

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Eloi A. Silva Filho e aprovado pela comissão julgadora no dia 28/04/95.

Meipe



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Cidade Universitária, Zeferino Vaz

Distrito de Barão Geraldo, Caixa Postal 6154

CEP 13083-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

**ESTUDO TERMODINÂMICO DA INTERAÇÃO DE TENSOATIVOS
IÔNICOS COM TRIPSINA**

Eloi Alves da Silva Filho

TESE DE DOUTORADO

Orientador: Prof. Dr. Pedro L. O. Volpe

1995



Uma.000070672.6

IP

2483f
483/95

b x
R8 1100
08/06/95

Silva Filho, Eloi Alves da

Estado termodinamico de inteira
uso de sensoativos ionicos com
tripsina
T/UNICAMP/SIGBa
DEVOLVER NOME LEIT. (24837/95)

COMISSÃO JULGADORA

PRESIDENTE

Prof. Dr. Pedro L. O. Volpe (IQ - UNICAMP)

MEMBROS

Prof^a. Dra. Ines Joekes (IQ - UNICAMP)

Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine (IQ - UNICAMP)

Prof^a. Dra. Maria da Graça Nascimento (DQ - UFSC)

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama (IB - UNICAMP)

SUPLENTES

Prof. Dr. Aécio P. Chagas (IQ - UNICAMP)

Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto (IQ - UNICAMP)

“O bom senso é o que há de mais bem distribuído no mundo pois cada um pensa estar bem provido dele.”

René Descarte (Filósofo e matemático Francês, 1596-1650)

“O aspecto mais triste da vida de hoje é que a Ciência ganha um conhecimento mais rapidamente que a sociedade em sabedoria.”

Isaac Asimov (Cientista Russo)

**Aos meus pais,
Maria de Jesus S. Silva
Eloi A. Silva (in memoriam)
a Nati
Dedico**

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a UFES pela liberação por dois anos para concluir os estudos de pós-graduação no IQ-UNICAMP;

Agradeço ao amigo Prof. Dr. Pedro L. O. Volpe pela orientação, experiência, assim como a ajuda e incentivo nos momentos mais difíceis do desenvolvimento deste trabalho;

Ao Instituto de Química pela oportunidade;

Aos colegas do laboratório de Biotermodinâmica (Amélia, Sílvia, Alexandre, Carmelita, Carmem, Lígia, Watson, Tonegutti, Marcio, Rodolpho e Mauro) e do laboratório de Organometálicos pela amizade;

Aos funcionários do IQ-UNICAMP pela colaboração;

Ao Prof. Dr. Milton K. Morigaki (DQ/UFES) e família pela amizade e ajuda das tarefas burocráticas;

Aos professores e funcionários do Departamento de Química da UFES pela amizade;

Ao Prof. Dr. Afonso Gonçalves (in memoriam), DQ/UFPI pelo incentivo e apoio sobre a realização e continuação de meus estudos de pós-graduação;

Ao Prof. Dr. Gilson H. M. Dias (IQ-UNICAMP) pela ajuda na impressão colorida;

A Prof^a Dra. Suzana P. Nunes (IQ-UNICAMP) pelas sugestões na montagem das celas de diálise;

Ao Prof. Mauro Granjeiro (BIOQ. USP/BAURU) pelas sugestões na apresentação da tese;

Ao Prof. Dr. Fred Y. Fujiwara pelas sugestões da síntese dos n-alkilsulfato de sódio;

Ao amigo Zuca (IQ-UNICAMP) pela ajuda na impressão laser;

A família Sá (Sr. Gerson, D. Rosa, Aline, Nativa, Fátima, Tiago, Neuza, Nica, Airton, Creuza, Fernando Lucia, João, Célio e Joana) pela amizade.

ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE TABELAS.....	iv
NOMENCLATURA ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii

PARTE I

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 HISTÓRICO.....	2
1.2 TENSOATIVOS.....	10
1.3 PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS.....	13
1.4 ESTABILIDADE CONFORMACIONAL DAS PROTEÍNAS.....	16
1.4.1 INTERAÇÕES ELETROSTÁTICAS.....	17
1.4.2 FORÇAS DE VAN DER WAALS.....	18
1.4.3 PONTES DE HIDROGÊNIO.....	18
1.4.4 INTERAÇÕES HIDROFÓBICAS.....	20
1.4.5 LIGAÇÕES DISSULFETO.....	21
1.5 ESTRUTURA MOLECULAR DA TRIPSINA.....	22
1.6 A INTERAÇÃO PROTEÍNA-LIGANTE.....	26
1.7 MODELOS TEÓRICOS USADOS NO ESTUDO DA INTERAÇÃO PROTEÍNA-TENSOATIVO.....	28
1.8 EQUILÍBRIO DE DIÁLISE.....	33
1.9 APLICAÇÕES DA CALORIMETRIA NO ESTUDO DE SISTEMAS DE NATUREZA BIOLÓGICA.....	34
OBJETIVOS.....	36

PARTE II

2. EXPERIMENTAL	37
2.1 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	37
2.2 EQUIPAMENTOS.....	40
2.3 SÍNTESE DOS TENSOATIVOS OCTILSULFATO DE SÓDIO E E TETRADECILSULFATO DE SÓDIO.....	41
2.4 MÉTODOS EXPERIMENTAIS.....	42
2.4.1 UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DO EQUILÍBRIO DE DIÁLISE.....	42
2.4.2 MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO DE TENSOATIVO IÔNICO LIVRE EM SOLUÇÃO.....	44
2.4.3 TITULAÇÃO MICROCALORIMÉTRICA.....	47

PARTE III

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1 VARIAÇÃO DA ENERGIA LIVRE DE INTERAÇÃO TRIPSINA-TENSOATIVO.....	53
3.2 VARIAÇÃO DA ENTALPIA DE INTERAÇÃO TRIPSINA-TENSOATIVO.....	66
3.3 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE SÍTIOS DA INTERAÇÃO PROTEÍNA-TENSOATIVO.....	78
CONCLUSÕES	83

APÊNDICES

ÍNDICE DE FÍGURAS

PARTE I

N ^o	Página
1.2	Representação esquemática da Micela.....12
1.3	Aminoácidos fundamentais.....14
1.4	Forças envolvidas na estrutura molecular das proteínas.....17
1.4.3	Equilíbrio entre N-dimetilacetamida e seu dímero por ponte de hidrogênio.....19
1.5.1	Estrutura primária da Tripsina bovina.....24
1.5.2	Estrutura tridimensional da Tripsina com seu sítio ativo.....25
1.6.1	Representação esquemática da interação Proteína-Ligante.....26
1.6.2	Esquema representativo das formas das isotermas de interação Proteína-Ligante.....28

PARTE II

2.4.1	Cela de diálise.....42
2.4.2	Curva de calibração para soluções DSS no pH 3,5, força iônica 10 mM usando azul de metileno como corante a 298 K.....46
2.4.3.1	Unidade microcalorimétrica (1), e cela de reação (2).....48
2.4.3.2	Parte do entalpograma de titulação da reação do Tris 1mM com HCl 10 mM a 298 K.....49
2.4.3.3	Titulação microcalorimétrica do Tris 1 mM com HCl 10 mM a 298 K.....50
2.4.3.4	Representação esquemática da curva de calibração elétrica estática.....52

PARTE III

3.1	Isoterma de interação (a) Tripsina-OSS (C ₈), (b) Tripsina-DSS (C ₁₀) nos pH's 3,5; 7,0 e 9,0 a 298 K.....56
3.1	Isoterma de interação (c) Tripsina-SDS (C ₁₂), (d) Tripsina-TDSS (C ₁₄) nos pH's 3,5; 7,0 e 9,0 a 298 K.....57
3.1	Isoterma de interação (e) Tripsina-CPC, (f) Tripsina-DTAB nos pH's 3,5; 7,0 e 9,0 a 298 K.....58
3.2.1	Titulação microcalorimétrica do OSS com Tripsina nos pH's 3,5; 7,0 e 9,0 a 298 K.....68
3.2.2	Varição da Entalpia de interação da série homóloga dos n-alkilsulfato de sódio com Tripsina no pH 3,5 a 298 K.....70

3.2.3 Partes do entalpograma da titulação microcalorimétrica Tripsina-Tensoativo em pH 3,5, força iônica 10 mM a 298 K.....	72
3.2.4 Variação da Entalpia de interação da série homóloga dos n-alquilsulfato de sódio com Tripsina no pH 7,0 a 298 K.....	74
3.2.5 Partes do entalpograma da titulação microcalorimétrica Tripsina-Tensoativo em tampão fosfato pH 7,0, força iônica 10 mM a 298 K.....	75
3.2.6 Variação da Entalpia de interação da série homóloga dos n-alquilsulfato de sódio com Tripsina no pH 9,0 a 298 K.....	76
3.2.7 Partes do entalpograma da titulação microcalorimétrica Tripsina-Tensoativo em tampão bórax pH 9,0, força iônica 10 mM a 298 K.....	77
3.3 Distribuição livre dos valores residuais da interação Tripsina-CPC.....	81

ÍNDICE DE TABELAS

PARTE I

Nº

Página

1.4.3 Exemplos de pontes de hidrogênio que podem ser formados por resíduos de aminoácidos polares.....	19
1.5 Aminoácidos hidrofóbicos da Tripsina.....	23
1.8.1 Técnicas físicas aplicadas ao estudo da interação Proteína-Tensoativo.....	33

PARTE II

2.4.1 CMC das soluções de tensoativos a 298 K nos pH's 3,5; 7,0 e 9,0 obtidos pelo método espectrofotométrico a 298 K.....	44
2.4.2 Dados de calibração para determinar a concentração de tensoativo iônico livre em solução pH 3,5 a 298 K.....	46
2.4.3 Titulação do Tris 1,0 mM com HCl 10,0 mM a 298 K.....	50

PARTE III

3.1 Valores da variação da energia livre de interação Tripsina-Tensoativo nos pH's 3,5; 7,0 e 9,0 a 298 K.....	64
3.2.1 Resultados da titulação microcalorimétrica Tripsina-OSS em pH 3,5; 7,0 e 9,0 a 298 K.....	67
3.2.2 Valores da variação da entalpia de interação Tripsina-Tensoativo em pH 3,5; 7,0 e 9,0 a 298 K.....	69
3.3.1 Representação gráfica dos parâmetros da equação de Scatchard.....	78
3.3.2 Estimativa dos sítios de interação Tripsina-Tensoativo.....	82

NOMENCLATURA, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EC 3.1.1.3 : Lipase pancreática
 EC 3.4.21.1 : Quimiotripsina
 EC 3.4.21.4 : Tripsina
 EC 3.4.21.11: Elastase

A classificação das enzimas acima refere-se a nomenclatura recomendada pela *International Union of Biochemistry on Nomenclature and Classification of Enzymes* (Handbook of Biochemistry, CRC Press, 1989). Exemplificando para as enzimas Lipase e Tripsina torna-se mais claro o significado desta nomenclatura.

EC	3.	1.	1.	3
↑	↑	↑	↑	↑
Enzyme Commission.	Classe das Hidrolases.	Subclasse das Hidrolases, denominada de Esterease.	Sub-Subclasse das Hidrolases, denominada <i>Carboxylic Ester Hydrolase</i> .	Refere-se ao número da enzima na Subclasse.

EC	3.	4.	21.	4
↑	↑	↑	↑	↑
Enzyme Commission.	Classe das Hidrolases.	Subclasse das Hidrolases, denominada de Serina proteinase.	Sub-Subclasse das Hidrolases, denominada <i>Peptide Hydrolase</i> .	Refere-se ao número da enzima na Subclasse.

- [S]_{total} : Concentração molar total de tensoativo.
 [S]_{livre} : Concentração de tensoativo livre.
 Aerosol OT : bis 2-etil sulfosuccinato de sódio, é um tensoativo aniônico.
 R' : Cadeia carbônica.
 Grupo R : Parte polar ou apolar da molécula de aminoácido.
 v : Número médio de moléculas de tensoativo por molécula de proteína.
 CMC : Concentração Micelar Crítica.
 SDS : Dodcilsulfato de sódio.
 OSS : Octilsulfato de sódio.
 DSS : Decilsulfato de sódio.
 TDSS : Tetradecilsulfato de sódio.
 DTAB : Brometo de dodeciltrimetilamônio.
 CPC : Cloreto de hexadecilpiridínio.
 DOC : Desoxicolato.
 TDAC : Cloreto de tetradeciltrimetilamônio.

RESUMO

Título: “Estudo termodinâmico da interação de tensoativos iônicos com Tripsina”

Autor: Eloi A. Silva Filho

Orientador: Prof. Dr. Pedro L. O. Volpe

Palavra chave: tensoativos, proteína, microcalorimetria.

Um estudo sistemático da interação de tensoativos iônicos com Tripsina em solução tampão pH 3,5, 7,0 e 9,0 com força iônica 10 mM a 25 °C foi feito utilizando as técnicas do equilíbrio de diálise e titulação microcalorimétrica. Neste estudo foi utilizado soluções de tensoativos aniônicos da série dos n-alkilsulfato de sódio (C₈, C₁₀, C₁₂ e C₁₄) e alguns tensoativos catiônicos como o cloreto de hexadecilpiridínio (CPC) e brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB).

