

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

SISBI/UFU



1000215595

MON
SAB. 15
VOLUME
TES/MEU

ENTALPIA DE VAN'T HOFF E ENERGIA LIVRE DE GIBBS
PARA ASSOCIAÇÃO DE TRIPSINA BOVINA
COM O ÍON BENZAMIDÍNIO
SOB CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE GLICEROL

Yara Almeida Viana

UBERLÂNDIA – MG

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

ENTALPIA DE VAN'T HOFF E ENERGIA LIVRE DE GIBBS
PARA ASSOCIAÇÃO DE TRIPSINA BOVINA
COM O ÍON BENZAMIDÍNIO
SOB CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE GLICEROL

Aluna: Yara Almeida Viana

Orientador: Dr. Nilson Penha Silva

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área de Bioquímica)

UBERLÂNDIA – MG

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

A dissertação de Mestrado intitulada **Entalpia de van't Hoff e energia livre de Gibbs para associação de tripsina bovina com o íon benzamidínio sob concentrações crescentes de glicerol** foi defendida no dia 28 de abril de 2003, por Yara Almeida Viana tendo sido aprovada pela banca examinadora assim composta:

Francisco José Tôrres de Aquino

Professor do Centro Universitário do Triângulo
Doutor pela UFMG

Eloízio Júlio Ribeiro

Professor titular da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia
Doutor pela UNICAMP

Nilson Penha Silva

Orientador

Professor titular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia
Doutor pela UFMG

Pós Doutor pela Southern Illinois University e pela University of Texas Medical Branch

Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (PROPP-UFU);

Aos meus pais, Essi
Fernandes Viana e Maria
Madalena Almeida Viana, pelo
amor incondicional, hoje e
sempre...

Agradecimentos

Agradeço ao professor Dr. Nilson Penha Silva pelos valiosos ensinamentos. Aos colegas do Laboratório de Enzimologia, pelo incentivo e pelo ambiente de trabalho agradável que sempre proporcionaram. Aos professores e funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica. Aos amigos, que com palavras de apoio e encorajamento, dividiram os momentos árduos e felizes desta caminhada. E a todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Índice

	Página
Capa.....	
Contra capa.....	ii
Banca examinadora.....	iii
Instituições financiadoras.....	iv
Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de Abreviaturas.....	viii
Lista de tabelas.....	ix
Lista de figuras.....	x
Resumo geral.....	xi
Introdução geral.....	01
Referências.....	09
Capítulo 1.....	15
Abstract.....	16
Introdução.....	17
Material e Métodos.....	18
Resultados e Discussão.....	23
Conclusões.....	40
Referências.....	41

Lista de abreviaturas

Betaina	N,N,N-trimetil-glicina
Bz-D,L-Arg-Nan	Benzoil-D,L-Arginina- <i>para</i> -Nitroanilida
ΔG°	Varição de energia livre padrão de Gibbs
ΔH°	Varição de entalpia padrão
ΔS°	Varição de entropia padrão
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Enzima livre
EI	Complexo Enzima-Inibidor
I	Inibidor
K	Grau Kelvin
K_{eq}	Constante de equilíbrio
K_f	Constante de formação do complexo EI
K_i	Constante de dissociação do complexo EI
R	Constante universal dos gases (1,987 cal/K.mol)
sd	Desvio padrão
T	Temperatura absoluta em graus Kelvin
Trealose	α -D-glicopiranosil (1 \rightarrow 4) α -D-glicopiranosídeo
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

Lista de tabelas

Tabela 1. Constantes de dissociação (K_i) dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio na ausência de glicerol entre 5 e 30 °C de temperatura.....	28
Tabela 2. Constantes de dissociação (K_i) dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio na presença de 0,5 mol.L ⁻¹ de glicerol entre 5 e 30 °C de temperatura.....	29
Tabela 3. Constantes de dissociação (K_i) dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio na presença de 1,0 mol.L ⁻¹ de glicerol entre 5 e 30 °C de temperatura.....	30
Tabela 4. Constantes de dissociação (K_i) dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio na presença de 1,5 mol.L ⁻¹ de glicerol entre 5 e 30 °C de temperatura.....	31
Tabela 5. Constantes de dissociação (K_i) dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio na presença de 2,0 mol.L ⁻¹ de glicerol entre 5 e 30 °C de temperatura.....	32
Tabela 6. Constantes de dissociação (K_i) dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio na presença de 2,5 mol.L ⁻¹ de glicerol entre 5 e 30 °C de temperatura.....	33
Tabela 7. Variação de energia livre de Gibbs para formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio na presença de concentrações crescentes de glicerol.....	34
Tabela 8. Variação de entalpia de van't Hoff para a formação dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio.....	35

Lista de figuras

- Figura 1. Gráfico de $1/A_{410\text{nm}}$ contra a concentração do íon benzamidínio para formação dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio na presença de $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de glicerol a $15 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura..... 36
- Figura 2. Dependência de K_i com a concentração de glicerol para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio entre 5 e $30 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura.....37
- Figura 3. Dependência de $\ln K_i$ contra $1/T$ para formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio na presença de concentrações crescentes de glicerol.....38
- Figura 4. Dependência da variação de energia livre de Gibbs com a concentração de glicerol para formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio.....39

Resumo geral

Os osmólitos constituem um grupo de solutos de baixo peso molecular que estabilizam proteínas, ácidos nucleicos, células, tecidos e órgãos, em resposta a aumento no estresse ambiental. Eles têm uma distribuição ubiqüitária, com os mesmos tipos de solutos sendo encontrados em organismos muito distantes na escala evolucionária. Esta dissertação inicialmente revê os principais conhecimentos sobre os efeitos estabilizantes de osmólitos, com ênfase na estabilização de proteínas, e apresenta as idéias predominantes na literatura a respeito de seu mecanismo de ação. Os osmólitos forçam as proteínas a se enovelarem e a resistirem a desnaturação, alterando as propriedades do solvente e modificando a interação da superfície externa da proteína com o solvente. Apesar de muitos trabalhos terem explorado a ação dos osmólitos sobre a transição entre os estados nativo e desenovelado de uma proteína, pouco se estudou o efeito destes solutos sobre a formação de complexos enzima-inibidor. Esta dissertação também estudou o efeito do glicerol sobre o equilíbrio de inibição da tripsina bovina com o íon benzamidínio. A incorporação de 0 a 2.5 mol.L⁻¹ de glicerol não perturba a entalpia de van't Hoff, mas aumenta a energia livre de Gibbs, para a associação de tripsina bovina com o íon benzamidínio.

Introdução Geral

As proteínas apresentam enorme diversidade de função e constituem as macromoléculas mais abundantes na natureza. O arcabouço que forma a maioria dos organismos vivos, os anticorpos, além de muitos transportadores e hormônios são proteínas. As enzimas, que apresentam a habilidade de aumentar de maneira extraordinária a velocidade das reações químicas, constituem as biomoléculas mais especializadas dentro deste grupo (Nelson & Cox, 2000).

No meio intracelular normalmente existem as condições ideais para assegurar esta atividade biológica (Arakawa et al., 2001), entretanto também ocorrem mecanismos para regular a ação enzimática. A compartimentação de células e tecidos, alterações de pH, a presença de coenzimas, a concentração do substrato, a disponibilidade de energia, além de eventos como a regulação alostérica e covalente afetam a velocidade de uma reação enzimática.

As enzimas aumentam a velocidade das reações químicas através de mecanismos como o encaixe induzido, a aproximação, a desestabilização das ligações a serem rompidas e a especificidade pelo substrato. Os eventos que ocorrem durante a catálise assemelham-se bastante com as reações orgânicas (Smith et al., 1983).

A função de uma enzima está intrinsecamente associada ao seu estado nativo. Este estado é, na verdade, resultante de vários microestados constituídos por conformações distintas, que têm afinidades diferentes pelo substrato (Bai et al., 1995; Wooll et al., 2000). Alterações sutis no grau de flexibilidade e estabilidade da enzima permitem que a sua atividade catalítica ótima seja mantida numa ampla faixa de temperatura (Fields, 2001).

