

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO DO GLICEROL SOBRE A ENTALPIA DE LIGAÇÃO
DA TRIPSINA BOVINA COM O ÍON BENZAMIDÍNIO
ENTRE 5 E 30 °C DE TEMPERATURA**

YARA ALMEIDA VIANA

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal
de Uberlândia, para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia – MG
Dezembro de 2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO DO GLICEROL SOBRE A ENTALPIA DE LIGAÇÃO
DA TRIPSINA BOVINA COM O ÍON BENZAMIDÍNIO
ENTRE 5 E 30 °C DE TEMPERATURA**

YARA ALMEIDA VIANA
Estudante

PROF. DR. NILSON PENHA SILVA
Orientador

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia – MG
Dezembro de 2000

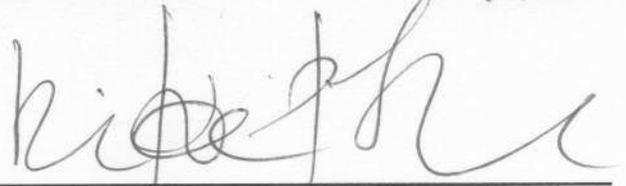
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO DO GLICEROL SOBRE A ENTALPIA DE LIGAÇÃO
DA TRIPSINA BOVINA COM O ÍON BENZAMIDÍNIO
ENTRE 5 E 30 °C DE TEMPERATURA

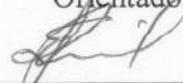
YARA ALMEIDA VIANA

Aprovada pela Banca Examinadora em 11 de dezembro de 2000

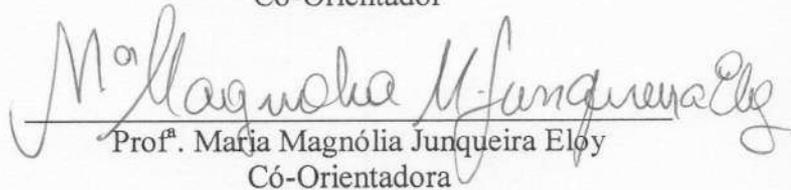
Nota: 9,0



Prof. Dr. Nilson Penha Silva
Orientador



Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
Có-Orientador



Prof.ª Maria Magnólia Junqueira Eloy
Có-Orientadora

Uberlândia, 11 de dezembro de 2000

Aos meus pais, Essi Fernandes Viana
e Maria Madalena A. Viana, pelo amor incondicional,
hoje e sempre;
à minha irmã, Vanessa Almeida Viana,
pela alegria que trouxe ao meu cotidiano.

AGRADECIMENTOS

- À Deus, que na sua infinita bondade e sabedoria tem conduzido-me sempre pelos melhores caminhos;
- Ao professor Nilson Penha Silva, pela paciência e profissionalismo. A sua competência e integridade tornam bem sucedida a realização de qualquer trabalho acadêmico;
- À Universidade Federal de Uberlândia, por disponibilizar a infra estrutura necessária à realização deste trabalho e pela concessão da bolsa de iniciação científica;
- Aos professores que efetivamente contribuíram para a minha formação acadêmica;
- À coordenadora do curso de Ciências Biológicas, Ana Maria Coelho Carvalho, pelo empenho em melhorar a qualidade do nosso curso;
- À Tânia Miranda Magalhães, a amiga que ajudou-me a superar as dificuldades do cotidiano, mostrando-se sempre generosa, leal e otimista;
- Aos colegas do Laboratório de Enzimologia, Miguel Antônio Facury, Adriana Borges e Fabrício Cintra, pelo ambiente de trabalho descontraído e agradável que proporcionaram;
- Aos amigos, Ana Flávia Vitorino, Gilvan Duarte, Juliana Meola, Karine Rezende, Rodrigo Magrin, Sandra Gracielle, Sílvio Oliveira e Willian Lopes. Sem a ajuda de vocês, tudo seria mais difícil;
- Às secretárias do INGEB, Sebastiana Abadia Inácio e Maria Marlene Macedo, pelo atendimento cordial e pela evidente disposição para auxiliar sempre na resolução dos problemas.

