SHIRLEY SCHREIER

ESTUDOS COM COENZIMAS PIRIDÍNICOS

Tese de doutoramento apresentada
à Faculdade de Filosofia, Ciências
e Letras da Universidade de S. Paulo

Orientador :

Prof. Dr. Giuseppe Cilento

A MEUS PAIS

Ao professor G. Cilento, cientista e
mestre, pela sua contribuição para minha
formação científica, minha gratidão.

Ao Professor

H. STAMMREICH

Homenagem e Saudade

MEUS AGRADECIMENTOS

ao Prof. P. Krumholz, pelo apôio e solicitude de sempre
ao Prof. E. Giesbrecht, pela compreensão

ao REGINALDO

à Lydia

à Jacyra

ao Raphael

ao Sr. João

aos amigos

ao Centro de Cálculo Numérico da U. S. P.

ao Setor de Matemática Aplicada do Depto. de Física da F.F.C.I-USP

ao Instituto de Estudos Brasileiros da U. S. P.

ao Conselho Nacional de Pesquisas e a Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de São Paulo, pela ajuda material.

Voici encore des arbres et je connais leur rugueux, de l'eau et j'éprouve sa saveur. Ces parfums d'herbe et d'étoiles, la nuit, certains soirs où le cœur se détend, comment nierais-je ce monde dont j'éprouve la puissance et les forces? Pourtant toute la science de cette terre ne me donnera rien qui puisse m'assurer que ce monde est à moi. Vous me le décrivez et vous m'apprenez à le classer. Vous énumérez ses lois et dans ma soif de savoir je consens qu'elles soient vraies. Vous démontez son mécanisme et mon espoir s'accroît. Au terme dernier, vous m'apprenez que cet univers prestigieux et bariolé se réduit à l'atome et que l'atome lui même se réduit à l'électron. Tout ceci est bon et j'attends que vous continuiez. Mais vous me parlez d'un invisible système planétaire où des électrons gravitent autour d'un noyau. Vous m'expliquez ce monde avec une image. Je reconnais alors que vous en êtes venus à la poésie: je ne connaîtrai jamais. Ai-je le temps de m'en indigner? Vous avez déjà changé de théorie. Ainsi cette science qui devait tout m'apprendre finit dans l'hypothèse, cette lucidité sombre dans la métaphore, cette incertitude se résout en œuvre d'art.

albert camus

ÍNDICE

Página

I. INTRODUÇÃO.	1
A. Generalidades a respeito de complexos de transferência de carga.	4
1. Introdução.	4
2. Teoria de Mulliken.	4
3. Tratamento matemático.	5
4. Teoria de Dewar.	7
5. Modelo e realidade	7
6. Complexos fracos.	8
7. Importância bioquímica.	8
II. MATERIAIS E MÉTODOS.	10
A. Materiais.	10
1. Substâncias usadas.	10
2. Lista de abreviações.	16
3. Aparelhagens.	17
B. Métodos.	18
1. Preparação das soluções.	18
2. Determinação espectrofotométrica da constante de associação de complexos moleculares.	18
3. Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade de uma reação de pseudo-primeira ordem	22
4. Determinação de parâmetros termodinâmicos e de ativação.	24
III. TRANSFERÊNCIA DE HIDROGÊNIO ENTRE AS FORMAS OXIDADAS E REDUZIDAS DOS COENZIMAS PIRIDÍNICOS E SEUS MODELOS. . .	26
A. Introdução.	26
B. Resultados.	29

	Página
1. Interação entre modelos	29
2. Interação entre os coenzimas	35
3. Interação em sistemas mistos modelo-coenzima.	35
C. Discussão.	44
IV. INTERAÇÃO INTERNA NOS COENZIMAS PIRIDÍNICOS.	47
A. Introdução	47
B. Resultados.	49
1. Interação entre um modelo da forma oxidada e adenosina	49
2. Interação entre um modelo da forma oxidada e ADP.	49
3. Efeito de fósforos sobre substâncias e sistemas estudados	49
C. Discussão.	60
V. HIDRATAÇÃO DAS FORMAS REDUZIDAS DOS COENZIMAS PIRIDI- NICOS E SEUS MODELOS	61
A. Introdução.	61
B. Resultados.	65
1. Natureza dos produtos formados	65
2. Cinética.	70
a. Ensaio de substâncias estruturalmente rela- cionadas a porções moleculares do coenzima.	70
b. Ensaio de amino-ácidos, péptidos, proteínas e substâncias relacionadas	77
c. Ensaio de substâncias relacionadas à tiro- xina	87
C. Discussão	110
VI. SUMÁRIO E CONCLUSÕES.	119
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

I. INTRODUÇÃO

Os coenzimas piridínicos desempenham um papel fundamental relacionado às suas propriedades de óxido-redução. Assim, participam da cadeia respiratória, onde se situam, devido ao valor do potencial de óxido-redução do par, logo no início, sendo os primeiros intermediários entre certos substratos e o oxigênio. Constituem-se também no primeiro local de síntese de ATP; muito importante, presumivelmente em conexão com a função respiratória, é o fato de os coenzimas piridínicos intervirem nos sistemas de algumas trans-hidrogenases.

A parte funcional dos coenzimas piridínicos é o anel piridínico da molécula, a qual, na forma oxidada, pode ser assim representada:

Fornecendo-se a molécula os elementos de um íon hidreto, resulta a forma reduzida:

Note-se que o anel funcional é agora uma 1,4-dihidronicotinamida.

Empregam-se as designações NAD^+ e NADH , para as formas (1) e (2) ou seja, nicotinamida-adenina-dinucleótido e nicotinamida-adenina-dinucleó-

tido reduzido. São ainda designadas por NADP^+ e NADPH as formas em que, em lugar da ribose, tem-se a ribose-2^a-fosfato ligada à adenina.

Cálculos quanto-mecânicos⁽¹⁾ estão de acordo com o fato da forma oxidada ser um bom receptor de elétrons e a reduzida, um bom doador; isto pode ser apreciado na tabela I, onde figuram as energias das orbitais moleculares.

TABELA I
Energias das orbitais moleculares (em β)

Composto	Energia da mais alta orbital molecular ocupada	Energia da mais baixa orbital molecular vazia
NAD^+	1,032	-0,356
NADH	0,298	-0,915

É de grande utilidade, também, o trabalho com modelos dessas substâncias, cujos resultados podem ser comparados com os obtidos através do uso dos próprios coenzimas, a fim de se chegar a conclusões a respeito dos mecanismos pelos quais atuam estes últimos.

Assim, podem-se representar esquematicamente os modelos das formas oxidada e reduzida como sendo respectivamente

em que R é frequentemente uma cadeia alifática ou o radical benzila e R' é frequentemente o radical $-\text{NH}_2$.

Coloca-se como um objetivo interessante o exame da interação en-

tre as formas oxidada e reduzida dos coenzimas piridínicos e seus modelos. Tendo sido já mencionada a capacidade receptora de elétrons da forma oxidada e a doadora de elétrons da forma reduzida, torna-se interessante pesquisar a existência de uma possível complexação por transferência de carga entre essas formas. De fato, as indicações obtidas podem fornecer sugestões a respeito do estado de transição destes coenzimas, especialmente nas reações de transhidrogenação.

No campo dos coenzimas piridínicos também se afigura de notável importância o estudo da interação entre as duas partes da molécula do coenzima, isto é, entre o anel piridínico e o anel adenínico. De fato, teoricamente, é de se esperar uma interação do tipo transferência de carga⁽¹⁾. O estudo dessa interação pode, em princípio, fornecer resultados valiosos sobre a configuração do coenzima, seja na forma livre, como quando ligado ao apoenzima e também sobre a natureza das forças responsáveis pela configuração. O exame dessas questões constituiu-se em outro objetivo deste trabalho.

Participam também os coenzimas piridínicos de certas reações ainda não totalmente elucidadas, mas que são, presumivelmente, de grande importância na síntese da primeira molécula de ATP na cadeia respiratória. Entre estas, figura a formação de NADH-X por hidratação do NADH.

O estudo dessas hidratações compreende a terceira parte deste trabalho.

A. Generalidades a respeito de complexos de transferência de carga

1. Introdução

A interação entre espécies químicas é um fenômeno há longo tempo conhecido; as energias envolvidas variam aproximadamente de 0 a 10 kcal/mol. Portanto, não se trata de reações químicas; entretanto, o comportamento do sistema não corresponde ao aditivo.

As forças que intervêm nessas interações entre compostos são as forças de van der Waals, as quais podem ter caráter atrativo ou repulsivo.

As forças de van der Waals são chamadas de indução quando resultantes de uma interação de tipo dipolo-dipolo induzido e de dispersão (de London) quando resultantes de interação do tipo dipolo instantâneo-dipolo induzido.

Em geral, a energia proveniente desses tipos de interações varia com $1/R^n$, onde R é a distância entre as partículas e n tem valores grandes. Isso indica que são forças que atuam somente a pequenas distâncias.

Outras forças podem ser levadas em conta, tais como as resultantes de ponte de hidrogênio.

No entanto, pensou-se que essas forças não seriam ainda suficientes para explicar a energia da interação entre as moléculas consideradas.

2. Teoria de Mulliken

A fim de procurar encontrar uma formulação adequada para representar os fatos através de um modelo satisfatório, introduziu-se um caráter quanto-mecânico ao quadro descritivo da situação. Essa apresentação da explicação do que ocorre tem por base o poder doador de elétrons, que, em geral, caracteriza um dos componentes do complexo molecular e o poder receptor de elétrons que caracteriza o outro dos componentes, uma vez que êsses compostos se for

nam geralmente na proporção de 1:1. Foi Mulliken^(2,3) quem sugeriu um modelo quanto-mecânico descritivo desse tipo de compostos, introduzindo o conceito de transferência de carga.

Um complexo molecular poderia ser descrito por uma função de onda que se constituísse na contribuição de outras duas: uma função de onda descritiva de um estado não ligado, em que as moléculas se aproximariam uma da outra e permaneceriam próximas pela contribuição das atrações de natureza clássica e uma outra função de onda, característica de uma estrutura dativa, em que um elétron pertencente a uma orbital de alta energia da molécula doadora seria cedido a uma orbital livre de baixa energia da molécula receptora. Essa segunda estrutura seria estabilizada pela energia eletrostática de interação entre um cátion e um ânion, como se pode considerar no caso mais geral, e seria denominada "de transferência de carga". Compostos nos quais estrutura desse tipo são admitidas como colaboradoras na estabilização do complexo são conhecidos como complexos de transferência de carga.

3. Tratamento matemático⁽⁴⁾

Matematicamente pode-se escrever:

$$\Psi_N = a \Psi_{0(D,A)} + b \Psi_{1(D^+A^-)} \quad \text{onde } b \ll a$$

$$\Psi_{0(D,A)} = \mathcal{A} \Psi_D \Psi_A \quad \text{e} \quad \Psi_{1(D^+A^-)} = \mathcal{A} \Psi_{D^+} \Psi_{A^-}$$

N representaria a função de onda descritiva do estado fundamental do complexo, construída pela combinação linear das funções Ψ_0 e Ψ_1 , que, como se pode ver pela expressão matemática, correspondem respectivamente ao estado não ligado e ao estado de transferência de carga. Como se pode ver também nas expressões acima $b \ll a$ e, portanto, a contribuição da segunda estrutura é insignificante e sabe-se, realmente, hoje em dia, que a energia de estabilização resultante da estrutura dativa é muito pequena.

Pode-se ter uma outra função de onda, a partir das mesmas iniciais onde

$$\Psi_E = a^* \Psi_{1(D+A)} - b^* \Psi_0(D,A), \text{ onde, novamente}$$

$$b^* \ll a^* \text{ e } a \approx a^* \text{ e } b \approx b^*.$$

As funções de onda Ψ_N e Ψ_E são características do complexo e não existem para os compostos separadamente.

Ψ_E representaria um estado excitado. Poderia, portanto, perfeitamente, haver uma transição eletrônica $\Psi_N \rightarrow \Psi_E$, envolvendo uma energia antes não existente. Essa energia daria origem a uma nova banda espectral denominada banda de transferência de carga.

Pode-se calcular a energia associada à banda de transferência de carga.

Se for assumido o seguinte esquema energético⁽⁵⁾:

onde se têm em ordenadas as energias correspondentes às diferentes estruturas assinaladas, o cálculo da energia da banda de transferência de carga pode ser efetuado:

$$E_E = I_D - A - E' + R_E, E_N = E_0 + R_N \text{ e } \Delta E = h\nu_{ct} = E_E - E_N$$

onde I_D é o potencial de ionização do elétron mais energético do doador, A , a afinidade eletrônica do receptor, E' , a energia de estabilização pela interação eletrostática entre o cátion D^+ e o ânion A^- , R_E a energia de instabilização do estado excitado pela contribuição da estrutura não ligada e R_N a energia de estabilização do estado fundamental pela contribuição da estrutura de transferência de carga.

4. Teoria de Dewar

Em complexos orgânicos típicos, as orbitais do doador e do receptor são orbitais moleculares delocalizadas e a região de entrosamento entre tais orbitais é delocalizada. Se se quer referir a uma ligação química entre os dois componentes do complexo, então é necessário compreender que essa é uma ligação delocalizada e não algo que possa ser representado através de uma linha entre dois átomos. Dewar e Lepley⁽⁶⁾ formularam a conceituação acima através do emprêgo do método das orbitais moleculares e denominaram os complexos de "complexos π ".

5. Modelo e Realidade⁽⁷⁾

O termo transferência de carga para descrever a ligação num complexo molecular tem o mesmo sentido que os termos estrutura e ressonância para moléculas. É um termo ligado a um modelo quântico-mecânico particular e não a algo fisicamente observável. Por outro lado, quando usado para descrever uma banda de absorção eletrônica, isto significa que grande quantidade de densidade eletrônica é trans

ferida do doador para o receptor quando o complexo é excitado pela luz.

6. Complexos Fracos

Com relação a complexos moleculares fracos, em que a determinação da constante de estabilidade revela a existência de uma complexação muito reduzida em relação à esperada pela intensidade da banda de absorção, Mulliken e Orgel⁽⁸⁾ formularam a possibilidade de complexação por contactos entre partículas em solução, fundamentando a explicação no fato de que no momento da colisão o valor da integral de entrosamento S_{DA} entre a orbital ocupada de mais alta energia do doador e a orbital livre de mais baixa energia do receptor superaria o valor da integral de repulsão de van der Waals, S_{vdw} , dada pelas orbitais ocupadas de mais alta energia do doador e do receptor.

Por outro lado, Murrell⁽⁹⁾ explica teoricamente tais complexos, ou melhor, a intensidade de suas bandas, em parte pela possibilidade de ocorrência de maior mistura de estados de transferência de carga com estados excitados do doador ou do receptor do que no estado fundamental. Quanto menor S_{DA} (menor estável o complexo) maior a possibilidade de o estado de transferência de carga interagir com estados excitados do doador.

Melhor concordância pode ser obtida levando em conta que o número de moléculas de solvente envolvidas na solvatação do complexo é diferente do envolvido na solvatação dos componentes⁽¹⁰⁾.

7. Importância Bioquímica

Do ponto de vista químico, e, conseqüentemente, bioquímico, pode-se imaginar que, se uma reação puder ocorrer através da formação intermediária de um complexo de transferência de carga, isso poderá acarretar uma diminuição da energia livre de ativação; poder-

-se-iam também obter informações valiosas com relação ao mecanismo e estereoquímica da reação.

A existência de complexos de transferência de carga entre partes constituintes de uma entidade molecular qualquer contribui, também, para esclarecer a estrutura da dada entidade e que forças atuam no sentido de manter e estabilizar essa estrutura.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

A. Materiais

1. Substâncias usadas

1-Benzil-1,4-dihidronicotinamida (ClBCH). Foi preparada segundo o método de Mauzerall e Westheimer⁽¹¹⁾.

PF: 122-123°C; descrito: 121°C⁽¹¹⁾

$$\epsilon_{(\text{em } H_2O)} = 7,3 \cdot 10^3 \quad \lambda = 355 \text{ m}\mu$$

Cloreto de 1-benzil-3-carboxamido-piridínio (ClBC). Foi preparado segundo o método de Karrer e Stare⁽¹²⁾.

PF: 236°C; descrito: 236°C⁽¹²⁾

Cloreto de 1-benzil-3-acetil-piridínio (ABC). Foi preparado segundo o método de Cilento⁽¹³⁾.

PF: 189°C; descrito: 189°C⁽¹³⁾

Ácido 3,5-dicloro-4-hidroxibenzóico (MBCl). Foi preparado segundo o método de Gray e Jones⁽¹⁴⁾.

$$\epsilon_{(\text{em NaOH } 0,05 \text{ N})} = 14,4 \cdot 10^3 \quad \lambda = 280 \text{ m}\mu$$

Ácido 3,5-dibromo-4-hidroxibenzóico (MBBr). Foi preparado segundo o método de Pope e Wood⁽¹⁵⁾.

$$\epsilon_{(\text{em NaOH } 0,05 \text{ N})} = 15,8 \cdot 10^3 \quad \lambda = 285 \text{ m}\mu$$

Iodocaseína. A caseína foi iodada pelo método de Reinecke e Turner⁽¹⁶⁾.

