

MON  
577.1  
P399Z  
TES/MEU

Universidade Federal de Uberlândia  
Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

TERMODINÂMICA DA LIGAÇÃO  
DE TRIPSINA BOVINA  
COM O ÍON BENZAMIDÍNIO  
NA PRESENÇA DE OSMÓLITOS NATURAIS

DIRBI/UFU



1000187032

Dissertação apresentada por **Márcia Aguiar de Souza Penha**, sob a orientação do Professor Dr. Nilson Penha Silva, ao curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Bioquímica.

Uberlândia - MG - Brasil  
Agosto de 1998

Souza-Penha, Marcia Aguiar de, 1954  
Termodinâmica da ligação de tripsina bovina com o íon benzamidínio na  
presença de osmólitos naturais  
Uberlândia, 1998  
68 p.: il.  
Nilson Penha Silva  
Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia,  
Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui Bibliografia  
1. Tripsina - Teses. 2. Osmólitos - Teses. 3. Estabilização - Teses. I.  
Universidade Federal de Uberlândia. Coordenação do Curso de Pós-  
Graduação em Genética e Bioquímica.  
CDU 577.112.088

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

A Dissertação de Mestrado intitulada **Termodinâmica da ligação de tripsina bovina com o íon benzamidínio na presença de osmólitos naturais**, foi defendida no dia 28 de agosto de 1998, por **Marcia Aguiar de Souza Penha**, tendo sido aprovada com conceito **A** pela banca examinadora, assim composta:

**Carlos Alberto de Oliveira**

Professor adjunto do Depto. de Química da Universidade Federal de Uberlândia  
Doutor e Pós-Doutor pela USP, campus de Ribeirão Preto

**Eloízo Júlio Ribeiro**

Professor titular do Depto. de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia  
Doutor pela UNICAMP

**Nilson Penha Silva**

Orientador

Professor titular do Depto. 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 Bioquímica do Departamento de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, com o apoio financeiro das seguintes instituições:

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

Ao Nilson,  
mestre, marido e amigo.

Ao Bernardo, Laura e Victor,  
meus queridos filhos.

A todas as pessoas que têm um ideal,  
para que nunca desistam dele.

# AGRADECIMENTOS

- Ao prof. Dr. Nilson Penha Silva, pela orientação, profissionalismo e valiosos ensinamentos;
- Ao prof. Dr. José Antônio Galo, pelo empréstimo voluntário das cubetas de quartzo, por tempo indeterminado, sem as quais os experimentos no espectrofotômetro não teriam sido possíveis;
- À prof<sup>a</sup> Maria Magnólia Junqueira Eloy, pela simpatia e amizade que sempre me dedicou;
- Ao professor Fernando Carlos Ribeiro (*in memoriam*), pelo exemplo de convivência e respeito;
- À prof<sup>a</sup> Dra. Maria Inês H. Brandeburgo, pela doação da  $\beta$ -alanina;
- Aos professores do Departamento de Genética e Bioquímica que contribuíram para a minha formação, especialmente ao prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, coordenador do curso de Pós-Graduação;
- Aos colegas do Laboratório de Bioquímica, entre eles Ana Cecília Silva Santos, Marcia Helena Borges, Luís Fernando M. Isidoro, Regildo, Gilvan, pelo convívio alegre e o espírito de solidariedade e amizade, que tornou agradável a convivência no laboratório e pelo apoio nas horas mais árduas;

- À Ana Graci Brito, Elaine Christine Dantas Moisés e Alessandra Martinele Fonseca, colegas do grupo da Enzimologia, pelo apoio e colaboração;
- Aos técnicos da Bioquímica, Cleuber Honorato Pereira, Sebastiana Abadia Inácio (Tiana), e Sebastiana (Nenzinha), pelo pronto e constante atendimento e pela simpatia;
- Ao Hélio Elias Costa, técnico do Laboratório de Biofísica, pela doação de material em todo momento que precisei e pela forma simpática e carinhosa com que sempre me atendeu;
- Ao Heleno, técnico do Laboratório de Toxicologia, pela doação de material sempre que precisei e pela atenção com que sempre me atendeu;
- Ao Reis, técnico do Laboratório de Farmacologia, pelo empréstimo por tempo indeterminado da bomba peristáltica, sem a qual não teria sido possível a produção dos meus géis;
- Ao José Custódio de Moraes (*in memoriam*), pelo exemplo de simplicidade e dedicação;
- Especialmente, ao meu marido e filhos pelo apoio, carinho e compreensão;
- E enfim, a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho;
- Mas, sobretudo, eu agradeço a Deus, por sua bondade e sabedoria infinitas, com que me tem propiciado tudo que eu preciso, cada coisa a seu devido tempo.

# ÍNDICE

	Página
Contra-capa.....	i
Ficha catalográfica.....	ii
Composição e avaliação da banca examinadora.....	iii
Apoio financeiro.....	iv
Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Índice.....	viii
Palavras-chaves.....	ix
Abreviações e sinonímia.....	x
Lista de tabelas.....	xi
Lista de figuras.....	xii
Resumo.....	xiii
Introdução.....	01
Objetivos.....	07
Justificativa.....	09
Material.....	10
Métodos.....	12
Resultados.....	23
Discussão.....	52
Conclusões.....	58
Summary.....	60
Bibliografia.....	62
Curriculum vitae.....	68



# PALAVRAS-CHAVES

Íon benzamidínio;

Benzamidina;

Betáina;

Engenharia enzimática;

Estabilização de proteínas;

Glicerol;

Inibidor;

Osmólitos;

Osmorregulação;

Sacarose;

Sorbitol;

Termodinâmica;

Tripsina.

# ABREVIACÕES E SINONÍMIA

a	Inclinação da reta dada pela equação $y = ax + b$
$A_{280}$	Absorvância em 280 nanometros
$A_{410}$	Absorvância em 410 nanometros
b	Interseção da reta dada pela equação $y = ax + b$
BAPNA	$N^{\alpha}$ -Benzoil-D,L-Arginina- <i>para</i> -Nitroanilida
Betaína	N,N,N-trimetil-glicina
Bz-D,L-Arg-Nan	$N^{\alpha}$ -Benzoil-D,L-Arginina- <i>para</i> -Nitroanilida
$\Delta G^{\circ}$	Varição de energia livre padrão de Gibbs
$\delta \Delta G^{\circ}$	Varição de energia livre padrão de Gibbs devida ao soluto
$\Delta H^{\circ}$	Varição de entalpia padrão
$\Delta H^{\circ}_{cal}$	Varição de entalpia padrão calorimétrica
$\Delta H^{\circ}_{vH}$	Varição de entalpia padrão de van't Hoff
$\Delta S^{\circ}$	Varição de entropia padrão
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
$\epsilon$	Coefficiente de extinção molar ( $\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ )
E	Enzima livre
EI	Complexo Enzima-Inibidor
I	Inibidor
i	Concentração do inibidor
$K_i$	Constante de dissociação do complexo EI
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
N	Estado nativo de uma proteína
NU	Transição entre os estado nativo e desenovelado
R	Constante universal dos gases (1,987 cal/K.mol)
S	Concentração do substrato
Sarcosina	N-metil-glicina
T	Temperatura em graus Kelvin
$T_m$	Temperatura intermediária de uma transição NU
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Trizma base	Forma básica do tris(hidroximetil)aminometano
U	Estado desenovelado de uma proteína
v	Velocidade inicial da reação enzimática
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidade máxima da reação enzimática

# LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> Efeito de solutos sobre as constantes de dissociação ( $K_i$ ) dos complexos tripsina-íon benzamidínio em tampão tris-HCl a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 8 com $\text{CaCl}_2$ a $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ .....	46
<b>Tabela 2</b> Variação de energia livre de Gibbs para formação dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio.....	47
<b>Tabela 3</b> Variação de entalpia padrão de Van't Hoff para formação dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio...	48

# LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 01</b>	Determinação de $K_i$ na ausência de osmólito a 10 °C..... 26
<b>Figura 02</b>	Determinação de $K_i$ na ausência de osmólito a 20 °C..... 27
<b>Figura 03</b>	Determinação de $K_i$ na ausência de osmólito a 30 °C..... 28
<b>Figura 04</b>	Determinação de $K_i$ em glicerol a 0,5 mol.L <sup>-1</sup> e 10 °C..... 29
<b>Figura 05</b>	Determinação de $K_i$ em glicerol a 0,5 mol.L <sup>-1</sup> e 20 °C..... 30
<b>Figura 06</b>	Determinação de $K_i$ em glicerol a 0,5 mol.L <sup>-1</sup> e 30 °C..... 31
<b>Figura 07</b>	Determinação de $K_i$ em sorbitol a 0,5 mol.L <sup>-1</sup> e 10 °C..... 32
<b>Figura 08</b>	Determinação de $K_i$ em sorbitol a 0,5 mol.L <sup>-1</sup> e 20 °C..... 33
<b>Figura 09</b>	Determinação de $K_i$ em sorbitol a 0,5 mol.L <sup>-1</sup> e 30 °C..... 34
<b>Figura 10</b>	Determinação de $K_i$ em sacarose a 0,5 mol.L <sup>-1</sup> e 10 °C..... 35
<b>Figura 11</b>	Determinação de $K_i$ em sacarose a 0,5 mol.L <sup>-1</sup> e 20 °C..... 36
<b>Figura 12</b>	Determinação de $K_i$ em sacarose a 0,5 mol.L <sup>-1</sup> e 30 °C..... 37
<b>Figura 13</b>	Determinação de $K_i$ em betaína a 0,5 mol.L <sup>-1</sup> e 10 °C..... 38
<b>Figura 14</b>	Determinação de $K_i$ em betaína a 0,5 mol.L <sup>-1</sup> e 20 °C..... 39
<b>Figura 15</b>	Determinação de $K_i$ em betaína a 0,5 mol.L <sup>-1</sup> e 30 °C..... 40
<b>Figura 16</b>	Gráfico de van't Hoff na ausência de osmólitos..... 41
<b>Figura 17</b>	Gráfico de van't Hoff em glicerol a 0,5 mol.L <sup>-1</sup> ..... 42
<b>Figura 18</b>	Gráfico de van't Hoff em sorbitol a 0,5 mol.L <sup>-1</sup> ..... 43
<b>Figura 19</b>	Gráfico de van't Hoff em sacarose a 0,5 mol.L <sup>-1</sup> ..... 44
<b>Figura 20</b>	Gráfico de van't Hoff em betaína a 0,5 mol.L <sup>-1</sup> ..... 45
<b>Figura 21</b>	Eletroforese com gradiente de glicerol em tris-acetato..... 49
<b>Figura 22</b>	Eletroforese com gradiente de glicerol em $\beta$ -alanina..... 50
<b>Figura 23</b>	Eletroforese com gradiente de uréia..... 51
<b>Figura 24</b>	Ligação do íon benzamidínio ao centro ativo da tripsina..... 57

## RESUMO

Sacarose, sorbitol, glicerol e betaína são solutos estabilizantes conhecidos na literatura como osmólitos. Neste trabalho, nós investigamos a ação de tais solutos sobre a variação de energia livre padrão e a variação de entalpia padrão de van't Hoff para a formação de complexos entre a tripsina bovina e o íon benzamidínio. As energias livres de associação foram determinadas a partir das constantes de dissociação do complexo tripsina-íon benzamidínio ( $K_i$ ) sob diferentes composições do solvente. A variação de entalpia padrão de van't Hoff foi determinada a partir da dependência de  $\ln K_i$  com  $1/T$  a 10, 20 e 30 °C. As constantes de dissociação foram determinadas de acordo com um método clássico na literatura, usando Benzoil-D,L-Arginina-p-Nitroanilida como substrato em duas ou três diferentes concentrações e seis ou quatorze diferentes concentrações do inibidor. Os osmólitos foram incorporados em cada solução usada nos experimentos em uma concentração de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ . Os pontos experimentais obtidos locando o recíproco da atividade enzimática contra a concentração do inibidor foram ajustados por regressão linear. Nós determinamos cada constante de dissociação a partir do valor da abcissa correspondente ao ponto de interseção das linhas de regressão. A 25 °C, a presença de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de sacarose, sorbitol, glicerol ou betaína, mudaram a variação de energia livre de associação entre a tripsina bovina e o íon benzamidínio de  $-6,02 \pm 0,061 \text{ kcal/mol}$  para  $-5,21 \pm 0,042$ ,  $-5,22 \pm 0,026$ , -

5,23  $\pm$  0,060 e -5,25  $\pm$  0,087 kcal/mol, respectivamente. Os osmólitos considerados, independentemente de sua estrutura, produziram um aumento médio na variação de energia livre padrão ( $\delta\Delta G^\circ$ ) de formação do complexo tripsina-íon benzamidínio de +0,79 kcal/mol, o que significa que aqueles solutos aumentaram a população relativa da enzima livre no equilíbrio  $E + I = EI$ . Glicerol, sorbitol, sacarose e betaína produziram variações de entalpia padrão de van't Hoff de -11,4  $\pm$  0,86, -10,3  $\pm$  0,52, -12,3  $\pm$  1,22 e -13,1  $\pm$  1,76 kcal/mol, respectivamente. Aqueles valores não diferem significativamente do valor de  $\Delta H^\circ$  de -11,7  $\pm$  1,24 kcal/mol obtido na ausência dos osmólitos. A ação destes solutos sobre a tripsina foi também investigada por eletroforese em gel de poli(acrilamida) na qual foi incorporado um gradiente transversal à direção de migração da proteína com 0 a 4 mol.L<sup>-1</sup> de glicerol. Para contrapor ao aumento da densidade do gel determinado pelo gradiente do osmólito, nós variamos a concentração de acrilamida de 11 a 8% no sentido do aumento do gradiente do soluto. A tripsina foi aplicada como uma banda contínua no topo do gel. Nenhuma perturbação da mobilidade da proteína foi verificada dentro dos limites considerados de concentração do glicerol. Estes resultados concordam com a idéia de que todos estes compostos, independentemente de sua estrutura, agem da mesma maneira, mudando as propriedades do solvente, no sentido de estabilizar a estrutura proteica.

# INTRODUÇÃO

A manutenção da atividade biológica de preparações purificadas de proteínas é assunto de grande interesse prático, não somente em pesquisa científica, mas também em Biotecnologia. Este assunto tem sido alvo de muitos estudos, no sentido de desenvolver condições experimentais adequadas de manutenção da atividade biológica de preparações purificadas de proteínas, tarefa muitas vezes difícil, cujo resultado nem sempre é o esperado.

A estabilização proteica não é um problema restrito das preparações *in vitro*, mas também dos seres vivos, que contam com muito menos opções do que o laboratório. A integridade do estado nativo da proteína é importante para a manutenção de funções essenciais das células, pelo controle dos níveis de atividade enzimática, energia e produtos metabólicos. Além disto, a manutenção do estado nativo de proteínas também determina a capacidade da célula de responder a alterações do meio, propriedade esta denominada de responsividade regulatória (Yancey et al., 1982).

Alguns sistemas celulares submetidos a situações de estresse ambiental, como calor, frio, desidratação e soluções desnaturantes, são capazes de preservar suas atividades biológicas pela manutenção de suas proteínas no estado nativo. As proteínas são muito sensíveis às condições do meio, como pH, força iônica, temperatura e hidratação. Condições ambientais adversas podem levá-las ao desenovelamento e, conseqüentemente, à inativação. Para evitar o desenovelamento proteico, tais sistemas vivos acumulam certos tipos

de solutos de baixos pesos moleculares, genericamente designados como osmólitos, em concentrações intracelulares que vão de apenas algumas dezenas a centenas de milimolar (**Yancey et al., 1982; Somero, 1986-b; Somero, 1986-c; Rhodes, 1987**).

Alguns trabalhos têm mostrado que os osmólitos são capazes de estabilizar a atividade enzimática, *in vitro*, sem comprometer sua eficiência catalítica, o que provavelmente também ocorre *in vivo* (**Borowitzka e Brown, 1974; Bowlus e Somero, 1979; Pollard e Wyn Jones, 1979; Yancey, 1985; Nikolopoulos e Manetas, 1991**)

Sob o ponto de vista evolucionário, parece que tem sido vantajoso para os organismos vivos, independente da sua posição filogenética, a seleção dos osmólitos como meio de proteção de suas proteínas endógenas, pois este mecanismo prevalece sobre os mecanismos genéticos de modificação de proteínas (**Somero, 1986**). Os osmólitos têm uma distribuição ubiqüitária nos sistemas vivos, sugerindo que mecanismos osmorregulatórios tenham um caráter universal, particularmente na estabilização de proteínas. O tipo de osmólito orgânico utilizado não é determinado pela posição filogenética do organismo e sim por diversos outros fatores. Os sistemas de solutos orgânicos osmorregulatórios são comuns quanto à natureza química nos diversos tipos de organismos vivos, a despeito da grande distância evolucionária existente entre bactérias, animais e plantas (**Yancey et al., 1982**).

Estes compostos são quimicamente classificados em três grandes grupos (**Yancey et al., 1982**). O primeiro grupo é constituído pelos **álcoois poliídrosílicos**, como o glicerol e o sorbitol. Os **aminoácidos e seus**



**derivados** constituem o segundo grupo, compreendendo a glicina, a metil-glicina (ou sarcosina), a dimetil-glicina e a trimetil-glicina (ou betaína), por exemplo. A trimetil-glicina, a dimetil-glicina e a metil-glicina são intermediários da via metabólica de conversão da colina em glicina (**Murray et al., 1996**). Os **açúcares**, como a sacarose e a trealose, constituem o terceiro grupo de osmólitos.

Quanto à função, os osmólitos podem ser classificados em dois grupos, os **solutos compatíveis**, que apresentam apenas pequenos efeitos sobre a função proteica, e os **solutos neutralizantes**, que combatem os efeitos estruturais ou funcionais que solutos deletérios da célula têm sobre as proteínas (**Borowitz e Brown, 1974; Yancey et al., 1982**).

Os solutos compatíveis englobam certos aminoácidos neutros livres e carboidratos, que podem estar presentes em altas e variadas concentrações sem perturbar significativamente as propriedades estruturais e funcionais das proteínas. Eles são amplamente dispersos na natureza, em vegetais e animais osmoticamente estressados. Aminoácidos livres, como a glicina e a alanina, têm efeitos insignificantes sobre as funções de várias reações enzimáticas. Se os aminoácidos forem D-configurados, sua reatividade com enzimas é ainda menor. Carboidratos como o glicerol e a sacarose, acumulados de acordo com o grupo evolutivo e o nível de estresse sofrido pelo organismo, também têm uma baixa reatividade com as proteínas em geral (**Yancey et al., 1986**).

A classe dos solutos neutralizantes compreende espécies como a glicerofosforilcolina e a betaína (**Lien, Pacelli e Brawn, 1993; Peterson et al., 1992; Yancey e Burg, 1990**), cuja ação pode explicar o paradoxo de

alguns sistemas celulares, como as células de peixes cartilaginosos e os rins. Estes tecidos acumulam uréia em concentrações suficientemente altas para interferir nas interações entre as proteínas e seus ligantes, e mesmo promover o seu desenovelamento (**Bagnasco et al., 1986; Garcia-Perez e Burg, 1990; Somero, 1986-a; Yancey et al., 1982**). A glicerofosforilcolina e a betaína bloqueiam os efeitos da uréia sobre a estrutura e função protéicas, por provocar efeitos opostos. Portanto, para a manutenção de níveis adequados da ação proteica deve haver um equilíbrio perfeito entre os efeitos destes dois tipos de substâncias, o que deve ocorrer pelo controle de suas concentrações. Na presença apenas da uréia, o  $K_M$  de uma enzima aumenta, enquanto na presença somente das metilaminas glicerofosforilcolina e betaína, os valores de  $K_M$  diminuem. Mas quando ambos os solutos estão presentes, a uma concentração proporcional de 2[uréia]:1[metilamina], seus efeitos são compensados e o  $K_M$  não se altera (**Lien, Pacelli e Brawn, 1993; Peterson et al., 1992; Yancey e Burg, 1990**).

Com exceção da uréia, os osmólitos têm a propriedade característica de não interagir fortemente com as proteínas, seus substratos, cofatores e moduladores, mas eles têm uma ação protetora sobre as proteínas, estabilizando-as no estado nativo. Qual deve ser a origem desta ação estabilizadora? Segundo a literatura (**Arakawa e Timasheff, 1983; Arakawa e Timasheff, 1985; Timasheff e Arakawa, 1989**), a estabilização de proteínas por osmólitos é devida a modificações nas propriedades do solvente e não por ligação direta do soluto à proteína. Os osmólitos orgânicos tendem a ser excluídos da camada de água que circunda a proteína (zona de exclusão).

De fato, resultados experimentais mostram que não há ligação significativa de moléculas de sacarose ou glicerol a várias proteínas estudadas (**Timasheff e Arakawa, 1989**). A exclusão dos osmólitos é entropicamente desfavorável. Como estes solutos tendem a se espalhar pela água, que estruturalmente não é afetada pela superfície proteica, eles acabam se restringindo a uma fração do volume total da solução. Esta distribuição organizada dos osmólitos orgânicos reduz a entropia da solução, o que faz a superfície proteica exposta ao solvente tender a um valor mínimo, ou seja, as proteínas tendem para as suas conformações enoveladas. Assim, a proteína é estabilizada em seu estado nativo.