ÍNDICE

1-Introdução	01
2-Objetivo	05
3-Material e Métodos	06
3.1-Preparo das soluções utilizadas	06
3.2-Efeito de osmólitos sobre a formação de complexos enzima-inibidor	06
3.3-Cálculo das constantes de dissociação dos complexos EI	07
3.4-Determinação da variação de entalpia padrão de van't Hoff	07
4-Resultados e discussão	10
5-Conclusão	15
6-Referências Bibliográficas	16

RESUMO

As macromoléculas e a atividade biológica das proteínas são freqüentemente preservadas por pequenos solutos orgânicos denominados osmólitos. O glicerol é um reconhecido osmólito que protege as células contra condições de estresse como a presença de agentes desnaturantes e temperaturas elevadas. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de glicerol a 1 mol.L^{-1} sobre a variação de entalpia de van't Hoff ($\Delta H^{\circ}_{\text{vH}}$) para a formação do complexo tripsina bovina com o íon benzamidínio no intervalo de temperatura de 5 e 30 °C. Os gráficos de $1/A_{410\text{nm}}$ em função de 14 diferentes concentrações do inibidor, na presença de duas diferentes concentrações do substrato Benzoil-D,L-Arginina-*para*-Nitroanilida foram usados para determinação dos valores das constantes de dissociação do complexo enzima-inibidor (K_i). A dependência de $\ln K_i$ em função de $1/T$ foi utilizada para calcular a variação de entalpia de van't Hoff na presença de 1 mol.L^{-1} de glicerol. Na ausência de osmólitos e na presença de glicerol a 1 mol.L^{-1} os valores de $\Delta H^{\circ}_{\text{vH}}$ foram de $-11,7 \pm 1,24$ e $-12,29 \pm 1,03 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Em suma, a incorporação de 1 mol.L^{-1} de glicerol não promoveu nenhuma alteração na variação de entalpia de van't Hoff para a formação do complexo enzima-inibidor.

Palavras chaves: tripsina, glicerol e entalpia.

1- INTRODUÇÃO

Muitos mecanismos de resposta a condições ambientais de estresse, como calor, radicais livres, altas concentrações de sais e congelamento, têm em comum o fato de serem regulados por compostos conhecidos como osmólitos (Yancey et al., 1982; Somero, 1986). Essas substâncias, cuja concentração pode variar de dezenas a centenas de milimol.L^{-1} , permitem que as proteínas mantenham suas atividades porque atuam como estabilizadores da estrutura proteica, sem comprometer a eficiência dos mecanismos catalíticos que ocorrem dentro da célula (Yancey et al. 1982; Yancey, 1985).

Os osmólitos de ocorrência natural são quimicamente classificados em três grupos: (1) poliálcoois, como glicerol e sorbitol; (2) aminoácidos e seus derivados, como as metilaminas betaína e sarcosina; e (3) açúcares, como sacarose e trealose (Yancey et al., 1982).

Considerando-se o aspecto funcional, ainda há uma outra classificação para estes solutos. Aqueles que exercem pequenos efeitos sobre a função proteica são classificados como soluto compatíveis. Já os osmólitos que combatem os efeitos que solutos deletérios têm sobre as proteínas são denominados solutos neutralizantes (Borowitz & Brown, 1974; Yancey et al., 1982).

A atividade osmorregulatória está amplamente distribuída na natureza. Plantas, bactérias, mamíferos e invertebrados marinhos, apesar de apresentarem uma grande distância dentro da escala evolutiva, utilizam-se desses solutos para estabilizar sua estrutura proteica (Somero, 1986).

