

INHIBICION DE LA FOSFATASA ACIDA POR EL O-VANADATO DE SODIO EN DIFERENTES ETAPAS DE TERMOINACTIVACION

Quijano Parra A¹, Chukhrai E.S², Poltorak O.M²

¹ Departamento de Química, Grupo de Investigación en Química.
Universidad de Pamplona (Colombia),
Email: alquiparra @unipamplona.edu.co

² Facultad de Química, Departamento de Cinética y Catálisis (Rusia)
Universidad Estatal de Moscú "M.V.Lomonosov".

Recibido Abril 17 de 2006

Aceptado Mayo 12 de 2006

RESUMEN

Se determinaron los centros activos de la Fosfatasa Acida proveniente del trigo, usando en calidad de inhibidor el O-Vanadato de Sodio, que es un fuerte inhibidor de esta enzima. Por primera vez se muestra que el O-Vanadato de Sodio es un Inhibidor de la Fosfatasa Ácida

PALABRAS CLAVES

Centros activos, Inhibidor, Termoinactivación, Fosfatasa Acida , O-Vanadato de Sodio

ABSTRACT

The active centers of the Acid Phosphatase, from wheat sprouts were determined using a quality inhibitor, O-Vanadat Sodium; this paper shows that for the very first time O-Vanadat Sodium is a strong inhibitor of this enzyme.

KEY WORDS:

Active Center, Inhibitor, Thermal-inactivation, Phosphatase Acid, O-Vanadat Sodium.

INTRODUCCION

El problema de conservación de la actividad enzimática de los preparados obtenidos de las proteínas, es uno de los problemas más importantes de la Enzimología Química.- Una gran dificultad es el trabajo con enzimas que conservan su actividad en un medio acuoso de soluciones buffers solo durante unas cuantas horas a temperatura ambiente.- En los actuales momentos se ha vuelto una tradición examinar las sustancias naturales fisiológicamente activas de naturaleza proteínica, en primer lugar las enzimas como

medios perspectivas de tratamiento medico debido a su gran actividad y selectividad. De ahí que el estudio de la termoinactivación es un aspecto muy importante para establecer la estabilidad de la enzima.

Los métodos de análisis de los parámetros cinéticos y equilíbricos de las reacciones fermentativas están basados en los principios clásicos de la termodinámica y la cinética. Toda la información cinética sobre el mecanismo de reacción y los valores numéricos de las

constantes de velocidad de los procesos elementales esta basada en las curvas cinéticas.

La influencia de la temperatura en la velocidad de la reacción catalizada por un biocatalizador, esta determinada por una serie de factores.- La temperatura influye en la estabilidad de la enzima, en el estado de la estructura cuaternaria, en la velocidad de formación y disociación del complejo sustrato-fermento y en la ionización de los diferentes grupos catalíticos del centro activo.

La termoinactivación de las enzimas oligoméricas se lleva acabo por diferentes mecanismos:- El más conocido es el disociativo.- En este caso la disociación reversible precede a la variación cinética irreversible de los productos.-Para una enzima dimérica (como la fosfatasa acida) (Roberts D.W.A, 1970) el esquema cinético tiene el siguiente aspecto:



Activo Inactivo Inactivo

E_1 es el monómero capaz de formar reversiblemente el dímero catalíticamente activo ; E_d es el monómero denaturizado, imposible de formar el complejo E_2 en las condiciones cinéticas del experimento

$K_{dis} = k_1 / k_{-1}$ constante de disociación de la enzima

K_d constante de velocidad de denaturación

El sistema de ecuaciones diferenciales que describen la inactivación disociativa, no tiene una solución analítica y exige el desarrollo de métodos aproximados para la determinación de los parámetros cinéticos del esquema (1) (Poltorak,Chukhrai,2002)

La termoinactivación disociativa se observa en un determinado intervalo de temperatura y para ciertas concentraciones de la enzima comparables con K_{dis} para la temperatura

dada.- El esquema (1) describe no solamente la termoinactivación de las enzimas diméricas, sino también la inactivación química en presencia de diferentes compuestos, que producen la destrucción de la estructura terciaria

Materiales y Métodos

Las investigaciones se realizaron con la fosfatasa acida (KF 3.1.3.2) proveniente del trigo de la firma Fluka AG, Buchs SG, su actividad se determinó por la velocidad de la hidrólisis del p..Nitrofenilfosfato de Sodio de la firma Reanal ; la cantidad de p-nitrofenol formado se determino fotocolorimetricamente a 400 nm .- En esta investigación por primera vez se utiliza el O-Vanadato de Sodio en calidad de inhibidor de la fosfatasa acida., se muestra que para un PH de 5,5(0,1 M solución bufer de acetato) el O-Vanadato de Sodio es un inhibidor efectivo de la Fosfatasa Acida.- En la figura N 1 se muestra la dependencia de la velocidad de hidrólisis del p-nitrofenilfosfato de sodio de la concentración del O-Vanadato de Sodio para diferentes concentraciones de fosfatasa acida.