Entretanto, inúmeras condições de estresse ambiental como calor, radicais livres e altas concentrações de sais, podem comprometer a atividade

de uma biomolécula. Um mecanismo intracelular inicialmente empregado para prevenir tais efeitos deletérios em procariotos foi o acúmulo de íons inorgânicos como potássio, além de aminoácidos como glutamato, prolina e glutamina (Welsh, 2000). Posteriormente, a ampla utilização de solutos coletivamente conhecidos como osmólitos tornou-se uma estratégia freqüentemente observada na natureza para assegurar a sobrevivência dos organismos a essas condições adversas (Yancey et al., 1982; Somero, 1986; Rhodes, 1987).

Os níveis intracelulares de osmólitos dependem do organismo, de sua disponibilidade no meio e do tipo, bem como da severidade e da duração do estresse osmótico (Diamant et al., 2001). Desta forma, podem ser encontradas concentrações que variam de dezenas a centenas de milimolar.

Os osmólitos permitem que as proteínas mantenham suas atividades biológicas porque atuam como estabilizadores da estrutura proteica, sem contudo comprometer a eficiência de sua função dentro da célula (Yancey et al., 1982; Yancey, 1985; Bowlus & Somero, 1979).

Estes solutos estabilizantes 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). No caso da betaína, é particularmente interessante observar que esse composto, derivado da colina, após sucessivas desmetilações dá origem à dimetilglicina, à metilglicina e à glicina, compostos que constituem uma família análoga de estabilizadores.

Considerando-se o aspecto funcional, há ainda uma outra classificação para estes solutos. Aqueles que exercem pequenos efeitos sobre a função proteica são classificados como solutos compatíveis. Já os osmólitos que combatem os efeitos que solutos deletérios têm sobre as proteínas são

denominados solutos neutralizantes (Borowitzka & Brown, 1974; Yancey et al., 1982).

As altas pressões hidrostáticas as quais muitos organismos estão submetidos são compensadas pelo acúmulo de osmólitos até concentrações de 300 mmol/kg de massa corporal, sendo que este acúmulo é proporcional à profundidade em que estes animais vivem (Gillett et al., 1997; Kelly & Yancey, 1999).

Rãs, tartarugas e insetos que comumente hibernam, resistem ao congelamento de seus fluidos corporais por um considerável período sem apresentar movimentos respiratórios, o que normalmente não seria compatível com a vida (Storey et al., 1996).

Organismos anidrobióticos são beneficiados com o acúmulo desses solutos estabilizantes, que mantêm viáveis tecidos com até menos que 0,1% de água (Panek, 1996). Este efeito protetor é usualmente observado com solutos da classe dos carboidratos, que estabelecem ligações de hidrogênio com a proteína, substituindo desta forma a água (Carpenter & Crowe, 1988).

Vários ensaios *in vitro* têm comprovado a ação protetora dos osmólitos. A malato desidrogenase é protegida contra desnaturação a 44 °C por concentrações fisiológicas de betaína, trealose, prolina ou glicerol. Estes solutos promovem uma diminuição dos movimentos de grupos da proteína mesmo em temperaturas elevadas o suficiente para promover sua agregação e desnaturação (Diamant et al., 2001).

A incorporação de sacarose ou trealose a 1,5 mol.L⁻¹ aumenta consideravelmente a temperatura de transição de desnaturação térmica da lisozima TAP². Além disso, a presença destes osmólitos permite que, mesmo no estado desnaturado, a lisozima apresente α -hélices e preserve alguma estrutura terciária. A adição destes açúcares também diminui a taxa de agregação e a ocorrência de processos como racemização e desaminação nesta

enzima (Ueda, Makiko & Imoto, 2001). Uma baixa incidência destes eventos, além de uma reduzida ocorrência de reações oxidativas, também são observados para a holoenzima e para a apoenzima da álcool desidrogenase de levedura, na presença de solutos como trealose, sacarose, sorbitol e manitol (Miroliaei & Nemat-Gorgani, 2001).

A presença de glicerol, xilose e polietilenoglicol têm um pequeno efeito sobre a complexação da proteína repressora do triptofano (TR) com um segmento derivado do operon TRP EDCBA de *Escherichia coli* (Brown, 1999). Segundo o autor, isto poderia ser justificado pelo aumento da estabilidade da proteína e conseqüente diminuição da sua flexibilidade. Entretanto, a análise da variação de energia livre envolvida na complexação dos três dímeros de TR ao seu opéron mostra que a presença de betáina interfere no grau de cooperatividade desta interação (Brown, 1999).

O S PRO, um dos fragmentos que constitui a ribonuclease, é protegido contra desnaturação térmica pela adição de sarcosina, que promove uma elevação da temperatura de transição térmica desta enzima (T_m) de 35,3 °C para 53,5 °C. Na presença deste soluto, o S PRO também adquire uma estrutura mais compacta e menos susceptível à clivagem pela tripsina, ocorrendo inclusive proteção do fragmento S PRO 38-124, que normalmente seria clivado. De forma geral, a ligação dos fragmentos S PRO e S PEP, que constituem a ribonuclease, mostra-se mais forte na presença de sarcosina (Ratnaparkhie & Varadarajan, 2001).

Proteínas como a ribonuclease A, o citocromo C, a mioglobina e a lisozima, apresentam um aumento na temperatura de transição térmica com a adição de alguns osmólitos. Entretanto, a variação de energia livre de desnaturação dessas biomoléculas não é afetada, à temperatura de 25 °C, pela adição de tais solutos (Anjum, Rishi & Ahmad, 2000), o que naturalmente seria importante para não alterar o turnover dessas proteínas (Pace, Fisher &

Cupo, 1981).

A N-óxido trimetilamina (TMAO) interfere na ação da proteína TAU, que, associada aos microtúbulos, atua no processo de nucleação, polimerização e manutenção durante a reunião de tubulina, inclusive na presença de agentes caotrópicos (Tseng & Graves, 1998). Recentemente, a associação de L-prolina a esta chaperonina química, com conhecida capacidade de induzir estruturas secundárias e terciárias, revelou a habilidade em promover uma maior regularidade na estrutura cristalina da proteína básica da mielina, que normalmente é considerada como uma proteína desestruturada (Hill et al., 2002).

O supressor de tumor p53, um dos reguladores centrais da resposta ao DNA danificado, mostrou ser capaz de induzir o acúmulo de ceramidas, compostos que apresentam múltiplas atividades biológicas associadas ao controle do ciclo celular, da apoptose e das respostas ao estresse (Dbaiibo, 1997).

É particularmente interessante observar que o uso de um tipo de osmólito orgânico não é delineado pela posição filogenética do organismo. Glicina e betaína são usados por invertebrados marinhos, eubactérias e plantas halofílicas, mas também são encontrados nos rins de mamíferos, o que consiste numa verdadeira convergência evolutiva (Somero, 1986). Fields (2001) sugere inclusive que a utilização de solutos estabilizantes pelos organismos para prevenir efeitos deletérios sobre as suas estruturas proteicas é altamente benéfica, porque permite que eles possam adaptar-se a vários nichos térmicos e colonizar novas áreas com mais facilidade, alterando os níveis destes aditivos.

A atividade osmorregulatória também está bastante caracterizada em mamíferos. Na medula renal, onde as concentrações de uréia, um agente com reconhecida habilidade de desenovelar proteínas é bastante alta, ocorre síntese

de sorbitol e glicerofosforilcolina, além de acúmulo de inositol e betaina (Garcia-Perez & Burg, 1990).

A forma recombinante do interferon- α humano tem a meia vida da sua atividade antiviral bastante aumentada quando submetida à inativação térmica na presença de soro albumina bovina, monossacarídeos, aminoácidos e polióis, mas na ausência destes aditivos é observado um decaimento exponencial desta atividade (Šebéka et al., 2001).

In vitro, embriões de mamíferos desenvolvem-se melhor em meio hiperosmótico pela adição de osmólitos (Dawsan & Baltz, 1997). *In vivo*, em ratos, há uma variação no perfil destes solutos ao longo do desenvolvimento (Miller, Hanson & Yancey, 2000).

