversible inactivation of papain by cyanate. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 135, p. 439, 1967.
- SLUYTERMAN, L.A.AE.-The relation between enzyme, substrate and product. *Philips Tech. Rev.*, v. 27, n. 6, p. 160, 1970.
- SLUYTERMAN, L.A.AE.; DE GRAFF, M.J.M.-The fluorescence of papain. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 200, p. 595, 1970.
- SLUYTERMAN, L.A.AE.; WIJDENES, J.-Sigmoidal progress curves in the polymerization of leucine methyl ester catalyzed by papain. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 298, p. 194, 1970.
- SMITH, E.L.; FINKLE, B.J.; STOCKWELL, A.-Proteolysis of certain vegetable proteins by papain. *Discuss. Faraday Soc.*, v. 20, p. 96, 1955.
- SMITH, E.L.; KIMMEL, J.R.-*The Enzymes*. N.Y.: P.D. Boyer. Ed., 1960. v. 4, p. 133.
- SMITH, E.L.; PARKER, M.J.-Kinetics of papain action. *J. Biol. Chem.*, v. 233, p. 1387, 1958.
- SPECTOR, T.-Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation. *Analyt. Biochem.*, v. 80, p. 142, 1978.

- STOCKEL, A.; SMITH, E. L. - Kinetics of papain action. I. Hydrolyses of benzoil-L-argininamide. *J. Biol. Chem.*, v. 227, p. 1, 1957.
- TANG, C. S.; TANG, W. J. - Inhibition of papain by isothiocyanates. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 452, p. 510, 1976.
- VINES, S. H. - The protease of plants (VI). *Ann. Bot.*, v. 19, p. 149, 1905.
- WHITAKER, J. R.; BENDER, L. M. - Kinetics of papain-catalyzed hydrolysis of α -N-benzoyl-L-arginine ethyl ester and α -N-benzoyl-L-argininamide. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 87, n. 12, p. 2728, 1965.
- WHITAKER, J. R.; PEREZ-VILLASEÑOR, J. - Chemical modification of papain. I. Reaction with the chloromethyl ketones of phenylalanine and lysine and with phenylmethylsulfonyl fluoride. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 124, p. 70, 1968.
- WOLTERS, B. G.; KALK, K. H. - Binding of competitive (product) inhibitor to papain in the active and inactive state. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 198, p. 556, 1970.
- WURTZ, A.; BOUCHET, E. - Recherches sur la papaine. *C. R. Acad. Sci. Paris*, v. 89, p. 425, 1879.
- ZANNIS, V. I.; KIRSCH, J. F. - Effects of substituents on the rates of deacylation of substituted benzoyl papains. Role of a carboxylate residue in the catalytic mechanism. *Biochemistry*, v. 17, p. 2669, 1978.

VIII - A B R E V I A T U R A S

Ac	= acetila, CH ₃ CO-
BAEE	= N α -benzoil-L-arginina-etil-éster
BAL	= 2,3-dimercapto 1-propanol
DMF	= dimetilformamida
DMSO	= dimetilssulfóxido
DTNB	= ácido 5,5'-ditio bis,2-nitrobenzóico
DTT	= DL-ditiotreitól
E.C.	= Enzyme Catalogue
EDTA	= ácido etilenodiaminotetracético
RSE	= ressonância de spin-elétron
I	= força iônica
[I] ₅₀	= concentração de inibidor capaz de inativar 50% de enzima.
k _{cat}	= constante catalítica
K _i	= constante de inibição
K _m	= constante de Henri-Michaelis-Menten
M	= molaridade
Me	= metila
NHEt ₂	= dietilamina
RMN	= ressonância magnética nuclear
PPh ₃	= trifenilfosfina
py	= piridina
SCF-X α -Sw	= self-consistent field, X α , scattered wave
TCA	= ácido tricloroacético
THT	= tetraidrotiofeno
V _m	= velocidade máxima