As isotermas de interação obtidas utilizando a técnica do equilíbrio de diálise foram tratadas de acordo com o modelo teórico de Wyman que permitiu calcular os valores da variação da energia livre de interação Tripsina-Tensoativo (ΔG_V^0). Os resultados mostraram que o valor de ΔG_V^0 foi na faixa de - 0,1 a - 9,0 kJ.mol⁻¹ para os tensoativos n-alkilsulfato. Para os tensoativos CPC e DTAB observamos que ΔG_V^0 foi na faixa de - 0,1 a - 11,0 kJ.mol⁻¹.

A variação da entalpia de interação ($\Delta_{int}H^0$) obtida por titulação microcalorimétrica mostrou que a interação dos tensoativos n-alkilsulfato de sódio (C₈, C₁₀, C₁₂ e C₁₄) com Tripsina no pH 3,5 é um processo endotérmico com o valor de $\Delta_{int}H^0$ diminuindo linearmente com o aumento da cadeia carbônica do tensoativo. No pH 7,0 observamos a mesma tendência com exceção do C₁₄. No pH 9,0 a partir do C₁₀ a entalpia de interação não variou com o aumento da hidrofobicidade do tensoativo. Para os tensoativos catiônicos observamos um processo de interação praticamente atérmico para o DTAB e para o CPC um processo endotérmico.

O modelo de distribuição livre foi também utilizado como método de cálculo do número de sítios de interação Tripsina-Tensoativo utilizando baixa concentração do tensoativo livre.

ABSTRACT

Title: “Thermodynamic Study of the Interaction of Ionic Surfactants with Trypsin”

Author: Eloi Alves da Silva Filho

Thesis Advisor: Prof. Dr. Pedro L. O. Volpe

Keywords: surfactants, protein, microcalorimetry

A systematic study of the interactions of ionic surfactants with Trypsin in buffer solution pH 3.5, 7.0, 9.0, ionic strength 10 mM at 25 °C was done using the dialysis equilibrium and microcalorimetric titration techniques. In this study it was used anionic surfactants solutions of the sodium n-alkyl sulfates series (C_8 , C_{10} , C_{12} and C_{14}) and two cationic surfactants, hexadecylpyridinium chloride (CPC) and dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB).

The obtained isotherms of interaction by using the dialysis equilibrium technique were treated according to the Wyman's theoretical model that allowed to calculate the free energy of interaction of Trypsin-Surfactant (ΔG_v°). The results show that the values of ΔG_v° are in the range of - 0.1 to - 9.0 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ for the surfactants sodium n-alkyl sulfates. For the surfactants CPC and DTAB we observed that ΔG_v° are in the range of -0.1 to -11.0 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

The enthalpy of interaction ($\Delta_{\text{int}}H^\circ$) obtained through microcalorimetric titration shows that the interaction of the surfactants sodium n-alkyl sulfates (C_8 , C_{10} , C_{12} , and C_{14}) with Trypsin in the pH 3.5 is an endothermic process with the value of $\Delta_{\text{int}}H^\circ$ decreasing linearly with the increasing of the carbonic chain length. In the pH 7.0 we observed the same trend except for C_{14} . In the pH 9.0, from C_{10} the enthalpy of interaction didn't change with the increasing of the carbonic chain length. For the cationic surfactants we observed an athermic process for the interaction of DTAB and endothermic for CPC.

The distribution-free model has also been used as a method to calculate the number of sites of interaction Trypsin-Surfactant using low concentration of free surfactant.

PARTE I
INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O estudo termodinâmico da interação de tensoativos iônicos com proteínas globulares é atualmente de grande interesse nas áreas de Físico-Química e Bioquímica.

Tensoativos iônicos ligam-se a proteínas globulares em concentrações abaixo da concentração micelar crítica (CMC) por uma combinação de interações iônicas e hidrofóbicas formando o chamado complexo Proteína-Tensoativo. A parte hidrofóbica da molécula de tensoativo, como por exemplo, dodecilsulfato de sódio (SDS) interage com as regiões hidrofóbicas no interior das proteínas, causando a quebra da sua estrutura secundária e terciária. Também, a formação de pares iônicos entre moléculas de tensoativos e resíduos de aminoácidos contribuem para este processo. Por este motivo, os tensoativos iônicos possuem propriedades desnaturantes incomparáveis, pois em concentrações da ordem de milimolar desnaturam proteínas enquanto que desnaturantes clássicos¹ como Uréia e Cloridrato de Guanidina necessitam de concentrações da ordem de 6,0 a 8,0 M.

A aplicação de tensoativos na bioquímica, principalmente no estudo da solubilização de proteínas intrínsecas das membranas biológicas, tem sido de interesse em estudos físico-químicos sobre a natureza das interações entre tensoativos e proteínas pelo fato dos tensoativos iônicos serem ingredientes importantes em muitos cosméticos, produtos de toalete, preparações farmacêuticas (soluções de gargarejo entre outros), e todos estes materiais entram em contato com as proteínas da membrana.

1.1 HISTÓRICO

Uma revisão bibliográfica dos estudos realizados da interação de tensoativos com proteínas é feita a seguir.

Com base no trabalho iniciado por Lundgren et al (1943)² sobre propriedades eletroforéticas da formação de complexos da albumina do ovo com os tensoativos alquilbenzenosulfonatos acima do ponto isoelétrico pH(I) 4,6, Putnan e Neurath (1943)³ verificaram que a formação de complexos entre tensoativos e proteínas também pode ocorrer abaixo do ponto isoelétrico. Seus estudos comprovaram que a albumina de cavalo é completamente precipitada pelo tensoativo SDS abaixo do ponto isoelétrico no limite em que a razão de massa de proteína por tensoativo varia de 5/1 e 2,5/1. Estes pesquisadores concluíram que nestas condições o tensoativo interage completamente com a proteína e que com o excesso de tensoativo esta precipita. A precipitação pode ter sido causada por interações eletrostáticas, desde que, o pH máximo da solução se aproxime do ponto isoelétrico da proteína e que a concentração máxima de SDS necessária para a precipitação completa da solução corresponda à capacidade total de interação com a proteína. Concluíram também que após a dissociação do complexo Proteína-Tensoativo e consequente remoção do alquilsulfato com cloreto de bário a proteína obtida se mostrou eletroforéticamente pura.

Benzonana (1969)⁴ estudou o efeito do tensoativo desoxicolato de sódio sobre a lipólise de triglicerídeos da lipase pancreática (EC 3.1.1.3). Concluiu que o efeito das soluções de desoxicolato de sódio em pH 9,0 em presença de NaCl 0,1 M sobre a lipólise de triglicerídeos leva a remoção de ácidos graxos da interface, permitindo que a hidrólise da lipase continue a uma velocidade constante.

Knox e Parshall (1970)⁵ realizaram estudos sobre a interação do tensoativo aniônico dodecilsulfato de sódio (SDS) com gelatina em pH 7,0 e 4,1 através de medidas de tensão superficial das soluções de SDS/gelatina. Os resultados indicaram que as composições dos complexos SDS/gelatina formados foram muito semelhantes.

Knox e Parshall (1972)⁶ estudaram a interação do tensoativo aniônico Aerosol OT com gelatina em pH 7,0 utilizando medidas de tensão superficial de Aerosol OT/gelatina e NaCl/gelatina. Os resultados indicaram a formação de complexos Aerosol OT com gelatina, e concluíram que os complexos contendo Aerosol OT aparecem com a diminuição da concentração micelar crítica (CMC) deste tensoativo induzida pela presença de NaCl.

Jones et alii (1973)⁷ fizeram um estudo comparativo da interação entre Ribonuclease A (RNase A) com os tensoativos SDS e DTAB. Os resultados da comparação dos espectros no UV mostraram que o SDS desnatura a RNase A nos pH's 7,3 e 10,3, enquanto DTAB não afetou a conformação da enzima. Usando a técnica do equilíbrio de diálise determinaram que somente SDS interagiu com a RNase A. Os estudos de atividade enzimática comprovaram que a enzima não é afetada por DTAB em concentrações acima de 0,03 M a 25 °C. Os resultados das medidas calorimétricas sugerem claramente que a interação do SDS com RNase A envolve dois processos. Em valores baixos de v ocorre um processo exotérmico de interação rápida. Em valores intermediários de v o processo de interação exotérmico inicial é seguido por um processo endotérmico

mais lento, o qual pode ser atribuído a desnaturação da RNase A. Em valores altos de v ambos os processos de desnaturação e interação ocorrem mais rapidamente de maneira que o processo endotérmico fica encoberto no processo exotérmico registrado.

Makino et al (1973)⁸ realizaram estudos sobre a interação dos tensoativos DOC e Triton X100 com a albumina bovina usando as técnicas do equilíbrio de diálise e dicroísmo circular. O objetivo deste estudo foi investigar mais detalhadamente o modo de ação de DOC e Triton X100 na interação com albumina bovina, e posteriormente fazer uma comparação com os tensoativos aniônicos. As medidas foram obtidas para soluções com pH 9,2 e força iônica 0,1 M. Os resultados mostraram que DOC e Triton X100 são eficientes para a solubilização de proteínas da membrana da albumina bovina na forma nativa devido a sua CMC ser muito baixa, e assim a concentração de soluções destes tensoativos preparadas abaixo da CMC dificulta uma interação cooperativa com a albumina bovina.

Nozaki et al (1974)⁹ estudaram a interação do tensoativo catiônico cloreto de tetradeciltrimetilamônio (TDAC) com a albumina bovina e com outras proteínas globulares através das técnicas de espectroscopia no UV e dicroísmo circular. Os resultados mostraram que tensoativos catiônicos não são substitutos adequados do tensoativo aniônico SDS que apresenta como propriedade um alto poder de desnaturação, sendo usado rotineiramente em procedimentos na área biológica como por exemplo, eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).

Jones (1975)¹⁰ propôs uma teoria para a interação de moléculas de tensoativos com proteínas globulares. Esta teoria foi formulada de acordo com o modelo de equilíbrio múltiplo no qual é feito o cálculo da constante de interação proteína-tensoativo. Posteriormente esta teoria foi usada para tratar os dados da interação de SDS com RNase A, β -lactoglobulina e albumina bovina existentes na literatura da época.

Jones (1977)¹¹ estudou a interação de SDS com Tripsina nativa e Tripsina reduzida nos pH's 3,5 e 5,5 utilizando a técnica microcalorimétrica e equilíbrio de diálise. Os resultados em pH 3,5 mostraram que a interação cooperativa do SDS com a Tripsina ocorre numa ampla faixa de concentração (1×10^{-5} a 1×10^{-3} M). Eles comprovaram que em pH 3,5 ambas Tripsina nativa e reduzida apresentavam somente interação cooperativa. Os resultados das medidas microcalorimétricas realizadas a 25 °C mostraram uma variação da entalpia de desnaturação de $82,0 \pm 5,0 \text{ kJ.mol}^{-1}$ em pH 3,5 e de $128,0 \pm 5,0 \text{ kJ.mol}^{-1}$ no pH 5,5. Concluíram que termodinamicamente a Tripsina nativa e a Tripsina reduzida mostram interações diferentes.

Andrade et ali (1981)¹² utilizando a técnica microcalorimétrica determinaram a variação da entalpia de interação para a série de n-alkilsulfato de sódio (C_8 , C_{10} e C_{12}) com a RNase A a 25 °C em soluções com pH 3,2; 7,1 e 10,0. Os resultados mostraram que a interação do SDS com a RNase A é exotérmica no pH 7,1 e que esta interação ocorre nos sítios catiônicos específicos da RNase A. Utilizando esta mesma técnica determinaram que a variação da entalpia de desnaturação desta série homóloga é endotérmica. No entanto, em pH 3,2; a variação da entalpia de interação para os n-alkilsulfato C_8 e C_{10} foi confirmada como sendo um processo endotérmico, e atribuída a desnaturação da RNase A. Também comprovaram que nos pH's 7,1 e 10,0, C_{10} desnaturou a RNase A, enquanto C_8 interagiu quase atermicamente.

Jones e Manley (1982)¹³ utilizaram a técnica do equilíbrio de diálise para estudar a interação de SDS com Catalase em soluções aquosa de pH na faixa de 3,2 a 10,0. Os resultados mostraram que a interação cooperativa ocorreu somente na faixa de pH acima do ponto isoelétrico da Catalase [pH(I) 5,4]. Também determinaram que o valor médio da variação da energia livre é de -28 kJ.mol^{-1} para a interação do SDS com os sítios catiônicos específicos da Catalase. Para interações cooperativas o valor médio da variação da energia livre encontrado foi cerca de -15 kJ.mol^{-1} .

Lundahl et alii (1986)¹⁴ propuseram um modelo hipotético para as interações iônicas, hidrofóbicas e pontes de hidrogênio em complexos Proteína-SDS. O modelo proposto foi construído para representar a estrutura do complexo Proteína-SDS. Estes autores afirmam que os segmentos hidrofóbicos da cadeia polipeptídica da proteína podem ser acomodados no interior da micela alongada de SDS.