A complexação do dímero de triptofano ao seu alvo no DNA de *Escherichia coli* depende da presença de moléculas de água, que têm um importante papel termodinâmico neste processo. Pequenas concentrações de betaína contribuem para que a água permaneça na

superfície do complexo dímero-DNA (**Brown et al., 1999**).

O osmólito β -hidroxicetoína, extraído de *Marinococcus*, a uma concentração de 3 mol.L⁻¹ aumentou a temperatura de desenovelamento da Ribonuclease A bovina em mais de 12 Kelvin, o que sugere que este osmólito possa atuar de forma bastante eficiente como estabilizador de processos que envolvem enzimas aplicadas na presença de desnaturantes ou em temperaturas elevadas (**Knapp, Ladenstein & Galinski, 1999**).

O inibidor de quimotripsina e de citocromo C de coração de cavalo são proteínas estabilizadas com sucesso na presença de elevadas concentrações de glicina. Este processo é caracterizado por uma considerável redução na proporção das constantes de troca de prótons amidínicos sem que ocorra entretanto uma alteração na estrutura tridimensional dessas proteínas (**Foord & Leatherbarrow, 1998**).

A trealose, um açúcar de notáveis propriedades estabilizantes, é capaz de prevenir completamente o colapso da mioglobina ao evitar o escape de pequenas moléculas de água que são vitais para preservar a estabilidade interna dessa proteína (**Sastry & Agmon, 1997**). Além disso, promove a estabilização estrutural das membranas ao interagir com os fosfolipídeos de sua bicamada lipídica, diminuindo a transição termotrópica de fase da membrana seca, mantendo assim sua permeabilidade durante a reidratação (**Araújo, 1996**).

Em algumas células endoteliais, astrócitos e células da medula espinhal, a hiperosmolaridade induz ao acúmulo de mioinositol, resultado de um aumento na velocidade máxima do co-transportador de sódio-mioinositol (SMIT) e do aumento da expressão deste gene. Em doenças como a síndrome de Down são encontrados distúrbios relacionados à acumulação de mioinositol (**Warskulat, Weik & Haüssinger, 1997**).

Já as ceramidas, esqueletos estruturais dos esfingolipídeos, capazes de desempenhar múltiplas atividades biológicas, predominantemente associadas à supressão do crescimento, também são capazes de ativar uma proteína-quinase que desempenha um papel central numa

variedade de respostas ao estresse. Recentemente, o supressor de tumor p53, um dos reguladores centrais de resposta ao DNA danificado, mostrou-se capaz de induzir o acúmulo de ceramida (Dbaiho, 1997).

A N-óxido-trimetilamina (TMAO) exerce um importante papel na manutenção dos microtúbulos em concentrações bastante próximas das fisiológicas, porque interfere na atuação da proteína TAU, que associada aos microtúbulos influencia no processo de nucleação, polimerização e manutenção durante a reunião de tubulina, inclusive na presença de agentes caotrópicos. O mecanismo de ação deste osmólito ainda é desconhecido, entretanto, evidências sugerem que a TMAO possa forçar algumas proteínas a se enovelarem e resistirem à desnaturação (Tseng & Graves, 1998).

Atualmente, todas essas estratégias utilizadas pelos organismos vivos para estabilizarem suas estruturas proteicas têm sido exploradas pela indústria farmacêutica. Já estão sendo realizados testes clínicos com uma insulina inalável, encapsulada em açúcar. Esta mesma metodologia têm sido utilizada experimentalmente para preservar proteínas de valor terapêutico, tais como a calcitonina, usada no tratamento da osteoporose, e a α_1 -anti-tripsina, usada no tratamento do enfisema pulmonar. No futuro, drogas e suplementos alimentares serão encapsulados em açúcares principalmente para serem enviados para países que possuem escassos meios de refrigeração e transporte de proteínas frágeis (Potera, 1998).