Quase toda a literatura termodinâmica sobre os osmólitos tem explorado a ação destes solutos sobre a transição NU (**Santoro et al., 1992; Liu e Bolen, 1995; Wang, Robertson e Bolen, 1995; Taylor et al, 1995**). Nenhum trabalho da literatura tratou da transição de formação de complexos EI. A formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio, um inibidor típico de enzimas da família da tripsina (**Penha-Silva, 1989; Rogana, Penha-Silva e Mares-Guia, 1989**), constitui um modelo de formação de complexos EI bastante conveniente para estudar o efeito de osmólitos. Esta dissertação apresenta resultados sobre o efeito de osmólitos sobre a variação de energia livre padrão e entalpia padrão de van't Hoff para a formação de complexos entre a tripsina bovina e o íon benzamidínio.

A eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente transversal de solutos desenovelantes tem sido utilizada na literatura para estudar a transição de desenovelamento de proteínas (**Creighton, 1979; Creighton, 1980;**

**Goldenberg, 1989**). Nesta dissertação, a técnica originalmente proposta por **Creighton** para estudar as transições de desenovelamento de proteínas, foi modificada com a incorporação de um osmólito no gradiente transversal dos géis de poliacrilamida, no lugar dos solutos desenovelantes, para estudar o efeito de uma ampla faixa de concentração de glicerol sobre a estabilidade da tripsina bovina.

# OBJETIVOS

## Geral

- Estudar o efeito de osmólitos de ocorrência natural sobre a termodinâmica de ligação de tripsina bovina com o íon benzamidínio.

## Específicos

- Determinar o efeito de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  dos álcoois polihidroxílicos glicerol e sorbitol sobre a constante de dissociação do complexo tripsina-íon benzamidínio a 10, 20 e 30 °C;
- Determinar o efeito de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  da metilamina betaína (N,N,N-trimetilglicina) sobre a constante de dissociação do complexo tripsina-íon benzamidínio a 10, 20 e 30 °C;
- Determinar o efeito de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  do açúcar sacarose sobre a constante de dissociação do complexo tripsina-íon benzamidínio a 10, 20 e 30 °C;
- Determinar o efeito de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de glicerol, sorbitol, sacarose e betaína, sobre a variação da energia livre padrão de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio;
- Determinar o efeito de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de glicerol, sorbitol, sacarose e betaína, sobre a variação da entalpia padrão de van't Hoff ( $\Delta H^\circ$ ) para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio entre 10 e 30 °C.

- Estudar o efeito de concentrações de 0 a 4 mol.L<sup>-1</sup> de glicerol sobre a mobilidade eletroforética da tripsina nativa;
- Determinar o efeito da concentração de 0 a 8 mol.L<sup>-1</sup> de uréia sobre a mobilidade eletroforética da tripsina bovina.

# JUSTIFICATIVA

Grande esforço é geralmente dedicado ao desenvolvimento de condições experimentais para reter a atividade biológica de preparações purificadas de proteínas. A ação dos osmólitos sugere-nos uma alternativa usada com bastante sucesso nos sistemas vivos. Um diagnóstico preciso das condições experimentais ótimas em que os osmólitos exercem sua ação protetora sobre proteínas constitui um importante subsídio para a biotecnologia, especialmente para a engenharia enzimática.

Os osmólitos representam uma importante condição estabilizante não somente para as proteínas, mas também para células, tecidos e órgãos (**Panek, 1995**). Sua utilização pode aumentar muito a eficiência de outras técnicas de conservação como as de criopreservação (**Storey et al., 1996**).

Os osmólitos têm uma distribuição ubiqüitária nos sistemas vivos, sugerindo que mecanismos osmorregulatórios tenham um caráter universal, particularmente na estabilização de proteínas.

A utilização neste trabalho de compostos das três classes descritas de osmólitos, dos álcoois poliídrolílicos (glicerol e sorbitol), aminoácidos e metilaminas (betaína), e açúcares (sacarose), justifica-se por objetivar a obtenção de tendências ou regras gerais no efeito de estabilização proteica. A utilização do sistema tripsina-íon benzamidínio tenta fornecer a abrangência necessária a este tipo de estudo, ao mesmo tempo que emprega uma enzima de grande relevância biotecnológica.

# MATERIAL

As medidas de massa foram feitas em uma balança analítica, da marca **Sartorius**, e em uma balança digital de precisão, da marca **Kern**, modelo **870**. As medidas de densidade óptica utilizaram um espectrofotômetro de feixe único da marca **Zeiss**, modelo Spekol UV- VIS, e um espectrofotômetro de feixe duplo da marca **Hitachi**, modelo U-2000, com cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Durante a preparação e posterior utilização das soluções foram utilizadas pipetas das marcas **Herka** e **Pyrex**; beakers, provetas e balões volumétricos da marca **Pyrex**; além de pipetas automáticas reguláveis **Labsystems** modelo Finnpiptette Digital (0,5 µL a 10 µL, 5 µL a 40 µL, 40 µL a 200 µL e 100 µL a 1000 µL). Para a confecção dos géis, nos experimentos com eletroforese, foram utilizadas duas bombas peristálticas, sendo uma da marca **Pharmacia**, modelo GE-4, e outra da marca **Incibrás**, modelo BP-100, e placas quadradas de vidro de 82 X 82 mm que podiam ser giradas de 90°, unidas por espaçadores de polietileno, vedados com vaselina. Para a corrida eletroforética, foram utilizadas fontes de corrente elétrica das marcas **Labor Müszeripari Müvek Esztergom** e **Unicable Inc.** acopladas a cubas de acrílico com cabos de condução elétrica. A secagem dos géis foi feita em folhas de papel celofane transparente, presas por bastidores de madeira. Para os experimentos de determinação de  $K_i$  em temperaturas de 10, 20 e 30 °C foi utilizado um banho termostaticado da marca **Marconi** modelo MA184. As



medições de pH foram feitas com um pHmetro microprocessado BG2000 da marca **Gehaka**.

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza e obtidos da Sigma, Reagen, Inlab, Quimis e Merck. A tripsina bovina, a benzamidina, o substrato Benzoil-D,L-Arginina-para-Nitroanilida foram provenientes da Sigma Chemical Company. As soluções-estoques para o preparo dos substratos da tripsina eram preparadas semanalmente em DMSO, armazenadas em frasco âmbar e congeladas, para evitar hidrólise inespecífica pela radiação luminosa. As soluções com osmólitos eram preparadas na hora do experimento.

# MÉTODOS

**Preparo das soluções de tripsina e determinação de suas concentrações molares** - As soluções de tripsina bovina eram preparadas em HCl pH 3,0 para evitar autólise. A concentração molar de cada solução foi calculada com base no coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) em 280 nm de 36700 mol.L<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (Trowbridge et al., 1963; Villanueva e Herskovits, 1971).

**Preparo dos tampões** - As soluções tampões de tris-HCl a 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0, com CaCl<sub>2</sub> a 2 mmol.L<sup>-1</sup>, em várias temperaturas (10, 20 e 30 °C),<sup>1</sup> eram preparadas semanalmente. Em seu preparo, o pH do tampão somente era ajustado para 8,0 após equilibração térmica do tampão à temperatura desejada. Para os experimentos com osmólitos a 0,5 mol.L<sup>-1</sup>, massas apropriadas de glicerol, sorbitol, sacarose ou betaína eram incorporadas no tampão antes do pH ser ajustado à temperatura em que o experimento seria conduzido. Os tampões com osmólitos somente eram preparados logo antes de sua utilização.

**Preparo das soluções do inibidor** - As soluções do íon benzamidínio eram preparadas a uma concentração de 0,001 mol.L<sup>-1</sup> em tampão tris-HCl a 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0, com CaCl<sub>2</sub> a 2 mmol.L<sup>-1</sup>, na presença ou

ausência de glicerol, sorbitol, sacarose ou betaína a  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ , logo antes de sua utilização.

**Efeito de osmólitos sobre a constante de dissociação do complexo de tripsina bovina com o íon benzamidínio** - Os valores de  $K_i$  dos complexos tripsina-íon benzamidínio foram determinados com base na medida de atividade amidásica da tripsina na presença de várias concentrações do inibidor, em séries de ensaios com duas ou três concentrações do substrato, de acordo com o método geral descrito originalmente por **Dixon (1953)**. O substrato utilizado foi o Benzoil-D,L-Arginina-*para*-Nitroanilida (**Erlanger et al., 1961**). Soluções-estoques com  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  do substrato, eram preparadas dissolvendo-se  $0,218 \text{ g}$  de Bz-D,L-Arg-Nan ( $M_r = 434,89$ ) em  $5 \text{ mL}$  de dimetilsulfóxido, e armazenadas em frascos âmbar a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  por períodos de no máximo uma semana. As soluções de uso do substrato eram preparadas, no momento de sua utilização, diluindo-se as soluções-estoques de 1:50, 1:100 e 1:200 em tampão tris-HCl a  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 8,0, sob 10, 20 ou  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, com  $\text{CaCl}_2$  a  $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ , na ausência ou na presença de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de glicerol, sorbitol, sacarose ou betaína. Três diferentes tipos de protocolos experimentais, designados de **6S2**, **6S3** e **14S2**, foram utilizados.

No método original de **Dixon (1953)** são utilizadas duas diferentes concentrações do substrato, mas em um dos tipos de protocolos experimentais aqui empregados, o protocolo **6S3**, foram usadas três diferentes concentrações

do substrato, cada uma com seis diferentes concentrações em duplicata do inibidor. Neste protocolo, as três séries de concentrações do substrato continham Bz-D,L-Arg-Nan a 800 (S1), 400 (S2) e 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (S3), cada uma delas com seis tubos em que as concentrações do inibidor eram de 0, 80, 160, 240, 320 e 400  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente. O protocolo **6S2** usava duas séries de concentrações do substrato, cada uma com seis diferentes concentrações em duplicata do inibidor. As concentrações do substrato eram de 200 (S1) e 400  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (S2) no meio da reação, enquanto as concentrações do inibidor eram de 0, 80, 160, 240, 320 e 400  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . No protocolo **14S2**, também eram utilizadas duas séries de concentrações do substrato, cada uma com 14 diferentes concentrações, sem duplicatas, do inibidor. As concentrações do substrato também eram de 200 (S1) e 400  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (S2) no meio da reação, mas as concentrações do íon benzamidínio eram de 0, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360, 400, 440, 480 e 520  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

Em todos os tipos de experimentos, primeiro eram colocados volumes de 1 mL de Bz-D,L-Arg-Nan em cada uma de duas (protocolos 6S2 e 14S2) ou três (protocolo 6S3) séries de concentrações do substrato. Depois era adicionado o tampão pH 8,0, em volume suficiente para que o volume final do meio da reação fosse de 2,5 mL, e logo em seguida o inibidor era também adicionado. Após equilíbrio térmico das soluções à temperatura do experimento (10, 20 ou 30 °C), a reação era iniciada pela adição de 0,2 mL de tripsina a 2 mg/mL a cada tubo, exceto no tubo 1, que recebia 0,2 mL de HCl pH 3,0. Como o HCl pH 3 era o solvente usado para preparar as soluções de tripsina, no tubo 1 não ocorria reação, razão pela qual ele funcionava como tubo controle ou branco.

Antes de recolocar os tubos no banho, eles eram suavemente agitados para homogeneização da solução. Após 10 minutos de reação à temperatura do experimento, a reação era interrompida pela adição de 0,5 mL de ácido acético a 60% v/v. O grau de hidrólise do substrato era então determinado pela leitura da absorvância em 410 nm, contra o tubo controle (tubo 1). Para efetuar o cálculo das constantes foram usados os procedimentos computacionais descritos a seguir.

**Cálculo das constantes de dissociação ( $K_i$ )** - O cálculo dos valores de  $K_i$  foi executado com a utilização do aplicativo **Passage (Macintosh)** e os gráficos foram editados com o programa **Origin 3.0 (PC)**. Inicialmente, os valores de  $A_{410 \text{ nm}}$  e dos volumes do inibidor eram respectivamente convertidos em  $1/A_{410}$  e concentração do íon benzamidínio. Os pontos experimentais do gráfico de  $1/A_{410}$  contra a concentração do inibidor para cada concentração do substrato eram depois ajustados a retas de regressão linear. A extrapolação destas linhas até o quadrante superior à esquerda produz um ponto de interseção, cujo valor da abcissa correspondente à constante de dissociação do complexo EI (**Dixon, 1953**). Os valores de  $K_i$  eram então determinados obtendo-se o valor da abcissa no ponto da interseção, por meio de um procedimento matemático simples. As retas de regressão a diferentes concentrações do substrato seguem as seguintes equações gerais:

$$y = a_1x + b_1 \quad (1)$$

e

$$y = a_2x + b_2 \quad (2)$$

as quais se cruzam no quadrante superior à esquerda. No ponto de interseção das retas, os valores de  $x$  e  $y$  se equivalem, e o valor de  $x$  foi obtido pela expressão

$$x = \frac{b_2 - b_1}{a_1 - a_2}, \quad (3)$$

do qual era obtido o valor de  $K_i$ , pois  $K_i = -x$  no ponto de encontro das retas de regressão.

Segundo **Dixon (1953)**, quando duas retas a diferentes concentrações do substrato cruzam-se em um ponto do quadrante superior à esquerda em que  $1/v \neq 0$ , a inibição é do tipo competitiva. A racionalidade desta afirmação é simples e pode ser facilmente entendida. Na ausência do inibidor, a tripsina segue a cinética de **Michaelis-Menten (1913)** e

$$v = \frac{V_{\text{máx}} S}{K_M + S}, \quad (4)$$

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. Um inibidor competitivo liga-se ao centro ativo da enzima, aumentando o valor de  $K_M$  por um fator que é proporcional à concentração do inibidor ( $i$ ) e inversamente proporcional à constante de dissociação do complexo EI ( $K_i$ ), de tal forma que a equação de Michaelis-Menten na presença de um inibidor competitivo assume a forma

$$v = \frac{V_{\text{máx}} S}{K_M (1 + i/K_i) + S} \quad (5)$$

O duplo recíproco (**Lineweaver e Burk, 1934**), desta equação assume a forma seguinte:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\text{máx}} S} \left[ 1 + \frac{i}{K_i} \right] + \frac{1}{V_{\text{máx}}}, \quad (6)$$

que pode ser rearranjada para assumir a forma

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + S}{V_{\text{máx}} S} + \frac{K_M}{V_{\text{máx}} S K_i} \cdot i, \quad (7)$$

a qual dá a dependência de  $1/v$  contra  $i$  e corresponde à equação das retas dos gráficos de Dixon. Para as duas concentrações do substrato considerada no método de Dixon, esta equação assume a forma:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + S_1}{V_{\text{máx}} S_1} + \frac{K_M}{V_{\text{máx}} S_1 K_i} \cdot i \quad (8)$$

para a concentração  $S_1$  do substrato e

$$\frac{1}{v'} = \frac{K_M + S_2}{V_{\text{máx}} S_2} + \frac{K_M}{V_{\text{máx}} S_2 K_i} \cdot i \quad (9)$$

para a concentração  $S_2$  do substrato, já que a presença do inibidor competitivo não afeta a velocidade máxima da reação. No ponto de interseção das retas,

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v'}, \quad (10)$$

e

$$i = -K_i \quad (11)$$

Se de fato  $i = -K_i$ ,

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\text{máx}}} \quad (12)$$

e

$$\frac{1}{v} \neq 0, \quad (13)$$

pois a velocidade máxima é um número finito e relativamente pequeno.

A determinação das constantes de dissociação dos complexos EI mostrada nos gráficos das **figuras 1 a 15** não usou a velocidade da reação, como discutido anteriormente, mas simplesmente o inverso da absorvância em 410 nm. Este comprimento de onda corresponde ao  $\epsilon_{\text{máx}}$  da *para*-nitroanilina liberada pela hidrólise do Bz-D,L-Arg-Nan catalisada pela tripsina (**Erlanger, Kokowsky e Cohen, 1961**). A conversão do  $A_{410}$  em  $\mu\text{mol}$  de produto formado por segundo pode ser feita por um procedimento simples. A  $A_{410}$  deve ser dividida pelo caminho óptico (1 cm) e pelo valor do  $\epsilon_{\text{máx}}$  da *para*-nitroanilina, que é  $8.800 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  (**Erlanger, Kokowsky e Cohen, 1961**), para obtenção da concentração molar do produto. O valor obtido deve então ser multiplicado pelo volume total da solução ( $3 \times 10^{-3} \text{ L}$ ), para obtenção do número de mol do produto, o qual deve ser multiplicado por  $10^6$  para conversão em  $\mu\text{mol}$ . A divisão do número obtido pelo tempo da reação em segundos ( $10 \times 60$  segundos), dará então a velocidade da reação em  $\mu\text{mol}$  de produto formado por segundo. Tudo isto equivale simplesmente a multiplicar os valores de  $A_{410}$  por  $568,18 \times 10^{-6}$  para obter a velocidade da reação. Assim, para se obter o valor de  $1/v$  basta se multiplicar  $1/A_{410}$  por 1760, que é o inverso do fator anterior. Apesar da facilidade de execução destes cálculos com



a utilização de planilhas eletrônicas, ele não é essencial para obter a interseção das retas a diferentes concentrações de **S** dos gráficos de Dixon. O mesmo fator seria utilizado para todas as retas, pois a única diferença entre elas é a concentração do substrato, e isto não afetaria a interseção das retas de regressão.

### **Determinação da variação de energia livre padrão de formação dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio**

- Como  $K_i$  é uma constante de dissociação do complexo EI, a constante de formação do complexo será  $1/K_i$  e, conseqüentemente, a variação de energia livre de formação do complexo EI será dada pela expressão

$$\Delta G^\circ = -RT \ln (1/K_i) \quad (14)$$

ou mais simplesmente por

$$\Delta G^\circ = RT \ln K_i \quad (15)$$

onde o valor de  $\ln K_i$  a 25 °C foi determinado pela equação da reta de regressão obtida do gráfico de  $\ln K_i$  contra  $1/T$ , e o valor do desvio padrão de  $\Delta G^\circ$  foi obtido pela equação

$$DP(\Delta G^\circ) = RT \cdot DP(\text{Regressão}), \quad (16)$$

em que R é a constante universal dos gases (1,987 cal/K.mol) e T é a temperatura absoluta, dada em graus Kelvin.

### **Determinação da variação de entalpia padrão ( $\Delta H^\circ$ ) de formação dos complexos de tripsina bovina com o íon**

**benzamidínio** - A partir da **equação 5** e da seguinte equação derivada da segunda lei da termodinâmica

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ, \quad (17)$$

é possível chegar à expressão

$$RT \ln K_i = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ, \quad (18)$$

que pode ser convenientemente rearranjada para a forma mostrada logo a seguir,

$$\ln K_i = \frac{\Delta H^\circ}{R} \cdot \frac{1}{T} - \frac{\Delta S^\circ}{R}, \quad (19)$$

que é a equação de van't Hoff para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio. O gráfico de  $\ln K_i$  contra  $1/T$  deve seguir uma equação do tipo  $y = ax + b$ , cuja inclinação nos permite calcular o valor da variação de entalpia padrão de van't Hoff para a formação dos complexos EI, por meio da seguinte expressão:

$$\Delta H^\circ_{vH} = a R, \quad (20)$$

enquanto o desvio padrão de  $\Delta H^\circ_{vH}$  é calculado pela equação

$$DP(\Delta H^\circ_{vH}) = DP(a) R. \quad (21)$$

### **Efeito de 0 a 4 mol.L<sup>-1</sup> de glicerol sobre a mobilidade**

**eletroforética de tripsina** - A eletroforese em gel de poliacrilamida foi conduzida conforme as descrições de **Creighton (1979)**, usando o aparelho GE-4 da Pharmacia e películas quadradas de gel, com 82 X 82 mm. Este dispositivo têm duas câmaras intercomunicantes, sendo uma delas, chamada

câmara de mistura, ligada a uma cuba de vidro onde são formados os géis no interior de placas de vidro. A comunicação entre as duas câmaras é controlada por um dispositivo, que pode permitir ou não a mistura das soluções. Os géis foram produzidos por fotopolimerização de duas soluções de acrilamida, uma com acrilamida a 15% e 0 mol.L<sup>-1</sup> de glicerol (solução **A**), e a outra com acrilamida a 11% e 4 mol.L<sup>-1</sup> do osmólito (solução **B**). As soluções **A** e **B** eram colocadas respectivamente na primeira câmara e na câmara de mistura do formador de gradientes, com a comunicação entre ambas inicialmente bloqueada. A solução **B** do osmólito era a primeira a ser introduzida na base do formador de gel, com um fluxo controlado por uma bomba peristáltica. Quando a solução **B** atingia a altura de 1 cm na placa, era removido o bloqueio entre as duas câmaras. A solução da câmara de mistura ia ficando então com uma concentração cada vez menor do osmólito, ao mesmo tempo que penetrava no interior das duas placas de vidro. A 1 cm do fim da placa, a solução **B** era então substituída pela solução **A**. Assim, o gel ficava com um gradiente de osmólito, com uma faixa inicial de 1 cm a 4 mol.L<sup>-1</sup> do osmólito e uma faixa terminal de 1 cm com a concentração de 0 mol.L<sup>-1</sup> de glicerol. Após a fotopolimerização, as películas de gel com o gradiente do osmólito eram colocadas perpendicularmente à direção do campo elétrico e as corridas eletroforéticas eram feitas com os mesmos tampões do gel, mas sem o osmólito. Os tampões usados foram tris-acetato a 0,05 mol.L<sup>-1</sup> pH 4,0 (ácido acético a 0,05 mol.L<sup>-1</sup> titulado até pH 4,0 com trizma base a 0,05 mol.L<sup>-1</sup>), ou β-alanina a 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 4,4. Cerca de 50 ou 100 μL da solução de proteína a 2 mg/mL no tampão de corrida eram espalhados numa camada contínua sobre o gel, junto com 10

$\mu\text{L}$  de uma solução contendo glicerol a 50% e verde de metila a 0,2%. O verde de metila é um indicador próprio para acompanhar corridas eletroforéticas em direção ao cátodo (**Goldenberg, 1989**). A eletroforese era iniciada a 10 mA/gel e, após a migração do marcador por alguns centímetros, a corrente era aumentada para 20 mA/gel. A corrida era feita dentro de uma câmara fria e a temperatura do tampão era mantida constante entre 15 e 20 °C durante o curso de 1 a 2 horas da eletroforese. Após o término da eletroforese, os géis eram corados durante a noite com uma solução contendo 0,1% de Coomassie Brilliant Blue, 10% de ácido tricloroacético e 10% de ácido sulfossalicílico. O excesso do corante era removido por difusão contra uma solução contendo 5% de ácido acético, 7,5% de metanol e 10% de ácido tricloroacético.