Mosavi-Movahedi et al (1989)¹⁵ estudaram a interação do tensoativo catiônico DTAB com a Catalase do fígado bovino e Catalase de *Aspergillus niger* no pH 10,0 a 25 °C utilizando as técnicas de equilíbrio de diálise e microcalorimetria. Os resultados de microcalorimetria mostraram que DTAB interagiu endotermicamente com estas enzimas. Comparando a interação do tensoativo SDS com estas mesmas enzimas os autores concluíram que as interações são dominadas pelo aumento da entropia de interação. Para SDS este aumento foi maior em meio ácido e para DTAB em meio alcalino.

Luisi et alii (1990)¹⁶ fizeram estudos com proteínas solubilizadas em solventes orgânicos via micela reversa. Concluíram que a estabilidade de proteínas em soluções de micelas reversa é menor do que em solução aquosa, e as correspondentes contribuições da entalpia e da entropia na energia livre de transição foram interpretadas com base na estrutura molecular da proteína.

Moosavi-Movahedi e Ghobadi (1991)¹⁷ fizeram estudos sobre a interação da Catalase de *Aspergillus niger* com o tensoativo SDS nos pH's de 3,2; 6,4 e 10,0 utilizando as técnicas do equilíbrio de diálise a 25 e 37 °C e microcalorimetria. Os resultados mostraram que a razão $\Delta H_{VH} / \Delta H_{cal}$ (variação da entalpia calculada pela equação de van't Hoff sobre a variação da entalpia medida por microcalorimetria) é dependente do pH variando de 1,79 a 7,33 no pH 6,4 que corresponde a um valor muito alto neste pH, mas que foi consistente com as fortes interações intermoleculares do complexo Catalase *Aspergillus niger*/SDS indicando ser um sistema com dois estados de transição. Nos pH's 3,2 e 10,0 esta razão foi menor que 2, indicando ser um sistema com múltiplos estados de transição.

Sarmiento et al (1992)¹⁸ estudaram a interação de n-alkilsulfato de sódio (C_8 , C_9 , C_{10} e C_{12}) com Insulina bovina em solução aquosa a 25 °C nos pH's 3,2 e 10,0 por microcalorimetria e equilíbrio de diálise. Os resultados mostraram que a variação da entalpia de interação é exotérmica e dependente do pH, como por exemplo, para C_{12} no pH 3,2 corresponde a $-30,7 \text{ kJ.mol}^{-1}$ enquanto no pH 10,0 diminui para $-12,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Os resultados da variação de energia livre (obtida das isotermas de interação) por molécula de tensoativo diminui com o aumento da interação até um valor limite de cerca de $-15 \text{ kJ(mol de tensoativo)}^{-1}$. Os altos níveis de interação associados com uma dependência da cadeia hidrofóbica do tensoativo sugerem uma estrutura do tipo micelar para os complexos Insulina-Tensoativos.

Miller et alli (1994)¹⁹ realizaram estudos sobre a aplicação das técnicas de ¹³C RMN e ¹H-RMN com gradiente de pulso para estudar a estrutura e mobilidade do complexo formado da interação de SDS com gelatina em solução aquosa e pH na faixa de 5 a 6. Usando estas técnicas analisaram que a gelatina interage com agregados de SDS através de atração eletrostática de resíduos catiônicos (lisina e arginina) com a parte polar da molécula de SDS e também através de interações hidrofóbicas da cadeia carbônica do SDS com os resíduos neutros e alifáticos (leucina, isoleucina, valina, etc).

Moosavi-Movahedi (1994)²⁰ estudou a interação da Catalase de *Aspergillus niger* com o tensoativo aniônico SDS através da técnica de equilíbrio de diálise e microcalorimetria. Neste estudo mostrou que o complexo Catalase de *Aspergillus niger*-SDS formado durante a atividade catalítica da enzima pode ser ter sua atividade enzimática aumentada em até 180% por soluções de SDS no pH 6,4 (tampão fosfato) e pH 8,0 (tampão tris). Este autor afirma que este resultado é inconsistente com outras Catalases (bovina e de bactérias) que são inativadas por SDS.

Jones, et alli (1994)²¹ estudaram a entalpia de interação de uma série homóloga de brometo de n-alkiltrimetilamônio (C₈, C₁₀ e C₁₂) com os polipeptídios sintéticos poli(L-glutamato) e poli(L-aspartato) em solução tampão, pH 3,2 e 10,0 a 25 °C. Os resultados mostraram que a variação da entalpia de interação da série homóloga é endotérmica. No entanto, com o aumento da concentração molar de C₁₀ e C₁₂ a variação da entalpia de interação apresentou uma contribuição exotérmica que foi atribuída a presença de partículas em suspensão. As isotermas de interação indicaram que o número médio de moléculas de tensoativos por moléculas de polipeptídios está na faixa de 0 a 0,5. Combinando os dados da entalpia de interação com os de energia livre, estimaram uma entropia de interação

positiva para esta série homóloga e sugerem que isto ocorre devido as contribuições hidrofóbicas que correspondem as interações das cadeias carbônicas das moléculas dos tensoativos com as moléculas dos peptídios.

Whitesides e Miller (1994)²² realizaram estudos da interação entre gelatina e SDS usando uma variedade de técnicas físicas e fotofísicas em solução tampão pH's 5,5; 6,5 e 8,0 a 45 °C. Mostraram que a interação envolve a formação de micelas aderidas ao polímero formando um tipo de colar. Concluíram que as micelas apresentam o número de agregação semelhantes as micelas formadas na ausência de gelatina sob as mesmas condições e ligadas por forças eletrostáticas e hidrofóbicas.

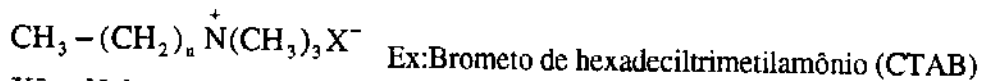
Chen et al (1995)²³ realizaram estudos sobre a determinação da isoterma de interação da albumina bovina (BSA) com dodecilsulfato de sódio (SDS) em solução tampão pH 7,2 e força iônica 0,02 M utilizando a técnica de espectroscopia DOSY (diffusion ordered 2D-NMR spectroscopy). Os resultados mostraram que a fração de SDS ligada a BSA ocorreu numa razão de 1,9 g de SDS por grama de BSA. Concluíram por análise dos dados de difusão e deslocamento químico que o complexo BSA-SDS foi consistente com o modelo de formação micelar, com as moléculas de SDS ligando-se as regiões hidrofóbicas da proteína desnaturada.

1.2 TENSOATIVOS

Tensoativos são substâncias anfifílicas, conhecidas como detergentes ou surfatantes consistindo de uma cadeia carbônica (**cauda** ou parte hidrofóbica) e uma parte polar (**cabeça**) que se caracterizam por diminuir a tensão superficial ou interfacial de um sistema. Os tensoativos podem ser classificados de acordo com a estrutura molecular da parte polar em catiônico, aniônico, neutro e anfóteros.^{24,25,26} Alguns dos exemplos de tensoativos mais comuns são;

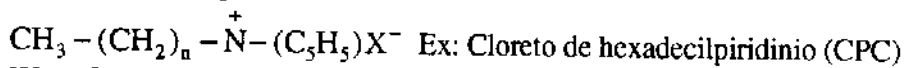
i) Catiônicos

São caracterizados por possuírem um grupo polar com carga positiva ligada a cadeia carbônica. Estes tensoativos possuem algumas propriedades importantes, como por exemplo são usados como bactericidas.



$\text{X}^- = \text{Haleto},$

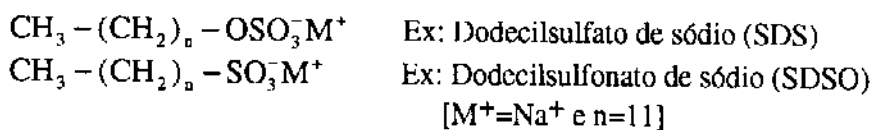
$[\text{X}^- = \text{Br}^- \text{ e } n=15]$



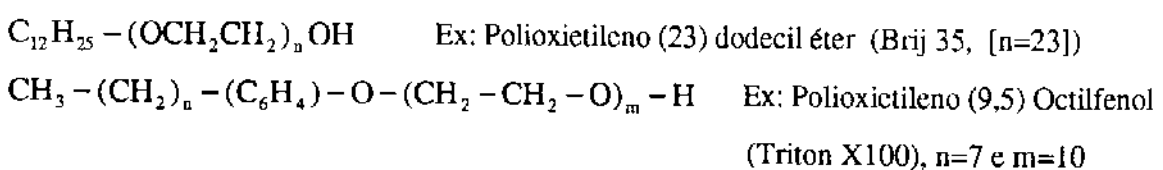
$[\text{X}^- = \text{Cl}^- \text{ e } n=15]$

ii) Aniônicos

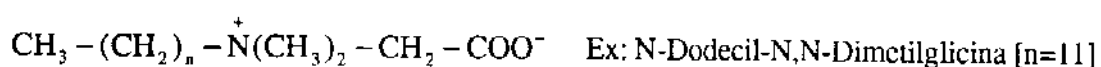
São aqueles que apresentam um grupo polar com carga negativa, e propriedades físicas superiores aos demais no que se refere ao poder de espuma e detergência. Os principais exemplos desta classe são os alquil sulfatos, alquil éter sulfatos e alquil sulfossucionatos.

**iii) Não iônicos**

São caracterizados por terem um grupo polar sem carga ligada a cadeia carbônica. Possuem como características principais: compatibilidade com a maioria das matérias-primas utilizadas em cosméticos, tem baixa irritabilidade à pele e aos olhos, alto poder de redução da tensão superficial, baixo poder de detergência e baixo poder de espuma. Os exemplos mais comuns desta classe são os derivados de polióis.

**iv) Anfóteros**

Estes tensoativos são caracterizados por conter na mesma molécula, grupos com carga positiva e grupos com carga negativa. Os tensoativos desta classe são derivados das betaínas e imidazolinás.



Uma propriedade física excepcional dos tensoativos é que ao serem dissolvidos em água, sob determinada concentração, suas moléculas se arranjam em agregados moleculares organizados denominados de micelas (figura 1.2) e a concentração na qual este fenômeno acontece é chamada concentração micelar crítica (CMC).

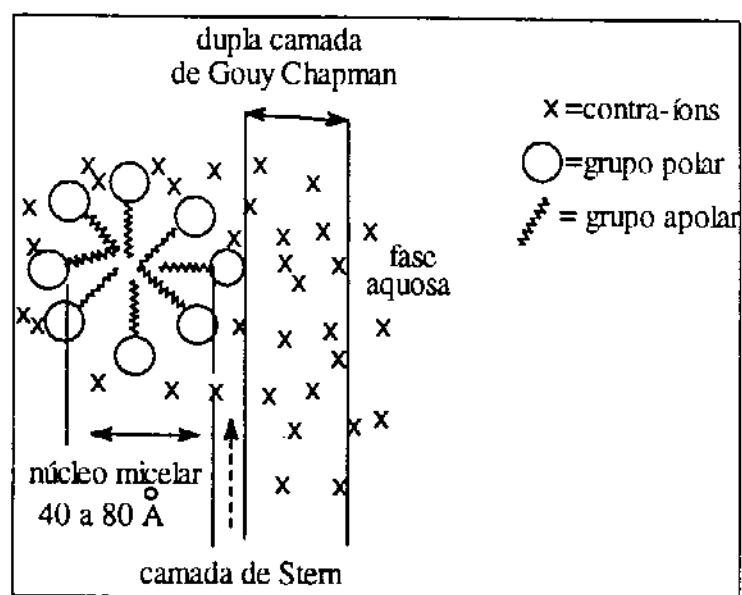


Fig. 1.2 Representação esquemática da Micela.²⁷

A estabilidade da micela é determinada pelo balanço de forças atrativas (interação hidrofóbica) entre os grupos apolares e forças repulsivas entre os grupos polares além da solvatação e interação destes grupos polares com contra-íons na camada de Stern.²⁴

1.3 PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS

Berzelius,²⁸ cunhou a palavra proteína em 1838, para salientar a importância dessa classe de moléculas. Proteína é uma palavra de origem grega *Proteios*, que significa “o que vem em primeiro lugar”, sendo um dos principais constituintes dos organismos animais, responsáveis pelo funcionamento das suas funções vitais.

Proteínas são macromoléculas ou biopolímeros, constituídas por vinte aminoácidos fundamentais (figura 1.3). Estes aminoácidos se arranjam entre si, através de ligações covalentes (ligação peptídica ou ligação amida) para formar a sequência de aminoácidos de uma determinada proteína, que é definida como sua estrutura primária.

Os aminoácidos fundamentais contidos na figura 1.3 podem ser classificados de acordo com o seu grupo R, ou seja sua parte polar ou apolar de sua estrutura molecular. Deste modo, os aminoácidos Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Cys e Gly pertencem ao grupo apolar e hidrofóbico, Asn, Gln, Ser, Thr, e Tyr ao grupo polar e hidrofílico, Lys, Arg e His ao grupo básico, Asp e Glu ao grupo ácido.