As seguintes substâncias foram usadas após recristalização:

Tirosina (de Eastman Organic Chemicals). Recristalizada de ácido acético aquoso.

$$\epsilon_{(\text{em NaOH } 0,05 \text{ N})} = 2,44 \cdot 10^3 \quad \lambda = 295 \text{ m}\mu$$

De Aldrich Chemical Co:

3,5-Dibromotirosina (DIB). Recristalizada de ácido acético aquoso.

$$\epsilon_{(\text{em NaOH } 0,05 \text{ N})} = 5,92 \cdot 10^3^{(18)} \quad \lambda = 310 \text{ m}\mu$$

3,5-Diidotirosina (DIT). Recristalizada de ácido acético aquoso.

$$\epsilon_{(\text{em NaOH } 0,05 \text{ N})} = 5,92 \cdot 10^3^{(17)} \quad \lambda = 310 \text{ m}\mu$$

3-Iodotirosina (MIT). Recristalizada de ácido acético aquoso.

$$\epsilon_{(\text{em NaOH } 0,05 \text{ M})} = 3,98 \cdot 10^3^{(19)} \quad \lambda = 305 \text{ m}\mu$$

Ácido 3,5-diiodo-4-hidroxibenzóico (MBI) (de Eastman Organic Chemicals). Recristalizado de acetona aquosa.

$$\epsilon_{(\text{em NaOH } 0,05 \text{ N})} = 14,0 \cdot 10^3 \quad \lambda = 284 \text{ m}\mu$$

p-Iodo-anisol (de British Drug House). Recristalizado de etanol-água.

$$\epsilon_{(\text{em EtOH})} = 1,7 \cdot 10^3^{(20)} \quad \lambda = 280 \text{ m}\mu$$

As seguintes substâncias foram usadas sem posterior purificação:

De Sigma Chemicals Co.:

β -Nicotinamida-adenina-dinucleótido reduzido (β -NADH)

$$\epsilon = 6,22 \cdot 10^3^{(21)} \quad \lambda = 340 \text{ m}\mu$$

β -Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reduzido (β -NADPH).

$$\epsilon = 6,22 \cdot 10^3^{(21)} \quad \lambda = 340 \text{ m}\mu$$

β -Nicotinamida-adenina-dinucleótido (β -NAD⁺).

Adenina

Xantina

Cafeina

Adenosina

Adenosina difosfato (ADP)

2-Desoxiglicose-6-fosfato (sal de sódio)

Arginina

Fenilalanina

Glutatião

D-, L- e DL-triptofano

$$\epsilon_{(\text{em } \text{H}_2\text{O})} = 5,65 \cdot 10^3^{(22)} \quad \lambda = 279 \text{ m}\mu$$

Tironina (T_1)

$$\epsilon_{(\text{em NaOH } 0,05\text{N})} = 2,82 \cdot 10^3^{(17)} \quad \lambda = 300 \text{ m}\mu$$

3,5-Dibromotironina ($T_2(\text{Br})$)

$$\epsilon_{(\text{em NaOH } 0,05\text{N})} = 3,33 \cdot 10^3^{(17)} \quad \lambda = 305 \text{ m}\mu$$

3,5-Diiodotironina (T_2)

$$\epsilon_{(\text{em NaOH } 0,05\text{N})} = 3,33 \cdot 10^3^{(17)} \quad \lambda = 305 \text{ m}\mu$$

3,3',5-Triiodotironina (sal. sódico) (T_3)

$$\epsilon_{(\text{em NaOH } 0,05\text{N})} = 4,66 \cdot 10^3^{(17)} \quad \lambda = 320 \text{ m}\mu$$

Tiroxina (T_4)

$$\epsilon_{(\text{em NaOH } 0,05\text{N})} = 6,21 \cdot 10^3^{(17)} \quad \lambda = 325 \text{ m}\mu$$

Tiroglobulina

Tris(hidroximetil) aminometano (tris)

De Nutritional Biochemicals Co.:

Inositol

Glicose

Galactose

Frutose

Ribose

Metilglicósido

Glicose-1-fosfato (sal de potássio)

Glicose-6-fosfato (sal de bário)

Galactose-6-fosfato (sal de bário)

Manose-6-fosfato (sal de bário)

Frutose-6-fosfato (sal de bário)

Ribose-5-fosfato (sal de bário)

Ácido glutâmico

Glicilalanina, glicilglicina

De Eastman Organic Chemicals :

Serina

Lisina

Prolina

Ácido aspártico

Cisteína

Butilamina

2-Mercaptoetanol

Etilmercaptana

2-Bromofenol

$$\epsilon_{(\text{em NaOH } 0,1N)} = 3,98 \cdot 10^3^{(23)} \quad \lambda = 295 \text{ m}\mu$$

2-Iodofenol

$$\epsilon_{(\text{em EtOH})} = 3,45 \cdot 10^3^{(20)} \quad \lambda = 280 \text{ m}\mu$$

2,6-Dibromofenol

$$\epsilon_{(\text{em NaOH } 0,1N)} = 3,71 \cdot 10^3^{(23)} \quad \lambda = 308 \text{ m}\mu$$

2,4,6-Triiodofenol

$$\epsilon_{(\text{em EtOH})} = 3,6 \cdot 10^3^{(20)} \quad \lambda = 295 \text{ m}\mu$$

Ácido 4-hidroxibenzóico

De E. Merck A. G. :

Glicerol

Imidazol

Glicina

Caseína

De Ki-Kion:

Sacarose

Ácido acético

Ácido propiônico

De Mann Research Labs:

Gliceraldeído

Ácido monoiodoacético

De Schwartz Labs. Inc.:

Frutose-2,6-difosfato (sal de bário)

De Paul Lewis Labs Inc.:

Asparagina

De British Drug House:

Histidina

De H. M. Chemicals Co.:

Metionina

Etionina

De Armour Labs.:

Albumina humana

Albumina bovina

De Penbex Inc.:

γ -Globulina

De Q.E.E.L.:

Uréia

Existentes no laboratório:

Glicerofosfato de sódio

Glicerofosfato de bário

Betaina

Iodobenzeno

$$\epsilon_{(em H_2O)} = 6,60 \cdot 10^2 (24)$$

$$\lambda = 254 m\mu$$

Foram ainda usados os seguintes reagentes inorgânicos p.a.:

Monohidrogenofosfato de potássio

Dihidrogenofosfato de potássio

Ácido clorídrico

Cloreto de sódio

Perclorato de sódio

Sulfato de sódio

Carbonato de sódio

Bicarbonato de sódio

Nitrato de potássio

Acetato de Sódio

2. Lista das abreviações usadas

ClBCH - 1-benzil-3-carboxamido-1,4-dihidropiridina

ClBC - cloreto de 1-benzil-3-carboxamido-piridínio

ABC - cloreto de 1-benzil-3-acetil-piridínio

β -NADH ou NADH- β - nicotinamida-adeninadinucleótido reduzido

β -NADPH ou NADPH- β - nicotinamida-adeninadinucleótido fosfato
reduzido

β -NAD⁺ ou NAD⁺- β - nicotinamida-adeninadinucleótido

NMN - nicotinamidamononucleótido

ADP - adenosinadifosfato

ATP - adenosina trifosfato

MBCl - ácido 3,5-dicloro-4-hidroxibenzóico

MBBr - ácido 3,5-dibromo-4-hidroxibenzóico

MBI - ácido 3,5-diiodo-4-hidroxibenzóico

DIB - 3,5-dibromotirosina

DIT - 3,5-diiodotirosina

MIT - 3-iodotirosina

T₀ - tironina

T₂(Br) - 3,5-dibromotironina

T₂ - 3,5-diiodotironina

T₃ - 3,3',5-triiodotironina

T₄ - tiroxina

Tris - tris(hidroximetil)-aminometano

GPD - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

6. Aparelhagens

Praticamente todâs as medidas espectrofotométricas foram feitas com o emprêgo de um aparêlho Beckman DU, o qual era termos_utatizado através de um "cyclotherm" circulando água por um "thermospacer" situado lateralmente ao compartimento contendo as celas.

Ocasionalmente foram utilizados um espectrofotômetro Zeiss PMQII e um Cary 14.

Foram usadas celas de quartzo tampadas, de caminho ótico 1 cm e também celas de Thunberg.

As medidas de pH foram afetuadas em potenciômetros Metrohm, modelos E 148 e E 388.

B. Métodos

1. Preparação de soluções

As soluções de ClBCH foram preparadas agitando-se o sólido triturado em almofariz num frasco escuro contendo o solvente, imediatamente antes do uso.

As soluções das substâncias empregadas tiveram sua concentração determinada por pesagem. Exceções encontram-se naquelas para as quais é dada a absorptividade molar na primeira parte deste capítulo: nesse caso, as concentrações foram determinadas espectrofotometricamente. A concentração da solução de etil-mercaptana foi determinada por medida de volume. Finalmente, tiroglobulina teve a concentração em DIT determinada espectrofotometricamente⁽²⁵⁾.

Tôdas as soluções cuja concentração não foi determinada por pesagem, especialmente quando se tratava de substâncias pouco solúveis, foram também preparadas por agitação num agitador mecânico.

Os açúcares fosforilados na forma de sal de bário tiveram êsse íon removido por precipitação com sulfato de sódio.

Praticamente todo o trabalho foi efetuado em solução aquosa de tampão tris 0,25M. Exceções ocorreram na determinação do pK da caseína iodada, quando se empregou tampão acetato e também carbonato/bicarbonato; também em algumas experiências em que a iodo-caseína atuou como catalisador, empregou-se tampão acetato e imidazol. Ocasionalmente, conforme será visto, foram empregados os outros tampões referidos.

2. Determinação espectrofotométrica da constante de associação de complexos moleculares

Sejam dois reagentes que se associam em um complexo:

onde A é o receptor de elétrons, D é o doador de elétrons e C é o complexo.

Se a concentração de A for a , a de D for b , e a do complexo no equilíbrio c , tem-se a constante:

$$K = \frac{c}{(a-c)^m (b-c)^n}$$

Se a concentração de um dos reagentes, por exemplo, o receptor, estiver em grande excesso em relação ao outro, a concentração do complexo será negligenciável em relação ao primeiro. Ter-se-á:

$$K = \frac{c}{a^m (b-c)^n}$$

e, no caso em que os complexos se formam na proporção de 1:1 de receptor e de doador:

$$K = \frac{c}{a(b-c)} \quad (1), \text{ ou, rearranjando,}$$

$$\frac{1}{a} = K \frac{(b-c)}{c} - K \quad (2)$$

Do ponto de vista espectrofotométrico admite-se que a variação ocorrida no valor da absorbância é devida à formação do complexo, isto é,

$$A_{\text{total}} = A_{\text{receptor}} + A_{\text{doador}} + A_{\text{complexo}}$$

$$\therefore A = A_{\text{total}} - (A_{\text{receptor}} + A_{\text{doador}}) = A_{\text{complexo}}$$

Pela lei de Lambert-Beer tem-se que

$A = \epsilon \cdot d \cdot c$, onde A é a absorbância, ϵ é a absorptividade molar, d é o caminho ótico em cm e c é a concentração da substância em moles/l.

Portanto, para um caminho ótico de 1 cm, a concentração do complexo será dada por:

$$c = \frac{\Delta A}{\epsilon_C - (\epsilon_A + \epsilon_D)} \quad (3)$$

onde ϵ_C é a absorptividade molar do complexo, ϵ_A é a absorptividade molar do receptor no complexo, ϵ_D é a absorptividade molar do doador no complexo, ou seja, a expressão no denominador da equação (3) reflete a absorção devida à transferência de carga.

Substituindo a equação (3) na (2) tem-se:

$$\frac{1}{a} = \frac{Kb [\epsilon_C - (\epsilon_A + \epsilon_D)]}{\Delta A} - K \quad (4)$$

que é a equação de Fujimori⁽²⁶⁾, uma variante da equação original de Benesi-Hildebrand⁽²⁷⁾.

Portanto, mantendo-se fixo o valor de b, ou seja a concentração do doador e projetando-se $1/a$ versus $1/\Delta A$ deve-se obter uma reta cujo corte na ordenada representa o negativo da constante de associação. É fácil ver que a partir da inclinação da reta pode-se calcular o valor de ϵ_C .

Multiplicando a equação (3) por ΔA , obtem-se uma expressão equivalente à equação de Foster e cols.⁽²⁸⁾:

$$\frac{\Delta A}{a} = Kb [\epsilon_C - (\epsilon_A + \epsilon_D)] - K \Delta A \quad (5)$$

Nesse caso, o valor de K corresponde ao negativo da inclinação da reta obtida projetando-se $\Delta A/a$ versus ΔA .

Na prática prepara-se uma série de soluções nas quais a concentração do componente em baixa concentração é mantida constante e se varia a do componente de alta concentração, alterando-se assim a proporção de complexação e, portanto, ΔA .

Pode-se ainda utilizar a equação de Cilento e Sanioto⁽²⁹⁾, através do método das diluições, que consiste no preparo de uma úni

ca solução e no estudo da variação de absorbância ocasionada pela adição de sucessivas quantidades de solvente.

Expressando a concentração em número de moles por litro (n/v), assumindo-se as mesmas condições iniciais, ou seja, a concentração de um dos componentes é muito maior que a do outro, a equação (1) fica:

$$K = \frac{\frac{n_C}{v}}{\frac{n_A}{v} \left(\frac{n_D - n_C}{v} \right)} \quad (6)$$

sendo pois, n_C o número de moles do complexo, n_A o número de moles do receptor de elétrons e n_D o número de moles do doador de elétrons.

Trabalhando-se numa região de comprimento de onda em que apenas o complexo absorva, ter-se-á:

$$A = \frac{\epsilon_C \cdot n_C \cdot d}{v}, \text{ donde } \frac{n_C}{v} = \frac{A}{\epsilon_C d} \quad (7)$$

Introduzindo (7) na equação (6) e rearranjando:

$$\frac{A}{\epsilon_C d} = K \frac{n_A}{v} \cdot \frac{n_D}{v} - K \frac{A}{\epsilon_C d} \cdot \frac{n_A}{v}$$

Multiplicando por $\frac{\epsilon_C d v}{A}$, tem-se:

$$v = \frac{K \cdot \epsilon_C \cdot d \cdot n_A \cdot n_D}{v \cdot A} - K n_A \quad (8)$$

Portanto, projetando-se v versus $1/v \cdot A$ obtém-se uma reta cujo corte na ordenada fornece $-K n_A$.

Medidas em diferentes comprimentos de onda deverão resultar em retas de diferente inclinação e mesma intersecção no eixo das ordenadas.

Ainda é possível aplicar a equação de Cilento e Sanioto para o caso em que exista absorção dos componentes, tomando o cui-

dado de subtrair o valor de absorção correspondente a cada diluição.

As retas foram sempre traçadas pelo método dos quadrados mínimos.

3. Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade de uma reação de pseudo-primeira ordem⁽³⁰⁾

Um processo catalítico que se constitua numa reação de primeira ordem em relação ao reagente pode ser matematicamente abordado como se se tratasse de uma reação de primeira ordem; o mesmo ocorre num processo não catalítico em que um dos reagentes se encontre em tal excesso que sua concentração possa ser considerada constante.

Assim, na reação:

A seria o reagente de cuja concentração a velocidade da reação depende segundo uma equação de primeira ordem; B seria o catalizador ou o reagente em excesso.

Se a concentração de A for a e de B for b e se x é a variação da concentração de A no tempo t , pode-se escrever:

$$\frac{dx}{dt} = k_r (a-x) (b-x)^n,$$

sendo k_r a constante de velocidade da reação.

Levando em conta o que foi dito em relação a B e verificando-se que $n = 1$:

$$\frac{dx}{dt} = k_r b (a-x),$$

Integrando

$$\ln \frac{a}{a-x} = k_r b t \quad (9)$$

Espectrofotometricamente, uma vez que se tem a correspondência entre absorção e concentração, pode-se deduzir:

$$A_t = (a-x).d \cdot E_{(A)} + b.d \cdot E_{(B)} + x.d \cdot E_{(P)} \quad (10),$$

sendo A_t a absorvância no tempo t .

Visto que A_0 ($x=0$, $t=0$) e A_{∞} ($x=a$, $t=\infty$), podem ser expressas respectivamente como:

$$A_0 = a.d \cdot E_{(A)} + b.d \cdot E_{(B)} \quad (11) \text{ e}$$

$$A_{\infty} = a.d \cdot E_{(P)} + b.d \cdot E_{(B)} \quad (12),$$

de (10), (11) e (12), segue-se que:

$$x = a \cdot \frac{A_t - A_0}{A_t - A_{\infty}}$$

A substituição para o valor de x na equação (9) dá:

$$\ln \frac{A_{\infty} - A_0}{A_{\infty} - A_t} = k_r b t,$$

ou seja,

$$\ln (A_{\infty} - A_t) = -k_r b t + \ln (A_{\infty} - A_0)$$

No caso em que se acompanha a reação no comprimento de onda em que a substância reagente tem absorção máxima, caindo, portanto, com o tempo, a equação fica:

$$\ln (A_t - A_{\infty}) = -k_r b t + \ln (A_0 - A_{\infty})$$

Portanto, para uma reação catalisada, projetando $\ln (A_t - A_{\infty})$ em função do tempo obter-se-á uma reta cujo coeficiente angular será $-k_r [\text{cat}]$, de onde se pode calcular o valor de k_r .

Se a reação ocorre também em ausência de catalisador (reação "espontânea"), êsse efeito pode ser descontado da reação catalisada, acompanhando-se simultaneamente a reação espontânea. De fato, para o coeficiente angular da reação total, tem-se:

$$m = k_{\text{cat}} [\text{cat}] + k_{\text{esp}} [\text{outros catalizadores}]$$

As retas foram traçadas aplicando-se o método dos quadrados mínimos, com o emprego de um computador eletrônico.