Uma das mais recentes e interessantes descobertas relacionadas à ação dos osmólitos refere-se a sua influência na ação das chaperoninas, regulando desta forma a homeostase das proteínas. Betaina e glicerol ativam a chaperona LS (GroEL + GroES) de *E. coli* em 30 a 40% durante o enovelamento de malato desidrogenase termicamente desnaturada associada à GroEL. Além disso, na ausência da GroES o enovelamento ocorre doze vezes mais rápido com a adição de glicerol a $3,8 \text{ mol.L}^{-1}$ (Diamant et al., 2001). Segundo Bolen e Baskakov (2001), a presença destes solutos estabilizantes asseguraria o enovelamento adequado destas biomoléculas mesmo quando elas não estão submetidas a condições de estresse.

Apesar de ainda serem necessárias muitas investigações para avaliar o grau de especificidade da relação osmólito-proteína para promover a estabilidade proteica, é indiscutível que esta estratégia tem uma ampla aplicabilidade.

Já estão sendo realizados testes clínicos com uma insulina inalável encapsulada em açúcar. Este mesmo método também tem sido utilizado para preservar proteínas de valor terapêutico como a calcitonina, usada no

tratamento da osteoporose, e a α_1 - anti-tripsina, utilizada no tratamento de enfisema pulmonar (Potera, 1998).

Clones e cepas de laboratório poderiam ser estocados de forma mais adequada com a utilização de mecanismos capazes de promover resistência à dessecação causada pela atmosfera, a qual remove a monocamada de água intimamente associada à macromolécula e provoca sua desestabilização (Billi & Potts, 2002).

Além disso, o estudo das propriedades destes solutos estabilizantes poderia permitir o aperfeiçoamento das técnicas de conservação de órgãos, tecidos e células utilizadas em transplantes, implantes e em procedimentos como a fertilização *in vitro*.

A estabilização proteica, assegurada por mecanismos que diminuem a reatividade de seus grupamentos, como a oxidação de tióis, as metilações e a formação de pontes dissulfeto (Arakawa et al., 2001), poderia ser obtida de uma forma mais simples, resultando na redução dos custos deste procedimento.

Apesar de muitos trabalhos relatados na literatura explorarem a ação dos osmólitos sobre a transição entre os estados nativo e desenovelado de uma proteína, existe uma escassa produção científica que relata o efeito destes solutos sobre a formação de complexos enzima-inibidor.

O equilíbrio de formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio, um inibidor clássico desta protease serínica pode ser afetado pela adição de glicerol, sorbitol ou betaína (Souza-Penha, 1998). Este efeito poderia ser justificado por alterações nas propriedades do solvente (Arakawa & Timasheff, 1983; Arakawa & Timasheff, 1985; Timasheff & Arakawa, 1989).

A tripsina bovina é uma enzima produzida na forma inativa, o tripsinogênio. Uma vez ativada pela enteropeptidase, a tripsina também

promove sua autoativação a partir do tripsinogênio, com a liberação de um peptídeo com seis resíduos de aminoácidos (Davie & Neurath, 1955). Esta proteína tem os resíduos de Ser¹⁸³, His⁴⁶ e Asp⁹⁰ diretamente envolvidos no processo de catálise, que consiste na quebra das ligações peptídicas entre as carboxilas de resíduos de lisina e arginina com outros aminoácidos da cadeia. O sítio catalítico desta enzima também compreende uma região da enzima chamada de fenda oxaniônica, que estabiliza o intermediário tetraédrico da catálise (Walter & Bode, 1983).

O íon benzamidínio é um inibidor clássico de tripsina. Sua ligação à enzima resulta numa maior compactação da mesma, com liberação de moléculas de água e aumento das interações hidrofóbicas em seu interior. A associação de *para*-derivados do íon benzamidínio à tripsina ocorre com uma elevada variação negativa na entalpia de van't Hoff (Rogana, Penha-Silva & Mares-Guia, 1989).

O presente trabalho investiga se a incorporação de concentrações crescentes de glicerol, um agente com reconhecida propriedade estabilizante, afeta a variação de energia livre de Gibbs e a entalpia de ligação do íon benzamidínio à tripsina bovina, entre os limites de 5 e 30 °C de temperatura.

Referências

- Anjum F, Rishi V & Ahmad F (2000). Compatibility of osmolytes with Gibbs energy of stabilization of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1476: 75-84.
- Arakawa T & Timasheff SN (1983). Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 224: 169-177.
- Arakawa T & Timasheff SN (1985). Stabilization of proteins by osmolytes. *Biophysical Journal*, 47: 411-414.
- Arakawa T, Prestrelski SJ, Kenney WC & Carpenter JF (2001). Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46: 307-326.
- Bai YW, Sosnick TR, Mayne L & Englander SW (1995). Protein-folding intermediates: native-state hydrogen-exchange. *Science*, 269: 192-197.
- Billi D & Potts M (2002). Life and death of dried prokaryotes. *Research in Microbiology*, 153: 7-12.
- Bolen DW & Baskakov IV (2001). The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *Journal of Molecular Biology*, 310: 955-963.
- Borowitzka LJ & Brown AD (1974). The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga *Dunaliella*: the role of glycerol as a compatible solute. *Archives of Microbiology*, 96: 37-52.

- Bowlus RD & Somero GN (1979). Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. *Journal of Experimental Zoology*, 208: 137-152.
- Brown MP, Grillo AO, Boyer M & Royer CA (1999). Probing the role of water in tryptophan repressor-operator complex. *Protein Science*, 8: 1276-1285.
- Carpenter JF & Crowe JH (1988). Models of stabilization of a protein by organic solutes during desiccation. *Cryobiology*, 25: 459-470.
- Davie EW & Neurath H (1955). Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. *Journal of Biological Chemistry*, 212: 515-529.
- Dawson KM & Baltz JM (1997). Organic osmolytes and embryos: substrates of the Gly and β Transport systems protect mouse zygotes against the effect of raised osmolarity. *Biol Repro*, 56: 1550-1558.
- Dbaibo GS (1997). Regulation of stress response by ceramide. *Biochemical Society Transactions*, 25: 557-561.
- Diamant S, Eliahu N, Rosenthal D & Goloubinoff P (2001). Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 39586-39591.
- Fields PA (2001). Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 129: 417-431.

- Garcia-Perez A & Burg MB (1990). Importance of organic osmolytes for osmoregulation by renal medullary cells. *Hypertension*, 16: 595-602.
- Gillett MB, Suko JR, Santoso FO & Yancey PH (1997). Elevated levels of trimethylamine oxide in muscles of deep-sea gadiform teleosts: A high pressure adaptation. *Journal of Experimental Zoology*, 279: 386-391.
- Hill CM, Bates IR, White GF, Ross Hallet F & Harauz G (2002). Effects of osmolyte trimethylamine-N-oxide on conformation, self association, and two-dimensional crystallization of myelin basic protein. *Journal of Structural Biology*. 139: 13-26.
- Kelly RH & Yancey PH (1999). High contents of trimethylamine oxide correlating with depth in deep-sea teleost fishes, skates and decapod crustaceans. *Biological Bulletin*, 196: 18-25.
- Miller TJ, Hanson RD & Yancey PH (2000). Developmental changes in organic osmolytes in prenatal Y postnatal rat tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A*, 125:45-56.
- Miroliaei M & Nemat-Gorgani (2001). Sugars protect native and apo yeast alcohol dehydrogenase against irreversible thermoinactivation. *Enzyme and Microbial Technology*, 29: 554-559.
- Nelson DL & Cox MM (2000). Amino acids, Peptides, and Proteins. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York, 115-153.
- Pace CN, Fisher LM & Cupo JE (1981). Globular protein stability: aspect of interest in protein turnover. *Acta Biologica et Medica Germanica*, 40: 1385-1392.