**Efeito de 0 a 8 mol.L<sup>-1</sup> de uréia sobre a mobilidade eletroforética da tripsina** - Os géis de poliacrilamida com gradiente de uréia foram preparados de forma análoga aos géis com gradiente de glicerol, com a solução **A** contendo 15% de acrilamida e 0 mol.L<sup>-1</sup> de uréia, e a solução **B** contendo 11% de acrilamida e 8 mol.L<sup>-1</sup> de uréia. As corridas eletroforéticas e o tratamento dos géis foram feitas da mesma maneira descrita para os géis com gradiente de glicerol.

## RESULTADOS

Este trabalho estuda primariamente o efeito de um grupo de solutos, genericamente chamados de osmólitos, sobre a constante de dissociação de tripsina bovina e o íon benzamidínio, um inibidor clássico daquela enzima, sob 10, 20 e 30 °C de temperatura. Estes osmólitos foram utilizados numa concentração de 0,5 mol.L<sup>-1</sup> em todos os experimentos.

As **figuras 1 a 15** mostram os resultados de experimentos típicos para determinação das constantes de dissociação ( $K_i$ ) dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em diferentes condições. A tabela inserida em cada gráfico mostra os parâmetros da regressão linear para cada linha de dependência de  $1/A_{410\text{ nm}}$  com a concentração do íon benzamidínio. Os valores de  $K_i$  foram calculados a partir dos valores da interseção e da inclinação de cada reta de regressão, como mostrado na seção de métodos. Os valores dos parâmetros de regressão aparecem na tabela com todos os dígitos utilizados nos cálculos que conduziram ao  $K_i$  apresentado em cada legenda de figura. Os valores dos coeficientes  $r$  de Pearson foram invariavelmente elevados, indicando que em todos os casos os pontos experimentais se ajustam bem ao modelo linear considerado para a dependência.

Cada sequência de três figuras de 1 a 15 mostra experimentos executados, respectivamente, na ausência de osmólitos (**figuras 1, 2 e 3**) e na presença de 0,5 mol.L<sup>-1</sup> de glicerol (**figuras 4, 5 e 6**), sorbitol (**figuras 7, 8 e 9**), sacarose (**figuras 10, 11 e 12**) e betaína (**figuras 13, 14 e 15**). As

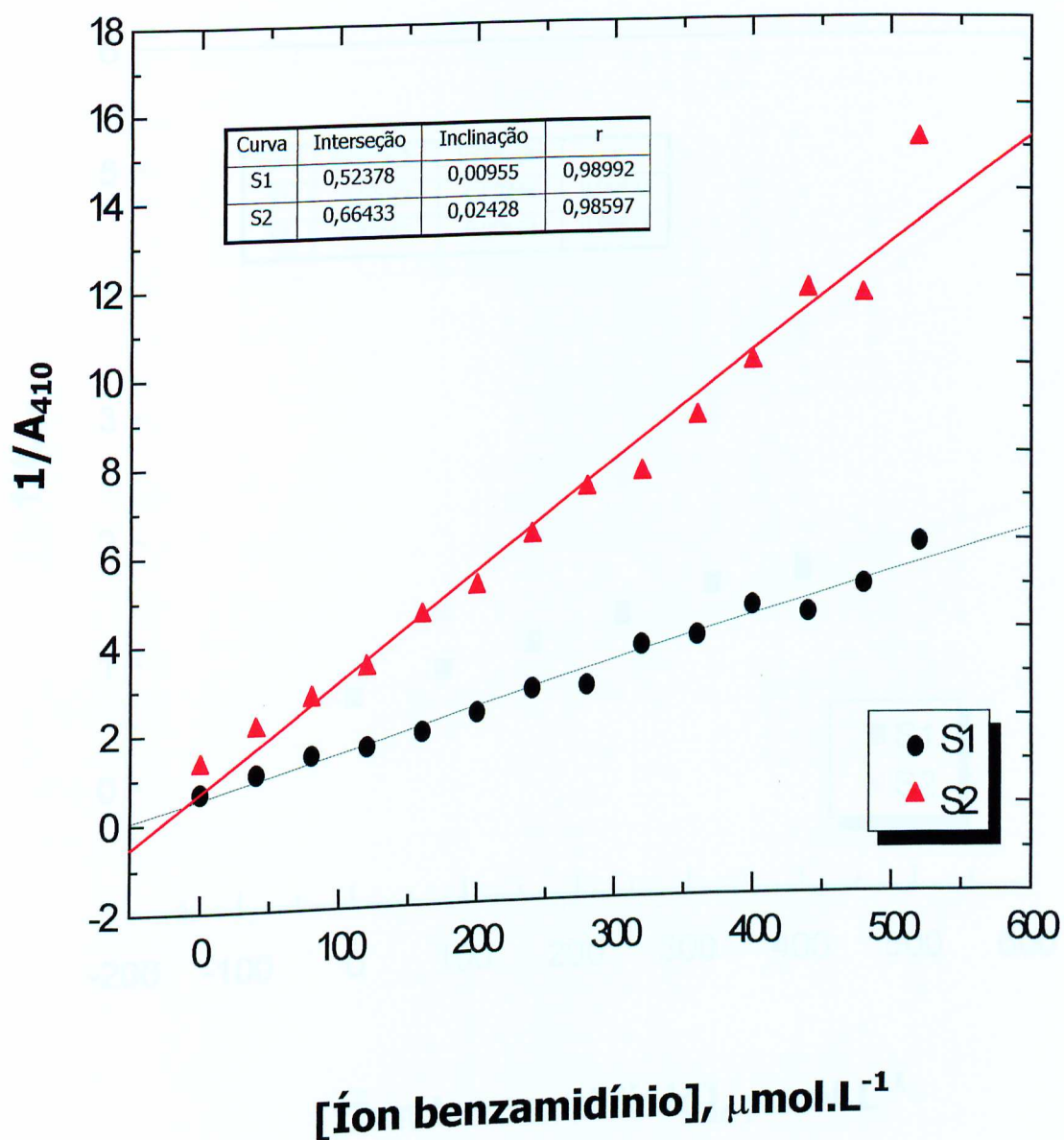
figuras iniciais (**figuras 1, 4, 7, 10 e 13**), intermediárias (**figuras 2, 5, 8, 11 e 14**), e finais (**figuras 3, 6, 9, 12 e 15**) de cada série de três mostram resultados obtidos a 10, 20 e 30 °C de temperatura, respectivamente.

Estes experimentos seguiram três tipos diferentes de protocolos, designados de **6S2**, **6S3** e **14S2** (apêndice). O dígito que antecede a letra S indica a quantidade utilizada de diferentes concentrações do inibidor, enquanto o número que sucede S indica o número de concentrações do substrato. Os protocolos 6S2 e 6S3 foram feitos com pontos em duplicatas, mas não o protocolo 14S2, que usa apenas um ponto para cada concentração do inibidor. Assim os experimentos baseados nos protocolos 6S2, 6S3 e 14 S2 envolvem respectivamente 24, 36 e 28 ensaios de velocidade para a determinação de  $K_i$ . Não somente os experimentos mostrados nas **figuras de 1 a 15** foram feitos para determinação dos valores de  $K_i$ . Vários destes experimentos foram feitos e os valores individuais de  $K_i$  determinados aparecem na **tabela 1** como médias e desvios-padrões de diferentes experimentos executados, na ausência e na presença de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de glicerol, sorbitol, sacarose e betaína. Os números entre parênteses da tabela indicam a quantidade total de ensaios de velocidade utilizada na determinação de cada valor de  $K_i$ .

Os valores de constantes de dissociação foram utilizados na determinação da variação da energia livre padrão de Gibbs para formação dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio. Os valores médios obtidos para  $\Delta G^\circ$  estão mostrados na **tabela 2**. Estes resultados foram apresentados e previamente discutidos na Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica de 1998 (**Souza-Penha e Penha-Silva, 1998**).

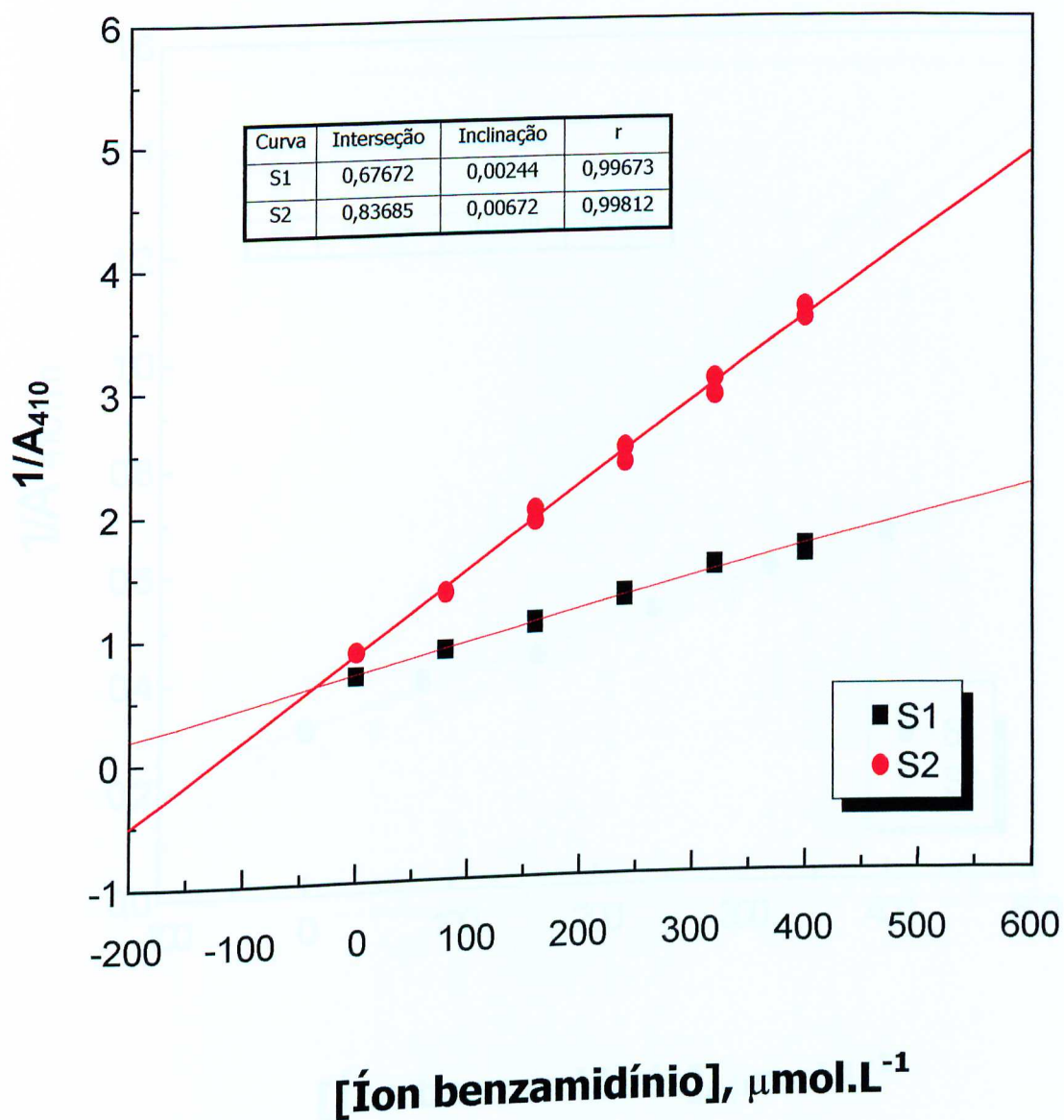
A determinação de  $K_i$  em três diferentes temperaturas permitiu a estimativa da variação de entalpia-padrão de van't Hoff. As **figuras 16, 17, 18, 19 e 20** mostram os gráficos de  $\ln K_i$  contra  $1/T$  na ausência de osmólitos e na presença de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de glicerol, sorbitol, sacarose e betaína, respectivamente. Os valores da interseção e inclinação de cada reta aparecem na legenda de cada gráfico, juntamente com seus respectivos desvios-padrões. A partir das inclinações daquelas retas foram obtidos os valores de  $\Delta H^\circ$  (**tabela 3**) para a formação dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio.

O efeito do glicerol sobre a mobilidade eletroforética de tripsina bovina foi estudado entre os limites de  $0$  a  $4 \text{ mol.L}^{-1}$  de concentração daquele soluto. Para isto foram empregados géis de poliacrilamida com gradientes transversos de glicerol. As **figuras 21 e 22** mostram que nas condições usadas, o glicerol não perturbou a mobilidade eletroforética da tripsina bovina. A apresentação de uma banda linear de migração para os osmólitos estudados não é um artefato de técnica, mas reflete um comportamento real do gradiente de glicerol. A substituição dos osmólitos por uréia entre  $0$  e  $8 \text{ mol.L}^{-1}$  no gradiente (**figura 23**), segundo a técnica de **Creighton (1989)** mostra uma curva sigmoideal característica da transição entre os estados nativo e desenovelado da tripsina. Os resultados sobre o efeito de osmólitos sobre a mobilidade eletroforética da tripsina também já foram apresentados e discutidos previamente em reuniões científicas (**Moisés et al., 1997; Fonseca, Souza-Penha e Penha Silva, 1997**).

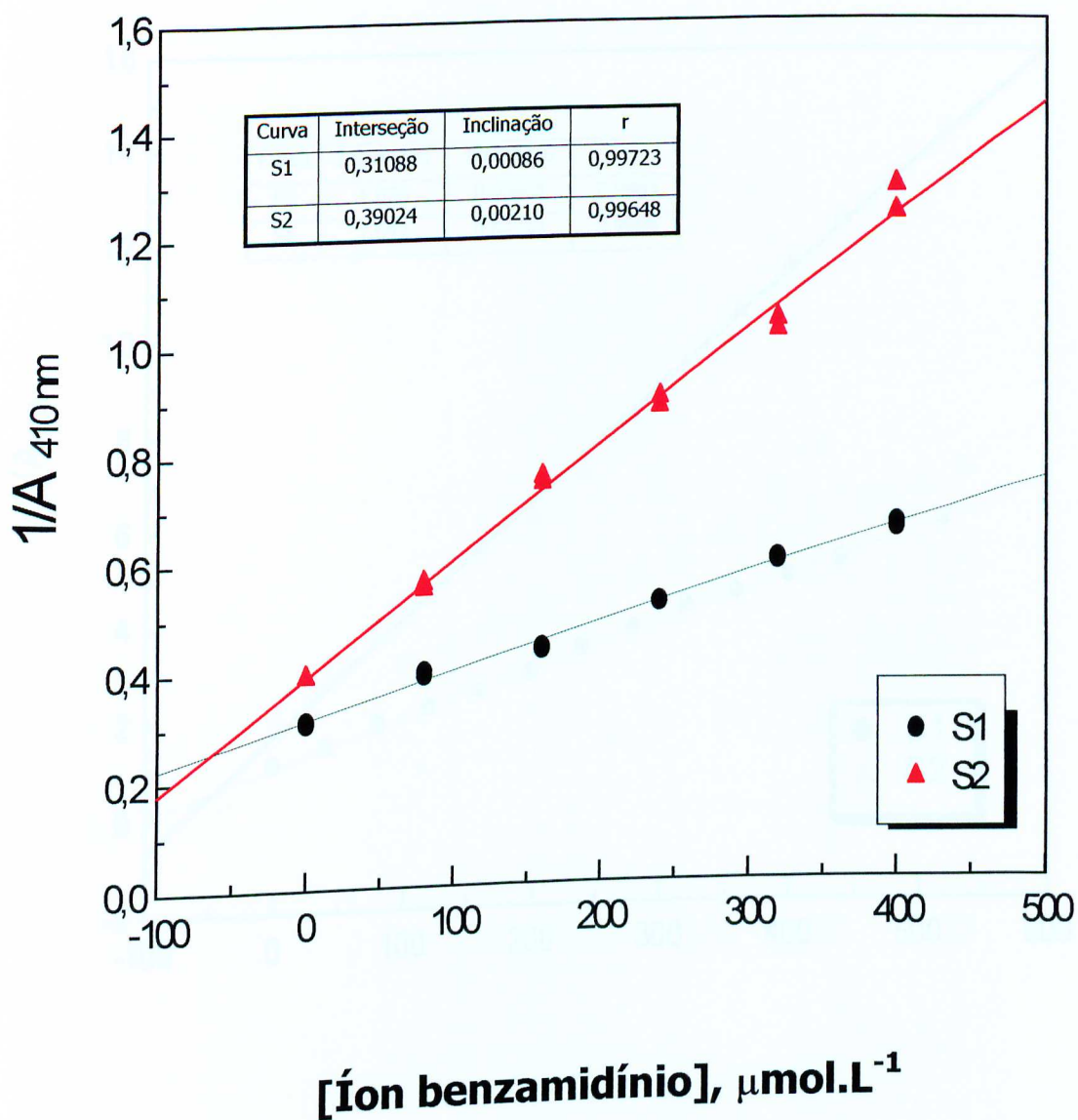


**Figura 1** - Gráfico de  $1/A_{410 \text{ nm}}$  contra a concentração do íon benzamidínio para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de tris-HCl pH 8, com  $\text{CaCl}_2$  a  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ , sob  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, em 10 minutos de reação. Os ensaios foram conduzidos em concentrações de  $400 \text{ (S1)}$  e  $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (S2) do substrato Bz-D,L-Arg-Nan. A absorvância em  $280 \text{ nm}$  da solução-estoque de tripsina bovina foi de  $2,69$ . O valor de  $K_i$  deste experimento foi de  $9,54 \times 10^{-6}$ .