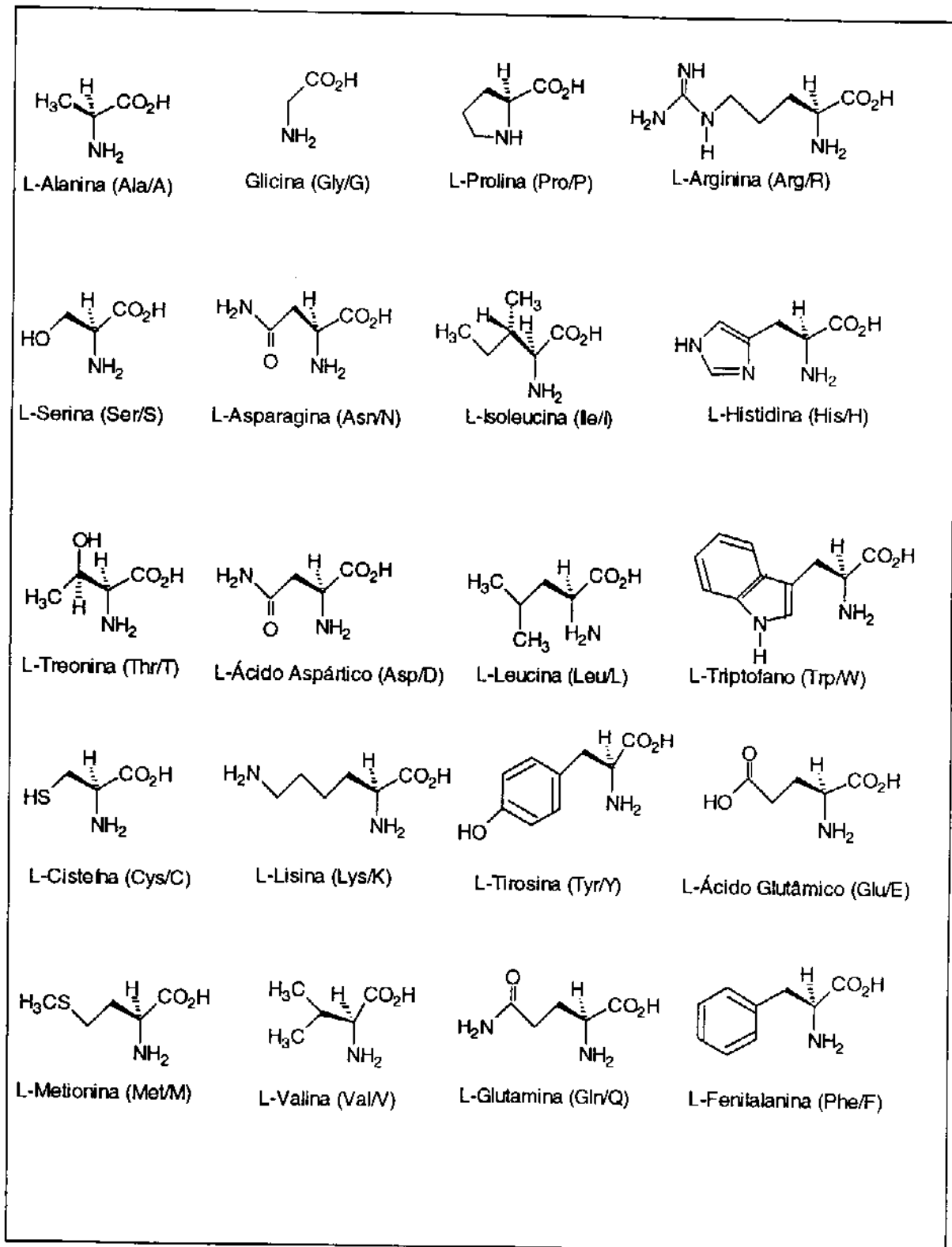


Fig. 1.3 Aminoácidos fundamentais.

Além da estrutura primária descrita anteriormente, as proteínas apresentam:

i) **Estrutura Secundária**, refere-se ao arranjo espacial dos resíduos aminoácidos que estão próximos um do outro na sequência linear. É denominada de α -Hélice, folha β pregueada (paralela ou antiparalela) que é comum em proteínas fibrosas, em que as cadeias polipeptídicas apresentam uma conformação estendida, tipo hélice ou espiralada longitudinalmente; e ocorre em segmentos das cadeias polipeptídicas nas proteínas globulares.²⁸

ii) **Estrutura Terciária**, refere-se ao arranjo espacial dos resíduos aminoácidos da cadeia polipeptídica com curvas ou dobras em três dimensões, formando a estrutura compacta e enovelada das proteínas globulares. Proteínas contendo mais de uma cadeia polipeptídica exibem um nível adicional de estrutura molecular. Neste caso cada cadeia polipeptídica da proteína é denominada de subunidade.²⁸

iii) **Estrutura Quaternária**, refere-se ao arranjo espacial de cada subunidade e da natureza de suas interações.

De acordo com a estrutura conformacional, as proteínas são classificadas em duas grandes classes:

proteínas fibrosas, insolúveis em água, são um dos principais constituintes dos tecidos animais, como por exemplo, a α -queratina, existente na epiderme, cabelo, lâ, unha; o colágeno, existente nos tendões; a miosina nos músculos e a fibroína, na seda.²⁹

proteínas globulares, solúveis em água ou em soluções aquosas de ácidos, bases ou sais, são responsáveis por funções vitais de nosso organismo, como por exemplo, a hemoglobina, que transporta o oxigênio dos pulmões para os tecidos, a insulina que regula o metabolismo da glicose, a trombina que atua na coagulação sanguínea, etc.²⁹

Virtualmente, todas as enzimas são proteínas globulares, algumas contendo uma cadeia polipeptídica única e outras contêm duas ou mais.³⁰

1.4 ESTABILIDADE CONFORMACIONAL DAS PROTEÍNAS

As proteínas globulares apresentam estruturas moleculares muito complexas e as medidas experimentais revelam que a variação de energia livre necessária para desnaturá-las é 0,4 kJ por mol de resíduos de aminoácidos³⁰ de maneira que para desnaturar uma proteína contendo cerca de 100 resíduos de aminoácidos seria necessário $\sim 40 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Em contraste, a energia necessária para quebrar uma ponte de hidrogênio típica é $\sim 20 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Deste modo, as várias forças de ligação as quais as proteínas estão sujeitas: interações eletrostáticas (atrativas e repulsivas), pontes de hidrogênio (intramolecular e com a água), interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e ligações dissulfeto somam num total, centenas de kilojoules por mol de moléculas de uma proteína. Conseqüentemente a estrutura de uma proteína é o resultado de um complexo balanço entre as forças de ligações citados e esquematizadas na figura 1.4.

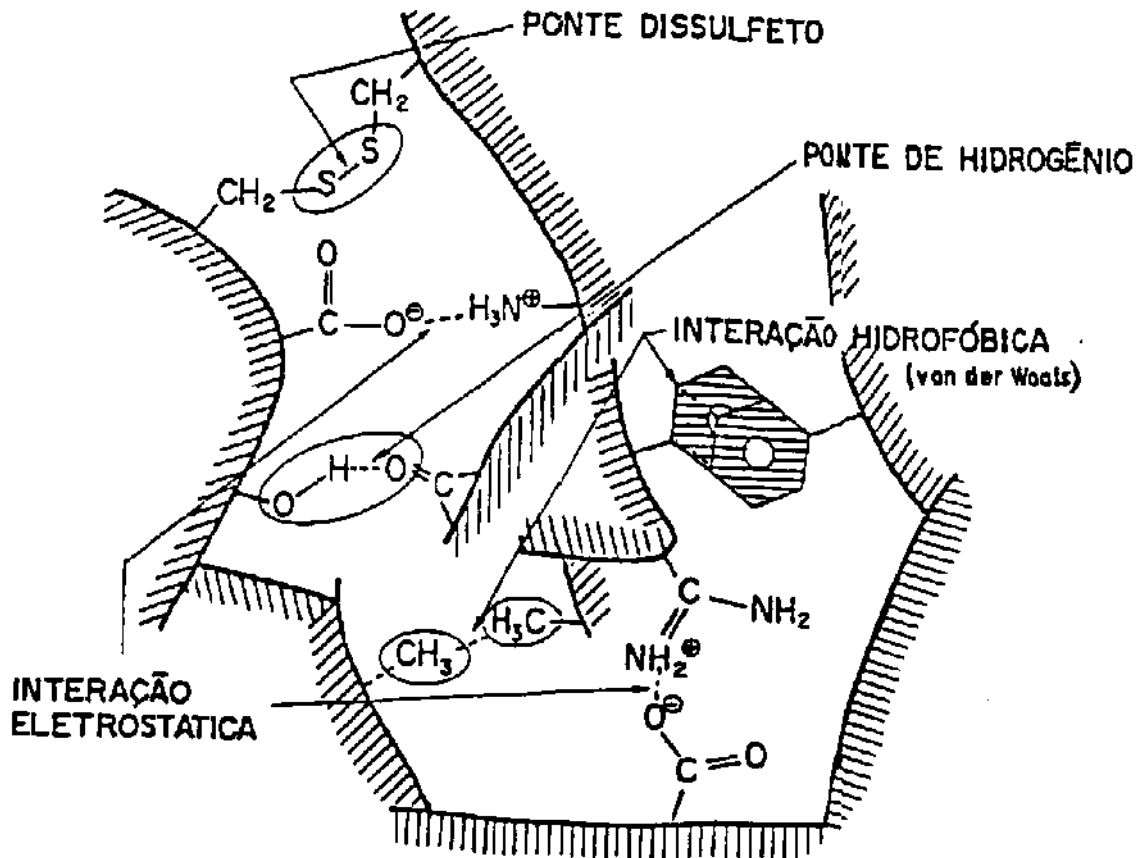


Fig. 1.4 Forças envolvidas na estrutura molecular das proteínas.³¹

1.4.1 INTERAÇÕES ELETROSTÁTICAS

A teoria que estuda as interações eletrostáticas são baseadas nas leis da eletrostática clássica.³⁰ A energia potencial de interação (U) entre duas cargas elétricas, q_1 e q_2 separadas por uma distância r é dada pela equação da lei de Coulomb, que resulta no trabalho necessário para separar estas duas cargas de uma distância infinita.

$$U = \frac{k \cdot q_1 \cdot q_2}{\epsilon \cdot r^2} \quad (1.4.1)$$

onde: k - corresponde a constante de proporcionalidade = $9,0 \times 10^9 \text{ J} \cdot \text{m} \cdot \text{C}^{-2}$.

ϵ - é a constante dielétrica, no vácuo que é igual a 1 e aumenta com a polaridade do meio; para uma molécula de proteína é determinada na faixa de 2 a 5.

De acordo com esta equação, a energia de interação entre grupos carboxílicos no aminoácido Glu e grupos amônia no aminoácido Lys, com as cargas separadas por 4 Å num meio de $\epsilon=4$ é da ordem de -86 kJ.mol^{-1} .³⁰ Contrariamente, grupos carboxílicos e grupos amônia de aminoácidos situados fora da parte hidrofóbica da proteína são fortemente solvatados e portanto contribuem muito pouco para a estabilidade conformacional da mesma.

1.4.2 FORÇAS DE VAN DER WAALS

São interações fracas entre dipolo-dipolo ou interações dipolo-induzido. As interações entre dipolo-dipolo são determinantes estruturais importantes em proteínas porque muitos destes grupos tais como carbonila e amida da cadeia peptídica tem momento dipolar permanente. A ponte de hidrogênio é uma classe especial de interação dipolar e será tratada separadamente.

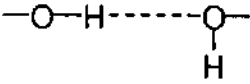
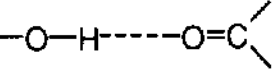
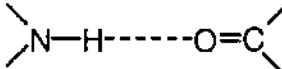
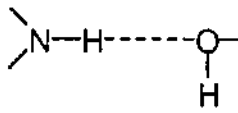
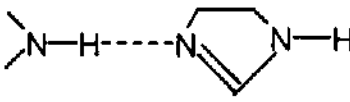
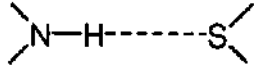
1.4.3 PONTES DE HIDROGÊNIO

Pontes de hidrogênio (D-H...A) são predominantemente interações eletrostáticas entre um grupo doador fracamente ácido (D-H) e um átomo aceptor (A) que possuem um par de elétrons isolado. Em sistemas biológicos D e A podem ambos serem os átomos altamente eletronegativos nitrogênio e oxigênio e ocasionalmente enxofre.

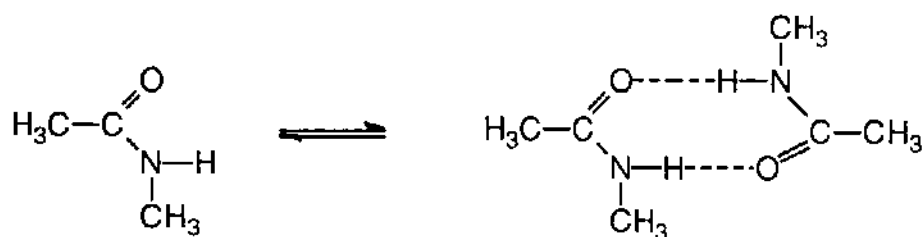
A estrutura molecular de uma proteína depende de um grande número de ligações por ponte de hidrogênio que são consideradas como as de maior importância na estabilidade conformacional de uma proteína. Aminoácidos com capacidade de formar ligações por pontes de hidrogênio, tais como Ser, Tyr, Trp, Arg, Asp, Asn e Gln, podem interagir com a molécula de água, com outro aminoácido ou com a cadeia peptídica.