4. Determinação de parâmetros termodinâmicos e de ativação.

a. Estudo de complexos moleculares

Determinando a constante de associação de um complexo molecular a diferentes temperaturas e aplicando as relações conhecidas da termodinâmica tem-se:

$$\Delta G = - RT \ln k \quad (13)$$

$$\Delta H = R \left(\frac{T_2 T_1}{T_2 - T_1} \right) \ln \frac{K_2}{K_1} \quad (14)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (15)$$

Calcula-se assim a energia livre, a entalpia e a entropia de formação do complexo.

b. Estudo cinético de uma reação

i. Energia de ativação

A energia de ativação é determinada medindo-se a velocidade de reação a diferentes temperaturas e empregando a equação de Arrhenius.

$$\ln k_r = - \frac{E_a}{RT} + C$$

A projeção de $\ln k_r$ versus $1/T$ fornece uma reta cujo coeficiente angular é $-E_a/R$, donde se calcula E_a .

ii. Entalpia e entropia de ativação

A equação para a constante de velocidade estabelecida pela

teoria do estado de transição é:

$$K_r = \frac{kT}{h} \cdot e^{-\Delta H^\ddagger/RT} \cdot e^{\Delta S^\ddagger/R}$$

permitindo calcular a entropia de ativação da reação uma vez que, para reações em solução, tem-se para a entalpia de ativação

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

onde E_a é a energia de ativação calculada pela equação de Arrhenius.

III. TRANSFERÊNCIA DE HIDROGÊNIO ENTRE AS FORMAS OXIDADA E REDUZIDA DOS COENZIMAS PIRIDÍNICOS E SEUS MODELOS.

A. Introdução

A transferência de hidrogênio entre as formas oxidada e reduzida dos coenzimas piridínicos tem sido exaustivamente estudada. Do ponto de vista biológico a sua importância se manifesta no controle das quantidades de NADH e NADPH, uma vez que se atribuem diferentes funções a ambos os coenzimas; NADH teria importância primordial nas oxidações biológicas, enquanto que o papel de NADPH se ligaria fundamentalmente às biossínteses redutoras⁽³¹⁾.

Assim sendo, todos os processos — in vitro ou in vivo — que permitam detectar a oxidação de um coenzima piridínicos em estado reduzido às custas de outro em estado oxidado constituem-se potencialmente em fonte de informações para o estudo do problema acima referido.

O assim chamado processo de transhidrogenação pode ocorrer enzimaticamente através de diferentes mecanismos.

Existem enzimas ou sistemas enzimáticos cuja função primordial é outra que não a de promover transferência de hidrogênio de um coenzima a outro, porém que podem, secundariamente, catalizar esse processo⁽³²⁻³⁵⁾. Os cofatores atuando nessas transhidrogenações são variados.

São, porém, ao lado desses casos, conhecidos processos de transhidrogenação enzimática nos quais ocorre uma transferência direta de hidrogênio entre os coenzimas piridínicos. As enzimas que catalisam esta transferência já foram detectadas em bactérias⁽³⁶⁻⁴¹⁾ e em vários órgãos de mamíferos⁽⁴²⁻⁴⁴⁾.

Tem-se ciência ainda de reações de transhidrogenação para cuja ocorrência é necessário o fornecimento de energia⁽⁴⁵⁻⁵⁶⁾, podendo esta ser formada por ATP ou outras vias, indicando a possibilidade da formação de compostos intermediários ricos em energia

não fosforilados^(49,51,53). Isto abre perspectivas para se propor mecanismos análogos em outros processos.

Quanto a proposição de que a mesma enzima esteja envolvida nos processos energeticamente distintos, algumas evidências parecem sugerir que seria realmente êsse o caso. Assim, por exemplo na redução de NADP^+ por NADH verificou-se que, tanto na reação dependente de energia, como na não dependente, a transferência de hidrogênio ocorre do lado A do NADH para o lado B do NADP ^(50-52,54,56). Isso contribui para eliminar qualquer dúvida de que possa se tratar da transferência de grupamento fosfato ou outro qualquer. Pôde-se observar, também, que ambas as reações são inibidas por um anti-corpo específico para uma transhidrogenase pura não dependente de energia^(50,54), por triiodotironina e tiroxina^(44,46,47,50) e que ambas possuem energia de ativação relativamente alta^(46,50).

Essa mesma estereo-especificidade, descrita para reações ocorrendo em mitocôndrias, foi também verificada para a redução dependente de luz de NADP^+ por NADH por cromatóforos de Rhodospseudomonas spheroides⁽⁵⁶⁾.

Outros estudos, ainda, indicam diferentes especificidades e intensidades das reações das diferentes transhidrogenases conhecidas, em relação a derivados de NAD^+ .

Assim, a transhidrogenase isolada de Pseudomonas fluorescens⁽³⁶⁾ catalisa a interconversão:

e ainda as seguintes reações^(37,38):

De Chromatium⁽⁵⁵⁾ foi isolada e purificada uma transhidrogenase que promove a transhidrogenação entre NADPH e NAD^+ . Além

dessa, efetua ainda as reações (2) e (3), podendo utilizar ainda tionicotinamida- NAD^+ e deamino- NADH . Essa enzima, assim como a de *Pseudomonas*, catalisa ainda a redução de NMN, não usando ambas, contudo, os 3-acetil derivados como substrato, ao contrário da transhidrogenase presente em tecidos animais que, além de promover as reações (1) e (2)⁽⁴⁴⁾, catalisa, ainda, as seguintes:

A transhidrogenase de tecidos animais não é, no entanto, capaz de reduzir NMN.

Através do exposto pode-se bem avaliar a contribuição para o estudo da ação das transhidrogenases de um exame da interação entre coenzimas piridínicos e seus modelos, mesmo em ausência de enzima, pois os resultados obtidos podem ser úteis para a compreensão do mecanismo de ação das enzimas.

Anteriormente já fôra descrita a transferência de hidrogênio entre as formas oxidada e reduzida⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾. Estudou-se aqui a complexação entre essas formas com vistas ao mecanismo da transferência de hidrogênio nessas transhidrogenações.

B. Resultados

1. Interação entre ClBC e ClBCH

Foi estudada em meio aquoso tamponado (tris 0,25M, pH = 7.0) a interação entre as formas oxidada e reduzida dos modelos dos coenzimas piridínicos.

A alteração espectral observada na solução de mistura na região de comprimento de onda em que o íon de piridínio não absorve e a absorção da dihidropiridina é praticamente negligenciável encontra-se na figura 1. Verifica-se que há uma intensificação na côr da solução de mistura em relação aos componentes isolados, a qual pode ser detetada mesmo visualmente. Esta alteração espectral, por ser instantânea, constitui indicação da presença de um complexo de transferência de carga.

A determinação da constante de estabilidade do complexo foi efetuada pelas variantes de Fujinori e de Foster da equação de Benesi-Hildebrand e também pelo método das diluições.

Os resultados podem ser apreciados na tabela II.

As figuras 2-4 registram as projeções, segundo as equações mencionadas, dos resultados obtidos.

Pode-se deduzir que a extensão de complexação do ClBCH variou de 20 a 50%, aproximadamente, da solução menos concentrada de ClBC para a mais concentrada à temperatura ambiente^e de 10 a 40% à temperatura mais alta.

Os parâmetros termodinâmicos foram avaliados de maneira aproximada devido ao baixo valor da constante de estabilidade. Os valores foram os seguintes:

$$\Delta G = -0,834 \text{ kcal/mol}, \Delta H = -4,83 \text{ kcal/mol e } \Delta S = -13,4 \text{ cal/grau}$$

Fig. 1 - Espectro logarítmico da absorção de CLBOH $1,1 \cdot 10^{-3}$ M em uma solução 0,14 M em CIBC, descontada a absorção devida ao CIBC (curva cheia). A curva pontilhada representa a absorção de uma solução $1,1 \cdot 10^{-3}$ M de CLBOH. Meio: tampão tris 0,25M, pH=7,0.

TABELA II

Estudo espectrofotométrico da interação entre ClBC e ClBCH a pH = 6,92 ^a ^{b,c}

Método	Equação	Temperatura (°C)	λ (m μ)	K (l/mol)	ϵ^d
Benesi-Hildebrand	Fujimori	26,1	440	4,07	$3,0 \cdot 10^2$
Benesi-Hildebrand	Fujimori	26,1	470	2,96	$1,7 \cdot 10^2$
Benesi-Hildebrand	Foster	26,1	440	3,83	$3,1 \cdot 10^2$
diluições	Cilento-Sanioto	25,0	440	5,9	-
Benesi-Hildebrand	Fujimori	45,9	440	2,46	$4,5 \cdot 10^2$
Benesi-Hildebrand	Fujimori	45,9	470	2,41	$2,0 \cdot 10^2$
Benesi-Hildebrand	Foster	45,9	470	2,46	$2,0 \cdot 10^2$

a) A concentração de ClBC variou de 0,05 a 0,28M, exceto no método das diluições em que o limite inferior foi 0,10M. A concentração de ClBCH foi 0,83mM a 26,1°C e 0,61mM a 45,9°C; b) tampão tris 0,25M; c) a força iônica foi mantida constante pela adição de NaClO₄; d) ϵ_c é a absorptividade molar aparente do complexo, calculada pela equação empregada.

Fig. 2 - Determinação espectrofotométrica da constante de equilíbrio do complexo ClBC-ClBCH pela projeção de Fujimori à temperatura de $26,1^{\circ}\text{C}$. A concentração de ClBCH nas celas foi de $8,5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ e a de ClBC variou de 0,056 a 0,282 M. Meio: tampão tris 0,25M, $\text{pH}=6,92$.

Fig. 3 - Determinação espectrofotométrica da constante de equilíbrio do complexo ClBC-ClBCH pela projeção de Cilento e Sanioto à temperatura de $25,0^{\circ}\text{C}$. A concentração de ClBCH na cela foi de $8,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ e a de ClBC variou de 0,102 a 0,262 M. Meio: tampão tris 0,25M, pH= 6,92 .

Fig. 4 - Determinação espectrofotométrica da constante de associação do per CLBOH pela projeção de Fujimori, à temperatura de 45,9°C. A concentração de CLBOH nas células foi de $8,1 \cdot 10^{-4}$ M e a de CLBO variou de 0,056 a 0,288 M. Meio: tampão tris 0,25 M, pH=6,92.

2. Interação entre NAD^+ e NADH

O estudo da mistura em solução aquosa tamponada (tris 0,25M, pH = 7,2) dos coenzimas piridínicos em suas formas oxidada e reduzida indicou um aumento da absorção relativamente à soma das absorbâncias dos componentes isolados, em região de comprimento de onda em que a absorção da dihidropiridina já se torna desprezível.

O valor da constante de estabilidade foi determinado através do método de Benesi-Hildebrand, utilizando-se as equações de Fujimori e de Foster; o valor praticamente nulo indica uma tendência menor à complexação dos coenzimas comparativamente aos modelos.

Os resultados relativos ao estudo do sistema $\text{NAD}^+ - \text{NADH}$ podem ser apreciados na tabela III e nas figuras 5 e 6.

3. Interação entre $\text{NAD}^+ - \text{ClBCH}$, $\text{ClBC} - \text{NADH}$ e $\text{ABC} - \text{NADH}$

Com o fim de esclarecer as razões estruturais da diferença de comportamento entre os coenzimas e seus modelos, foram feitos estudos compreendendo a interação entre coenzimas e modelos.

Devido ao fato de ocorrerem reações entre os componentes dos sistemas estudados⁽⁵⁸⁾, leituras foram feitas em tempos diferentes, extrapolando-se posteriormente o valor para o tempo zero.

Pôde-se verificar entre NAD^+ e ClBCH , sempre nas condições experimentais já descritas, uma modificação espectral, resultando, porém, nulo o valor da constante de equilíbrio de formação do complexo (Tabela IV, figura 7).

O exame da complexação entre ClBC e NADH e ABC e NADH indicou para ambos os sistemas um comportamento análogo quanto à intensidade de interação, fornecendo para as constantes de estabilidade dos complexos, calculadas pelas formas já citadas, os valores que se encontram na tabela IV (figuras 8 e 9).

Como se pode verificar, êsses valores representam aproximadamente a metade do valor da constante para o sistema ClBC-ClBCH.

Nas condições experimentais usadas (tabela IV), a complexação do NADH foi de 11 a 37% com ClBC e de 14 a 32% com ABC.

TABELA III

Estudo espectrofotométrico da interação entre NAD^+ e $\text{NADH}^{a,c}$ a $\text{pH} = 7,18^b$

Equação ^e	Temperatura (°C)	λ (m μ)	K l / mol	ϵ_c^d
Fujimori	25,8	420	0,33	$6,3 \cdot 10^2$
Fujimori	25,8	440	-	-
Fujimori	25,8	460	-	-
Foster	25,8	420	0,29	-
Fujimori	48,0	420	0,95	-
Fujimori	48,0	440	-	-
Foster	48,0	420	0,93	-

a) A concentração de NADH foi mantida da constante, tendo sido 6,0 mM a 25,8°C e 5,4 mM a 48,0°C; b) idem tabela II; c) a solução original de NAD^+ foi neutralizada pela adição de KHCO_3 em concentração igual ao dobro da concentração de NAD^+ ; d) idem tabela II; e) o método empregado foi sempre o de Benesi-Hildebrand.

Fig. 5 - Determinação espectrofotométrica da constante de associação do par $\text{NAD}^+ - \text{NADH}$ à temperatura de $25,8^\circ\text{C}$ pela projeção de Fujimori. A concentração de NADH nas células foi $6,05 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ e a de NAD^+ variou de 0,111 a 0,534 M. Meio: tampão tris 0,25M, $\text{pH}=7,18$.

Fig. 6 - Determinação espectrofotométrica da constante de associação do par $NAD^+ - NADH$ à temperatura de $48,0^\circ C$ pela projeção de Foster. A concentração de $NADH$ nas células foi $5,4 \cdot 10^{-4} M$ e a de NAD^+ variou de 0,108 a 0,324 M. Meio: tampão Tris 0,25M, $pH=7,18$.

TABELA IV

Estudo espectrofotométrico da interação em sistemas mistos coenzima-modelo à temperatura de 25,0°C

Sistema	a Equação	b pH	[forma reduzida] mM	[forma oxidada]	λ (m μ)	K (l/mol)	ϵ (l.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
NAD ⁺ - CLBCH ^c	Fujimori	7,2	9,74.10 ⁻¹	0,0945-0,221	420	-	-
CLBC-NADH	Fujimori	7,2	3,08	0,0606-0,303	410	1,94	4,0.10 ²
CLBC-NADH	Fujimori	7,2	3,08	0,0606-0,303	420	1,96	3,1.10 ²
CLBC-NADH	Foster	7,2	3,08	0,0606-0,303	410	1,89	4,1.10 ²
CLBC-NADH	Foster	7,2	3,08	0,0606-0,303	420	1,91	3,0.10 ²
ABC-NADH	Fujimori	6,9	6,34	0,096-0,288	440	1,62	2,4.10 ²
ABC-NADH	Foster	6,9	6,34	0,096-0,288	440	1,35	2,7.10 ²

a) O método empregado foi sempre o de Bensei-Hildebrand; b) ídem tabela II; c) ídem tabela III; d) ídem tabela II.

Fig. 7 - Determinação espectrofotométrica da constante de associação do par NAD^+ -CLBCH à temperatura de $25,0^\circ C$ pela projeção de Fujimori. A concentração de CLBCH nas celas foi $9,74 \cdot 10^{-4} M$ e a de NAD^+ variou de 0,095 a 0,221 M. Meio: tampão tris 0,25M, pH=7,2 .

Fig. 8 - Determinação espectrofotométrica da constante de associação do par CLBC-NADH à temperatura de $25,0^{\circ}\text{C}$ pela projeção de Fujimori. A concentração de NADH nas celas foi $3,08 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ e a de CLBC variou de 0,0606 a 0,303 M. Meio: tampão tris 0,25M, $\text{pH}=7,2$.

Fig. 9 - Determinação espectrofotométrica da constante de equilíbrio do complexo ABC-NADH à temperatura de $25,0^{\circ}\text{C}$ pela projeção de Fujimori. A concentração de NADH nas celas foi $6,34 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ e a de ABC variou de 0,096 a 0,288 M. Meio: tampão tris 0,25M, $\text{pH}=7,2$.

C. Discussão

A formação de complexo de transferência de carga por parte do íon de piridínio aqui descrita constitui-se em mais um exemplo da tendência dêsse anel para formar complexos⁽⁶⁰⁻⁶²⁾.

Os baixos valores encontrados para as constantes de estabilidade dos complexos estudados, comparativamente com complexos de derivados de flavinas, podem ser compreendidos se se lembrar que a orbital ocupada de mais alta energia nas dihidropiridinas é ainda uma orbital ligante, enquanto que nas flavinas trata-se de uma orbital antiligante⁽⁶³⁾, fato êsse que explica a grande facilidade de formação de radicais e da auto-oxidação destas últimas.

A verificação espectral da complexação entre ClBC e ClBCH permite sugerir que as forças que atuam para essa complexação são, entre outras, de transferência de carga.

O fato de se constatar a existência da transferência de carga entre NAD^+ e NADH, obtendo-se, porém, para êsse sistema, um valor nulo da constante de equilíbrio, vem demonstrar que, em relação aos modelos, os coenzimas manifestam menor tendência à complexação, revelando a influência da diferença estrutural entre os componentes dos dois sistemas.