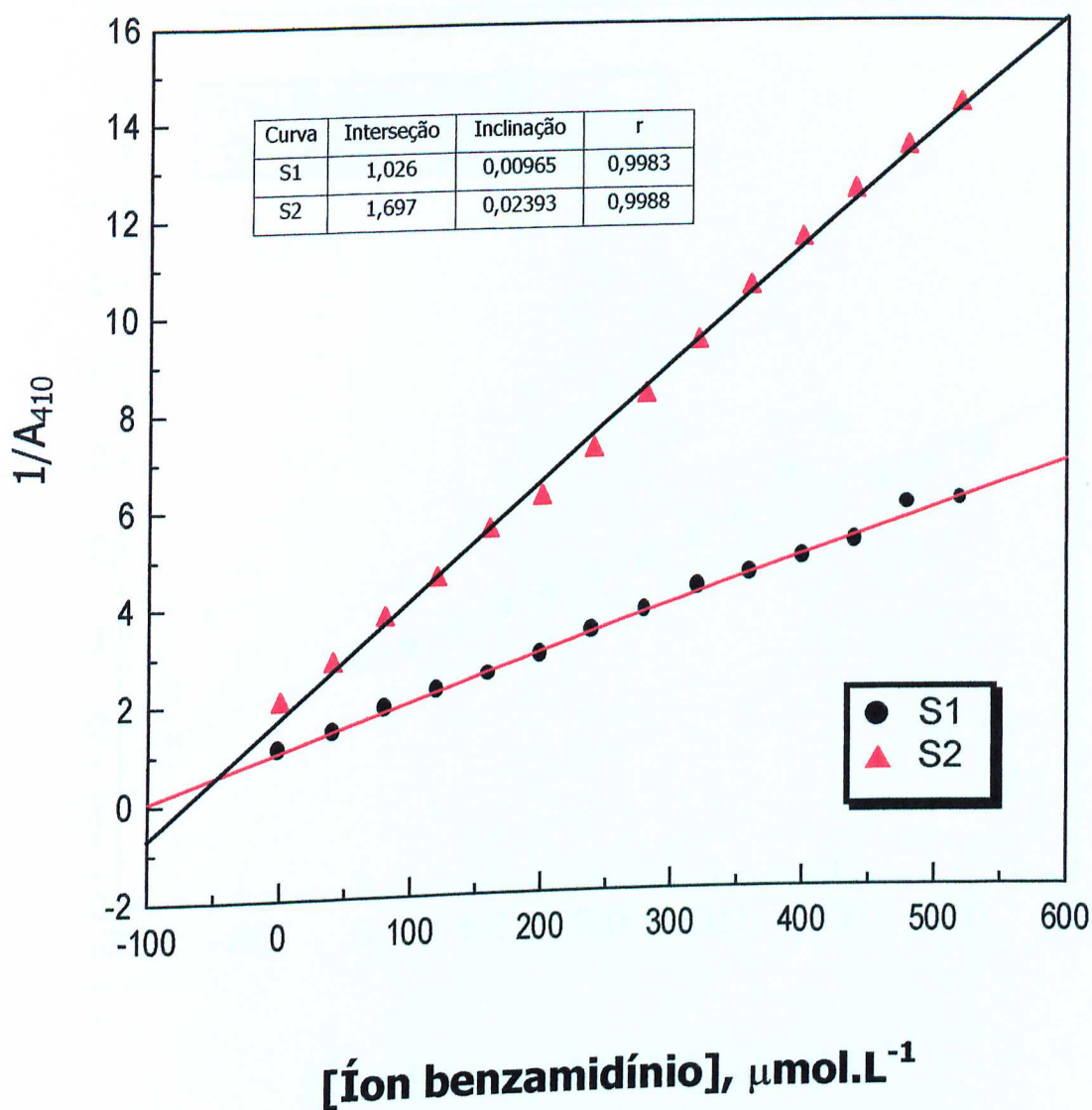




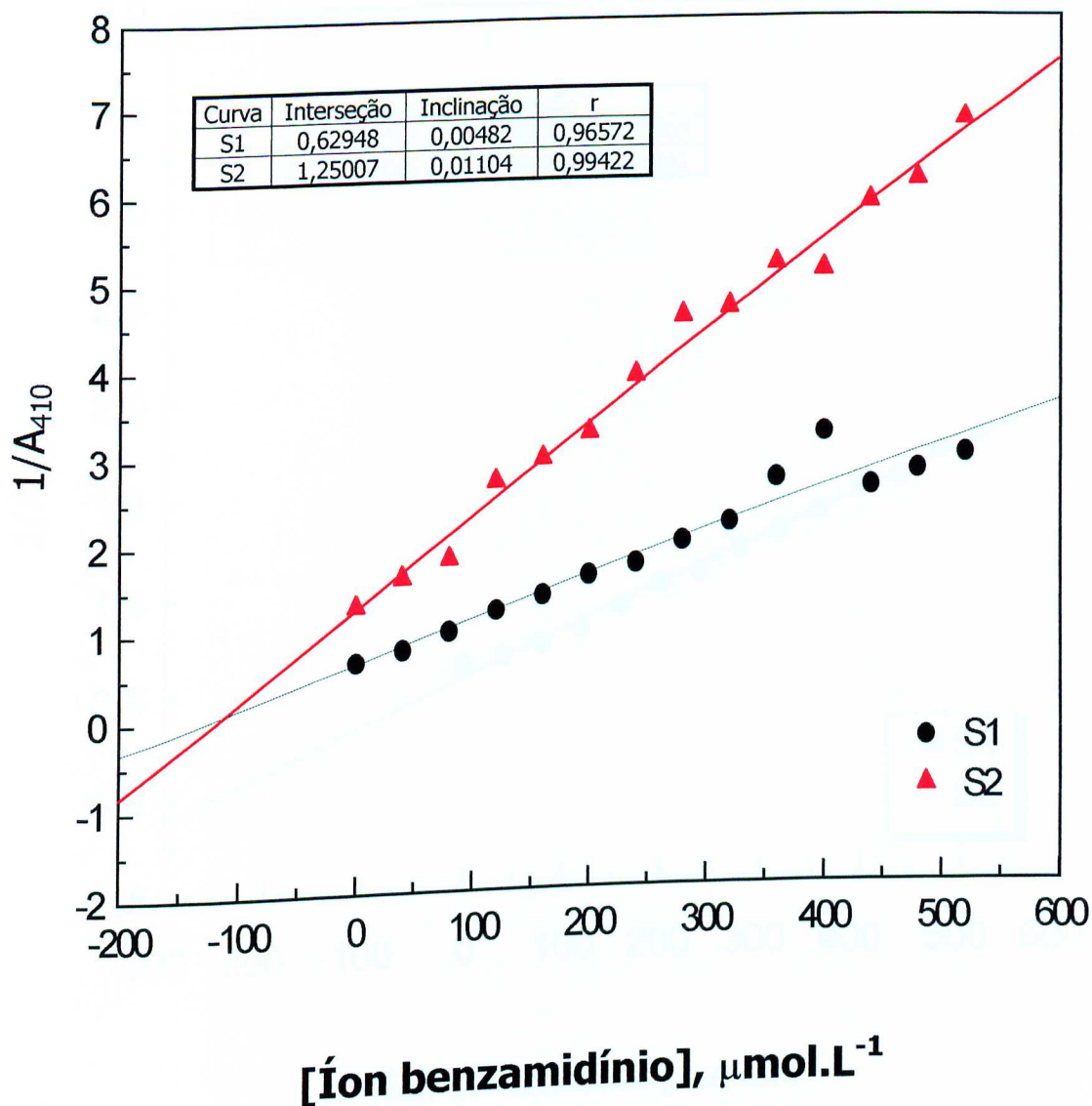
**Figura 2** - Gráfico de  $1/A_{410 \text{ nm}}$  contra a concentração do íon benzamidínio para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de tris-HCl pH 8, com  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ , a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, em 10 minutos de reação. Os ensaios foram conduzidos em concentrações de  $400$  (S1) e  $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (S2) do substrato Bz-D,L-Arg-Nan. A absorvância em  $280 \text{ nm}$  da solução-estoque de tripsina bovina foi de  $2,61$ . O valor de  $K_i$  deste experimento foi de  $37,4 \times 10^{-6}$ .



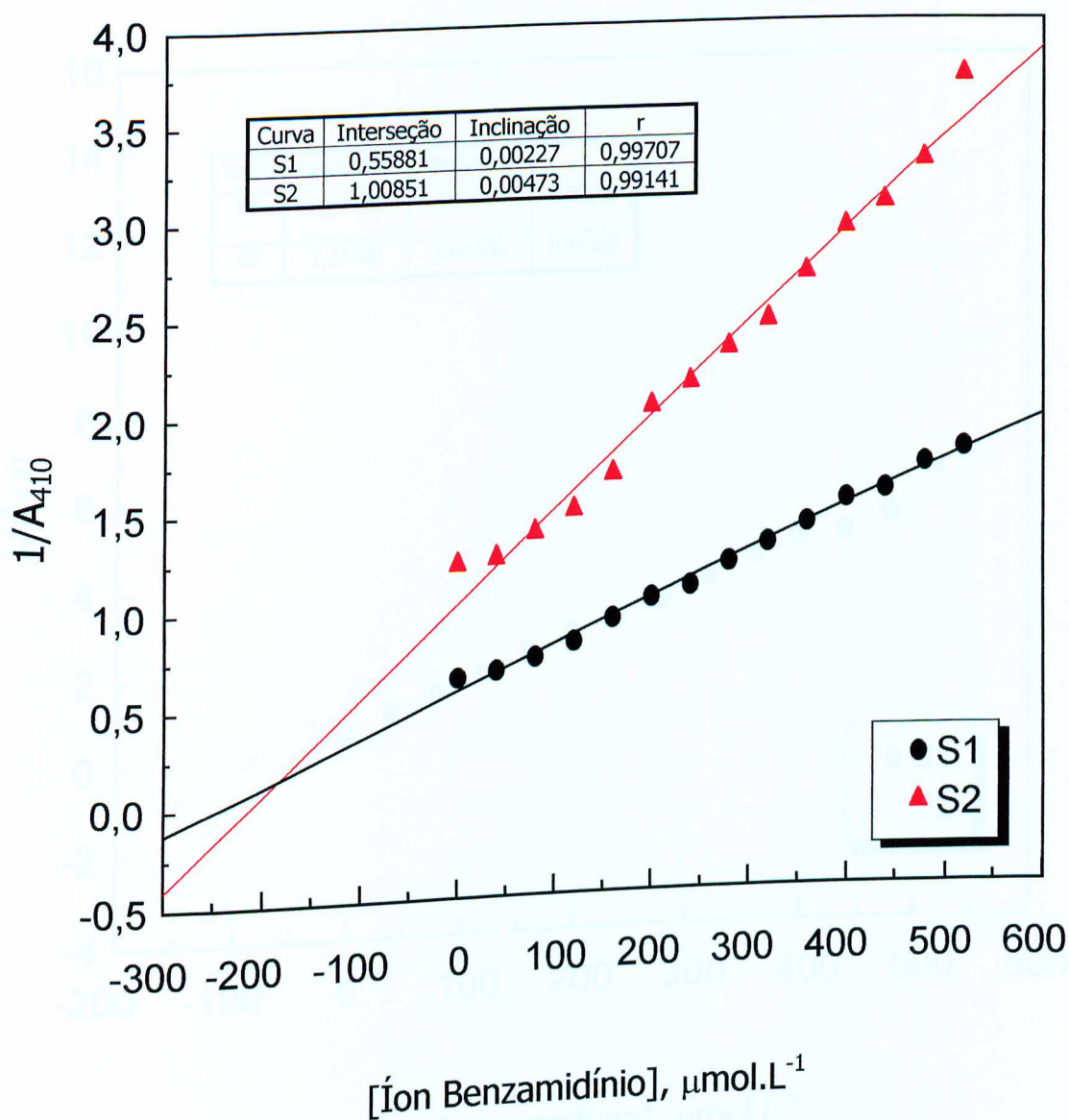
**Figura 3** - Gráfico de  $1/A_{410 \text{ nm}}$  contra a concentração do íon benzamidínio para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de tris-HCl pH 8, com  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ , a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, em 10 minutos de reação. Os ensaios foram conduzidos em concentrações de  $400$  (S1) e  $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (S2) do substrato Bz-D,L-Arg-Nan. A absorvância em  $280 \text{ nm}$  da solução-estoque de tripsina bovina foi de  $2,71$ . O valor de  $K_i$  deste experimento foi de  $64,0 \times 10^{-6}$ .



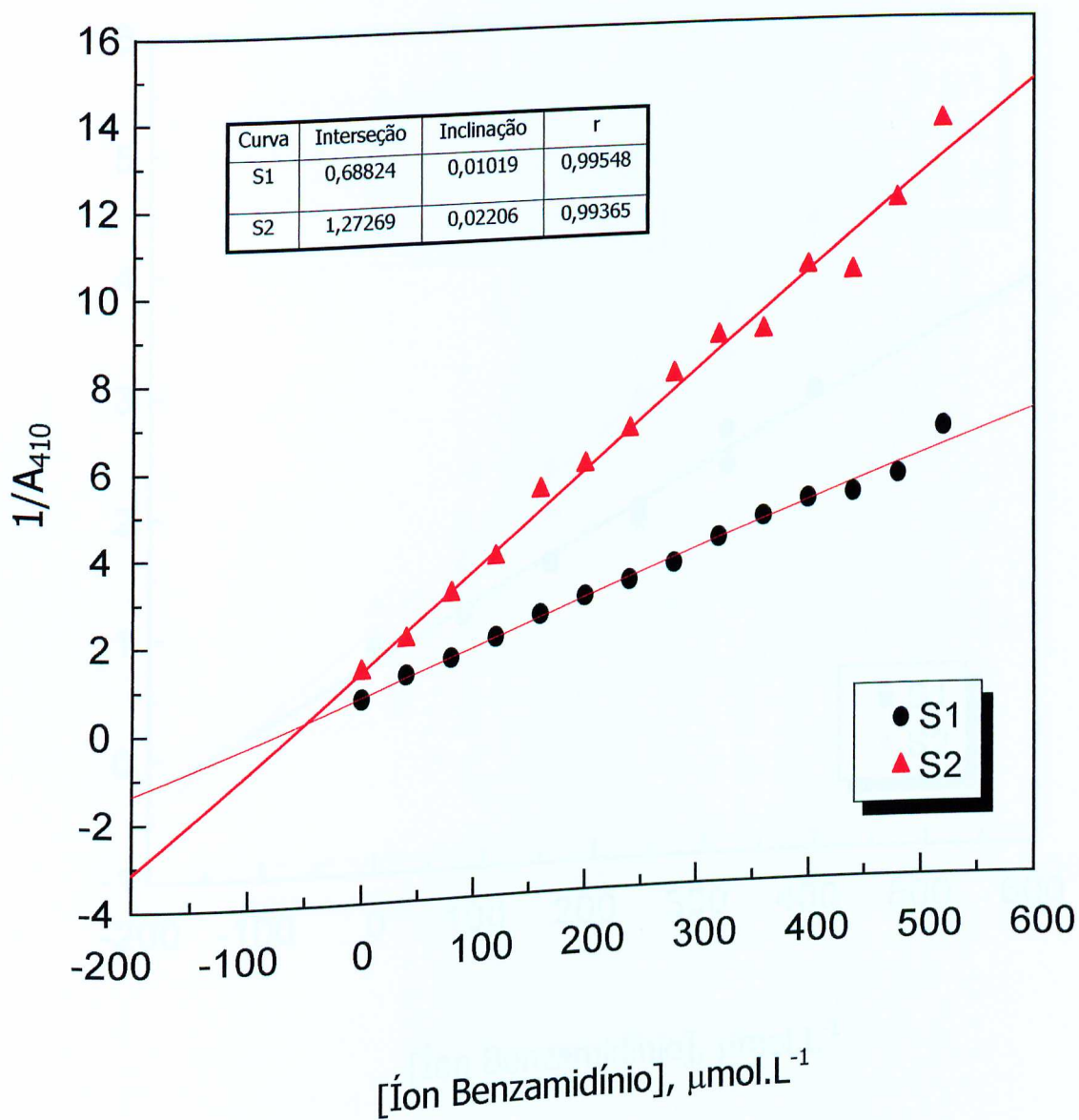
**Figura 4** - Gráfico de  $1/A_{410 \text{ nm}}$  contra a concentração do íon benzamidínio para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de tris-HCl pH 8, com  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  e  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de glicerol, a  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, em 10 minutos de reação. Os ensaios foram conduzidos em concentrações de  $400$  (S1) e  $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (S2) do substrato Bz-D,L-Arg-Nan. A absorvância em  $280 \text{ nm}$  da solução-estoque de tripsina foi de  $2,65$ . O valor de  $K_i$  deste experimento foi de  $47,0 \times 10^{-6}$ .



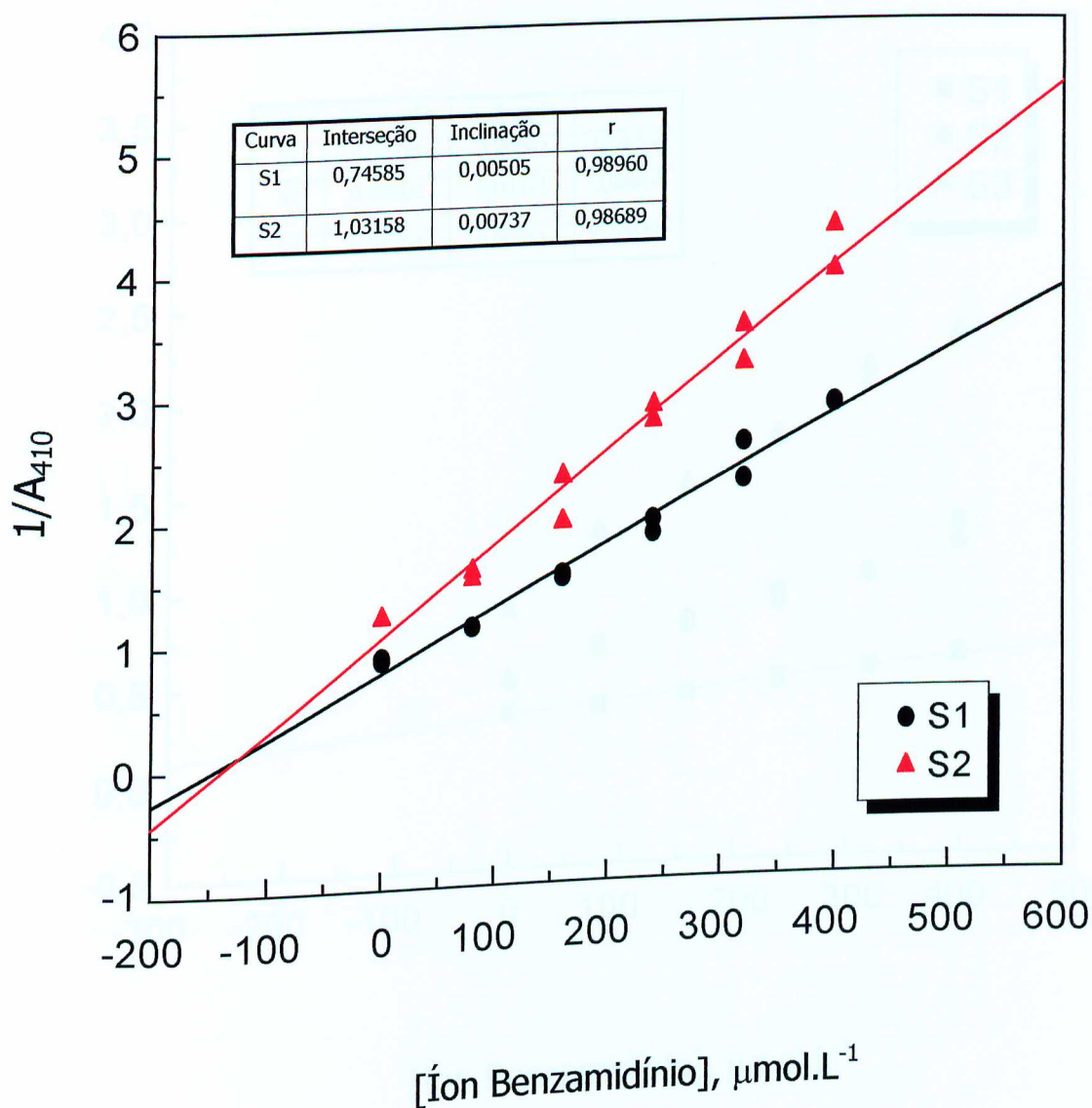
**Figura 5** - Gráfico de  $1/A_{410 \text{ nm}}$  contra a concentração do íon benzamidínio para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de tris-HCl pH 8, com  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  e  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de glicerol, a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, em 10 minutos de reação. Os ensaios foram conduzidos em concentrações de  $400 \text{ (S1)}$  e  $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1} \text{ (S2)}$  do substrato Bz-D,L-Arg-Nan. A absorvância em  $280 \text{ nm}$  da solução-estoque de tripsina bovina foi de  $2,46$ . O valor de  $K_i$  deste experimento foi de  $99,8 \times 10^{-6}$ .



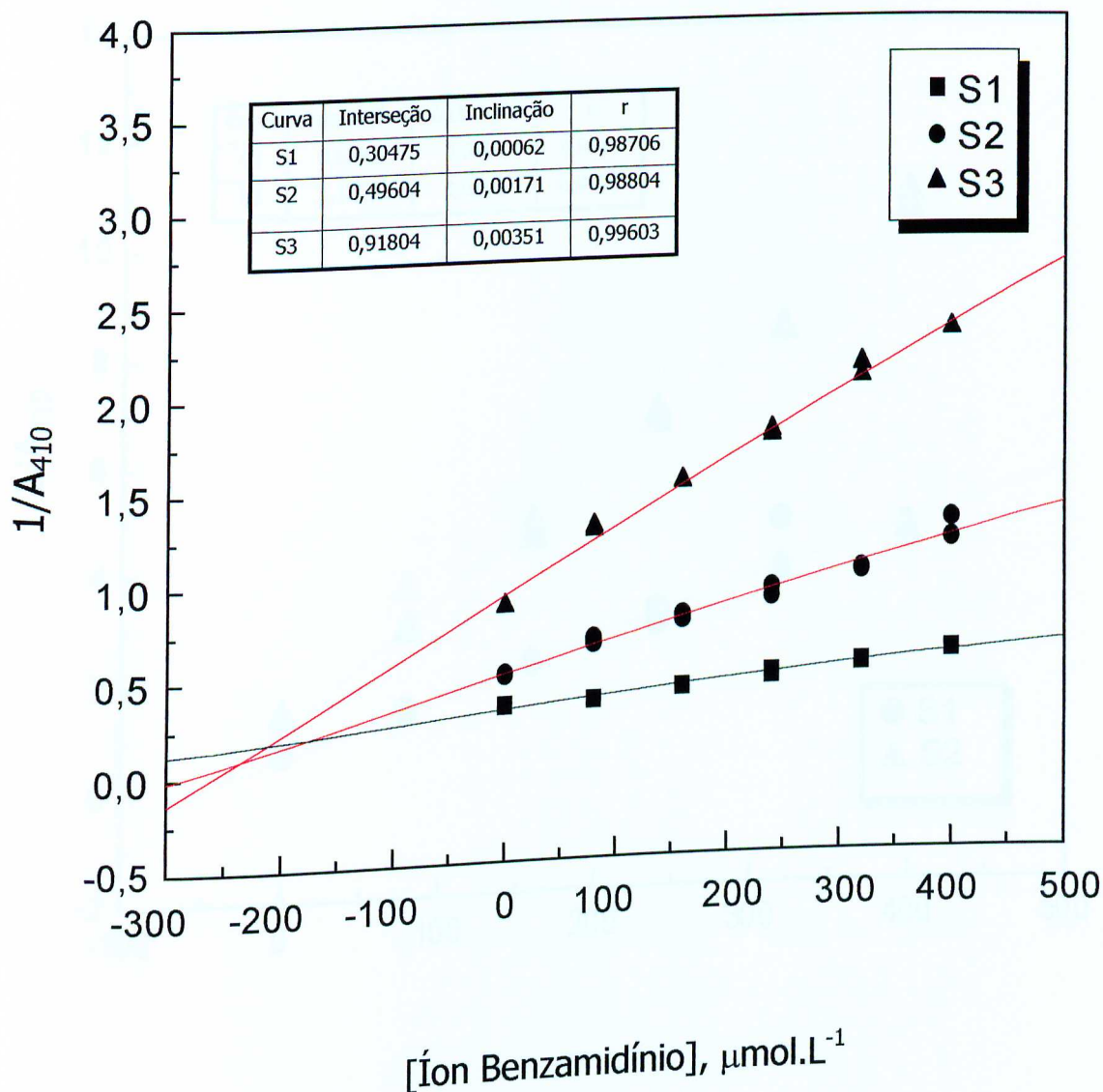
**Figura 6** - Gráfico de  $1/A_{410 \text{ nm}}$  contra a concentração do íon benzamidínio para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de tris-HCl pH 8, com  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  e  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de glicerol, a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, em 10 minutos de reação. Os ensaios foram conduzidos em concentrações de  $400$  (S1) e  $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (S2) do substrato Bz-D,L-Arg-Nan. A absorvância em  $280 \text{ nm}$  da solução-estoque de tripsina bovina foi de  $2,63$ . O valor de  $K_i$  deste experimento foi de  $182,8 \times 10^{-6}$ .