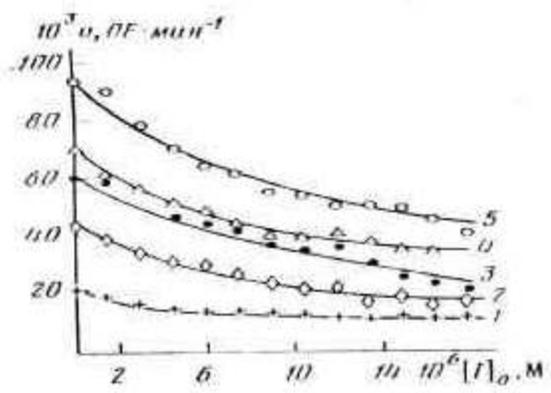


Figura 1.- Dependencia de la velocidad de hidrólisis del p-nitrofenilfosfato de sodio de la concentración del O-vanadato de sodio, para diferentes concentraciones de fosfatasa acida : 1.-0,04 mg/ml ; 2.- 0,06 mg/ml ; 3.- 0,1 mg/ml ; 4.- 0,14 mg/ml

En esta investigación el O-Vanadato de Sodio se utilizo como inhibidor para la determinación de la concentración de los centros activos de

la enzima utilizando el método de titulación de los centros activos (Poltorak, Priakhin, 1982).- En este método se propone la siguiente ecuación:

$$[I]_0 \frac{V_\infty - V_0}{V - V_0} = [E]_0 + \frac{1 + K_s^{-1} [S]_0}{K_i^{-1}(1 + K_{is}^{-1} [S]_0)} \frac{(V_\infty - V_0)}{(V_\infty - V)} \quad (2)$$

En donde $[I]_0$ concentración inicial del inhibidor ; $[E]_0$ concentración inicial de la enzima ; $[S]_0$ concentración inicial del sustrato ; V_0 , V , V_∞ corresponden a la velocidad inicial, actual y limite de la reacción para $[I]_0$; V_∞ ; K_i , K_{is} y K_s corresponden a las constantes de equilibrio.

Para determinar $[E]_0$, la ecuación (2) es necesario transformarla en la forma de diferencia en la siguiente ecuación:

$$\frac{\Delta [[I]_0 V / (V_0 - V)]}{\Delta V} = V_\infty \frac{\Delta [[I]_0 / (V_0 - V)]}{\Delta V} + \frac{[E]_0}{(V_0 - V_\infty)} \quad (3)$$

Discusión de Resultados

En la figura 2 se muestran las curvas de la dependencia de la actividad de la enzima de la concentración inicial del inhibidor, en la figura 3 la curva 1 se muestra en la forma lineal de las coordenadas de la ecuación (3)

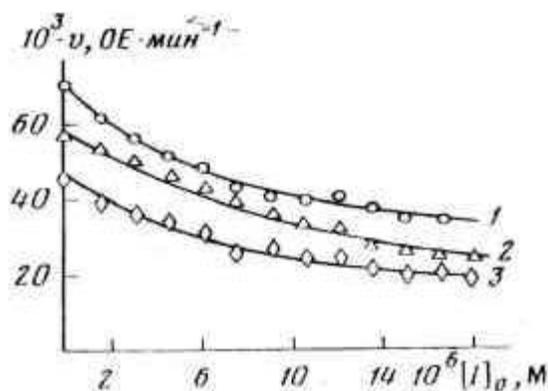


Figura 2.- Dependencia de la velocidad de hidrólisis del p-nitrofenilfosfato de sodio(0,02 M) por la fosfatasa acida(0,10 mg/ml) de la concentración inicial del o-vanadato de sodio : 1-enzima nativa ;2-enzima calentada 30 minutos a 55 o C, 3-enzima calentada 90 minutos a 55 o C