Exemplos de todas as possíveis formações de pontes de hidrogênio em sistemas biológicos estão representadas na tabela 1.4.3.

Tab. 1.4.3 Exemplos de pontes de hidrogênio que podem ser formados por resíduos de aminoácidos polares.³²

Tipo de Ponte de Hidrogênio		Distância entre átomo doador e receptor (nm)
hidroxila-hidroxila		0,28
hidroxila-carbonila		0,28
amida-carbonila		0,29
amida-hidroxila		0,30
amida-N do Imidazol		0,31
amida-enxofre		0,37

A variação da energia livre de formação da ponte de hidrogênio³¹ é da ordem de -12 a -30 kJ.mol⁻¹.³⁰ Podemos então questionar se a formação de estruturas secundárias envolvendo pontes de hidrogênio colabora significativamente para o processo de conformação da proteína. Podemos examinar a questão considerando a formação de pontes de hidrogênio num composto modelo N-dimetilacetamida em água e em solvente apolar como por exemplo o CCl₄ conforme esquematizado na figura 1.4.3.

Fig.1.4.3 Equilíbrio entre N-dimetilacetamida e seu dímero por ponte de hidrogênio.³²

A constante de equilíbrio para a dimerização da N-dimetilacetamida em água é 5×10^{-3} M e a variação de energia livre é $28,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Em solventes apolares como o CCl_4 a constante de dimerização é $57,2$ M e a variação da energia livre é $-10,1 \text{ kJ.mol}^{-1}$. A variação da energia livre positiva para formação da ponte de hidrogênio em água indica um processo desfavorável, enquanto a variação da energia livre negativa para a formação da ponte de hidrogênio no solvente apolar indica um processo espontâneo. Estes resultados sugerem que pontes de hidrogênio entre resíduos de aminoácidos tendem a se formar no interior hidrofóbico da proteína. Portanto, durante o enovelamento da proteína, quando pontes de hidrogênio se formam entre os resíduos de aminoácidos no interior da mesma, um número igual de pontes de hidrogênio entre a proteína e a água devem ser rompidas de maneira que não haja um aumento no número total de pontes de hidrogênio.

A interação por ponte de hidrogênio é responsável pela estabilização da conformação enovelada da proteína, mas não é a interação que contribui significativamente para o processo que impulsiona o enovelamento.³³

1.4.4 INTERAÇÕES HIDROFÓBICAS

Kauzmann foi um dos primeiros a estudar este fenômeno (efeito hidrofóbico), inicialmente denominou de *ligação hidrofóbica* e o definiu como sendo a tendência das moléculas de uma proteína se agruparem uma às outras em meio aquoso.³⁴ Modelos semelhantes podem ser observados para soluções de hidrocarbonetos em água, soluções aquosas de tensoativos e outras soluções contendo moléculas apolares, tais como, álcoois, éteres, ésteres e aminas. Posteriormente, Tanford³¹ denominou este mesmo fenômeno descrito por Kauzmann de *efeito hidrofóbico* e o define como sendo as interações que ocorrem entre grupos apolares ($-\text{CH}_2$) de cadeias de hidrocarbonetos.

A interação hidrofóbica é a força responsável pelo enovelamento. Imaginando uma cadeia polipeptídica desenrolada em solução, os peptídios polares da cadeia são estabilizados por solvatação. As moléculas de água interagem de maneira muito diferente com aminoácidos não polares sendo as interações água-água muito mais fortes que as interações entre moléculas de água e grupos não polares. Em consequência disso, a água ao redor das regiões não polares se arranja por pontes de hidrogênio numa estrutura altamente organizada formando uma espécie de *gaiola* ao redor do grupo não polar.³⁵

Com o enovelamento da cadeia polipeptídica, ocorre a remoção das regiões hidrofóbicas em contato com as *gaiolas* de água altamente organizadas, fazendo com que as regiões hidrofóbicas fiquem em contato umas com as outras no centro da proteína. O arranjo das moléculas de água é rompido e as moléculas de água são libertadas na solução.

Embora o rompimento das *gaiolas* represente uma perda na variação da entalpia de formação das pontes de hidrogênio favorável ($\Delta H < 0$), o processo de rompimento é endotérmico ($\Delta H > 0$), portanto desfavorável, mas o aumento de entropia ($\Delta S > 0$) contrabalança o termo entálpico e a interação entre as regiões hidrofóbicas da cadeia peptídica é espontânea, fenômeno este conhecido como *efeito hidrofóbico*.³¹

Deve-se ressaltar que a proteína, em sua forma nativa, reflete um delicado balanço entre os vários tipos de interação que estabilizam a sua estrutura enovelada. Este importante balanço energético é essencial para manifestação das propriedades funcionais e estabilidade das proteínas em seu estado nativo.

1.4.5 LIGAÇÕES DISSULFETO

As ligações dissulfeto ou pontes S-S tem a função de estabilizar a estrutura tridimensional nas proteínas nativas. Estas ligações conferem estabilidade estrutural adicional contra variações de temperatura e pH.

1.5 ESTRUTURA MOLECULAR DA TRIPSINA BOVINA

Tripsina é uma *serina proteinase*, pertencente a uma classe de enzimas que apresentam o resíduo de aminoácido Ser em seu sítio ativo. Fazem parte desta classe, as enzimas pancreáticas dos vertebrados, Quimiotripsina (EC 3.4.21.1), Tripsina (EC 3.4.21.4) e Elastase (EC 3.4.21.11) com os resíduos aminoácidos Asp (102), Ser (195) e His (57) representando o sítio ativo desta família de serina proteinase.³⁶ As enzimas do plasma, como trombina e fator Xa também fazem parte desta classe.³² Tripsina, é uma enzima reversível e muito usada para catalisar a hidrólise de outras proteínas e produzir misturas de peptídeos.³⁷ A estrutura molecular da Tripsina é constituída por uma sequência de 223 aminoácidos³⁸ com seis ligações S-S. A figura 1.5.1 mostra a sequência de aminoácidos da Tripsina e as respectivas ligações dissulfeto. Bigelow³⁹ criou uma escala de hidrofobicidade das proteínas baseado na definição do parâmetro de hidrofobicidade média de cada aminoácido (H) como sendo a variação da energia livre de transferência do aminoácido de um solvente orgânico para um meio aquoso. A tabela 1.5 contém o número de aminoácidos hidrofóbico na molécula da Tripsina e a hidrofobicidade média por mol para cada aminoácido.

Tab. 1.5 Aminoácidos hidrofóbicos da Tripsina.

Aminoácido	Nº de resíduos	Π /kJ.mol ⁻¹
Ala	14	43,96
Val	16	113,76
Leu	13	130,39
Ile	14	172,62
Pro	8	86,96
Phe	3	33,24
Trp	3	37,62
Met	2	10,86
Cys	12	50,16
Gly	24	-

A hidrofobicidade média da Tripsina é da ordem de 679,57 kJ.mol⁻¹ sendo que a insulina é uma das proteínas mais hidrofóbicas, com uma hidrofobicidade média de 1180 kJ.mol⁻¹ na escala de Bigelow.³⁹

A estrutura tridimensional da Tripsina bovina foi determinada por estudos de cristalografia de Raio-X³⁸ confirmando que os aminoácidos Ser 195 e His 57 formam o sítio ativo desta proteína, sendo que o aminoácido His 57 se liga através de ponte de hidrogênio ao grupo carboxílico existente no aminoácido Asp 102. Utilizando o programa HyperChemistry e entrando com a sequência de aminoácidos já descrita na literatura,³⁸ obtivemos a estrutura tridimensional da Tripsina a qual é apresentado na figura 1.5.2.

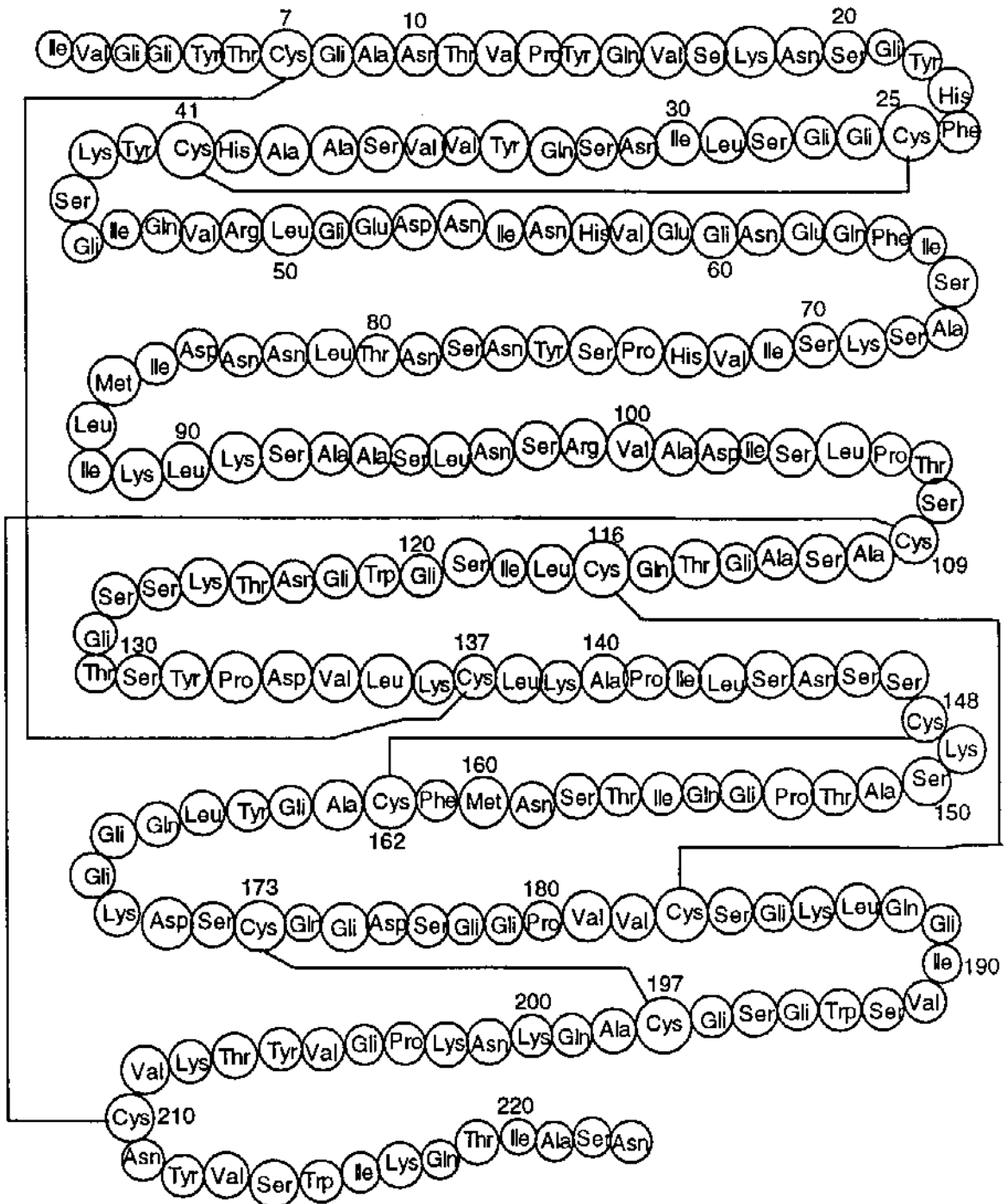


Fig. 1.5.1. Estrutura primária da Tripsina bovina.