**Figura 7** - Gráfico de  $1/A_{410 \text{ nm}}$  contra a concentração do íon benzamidínio para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de tris-HCl pH 8, com  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  e  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de sorbitol, a  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, em 10 minutos de reação. Os ensaios foram conduzidos em concentrações de  $400 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (S1) e  $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (S2) do substrato Bz-D,L-Arg-Nan. A absorvância em  $280 \text{ nm}$  da solução-estoque de tripsina bovina foi de  $2,63$ . O valor de  $K_i$  deste experimento foi de  $49,2 \times 10^{-6}$ .

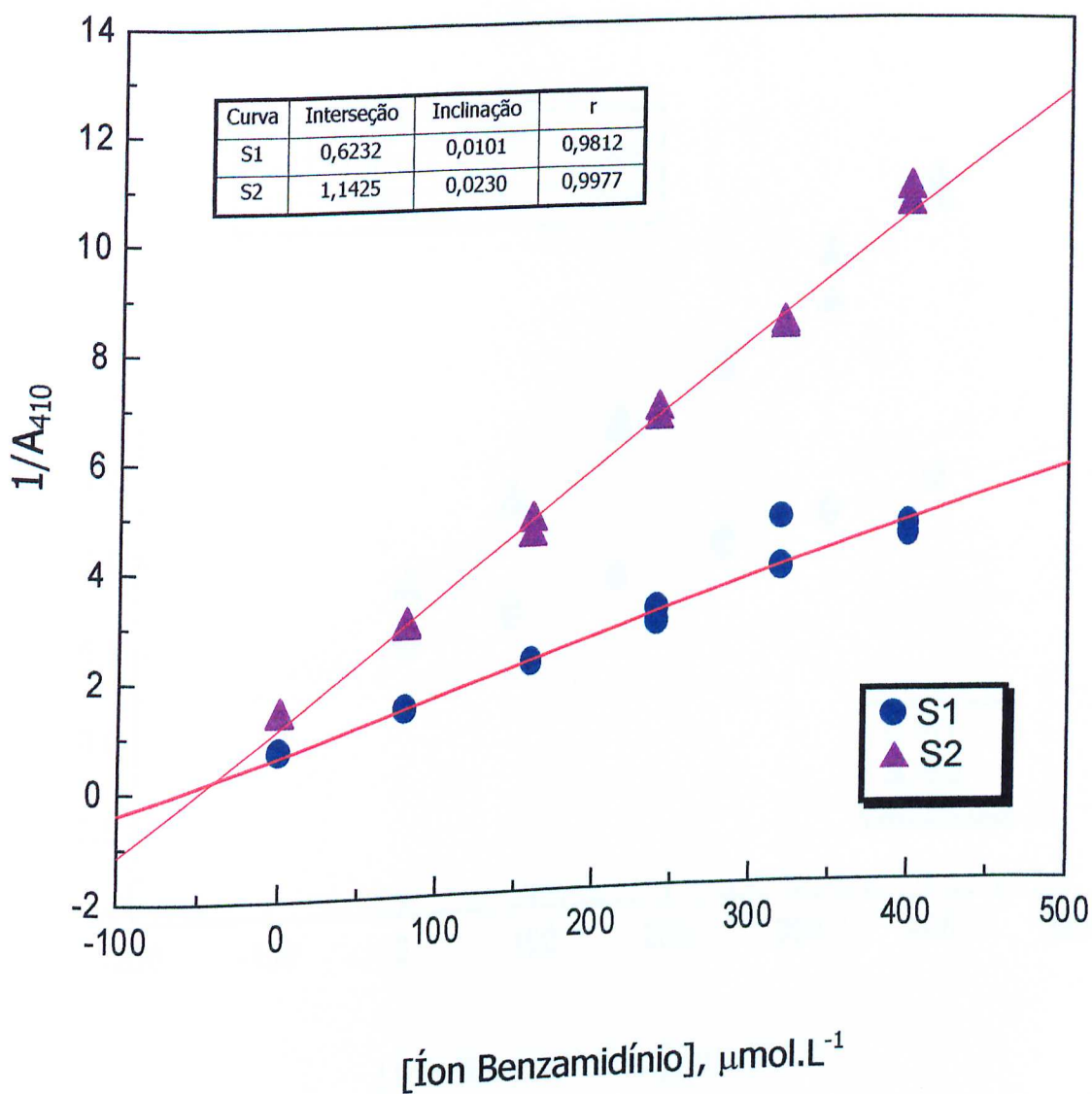


**Figura 8** - Gráfico de  $1/A_{410 \text{ nm}}$  contra a concentração do íon benzamidínio para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de tris-HCl pH 8, com  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  e  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de sorbitol, a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, em 10 minutos de reação. Os ensaios foram conduzidos em concentrações de  $400$  (S1) e  $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (S2) do substrato Bz-D,L-Arg-Nan. A absorvância em  $280 \text{ nm}$  da solução-estoque de tripsina bovina foi de  $2,63$ . O valor de  $K_i$  deste experimento foi de  $123,2 \times 10^{-6}$ .

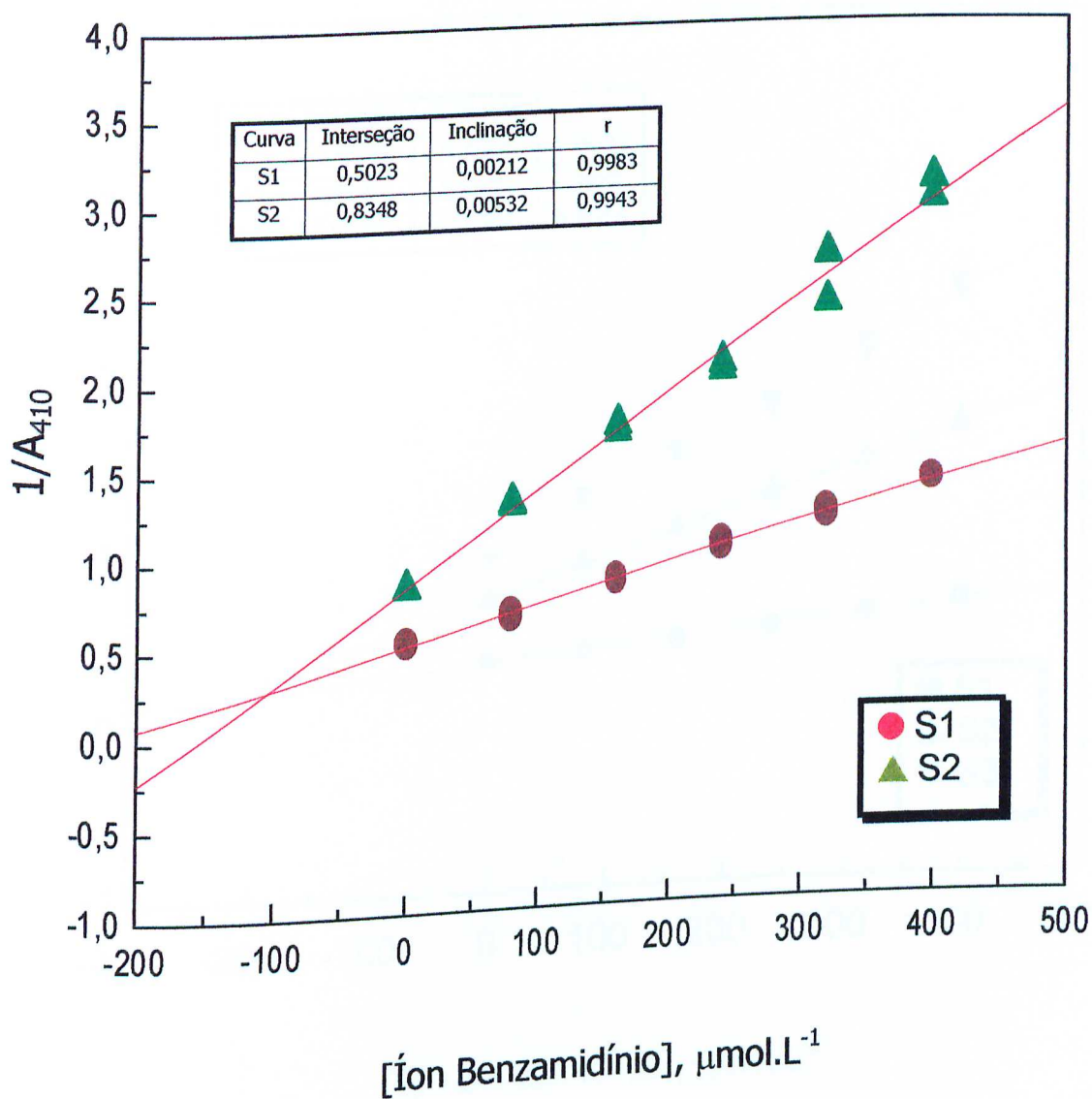


**Figura 9** - Gráfico de  $1/A_{410 \text{ nm}}$  contra a concentração do íon benzamidínio para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de tris-HCl pH 8, com  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  e  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de sorbitol, a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, em 10 minutos de reação. Os ensaios foram conduzidos em concentrações de  $800 \text{ (S1)}$ ,  $400 \text{ (S2)}$  e  $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1} \text{ (S3)}$  do substrato Bz-D,L-Arg-Nan. A absorvância em  $280 \text{ nm}$  da solução-estoque de tripsina bovina foi de  $2,67$ . O valor de  $K_i$  deste experimento foi de  $207,4 \times 10^{-6}$ .

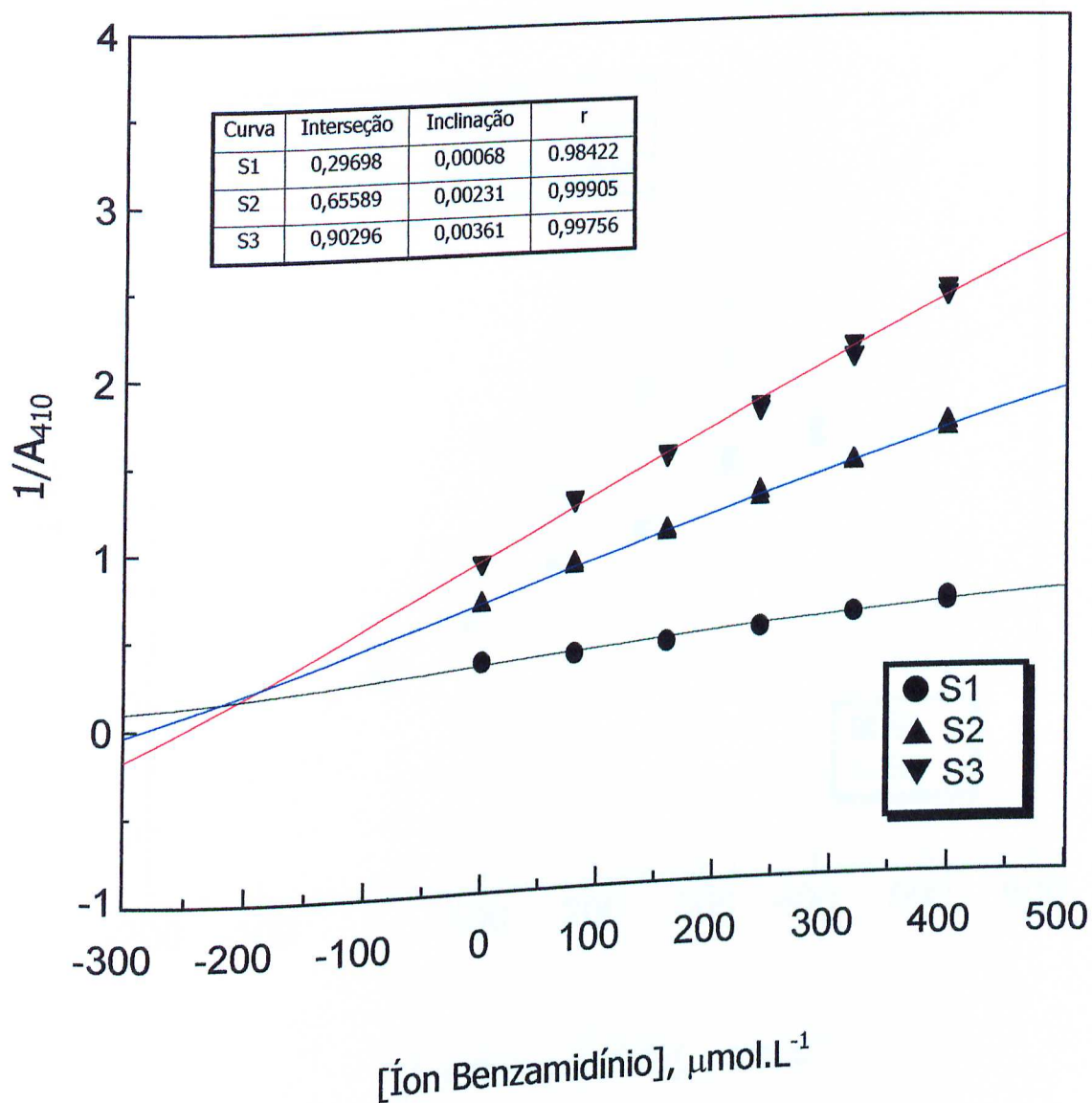




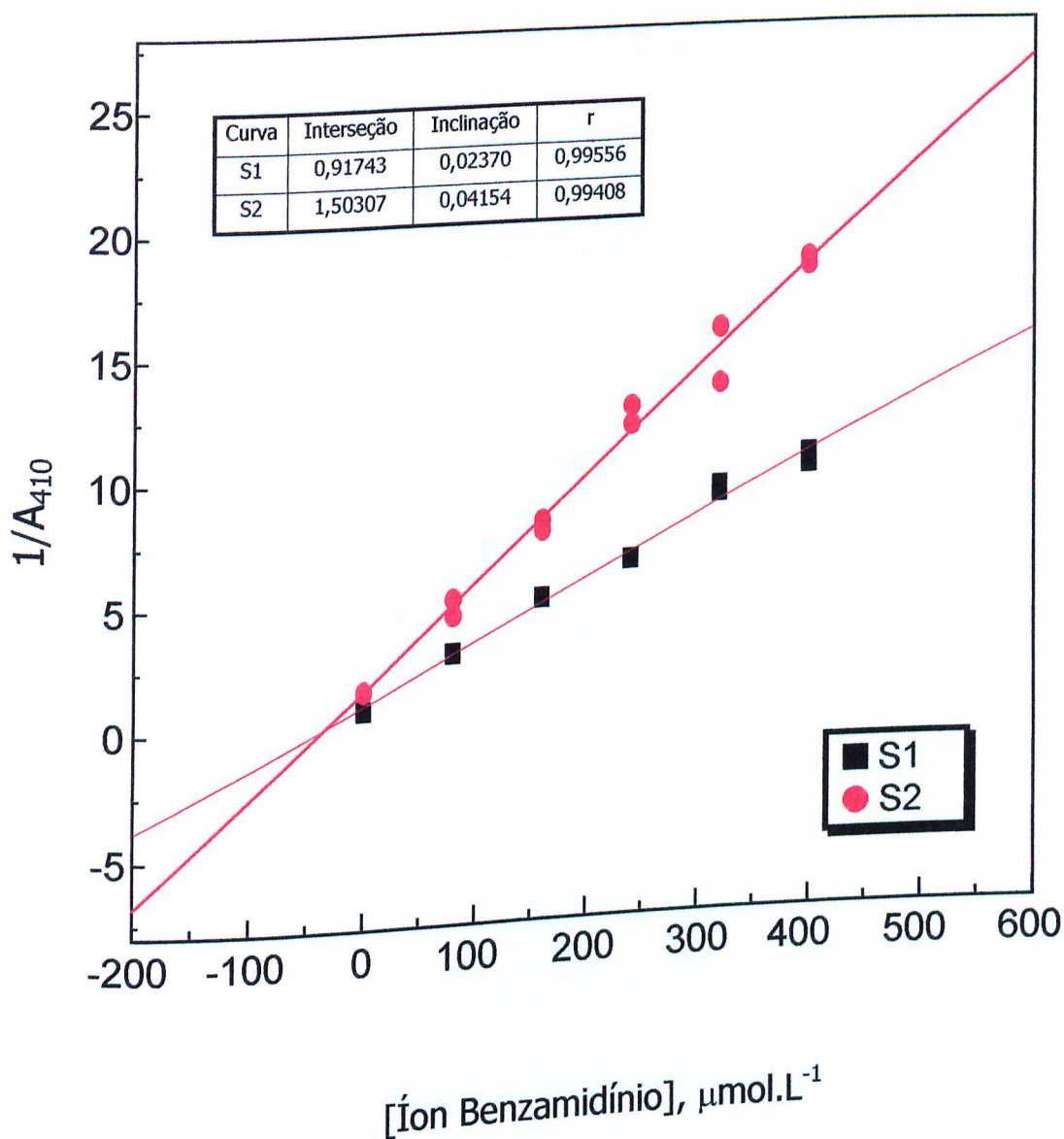
**Figura 10** - Gráfico de  $1/A_{410 \text{ nm}}$  contra a concentração do íon benzamidínio para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de tris-HCl pH 8, com  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  e  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de sacarose, a  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, em 10 minutos de reação. Os ensaios foram conduzidos em concentrações de  $400$  (S1) e  $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (S2) do substrato Bz-D,L-Arg-Nan. A absorvância em  $280 \text{ nm}$  da solução-estoque de tripsina bovina foi de  $2,59$ . O valor de  $K_i$  deste experimento foi de  $40,3 \times 10^{-6}$ .



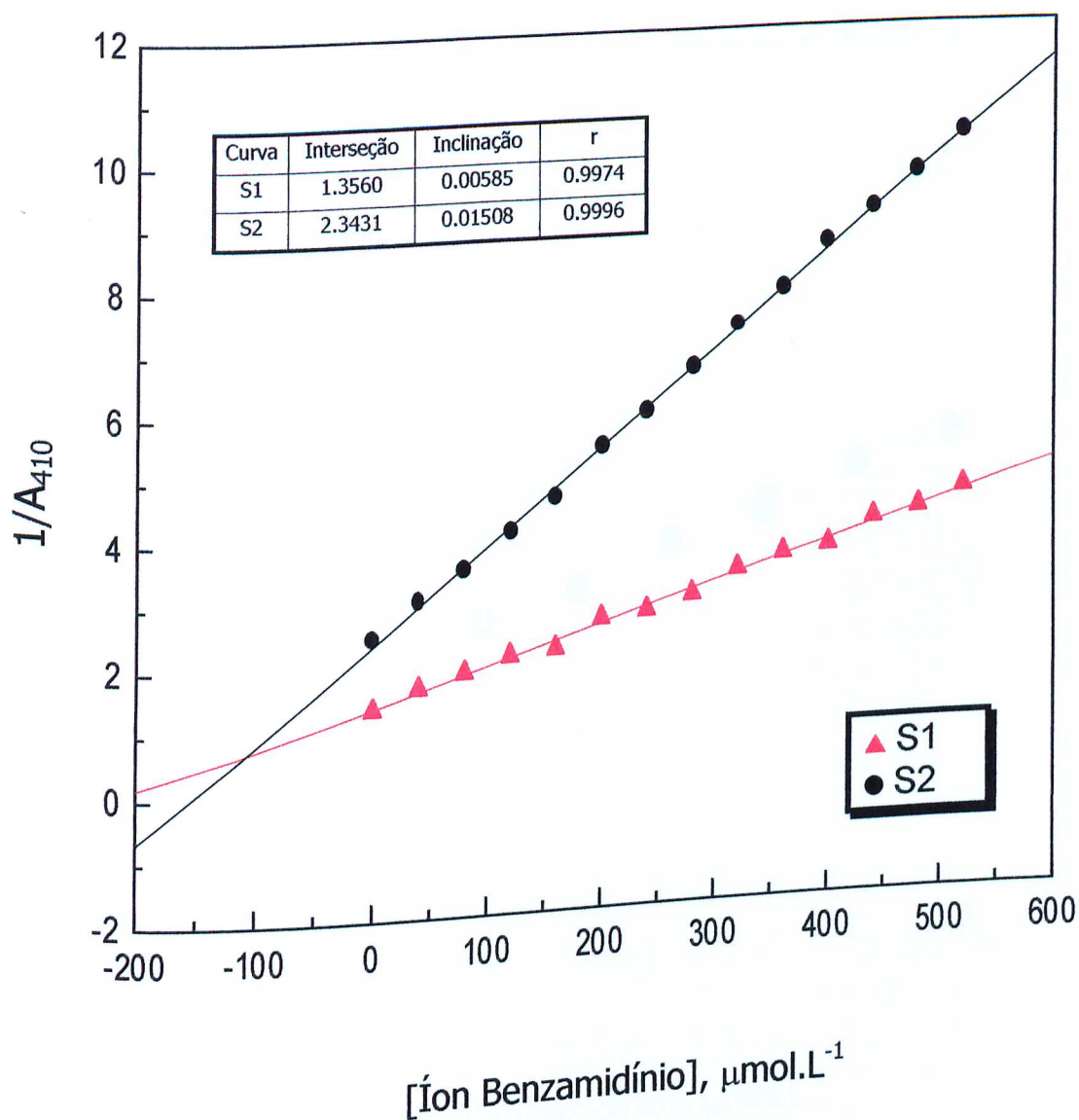
**Figura 11** - Gráfico de  $1/A_{410 \text{ nm}}$  contra a concentração do íon benzamidínio para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de tris-HCl pH 8, com 2 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> e 0,5 mol.L<sup>-1</sup> de sacarose, a 20 °C de temperatura, em 10 minutos de reação. Os ensaios foram conduzidos em concentrações de 400 (S1) e 200 μmol.L<sup>-1</sup> (S2) do substrato Bz-D,L-Arg-Nan. A absorvância em 280 nm da solução-estoque de tripsina bovina foi de 2,60. O valor de  $K_i$  deste experimento foi de  $103,9 \times 10^{-6}$ .