O glicerol é capaz de prevenir a inativação pelo calor das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC^{ase}), malato desidrogenase (MDH) e nitrato redutase (NR) de *Salsola soda*. Esta proteção está diretamente relacionada à concentração de glicerol utilizada (Nikolopoulos & Manetas, 1991). O equilíbrio de formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio, um inibidor clássico desta enzima, também pode ser afetado com a adição de 0,5 mol.L⁻¹ de glicerol, sacarose, sorbitol e betaína (Souza-Penha, 1998).

O presente trabalho avaliou o efeito do glicerol sobre a variação de entalpia de van't Hoff para o equilíbrio de formação de complexo entre a tripsina bovina e o íon benzamidínio a partir das constantes de dissociação do complexo enzima-inibidor, determinadas entre 5 e 30 °C de temperatura.

2- OBJETIVO

Analisar o efeito do glicerol a 1 mol.L^{-1} sobre a variação da entalpia de van't Hoff para a ligação de tripsina bovina com o íon benzamidínio, em tampão tris-HCl a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 8,0, a partir das constantes de dissociação do complexo enzima-inibidor, no intervalo de temperatura de 5 a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Preparo das soluções utilizadas - As soluções de tripsina bovina foram utilizadas a uma concentração de 2 mg/mL em HCl pH 3,0. Todas as reações ocorreram em tampão tris-HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, contendo CaCl_2 a 2 mmol.L^{-1} e glicerol na concentração 1 mol.L^{-1} em pH 8,0. O glicerol foi incorporado ao tampão antes de ajustar o pH e o volume final da solução. O substrato utilizado foi o Benzoil-D,L-Arginina-*para*-Nitroanilida (BAPNA). As soluções de BAPNA foram semanalmente preparadas em uma concentração estoque de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em dimetilsulfóxido. As reações de hidrólise enzimática do BAPNA ocorreram na presença de benzamidina em tampão tris-HCl pH 8,0. As reações foram interrompidas pela adição de ácido acético a 60% v/v.

Os reagentes utilizados para o preparo destas soluções foram provenientes da Sigma, Aldrich, Fluka e Merk. As medidas de massa foram feitas em uma balança de precisão analítica marca AND, modelo HR-120. A homogeneização do tampão foi realizada em um agitador termostatizado da marca Quimis e o pH foi ajustado com um peagâmetro marca analyser, modelo pH20. Todas as pipetas, beakers, provetas e balões volumétricos utilizados para o preparo das soluções eram da marca Pyrex.

3.2- Efeito do glicerol sobre a formação de complexos de tripsina com o íon benzamidínio - Em um experimento típico, foram usadas duas séries com 15 tubos de ensaio cada uma, com o substrato a 200 e 400 mmol.L^{-1} , respectivamente. Inicialmente cada tubo das séries S₁ e S₂ recebeu 1 mL da respectiva solução de uso do substrato. Depois cada um dos 15 tubos de cada série recebeu respectivamente 1,3; 1,3; 1,2; 1,1; 1,0; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 0,1 e 0,0 mL da solução do tampão. Em seguida foi adicionado a cada tubo um volume da solução de benzamidina a $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão pH 8,0 (0,0; 0,0; 0,1; 0,2; 0,3;

0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2 e 1,3 mL), de forma que o volume total da solução presente em cada tubo fosse igual a 2,3 ml. Após atingir o equilíbrio térmico da solução à temperatura do experimento em banho termostático com refrigeração, marca Marconi modelo MA 184, foi adicionado 0,2 mL de tripsina a 2,0 mg/mL a cada um desses tubos com o auxílio de pipetas automáticas reguláveis Oxford modelo Sampler System, exceto ao tubo 1 de cada série, que recebeu 0,2 mL de HCl pH 3,0. Após 10 minutos de incubação foi adicionado a cada um desses tubos 0,5 mL de ácido acético a 60% v/v. O grau de hidrólise do substrato foi determinado pela leitura da absorvância da *para*-nitroanilida em 410 nm, contra o tubo branco de sua respectiva série (tubo número 1) em espectrofotômetro Micronal modelo B442.