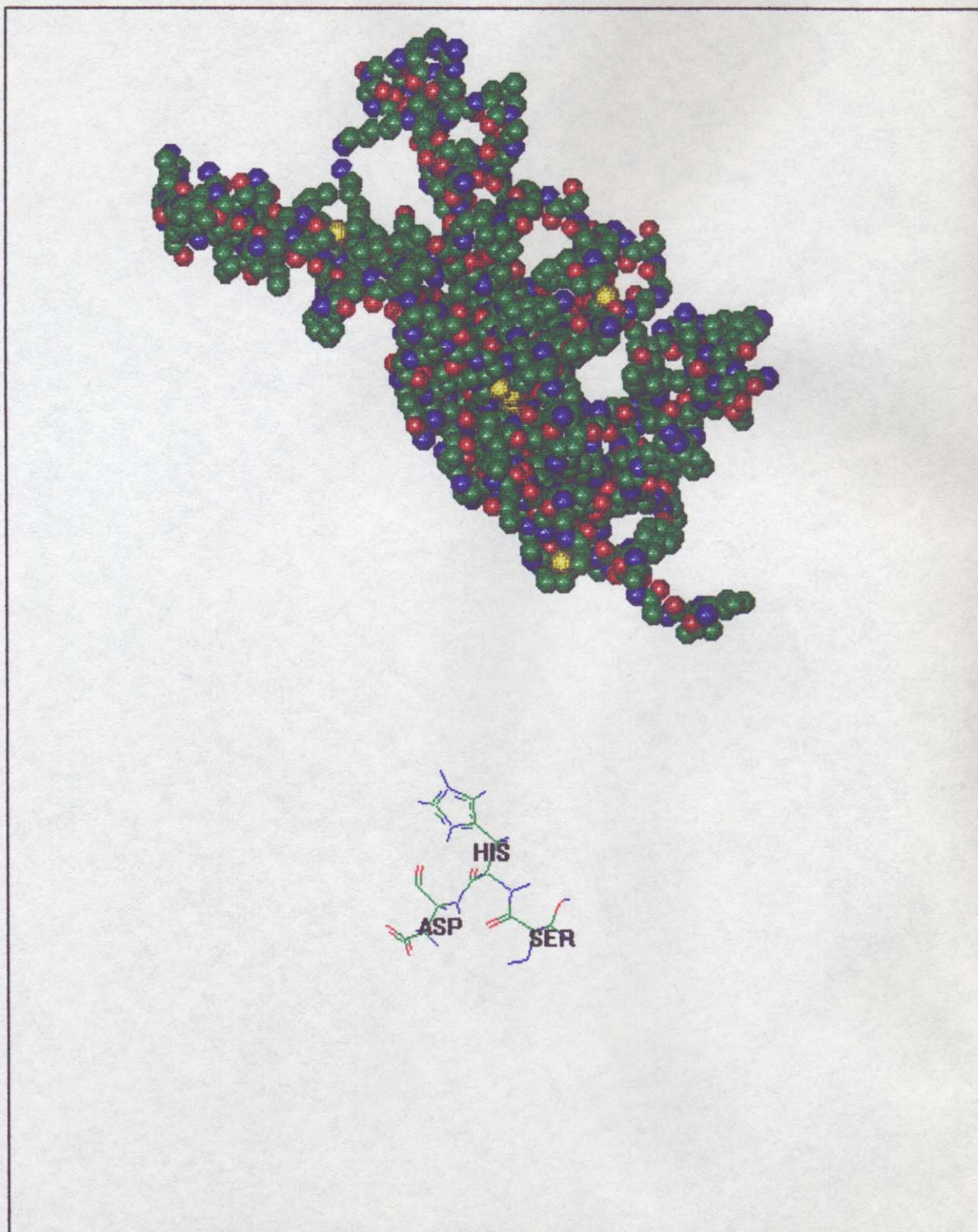
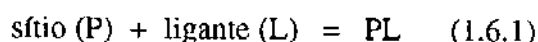


Fig.1.5.2 Estrutura tridimensional da Tripsina⁴⁰ com seu sítio ativo abaixo
(C-verde, O-vermelho, H,N-azul, S-amarelo)

1.6 A INTERAÇÃO PROTEÍNA-LIGANTE

Uma proteína no seu estado nativo e em solução possui sítios de interação para ligantes hidrofóbicos. Se a proteína possui n destes sítios e se os sítios são idênticos e independentes, o equilíbrio em cada sítio é dado por:



e a forma da isoterma de interação é exatamente a mesma para um grande número de moléculas pequenas, cada uma tendo somente um sítio. Para a consideração de sítios idênticos e independentes, a isoterma de interação é representada pela parte (a) da figura (1.6.1), onde v = número médio de moléculas de ligante por molécula de proteína.

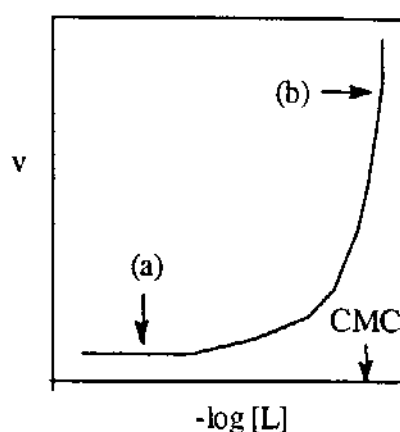


Fig. 1.6.1. Representação esquemática da interação Proteína-Ligante.³¹

Esta aproximação simples, considerando sítios idênticos e independentes, é descrita pela equação de Scatchard.⁴¹

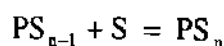
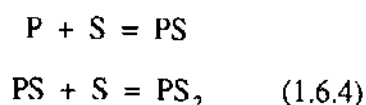
$$\frac{v}{[S]_{\text{livre}}} = K(n - v) \quad (1.6.2)$$

onde K é a constante de equilíbrio para a reação $P + L = PL$ e um gráfico de $v/[L]$ contra v deve portanto ser linear para o número n total de sítios de interação. O valor de K está relacionado com a variação da energia livre de transferência do ligante da solução para a proteína ($\mu_p^\circ - \mu_{aq}^\circ$):³¹

$$-RT \ln K = (\mu_p^\circ - \mu_{aq}^\circ) \quad (1.6.3)$$

Se uma isoterma de interação experimental não puder ser ajustada utilizando a equação (1.6.2), é porque um valor menor de K deve ser usado com o aumento de $[L]$ e v e há duas interpretações que podem ser consideradas. Uma é que o número de sítios de interação n ainda são independentes mas não possuem afinidade idêntica com o ligante. Neste caso, os sítios com alta afinidade interagem mesmo com baixa concentração do ligante, isto é, a isoterma total será uma superposição de isotermas. Outra interpretação para explicar a não linearidade da isoterma deve-se ao fato de que a interação do ligante num sítio interfere na interação de outros sítios devido a repulsão eletrostática e impedimento estereo. Devido a estas considerações a interação de um ligante com uma proteína é um processo cooperativo, isto é, há um aumento da afinidade de interação quanto mais moléculas do ligante interagem. O caso mais extremo de cooperatividade é obtido quando a associação com a proteína não envolve somente sítios para a interação de um único ligante, mas quando, em vez disto, existe uma região de interação que permite um grande número de ligantes simultaneamente.

Baseado nas considerações acima, a reação da interação Proteína-Tensoativo consiste na realidade de um processo cooperativo complexo e pode ser representada por uma série de equilíbrios:



a equação (1.6.3) pode ser então escrita:

$$-RT \ln K = n(\mu_p^\circ - \mu_{aq}^\circ) \quad (1.6.5)$$

se n é grande a isoterma pode ser representada pela parte (b) da figura (1.6.1).

A forma da isoterma da interação Proteína-Tensoativo pode ser esquematizada segundo a figura (1.6.2)³¹. A isoterma (a) representa interação não cooperativa e a isoterma (b) a interação em um processo altamente cooperativo.

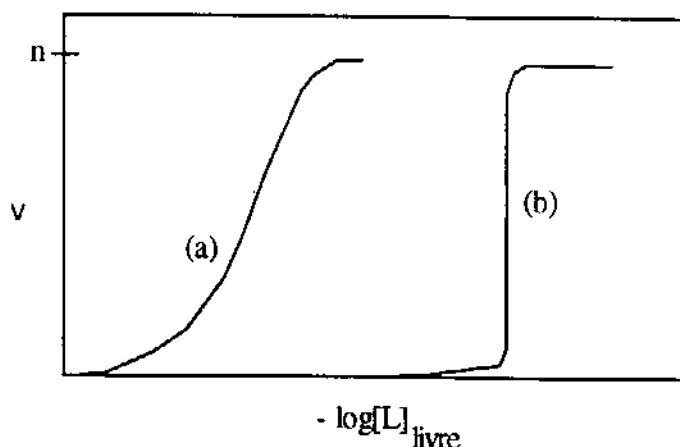


Fig. 1.6.2. Esquema representativo das formas das isotermas de interação Proteína-Ligante.³¹

1.7 MODELOS TEÓRICOS USADOS NO ESTUDO DA INTERAÇÃO PROTEÍNA-TENSOATIVO

A aproximação de Scatchard (equação 1.6.2) não funciona, certamente devido a existência da cooperatividade entre diferentes sítios de interação específica, demonstrando uma limitação desta equação, pois a condição de sítios idênticos e independentes não é a representação real para a interação de tensoativos com diferentes proteínas. Baseado nos equilíbrios (equação 1.6.4), podemos definir v , através da equação;

$$v = \frac{\sum_{v=0}^n [PS_v]v}{\sum_{v=0}^n [PS_v]} \quad (1.7.1)$$

onde n é o número total de sítios de interação e v é o número de moléculas de tensoativo (de 0 até n) ligado a cada proteína. Mesmo considerando um equilíbrio complexo e múltiplo em termos de todas as constantes de interação é inevitavelmente necessária uma outra aproximação, pelo menos mais realista do que a aproximação de Scatchard, desde que a interação de cada molécula do tensoativo com a proteína deve mudar a constante de interação para as moléculas de tensoativos subsequentes.

Wyman⁴², desenvolveu um procedimento que permite calcular a constante de interação baseado no conceito de potencial de interação e foi utilizado no estudo da interação de sistemas Proteína-Tensoativo.⁴³ Wyman^{42,44} usou a transformada de Legendre no tratamento termodinâmico da interação de tensoativos com biopolímeros.⁴⁵ O potencial de interação de Wyman, $\pi(P, T, \mu_1, \mu_2, \dots)$ é uma energia livre de Gibbs transformada, que tem como variáveis independentes as propriedades intensivas do ligante, isto é, a quantidade do tensoativo ligado a proteína e o potencial químico do tensoativo.

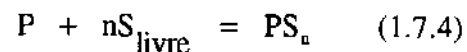
$$v = \left(\frac{\partial \pi}{\partial \mu} \right)_{P, T} \quad (1.7.2)$$

Considerando que o potencial químico do tensoativo na concentração $[S]$ é dado por uma expressão da solução ideal $\mu = \mu^0 + RT \ln[S]_{\text{livre}}$ com o estado padrão μ^0 um molar, temos;

$$\pi = RT \int_0^v v d \ln[S]_{\text{livre}} \quad (1.7.3)$$

portanto, o potencial de interação de Wyman corresponde ao produto de RT pela área da curva sob a isoterma de interação, isoterma esta obtida pelo gráfico de v em função do $\log[S]_{\text{livre}}$ (figura 1.6.2).

Isotermas de interação Proteína-Tensoativo como as da figura 1.6.2 são geralmente obtidas utilizando a técnica de equilíbrio de diálise. Nestes experimentos o complexo Proteína-Tensoativo formado se dissocia num meio contendo tensoativo livre. Podemos considerar a formação de um complexo PS_n (proteína + cátion ou ânion do tensoativo) de acordo com o equilíbrio;



Embora a formação de PS_n envolva n equilíbrios com constante estequiométrica de interação individual devido à natureza cooperativa do processo, numa dada concentração do tensoativo livre, se nós assumirmos que as concentrações de todas as espécies com exceção de P e PS_n são desprezíveis então, a constante estequiométrica de interação total é dada por:

$$K = \frac{[PS_n]}{[P][S]_{\text{livre}}^n} \quad (1.7.5)$$

das equações (1.6.2) e (1.7.5) obtemos que:

$$v = \frac{n[S]_{\text{livre}}^n K}{1 + K[S]_{\text{livre}}^n} \quad (1.7.6)$$

e diferenciando v com relação a $\ln[S]_{\text{livre}}^n$ e substituindo na equação do potencial de interação π , equação (1.7.3) obtem-se;

$$\pi = RT \ln(1 + K[S]_{\text{livre}}^n) \quad (1.7.7)$$

Desde que o potencial de interação π pode ser obtido pela integração da isoterma é possível calcular $K[S]_{\text{livre}}^n$ usando a equação (1.7.7).

Se entretanto, fizermos a consideração de que para um dado valor de $[S]_{\text{livre}}$ a espécie predominante será PS_v , isto é, $K[S]_{\text{livre}}^n \equiv K_{\text{ap}}[S]^v$ então, uma constante de interação aparente pode ser calculada a qual pode ser relacionada com uma variação de energia livre de Gibbs aparente $\Delta G_{\text{ap}}^\circ$ para um dado valor de v ;

$$\Delta G_{\text{ap}}^\circ = -RT \ln K_{\text{ap}} \quad (1.7.8)$$

É conveniente definir uma variação de energia livre de Gibbs de interação por ligação de íon tensoativo $\Delta G_v^\circ = \Delta G_{\text{ap}}^\circ / v$ e desta maneira é possível utilizar toda a isoterma de interação para determinar a variação de energia livre aparente conforme os sucessivos íons tensoativos interagem.

Um outro modelo para interpretar a interação Proteína-Tensoativo é a equação de Hill⁴⁶ (equação 1.7.9) que pode ser aplicada nos casos de isotermas que apresentam uma cooperatividade positiva.

$$v = \frac{g(K[S]_{\text{livre}})^{N_H}}{1 + (K[S]_{\text{livre}})^{N_H}} \quad (1.7.9)$$

onde g representa o valor máximo de v , e N_H é o coeficiente de Hill que indica a cooperatividade da interação Proteína-Tensoativo. Esta equação de Hill quando linearizada resulta na seguinte forma,

$$\log(v/g-v) = N_H \log[S]_{\text{livre}} - \log K \quad (1.7.10)$$

Além destes, existe o modelo de distribuição livre⁴⁷ que foi usado em estudos da ligação de Opiatos (Etorfina e Naloxone) na retina⁴⁸ e interação de manganês com fragmentos de polinucleotídeos sintéticos.⁴⁹ Este modelo de distribuição livre baseia-se na equação de Scatchard⁴¹ onde os valores de n e K são as variáveis, v e $[S]_{\text{livre}}$ constantes e apresenta bons resultados para baixa concentração do tensoativo.

Neste caso para cada par de valores de v e $[S]_{\text{livre}}$ existe um infinito número de valores de n e K , mas somente um conjunto satisfaz à todos os valores de v e $[S]_{\text{livre}}$ fornecido no sistema. Este modelo tem sido útil para estimar o número de sítios de interação Proteína-Tensoativo no início do processo ou seja, para baixas concentrações dos tensoativos.