- Panek AD (1996). Trealose metabolism-new horizons in technological applications. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*, 28: 169-181.
- Potera C (1998). A sweet way to keep proteins safe. *Science*, 281: 1793.
- Ratnaparkhi GS & Varadarajan R (2001). Osmolytes stabilize Ribonuclease S by stabilizing its fragments S protein and S peptide to compact folding-competent states. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 28789-28798.
- Rhodes D (1987). Metabolic responses to stress. In: Davies DD (editor), *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*, Academic Press, New York, 201-241.
- Rogana E, Penha-Silva N & Mares-Guia M (1989). The substituent effect on complex formation between α -trypsin and *para*-substituted benzamidinium ions: A thermodynamic study. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*, 22: 1177-1190.
- Šeběca HK, Starkuvienė B, Trepšienė OV, Pauliukonis AA & Brumelis VA (2001). Comparative effects of stabilizing additives on the rates of heat inactivation of recombinant human interferon α -2b in solution. *Antiviral Research*, 50: 117-127.
- Smith EL, Hill RL, Lehman IR, Lefkowitz RJ, Handler P & White A (1983). Enzimas II. In: *Bioquímica: Aspectos Gerais*, Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 199-250.
- Somero GN (1986). Protons, osmolytes and fitness of internal milieu for protein function. *American Journal of Physiology*, 251: R197-R213.
- Souza-Penha MA (1998). Termodinâmica da ligação de tripsina bovina com o

- ion benzamidínio na presença de osmólitos naturais. Dissertação de Mestrado. Uberlândia: UFU, 68 pp.
- Storey KB, Mosser DD, Douglas DN, Grundy JE & Storey JM (1996). Biochemistry bellow 0 °C: nature's frozen vertebrates. *Brazilian Journal of Medical and Biology Resarch*, 29: 283-307.
- Timasheff SN & Arakawa T (1989). Stabilization of protein structure by solvents. In: (Creighton TE editor), IRL Press, Oxford, 331-345.
- Tseng HC & Graves DJ (1998). Natural methylamine osmolytes trimethylamine N-oxide and betaine, increase TAU-induced polymerization of microtubules. *Biochemical and Biophysical Resarch*, 250: 726-730.
- Ueda T, Makiko N & Imoto T (2001). Aggregation and chemical reaction in hen lysozyme caused by heating at pH 6 are depressed by osmolytes, sucrose and trealose. *The Japanese Biochemical Society*, 130: 491-496.
- Walter J & Bode W (1983). The X-ray crystal structure analysis of the refined complex formed by bovine trypsin and p-amidinophenypyruvate at 1.4 Å resolution. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 364: 949-959.
- Welsh DT (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 263-290.
- Wooll JO, Wrabl JO & Hilser VJ (2000). Ensemble modulation as an origin of denaturant-independent hydrogen exchange in proteins. *Journal of Molecular Biology*, 301: 247-256.
- Yancey PH (1985). Organic osmotic effectors in cartilaginous fishes. In:

Gilles R & Gilles-Baillien M (editors), *Transport process, iono- and osmoregulation*, Springer-Verlag, New York, 424-436.

Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD & Somero G (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 21: 1214-1222.

Capítulo I – Entalpia de van't Hoff e energia livre de Gibbs para associação de tripsina bovina com o íon benzamidínio sob concentrações crescentes de glicerol

Abstract

VAN'T HOFF ENTHALPY AND GIBBS FREE ENERGY OF ASSOCIATION OF BOVINE TRYPSIN WITH THE BENZAMIDINIUM ION UNDER INCREASING CONCENTRATIONS OF GLYCEROL

Glycerol is a stabilizing solute that can protect protein, nucleic acids, cells, tissues, and organs, against stress conditions. This work investigated the action of glycerol on van't Hoff enthalpy changes ($\Delta H^{\circ}_{\text{vH}}$) of association between bovine trypsin and the benzamidinium ion at 5 to 30 °C of temperature. Plots of $1/A_{410 \text{ nm}}$ against fourteen inhibitor concentrations at two different concentrations of the substrate Benzoil-D-L-Arginine-*p*-Nitroanilide were used to determine K_i values. Van't Hoff enthalpy changes in the absence and presence of 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; and 2.5 mol.L⁻¹ glycerol were determined by using the dependence line slope of $\ln K_i$ with $1/T$ between 5 and 30 °C of temperature. The presence of 0.0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; and 2.5 mol.L⁻¹ of glycerol produced $\Delta H^{\circ}_{\text{vH}}$ values of -12.51 ± 0.63 ; -12.68 ± 0.61 ; -12.29 ± 1.03 ; -12.42 ± 0.54 ; -10.63 ± 0.57 ; and -11.00 ± 0.62 kcal.mol⁻¹, respectively. Since slope of the dependence lines of $\ln K_i$ with $1/T$ didn't showed statistically significant differences ($P < 0.01$), we concluded that incorporation of 0 to 2.5 mol.L⁻¹ of glycerol doesn't perturb the van't Hoff enthalpy of association between bovine trypsin and the benzamidinium ion. Otherwise, incorporation of until 2.5 mol.L⁻¹ of glicerol produce an increase in the values of Gibbs free energy for association between bovine trypsin and the benzamidinium ion ($P = 0.00363$), according the linear regression line given by the equation $\Delta G^{\circ} = -5.355 - 0.0664 x$, where ΔG° is given in kcal.mol⁻¹.

Supported by PROPP-UFU, CNPq and CAPES.

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, de natureza quimicamente definida (Yancey et al., 1982) estabilizam a estrutura proteica sem comprometer a eficiência dos processos catalíticos que ocorrem dentro da célula (Bowlus & Somero, 1979; Yancey et al., 1982; Yancey, 1985), porque exercem sua ação protetora sem interagir fortemente com a mesma (Panek, 1996).

O mecanismo de ação dos osmólitos ainda não está devidamente esclarecido, entretanto evidências sugerem que essas substâncias forçam algumas proteínas a se enovelarem e resistirem à desnaturação (Tseng & Graves, 1998; Ueda, Makiko & Imoto, 2001; Miroliaei & Nemat-Gorgani, 2001; Ratnaparkhie & Varadarajan, 2001).

A atividade osmorregulatória está amplamente distribuída na natureza, mesmo em seres bastante distantes dentro da escala evolutiva (Somero, 1986). Fields (2001) inclusive sugere que o acúmulo destes aditivos contribui para que os organismos possam colonizar novas áreas. Além disso, os osmólitos influenciam no papel das chaperoninas, regulando desta forma, a homeostase das proteínas (Diamant et al., 2001).

Este trabalho explorou o efeito de concentrações crescentes de glicerol sobre a variação de energia livre de Gibbs e a entalpia de van't Hoff para a formação de complexos de tripsina bovina, uma enzima da família das proteinases serínicas, com o íon benzamidínio, um inibidor competitivo clássico desta enzima, entre 5 e 30 °C de temperatura.

Material e Métodos

Preparo das soluções utilizadas - As soluções de tripsina bovina foram utilizadas a uma concentração de 2 mg/mL em HCl pH 3,0 e conservadas na geladeira por períodos de no máximo uma semana. Todas as reações ocorreram em tampão trizma-base $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, contendo CaCl_2 a 2 mmol.L^{-1} , pH 8,0, ajustado com a adição de HCl a 0,2 e $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. O glicerol foi incorporado ao tampão, em concentrações de 0 até $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$, antes de ajustar o pH e o volume final da solução. O substrato utilizado foi o Benzoil-D,L-Arginina-*para*-Nitroanilida (Bz-D,L-Arg-Nan). As soluções de Bz-D,L-Arg-Nan foram semanalmente preparadas em uma concentração estoque de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em dimetilsulfóxido (DMSO) e conservadas em frasco âmbar no freezer. As reações de hidrólise enzimática do Bz-D,L-Arg-Nan ocorreram na presença do íon benzamidínio em tampão trizma-base pH 8,0 e foram interrompidas pela adição de ácido acético a 60% v/v.

Os reagentes utilizados para preparo destas soluções foram provenientes da Sigma-Aldrich, Fluka, Merk, USB, Fisher Scientific e Reagen. A tripsina utilizada neste trabalho é uma tripsina bovina comercial adquirida da Sigma Chemical Company e é constituída basicamente pela forma β da enzima.

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, beckers, provetas e balões volumétricos utilizados para o preparo das soluções eram da marca Pyrex.