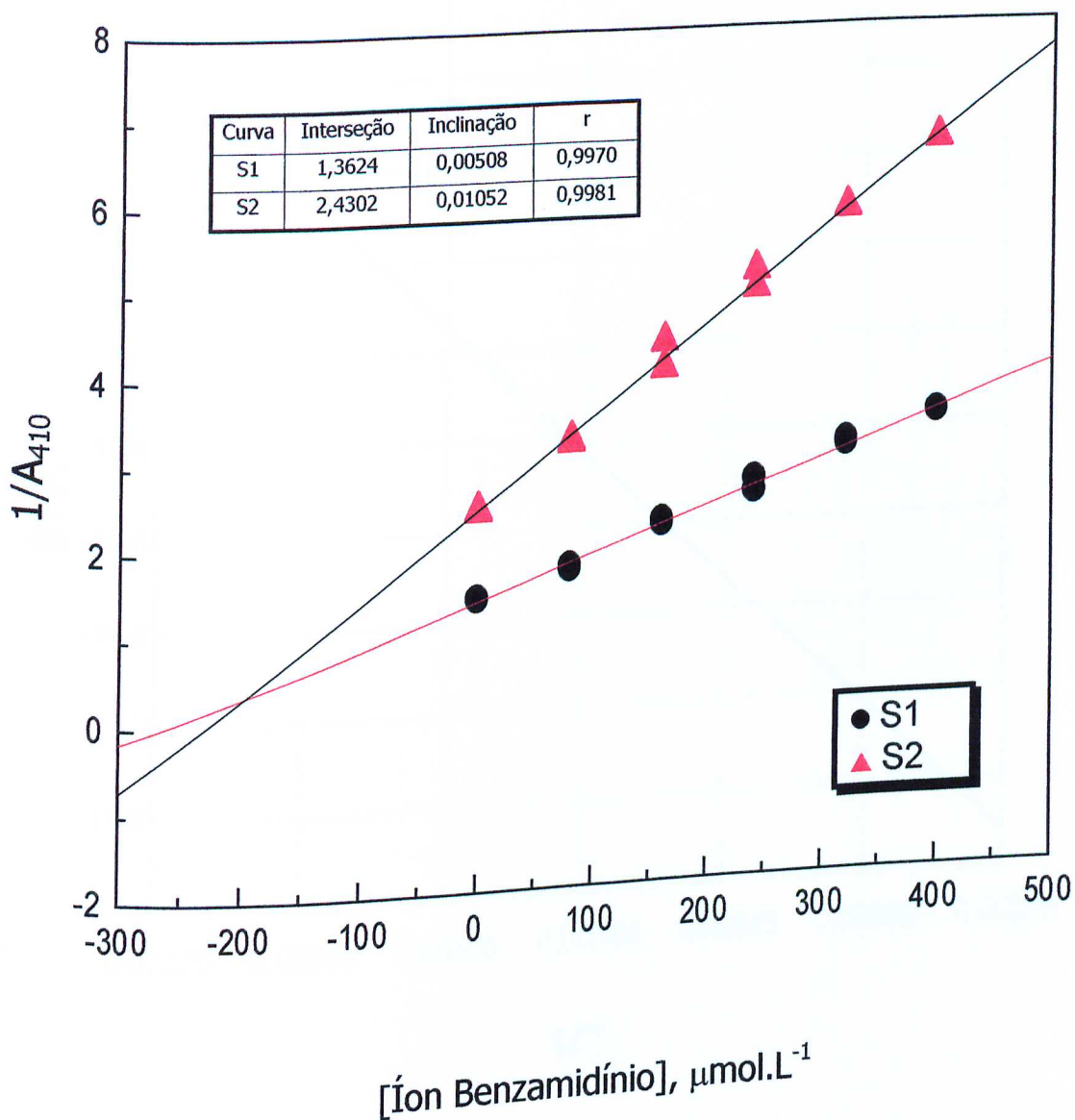
**Figura 12** - Gráfico de  $1/A_{410 \text{ nm}}$  contra a concentração do íon benzamidínio para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de tris-HCl pH 8, com  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  e  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de sacarose, a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, em 10 minutos de reação. Os ensaios foram conduzidos em concentrações de  $800 \text{ (S1)}$ ,  $400 \text{ (S2)}$  e  $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1} \text{ (S3)}$  do substrato Bz-D,L-Arg-Nan. A absorvância em  $280 \text{ nm}$  da solução-estoque de tripsina foi de  $2,67$ . O valor de  $K_i$  deste experimento foi de  $205,7 \times 10^{-6}$ .



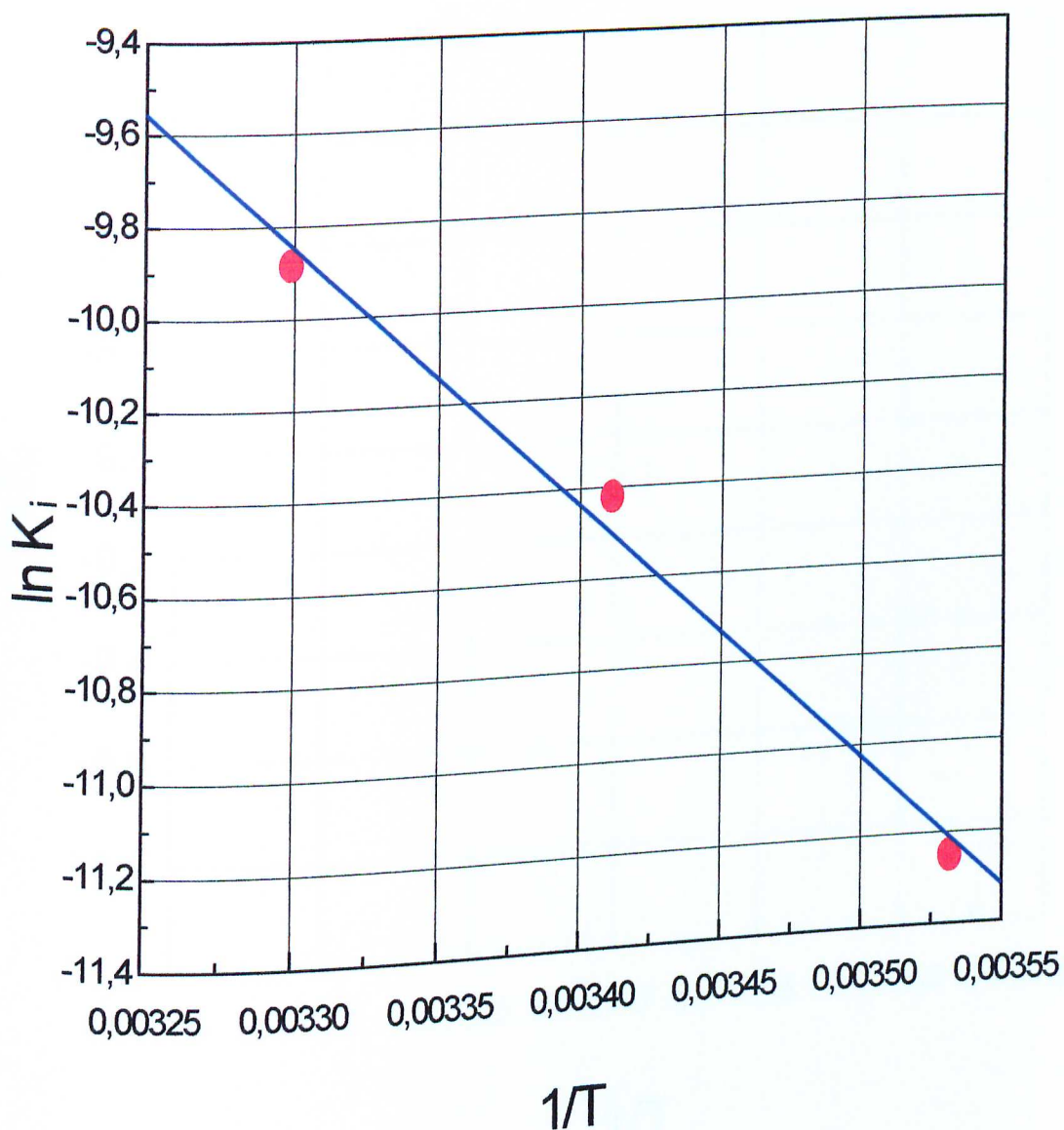
**Figura 13** - Gráfico de  $1/A_{410 \text{ nm}}$  contra a concentração do íon benzamidínio para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de tris-HCl pH 8, com  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  e  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de betaína, a  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, em 10 minutos de reação. Os ensaios foram conduzidos em concentrações de  $400$  (S1) e  $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (S2) do substrato Bz-D,L-Arg-Nan. A absorvância em  $280 \text{ nm}$  da solução-estoque de tripsina bovina foi de  $2,62$ . O valor de  $K_i$  deste experimento foi de  $32,8 \times 10^{-6}$ .



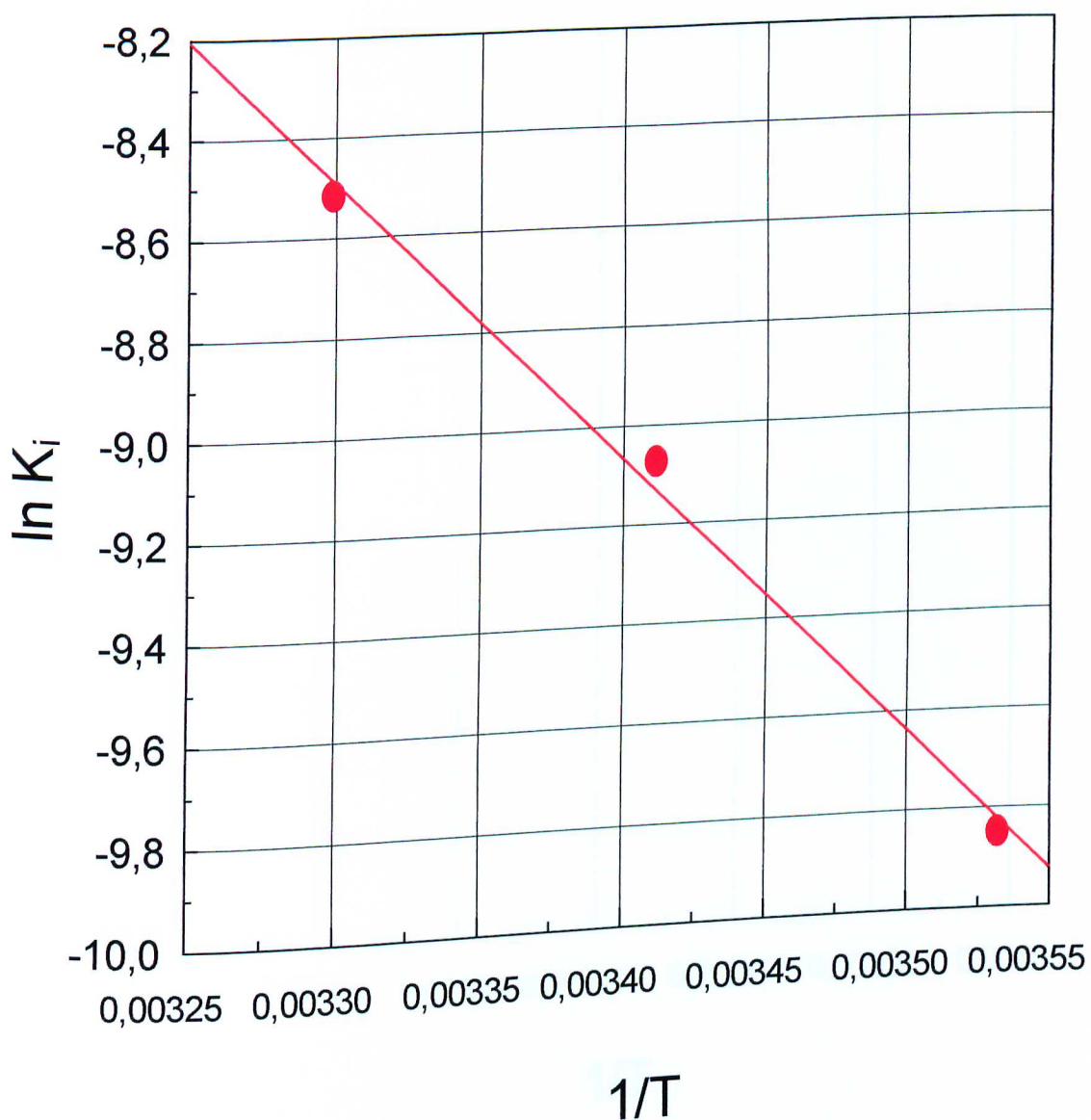
**Figura 14** - Gráfico de  $1/A_{410 \text{ nm}}$  contra a concentração do íon benzamidínio para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de tris-HCl pH 8, com  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  e  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de betáina, a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, em 10 minutos de reação. Os ensaios foram conduzidos em concentrações de  $400 \text{ (S1)}$  e  $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (S2) do substrato Bz-D,L-Arg-Nan. A absorvância em  $280 \text{ nm}$  da solução-estoque de tripsina bovina foi de  $2,62$ . O valor de  $K_i$  deste experimento foi de  $107,0 \times 10^{-6}$ .



**Figura 15** - Gráfico de  $1/A_{410 \text{ nm}}$  contra a concentração do íon benzamidínio para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de tris-HCl pH 8, com  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  e  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de betaína, a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, em 10 minutos de reação. Os ensaios foram conduzidos em concentrações de  $400 \text{ (S1)}$  e  $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (S2) do substrato Bz-D,L-Arg-Nan. A absorvância em  $280 \text{ nm}$  da solução-estoque de tripsina bovina foi de  $2,52$ . O valor de  $K_i$  deste experimento foi de  $196,3 \times 10^{-6}$ .



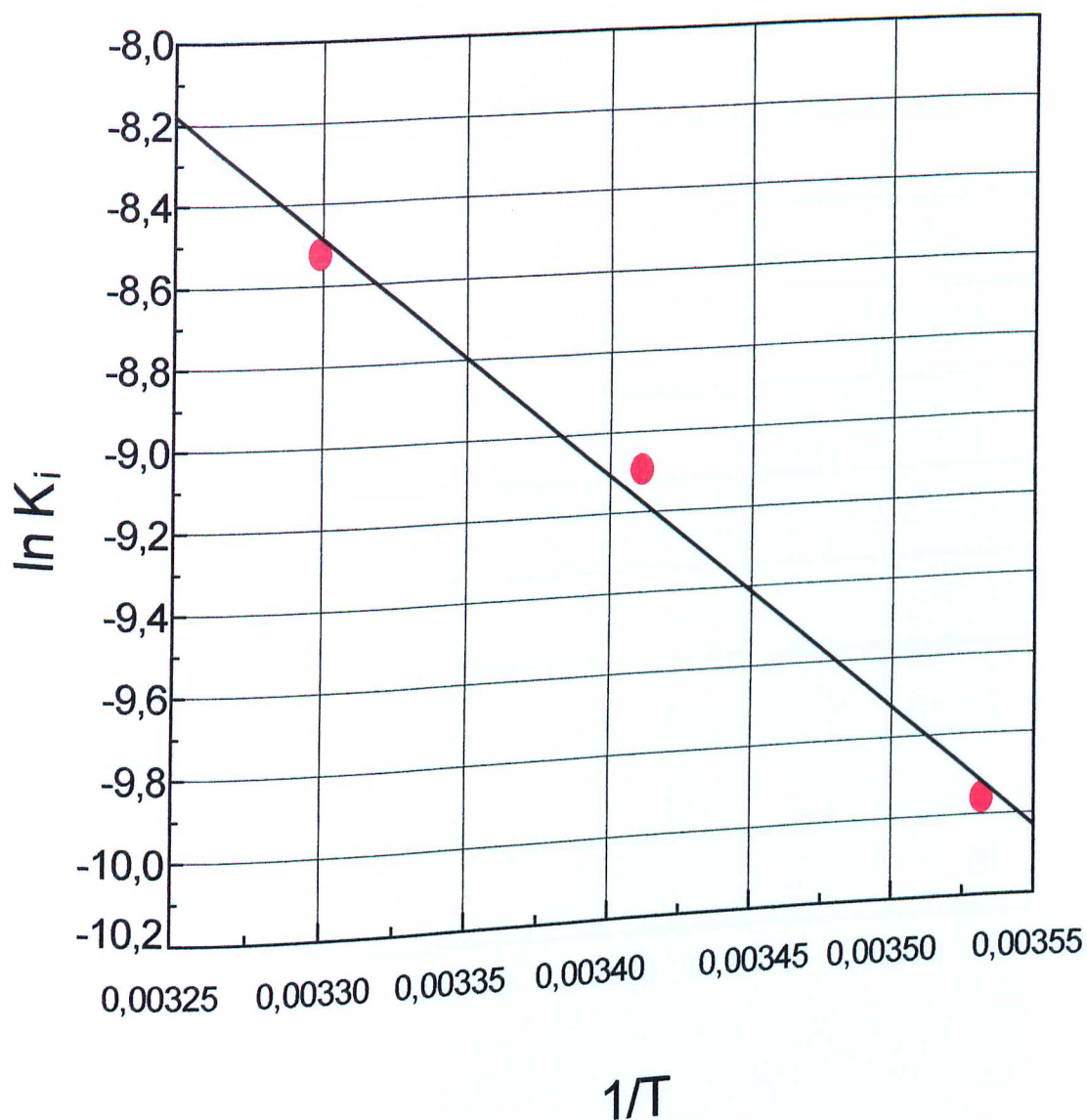
**Figura 16** - Gráfico de  $\ln K_i$  contra  $1/T$  para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em tris-HCl a  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 8,0, com  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ , na ausência de osmólitos. Os dados experimentais se ajustaram a uma reta de regressão com valores de interseção de  $9,553 \pm 2,124$ , inclinação de  $-5.879 \pm 622,1$  e  $r$  de  $-0,9945$ .



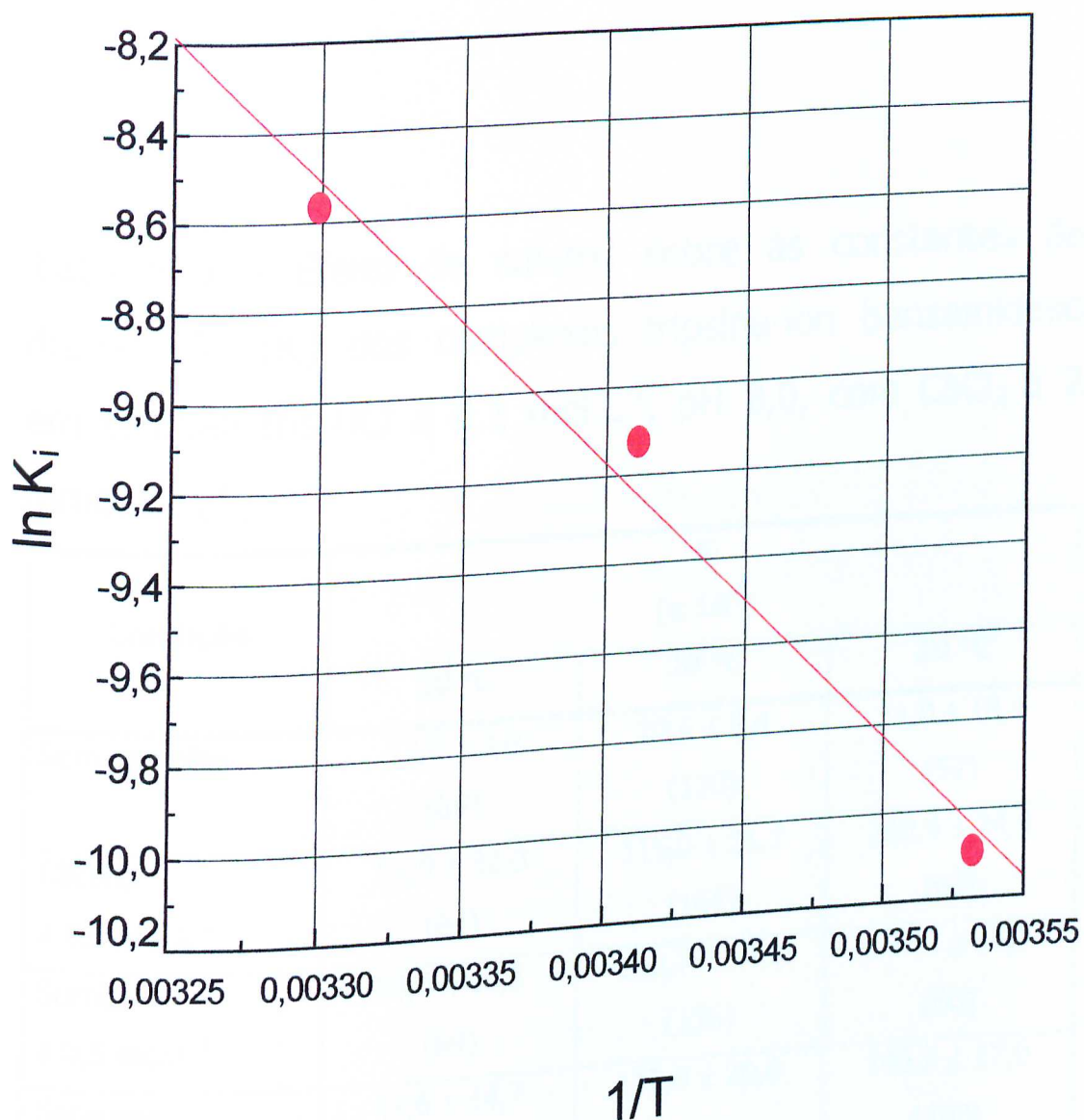
**Figura 17** - Gráfico de  $\ln K_i$  contra  $1/T$  para a formação de complexos de tripsina com o íon benzamidínio em tris-HCl a 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0, com 2 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>, na **presença de 0,5 mol.L<sup>-1</sup> de glicerol**. Os dados experimentais se ajustaram a uma reta de regressão com valores de interseção de  $10,40 \pm 1,477$ , inclinação de  $-5.725 \pm 432,4$  e  $r$  de  $-0,9972$ .