Os estudos com os sistemas mistos NAD^+ e ClBCH, ClBC e NADH e ABC e NADH vêm elucidar que a maior relutância em complexar é devida ao NAD^+ , fato êsse cuja explicação pormenorizada se constitui no tema do próximo capítulo dêste trabalho.

Os valores das constantes de estabilidade dos complexos entre ClBC e NADH e ABC e NADH, quando se revelam como muito perto da metade da constante para o complexo entre ClBC e ClBCH, sugerem a dificuldade estatística da complexação de NADH em comparação com ClBCH.

Uma vez que se tem conhecimento da estrutura fechada do β -NADH^(21,64-66), onde a base purínica se apresenta relativamente

paralela e próxima do anel dihidropiridínico, pode-se concluir que apenas um dos lados do anel se encontra desimpedido para interagir através da transferência de carga com a outra entidade complexante.

É conhecido o fato de que, tanto no processo enzimático de transhidrogenação^(40,50-52,54,56), como no não catalisado⁽⁵⁹⁾, o hidrogênio transferido se encontra no carbono 4 do anel dihidropiridínico, antes e depois da reação. Mostrou-se possível, então, estudar a complexação entre a forma reduzida e oxidada de uma mesma substância, pois os reagentes eram sempre regenerados.

A existência de uma complexação entre NADH e NAD^+ , NADPH e NADP^+ e 1-n-propil-1,4-dihidronicotinamida e cloreto de 1-n-propil-3-carboxamidapiridínio foi descrita por Ludowieg e Levy⁽⁶⁷⁾ praticamente ao mesmo tempo em que eram publicados os nossos resultados⁽⁶⁸⁾.

A admissão da possibilidade de interação, parcialmente por forças de transferência de carga, entre as formas oxidada e reduzida dos coenzimas piridínicos e seus modelos e a conceituação de que, para que haja êsse tipo de interação, torna-se necessária uma certa justaposição entre ambos os anéis envolvidos, permite a sugestão de um mecanismo para o processo de transhidrogenação, enzimático ou não, o qual poderia ocorrer via a formação intermediária de um complexo de transferência de carga. Essa formação intermediária poderia favorecer a reação.

Tratando-se da reação enzimática, uma vez aceito êsse mecanismo e conhecendo-se a especificidade estérica da transhidrogenase envolvida pode-se propor a configuração absoluta dos dois coenzimas na superfície da enzima.

Se os dois coenzimas interagem com a mesma estereo-especificidade, então a formação intermediária do complexo indicaria que os dois grupos carboxamida apontam em direções opostas. Assim, para

a transhidrogenase simétrica de Kaplan⁽⁴⁰⁾ e cols., levando em conta também que a estereoespecificidade é do tipo B, ter-se-ia:

Por outro lado, se os coenzimas envolvidos interagem com estereoespecificidade diferente, então a formação de complexo requer que os dois grupamentos -CONH_2 apontem na mesma direção. Nesse mesmo sentido, levando em conta que, na transhidrogenação entre NADH e NADP^+ ^(50-52, 54, 56), a enzima catalisa a transferência de hidrogênio da posição A do NADH para a posição B do NADP^+ , ter-se-á:

IV. INTERAÇÃO INTERNA NOS COENZIMAS PIRIDÍNICOS

A. Introdução

A simples construção de modelos para a estrutura normal dos piridinodinucléótidos (com a ligação nicotinamida-ribose através da configuração β do açúcar) mostra que as bases purínica e piridínica podem se aproximar, com possibilidade de coplanaridade e mesmo de justaposição, acarretando esta última uma estrutura fechada⁽⁶⁹⁾.

Diversos fatos indicam que os coenzimas piridínicos, seja na forma reduzida, como na oxidada, possuem uma tal estrutura.

Os fatos em favor da conformação fechada para o NAD^+ são os seguintes:

- (i) a ação de pirofosfatase resulta numa hiper-cromicidade na região de absorção máxima de adenina e do íon de piridínio (260-270 m μ), indicativa da destruição de ponte de hidrogênio na estrutura original⁽²¹⁾;
- (ii) o estudo comparativo da adição de cianeto em meio aquoso a certos derivados substituídos do íon de 1-metilpiridínio e de NAD^+ mostra que a ação desse reagente sobre 1-metil-3-etoxicarbonil-piridínio implica na hidrólise do éster; isto não se passa no correspondente derivado de NAD^+ . Uma explicação parcial para essas observações constituir-se-ia no efeito estérico protetor promovido pelo restante da molécula de NAD^+ ⁽⁷⁰⁾;
- (iii) elevando-se o pH observa-se o desaparecimento da fluorescência do derivado 5-amino- NAD^+ , indicativo de que a remoção do próton do N_1 da adenina (cujo pK é 3,7) favorece a interação entre o anel piridínico e o anel adenínico⁽⁷¹⁾;
- (iv) mais recentemente, medidas de ressonância magnética nuclear mostram deslocamentos químicos cuja interpretação se adequa bem

com a formulação de uma complexação interna^(69,72). Pôde-se mesmo calcular os parâmetros termodinâmicos do complexo.

A natureza das forças atuando para a manutenção dessa estrutura deve variar, certamente, com o estado de oxidação; assim, no que se refere à contribuição das forças de transferência de carga, esta só pode ser esperada no caso da forma oxidada. De fato, a parte adenínica da molécula dos coenzimas é boa doadora de elétrons e, como tal, poderia interagir com o anel de piridínio que é um bom receptor, mas não com o anel dihidropiridínico, que é doador⁽¹⁾.

A interação interna em NAD^+ poderia constituir-se numa explicação da dificuldade que êsse coenzima manifesta em se complexar, quando comparado com ClBC.

Mostrou-se, por isso, interessante um exame de uma possível interação por transferência de carga entre as partes componentes de NAD^+ , isto é, entre íons de piridínio e derivados adenínicos.

B. Resultados

1. Interação entre ClBC e adenosina

A presença de ClBC $1,27 \cdot 10^{-2}$ M altera a curva espectral de absorção ultravioleta da adenosina na região de maiores comprimentos de onda (fig. 10); nota-se a presença de uma nova banda de absorção com máximo oculto. Os valores das constantes de associação determinados com base nessas alterações espectrais e em diferentes condições experimentais (figs. 11-14) acham-se na tabela V.

A extensão de complexação da adenosina variou de 11 a 38% à temperatura ambiente • da mesma forma à temperatura mais alta.

Pode-se observar que a constante de complexação é baixa e praticamente não influenciada pela temperatura, fatos estes indicativos de variação pequena ou nula nos parâmetros termodinâmicos ($\Delta G = -0,4$ kcal/mol, $\Delta H = -0,6$ kcal/mol, $\Delta S \approx 0$ cal/grau)

2. Interação entre ClBC e ADP

A interação por transferência de carga entre ClBC e ADP pode ser observada na figura 15.

Os resultados relativos às medidas da constante de equilíbrio encontram-se nas figuras 16 e 17 e na tabela VI.

Verifica-se que a associação de ClBC com ADP é bem mais pronunciada que com adenosina, tendo a extensão da complexação do ADP variado de 18 a 52%.

3. Efeito de fosfatos sobre substâncias e sistemas estudados.

Ions de fosfato inorgânico aumentam a absorção de β -NAD⁺ acima de 295 m μ ⁽⁷³⁾. No entanto, êsse efeito não se faz sentir quando se procura estudá-lo sobre as partes componentes de NAD⁺.

Acima de 300 m μ , fosfato inorgânico (1,5M) não altera a

absorção de ClBC, adenosina ou ADP isolados e nem dos sistemas ClBC - adenosina e ClBC - ADP.

A fim de eliminar a possibilidade de participação do açúcar na interação com ClBC, foi estudada a interação no sistema ClBC - glicose - 1-fosfato, constatando-se a não ocorrência da mesma na região de 290 - 350 $m\mu$, nas condições empregadas (ClBC $1,25 \cdot 10^{-2}$ M, glicose-1-fosfato $2,5 \cdot 10^{-2}$ M em água e em tampão tris 0,25 M, pH = 6,87).

Fig. 10 - Espectro de absorção de uma solução de adenosina $4,1 \cdot 10^{-3} M$ em presença de ClBC $1,27 \cdot 10^{-2} M$, descontada a absorção de ClBC (linha cheia) . A linha pontilhada representa a absorção de uma solução $4,1 \cdot 10^{-3} M$ de adenosina. Meio: tampão tris $0,25 M$, $pH=7,18$.

TABELA V

Estudo espectrofotométrico da interação entre ClBC e Adenosina^a

Equação ^b	Temperatura (°C)	pH ^c	λ (m μ)	K (l/mol)	ϵ ^d (C)
Fujimori	24,2	7,00	325 ^e	2,05	$1,7 \cdot 10^2$
Fujimori	24,2	7,00	330 ^e	2,52	$1,1 \cdot 10^2$
Fujimori	24,2	7,00	335 ^e	1,97	$1,1 \cdot 10^2$
Foster	24,2	7,00	325 ^e	2,34	$1,6 \cdot 10^2$
Foster	24,2	7,00	330 ^e	2,44	$1,2 \cdot 10^2$
Foster	24,2	7,00	335 ^e	2,18	$1,0 \cdot 10^2$
Fujimori	25,0	7,18	325 ^f	2,50	$1,4 \cdot 10^2$
Fujimori	25,0	7,18	330 ^f	2,40	$1,1 \cdot 10^2$
Foster	25,0	7,18	325 ^f	2,29	$1,5 \cdot 10^2$
Foster	25,0	7,18	330 ^f	2,22	$1,2 \cdot 10^2$
Fujimori	43,1	7,00	325 ^e	2,34	$1,2 \cdot 10^2$
Fujimori	43,1	7,00	330 ^e	2,18	$1,1 \cdot 10^2$
Fujimori	43,1	7,00	335 ^e	2,05	$0,9 \cdot 10^2$
Foster	43,1	7,00	325 ^e	1,97	$1,4 \cdot 10^2$
Foster	43,1	7,00	330 ^e	2,01	$1,1 \cdot 10^2$
Foster	43,1	7,00	335 ^e	1,80	$1,0 \cdot 10^2$
Fujimori	43,6	7,25	325 ^f	2,41	$1,3 \cdot 10^2$
Fujimori	43,6	7,25	330 ^f	2,34	$1,10 \cdot 10^2$
Foster	43,6	7,25	325 ^f	2,05	$1,5 \cdot 10^2$
Foster	43,6	7,25	330 ^f	2,14	$1,1 \cdot 10^2$

a) A concentração da adenosina foi mantida fixa (7,0 mM) e a de ClBC foi variada de 0,056 a 0,282 M; b) o método empregado foi sempre o de Benesi-Hildebrand; c) tampão Tris 0,25 M; d) idem tabela II; e) experiência feita com lâmpada de tungstênio; f) experiência feita com lâmpada de mercúrio.

Fig. 11 - Determinação espectrofotométrica da constante de equilíbrio para a interação ClBC-adenosina à temperatura de 24,2°C pela projeção de Fujimori. A concentração de adenosina nas celas foi $7,0 \cdot 10^{-4}$ M e a de ClBC variou de 0,056 a 0,262 M. Meio: tampão tris 0,25M, pH=7,00 .

Fig. 12 - Determinação espectrofotométrica da constante de estabilidade do complexo ClBC-adenosina à temperatura de 25°C e $\text{pH} = 7.18$ pela projeção de Foster. As demais condições experimentais são as mesmas da figura 11.

Fig. 13 -- Determinação espectrofotométrica da constante de estabilidade do complexo CLBC-adenosina à temperatura de 48,1°C pela projeção de Fujimori. As demais condições experimentais são as mesmas da figura 11.

Fig. 14 - Determinação espectrofotométrica da constante de estabilidade do complexo ClBC-adenosina à temperatura de $43,6^\circ\text{C}$ e $\text{pH}=7,25$ pela projeção de Foster. As demais condições experimentais são as mesmas da figura 11 .

Fig. 15 - Espectro logarítmico da absorção de uma solução $4,1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ de ADP em presença de ClBC $1,27 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, descontada a absorção do ClBC (curva cheia). A curva pontilhada representa a absorção de uma solução $4,1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ de ADP. Meio: tampão tris $0,25 \text{ M}$, $\text{pH}=7,3$.

TABELA VI

Estudo espectrofotométrico da interação entre CLBC e ADP^a

Equação ^b	Temperatura (°C)	pH ^c	λ ^d (m μ)	K (l/mol)	ϵ (C)
Fujimori	24,2	7,66	330	4,85	$1,0 \cdot 10^2$
Fujimori	24,2	7,66	335	4,77	$0,8 \cdot 10^2$
Foster	24,2	7,66	330	4,51	$1,1 \cdot 10^2$
Foster	24,2	7,66	335	4,51	$0,8 \cdot 10^2$
Fujimori	26,0	7,25	330	3,88	$1,2 \cdot 10^2$
Fujimori	26,0	7,25	335	3,60	$0,9 \cdot 10^2$
Foster	26,0	7,25	330	3,86	$1,2 \cdot 10^2$
Foster	26,0	7,25	335	3,79	$0,9 \cdot 10^2$

a) A concentração de ADP foi mantida fixa (4,1 mM) e a de CLBC variou de 0,0564 a 0,282M; b) ídem tabela V; c) ídem tabela V; d) experiências feitas com lâmpada de mercúrio; e) ϵ (C) é a absorptividade molar aparente do complexo, calculada pela equação empregada.

Fig. 16 - Determinação espectrofotométrica da constante de associação do par CLBC-ADP à temperatura de $24,2^\circ\text{C}$ pela projeção de Foster. A concentração de ADP nas celas foi $4,1 \cdot 10^{-3}\text{M}$ e a de CLBC variou de 0,056 a 0,282 M. Meio: tampão tris 0,25M, $\text{pH}=7,66$.

Fig. 17 - Determinação espectrofotométrica da constante de associação do par ClBC-ADP à temperatura de $26,0^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=7,25$, pela projeção de Fujimori. As demais condições experimentais são as mesmas da figura 16 .

C. Discussão

A observação aqui feita de que o íon de piridínio complexo com derivados adenínicos pode, muito plausivelmente ser estendida ao próprio NAD^+ ; levando em conta fatores de natureza estatística pode-se supor que essa complexação seja intra-molecular no coenzima intacto, o que, por sua vez, constitui forte indicação em favor da conformação fechada do coenzima.

Quanto à natureza das forças envolvidas na complexação, a existência de uma nova banda de absorção claramente indica a ocorrência de forças de transferência de carga. Entretanto, a contribuição dessas forças deve ser relativamente pequena. Presumivelmente, forças hidrofóbicas teriam importância: de fato, o valor praticamente nulo de ΔH vem indicar que a complexação é devida essencialmente a um efeito entrópico, resultante da dessolvatação dos complexantes no instante da associação, tal como ocorre nas interações hidrofóbicas.

No coenzima, como foi citado, haveria também contribuição de ponte de hidrogênio.

Em relação ao efeito de fosfato, pôde-se observar que ele é exercido sobre NAD^+ mas não sobre os sistemas ClBC-adenosina e ClBC-ADP. A ocorrência de um aumento de absorção apenas no caso do $\beta\text{-NAD}^+$ seria explicável admitindo-se que fosfato interferiria na conformação do coenzima, alterando-a de modo a adquirir uma estrutura mais móvel, diminuindo o efeito hipocômico e aumentando a transferência de carga.

V. HIDRATAÇÃO DAS FORMAS REDUZIDAS DOS COENZIMAS PIRIDÍNICOS E SEUS MODELOS

A. Introdução

A instabilidade em meio ácido da forma reduzida dos coenzimas piridínicos é de longa data conhecida⁽⁷⁴⁻⁷⁹⁾. Desde Haas⁽⁸⁰⁾, que foi o primeiro a acompanhar espectrofotometricamente a reação, muitos pesquisadores vêm estudando o problema, tentando isolar os produtos e elucidar o mecanismo do processo.

Com esta finalidade as mais variadas técnicas analíticas⁽⁸¹⁾, espectrofotométricas⁽⁸²⁻⁸⁴⁾, mais recentemente, de ressonância magnética nuclear^(85,86), dispersão ótica rotatória e dicroísmo circular⁽⁸⁷⁾ vem sendo aplicadas.

Anderson e Berkelhammer⁽⁸¹⁾ foram os primeiros a isolar e analisar uma substância pura, a qual era o principal produto da reação. Esse composto mostrou ser o resultado da adição de uma molécula de água à dupla ligação 5,6 do anel dihidropiridínico da substância modelo 1-benzil-3-acetil-1,4-dihidropiridina.

Estudos mais recentes confirmam a posição da hidroxila para a reação de modelos de NADH em meio ácido ou neutro contendo íons fosfato como sendo no carbono 5^(85,86). Segal e Stein, no entanto, indicam a adição da hidroxila no C₅ de ClBCH⁽⁸⁸⁾.

A cinética da ação do íon de hidrogênio e de ânions polibáricos, os quais catalisam a mesma reação para as substâncias modelos 1-benzil-1,4-dihidronicotinamida⁽⁸⁹⁾ e 1-propil-1,4-dihidronicotinamida⁽⁹⁰⁾ indica que a velocidade de formação do primeiro produto de reação depende da concentração da substância reagente segundo a equação de uma reação de primeira ordem. A reação seria de catálise ácida geral, fato êsse verificável através de projeção de Brønsted.