Efeito da concentração de glicerol sobre as constantes de dissociação dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio -

Foram utilizadas duas concentrações de substrato denominadas S_1 e S_2 , preparadas pela diluição da solução-estoque de Bz-D,L-Arg-Nan de 1:100 e 1:200 em tampão trizma-base a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, com CaCl_2 a 2 mmol.L^{-1} , contendo glicerol a 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$ em pH 8,0. As soluções S_1 e S_2 foram preparadas no momento do uso e conservadas em banho de gelo-água, para evitar hidrólise inespecífica do substrato.

Em um experimento típico, foram usadas duas séries, cada uma com 15 tubos de ensaio, designadas respectivamente de S_1 e S_2 , em que o primeiro tubo de cada série foi usado como controle ou branco. Inicialmente cada tubo das baterias S_1 e S_2 , inclusive os tubos controles, recebeu 1 mL das respectivas soluções de uso do substrato. Depois, foram adicionados 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 tampão aos tubos de ambas as séries. Em seguida foi adicionado a cada tubo um volume do íon benzamidínio a $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$ em solução tampão (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 contida em cada tubo fosse igual a 2,3 mL. Neste momento, os tubos de ensaios foram pré-incubados em banho termostatizado com refrigeração, marca Marconi, modelo MA 184, regulado para a temperatura do experimento. Após equilíbrio térmico da solução, os tubos controles de ambas as séries receberam 0,2 mL de HCl pH 3 e a cada um dos demais tubos foram adicionados 0,2 mL de tripsina a 2,0 mg/mL, de tal forma que cada tubo fosse incubado por exatamente 10 minutos. Após estes 10 minutos de incubação, foram adicionados a cada tubo 0,5 mL de ácido acético a 60% v/v para interromper a reação enzimática. O grau de hidrólise do substrato foi determinado pela leitura da absorvância da *para*-nitroanilida em 410 nm (A_{410}), contra o tubo branco (tubo número 1) da sua respectiva série, em espectrofotômetro Micronal modelo B442.

Cálculo das constantes de dissociação dos complexos enzima-inibidor – 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 (i), cada reta representando um conjunto de 14 ensaios cinéticos de velocidade (Dixon, 1953). A tripsina comporta-se de acordo com a cinética de Michaelis-Menten (1913). Na presença do inibidor competitivo esta expressão adquire a seguinte forma:

$$v = \frac{V_{\text{máx}} S}{K_M (1 + i/K_i) + S} \quad (01)$$

onde v , $V_{\text{máx}}$, S e K_M são, respectivamente, a velocidade inicial da reação, a velocidade máxima, a concentração do substrato e a constante de Michaelis-Menten, sendo que i e K_i correspondem à concentração do inibidor e à constante de inibição.

O duplo recíproco desta equação (Lineweaver & Burk, 1934) assume a forma:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\text{máx}} S} \cdot \frac{K_i + i}{K_i} + \frac{1}{V_{\text{máx}}}, \quad (02)$$

que pode ser modificada para:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + S}{V_{\text{máx}} S} + \frac{K_M}{V_{\text{máx}} S K_i} \cdot i \quad (03)$$

Esta expressão mostra a dependência de $1/v$ contra i , segundo a chamada equação de Dixon (1953). Entretanto, como Dixon considera 2

concentrações diferentes de substrato tem-se a equação:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + S_1}{V_{m\acute{a}x} S_1} + \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x} S_1 K_i} \cdot i, \quad (04)$$

que corresponde a concentração do substrato S_1 , e a equação:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + S_2}{V_{m\acute{a}x} S_2} + \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x} S_2 K_i} \cdot i, \quad (05)$$

que se refere à concentração do substrato S_2 . Como o inibidor competitivo não afeta a $V_{m\acute{a}x}$ da reação, no ponto de interseção destas retas

$$i = - K_i \quad (06)$$

Aos pontos experimentais utilizados para determinação da constante 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. Os pesos foram utilizados para corrigir os problemas resultantes da linearização da equação (1).

Determinação da variação de energia livre de Gibbs e da entalpia padrão de van't Hoff para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio - 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:

$$K_{eq} = \frac{[E][I]}{[EI]}, \quad (07)$$

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:

$$\Delta G^{\circ} = RT \ln K_i, \quad (08)$$

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,

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ}, \quad (09)$$

temos que:

$$RT \ln K_i = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ}, \quad (10)$$

ou, mais simplesmente:

$$\ln K_i = \frac{\Delta H^{\circ}}{R} \cdot \frac{1}{T} - \frac{\Delta S^{\circ}}{R}, \quad (11)$$

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 cada uma das concentrações de glicerol utilizadas.

Os coeficientes de correlação (**r**) entre as variáveis estudadas foram determinados a partir da expressão de Cembrowski & Sullivan (1996). Os cálculos foram executados com o auxílio do programa Origin 3.0.

Resultados e discussão

A **Figura 1** mostra um típico gráfico de Dixon (1953), utilizado para determinação de K_i . A natureza da inibição é nitidamente competitiva, uma vez que a interseção das retas S_1 e S_2 ocorre no quadrante superior esquerdo. Este padrão foi observado na maioria dos casos; entretanto, em algumas situações, a interseção foi detectada no quadrante inferior esquerdo ou no eixo x , o que não é compatível com uma inibição competitiva. Isto sugere que a presença de glicerol pode afetar o mecanismo envolvido na interação enzima-inibidor, modificando o padrão de inibição da tripsina pelo íon benzamidínio.

Em qualquer situação, o valor de x no ponto de interseção das retas de $1/A_{410nm}$ contra a concentração do íon benzamidínio fornece o K_i . Os valores de K_i obtidos a 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mol.L⁻¹ de glicerol estão mostrados nas **Tabelas 1, 2, 3, 4, 5 e 6**, respectivamente. Cada valor K_i foi determinado considerando-se 28 ensaios cinéticos de velocidade. Em todos os casos, para todas as retas consideradas, foram observados valores elevados e positivos para o coeficiente de correlação r de Pearson. Os valores de r sempre foram estatisticamente significantes ($P < 0,01$), o que comprova que os dados experimentais ajustaram-se bem ao modelo linear proposto para a dependência.

Tanto na ausência de glicerol quanto na presença deste osmólito, em todas as concentrações avaliadas, com o aumento da temperatura há um aumento na constante de dissociação (K_i) do complexo enzima-inibidor, como pode ser constatado nas **Tabelas 1 a 6**. Este aumento no K_i pode ser justificado pelo fato de que a adição de calor ao sistema contendo EI aumenta a agitação dos grupamentos químicos da proteína, prejudicando sua interação com ligantes (Hymes, Cuppert & Canady, 1969; Mares Guia, Nelson & Rogana, 1977; Rogana, Penha-Silva & Mares Guia, 1989). Sendo assim, com o aumento da temperatura, a população da enzima livre no equilíbrio fica

aumentada.

Da mesma forma que o aumento da temperatura prejudica as forças atrativas entre a proteína e o ligante, as próprias forças atrativas que mantêm a estrutura da proteína são também enfraquecidas. Esta é a base da ação caotrópica do calor. Manter a estrutura da proteína estável é um desafio importante para manutenção de sua função.

Modificações químicas de aminoácidos, mutagênese e alterações no microambiente proteico são as principais estratégias para melhorar a estabilidade de uma proteína (Miroliaei & Nemat-Gorgani, 2001).

A estabilização por solutos, como o glicerol, ocorre no microambiente proteico. Nas altas concentrações em que são usados (de 0,5 a 10 mol.L⁻¹), os osmólitos representam cerca de 30 a 40% do volume do solvente e são na realidade co-solventes (Timasheff, 2002).

As forças que determinam a estabilidade de uma proteína são várias e compreendem as interações hidrofóbicas, as ligações de hidrogênio e as forças atrativas eletrostáticas, dentre outras. A adição de um soluto ao solvente da proteína altera todas estas forças, além de promover um efeito estérico, que resulta em alterações na energia livre, devido a mudanças na configuração do solvente (Saunders et al., 2000).

A adição de uma proteína a uma solução de osmólito desestabiliza a superfície da macromolécula, promovendo exclusão preferencial do soluto na camada de solvente mais próxima da proteína, que tende então a preservar-se mais em seu estado nativo, que nestas condições é termodinamicamente mais favorável do que o estado desenovelado (Timasheff, 2002). De fato, na presença do osmólito, a energia livre do estado desnaturado é maior que a energia livre do estado nativo da proteína (Bolen & Baskakov, 2001).