**Figura 19** - Gráfico de  $\ln K_i$  contra  $1/T$  para a formação de complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em tris-HCl  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 8,0, com  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ , na presença de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de sacarose. Os dados experimentais se ajustaram a uma reta de regressão com valores de interseção de  $11,89 \pm 2,099$ , inclinação de  $-6.174,2 \pm 614,48$  e  $r$  de  $-0,9951$ .



**Figura 20** - Gráfico de  $\ln K_i$  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  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ , na presença de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de betaína. Os dados experimentais se ajustaram a uma reta de regressão com valores de interseção de  $13,17 \pm 3,030$ , inclinação de  $-6.569,0 \pm 887,2$  e  $r$  de  $-0,9910$ .

**Tabela 1** - Efeito de solutos sobre as constantes de dissociação ( $K_i$ ) dos complexos tripsina-íon benzamidínio em tampão tris-HCl a  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 8,0, com  $\text{CaCl}_2$  a  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  (\*)

Condição	$K_i$ ( $\times 10^6$ )		
	10 °C	20 °C	30 °C
Sem osmólito	$13,0 \pm 3,0$ (84)	$29,9 \pm 5,4$ (120)	$51,0 \pm 18,4$ (52)
Glicerol a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$	$52,9 \pm 32,0$ (64)	$115,0 \pm 21,7$ (164)	$200,4 \pm 24,9$ (64)
Sorbitol a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$	$58,6 \pm 13,3$ (64)	$116,7 \pm 30,2$ (136)	$194,7 \pm 18,0$ (60)
Sacarose a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$	$47,6 \pm 14,7$ (64)	$112,8 \pm 20,0$ (144)	$199,2 \pm 17,0$ (100)
Betaína a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$	$41,4 \pm 12,2$ (52)	$109,1 \pm 23,5$ (148)	$190,5 \pm 11,9$ (92)

\* Os números entre parênteses representam a quantidade de ensaios de velocidade envolvidos na determinação de cada valor de  $K_i$ .

**Tabela 2** - Variação de energia livre padrão de Gibbs para formação dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em tris-HCl a  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 8,0, com  $\text{CaCl}_2$  a  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  e sob  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura

Condição	$\Delta G^\circ$ (kcal/mol)
Sem osmólito	$-6,02 \pm 0,0607$
Glicerol a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$	$-5,21 \pm 0,0422$
Sorbitol a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$	$-5,22 \pm 0,0256$
Sacarose a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$	$-5,23 \pm 0,0600$
Betaína a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$	$-5,25 \pm 0,0866$

**Tabela 3** - Variação de entalpia padrão de Van't Hoff para formação dos complexos de tripsina bovina com o íon benzamidínio em tris-HCl a  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 8,0, com  $\text{CaCl}_2$  a  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$

Condição	$\Delta H^\circ$ (kcal/mol)
Sem osmólito	$-11,7 \pm 1,24$
Glicerol a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$	$-11,4 \pm 0,86$
Sorbitol a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$	$-10,3 \pm 0,52$
Sacarose a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$	$-12,3 \pm 1,22$
Betaína a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$	$-13,1 \pm 1,76$

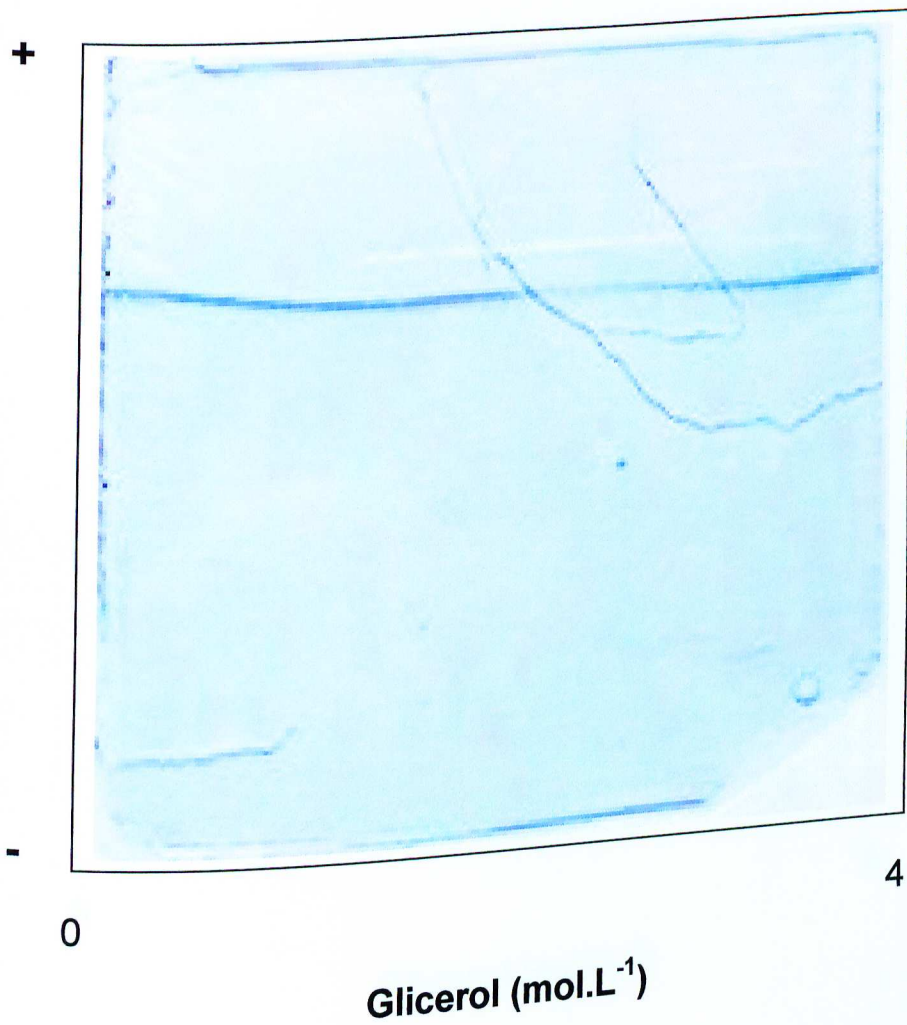


Figura 21 - Mobilidade eletroforética de tripsina bovina em gel de poliacrilamida com gradiente transversal de 0 a 4 mol.L<sup>-1</sup> de glicerol. O tampão de corrida foi tris-acetato a 0,05 mol.L<sup>-1</sup> pH 4,0. Uma amostra de 50  $\mu$ L de tripsina a 2 mg/mL foi aplicada como uma banda contínua no topo do gel. A corrida foi conduzida em direção ao cátodo e teve duração de 1 hora e 50 minutos na câmara fria.

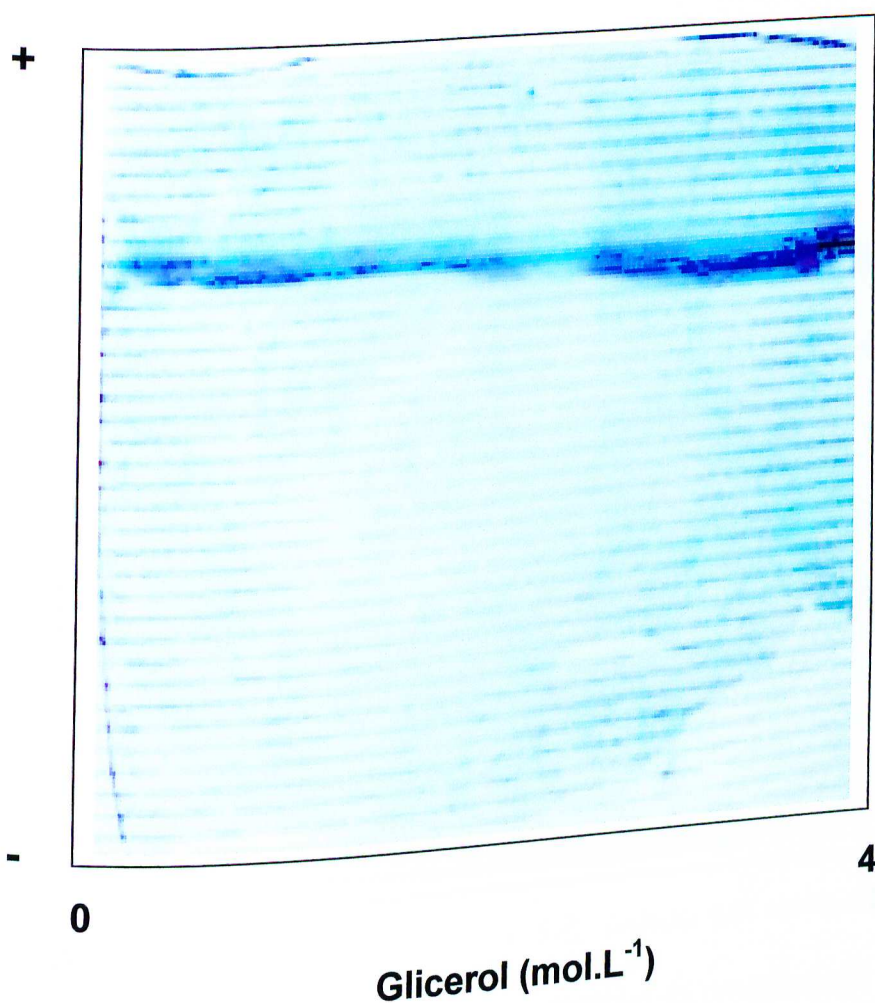
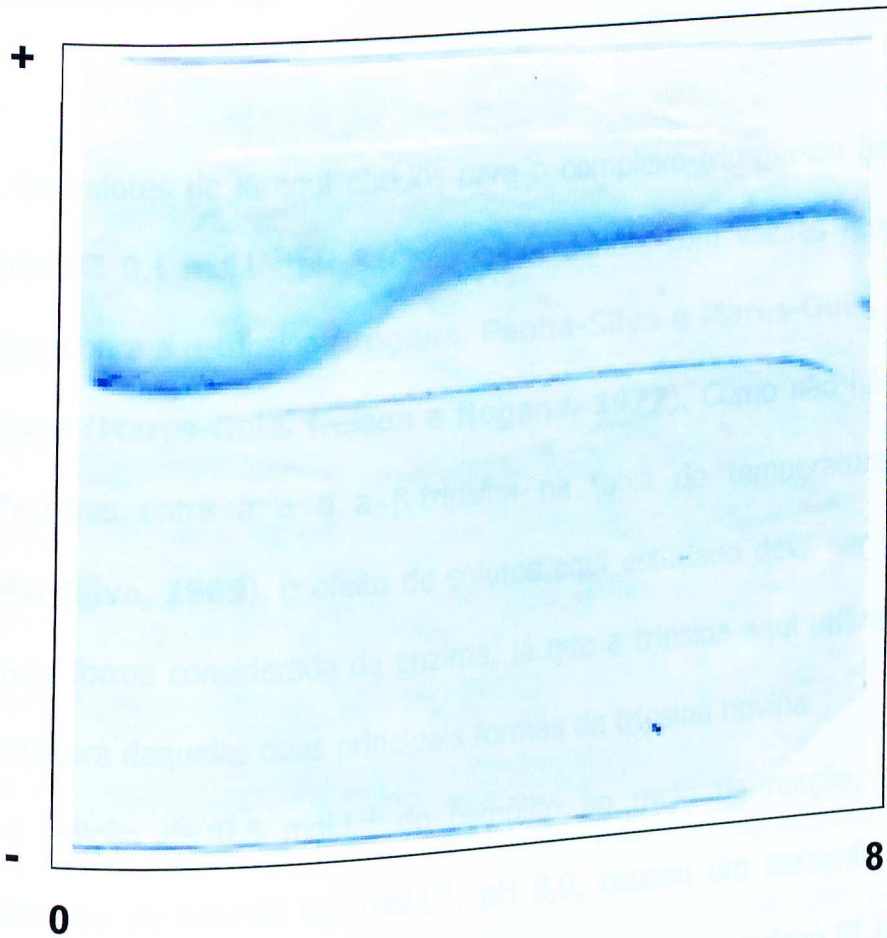


Figura 22 - Mobilidade eletroforética de tripsina bovina em gel de poliacrilamida com gradiente transversal de 0 a 4 mol.L<sup>-1</sup> de glicerol. O tampão de corrida foi  $\beta$ -alanina a 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 4,4. Uma amostra de 100  $\mu$ L de tripsina a 2 mg/mL foi aplicada como uma banda contínua no topo do gel. A corrida foi conduzida em direção ao cátodo e teve duração de 2 horas na câmara fria.





Uréia (mol.L<sup>-1</sup>)

Figura 23 - Mobilidade eletroforética de tripsina bovina em gel de poliacrilamida com gradiente transversal de 0 a 8 mol.L<sup>-1</sup> de uréia. O tampão de corrida foi  $\beta$ -alanina a 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 4,4. Uma amostra de 100  $\mu$ L de tripsina a 2 mg/mL foi aplicada como uma banda contínua no topo do gel. A corrida foi conduzida em direção ao cátodo e teve duração de 1 hora e 10 minutos na câmara fria.

## DISCUSSÃO

Os valores de  $K_i$  aqui obtidos para o complexo tripsina-íon benzamidínio em tris-HCl  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 8,0 são concordantes com valores reportados na literatura para a  $\alpha$ -tripsina (**Rogana, Penha-Silva e Mares-Guia, 1989**) e a  $\beta$ -tripsina (**Mares-Guia, Nelson e Rogana, 1977**). Como não há diferenças significativas entre a  $\alpha$  e a  $\beta$ -tripsina na faixa de temperatura estudada (**Penha-Silva, 1989**), o efeito de solutos aqui estudado deve ser válido para qualquer forma considerada da enzima, já que a tripsina aqui utilizada contém uma mistura daquelas duas principais formas da tripsina bovina.

A adição de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  do osmólito ao meio da reação, constituído basicamente de tris-HCl  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 8,0, causou um aumento médio de cerca de quatro vezes na constante de dissociação do complexo EI tanto a 10, 20 ou 30 °C (**tabela 1**). Isto significa que o osmólito piora a ação inibidora do íon benzamidínio. Assim, a utilização de osmólitos em preparações que necessitem de inibidores de enzimas proteolíticas da família do íon benzamidínio deve ser considerada com cautela. A própria temperatura também aumentou os valores das constantes de dissociação dos complexos EI (**tabela 1**). Este comportamento já é conhecido (**Hymes, Cuppett e Canady, 1969; Mares-Guia, Nelson e Rogana, 1977; Rogana, Penha-Silva e Mares-Guia, 1989**). O aumento da temperatura aumenta a energia vibracional de grupos da proteína, dificultando a formação ou a manutenção de ligações estabilizantes de sua estrutura terciária e a própria interação com ligantes.

O valor de  $\Delta G^\circ$  obtido para a formação do complexo de tripsina comercial Sigma com o inibidor na ausência de qualquer osmólito,  $-6,02$  kcal/mol, é bem parecido com o valor obtido para a mesma formação de complexo com a  $\alpha$ -tripsina bovina,  $-6,12$  kcal/mol (Rogana, Penha-Silva & Mares-Guia, 1989), ou com a  $\beta$ -tripsina bovina,  $-6,4$  kcal/mol (Mares-Guia, Nelson & Rogana, 1977). A  $25^\circ\text{C}$ , a presença de  $0,5\text{ mol.L}^{-1}$  de sacarose, sorbitol, glicerol, ou betaína, em tris-HCl  $0,1\text{ mol.L}^{-1}$  pH  $8,0$ , com  $2\text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ , alteraram a variação de energia livre padrão de Gibbs para a formação de complexos tripsina-íon benzamidínio de  $-6,02 \pm 0,061$  kcal/mol (na presença somente do tampão) para  $-5,21 \pm 0,042$ ,  $-5,22 \pm 0,026$ ,  $-5,23 \pm 0,060$  e  $-5,25 \pm 0,087$  kcal/mol, respectivamente. A natureza do soluto a  $0,5\text{ mol.L}^{-1}$  não afetou o valor de  $\Delta G^\circ$ , pois os valores individuais de  $\Delta G^\circ$  para o glicerol, sorbitol, sacarose e betaína não apresentam diferenças estatisticamente significativas. As diferenças existentes entre os valores de  $\Delta G^\circ$  para a formação do complexo na presença de cada soluto estão dentro dos valores dos desvios-padrões. Isto significa que a  $0,5\text{ mol.L}^{-1}$  de concentração estes solutos devem ter um mecanismo comum de ação. O valor médio de  $\Delta G^\circ$  para a formação dos complexos na presença de  $0,5\text{ mol.L}^{-1}$  de glicerol, sorbitol, sacarose e betaína foi de  $-5,23 \pm 0,017$  kcal/mol. Assim, o valor médio de  $\delta\Delta G^\circ$ , devido a contribuição dos solutos, foi de  $+0,79$  kcal/mol. Esta variação positiva no  $\Delta G^\circ$  de formação dos complexos indica que os solutos aumentaram a população relativa de enzima livre no equilíbrio  $\text{E} + \text{I} = \text{EI}$ . A constante de formação do complexo é a razão de duas constantes cinéticas,  $k_f$  e  $k_d$ , que

exprimem respectivamente as velocidades de formação e dissociação do complexo **EI**. O aumento relativo da fração **E** pode ser justificado tanto por uma diminuição de  $k_f$  quanto por um aumento de  $k_d$ . Qualquer uma destas alterações poderia ser produzida por mudança nas propriedades do solvente (Timasheff e Arakawa, 1989).

A **figura 24** mostra o íon benzamidínio ligado à fenda de especificidade do centro ativo da tripsina (Mares-Guia, Nelson e Rogana, 1977; Rogana, Penha-Silva e Mares-Guia, 1989). As interações envolvidas compreendem basicamente a formação de um par iônico entre o grupo amidínio do inibidor e o Asp177 da enzima e as ligações de **van der Waals** entre o anel benzênico do íon benzamidínio e cadeias laterais apolares de aminoácidos da fenda de especificidade da enzima (Bode e Schwager, 1975). A formação de pares iônicos poder ser perturbada por solutos que afetem a constante dielétrica, **D**, do meio. Um aumento em **D** reduz a força de atração (**F**) entre cargas opostas ( $q_1$  e  $q_2$ ), como pode ser visualizado na equação

$$F = \frac{q_1 q_2}{D r^2} \quad (22)$$

onde  $r^2$  é o quadrado da distância entre as duas cargas. De fato o glicerol, sorbitol, sacarose e betaína afetam a constante dielétrica do solvente. Além da constante dielétrica, outra propriedade do solvente que está sendo alterada deve ser a viscosidade do meio. Um aumento da viscosidade também poderia justificar uma diminuição da  $k_f$  em função da maior dificuldade de ligação do íon benzamidínio à tripsina. Se é a viscosidade a propriedade do solvente responsável pelo valor de  $\delta\Delta G^\circ$  positivo obtido na presença dos solutos, o valor

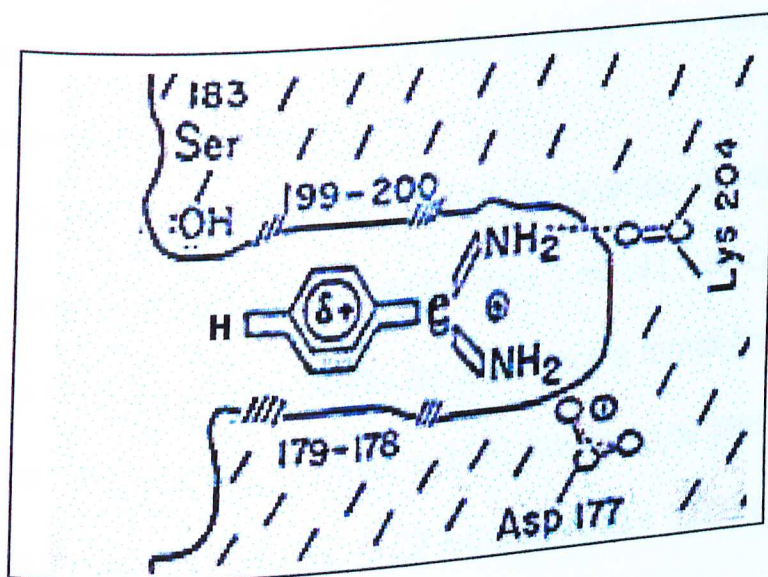
de  $\delta\Delta G^\circ$  deve ser afetado por diferentes concentrações do soluto. Determinações dos valores de  $\delta\Delta G^\circ$  na presença de concentrações variáveis de osmólitos já estão sendo conduzidas em nosso laboratório.