3.3- Cálculo das constantes de dissociação dos complexos EI - As constantes de dissociação dos complexos EI foram determinadas pelo valor da abscissa do ponto de cruzamento de duas retas (S_1 e S_2) em gráficos de $1/v$ contra a concentração do inibidor, cada reta representando um conjunto de 14 ensaios cinéticos de velocidade, de acordo com método de **Dixon (1953)** e as descrições detalhadas de **Rogana, Penha-Silva e Mares-Guia (1989)**. Aos pontos experimentais utilizados para determinação das constantes de dissociação do complexo EI foram atribuídos pesos estatísticos decrescentes (14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 e 1), a partir do tubo número 1, que produziu o maior e mais confiável valor de absorvância.

3.4- Determinação da variação de entalpia padrão de van't Hoff para a formação dos complexos EI - A dissociação do complexo de tripsina bovina com o íon benzamidínio ocorre segundo a reação reversível $EI \rightleftharpoons E + I$, caracterizada por uma constante de equilíbrio, dada pela expressão:

$$K_{eq} = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

que é idêntica ao valor da constante de inibição, K_i . A constante de formação do complexo EI é pois igual a $1/K_i$. Logo, a variação de energia livre padrão de formação dos complexos EI é dada pela expressão:

$$\Delta G^\circ = RT \ln K_i,$$

onde R é a constante universal dos gases (1,987 cal/mol.K) e T é a temperatura absoluta, dada em graus Kelvin. Colocando-se esta equação em igualdade com a seguinte equação derivada da segunda lei da termodinâmica,

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ,$$

temos que:

$$RT \ln K_i = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ,$$

ou mais simplesmente:

$$\ln K_i = \frac{\Delta H^\circ}{R} \cdot \frac{1}{T} - \frac{\Delta S^\circ}{R},$$

que é a equação de van't Hoff para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio. Esta equação representa uma reta onde $\Delta H^\circ/R$ corresponde à inclinação e $-\Delta S^\circ/R$ é a interseção da reta no eixo y.

Locando os valores de $\ln K_i$ obtidos a 5, 10, 15, 20, 25 e 30 °C em função dos inversos dos valores das temperaturas em graus Kelvin, foi obtida a variação da entalpia padrão de van't Hoff para a ligação de tripsina bovina com o íon benzamidínio na presença de glicerol a 1 mol.L⁻¹.

O coeficiente de correlação entre as variáveis estudadas foi determinado a partir da expressão de **Cembrowski & Sullivan (1996)**.

Este trabalho foi integralmente desenvolvido no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de K_i , determinados na presença de glicerol 1 a mol.L⁻¹ a partir da dependência de $1/A_{410\text{ nm}}$ com a concentração do íon benzamidínio estão representados na **Tabela 1**. Na presença de glicerol a 1 mol.L⁻¹, o aumento da temperatura provocou um aumento nos valores da constante de dissociação do complexo enzima-inibidor. Este comportamento já era esperado (**Hymes, Cuppett & Canady, 1969; Mares-Guia, Nelson & Rogana, 1977; Rogana, Penha-Silva & Mares-Guia, 1989**), uma vez que o calor aumenta a agitação dos grupamentos químicos da proteína, prejudicando assim a manutenção de ligações estabilizantes de sua estrutura, bem como sua interação com ligantes. Desta forma, a população relativa da enzima livre no equilíbrio aumenta com o aumento da temperatura, o que pode ser justificado pelo aumento na constante de dissociação do complexo EI.

Os solutos envolvidos na estabilização da estrutura proteica e na manutenção da sua simetria estrutural são preferencialmente excluídos do domínio da proteína. Estes mecanismos de exclusão de solutos podem envolver interações que dependem exclusivamente das propriedades do soluto ou podem ser determinados pela natureza química da superfície das proteínas e da sua interação com as moléculas do soluto. Também existem casos em que os dois mecanismos atuam simultaneamente (**Timasheff & Arakawa, 1989**).