Contudo, a presença de solutos caotrópicos favorece a diminuição do potencial químico da solução, reduzindo o efeito de exclusão e levando a uma

diminuição da estabilidade protéica (Arakawa et. al; 2001).

O glicerol tende a ser parcialmente excluído da superfície da proteína, porque seu contato com as regiões apolares da macromolécula é entropicamente mais desfavorável que seu contato com a água. Entretanto, o glicerol tem afinidade pelas regiões polares da proteína, razão pela qual ele não é completamente excluído da superfície dela. A adição deste soluto também promove um aumento do efeito hidrofóbico neste sistema (Gekko & Timasheff, 1981).

A associação da tripsina com o íon benzamidínio envolve uma interação do grupo amidínio do inibidor com um grupo carboxilato presente no fundo do bolso de especificidade da enzima, além de contatos hidrofóbicos do anel benzênico do inibidor com grupamentos apolares presentes nas paredes do bolso de especificidade da enzima (Krieger, Kay & Stroud, 1974; Mares-Guia, Nelson & Rogana, 1977; Penha-Silva, 1989; Rogana, Penha-Silva & Mares-Guia, 1989).

A presença de glicerol junto à fase volumosa do solvente da tripsina torna entropicamente desfavorável o contato do anel benzênico do íon benzamidínio com o solvente, favorecendo sua exclusão da fase volumosa do solvente e sua inclusão nos sítios hidrofóbicos de ligação do centro ativo da enzima. Este efeito deve promover um aumento na estabilidade do complexo EI em relação à enzima livre, na presença de glicerol. Assim, seria esperado um aumento em K_f e respectivamente uma diminuição em K_i ; na presença de concentrações crescentes de glicerol, o que de fato ocorreu, como pode ser verificado nas **Tabela 1 a 6**. A diminuição dos valores de K_i com a adição de glicerol ocorre tanto mais intensamente quanto mais elevada é a temperatura dentro do limite estudado (**Figura 2**). Este resultado é real e estatisticamente suportado por uma análise feita para comparação das retas de $\ln K_i$ contra $1/T$ (**Figura 3**) de acordo com descrições da literatura (Lark, Craven & Bosworth,

1968). Esta análise mostrou que as diferentes retas de regressão de $\ln K_i$ contra a temperatura não podem ser representadas por uma única reta média de regressão ($P < 0,05$).

Desta maneira, os valores em módulo do ΔG° de formação do complexo EI deveriam sofrer uma elevação com o aumento da concentração de glicerol, o que de fato ocorre (Magalhães, 2000). Este efeito também é suportado pelos dados da **Tabela 7**, que mostra valores de ΔG° determinados a partir dos valores de $\ln K_i$ obtidos por interpolação nas retas de regressão de $\ln K_i$ contra $1/T$ (**Figura 3**). A dependência de ΔG° com a concentração de glicerol (**Figura 4**) é de fato significativa ($P = 0,0063$) e dada pela equação de regressão $\Delta G^\circ = -5,355 - 0,0664 x$, onde ΔG° é dado em kcal.mol^{-1} e a concentração de glicerol é dada em mol.L^{-1} .

Rogana, Penha-Silva e Mares-Guia (1989) relatam uma diminuição do volume da α -tripsina após complexação com o íon benzamidínio. Estudos cristalográficos também sugerem um aumento na exposição de grupamentos iônicos na enzima inibida (Krieger, Kay & Stroud, 1974). Sendo assim, a associação da tripsina bovina ao íon benzamidínio seria uma condição bastante favorável num meio altamente polar, particularmente na presença de concentrações crescentes de glicerol.

A incorporação de um gradiente linear de glicerol entre 0 e 4 mol.L^{-1} em gel de poliacrilamida não promoveu mudança alguma no padrão de mobilidade eletroforética da tripsina, o que indica que a ação do glicerol não compreende alterações conformacionais significantes na estrutura da proteína (Souza-Penha, 1998). Assim, a ação do glicerol no aumento da estabilidade do complexo EI em relação à enzima e o inibidor livres deve envolver mudanças nas propriedades do solvente. De fato, o aumento na viscosidade do solvente determinada pela presença do osmólito apresenta uma correlação positiva com o efeito de termoproteção da proteína (Diamant et. al; 2001).

A **Tabela 8** apresenta os valores da variação de entalpia de van't Hoff para cada uma das concentrações de glicerol utilizadas. Os valores de $\Delta H^{\circ}_{\text{vH}}$ foram obtidos a partir das inclinações das retas de $\ln K_i$ contra $1/T$ (**Figura 3**). Para testar a ocorrência de diferenças estatisticamente significantes entre os valores de $\Delta H^{\circ}_{\text{vH}}$ obtidos, foi feita uma comparação estatística entre as inclinações das diferentes retas da **Figura 3**, segundo as descrições de Lark, Craven e Bosworth (1968), usando os dados compilados das **Tabelas de 1 a 6**. Esta análise mostrou que não há diferenças estatisticamente significantes entre as inclinações das diferentes retas ($P < 0,01$). Isto significa que a incorporação de concentrações crescentes de glicerol não afetou os valores de $\Delta H^{\circ}_{\text{vH}}$ para a formação dos complexos EI, nem a natureza entálpica que dirige esta associação. Por outro lado, os valores de $\Delta H^{\circ}_{\text{vH}}$ determinados neste trabalho não diferem muito do valor de $-11,8 \pm 1,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ obtido por Souza-Penha (1998) para a formação do mesmo complexo tripsina-íon benzamídínio, uma vez que as pequenas variações existentes situam-se dentro dos valores de desvio padrão. Estes resultados também são concordantes com ausência de perturbação no $\Delta H^{\circ}_{\text{cal}}$ para transição de desenovelamento da ribonuclease A na presença de osmólitos (Santoro et al., 1992).

Tabela 1. Constantes de dissociação (K_i) dos complexos de tripsina com o íon benzamidínio em tampão trizma-base a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 8,0, com CaCl_2 a 2 mmol.L^{-1} , na ausência de glicerol, em diferentes temperaturas.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	K_i ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
30	183,41
30	176,45
30	168,18
25	112,00
25	110,90
25	112,00
20	75,53
20	68,08
20	66,44
15	50,92
15	56,11
15	56,16
10	45,77
10	44,49
10	48,36
5	24,88
5	24,46
5	19,18

Tabela 2. Constantes de dissociação (K_i) dos complexos de tripsina com o íon benzamidínio em tampão trizma base a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 8,0, com CaCl_2 a 2 mmol.L^{-1} , na presença de glicerol a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, em diferentes temperaturas.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	K_i ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
30	140,85
30	167,79
30	185,79
25	121,91
25	110,32
25	96,98
20	70,07
20	64,21
20	73,90
15	51,68
15	53,22
15	60,39
10	36,26
10	44,67
10	42,57
5	25,70
5	20,81
5	19,71

Tabela 3. Constantes de dissociação (K_i) dos complexos de tripsina com o íon benzamidínio em tampão trizma base a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 8,0, com CaCl_2 a 2 mmol.L^{-1} , na presença de glicerol a $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$, em diferentes temperaturas.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	K_i ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
30	190,40
30	163,41
30	161,25
25	113,80
25	78,40
25	83,50
20	75,50
20	89,40
20	91,20
15	71,90
15	56,00
15	61,40
10	37,40
10	52,60
10	28,10
5	22,30
5	33,00
5	17,54

Tabela 4. Constantes de dissociação (K_i) dos complexos de tripsina com o íon benzamidínio em tampão trizma base a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 8,0, com CaCl_2 a 2 mmol.L^{-1} , na presença de glicerol a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$, em diferentes temperaturas.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	K_i ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
30	159,52
30	157,61
30	154,50
25	81,35
25	87,85
25	88,40
20	68,76
20	72,35
20	70,11
15	54,54
15	49,21
15	44,21
10	34,74
10	33,97
10	35,67
5	20,84
5	18,61
5	26,55