Os valores de  $\Delta H^\circ_{\text{vH}}$  do glicerol, sorbitol, sacarose e betaína a 0,5 mol.L<sup>-1</sup> não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si (**tabela 3**), uma vez que as diferenças entre os valores individuais estão dentro dos desvios padrões obtidos. O valor médio de  $\Delta H^\circ_{\text{vH}}$  foi de  $-11,8 \pm 1,20$  kcal/mol, valor este que também não apresentou diferença em relação ao valor de  $\Delta H^\circ_{\text{vH}}$  obtido na ausência dos osmólitos, que foi de  $-11,7 \pm 1,24$  kcal/mol. Esta invariabilidade no valor de  $\Delta H^\circ_{\text{vH}}$  não é um fato ímpar na literatura. O  $\Delta H^\circ_{\text{cal}}$  obtido para a transição de desenovelamento da ribonuclease A também não foi afetado nem pela natureza nem pela concentração de um grupo de osmólitos que compreendia a betaína, a dimetilglicina, a sarcosina, e a glicina, embora os valores de  $T_m$  tenham sido diretamente proporcionais à concentração do osmólito (**Santoro et al., 1992**).

O mecanismo de ação de concentrações elevadas de glicerol, e provavelmente de outros solutos compatíveis, sobre a tripsina não envolve alterações conformacionais significativas da proteína, uma vez que nenhuma perturbação na migração eletroforética foi observada nos limites de 0 a 4 mol.L<sup>-1</sup> de concentração presentes nos géis com gradiente de glicerol (**figuras 21 e 22**). A corrida eletroforética é reproduzível e independe se o tampão utilizado é tris-acetato ou  $\beta$ -alanina. Qualquer alteração significativa na estrutura deveria

perturbar a mobilidade eletroforética (**Goldenberg, 1989**). É visível o grau de perturbação que um soluto caotrópico, como a uréia, produz na migração eletroforética da tripsina bovina, como pode ser visto na **figura 23**, onde a banda inferior contém a proteína no estado enovelado e a banda superior contém a proteína no estado desenovelado, numa transição cooperativa, dada a natureza sigmoide da curva (**Goldenberg, 1989; Pace, Shirley e Thomson, 1989**).

Em suma, sob um ponto de vista termodinâmico, os osmólitos aqui estudados, a  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de concentração, promovem um acréscimo positivo no valor de  $\Delta G^\circ$  sem afetar o valor de  $\Delta H^\circ_{\text{cal}}$  para a formação dos complexos de tripsina com o íon benzamidínio. Este comportamento, junto com a ausência de perturbação na migração eletroforética da tripsina pelo glicerol, concordam com a idéia de que os osmólitos têm um mecanismo de ação baseado na mudança das propriedades do solvente. A possibilidade da alteração da viscosidade ser um fator importante no equilíbrio  $E + I = EI$  está em estudo neste laboratório.



**Figura 24** - Íon benzimidínio dentro da fenda de especificidade do centro ativo da tripsina, formando um par iônico com o resíduo de Asp177, uma ligação de hidrogênio com o oxigênio carbonílico da Lys204 e ligações de **van der Waals** com aminoácidos das paredes laterais da fenda.

## CONCLUSÕES

A presença de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de glicerol, sorbitol, sacarose ou betaína produziu um aumento médio de 3,8 vezes na constante de dissociação do complexo EI considerado, piorando a ação inibidora do íon benzamidínio sobre a tripsina bovina.

A  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , a presença of  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de sacarose, sorbitol, glicerol, ou betaína, em tris-HCl  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 8,0, com  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ , alteraram a variação de energia livre padrão de Gibbs para a formação de complexos tripsina-íon benzamidínio de  $-6,02 \pm 0,061 \text{ kcal/mol}$  (na presença somente do tampão) para  $-5,21 \pm 0,042$ ,  $-5,22 \pm 0,026$ ,  $-5,23 \pm 0,060$  e  $-5,25 \pm 0,087 \text{ kcal/mol}$ , respectivamente.

A natureza do soluto a  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  não afetou o valor de  $\Delta G^\circ$ , pois os valores individuais de  $\Delta G^\circ$  para o glicerol, sorbitol, sacarose e betaína não apresentam diferenças estatisticamente significantes, o que significa que estes solutos têm um mecanismo comum de ação.

O valor médio de  $\Delta G^\circ$  para a formação dos complexos na presença de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de glicerol, sorbitol, sacarose e betaína foi de  $-5,23 \pm 0,017 \text{ kcal/mol}$ .

O valor médio de  $\delta\Delta G^\circ$ , devido à contribuição dos solutos, foi de  $+0,79 \text{ kcal/mol}$ , o que significa que eles aumentaram a população relativa de enzima livre no equilíbrio  $E + I = EI$ .



A  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ , glicerol, sorbitol, sacarose e betaína produziram variações de entalpia padrão de van't Hoff de  $-11,4 \pm 0,86$ ,  $-10,3 \pm 0,52$ ,  $-12,3 \pm 1,22$ , e  $-13,1 \pm 1,76 \text{ kcal/mol}$ , respectivamente.

A  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de concentração, os valores de  $\Delta H^{\circ}_{\text{vH}}$  do glicerol, sorbitol, sacarose e betaína não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si, com um valor médio de  $\Delta H^{\circ}_{\text{vH}}$  de  $-11,8 \pm 1,20 \text{ kcal/mol}$ .

O valor médio de  $\Delta H^{\circ}_{\text{vH}}$  produzido pelos solutos também não apresentou diferença em relação ao valor de  $\Delta H^{\circ}_{\text{vH}}$  obtido na ausência dos osmólitos, que foi de  $-11,7 \pm 1,24 \text{ kcal/mol}$ .

O mecanismo de ação de altas concentrações do glicerol sobre a tripsina não envolve alterações conformacionais significativas da proteína, uma vez que nenhuma perturbação na migração eletroforética foi observada nos géis com gradiente de glicerol.

A natureza invariável do  $\delta\Delta G^{\circ}$  e a ausência de perturbação do  $\Delta H^{\circ}_{\text{vH}}$  para a formação do complexo de tripsina com o íon benzamidínio, junto com a falta de perturbação na migração eletroforética da tripsina por osmólitos, concordam com a idéia de que estes solutos têm um mecanismo de ação baseado na mudança das propriedades do solvente.

## SUMMARY

Sucrose, sorbitol, glycerol, and betaine are stabilizing solutes called in the literature as osmolytes. In this work, we investigated the action of such solutes on the standard free energy and van't Hoff enthalpy changes of association between bovine trypsin and the benzamidinium ion. Free energies of association were determined from the dissociation constants of trypsin-benzamidinium ion complex ( $K_i$ ) under different solvent compositions. The van't Hoff enthalpy changes were determined from the dependence of  $\ln K_i$  with  $1/T$  at 10, 20 and 30 °C. Dissociation constants were determined according to a classical method in the literature, by using Benzoyl-D,L-Arginine-p-Nitroanilide as substrate in two or three different concentrations and six or fourteen different inhibitor concentrations. Osmolytes were incorporated in each solution used in experiments in a 0.5 mol.L<sup>-1</sup> concentration. Experimental points obtained by plotting the reciprocal of enzyme activity against the inhibitor concentration were fitted by linear regression. We determined each dissociation constant from the abscissa value corresponding to the interception points of the regression lines. At 25 °C, the presence of 0.5 mol.L<sup>-1</sup> of sucrose, sorbitol, glycerol, or betaine, changed the standard free energy of association between bovine trypsin and benzamidinium ion from  $-6.02 \pm 0.061$  kcal/mol to  $-5.21 \pm 0.042$ ,  $-5.22 \pm 0.026$ ,  $-5.23 \pm 0.060$ , and  $-5.25 \pm 0.087$  kcal/mol, respectively. All

considered osmolytes produced a mean increase in the free energy of association between bovine trypsin and benzamidinium ion of 0.79 kcal/mol, what means that glycerol, sorbitol, sucrose, and betaine increased the relative population of the free enzyme in the  $\mathbf{E + I = EI}$  equilibrium. Glycerol, sorbitol, sucrose, and betaine produced standard van't Hoff enthalpy changes of  $-11.4 \pm 0.86$ ,  $-10.3 \pm 0.52$ ,  $-12.3 \pm 1.22$ , and  $-13.1 \pm 1.76$  kcal/mol, respectively. Those values don't differ significantly from the  $\Delta H^\circ$  value of  $-11.7 \pm 1.24$  kcal/mol obtained in the absence of the osmolytes. The action of glycerol on trypsin was also investigated by polyacrylamide gel electrophoresis in which was incorporated a transverse gradient with 0 to 4 mol.L<sup>-1</sup> of the osmolyte. To counteract the density effect of the osmolyte on the protein migration, we made the acrylamide concentration in the gel vary from 11 to 8%. Trypsin was applied as a single band to the top of the gel. No perturbation on protein mobility was verified for glycerol between the considered limits of concentration. These results agree with the idea that all these compounds, independently with their structure, act in the same manner by changing the solvent properties.

# Bibliografia

- Arakawa, T, & Timasheff, SN. (1983) Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. **Arch. Biochem. Biophys.** **224**:169-177.
- Arakawa, T, & Timasheff, SN. (1985) the stabilization of proteins by osmolytes. **Biophys. J.** **47**:411-414.
- Bagnasco, S, Balaban, R, Fales, HM, Yang, Y, & Burg, M. (1986) Identification of intracellular organic osmolytes in renal inner medulla. **J. Biol. Chem.** **261**, 5872-5877.
- Bode, W, & Schwager, P. (1975) The refined crystal structure of bovine  $\beta$ -trypsin at 1.8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0. **J. Mol. Biol.** **98**: 693-717.
- Borowitzka, LJ, & Brown, AD (1974) The salt relations of marine and halophilic species of the intracellular green alga *Dunaliella*: the role of glycerol as a compatible solute. **Arch. Microbiol.** **96**, 37-52.
- Bowlus, RD, & Somero, GN (1979) Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. **J. Exp. Zool.** **208**, 137.
- Creighton, TE (1979) Electrophoretic analysis of the unfolding of proteins by urea. **J. Mol. Biol.** **129**, 235-264.

- Creighton, TE (1980) Kinetic study of protein unfolding and refolding using urea gradient electrophoresis. **J. Mol. Biol.** **137**, 61-80.
- Dixon, M. (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. **Biochem. J.** **55**: 170-171.
- Erlanger, BF, Kokowsky, N, & Cohen, W. (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Arch. Biochem. Biophys.** **95**, 271-278.
- Fonseca, AM, Souza-Penha, MA, & Penha-Silva, N. (1997) Efeito de glicerol, sorbitol, sacarose e glicina sobre a mobilidade eletroforética de tripsina bovina em géis de poliacrilamida com gradientes transversos do soluto. **Anais do Encontro de Iniciação Científica 6**: 141. Goiânia, GO.
- Garcia-Perez, A, & Burg, MB (1990) Importance of organic osmolytes for osmoregulation by renal medullary cells. **Hypertension** **16**, 595-602.
- Goldenberg, DP. (1989) Analysis of protein structure by gel electrophoresis.. In: **Protein Structure: A Practical Approach** (Creighton, TE, ed.) pp 225-250, IRL Press, Oxford.
- Hymes, AJ, Cuppett, CC, & Canady, WJ. (1969) Thermodynamics of  $\alpha$ -chymotrypsin-inhibitor complex formation. Effects of structural modification of the inhibitor. **J. Biol. Chem.** **244**: 637-643.
- Lien, YH, Pacelli, MM, & Braun, EJ (1993) Characterization of organic osmolytes in avian renal medulla: a nonurea osmotic gradient system. **Am. J. Physiol.** **264**, R1045-R1049.

- Lineweaver, H, & Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. **J. Am. Chem. Soc.** **56**: 658-666.
- Liu, Y, & Bolen, DW. (1995) The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolites. **Biochemistry** **34**: 12884-12891.
- Mares-Guia, M, Nelson, DL, & Rogana, E. (1977) Electronic effects in the interaction of para-substituted benzamidines with trypsin: the involvement of the  $\pi$ -electronic density at central atom of the substituent in binding. **J. Am. Chem. Soc.** **99**: 2331-2336.
- Michaelis, L, & Menten, ML (1913) **Biochem. Z.** **49**: 333-369.
- Moisés, ECD, Fonseca, AM, Souza-Penha, MA, & Penha-Silva, N. (1997) Effect of solute on protein conformation in glycerol, sorbitol, and sucrose gradient gel electrophoresis. **Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular XXVI**: 129. Caxambu, MG.
- Murray, RK Granner, DK, Mayes, PA, & Rodwell, VW. **Harper's Biochemistry**. 24rd. ed. New Jersey, Prentice-Hall, 1996. 806 pp.
- Nikolopoulos, D, & Manetas, Y. (1991) Compatible solutes and *in vitro* stability of *Salsola soda* enzymes: proline incompatibility. **Phytochemistry** **30**, 411-413.
- Pace, CN, Shirley, A, & Thomson, JA. (1989) Measuring the conformational stability of a protein. In: **Protein Structure: A Practical Approach** (Creighton, TE, ed.) pp 311-329, IRL Press, Oxford.

- Panek, AD. (1996) Trehalose metabolism - new horizons in technological applications. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **28**: 169-181.
- Penha-Silva, N. (1989) **O efeito de substituintes sobre a formação de complexos entre  $\alpha$ -tripsina bovina e *para*-derivados do íon benzamidínio: um estudo termodinâmico.** Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, tese de doutorado, 99 pp.
- Peterson, DP, Murphy, KM, Ursino, R, Streeter, K, & Yancey, PH. (1992) **Am. J. Physiol.** **263**, F594-F600.
- Pollard, A, & Wyn-Jones, RG. (1979) Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. **Planta Berl.** **144**, 291-298.
- Rhodes, D. (1987) Metabolic responses to stress. In: **The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise** (Davies, DD, ed.) 201-241, Academic Press, New York.
- Rogana, E, Penha-Silva, N, & Mares-Guia, M. (1989) The substituent effect on complex formation between  $\alpha$ -trypsin and *para*-substituted benzamidinium ions: a thermodynamic study. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **22**: 1177-1190.
- Santoro, MM, Liu, Y, Khan, SMA, Hou, L-X, & Bolen, DW. Increased thermal stability in the presence of naturally occurring osmolytes. (1992) **Biochemistry** **31**, 5278-5283.
- Somero, GN (1986-a) From dogfish to dog: trimethylamines protect proteins from urea. **News Physiol. Sci.** **1**, 9-12.

- Somero, GN (1986-b) Intracellular pH, buffering substances, and proteins: imidazole protonation and the conservation of protein structure and function. In: **Transport Processes, Iono- and Osmoregulation** (Gilles, R.; & Gilles-Baillien, M., Ed.) pp 454-468, Springer-Verlag, New York.
- Somero, GN. (1986-c) Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function. **Am J. Physiol.** **251**: R197-R213.
- Souza-Penha, MA, & Penha-Silva, N (1998) Effects of sucrose, sorbitol, and glycerol on the free energy of association between bovine trypsin and the benzamidinium ion. **Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular XXVII**: 136. Caxambu, MG.
- Storey, KB, Mosser, DD, Douglas, DN, Grundy, JE, & Storey, JM. (1996) Biochemistry below 0 °C: nature's frozen vertebrates. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **29**: 283-307.
- Taylor, LS, York, P, Williams, AC, Edwards, HGM, Mehta, V, Jackson, GS, Badcoe, IG, & Clarke, AR. (1995) Sucrose reduces the efficiency of protein denaturation by a chaotropic agent. **Biochem. Biophys. Acta** **1253**: 39-46.
- Timasheff, SN, & Arakawa, T. (1989) Stabilization of protein structure by solvents. In: **Protein Structure: A Practical Approach** (Creighton, TE, ed.) pp 331-345, IRL Press, Oxford.



- Trowbridge, CG, Krehbiel, A, & Laskowski, M, Jr. (1963) Substrate activation of trypsin. **Biochemistry** **2**, 843-850.
- Villanueva, GB, & Herskovits, TT. (1971) Changes in the exposure of tyrosyl and tryptophyl residues in trypsin due to diisopropylphosphoryl and benzamidine inhibition. **Biochemistry** **10**, 4589-4594.
- Wang, A, Robertson, AD, & Bolen, DW. (1995) Effects of naturally occurring osmolytes on the internal dynamics of ribonuclease A. **Biochemistry** **34**: 15096-15104.
- Yancey, PH. (1985) Organic osmotic effectors in cartilaginous fishes. In: **Transport Processes, Iono- and Osmoregulation** (Gilles, R.; & Gilles-Baillien, M., Ed.) pp 424-436, Springer-Verlag, New York.
- Yancey, PH, & Burg, MB. (1990) Counteracting effects of urea and betaine in mammalian cells in culture. **Am. J. Physiol.** **258**, R198-204.
- Yancey, PH, Clark, ME, Hand, SC, Bowlus, RD, & Somero, GN. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science** **217**, 1214-1222.

# Curriculum vitae

Nome:	Márcia Aguiar de Souza Penha
Data de nascimento:	03/09/1954
Naturalidade:	Juiz de Fora, MG
Nacionalidade:	Brasileira
Filiação:	Loester de Souza e Francisca Aguiar de Souza
Cédula de identidade:	MG-289.739
CPF:	261.964.766/53
Título de eleitor:	796.747.902/81, zona 279, seção 20
Graduação universitária:	Farmácia e Bioquímica, pela Universidade Federal de Juiz de Fora, em 1977
Pós-Graduação:	Especialização em Bioquímica pela Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte, MG, em 1984.
Proficiência em inglês:	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Curso básico em inglês pela Sociedade Brasileira de Cultura Inglesa de Juiz de Fora, em 1977.</li> <li>■ Speaking and listening in English as a second language, fall 1992, at the Southern Illinois University, Division of continuing education, in Carbondale, IL, USA.</li> <li>■ Curso avançado em inglês pelo CCAA de Uberlândia, MG, em 1996.</li> </ul>
Produção científica:	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Fonseca, AM; Penha-Silva, N; Souza-Penha, MA; Ferreira, TAA; Brito, AG (1995) Quantificação de glicose pelo método do ácido pícrico. <b>Anais do Encontro de Iniciação Científica IV</b>: 102. Campo Grande, MS.</li> <li>■ Fonseca, AM; Souza-Penha, MA; Penha-Silva, N. (1997) Efeito de glicerol, sorbitol, sacarose e glicina sobre a mobilidade eletroforética de tripsina bovina em géis de poliacrilamida com gradientes transversos do soluto. <b>Anais do Encontro de Iniciação Científica 6</b>: 141. Goiânia, GO.</li> <li>■ Moisés, ECD; Fonseca, AM; Souza-Penha, MA; Penha-Silva, N. (1997) Effect of solute on protein conformation in glycerol, sorbitol, and sucrose gradient gel electrophoresis. <b>Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular XXVI</b>: 129. Caxambu, MG.</li> <li>■ Souza-Penha, MA; Penha-Silva, N (1998) Effects of sucrose, sorbitol, and glycerol on the free energy of association between bovine trypsin and the benzamidine ion. <b>Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular XXVII</b>: 136. Caxambu, MG.</li> </ul>
Atividades profissionais:	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Estagiária do Centro de Processamento de Dados da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, em 1976.</li> <li>■ Estagiária do Laboratório Central da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, em 1977.</li> <li>■ Farmacêutica-bioquímica do Laboratório de Análises Clínicas do Instituto de Hematologia do Centro Médico Especializado de Juiz de Fora, MG, em 1978.</li> <li>■ Estagiária do Laboratório de Análises Clínicas do Pronto Socorro Infantil Prontil Vieira Neto, em Juiz de Fora, MG, em 1978.</li> <li>■ Supervisora do controle de qualidade de matéria-prima na BIOTEST AS, em São Paulo, SP, de 1978 a 1979.</li> <li>■ Farmacêutica-Bioquímica do Laboratório de Análises Clínicas e do Banco de Sangue da Casa de Saúde e Maternidade Dr. Pedro Sanches, em Poços de Caldas, MG, de 1979 a 1980.</li> <li>■ Estagiária do Laboratório de Genética Molecular do Prof. Dr. Sebastião Baeta Henriques, na Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte, MG, de 1982 a 1983.</li> <li>■ Farmacêutica responsável pela Drogaudi, em Uberlândia, MG, de 1984 a 1991.</li> <li>■ Farmacêutica responsável pela Drogaria Mello e Martins, em Uberlândia, MG, de 1993 a 1994.</li> <li>■ Professora de Genética dos cursos de Educação Física, Enfermagem, Farmácia e Bioquímica, e Fisioterapia, do Centro Universitário do Triângulo, UNIT, a partir de fevereiro de 1998.</li> </ul>