Alivisatos e cols. efetuaram aprofundado estudo cinético da ação do íon fosfato sobre NADH e traçaram as equações que descreveriam formação e as subseqüentes transformações dos produtos⁽⁸⁴⁾.

Recentes estudos, de Miles e cols., empregando α -e- β -NADH, hipoxantina -NADH e β -NMNH acrescentaram ainda o efeito de epimerização do açúcar ligado à base quando as substâncias são tratadas com ácido ou fosfato⁽⁸⁷⁾.

Por outro lado é também há bastante tempo descrito na literatura um composto denominado NADH-X, cuja formação foi pela primeira vez detetada com NADH, em presença da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase em tampão fosfato⁽⁹¹⁾.

Em trabalhos posteriores, seus descobridores atribuíram a essa substância, através de análise do seu sal de bário, de sua hidrogenação catalítica⁽⁹²⁾ e através do estudo em D_2O ⁽⁹³⁾, a adição de uma molécula de água a dupla ligação 5,6 do anel dihidropiridínico.

De fato, o comportamento espectral do NADH-X é bastante análogo ao do produto ácido primário do NADH, desaparecendo em ambos os casos a banda de 300 m μ e intensificando-se a absorção de luz na região de 280-290 m μ .

Não se trata certamente, da mesma substância, uma vez que são conhecidas diferenças essenciais entre ambas: (i) NADH-X pode ser reconvertido em NADH através de uma enzima, em presença de Mg^{++} e ATP, enquanto que o produto ácido primário não pode;⁽⁹⁴⁾ (ii) NADH-X sustenta o crescimento de uma bactéria, a *Hemophilus parainfluenzae*⁽⁹⁵⁾; (iii) NADH-X pode ser convertido no produto ácido primário por abaixamento do pH, sendo NADH-X sempre obtido em regiões de pH próximas do fisiológico⁽⁹⁴⁾.

Outros autores descreveram posteriormente a formação de NADH-X mesmo em ausência da enzima, bastando a presença de certos ânions polifuncionais tais como fosfato, pirofosfato, citrato⁽⁸²⁾, arsenato^(82,96), ou o amino ácido cisteína⁽⁹⁶⁾.

Estudos cinéticos efetuados por Stock e cols.⁽⁸²⁾, através de via espectrofotométrica levaram êsses autores a sugerir a possi-

bilidade da formação de um intermediário contendo fosfato anteriormente à obtenção do NADH-X. Como esta última substância se forma apenas através da estrutura intacta do coenzima, sugeriram os autores que o NADH-X resultaria da interação do amino grupo da adenina com a dupla ligação 5,6 da dihidropiridina.

A conclusão a que chegaram Stock e cols. foi atingida após um intensivo estudo sistemático em que foi testada a ação das mais diferentes substâncias tais como ânions e cátions inorgânicos, moléculas orgânicas e elementos sobre NADH, NADPH, nicotinamida mononucleotídeo reduzido e diversas substâncias modelos sintéticas.

Outras substâncias orgânicas, ainda, tais como ácidos fracos (ácido sulfuroso, tiofenol, etc.) tiveram seu efeito sobre NADH e modelos estudado por Wallenfels e cols.⁽⁹⁷⁾.

O estudo cinético de Alivisatos e colaboradores⁽⁸⁴⁾ indica como primeiro produto espectrofotometricamente observável pela ação de fosfato, o produto ácido primário, sugerindo êsses autores a formação preliminar de NADH-X como produto intermediário.

Em conclusão, a estrutura do NADH-X não está totalmente elucidada. O mais provável é que essa molécula corresponde à adição de água à dupla ligação 5,6 da NADH; a diferença entre NADH-X e o produto ácido primário de NADH consistiria talvez no fato de que, para a formação dêste, há ainda outra alteração na molécula, qual seja a epimerização no C₁ da ribose ligada ao anel dihidropiridínico.

Com o intuito de oferecer uma contribuição para a elucidação dos problemas acima mencionados, quais sejam, o da ação de ácido e outras substâncias sobre NADH e modelos e a formação de NADH-X, foi efetuada uma série de estudos que podem ser esquematizada da seguinte forma:

1. Ensaios de substâncias que representam uma parte da molécula do coenzima, com o intuito de verificar a possibilidade de auto-catálise ou de interação interna.

2. Ensaio de aminoácidos, péptidos e proteínas, a fim de verificar uma possível relação da eventual catálise com a configuração e a sequência de amino ácidos na enzima GPD, uma vez que é conhecido que o centro ativo daquela enzima possui uma série de grupamentos sulfidríla e que, quando a formação de NADH-X ocorre em aerobiose, a enzima é inativada pela oxidação dos grupamentos -SH a dissulfeto⁽⁹⁸⁾.

3. Ensaio da tiroxina e compostos a ela relacionados, inclusive proteínas iodadas, em vista da observação preliminar de que aminoácidos halogenados eram ativos como catalizadores.

B. Resultados

1. Natureza dos produtos formados

Os substratos estudados foram ClBCH, β -NADH e, ocasionalmente, β -NADPH. O produto da reação catalisada foi identificado espectrofotometricamente com base na posição do máximo de absorção (ao redor de $290\text{m}\mu$) e na absorptividade molar do produto neste máximo (cêrca de 21.10^3).

Estudos das alterações espectrais ocorridas com ClBCH foram efetuados na presença de vários catalisadores em concentração suficientemente baixa, quando necessário, para permitir leituras até $230\text{-}240\text{m}\mu$ na região do ultra-violeta. Essas alterações corresponderam às esperadas para a perda da dupla ligação 5,6 da dihidropiridina, na presença de açúcares fosforilados, e amino-ácidos em geral e também na presença de DIT, BIB, MBI, MIT e 2,6-dibromofenol, de maneira satisfatoriamente quantitativa. Na presença de T_0 , $T_2(\text{Br})$, T_2 , T_3 e T_4 as mesmas alterações puderam ser observadas de maneira qualitativa.

A tabela VII traz uma relação entre a queda de absorção a $355\text{m}\mu$ e o aumento a $290\text{m}\mu$. Os quocientes observados (ao redor de 3) indicam que a dupla C_5C_6 foi saturada. Uma vez que o catalisador foi empregado em quantidade subestequiométrica conclui-se como era de se esperar, que ocorreu adição de água.

A figura 18 ilustra as alterações espectrais sofridas no correr do tempo por ClBCH em presença de DIT. Um espectro diferencial é apresentado na figura 19.

Deve-se notar, em vista da reatividade térmica e fotoquímica de dihidropiridinas⁽⁹⁹⁾, que se poderia esperar a ocorrência concomitante da seguinte reação na catálise por compostos

halogenoaromáticos :

Medidas condutométricas da reação entre ClBCH e 2,6-di
bromofenol permitiram afastar essa hipótese.

TABELA VII

Estudo espectrofotométrico do produto formado pela ação de diversos catalisadores sobre ClBCH

Catalisador	$-\Delta A_{355}$	$+\Delta A_{290}$	$\frac{A_{290}}{\Delta A_{355}}$	tempo aproximado (horas)
fosfato inorgânico	0,486	1,337	2,75	4
glicose-6-P	0,217	0,380	1,75	4
asparagina	0,217	0,504	2,32	4
histidina	0,265	0,606	2,29	4
glicilglicina	0,221	0,579	2,62	4
cisteína	0,623	1,434	2,30	2
glutatião	0,542	1,072	1,98	1
2,6-dibromofenol	0,536	1,452	2,71	21
MBI	0,483	1,305	2,67	21
DIB	0,560	1,515	2,71	21
DIT	0,580	1,630	2,81	21
2-bromofenol	0,560	1,533	2,74	36
2-iodofenol	0,567	1,649	2,91	36
MIT	0,528	1,317	2,49	36
ácido 4-hidroxi-benzóico	0,450	1,203	2,67	21
T ₀	0,609	~1,60	~2,6	40
T ₂ (Br)	0,648	1,584	2,44	40
T ₂	0,632	1,505	2,38	40
T ₃	0,836	0,839	1,00	40
T ₄	0,712	1,180	1,66	40

Fig. 18 - Espectro de absorção de uma solução $1,35 \cdot 10^{-4} M$ de CLBCH em presença de DIT $0,56 \cdot 10^{-4} M$, descontada a absorção de DIT. Curva (I): espectro no tempo zero; curva (II): espectro após cerca de 1 horas. Meio: tampão tris $0,25 M$, $pH=7,1$.

Fig. 19 - Espectro diferencial extraído da figura 18 (curva (II) menos curva (I)).

2. Cinética

Para estudos cinéticos as reações foram acompanhadas por períodos que variaram de cerca de 30 minutos, no caso dos catalisadores mais ativos, até cerca de 48 horas. A concentração do substrato foi usualmente $1 \cdot 10^{-4} M$.

A não ser em casos especificados de forma diferente, o comprimento de onda da radiação usada nos estudos cinéticos foi a correspondente ao λ máximo do substrato.

a. Ensaio de substâncias estruturalmente relacionadas a porções moleculares do coenzima

Procurou-se verificar um eventual efeito catalítico de compostos adenínicos, açúcares, açúcares fosforilados e outras substâncias também fosforiladas. Os resultados qualitativos encontram-se na tabela VIII.

Em vários casos foram efetuados estudos cinéticos; os resultados são apresentados na tabela IX. As figuras 20 e 21 ilustram os resultados obtidos com fosfato inorgânico e glicose-1-fosfato à temperatura ambiente.

A energia de ativação para a reação catalisada por glicose-1-fosfato foi calculada através da projeção do logaritmo da constante de velocidade em função do inverso da temperatura (figura 22). A entalpia e a entropia de ativação foram também calculadas (tabela X).

TABELA VIII

Resultados qualitativos obtidos para a interação entre ClBCH e as substâncias abaixo relacionadas

Substância	Concentração (moles/l)	Resultado da interação
adenina	0,04	-
xantina	0,026	-
cafeína	0,03	-
adenosina	0,03	-
ADP	0,03	+
NAD ⁺	0,03	-
NADH	0,03	-
glicerol	0,06	-
inositol	0,05	-
glicose	0,03	-
galactose	0,03	-
frutose	0,032	-
ribose	0,03	-
metilglicósido	0,03	-
sacarose	0,03	-
gliceraldeído	0,05	+
glicerofosfato de sódio	0,03	+
glicerofosfato de bário	0,012	+

TABELA IX

Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade da catalise de desidratação de ClBCH por açúcares fosforilados^a e fosfatos inorgânicos^b à temperatura de $24,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$

Catalisador	pK	pH	k_1^g (min^{-1})	k_2^h ($\text{l.mol}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
fosfato inorgânico(aerobiose)	6,81 ^e	7,46	$4,58.10^{-2}$	3,34
fosfato inorgânico (anaerobiose)	6,81 ^e	7,48	$5,07.10^{-2}$	3,70
glicose-1-P	6,13 ^f	6,99	$6,25.10^{-4}$	1,04
glicose-1-P ^c	6,13 ^f	7,01	$4,28.10^{-3}$	7,33
glicose-1-P ^d	6,13 ^f	7,05	$3,03.10^{-4}$	0,397
glicose-6-P	6,11 ^f	7,26	$7,90.10^{-4}$	2,40
2-desoxi-glicose-6-P	6,11	7,26	$4,75.10^{-4}$	1,42
galactose-6-P	6,1 ^f	7,26	$8,55.10^{-4}$	2,60
manose-6-P	6,1 ^f	7,32	$1,17.10^{-3}$	4,02
frutose-6-P	6,11 ^f	7,20	$2,02.10^{-3}$	5,37
frutose-2,6-diP	6,3 ^f	7,20	$2,99.10^{-3}$	5,34
ribose-5-P	6,1 ^f	7,25	$2,88.10^{-3}$	8,52

a) A concentração total foi 0,005M. A concentração da forma ácida foi calculada pela equação de Handerson-Hasselbach; b) a concentração total foi 0,075M. A concentração da forma não dissociada foi calculada pela equação de Handerson-Hasselbach; c) a temperatura da experiência foi $46,4^\circ\text{C}$; d) a temperatura da experiência foi $11,6^\circ\text{C}$; e) referência 100; f) referência 101; g) k_1 é constante de velocidade de primeira ordem em relação ao substrato ($k_1 = k_{\text{reação}} \cdot [\text{catalisador}]$); h) k_2 é a constante de velocidade de segunda ordem da reação ($k_2 = k_{\text{reação}} = k_1 / [\text{catalisador}]$). A concentração de catalisador empregada nos cálculos é a da forma não dissociada.

Fig. 20* - Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a catálise de hidratação de CLICH ($\approx 1 \cdot 10^{-4} M$) por fosfato inorgânico (0,075M) em aerobiose, à temperatura de $25,5^{\circ}C$ em tampão tris 0,25M de pH=7,40 .

*NOTA - Esta e todas as outras figuras representativas de determinação da constante de velocidade apresentam a reta obtida pelo método de todos os pontos ocorrendo na solução. A constante de velocidade característica para cada ponto limítrofe foi calculada desmontando-se do coeficiente angular das retas projetadas o valor do coeficiente angular correspondente à reação "exponencial", assumida através de um branco. O valor da diferença constitui-se em k_1 . Este valor, agora, dividido pela concentração da forma não dissociada da catalisadora, fornece k_2 .

Fig. 21 - Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a reação de hidratação de GLBCH ($4.10^{-4}M$) catalisada por glicose-1-fosfato ($0,005M$) à temperatura de $24,5^{\circ}C$ em tampão tris $0,25M$, $pH=6,99$.

Fig. 22 - Determinação experimental da energia de ativação para a reação de hidratação de CLBCH catalizada por glicose-1-fosfato .

TABELA X

Cálculo dos parâmetros de ativação para a catálise de hidratação de CLBCH por glicose-1-fosfato

Experiência	k_2^a ($\text{l.mol}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	$\log k_2$	T ($^{\circ}\text{K}$)	$\frac{1}{T} \cdot 10^3$ ($^{\circ}\text{K}^{-1}$)	$E_a = 14,0 \text{ kcal/mol}$ $\Delta H^\ddagger = 13,4 \text{ kcal/mol}$ $\Delta S^\ddagger = -21,0 \text{ cal/grau}$
1	7,33	0,8653	319,6	3,128	
2	1,04	0,0163	297,7	3,359	
3	0,397	-0,4016	284,2	3,519	

a) k_2 tem o mesmo significado que na tabela IX

b. Ensaio de amino-ácidos, péptidos, proteínas e substâncias relacionadas

Os resultados cinéticos ~~figutam~~ nas tabelas XIa e XIb, sendo que nesta última aparecem as substâncias contendo enxôfre.

As figuras 23-26 ilustram as experiências com glicina, ácido aspártico, cisteína e 2-mercaptoetanol à temperatura ambiente.

A figura 27 apresenta o gráfico empregado para o cálculo da energia de ativação na reação com cisteína. Os parâmetros de ativação dessa reação encontram-se na tabela XII;

TABELA XIa

Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a interação entre ClBCH e β -NADH e as substâncias abaixo relacionadas, em concentração total 0,05M, à temperatura de $26,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$

Substância	pH	k_1^h (min^{-1})	k_2^i ($\text{l.mol}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
ácido propiônico ^a	7,23	$4,79.10^{-4}$	4,38
ácido propiônico ^{a,b}	6,99	$1,08.10^{-5}$	$5,70.10^{-2}$
butilamina	7,27	$2,28.10^{-4}$	$4,56.10^{-3}$
ácido propiônico ^a +butilamina	7,25	$3,56.10^{-4}$	3,42
betaina	7,25	$7,80.10^{-5}$	$1,56.10^{-3}$
glicina	6,98	$2,45.10^{-4}$	$4,90.10^{-3}$
glicina ^b	7,02	$7,10.10^{-6}$	$1,42.10^{-4}$
serina	6,97	$4,51.10^{-4}$	$9,02.10^{-3}$
lisina	6,96	$1,98.10^{-4}$	$3,96.10^{-3}$
prolina	7,00	$2,11.10^{-4}$	$4,22.10^{-3}$
arginina	6,98	$6,25.10^{-4}$	$1,25.10^{-2}$
asparagina	7,22	$4,04.10^{-4}$	$8,30.10^{-3}$
ácido aspártico	7,01	$8,06.10^{-4}$	$1,61.10^{-2}$
ácido aspártico ^b	6,91	$5,05.10^{-5}$	$1,01.10^{-3}$
ácido glutâmico	7,12	$6,00.10^{-4}$	$1,20.10^{-2}$
fenilalanina	6,97	$3,78.10^{-4}$	$7,55.10^{-3}$
D-triptofano ^c	7,19	$2,02.10^{-4}$	$2,02.10^{-2}$

(continua na página seguinte)

(continuação da tabela XIa)

Substância	pH	k_1 (min^{-1})	k_2 ($\text{l.mol}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
D-triptofano ^{b,d}	7,02	$5,04.10^{-5}$	$1,86.10^{-3}$
L-triptofano ^{b,e}	7,02	$9,72.10^{-6}$	$2,08.10^{-3}$
DL-triptofano ^{b,f}	7,01	$1,38.10^{-5}$	$1,53.10^{-3}$
histidina	7,09	$8,72.10^{-4}$	$1,75.10^{-2}$
histidina ^c	7,02	$3,36.10^{-5}$	$6,72.10^{-4}$
glicilglicina	6,97	$5,70.10^{-4}$	$1,23.10^{-2}$
glicilglicina ^c	6,94	$1,56.10^{-5}$	$3,12.10^{-4}$
glicilalanina	7,02	$4,16.10^{-4}$	$8,32.10^{-3}$
albumina humana ^g	7,12	$5,50.10^{-5}$	-
albumina bovina ^g	7,05	$8,63.10^{-5}$	-
γ -globulina ^g	7,15	$4,02.10^{-5}$	-

a) $0,05\text{M}$ é a concentração total da substância. A concentração da forma não dissociada foi calculada pela equação de Handerson-Hasselbach, empregando-se $\text{pK} = 4,57$ (referência 102); b) experiência com $\beta\text{-NADH}$; c) a concentração de triptofano foi $1,01.10^{-2}\text{M}$; d) a concentração de triptofano foi $2,71.10^{-2}\text{M}$; e) a concentração de triptofano foi $4,56.10^{-3}\text{M}$; e) a concentração de triptofano foi $9,0.10^{-3}\text{M}$; g) solução saturada; h) k_1 tem o mesmo significado que na tabela IX; i) k_2 tem o mesmo significado que na tabela IX.