Tabela 5. Constantes de dissociação (K_i) dos complexos de tripsina com o íon benzamidínio em tampão trizma base a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 8,0, com CaCl_2 a 2 mmol.L^{-1} , na presença de glicerol a $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$, em diferentes temperaturas.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	K_i ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
30	145,11
30	137,02
30	133,84
25	85,39
25	103,00
25	108,00
20	59,21
20	58,80
20	57,56
15	49,71
15	50,42
15	49,53
10	40,91
10	44,19
10	42,82
5	26,33
5	26,94
5	23,80

Tabela 6. Constantes de dissociação (K_i) dos complexos de tripsina com o íon benzamidínio em tampão trizma base a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 8,0, com CaCl_2 a 2 mmol.L^{-1} na presença de glicerol a $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$, em diferentes temperaturas.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	K_i ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
30	143,82
30	134,55
30	138,02
25	71,36
25	72,26
25	77,85
20	64,79
20	62,75
20	57,05
15	43,07
15	45,03
15	40,66
10	38,31
10	35,85
10	33,36
5	26,65
5	19,24
5	23,83

Tabela 7. Variação de energia livre padrão de Gibbs para formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em tris-HCl pH 8,0 com CaCl_2 a 2 mmol.L^{-1} , a 25°C de temperatura na presença de concentrações crescentes de glicerol.

	$\Delta G^\circ(\text{kcal/mol})$
Sem glicerol	-5,374
Glicerol $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$	-5,393
Glicerol $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$	-5,385
Glicerol $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$	-5,455
Glicerol $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$	-5,482
Glicerol $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$	-5,539

Tabela 8. Variação de entalpia padrão de van't Hoff para formação dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em trizma base a 0,1 mol.L⁻¹, pH 8,0 com CaCl₂ a 2 mmol.L⁻¹.

	ΔH° (kcal/mol)	sd(kcal/mol)	r
Sem glicerol	-12,512	0,628	-0,980
Glicerol 0,5 mol.L ⁻¹	-12,677	0,608	-0,982
Glicerol 1,0 mol.L ⁻¹	-12,288	1,028	-0,948
Glicerol 1,5 mol.L ⁻¹	-12,424	0,537	-0,985
Glicerol 2,0 mol.L ⁻¹	-10,631	0,566	-0,978
Glicerol 2,5 mol.L ⁻¹	-10,999	0,623	-0,975

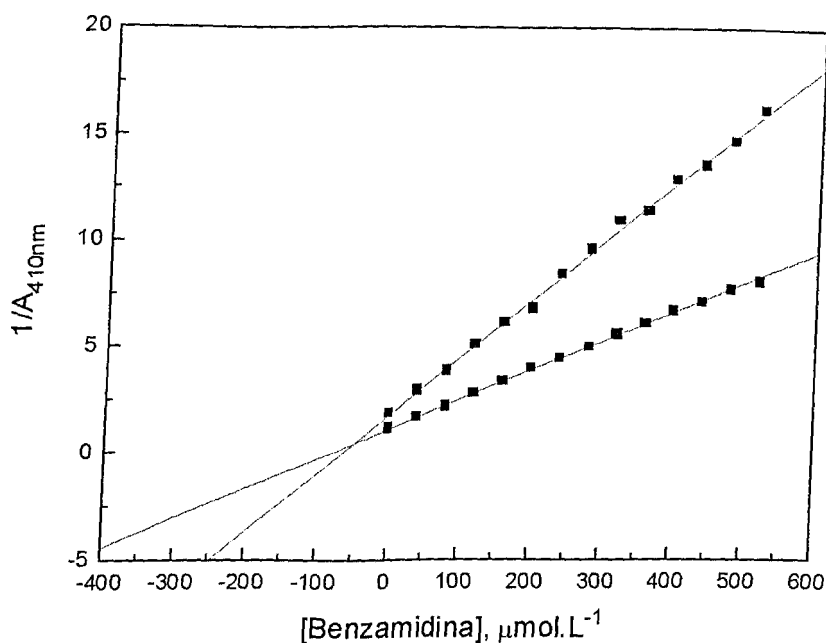


Figura 1 – Gráfico de $1/A_{410\text{ nm}}$ contra a concentração do íon benzamidínio para formação dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em $0,1\text{ mol.L}^{-1}$ trizma base pH 8,0 com 2 mmol.L^{-1} de CaCl_2 e $1,5\text{ mol.L}^{-1}$ de glicerol a $15\text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura. Os ensaios foram conduzidos em concentrações de 400 (S_1) e 200 (S_2) mmol.L^{-1} do substrato Bz-D,L-Arg-Nan. A reta mostrada em azul, que corresponde à concentração S_2 do substrato, é dada pela equação de regressão linear $y = 1,74073 + 0,02728 x$ com $r = 0,9986$. A reta vermelha, que corresponde à concentração do substrato S_1 , é dada pela equação $y = 1,0813 + 0,01384 x$ com $r = 0,9997$. O valor de K_i deste experimento foi de $49,21\text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$.

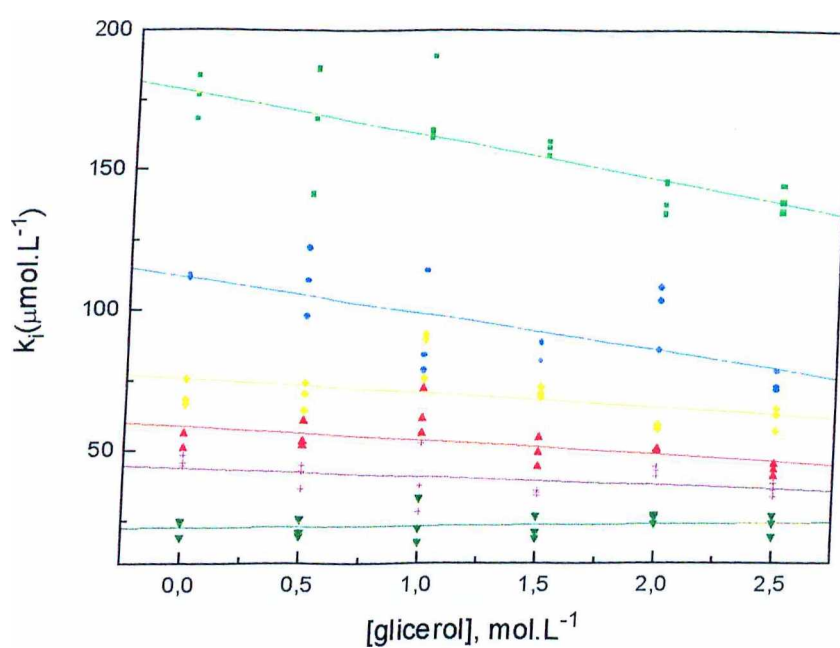


Figura 2 – Dependência de K_i com a concentração de glicerol para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de trizma base pH 8,0 com $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de CaCl_2 a 30 (■), 25 (●), 20 (*), 15 (▲), 10 (+) e 5 (▼) °C de temperatura.

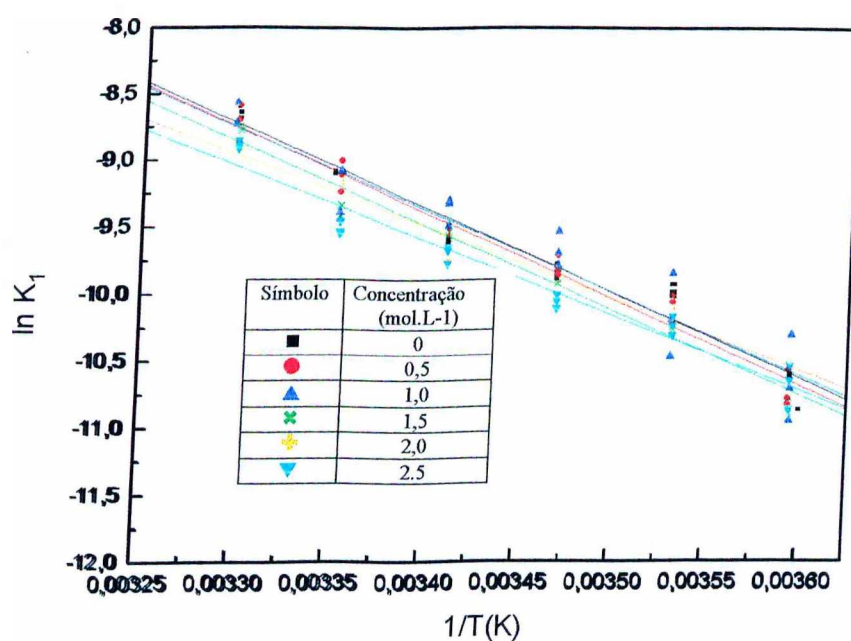


Figura 3 – Dependência de $\ln K_1$ contra $1/T$ para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em tris-HCl a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 8,0, com 2 mmol.L^{-1} de CaCl_2 na presença de concentrações crescentes de glicerol.