Quando a proteína é inerte em relação ao soluto, a interação proteína-soluto vai depender inteiramente da acessibilidade das moléculas do soluto ao contato mais íntimo com a proteína. Segundo **Kauzmann (1949)**, citado por **Timasheff & Arakawa (1989)**, ocorreria uma exclusão estérica do soluto à primeira camada de hidratação da proteína. Assim, formar-se-ia uma camada impermeável ao soluto ao redor da proteína (**Timasheff & Arakawa, 1989**).

A adição de solutos também pode perturbar a tensão superficial da água. Desta forma, eles tendem a ser excluídos da superfície da proteína, que torna-se preferencialmente hidratada. Este mecanismo é comum na exclusão de açúcares, aminoácidos e sais estabilizantes da estrutura (Timasheff & Arakawa, 1989).

O glicerol, especificamente, parece ser excluído da superfície da proteína por um efeito de natureza solvofóbica. O contato entre a mistura de glicerol e a água com as regiões não polares da proteína é entropicamente mais desfavorável do que o contato da água pura com os grupos não-polares. Por isso, o glicerol tende a ser excluído da superfície da proteína (Timasheff & Arakawa, 1989). Com certeza, a presença do glicerol junto à água na fase volumosa do solvente torna também entropicamente desfavorável o contato do anel benzênico do íon benzamidínio, de natureza não polar, com o solvente, o que favoreceria sua exclusão da fase volumosa do solvente e inclusão nos sítios hidrofóbicos de ligação do centro ativo da tripsina bovina.

Este efeito, justificaria um aumento na estabilidade relativa do complexo EI em relação à enzima e inibidor livres, em uma dada temperatura, na presença de glicerol. Assim, seria previsível um aumento em K_f e respectivamente uma diminuição em K_i na presença de concentrações crescentes de glicerol. Desta maneira, os valores de $-\Delta G^\circ$ de formação dos complexos EI deveriam sofrer uma elevação com o aumento da concentração de glicerol, o que de fato ocorre (Magalhães, 2000).

Na presença de glicerol, a dependência de $\ln K_i$ com $1/T$ produziu uma reta, que foi utilizada para determinação da variação de entalpia de van't Hoff para a formação do complexo EI, conforme mostrado na **Figura 1**. O valor médio do ΔH°_{vH} determinado na presença de glicerol a 1 mol.L^{-1} no intervalo de temperatura considerado (30, 25, 20, 15, 10 e 5° C) foi de $-12,3 \pm 1,03 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Este valor não difere significativamente do valor médio de $-11,7 \pm 1,24 \text{ kcal.mol}^{-1}$ determinado no intervalo de 10, 20 e 30° C registrado na literatura

(Souza-Penha, 1998), uma vez que as diferenças entre os valores individuais situam-se dentro dos desvios padrões obtidos. Isto significa que a dependência térmica do equilíbrio de formação do complexo EI não foi afetado entre os limites de 5 e 30 °C pela incorporação de 1 mol.L⁻¹ de glicerol no solvente. O efeito de concentrações crescentes deste soluto sobre a variação de entalpia de van't Hoff está em curso no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Tabela 1

Efeito de glicerol a 1 mol.L^{-1} sobre as constantes de dissociação (K_i), dado em $\mu\text{mol.L}^{-1}$, dos complexos de tripsina com o íon benzamidínio em tampão tris-HCl a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 8,0, com CaCl_2 a 2 mmol.L^{-1} , em diferentes temperaturas.