Fig. 23 - Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a reação de hidratação de CLBCH ($1 \cdot 10^{-4} M$) catalisada por glicina (0,05M) à temperatura de $26,0^{\circ}C$ em tampão tris 0,25M, pH=7,25 .

Fig. 24 - Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a reação de hidratação de ClBCH ($\sim 1.10^{-4}$ M) catalisada por ácido aspártico (0,05M) à temperatura de $25,5^{\circ}\text{C}$ em tampão tris 0,25M, $\text{pH}=7,1$.

TABELA XIb

Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a interação entre ClBCH e β -NADH e as substâncias abaixo relacionadas^a, à temperatura de $26,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$

Substância	pK	pH	^g k ₁ (min ⁻¹)	^h k ₂ (l.mol ⁻¹ .min ⁻¹)
metionina	-	7,01	$5,06 \cdot 10^{-4}$	$1,01 \cdot 10^{-2}$
etionina	-	7,02	$6,53 \cdot 10^{-4}$	$1,31 \cdot 10^{-2}$
cisteina	8,13 ^e	7,12	$1,33 \cdot 10^{-2}$	$2,93 \cdot 10^{-1}$
cisteina	8,13	8,25	$7,00 \cdot 10^{-3}$	$3,05 \cdot 10^{-1}$
cisteina ^b	8,13	7,07	$8,45 \cdot 10^{-2}$	1,84
cisteina ^c	8,13	7,09	$4,12 \cdot 10^{-3}$	$8,96 \cdot 10^{-2}$
cisteina ^d	8,13	7,10	$8,10 \cdot 10^{-4}$	$1,78 \cdot 10^{-2}$
glutatião	8,66 ^e	7,07	$1,94 \cdot 10^{-2}$	$3,98 \cdot 10^{-1}$
glutatião	8,66	8,80	$6,10 \cdot 10^{-3}$	$3,38 \cdot 10^{-1}$
glutatião	8,66	9,13	$4,20 \cdot 10^{-3}$	$3,31 \cdot 10^{-1}$
2-mercapto-etanol	9,43 ^f	7,09	$5,95 \cdot 10^{-3}$	$1,19 \cdot 10^{-1}$
2-mercapto-etanol	9,43	9,33	$3,30 \cdot 10^{-3}$	$1,19 \cdot 10^{-1}$
etilmercaptana	-	7,02	$8,40 \cdot 10^{-3}$	$1,68 \cdot 10^{-2}$

a) Todas as experiências foram efetuadas empregando as substâncias em concentração total 0,05 M; b) experiência realizada a $46,0^\circ\text{C}$; c) experiência realizada a $12,0^\circ\text{C}$; d) experiência com NADH; e) referência 103; f) referência 104; g) o significado de k₁ é o da tabela IX; h) o significado de k₂ é o da tabela IX.

Fig. 25 - Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a interação entre ClBCH ($\sim 1.10^{-4} M$) e cisteína ($0.05 M$) à temperatura de $25.0^\circ C$ em tampão tris $0.25 M$, $pH=7.09$.

Fig. 26 - Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a interação entre ClBH ($-1.10^{-4}M$) e 2-mercaptoetanol ($0.05M$) à temperatura de $25.0^{\circ}C$ em tampão tris $0.25M$. $pH=7.09$.

Fig. 7 - Determinação experimental da energia de ativação para a interação entre GLECH e cisteína.

TABELA XII

Cálculo dos parâmetros de ativação para a interação entre ClBCH e cisteína

Experiência	k_2^a (l.mol ⁻¹ .min ⁻¹)	log k_2	T (°K)	1/T.10 ³ (°K ⁻¹)	$E_a = 16,0 \text{ kcal/mol}$ $\Delta H^\ddagger = 15,4 \text{ kcal/mol}$ $\Delta S^\ddagger = 17,2 \text{ cal/grau}$
1	1,84	0,2648	319,2	3,133	
2	0,300	-0,5229	298,7	3,348	
3	0,0897	-1,0472	285,2	3,540	

a) o significado de k_2 é o mesmo que na tabela IX

c. Ensaios de substâncias relacionadas à tiroxina

Os resultados são apresentados nas tabelas XIII-XVII, procurando-se agrupar em cada tabela os compostos estruturalmente mais relacionados. As figuras 28-33 apresentam alguns gráficos representativos.

Nas tabelas XVIII-XXI figuram os resultados a respeito da influência de diferentes fatores, quais sejam, concentração (figura 34), pH, uréia 9M e força iônica sobre a atividade catalítica de DIT.

A energia de ativação para a reação catalisada por DIT foi calculada empregando-se o gráfico da figura 35 ($E_a = 15,5$ kcal/mol).

Duas proteínas contendo grupamentos iodofenólicos, tiroglobulina (figura 36) e caseína iodada foram estudadas (tabelas XXII e XXIII).

A influência do pH sobre a atividade catalítica da iodo-caseína pode ser observada na figura 37.

O cálculo da energia de ativação da reação catalisada pela caseína iodada foi efetuado utilizando-se o gráfico da figura 38. Os parâmetros de ativação para esta e outras reações catalisadas por compostos pertencentes ao grupo aqui estudado encontram-se na tabela XXIV.

Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade da catálise da hidratação de ClBCH e β -NADH pelas substâncias abaixo relacionadas a temperatura de $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$

Catalisador	Concentração ^g (moles/l)	pK	pH	k_1^m (min ⁻¹)	k_2^n (l.mol ⁻¹ .min ⁻¹)
2,6-dibromofenol	$1,53 \cdot 10^{-2}$	6,4 ^h	7,07	$4,90 \cdot 10^{-2}$	19,6
2,4-triodofenol	$4,67 \cdot 10^{-5}$	6,4 ⁱ	6,78	$6,02 \cdot 10^{-4}$	46,5
MBCl	$9,03 \cdot 10^{-3}$	6,1 ^j	6,75	$2,53 \cdot 10^{-2}$	12,9
MBCl	$4,40 \cdot 10^{-2}$	6,1	7,03	$6,03 \cdot 10^{-2}$	13,1
MBCl	$8,80 \cdot 10^{-2}$	6,1	7,76	$3,83 \cdot 10^{-2}$	20,4
MBBr	$7,93 \cdot 10^{-3}$	6,1 ^h	6,78	$2,82 \cdot 10^{-2}$	20,4
MBBr	$1,31 \cdot 10^{-2}$	6,1	7,06	$2,33 \cdot 10^{-2}$	17,0
MBBr	$2,97 \cdot 10^{-2}$	6,1	7,63	$1,59 \cdot 10^{-2}$	18,1
MBI	$5,40 \cdot 10^{-3}$	6,1 ^j	6,78	$2,94 \cdot 10^{-2}$	31,6
MBI	$1,10 \cdot 10^{-2}$	6,1	7,22	$3,07 \cdot 10^{-2}$	39,5
MBI	$1,16 \cdot 10^{-2}$	6,1	7,75	$6,84 \cdot 10^{-3}$	25,1
MBI ^{a,b}	$1,02 \cdot 10^{-2}$	6,1	7,04	$2,94 \cdot 10^{-4}$	0,284
DIB	$5,04 \cdot 10^{-3}$	6,36 ^k	6,81	$3,19 \cdot 10^{-2}$	24,2
DIB	$2,30 \cdot 10^{-2}$	6,36	7,19	$6,51 \cdot 10^{-2}$	22,3
DIB	$1,00 \cdot 10^{-2}$	6,36	7,72	$1,19 \cdot 10^{-2}$	28,5
DIB ^{a,o}	$1,03 \cdot 10^{-2}$	6,36	7,11	$5,59 \cdot 10^{-4}$	0,365
DIT	$1,28 \cdot 10^{-3}$	6,36 ^l	6,85	$1,40 \cdot 10^{-2}$	44,5

(continua na página seguinte)

(continuação da tabela XIII)

Catalisador	Concentração ^g (moles/l)	pK	pH	k_1^m (min ⁻¹)	k_2^n (l.mol ⁻¹ .min ⁻¹)
DIT	$1,10 \cdot 10^{-2}$	6,36	7,12	$4,62 \cdot 10^{-2}$	28,8
DIT	$4,12 \cdot 10^{-3}$	6,36	7,70	$6,51 \cdot 10^{-3}$	36,0
DIT ^d	$3,37 \cdot 10^{-4}$	6,36	6,58	$5,83 \cdot 10^{-3}$	46,1
DIT ^o	$3,06 \cdot 10^{-3}$	6,36	6,99	$1,48 \cdot 10^{-1}$	255
DIT ^f	$2,42 \cdot 10^{-3}$	6,36	7,13	$5,45 \cdot 10^{-3}$	15,2
DIT ^{a,b}	$3,40 \cdot 10^{-3}$	6,36	7,11	$2,70 \cdot 10^{-4}$	0,531

- a) Experiência feita com NADH; b) experiência medida em $\lambda = 340, 350$ e $360 \text{ m}\mu$; c) experiência medida em $\lambda = 350$ e $360 \text{ m}\mu$; d) experiência medida em $\lambda = 406, 408$ e $410 \text{ m}\mu$; e) experiência feita a $45,0^\circ\text{C}$; f) experiência feita a $12,0^\circ\text{C}$; g) o valor na tabela é a concentração total da substância. A concentração da forma ácida foi calculada pela equação de Handerson-Hasselbach; h) referência 105; i) tomado igual ao de 2,6-dibromofenol; j) tomado igual ao de MBBr; k) tomado igual ao de DIT; l) referência 17; m) k_1 tem o mesmo significado que na tabela IX; n) k_2 tem o mesmo significado que na **tabela IX**.

Fig. 28 - Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a reação de hidratação de CLBCH ($\sim 1 \cdot 10^{-4} M$) catalisada por 2,6-dibromofenol ($1,53 \cdot 10^{-3} M$) à temperatura de $28,5^{\circ}C$ em tampão tris $0,25M$, $pH=7,07$.

Fig. 29 - Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a reação de hidratação de ClBCH ($\sim 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) catalisada por MBCL ($4,40 \cdot 10^{-2} \text{ M}$) à temperatura de $25,5^\circ \text{C}$ em tampão tris $0,25 \text{ M}$, $\text{pH}=7,03$.

TABELA XIV

Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade da catálise de hidratação de ClBCH e β - NADH pelas substâncias abaixo à temperatura de $25,5 \pm 0,5$ °C

Catalisador	concentração ^c (moles/l)	pK	pH	^f k_1 (min ⁻¹)	^g k_2 (l.mol ⁻¹ .min)
2-bromofenol	$6,06 \cdot 10^{-2}$	8,44 ^d	7,20	$2,19 \cdot 10^{-2}$	0,397
2-bromofenol	$3,06 \cdot 10^{-2}$	8,51 ^d	7,10	$1,18 \cdot 10^{-2}$	0,405
MIT	$2,40 \cdot 10^{-2}$	8,20 ^e	6,80	$1,87 \cdot 10^{-2}$	0,812
MIT	$2,20 \cdot 10^{-2}$	8,20	7,00	$1,45 \cdot 10^{-2}$	0,700
MIT	$2,73 \cdot 10^{-2}$	8,20	7,69	$1,39 \cdot 10^{-2}$	0,667
MIT ^{a,b}	$2,43 \cdot 10^{-2}$	8,20	7,12	$3,57 \cdot 10^{-4}$	0,0153

- a) Experiência feita com NADH; b) experiência feita com $\lambda = 350$ e $360 \text{ m}\mu$; c) o valor na tabela é a concentração total da substância. A concentração da forma ácida foi calculada pela equação de Handerson-Hasselbach; d) referência 106; e) referência 19; f) o significado de k_1 é o mesmo da tabela IX; g) o significado de k_2 é o mesmo da tabela IX.

Fig. 30 - Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a reação de hidratação de ClBCH ($\sim 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) catalisada por MIT ($2,40 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) à temperatura de $26,5^{\circ}\text{C}$ em tampão tris $0,25 \text{ M}$, $\text{pH}=6,80$.

TABELA XV

Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a catálise de hidratação de ClBCH e β -NADH pela substância abaixo relacionadas à temperatura de $26,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$

Catalisador	Concentração (moles/l)	pH	k_1^c (min^{-1})	k_2^d ($\text{l.mol}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
ácido-4-hidroxibenzóico	0,05	7,22	$4,20.10^{-3}$	$8,39.10^{-2}$
" "	0,05	7,85	$3,32.10^{-3}$	$6,63.10^{-2}$
" "	0,05	6,84	$5,60.10^{-3}$	$1,1.10^{-1}$
" ^a	0,05	6,92	$8,65.10^{-5}$	$1,73.10^{-3}$
tirosina	$4,59.10^{-3}$	7,82	$2,13.10^{-4}$	$4,65.10^{-2}$
"	$3,84.10^{-3}$	6,92	$1,67.10^{-4}$	$6,70.10^{-2}$
"	$1,99.10^{-2}$	10,11	$5,61.10^{-4}$	$6,70.10^{-2}$
tironina	$1,95.10^{-3}$	6,82	$3,90.10^{-4}$	0,200
"	$1,63.10^{-3}$	7,02	$,59.10^{-5}$	0,159
"	$3,65.10^{-3}$	7,9	$8,03.10^{-4}$	0,220
tironina ^a	$5,81.10^{-4}$	7,01	$6,27.10^{-6}$	$1,08.10^{-2}$

- a) Experiência com NADH; b) o valor na tabela é a concentração total de substância. A concentração da forma ácida foi calculada pela equação de Handerson-Hasselbach tomando-se para as substâncias o pK indicado na referência 17 (9,97 para tirosina e 9,55 para tironina; c) o significado de k_1 é o mesmo da tabela IX; d) o significado de k_2 é o mesmo da tabela IX.

Fig. 31 - Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a reação de hidroxilação de GIBCH ($\sim 1 \cdot 10^{-4} \text{M}$) catalisada por tirosina ($4,59 \cdot 10^{-3} \text{M}$) à temperatura de $28,0^\circ\text{C}$ em tampão tris $0,15 \text{M}$, $\text{pH} \sim 7,82$.

Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade dada para a catálise de hidratação de CLBCH, β -NADH e β -NADPH pelas substâncias abaixo relacionadas à temperatura de $26,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$

Catalisador	Concentração ^f (moles/l)	pH	k_1^g (min^{-1})	k_2^h ($\text{l.mol}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
$T_2(\text{Br})$	$1,30.10^{-4}$	6,85	$2,22.10^{-4}$	1,71
$T_2(\text{Br})$	$1,25.10^{-4}$	7,16	$1,96.10^{-4}$	1,57
$T_2(\text{Br})$	$1,36.10^{-4}$	7,74	$1,71.10^{-4}$	1,26
T_2	$1,20.10^{-4}$	6,77	$2,14.10^{-4}$	1,78
T_2	$1,39.10^{-4}$	7,11	$6,41.10^{-4}$	4,61
T_2	$2,36.10^{-4}$	7,69	$1,11.10^{-3}$	4,71
T_2^a	$1,77.10^{-4}$	8,75	$4,11.10^{-4}$	3,00
T_2	$2,63.10^{-4}$	8,94	$3,08.10^{-4}$	1,70
T_2^a	$1,39.10^{-4}$	7,18	$6,53.10^{-5}$	$4,70.10^{-1}$
T_3	$1,91.10^{-4}$	6,77	$1,86.10^{-3}$	10,1
T_3	$1,97.10^{-4}$	7,20	$2,56.10^{-3}$	13,7
T_3	$1,57.10^{-4}$	7,75	$2,03.10^{-3}$	15,5
T_3^b	$1,74.10^{-4}$	6,76	$1,58.10^{-3}$	9,41
T_3^a	$2,08.10^{-4}$	7,17	$2,00.10^{-4}$	1,01
T_4	$1,94.10^{-5}$	6,80	$4,15.10^{-4}$	39,6
T_4	$1,13.10^{-5}$	7,06	$2,70.10^{-4}$	74,8
T_4	$2,01.10^{-5}$	7,02	$4,00.10^{-4}$	58,6
T_4^a	$2,25.10^{-5}$	7,15	$1,78.10^{-4}$	28,8
$T_4^{a,c}$	$4,51.10^{-5}$	6,99	$2,80.10^{-4}$	17,5
$T_4^{c,e}$	$4,84.10^{-5}$	6,98	$1,02.10^{-3}$	59,0
$T_4^{c,e}$	$4,16.10^{-5}$	6,95	$2,33.10^{-4}$	14,6

a) Experiência feita com NADH; b) experiência feita em anaerobiose; c) experiência feita a $38,0^\circ\text{C}$; d) experiência feita a $48,5^\circ\text{C}$; e) experiência feita com NADPH; f) o valor na tabela é a concentração total da substância. A concentração de forma ácida foi calculada pela equação de Handerson-Hassalbach tomando-se os valores de pK na referência 17(9,29 para $T_2(\text{Br})$ e T_2 ; 8,45 para T_3 e 6,73 para T_4); g) o significado de k_1 é o mesmo da Tabela IX h) o significado de k_2 é o mesmo da tabela IX.