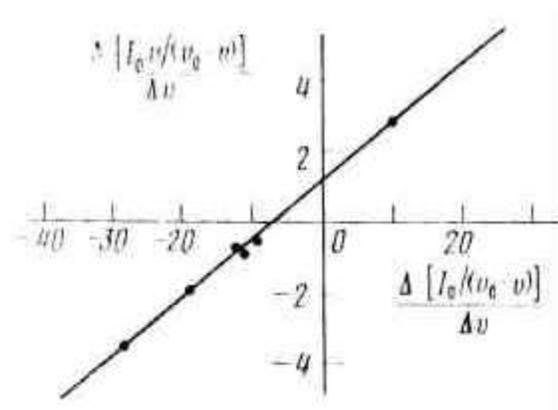
Para utilizar la ecuación (2) en la forma de diferencia, se determinan los valores medios de los últimos cinco puntos en la curva 1 (figura 2) y se toma la diferencia entre los correspondientes valores medios

$$\Delta [[I]_0 V / (V_0 - V)] = [I]_{oi} V_i / (V_{oi} - V_i) - \overline{[I]_0 V / (V - V_0)} \quad (i=1, \dots, n)$$

$$\Delta [[I]_0 / (V_0 - V)] = [I]_{oi} / (V_{oi} - V_i) - \overline{[I]_0 / (V - V_0)} \quad (i=1, \dots, n)$$

$$\Delta V = V_i - \overline{V}$$

En la figura 3 se muestra el calculo de la concentración de los centros activos de la fosfatasa acida(curva 1 figura 2) en las coordenadas de la ecuación (3)



Según los datos de la figura 3, se determinan los valores de los segmentos que cortan el eje de las abscisas (R_1) y el eje de las ordenadas (R_2), que permite determinar

$$[E_0] = v_0 R_1 + (R_1)^2 / R_2 \quad (4)$$

En la tabla No 1 se muestran los valores obtenidos de E_0 por la ecuación (4) para diferentes etapas de termoinactivación

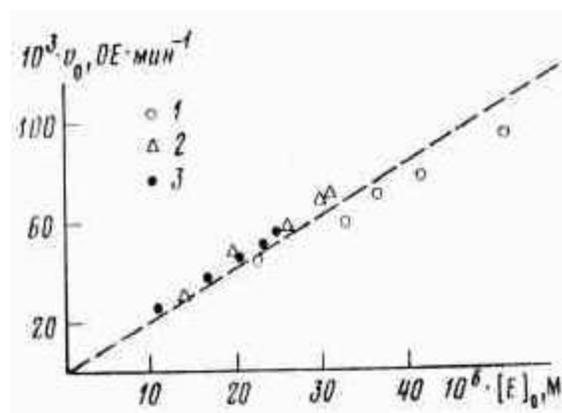
En la figura 4 se muestra la dependencia de la velocidad inicial de la reacción de la concentración de los centros activos de la fosfatasa acida: I(1) ;II(2) y III(3)

De la figura 4 se observa que los puntos, que corresponden a diferentes etapas de termoinactivación de la fosfatasa acida a 55 °C

C están sobre la misma línea , cuya tangente corresponde a la condición

$$V = \text{const} [E]_0$$

y es la constante catalítica.- De esta manera la constante catalítica se mantiene constante al aumentar el grado de termodegradación de la fosfatasa acida



Conclusiones

- 1.- La forma intermedia de la enzima (E_1) en el esquema cinético (1) es inactiva; sino fuera así, se observaría una disminución de la constante catalítica con el aumento del período de termoinactivación.
- 2.-El valor obtenido para la constante de inhibición K_i en diferentes etapas de termoinactivación, resulto ser $1,35(10^{-6}) M$
- 3.- En el esquema (1), la forma activa es E_2 corroborado además por que la constante efectiva de inhibición de la fosfatasa acida por el O-Vanadato de Sodio no depende del grado de destrucción de la enzima como resultado de la termoinactivación.

Tabla No 1

[Fosfatasa Acida] mg/ml	$E_0 \cdot 10^6 M$ I	$E_0 \cdot 10^6 M$ II	$E_0 \cdot 10^6 M$ III
0,04	13,20	25,30	17,8
0,06	22,50	14,00	11,0
0,08	33,0	19,80	16,50
0,10	36,75	26,0	20,0
0,12	45,5	30,0	23,0
0,14	51,45	31,0	25,0

I-Enzima nativa ; II Enzima calentada 30 minutos a 55 o C; III Enzima calentada 90 minutos a 55° C

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Poltorak O.M , Chukhrai E.S. "Curso especial de catálisis enzimática ", Moscú(2002) Editorial Moskovskii Gosudarstbenni Universitiet "M.V.Lomonosov", pag 29-43

Priakhin A,N ; Poltorak O.M., Titulación de los centros activos por medio de activadores reversibles "Viestnik Moskovskovo Gosudarstbennovo Universitieta " M.V.Lomonosov " Serie 2, Quimica, (1982), , Tom 23 No1, pag 102

Roberts D.W.A. Enzymol.,1970, 39, pag 151