T(K)	K_i
278,15	22,30
	33,00
	17,54
283,15	37,40
	52,60
	28,10
288,15	71,90
	56,00
	61,40
293,15	75,50
	89,00
	91,20
298,15	113,80
	78,40
	83,50
303,15	190,40
	163,41
	161,25

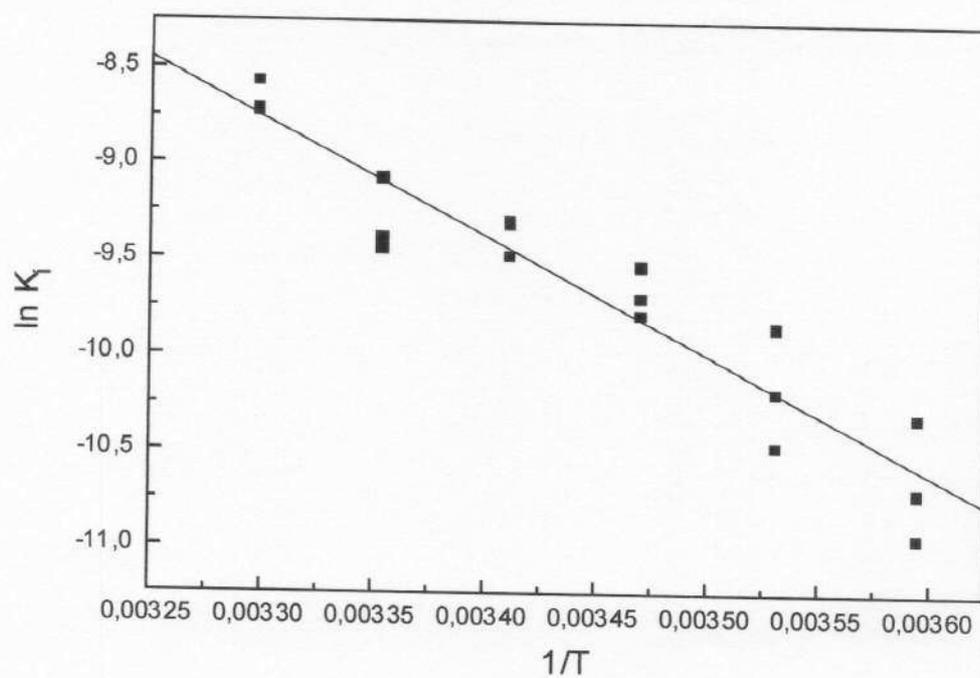


Figura 1 - Dependência de $\ln K_i$ com $1/T$ na presença de 1 mol.L^{-1} de glicerol de acordo com a equação de van't Hoff. Os dados experimentais ajustaram-se a reta de regressão linear dada pela equação $y = 11,65 - 6.184,47 x$, com $r = 0,9483$ ($P = 2,1896\text{E-}9$).

5- CONCLUSÃO

O valor de ΔH°_{vH} na presença de glicerol na concentração de 1 mol.L^{-1} foi de $-12,3 \pm 1,03 \text{ kcal.mol}^{-1}$ no intervalo de 5 a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura. Como este valor não difere de forma estatisticamente significativa do valor de $-11,7 \pm 1,24 \text{ kcal.mol}^{-1}$, obtido por **Souza-Penha (1998)** na ausência do osmólito no intervalo de 10 a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, isto significa que a presença de glicerol a 1 mol.L^{-1} não afetou a dependência térmica do equilíbrio de formação do complexo enzima-inibidor entre 5 e $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, P. S. The role of trealose in cell stress. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 29, p. 873-875, 1996.
- BOROWITZA, L. J. & BROWN, A. D. The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga, *Dunaliella* : the role of glicerol as a compatible solute. *Arch. Microbiol.* v. 96, p. 37-52, 1974.
- BROWN, M. P., GRILLO, A. O., BOYER, M. & ROYER, C. A. Probing the role of water in the tryptophan repressor-operator complex. *Protein-Science*. v. 8, n. 6, p. 1276-1285, 1999.
- CEMBROWSKI, G. S., & SULLIVAN, A. M. Quality control and statistics. In: BISHOP, M. L, DUBEN-ENGELKIRK, J. L. & FODY, E. P. *Clinical Chemistry*. 3rd. ed. Philadelphia: Lippincott, 1996. p. 65.
- DBAIBO, G. S. Regulation of the stress response by ceramide. *Biochem. Soc. Trans.* v. 25, n. 2, p. 557-561, 1997.
- DIXON, M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* v. 55, p. 170-171, 1953.
- FOORD, R. L. & LEATHERBARROW, R. J. Effect of osmolytes on the exchange rates of backbone amide protons in proteins. *Biochemistry*. v. 37, n. 9, p. 2969-2978, 1998.
- HYMES, A. J., CUPPETT, C. C. & CANADY, W. J. Thermodynamics of α - chymotrypsin - inhibitor complex formation. Effects of structural modification of the inhibitor. *J. Biol. Chem.* n. 244, p. 637-643, 1969.
- KNAPP, S., LADENSTEIN, R. & GALINSKI, E. A. Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hidroxyectoine and betaine. *Extremophiles*. v. 3, n. 3, p. 191-198. 1999.