Fig. 32 - Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a reação de hidratação de CLBCl ($\sim 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) catalisada por diiodotironina ($1,39 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) à temperatura de $27,0^\circ\text{C}$ em tampão tris $0,25\text{M}$, $\text{pH}=7,11$.

Fig. 33 - Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a reação de hidratação de GIBCH ($\sim 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) catalisada por triiodotironina ($1,97 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) à temperatura de $27,0^\circ\text{C}$ em tampão tris $0,25 \text{ M}$, $\text{pH}=7,20$.

TABELA XVII

Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a interação entre ClBCH e as substâncias abaixo relacionadas, a temperatura de $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$

Substância	Concentração (moles/l)	pH	k_1^b (min^{-1})	k_2^c ($\text{l.mol}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
ácido monoiôdo- acético	$0,05^a$	7,06	$7,20.10^{-4}$	125
iôdobenzeno	$1,02.10^{-3}$	7,08	$6,38.10^{-4}$	0,778
p-iôdoanisol	$2,55.10^{-4}$	7,12	$2,78.10^{-4}$	1,09

- a) A concentração na tabela é a total. A concentração da forma ácida foi calculada pela equação de Handerson-Hasselbach, empregando com $\text{pK} = 3,12$ (referência 101); b) k_1 tem o mesmo significado que na tabela IX; c) k_2 tem o mesmo significado que na tabela IX.

TABELA XVIII

Efeito da variação de concentração sôbre a atividade catalítica de DIT na hidratação de ClBCH a pH = 7,00 e à temperatura de $24,5 \pm 0,5^\circ \text{C}$

Concentração total ^a (moles/l)	k_1^b (min ⁻¹)	k_2^c (l.mol ⁻¹ .min ⁻¹)
$6,73 \cdot 10^{-3}$	$5,23 \cdot 10^{-2}$	40,8
$3,38 \cdot 10^{-3}$	$2,88 \cdot 10^{-2}$	45,8
$1,55 \cdot 10^{-3}$	$1,21 \cdot 10^{-2}$	41,8

a) A concentração da forma ácida foi calculada pela equação de Handerson-Hasselbach; b) k_1 tem o mesmo significado que na tabela IX; c) k_2 tem o mesmo significado que na tabela IX.

TABELA XIX

Efeito da variação do pH sôbre a atividade catalítica de DIT na hidratação de ClBCH à temperatura de $23,5 \pm 0,5^\circ \text{C}$

Concentração total ^a (moles/l)	pH	k_1^b (min ⁻¹)	k_2^c (l.mol ⁻¹ .min ⁻¹)
$8,84 \cdot 10^{-4}$	6,99	$8,12 \cdot 10^{-3}$	45,6
$8,84 \cdot 10^{-4}$	6,67	$1,67 \cdot 10^{-2}$	57,6
$8,50 \cdot 10^{-4}$	6,16	$2,61 \cdot 10^{-2}$	50,0

a) Idem tabela XVIII; b) idem tabela XVIII; c) idem tabela XVIII.

Fig. 34 - Determinação espectrofotométrica da influência da variação da concentração de DIT sobre a velocidade da reação de hidratação de CLBCH. Condições experimentais: CLBCH 5.10^{-4} M ; meio: tampão tris 0,25M, pH=7,00; temperatura: $24,5^{\circ}\text{C}$.

TABELA XX

Efeito de uréia 9M sôbre a atividade catalítica de DIT na hidratação de ClBCH a pH = 7,43 e à temperatura de $24,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$

Concentração total ^a (moles/l)	λ (m μ)	^b k_1 (min ⁻¹)	^c k_2 (l.mol ⁻¹ .min ⁻¹)
$3,92 \cdot 10^{-3}$	400	$1,21 \cdot 10^{-2}$	39,4
$3,92 \cdot 10^{-3}$	402	$1,22 \cdot 10^{-2}$	39,8
$3,92 \cdot 10^{-3}$	404	$1,22 \cdot 10^{-2}$	39,8

a) idem tabela XVIII; b) idem tabela XVIII; c) idem tabela XVIII.

TABELA XXI

Efeito da variação da força iônica sôbre a atividade catalítica de DIT na hidratação de ClBCH à temperatura de $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$

Concentração total ^a (moles/l)	pH	[tris] (moles/l)	^a k_1 (min ⁻¹)	^b k_2 (l.mol ⁻¹ .min ⁻¹)
$1,51 \cdot 10^{-3}$	7,06	0,125	$1,30 \cdot 10^{-2}$	51,8
$1,51 \cdot 10^{-3}$	7,03	0,066	$1,48 \cdot 10^{-2}$	55,5

a) idem tabela XVIII; b) idem tabela XVIII; c) idem tabela XVIII.

Fig. 35 - Determinação experimental da energia de ativação para a reação de hidratação de ClBCH catalisada por DIT .

TABELA XXII

Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade da catálise de hidratação dos substratos abaixo por tiroglobulina^a, à temperatura de $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

Substrato	Concentração ^{b,c} (moles/l)	pH	^d k_1 (min ⁻¹)	^e k_2 (l.mol ⁻¹ .min ⁻¹)
ClBCH	$8,0 \cdot 10^{-5}$	7,24	$2,60 \cdot 10^{-3}$	49,6
β -NADH	$9,4 \cdot 10^{-5}$	7,11	$8,74 \cdot 10^{-4}$	12,3
β -NADPH	$5,6 \cdot 10^{-5}$	7,05	$6,38 \cdot 10^{-4}$	14,5

- a) Todas as soluções de trabalho eram 0,1M em HNO_3 ; b) a concentração indicada é em termos do DIT presente na solução, tendo-se calculado o número de moles de DIT por mol. de proteína conforme indicado na referência 107; c) o valor indicado na tabela é a concentração total de DIT. A concentração da forma ácida foi calculada pela equação de Henderson-Hasselbach, assumindo-se $\text{pK} = 7,60$ (referencia 108); d) k_1 tem o mesmo significado que na tabela IX; e) k_2 tem o mesmo significado que na tabela IX.

Fig. 36 - Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a reação de hidratação de ClBCH ($\sim 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) catalisada por tiroglobulina ($8,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ em DIT) à temperatura de $25,0^\circ\text{C}$ em tampão tris $0,25 \text{ M}$, $\text{pH}=7,24$.

TABELA XXIII

Determinação espectrofotométrica da constante de velocidade para a hidratação de ClBCH catalisada por iodicaseína, à temperatura de $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$

concentração ^a (moles/l)	pH	λ (m μ)	k_1^d (min ⁻¹)	k_2^e (l.mol ⁻¹ min ⁻¹)
$7,50 \cdot 10^{-4}$	8,48	400 e 402	$7,37 \cdot 10^{-4}$	7,47
$7,22 \cdot 10^{-4}$	7,93	400 e 402	$1,52 \cdot 10^{-3}$	6,03
$7,00 \cdot 10^{-4}$	7,47	404 e 406	$2,57 \cdot 10^{-3}$	6,07
$1,61 \cdot 10^{-3}$	7,17	400, 404 e 406	$6,58 \cdot 10^{-3}$	5,40
$5,95 \cdot 10^{-4}$	7,10	406 e 408	$3,25 \cdot 10^{-3}$	6,93
$7,79 \cdot 10^{-4}$	7,06	386 e 388	$4,38 \cdot 10^{-3}$	7,02
$7,38 \cdot 10^{-4}$	7,00	402 e 404	$3,25 \cdot 10^{-3}$	5,98
$7,16 \cdot 10^{-4}$	6,99	395 e 397	$3,93 \cdot 10^{-3}$	7,02
$4,44 \cdot 10^{-4}$	6,46	393, 395, 397, 398 e 400	$4,66 \cdot 10^{-2}$	11,1
$2,12 \cdot 10^{-4}$	6,06	400 e 402	$3,31 \cdot 10^{-3}$	16,1
$7,90 \cdot 10^{-4}^b$	6,97	400 e 402	$1,90 \cdot 10^{-2}$	28,8
$7,22 \cdot 10^{-4}^c$	7,10	400 e 402	$1,08 \cdot 10^{-3}$	1,92

- a) O valor na tabela é a concentração total de DIT na solução. Esta foi calculada admitindo-se toda a absorção em $\lambda = 310 \text{ m}\mu$, em meio alcalino, devida ao DIT. A concentração da forma ácida foi calculada pela equação de Handerson-Hasselbach. O pK do grupamento fenólico do DIT na iodicaseína foi determinado no laboratório, correspondendo a 7,66; b) experiência feita a $45,0^\circ\text{C}$; c) experiência feita a $12,0^\circ\text{C}$; d) o significado de k_1 é o mesmo da tabela IX; e) o significado de k_2 é o mesmo que na tabela IX.

Fig. 37 - Estudo da influência da variação do pH sobre a constante de velocidade da reação de hidratação de ClBCN catalisada por iodocaseina .

Fig. 38 - Determinação experimental da energia de ativação para a reação de hidratação de CIBCH catalisada por iodocaseína.

TABELA XXIV

Cálculo dos parâmetros de ativação para alguns dos sistemas estudados

Sistema	E_a (kcal/mol)	$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mol)	$\Delta S^\ddagger$ (cal/grau)
ClBCH (reação espontânea)	21,9	-	-
ClBCH - DIT	15,5	14,9	-9,16
ClBCH - iodocaseína	14,7	14,1	-15,7
ClBCH - T_4	11,5	10,9	~ -6

C. Discussão

O primeiro produto formado pela ação de ácidos minerais, ácido acético, íons fosfato, sobre 1,4-dihidropiridinas revela-se como sendo a adição de água à dupla ligação 5,6 com a hidroxila na posição 6^(85,86).

Trata-se, portanto, de um efeito de catálise ácida pelo protom e também de catálise ácida geral. Isso é confirmado pela elaboração de um gráfico de Brønsted⁽⁸⁹⁾ (figura 39) onde se verifica a relação entre a constante de velocidade de catálise de diferentes substâncias e seu pK.

As substâncias estudadas neste trabalho atuam cataliticamente, fornecendo também o produto hidratado da dihidronicotinamida, exceto, talvez, no caso das substâncias contendo grupamentos sulfidril, pois Stock e cols.⁽⁹²⁾ postulam adição para o 2-mercaptoetanol.

Quanto aos amino ácidos comuns, exerceriam uma catálise de tipo ácida geral, assim como a de outros ácidos orgânicos conhecidos.

Cineticamente, as reações podem ser tratadas como sendo de pseudo-primeira ordem em relação ao substrato.

O exame das constantes de velocidade das reações estudadas indica que os amino ácidos comuns, os péptidos, e as proteínas empregadas possuem a propriedade de efetuar essa catálise em muito pequena escala; uma comparação com substâncias contendo separadamente os grupos carboxila e amino indica ser a atividade dos amino ácidos dependente somente do grupo carboxila (tabela XIa).

Exceções apreciáveis encontram-se nos amino ácidos e péptidos contendo grupamento sulfidril. A atividade destes é bastante acentuada (tabela XIb). Entretanto, parece que, nesse caso, a simples presença do grupamento -SH não é suficiente para a efetuação de uma catálise apreciável, uma vez que a constante de velocidade observada para a etilmercaptana é várias vezes inferior àquela para o 2-mercaptoetanol, ao passo que esta é apenas cerca da metade da observada para a cisteína, sendo esta, por sua vez, um pouco inferior à do

Fig. 39 - Gráfico de Brønsted para a catálise de hidratação de CLBCH (referência 81). Pode-se verificar o desvio de um simples mecanismo de catálise ácida geral para uma série de compostos estudados.

glutatio~o. Estes fatos sugerem que a complexidade da molécula exerce~ria uma certa influência sôbre o poder catalítico.

Os açúcares fosfarilados apresentam comportamento bastante análogo ao do próprio fosfato inorgânico (tabela IX) para o qual já foi demonstrado ser o produto formado uma 6-hidroxi-1,4,5,6-tetrahi~dropiridina. A ordem de grandeza das constantes de velocidade é a mesma para tôdas as substâncias examinadas e, levando-se em conta o gráfico de Brønsted empregado, verifica-se que, tanto fosfato inorgânico, quanto os açúcares fosforilados apresentam algum desvio, sugerindo uma influência mais complexa do que apenas a de catálise ácida geral. Que o comportamento de todos os fosfatos é análogo é também de se esperar examinando-se os resultados qualitativos registrados na tabela VIII.

Nesta base, pode-se compreender que a decomposição espontânea de NADH e NADPH seja parcialmente autocatalítica.

O exame do grupo de substâncias com estrutura análoga à da tiroxina indicou para estas também um efeito catalítico na hidratação pois foi verificado que a reação se processava em extensão maior do que a correspondente à concentração do catalisador, o que exclue adição do catalisador, a não ser na formação de um produto intermediário. O estudo com concentrações baixas de vários dos catalisadores (tabela VII) revelou ser o produto espectralmente idêntico ao formado pela ação de ácidos e de fosfatos. Um exemplo encontra-se na figura 18.

Um trabalho pormenorizado efetuado com substâncias que foram desde o ácido p-hidroxibenzóico à tiroxina e a tiroglobulina permitiu estabelecer uma série de observações a respeito da atividade catalítica.

Verificou-se que essa atividade aumenta ao se passar de fenóis não substituídos para orto-halogenofenóis e destes para ortodihalogenofenóis (tabelas XIII-XV). Este fato seria de se esperar em função do próprio pK das substâncias, uma vez que se trata de ca

tálise ácida geral. Porém o efeito não é apenas devido a êsse fator e isto pode ser constatado pelo fato de que as constantes de velocidade crescem ao se passar da tirosina à tironina e desta à 3,5-dibromotironina e 3,5-diiodotironina compostos êstes que possuem todos o mesmo valor de pK para o grupamento fenólico (tabelas XV e XVI) O anel aromático interno exerce portanto influência sôbre a atividade catalítica, influência esta acentuada pela presença dos halogênios.

A complexidade estrutural responsável pelo efeito catalítico fica ainda patenteada pelo desvio que êsse grupo de catalisadores apresenta em relação aos convencionais de catálise ácida no gráfico de Brønsted.

Em relação aos dihalogenofenóis pode-se observar que a presença e a natureza de substituintes na posição para não influem de maneira importante sôbre a velocidade da catálise, da mesma forma como o número atômico dos halogênios em orto (tabela XIII).

Ao menos no caso dos halogenofenóis (mono- e di-) com um anel aromático, o estudo a diferentes pH s (tabelas XIII e XIV) indica que a forma ativa deve ser a não dissociada.

Variações de concentração do catalisador, de pH , fôrça iônica e a adição de uréia, não alteram substancialmente a constante de velocidade da reação catalisada pela forma fenólica de DIT (tabelas XVIII-XXI). O estudo do primeiro fator vem mostrar ainda que a reação é de primeira ordem também em relação ao catalisador (figura 34).

O exame da atividade catalítica da tiroglobulina indicou que esta proteína não exerce nenhum efeito excepcional sôbre ClBCH, se se comparar a atividade da mesma concentração de grupamentos diiodotirosila ligados à proteína ou livres. No entanto, sôbre NADH e sôbre NADPH, a ação de DIT incorporado à proteína parece ser mais intensa (tabela XXII).

A atividade da caseína iodada é bem superior à da caseína; entretanto, a iodocaseína não apresentou nenhum efeito excepcional sôbre ClBCH se se compararem as mesmas concentrações de DIT quando

incorporado à proteína ou não (tabela XXIII).

A pHs abaixo de 6,5- parece ocorrer um aumento na atividade catalítica da iodocaseína (figura 37). Isto poderia ser causado por um grupamento diiodotirosila mais ativo, talvez devido a um pK mais baixo ou a uma nova conformação da proteína, resultante de uma possível protonação de um grupo imidazólico, em consequência do aumento de acidez. Entretanto, uma elucidação bastante clara deste ponto ficou impossibilitada em razão de dificuldades de caráter experimental.

Em relação à reatividade dos substratos empregados pôde-se notar, observando as próprias soluções de controle, onde ocorria a reação denominada "espontânea", que a substância modelo é muito mais reativa que os coenzimas naturais, sendo NADPH mais reativo do que NADH; este último fato confirma resultado de Stock e cols⁽⁸²⁾.

Mecanismo das Reações

A cinética das reações estudadas indica que outros fatores estruturais, além da capacidade doadora de prótons dos catalisadores, interferem na atividade catalítica dos compostos relacionados a tiroxina.

Um exemplo adicional ao já citado anteriormente é a diferença de atividade catalítica entre MIT e T₃, (tabelas XIV e XVI).

Sendo o carbono mais sujeito a um ataque eletrófilo o de posição 5 na dihidropiridina⁽⁸²⁾, o próton do catalisador se adicionaria a êsse carbono, iniciando-se a formação de um íon de carbônio na dihidropiridina e de um ânion fenolato. Estas entidades favoreceriam a formação de um complexo ativado relativamente estabilizado por transferência da carga, o que redundaria em um abaixamento da energia livre de ativação comparativamente com os catalisadores ácidos convencionais.

Esse mecanismo encontra apóio na conhecida capacidade do íon de carbônio formado pela adição do próton a 1,4-dihidropiridinas

formar complexos de transferência de carga⁽¹⁰⁹⁾. São também conhecidos complexos de transferência de carga em que diiodofenóis atuam como doadores⁽⁶²⁾.