Para usar o modelo de distribuição livre, foi desenvolvido o programa LIGAND em linguagem Basic (listagem no Apêndice I), conforme será mostrado na seção de resultados e discussão.

1.8 EQUILÍBRIO DE DIÁLISE

O estudo completo das interações entre proteína e tensoativo não pode ser satisfatoriamente feito sem os recursos de uma ampla variedade de técnicas físicas.^{19,43} Um resumo das técnicas físicas e a informação que pode ser obtida é mostrada na tabela 1.8.1.

Tab. 1.8.1 Técnicas físicas aplicadas ao estudo da interação Proteína-Tensoativo.

TÉCNICA	INFORMAÇÃO OBTIDA
Equilíbrio de diálise	Isoterma de interação, variação da energia livre aparente de interação.
Calorimetria, microcalorimetria, micro-DSC	Variação da entalpia de interação e desnaturação.
Ultracentrifugação	Coefficiente de sedimentação de complexos, dissociação de subunidades e peso molecular.
Viscosimetria	Volume hidrodinâmico e ponto isoelétrico.
Espalhamento de luz estático e dinâmico	Peso molecular, coeficiente de difusão, dimensões
Espectroscopia no UV	Mudança conformacional
Cinética enzimática	Interações em sítios ativos e desnaturação
RMN	Interações em sítios ativos

Destas técnicas físicas, o equilíbrio de diálise é simples e oferece a vantagem de fornecer a isoterma de interação e conseqüentemente possibilitar o cálculo da energia livre aparente (ΔG_{ap}^0) da interação Proteína-Tensoativo. Esta técnica utiliza membrana de diálise com um tamanho de poro bem menor que a proteína e suas subunidades. Em princípio, um volume da solução de proteína de concentração conhecida é dialisada até o equilíbrio em temperatura constante contra um volume da solução do tensoativo no mesmo tampão. Após o equilíbrio de diálise o tensoativo livre é analisado.

Portanto, como a quantidade total de proteína e tensoativo no sistema são conhecidos no equilíbrio, então a quantidade de tensoativo ligado à proteína (ν = número médio de moléculas de tensoativo por molécula de proteína) é determinado a partir da concentração do tensoativo livre usando a seguinte equação;

$$\nu = \frac{[S]_{\text{total}} - [S]_{\text{livre}}}{[P]} \quad (1.8)$$

Tomando o cuidado para que a concentração de proteínas seja suficientemente baixa em relação à força iônica do tampão, o efeito Donnam³⁵ pode ser então desprezado. Na parte experimental será mostrado mais detalhes da utilização desta técnica.

1.9 APLICAÇÃO DA CALORIMETRIA NO ESTUDO DE SISTEMAS DE NATUREZA BIOLÓGICA

Praticamente, todos os processos de natureza química, física e biológica são acompanhados pela liberação ou absorção de calor. Métodos de medidas da variação da entalpia, métodos calorimétricos, são portanto de um interesse potencial para todos os tipos de análises químicas e biológicas. No entanto, a grande quantidade de substâncias necessárias para a calorimetria convencional e sua baixa sensibilidade foram sempre fatores limitantes.⁵⁰

Avanços na tecnologia dos sensores Peltier ou termopilhas⁵¹ têm permitido a aplicação de técnicas calorimétricas no estudo de sistemas biológicos complexos devido à sensível detecção de pequenas quantidades de calor, utilizando amostras reduzidas. Esta técnica recebeu a denominação de microcalorimetria biológica (MB).⁵²

MB é uma técnica valiosa para monitorar em tempo real uma grande variedade de processos biológicos e sendo uma técnica não específica, não destrutiva não exige a priori que a amostra ou o sistema a ser analisado tenha algum tipo de tratamento podendo-se usar soluções de compostos bioquímicos, suspensões grosseiras, células, microorganismos, etc.

Pelo fato de não requerer soluções e objetos opticamente transparentes, a MB tem mais esta vantagem sobre os métodos espectrofotométricos.⁵³

O efeito térmico que acompanha por exemplo uma reação pode ser registrado em tempo real por meio desta técnica. O registro do efeito térmico durante um processo biológico é chamado entalpograma. O entalpograma ou curva dq/dt (J/s) x tempo, (*Nomenclature of Thermometric and Enthalpimetric Methods in Chemical Analysis*, 1994)⁵⁴ determina em tempo real o calor desenvolvido no processo.

A grande contribuição da microcalorimetria no estudo de sistemas bioquímicos está na possibilidade de propor modelos para os processos investigados através da análise dos entalpogramas.⁵⁵ Na indústria, principalmente na área farmacêutica, a microcalorimetria é usada para a determinação da velocidade de decomposição de produtos, dissolução, interação enzima-substrato, etc.

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos principais:

- Estudo sistemático da interação de uma série homóloga de tensoativos aniônicos, série dos n-alkilsulfato de sódio, Octilsulfato OSS (C_8), Decilsulfato DSS (C_{10}), Dodecilsulfato SDS (C_{12}) e Tetradecilsulfato TDSS (C_{14}) com a Tripsina em solução tampão pH 3,5; 7,0 e 9,0, força iônica 10 mM a 25 °C. Os tensoativos catiônicos Cloreto de Hexadecilpiridínio (CPC) e Brometo de Dodeciltrimetilamônio (DTAB) foram também incluídos neste estudo.
- Determinação da variação da energia livre de interação Proteína-Tensoativo utilizando a técnica do equilíbrio de diálise e o tratamento de Wyman.
- Determinação da variação da entalpia de interação Proteína-Tensoativo utilizando a técnica de titulação microcalorimétrica.
- Determinação do número de sítios da interação Tripsina-Tensoativo utilizando o modelo de distribuição livre.

PARTE II
EXPERIMENTAL

2 EXPERIMENTAL

2.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes e substâncias utilizados neste trabalho estão descritos abaixo juntamente com o método de purificação.

- Todas as soluções usadas durante os experimentos foram preparadas utilizando água destilada por duas vezes. A destilação da água foi feita utilizando solução de permanganato de potássio em meio básico, necessário para a eliminação de possíveis impurezas orgânicas. O sistema de destilação foi montado com aparelhagem de vidro pyrex constituído por um balão de 500 mL, coluna de refluxo de – 40 cm e bolas de porcelana como borbulhador. Este sistema de destilação foi usado somente para esta finalidade. A condutância (aparelho Actron, EC-1) da água purificada foi de $1,5 \times 10^{-6} \text{ ohm}^{-1}$.

- Permanganato de potássio, MERCK, p.a.

- Sulfato de cobre, REAGEM, p.a.

- Dodecilsulfato de sódio (SDS), SIGMA, 99,0%. A purificação do SDS foi feita através de extração com éter etílico sob refluxo por 8 horas usando um extrator Soxhlet, e depois seco a vácuo.⁵⁶ A pureza do SDS foi determinada pela medida da CMC em água a 25 °C, utilizando método espectrofotométrico.⁵⁷ O valor da CMC obtido, $8,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ foi concordante com os valores encontrados na literatura ($7,5 \times 10^{-3}$ a $8,3 \times 10^{-3} \text{ M}$).^{58,59}

- Decilsulfato de sódio (DSS), FLUKA, p.a.

- Cloreto de hexadecilpiridínio (CPC), SIGMA, 99,0%

- Brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB), SIGMA, 99,0%

- Orange II (ácido benzeno sulfônico monossódio azo 4-[2-(hidroxi-1-naftalenil)]),

$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{NaO}_4\text{S}$, POLYSCIENCES, INC., p.a.

- Azul de metileno, REAGEN, p.a.

- Fosfato de potássio monobásico, VETEC, p.a.

- Fosfato de potássio dibásico, VETEC, p.a.
- Acetato de sódio, VETEC, p.a.
- Brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), MERCK, 99,0% p.a. foi purificado por pelo menos tres recristalizações utilizando como solvente uma mistura acetona/etanol, 1:1 em volume⁶⁰, e mantido em dessecador. Sua pureza foi determinada pela medida da CMC em água a 25 °C utilizando método espectrofotométrico.⁵⁷ O valor da CMC obtido foi de $9,2 \times 10^{-4}$ M, em boa concordância com os valores da literatura ($9,2 \times 10^{-4}$ M).⁶¹
- Hidróxido de sódio, MERCK, p.a.
- Tripsina (Pancreas Bovino), United States Biochemical Co., Cleveland, atividade 1-250 unidades/mg proteína, massa molecular $23300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Daltons),⁶² Ohio, U.S.A.
- Tripsina (Pancreas Bovino), SIGMA, atividade 53 unidades/mg proteína, massa molecular $23300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Daltons).
- A dosagem das soluções de Tripsina foi realizada pelo método de Lowry.⁶³ Em soluções de proteínas à presença dos grupos Tyr, Trp e Phe exibem absorção no comprimento de onda de 280 nm o que torna uma medida rápida e sensível da concentração de proteínas. No caso da solução de Tripsina preparadas em solução tampão acetato (pH 3,5), fosfato (pH 7,0) e bórax (pH 9,0) foram feitas leituras de absorbância no comprimento de onda 280 nm para soluções 0,6 mg/mL, 1,2 mg/mL, 2,0 mg/mL e 4,0 mg/mL e sempre obedecendo o limite de um máximo 0,8 de absorbância.
- Ácido acético, ECIBRA, p.a.
- Bicarbonato de sódio, MERCK, p.a.
- Borato de sódio - Bórax, VETEC, p.a.
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), REAGEN, p.a.
- 1-Tetradecanol, FLUKA, p.a., 97,0% (CG).

- Etanol, CHEMCO, p.a.
- 1-Octanol, BDH, p.a.
- Ácido clorosulfônico, EASTMAN ORGANIC CHEMICALS - KODAK.
- Tris (hidroximetil)aminometano, ou THAM, $C_4H_{11}O_3N$, RIEDEL-DE HÄENAG, foi triturado e recristalizado por sublimação a vácuo em atmosfera de nitrogênio sob temperatura de 140 °C durante uma hora.⁶⁴ Sua pureza foi determinada por titulação potenciométrica (potenciômetro digital da Metrohm Herisau E-500) com HCl 0,01 M, mostrando ser 99% molar.
- Ácido clorídrico, MERCK, p.a.
- Biftalato de potássio, REAGEN, p.a.
- As soluções de tampão foram preparadas segundo o procedimento: tampão acetato pH 3,5 e força iônica $I=0,01$ M ($5,4 \times 10^{-5}$ mol de $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ /litro + $9,4 \times 10^{-4}$ M de CH_3COOH /litro); tampão fosfato pH 7,0 e força iônica $I=0,01$ M ($3,1 \times 10^{-4}$ mol de K_2HPO_4 /litro + $6,8 \times 10^{-4}$ mol de KH_2PO_4 /litro); o tampão bórax pH 9,0 e $I=0,01$ M foi preparado diretamente do frasco que continha o mesmo, com sua devida especificação da faixa de variação de pH. No ponto isoelétrico da Tripsina $pH(I) = 4,0$ foi utilizado a solução tampão biftalato pH 4,0, força iônica 10 mM.
- Membrana de diálise Viskase Inc., *cut-off (ou corte)* de 8000. A membrana de diálise foi previamente tratada utilizando o seguinte procedimento.⁶⁵
 - i) Inicialmente a membrana foi lavada com água bidestilada durante 48 horas sob agitação a temperatura ambiente;
 - ii) a membrana foi transferida para um béquer de 500 mL contendo solução de etanol 50% e mantida sob refrigeração por 10 horas. As etapas (i) e (ii) foram repetidas duas vezes;
 - iii) em seguida a membrana foi mantida sob agitação durante uma hora numa solução de bicarbonato de sódio 10 mM;

iv) após o tratamento com bicarbonato de sódio, a membrana foi colocada num béquer de 500 mL contendo uma solução de EDTA 1 mM e mantida por 30 minutos. Em seguida a membrana foi lavada com água bidestilada por cerca de 48 horas sob agitação e depois guardada dentro de um frasco fechado contendo solução de azoteto de sódio 1 mM e mantida na geladeira.

2.2 EQUIPAMENTOS

O pH das soluções foi determinado com o pHmetro Micronal, modelo B 371, com o eletrodo de vidro calibrado com soluções de referência pH 4 e 7, fornecido pela Merck.

As medidas de absorção foram feitas nos espectrofotômetro, Beckman DB-G, DMS 100 (Intralab) e Cary 2300 (Varian).

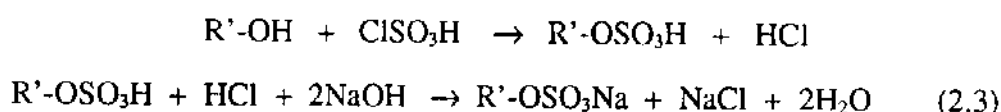
As celas de diálise foram termostatizadas no banho circulador Masterline modelo 2095, e no banho QUIMIS Modelo Q-214, ambos com variação na temperatura menor que 0,5 °C.

As medidas de variação da entalpia de interação dos tensoativos SDS, OSS, DSS, TDSS, DTAB e CPC com Tripsina foram feitos no sistema microcalorimétrico LKB-2277 TAM (*Thermal Activity Monitor*) através da técnica de titulação microcalorimétrica.