- MAGALHÃES, T. M. *Efeito da concentração de glicerol sobre a energia livre de ligação da tripsina bovina com o íon benzamidínio*. Monografia. Uberlândia: UFU, 2000. 22 p.
- MARES-GUIA, M., NELSON, D. L. & ROGANA, E. Electronic effects in the interaction of *para*-substituted benzamidines with trypsin: the involvement of the π -electronic density at central atom of the substituent in binding. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 99, p. 2331-2336, 1977.
- NIKOLOPOULOS, D. & MANETAS, Y. Compatible solutes and *in vitro* stability of *Salsola soda* enzymes: proline incompatibility. *Phytochemistry*. v. 30, p. 411-413. 1991.
- POTERA, C. A sweet way to keep proteins safe. *Science*. n. 281, p. 1793. 1998.
- ROGANA, E., PENHA-SILVA, N. & MARES-GUIA, M. The substituent effect on complex formation between α -trypsin and *para*-substituted benzamidinium ions: a thermodynamic study. *Braz. J. Med. Bio. Res.* v. 22, n. 10, p. 1177-1190. 1989.
- SASTRY, G. M. & AGMON, N. Trealose prevents myoglobin collapse and preserves its internal mobility. *Biochemistry*. v. 36, n.23, p. 7097-7108, 1997.
- SOMERO, G. N. Protons, osmolytes and fitness of internal milieu for protein function. *Am. J. Physiol.* v. 251, n.1, p. R197-R213, 1986.
- SOUZA-PENHA, M. A. *Termodinâmica da ligação de tripsina bovina com o íon benzamidínio na presença de osmólitos naturais*. Dissertação de Mestrado. Uberlândia: UFU, 1998. 68 p.
- TIMASHEFF, S. N. & ARAKAWA, T. Stabilization of protein structure by solvents. In: GREIGHTON, T. E. *Protein Structure: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, 1989. p. 331-345.
- TSENG, H. C. & GRAVES, D. J. Natural methylamine osmolytes, trimethylamine N-oxide and betaine, increase TAU-induced polymerization of microtubules. *Biochem. Biophys. Res.* v. 250, p. 726-730, 1998.

- WARSKULAT, U., WEIK, C. & HÄUSSINGER, D. Myo-Inositol is an osmolyte in rat liver macrophages (kupffer cells) but not in RAW 264.7 mouse macrophages. *Biochem. J.* v. 326, p. 289-295, 1997.
- YANCEY, P. H., CLARK, M. E., HAND, S. C., BOWLUS, R. D. & SOMERO, G. N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*. n. 212, p. 1214-1222. 1982.
- YANCEY, P. H. Organic osmotic effectors in cartilaginous fishes. In: GILLES, R. & GILLES - BAILLIEN, M. *Transport processes, iono- and osmorregulation*. Springer – Verlag, New York , 1985.p. 424 - 436.