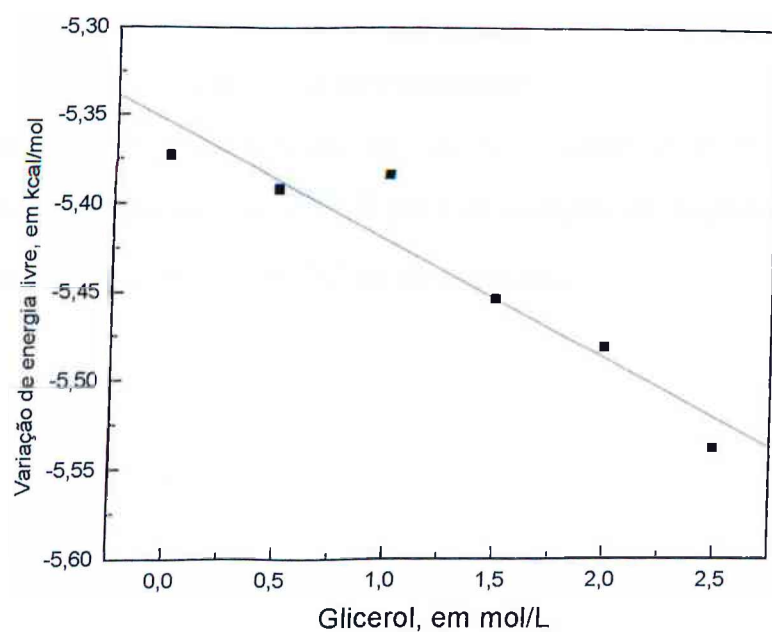


Figura 4 – Dependência da variação de energia livre de Gibbs com a concentração de glicerol para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em tampão trizma base a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 8,0, com CaCl_2 a 2 mmol.L^{-1} . A dependência de ΔG° com a concentração de glicerol é dada pela equação de regressão $\Delta G^\circ = -5,355 - 0,0664 x$, onde $r = 0,9504$ e $P = 0,00363$.

Conclusões

A constante de dissociação do complexo de tripsina com o íon benzamidínio sofre uma diminuição com o aumento na concentração de glicerol entre 0 e 2,5 mol.L⁻¹.

A incorporação de até 2,5 mol.L⁻¹ de glicerol provoca um aumento nos valores de variação de energia livre padrão de Gibbs para formação do complexo de tripsina com o íon benzamidínio.

Concentrações crescentes de glicerol, entre 0 e 2.5 mol.L⁻¹, não perturbam a entalpia de van't Hoff para associação de tripsina bovina com o íon benzamidínio entre 5 e 30 °C de temperatura.

Referências

- Arakawa T, Prestrelski SJ, Kenney WC & Carpenter JF (2001). Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46: 307-326.
- Bolen DW & Baskakov IV (2001). The osmophobic effect: Natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *Journal of Molecular Biology*, 310: 955-963.
- Bowlus RD & Somero GN (1979). Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. *Journal of Experimental Zoology*, 208: 137-152.
- Cembrowski GS & Sullivan AM (1996). Quality control and statistics. In: Bishop ML, Duben-Engelkirk JL & Fody EP (editors). *Clinical Chemistry*. Lippincott, Philadelphia, 65.
- Diamant S, Eliahu N, Rosenthal D & Goloubinoff P (2001). Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 39586-39591.
- Dixon M (1953). The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochemistry Journal*, 55:170-171.
- Fields PA (2001). Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 129:417-431.

- Gekko K & Timasheff SN (1981). Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry*, 20: 4667-4676.
- Hymes AJ, Cuppett CC & Canady WJ (1969). Thermodynamics of α -chymotrypsin-inhibitor complex formation. Effects of structural modification of the inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 244: 637-643.
- Krieger M, Kay LM & Stroud RM (1974). Structure and specific binding of trypsin: comparison of inhibited derivatives and a model for substrate binding. *Journal of Molecular Biology*, 83: 209-230.
- Lark PD, Craven BR & Bosworth RCL (1968). The comparison of several regression lines. *The Handling of Chemical Data*, Pergamon Press, Oxford, 171-175.
- Lineweaver H & Burk D (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of American Chemical Society*, 56: 658-666.
- Magalhães TM (2000). Efeito da concentração de glicerol sobre a energia livre de ligação da tripsina bovina com o íon benzamídico. Monografia, Uberlândia: UFU, 22 pp.
- Mares-Guia M, Nelson DL & Rogana E (1977). Electronic effects in the interaction of *para*-substituted benzamidines with trypsin: The involvement of the π -electronic density at the central atom of the substituent in binding. *Journal of American Chemical Society*, 99: 2331-2336.
- Michaelis L & Menten (1913). *Biochem Z*, 49: 333-369.

- Miroliaei M & Nemat-Gorgani (2001). Sugars protect native and apo yeast alcohol dehydrogenase against irreversible thermoinactivation. *Enzyme and Microbial Technology*, 29: 554-559.
- Panek AD (1996). Trealose metabolism-new horizons in technological applications. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*, 28: 169-181.
- Penha-Silva N (1989). O efeito de substituintes sobre a formação de complexos entre a α -tripsina bovina e *para*-derivados do íon benzamidínio: um estudo termodinâmico. Tese de Doutorado. Belo Horizonte: UFMG, 99pp.
- Ratnaparkhi GS & Varadarajan R (2001). Osmolytes stabilize Ribonuclease S by stabilizing its fragments S protein and S peptide to compact folding-competent states. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 28789-28798.
- Rogana E, Penha-Silva N & Mares-Guia M (1989). The substituent effect on complex formation between α -trypsin and *para*-substituted benzamidinium ions: a thermodynamic study. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 22: 1177-1190.
- Santoro MM, Liu Y, Khan SMA, Hou L-X & Bolen DW (1992). Increased thermal stability in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochemistry*, 31: 5278-5283.
- Saunders AJ, Davis-Searles PR, Allen DL, Pielak GJ & Erie DA (2000). Osmolyte induced changes in protein conformational equilibria. *Biopolymers*, 53: 293-307.
- Somero GN (1986). Protons, osmolytes and fitness of internal milieu for protein function. *American Journal of Physiology*, 251: R197-R213.

- Souza-Penha MA (1998). Termodinâmica da ligação de tripsina bovina com o íon benzamidínio na presença de osmólitos naturais. Dissertação de Mestrado. Uberlândia: UFU, 68pp.
- Timasheff SN (2002). Thermodynamic binding and site occupancy in the light of the Schellman exchange concept. *Biophysical Chemistry*, 101-102: 99-111.
- Tseng HC & Graves DJ (1998). Natural methylamine osmolytes trimethylamine N-oxide and betaine, increase TAU-induced polymerization of microtubules. *Biochemical and Biophysical Research*, 250: 726-730.
- Ueda T, Makiko N & Imoto T (2001). Aggregation and chemical reaction in hen lysozyme caused by heating at Ph 6 are depressed by osmolytes, sucrose and trealose. *The Japanese Biochemical Society*, 130: 491-496.
- Yancey PH (1985). Organic osmotic effectors in cartilaginous fishes. In: Gilles R & Gilles-Baillien M (editors), *Transport process, iono- and osmoregulation*, Springer-Verlag, New York, 424-436.
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD & Somero G (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 21: 1214-1222.