Entretanto, é muito provável que grande parte da estabilização do complexo ativado, na catálise por halogenofenóis, seja de natureza entrópica, pela contribuição de forças hidrofóbicas resultantes da libertação de moléculas de água. De fato, sabe-se que a diiodotirosina complexa melhor do que a tirosina com o íon de piridínio principalmente devido a uma contribuição maior do termo ligado à entropia⁽⁶²⁾. No presente trabalho, essa analogia existe quando se comparam as entropias de ativação das reações catalisadas por DIT e T_4 com as correspondentes a outros catalisadores, levando em conta que a queda no valor da energia de ativação em relação à reação espontânea é praticamente a mesma em todos os casos (tabelas X, XII e XXIV).

A estabilização hidrofóbica poderia tornar mais difícil a segunda fase, ou seja, o colapso do cátion na esfera de solvatação, porém, presumivelmente, não ao ponto de tornar essa segunda fase a etapa determinante da velocidade da reação. Além disso, é perfeitamente viável que o complexo ativado evolua para a formação de um intermediário, o qual sofreria então, a hidrólise.

Deve-se notar, ainda, que existem outros mecanismos compatíveis com a cinética observada. Num deles, a primeira fase seria a adição rápida e reversível do próton à dihidronicotinamida, seguida de uma fase mais lenta, na qual o cátion reage com H_2O sob a influência do ânion do catalisador.

Conseguiu-se porém, eliminar essa possibilidade com base em resultados de medidas de ressonância magnética nuclear⁽⁸⁵⁾, referentes à hidratação de dihidropiridinas em D_2O , sob a catálise de fosfato. Se se tratasse de adição rápida do próton, existiria um equilíbrio entre o reagente e a forma protonada, permitindo, através de troca, incorporação de deutério. Esse fato não se coaduna com a observação de que todos os sinais devidos aos prótons do anel decaem simultaneamente e com a existência de sinal do carbono 5 no produto de reação.

Importância biológica

O complexo entre a dihidropiridina e o catalisador no estado de transição poderia fornecer um intermediário em que o ânion do catalisador se adicionaria à posição 6 do anel; casos análogos já foram descritos^(110,111). Este intermediário, numa etapa subsequente sofreria hidrólise, fornecendo o produto hidratado.

Existem fortes indicações^(112,113,114) de que esse intermediário de adição do catalisador pode sofrer oxidação quando o catalisador é 2,6-diiodo-4-aminofenol. Isto, por sua vez, pode servir de base a uma hipótese para um mecanismo de síntese de ATP ao nível dos coenzimas piridínicos.

No organismo, o papel do 2,6-diiodo-4-aminofenol de ativar o oxigênio deveria ser exercido pela tiroxina conjugada com uma enzima que dispusesse de um grupamento $-NH_3^+$ estericamente favorável a uma atividade acoplada. O produto oxidado formado trocando o substituinte em 6 por fosfato forneceria um composto com

ligação fosfato rica em energia e este, na presença de ADP, reagiria, formando ATP.

A seqüência proposta é apresentada na figura 40; ela mostra analogias com a hipótese de Barltrop e cols⁽¹¹⁵⁾, onde a ação oxidante é atribuída a uma flavoproteína.

Fig. 40 - Esquema de uma possível sequência de reações para a síntese de ATP ao nível dos coenzimas piridínicos .

VI. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Estudos de sistemas contendo modelos dos coenzimas piridínicos ou os próprios coenzimas mostram que existe uma interação entre as formas oxidada e reduzida para a qual contribuem forças de transferência de carga. A extrapolação destes resultados a sistemas enzimáticos de trans-hidrogenases pode esclarecer, em parte, a reatividade dos sistemas e fornece indicações sobre a estereo-especificidade dos coenzimas no estado de transição.

A tendência do anel de piridínio, da forma oxidada do coenzima, para a complexação manifesta-se também em relação a derivados adenínicos. A extensão destes resultados, obtidos em sistemas modelos, ao próprio coenzima, apoiada em considerações estatísticas, leva a concluir a respeito de uma estrutura fechada para o NAD^+ , fato este já apontado por outros autores, inclusive para a forma reduzida.

Diversos autores atribuem à estrutura fechada a menor reatividade do coenzima, quando comparada à de modelos, em vários sistemas químicos. É possível que esta seja, ao menos parcialmente a explicação da maior dificuldade de hidratação de NADH em relação ao seu modelo, sob a catálise dos compostos estudados.

Essa catálise de hidratação e o destino do produto formado, caso a reação ocorra "in vivo" tornam-se centro altamente sugestivo de especulações uma vez que foi também demonstrada em nosso laboratório (112-114) a capacidade de o,o'-dihalogenofenóis contendo amino grupo protonado em para de catalisar a oxidação de ClBCH a QlBC e, provavelmente, também a oxidação dos intermediários na formação de produto hidratado. Essas reações poderiam constituir-se em elementos para a elaboração de um esquema para a síntese da primeira molécula de ATP, na cadeia respiratória.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) B. Pullman e A. Pullman, *Quantum Biochemistry*, Interscience Publishers (1963).
- 2) R. S. Mulliken, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 811 (1952).
- 3) R. S. Mulliken, *Rec. des trav. chim. des Pays-Bas*, 75, 845 (1956).
- 4) S. P. McGlynn, *Radiation Res. Suppl.*, 2, 300 (1960).
- 5) G. Cauquis e J. J. Bassilier, *Ann. de Chimie*, 7, 745 (1962).
- 6) M. S. J. Dowar e A. R. Lepley, *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 4560 (1961).
- 7) J. N. Murrell, S. F. A. Kettle e J. M. Tedder, *Valence Theory*, 1965, John Wiley & Sons.
- 8) R. S. Mulliken e L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 4839 (1957).
- 9) J. N. Murrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 5037 (1959).
- 10) J. N. Murrell, *J. Chem. Soc.*, 1965, 2048.
- 11) D. Mauzerall e F. H. Westheimer, *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 2261 (1955).
- 12) P. Karrer e F. J. Stare, *Helv. Chim. Acta*, 20, 418 (1937).
- 13) G. Cilento, *J. Org. Chem.*, 24, 2015 (1959).
- 14) G. W. Gray e B. Jones, *J. Chem. Soc.*, 1954, 2556.
- 15) F. G. Pope e A. S. Wood, *J. Chem. Soc.*, 101, 1823 (1912).
- 16) E. P. Reinecke e C. W. Turner, *J. Biol. Chem.*, 149, 555 (1943).
- 17) C. L. Gemmil, *Arch. Biochem. Biophys.*, 54, 359 (1955).
- 18) F. Yamazaki, K. Fujiki e Y. Murata, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 38, 8 (1965).
- 19) C. L. Gemmil, *Arch. Biochem. Biophys.*, 63, 177 (1956).
- 20) A. Bunawoy e J. T. Chamberlain, *J. Chem. Soc.*, 1952, 2310.
- 21) J. M. Siegel, C. A. Montgomery e R. M. Bock, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 288 (1959).
- 22) R. H. McMenamy e J. L. Oncley, *J. Biol. Chem.*, 233, 1436 (1958).
- 23) R. F. Brown e E. F. Claflin, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 5960 (1958).
- 24) H. E. Ungnade, *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 432 (1953).
- 25) J. Robbins e J. E. Rall, *Physiol. Revs.*, 40, 415 (1960).
- 26) E. Fujimori, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 45, 133 (1959).
- 27) H. A. Benesi e J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 2703 (1949).
- 28) R. Foster, D. Hampick e A. A. Wardley, *J. Chem. Soc.*, 1953, 3819.
- 29) G. Cilento e D. L. Sanjoto, *Z. Phys. Chem.*, 223, 333 (1963).
- 30) M. G. van Senden e H. N. Moning, *Rec. des trav. chim. des Pays-Bas* 81, 49 (1962).
- 31) D. W. Foster, J. B. Taylor, *J. Biol. Chem.*, 241, 38 (1966).
- 32) M. Shin e D. I. Arnon, *J. Biol. Chem.*, 240, 1405 (1965).
- 33) J. Jarabak, J. A. Adams, H. G. Williams-Ashman e P. Talalay, *J. Biol. Chem.*, 237, 345 (1962).
- 34) H. J. Karavolas e L. E. Engel, *J. Biol. Chem.*, 241, P. C. 3454 (1966).

- 35) M. M. Weber e N. O. Kaplan, J. Biol. Chem., 225, 909 (1957).
- 36) S. P. Colowick, N. O. Kaplan, E. F. Neufeld e N. M. Ciotti, J. Biol. Chem., 195, 95 (1952).
- 37) N. O. Kaplan, S. P. Colowick e E. F. Neufeld, J. Biol. Chem., 195, 107 (1952).
- 38) N. O. Kaplan, S. P. Colowick, E. F. Neufeld, J. Biol. Chem., 205, 17 (1953).
- 39) N. O. Kaplan, S. P. Colowick, L. J. Zatman e N. M. Ciotti, J. Biol. Chem., 205, 31 (1953).
- 40) A. San Pietro, N. O. Kaplan e S. P. Colowick, J. Biol. Chem., 212, 941 (1955).
- 41) D. L. Keister e R. B. Hommes, J. Biol. Chem., 241, 2820 (1966).
- 42) N. O. Kaplan, S. P. Colowick e E. F. Neufeld, J. Biol. Chem., 205, 1 (1953).
- 43) G. F. Humprey, Biochem. J., 63, 546 (1957).
- 44) A. M. Stein, N. O. Kaplan e N. M. Ciotti, J. Biol. Chem., 234, 979 (1959).
- 45) L. Danielson e L. Ernster, Biochem. Biophys. Res. Comm., 10, 91 (1963).
- 46) F. Hommes e R. W. Estabrook, Biochem. Biophys. Res. Comm., 11, 1 (1963).
- 47) R. W. Estabrook, F. Hommes e J. Gonze, Energy-linked function of mitochondria (Ed. B. Chance) Academic Press (1963).
- 48) F. Hommes, Energy-linked functions of mitochondria, (Ed. B. Chance) Academic Press (1963).
- 49) C. P. Lee e L. Ernster, Biochim. Biophys. Acta, 81, 187 (1964).
- 50) T. Kawasaki, K. Satoh e N. O. Kaplan, Biochem. Biophys. Res. Comm., 17, 648 (1964).
- 51) C. P. Lee, N. Simard-Duquesne e L. Ernster, Biochim. Biophys. Acta, 105, 397 (1965).
- 52) D. E. Griffiths e A. M. Robertson, Biochem. J., 94, 30P (1965).
- 53) C. P. Lee e L. Ernster, Biochem. Biophys. Res. Comm., 23, 176 (1966).
- 54) D. E. Griffiths e A. M. Robertson, Biochim. Biophys. Acta, 118, 453 (1966).
- 55) D. L. Keister e N. J. Yike, Biochem. Biophys. Res. Comm., 24, 519 (1966).
- 56) J. A. Orlando, Arch. Biochem. Biophys., 124, 413 (1968).
- 57) M. J. Spiegel e G. R. Drysdale, J. Biol. Chem., 212, 2498 (1955).
- 58) G. Cilento, Arch. Biochem. Biophys., 88, 352 (1960).
- 59) J. Ludowieg e A. Levy, Biochem. Biophys. Res. Comm., 11, 19 (1963).
- 60) G. Cilento e P. Tedeschi, J. Biol. Chem., 236, 907 (1960).
- 61) S. Shifrin, Biochim. Biophys. Acta, 81, 205 (1964).
- 62) G. Cilento e M. Berenholz, Biochim. Biophys. Acta, 94, 271 (1965).
- 63) Q. H. Gibson, V. Massey e N. M. Atherton, Biochem. J., 85, 369 (1962).
- 64) G. Weber, Nature, 180, 1409 (1957).
- 65) F. S. Velick, em Light and Life (D. McElroy e B. Glass, eds), John Hopkins Press, 1961.

- 66) W. L. Meyer, H. R. Mahler e R. H. Baker Jr, Biochim. Biophys. Acta, 64, 353 (1962).
- 67) J. Ludowieg e A. Levy, Biochemistry, 3, 373 (1964).
- 68) G. Cilento e S. Schreier, Arch. Biochem. Biophys., 107, 102 (1964).
- 69) R. H. Sarma, V. Ross e N. O. Kaplan, Biochemistry, 7, 3052 (1968).
- 70) M. R. Lamborg, R. M. Burton e N. O. Kaplan, J. Am. Chem. Soc., 79, 6173 (1957).
- 71) P. Walter e N. O. Kaplan, J. Biol. Chem., 238, 2823 (1963).
- 72) O. Jardetzky e N. G. Wade-Jardetzky, J. Biol. Chem., 241, 85 (1966).
- 73) F. Ungar e S. G. A. Alivisatos, Biochim. Biophys. Acta, 46, 406 (1961).
- 74) O. Warburg, W. Christian e A. Griese, Biochem. Z., 282, 157 (1935).
- 75) H. v. Euler, E. Adler e H. Hellström, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 241, 239 (1936).
- 76) P. Karrer e O. Warburg, Biochem. Z., 285, 297 (1936).
- 77) A. D. Winer e G. W. Schwert, J. Biol. Chem., 231, 1065 (1958).
- 78) O. H. Lowry, J. V. Passonneau e M. K. Rock, J. Biol. Chem., 236, 2756 (1961).
- 79) I. G. Fels, Nature, 195, 704 (1962).
- 80) E. Haas, Biochem. Z., 288, 123 (1936).
- 81) A. G. Anderson Jr. e G. Berkelhammer, J. Am. Chem. Soc., 80, 992 (1958).
- 82) A. Stock, E. Sann e G. Pfeleiderer, Liebigs Ann. Chem., 647, 188 (1961).
- 83) R. M. Burton e N. O. Kaplan, Arch. Biochem. Biophys., 101, 150 (1963).
- 84) S. G. A. Alivisatos, F. Ungar e G. Abraham, Biochemistry, 4, 2616 (1965).
- 85) K. S. Choi e S. G. A. Alivisatos, Biochemistry, 7, 190 (1968).
- 86) C. S. Y. Kim e S. Chaykin, Biochemistry, 7, 2339 (1968).
- 87) D. W. Miles, D. W. Urry e H. Eyring, Biochemistry, 7, 2333 (1968).
- 88) R. Segal e G. Stein, J. Chem. Soc., 1960, 5254.
- 89) B. M. Anderson, M. L. Reynolds e C. D. Anderson, Arch. Biochem. Biophys., 110, 577 (1965).
- 90) C. C. Johnston, J. L. Gardner, C. H. Suelter e D. E. Metzler, Biochemistry, 2, 689 (1963).
- 91) G. W. Rafter, S. Chaykin e E. G. Krebs, J. Biol. Chem., 208, 799 (1954).
- 92) S. Chaykin, J. O. Meinhart e E. G. Krebs, J. Biol. Chem., 220, 811 (1956).
- 93) J. O. Meinhart e M. C. Hines, Fed. Proc., 16, 425 (1956).
- 94) S. Chaykin, J. O. Meinhart e E. G. Krebs, J. Biol. Chem., 220, 820 (1956).
- 95) N. R. Bachur e N. O. Kaplan, Bact. Proc., 116 (1955) (tirado da ref. 92).
- 96) C. Bender, B. Regueiro, R. Amelunxen e S. Grisolia, Fed. Proc., 24, 420 (1965).
- 97) K. Wallenfels, D. Hofmann e H. Schtly, Liebigs Ann. Chem., 621, 188 (1959).
- 98) R. Amelunxen e S. Grisolia, J. Biol. Chem., 237, 3240 (1962).

- 99) J. L. Kurz, R. F. Hutton e F. H. Westheimer, J. Am. Chem. Soc., 83, 584 (1961).
- 100) R. P. Bell, Acid Basic Catalysis, Oxford University Press (tirado da ref. 99) (1961).
- 101) C. F. Cori, S. P. Colowick e G. M. Cori, J. Biol. Chem., 121, 465 (1937).
- 102) R. C. Weast e S. M. Selby, Handbook of Chemistry and Physics, C. D. Hodgman (Ed.) (1965).
- 103) A. Meister, Biochemistry of the amino acids, V. I., Academic Press, 1965.
- 104) M. M. Kresovoy, E. T. Harper, R. E. Duvall, H. S. Wilgres III e L. T. Ditsch, J. Am. Chem. Soc., 82, 4899 (1960).
- 105) K. Ihne-Rasa, J. Am. Chem. Soc., 84, 4969 (1962).
- 106) A. I. Biggs e R. A. Robinson, J. Chem. Soc., 1961, 388.
- 107) J. Robbins e J. E. Ball, Physiol. Revs., 40, 415 (1960).
- 108) H. Edelhoch, J. Biol. Chem., 237, 2778 (1962).
- 109) E. M. Kosower e T. S. Sorensen, J. Org. Chem., 27, 3764 (1962).
- 110) N. S. Isaacs, J. Chem. Soc., 1966, 1053 (Phys. Org.).
- 111) Z. Rapoport, J. Chem. Soc., 1963, 4498.
- 112) G. Cilento e M. S. Araujo, Chem. Comm. 1968, 1420.
- 113) M. S. Araujo e G. Cilento, Biochemistry, 8 (maio, 1969).
- 114) M. S. Araujo e G. Cilento, em vi de publicação.
- 115) J. A. Barltrop, P. W. Grubb e B. Hesp, Nature, 199, 759 (1963).