A espessura da membrana de acetato de celulose (Viskase Inc.) foi determinada utilizando o aparelho Dermatron digital modelo D9E da UPA Technology, Inc., (Telebrás) usado em medidas de espessuras metálicas e não metálicas. As membranas apresentaram uma espessura de 30 µm.

2.3 SÍNTESE DOS TENSOATIVOS OCTILSULFATO DE SÓDIO E TETRADECILSULFATO DE SÓDIO.

Os tensoativos Octilsulfato de sódio (OSS) e Tetradecilsulfato de sódio (TDSS) foram preparados através da reação (equação 2.3) de sulfonação dos álcoois octanol e tetradecanol respectivamente.



O procedimento utilizado na síntese destes tensoativos consiste das seguintes etapas;⁶⁶

- i) Inicialmente 0,1 mol de ácido clorosulfônico foi adicionado lentamente com agitação em 20 g de éter etílico anidro numa temperatura de 0° a 5 °C;
- ii) 0,1 mol de octanol ou tetradecanol foi dissolvido em 40 g de éter etílico anidro;
- iii) A solução preparada na etapa (ii) foi lentamente adicionada na solução preparada na etapa (i) (tempo de adição de ~20 minutos). A mistura foi agitada e purgada com nitrogênio seco durante 35 minutos até remoção total do HCl(g);
- iv) A mistura da etapa (iii) foi neutralizada com NaOH 50% pH 10 e em seguida diluída com 400 mL de álcool isopropílico e 250 mL de água bidestilada.

O tensoativo foi extraído da solução aquosa por agitação com éter de petróleo num funil de separação. Após extração, o éter de petróleo foi evaporado utilizando um evaporador rotatório à vácuo. A purificação dos tensoativos Octilsulfato de sódio (OSS) e Tetradecilsulfato de sódio (TDSS) foi feita através da extração com éter etílico sob refluxo por 8 horas usando um extrator Soxhlet. Após extração, os cristais foram secos a vácuo e mantidos em dessecador.

A caracterização dos tensoativos OSS e TDSS foi feita através das análise de espectros no infravermelho (ver apêndice II), cromatografia de camada delgada e medidas de CMC. A CMC foi medida espectrofotometricamente⁵⁷, e os resultados obtidos foram $1,35 \times 10^{-1}$ M (OSS) e $2,1 \times 10^{-3}$ M (TDSS) respectivamente, mostrando excelente concordância com os dados da literatura⁶⁷ (tab.2.4.1).

2.4 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

2.4.1 UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DO EQUILÍBRIO DE DIÁLISE

Utilizamos a técnica do equilíbrio de diálise para estudar a isoterma de interação Tripsina-Tensoativo. A cela de diálise utilizada neste trabalho foi construída com acrílico e é constituída de dois compartimentos idênticos de dimensões 6 cm x 6 cm com diâmetro interno de 4 cm, conforme é mostrada na figura 2.4.1.

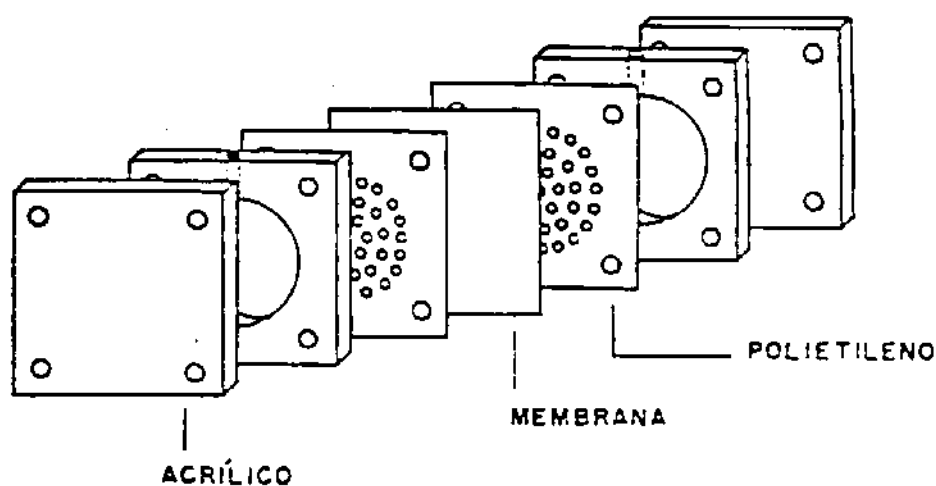


Fig. 2.4.1 Cela de diálise.⁶⁸

Uma membrana de acetato de celulose (Viskase Inc.), com espessura de 30 μm , e retenção de massa molecular *cut-off* da ordem de 8000 separa os dois compartimentos.

As experiências de equilíbrio de diálise foram feitas conforme o seguinte procedimento: adicionou-se primeiramente 6,5 mL da solução tampão da Tripsina em um dos compartimentos e no outro compartimento um volume igual da solução tampão de tensoativo.

Cada experimento de diálise foi sempre feito utilizando 8 celas idênticas, cada cela contendo diferentes concentrações da solução de tensoativo. Para cada tensoativo utilizado, fizemos um experimento de diálise contra somente a solução tampão, para estimar o tempo de equilíbrio da concentração do tensoativo nos compartimentos da cela de diálise. Constatamos que o equilíbrio se dá em torno de 20 horas.

As celas de diálise foram colocadas num banho termostaticado a 25 °C por um período de 24 horas. Os experimentos foram sempre feitos em triplicata e tendo o cuidado de quantificar a possível adsorção do tensoativo na membrana de diálise. Após a diálise, a concentração de tensoativo livre SDS, DSS, TDSS, OSS, e DTAB foi determinada utilizando o método de separação de fase e extração do par iônico tensoativo-corante, conforme descrito por Hayashi,⁶⁹ Few e Ottewill.⁷⁰

Para a determinação da concentração do tensoativo livre CPC foi usada leitura direta da absorbância em 258 nm (espectro de absorção da solução do CPC, apêndice III).

O método do equilíbrio de diálise exige que a concentração do tensoativo antes da diálise esteja bem abaixo da CMC. Utilizamos portanto soluções tamponadas de SDS, DSS e TDSS na faixa de $1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ M, OSS na faixa de $1,0 \times 10^{-3}$ a $7,0 \times 10^{-5}$ M, CPC na faixa de $5,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-5}$ M, e DTAB na faixa de $9,0 \times 10^{-4}$ a $8,0 \times 10^{-5}$ M.

Em todos os experimentos de diálise, a concentração da solução de Tripsina (SIGMA) foi de $2,6 \times 10^{-5}$ M (0,6mg/mL). Para garantir que as soluções dos tensoativos fossem preparadas abaixo da CMC nos tampões acetato, fosfato e bórax foi necessário determinar a CMC utilizando o método espectrofotométrico tendo como sonda, os corantes azul de metileno e orange II conforme descrito por Ray e Némethy.⁵⁷ Os resultados da CMC obtidos estão apresentados na tabela 2.4.1

Tab. 2.4.1 CMC das soluções de tensoativos nos pH's 3,5; 7,0 e 9,0 obtidos pelo método espectrofotométrico a 298 K.

Tensoativo em tampão	CMC* em tampão mol.L ⁻¹	CMC em água ^{67,71} mol.L ⁻¹
OSS pH 3,5 pH 7,0 pH 9,0	1,3x10 ⁻¹ 1,3x10 ⁻¹ 1,3x10 ⁻¹	1,3x10 ⁻¹
SDS pH 3,5 pH 7,0 pH 9,0	7,9x10 ⁻³ 8,0x10 ⁻³ 7,8x10 ⁻³	8,2x10 ⁻³
DSS pH 3,5 pH 7,0 pH 9,0	2,8x10 ⁻² 3,0x10 ⁻² 2,9x10 ⁻²	3,3x10 ⁻²
TDSS pH 3,5 pH 7,0 pH 9,0	2,1x10 ⁻³ 2,1x10 ⁻³ 2,1x10 ⁻³	2,10x10 ⁻³
CPC pH 3,5 pH 7,0 pH 9,0	8,3x10 ⁻⁴ 8,3x10 ⁻⁴ 8,3x10 ⁻⁴	9,0x10 ⁻⁴
DTAB pH 3,5 pH 7,0 pH 9,0	1,5x10 ⁻² 1,5x10 ⁻² 1,5x10 ⁻²	1,5x10 ⁻²

* O método utilizado para a determinação da CMC apresentou um erro de $\pm 1\%$.

2.4.2 MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO DE TENSOATIVO IÔNICO LIVRE EM SOLUÇÃO

Na literatura existem diferentes técnicas para quantificar a concentração de tensoativo iônico livre em solução, como por exemplo, polarografia,⁷² fluorescência,⁷³ turbidimetria,⁷⁴ cromatografia gasosa⁷⁵ e espectrofotometria UV-VIS.^{69,70,76}

Mukerjee⁷⁷ foi o precursor na determinação da concentração do SDS em solução utilizando o princípio de partição, que se baseia na extração do par iônico Tensoativo-Corante com um solvente orgânico. Esta técnica, conhecida como método de separação de fase, foi aperfeiçoada por Hayashi.⁶⁹

Determinou-se a concentração dos tensoativos iônicos OSS, DSS, SDS, TDSS e DTAB livre em solução baseado na complexação da molécula do tensoativo com a molécula de um corante de carga oposta formando um par iônico estável o qual foi extraído da fase aquosa utilizando como solvente o clorofórmio. A concentração da espécie Tensoativo-Corante foi determinada utilizando a espectrofotometria no UV-VIS (o coeficiente de absorvidade molar do par iônico Tensoativo-Corante é alto). Esta técnica é sensível, precisa e não influenciada pela presença de proteínas em solução, permitindo a determinação de quantidades de tensoativos iônicos em concentrações baixas⁶⁹ da ordem de 10^{-5} a 10^{-8} M, sendo portanto de grande interesse em análises de rotina, principalmente na determinação de tensoativos em efluentes, particularmente em água servidas, rios e água potável.⁷⁸

Após cada experimento de equilíbrio de diálise, a solução do tensoativo livre (SDS, DSS, TDSS, OSS e DTAB) é complexada com o corante específico, extraída com clorofórmio e a concentração do par iônico determinada utilizando uma curva de calibração (absorbância versus concentração da espécie Tensoativo-Corante). A tabela 2.4.2 contém os dados de concentração, volume e absorbância (Abs) utilizados na construção da curva de calibração para a determinação da concentração do tensoativo DSS livre em tampão acetato pH 3,5 e força iônica 10 mM (figura 2.4.2). O tensoativo DSS foi usado para exemplificar o método de extração do par iônico Tensoativo-Corante. Neste caso o corante utilizado foi o azul de metileno (AZM) em concentrações de $2,0 \times 10^{-4}$ M.

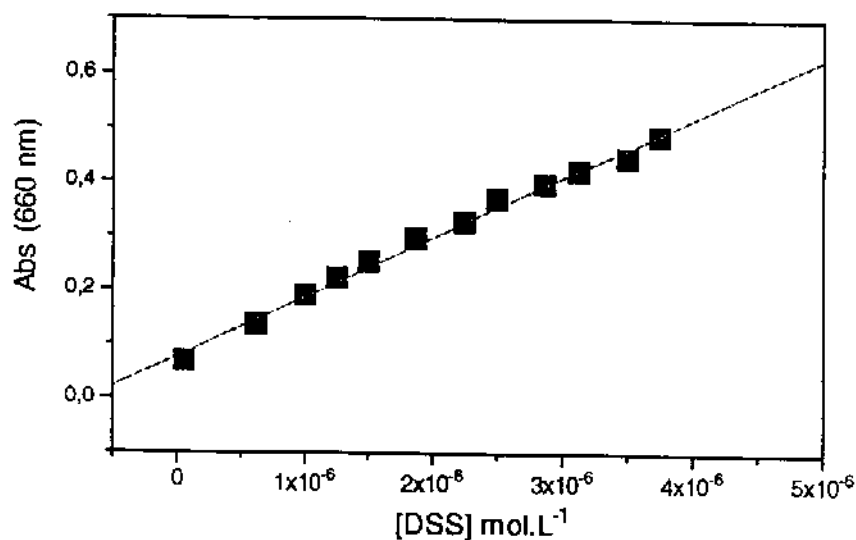


Fig. 2.4.2. Curva de calibração para soluções de DSS no pH 3,5, força iônica 10 mM usando azul de metileno como corante a 298K.

Tab. 2.4.2 Dados de calibração para determinar a concentração de tensoativo iônico livre em solução, pH 3,5 a 298 K.

[DSS] mol.L ⁻¹	Vol.(mL) [DSS]	Vol.(mL) T. Acetato	Vol.(mL) AZM	Vol.(mL) CHCl ₃	Abs 660 nm
3.75×10^{-6}	3,0	0,0	2,0	3,0	0,485
$3,5 \times 10^{-6}$	2,8	0,2	2,0	3,0	0,445
$3,13 \times 10^{-6}$	2,5	0,5	2,0	3,0	0,42
$2,87 \times 10^{-6}$	2,3	0,7	2,0	3,0	0,395
$2,5 \times 10^{-6}$	2,0	1,0	2,0	3,0	0,366
$2,25 \times 10^{-6}$	1,8	1,2	2,0	3,0	0,325
$1,87 \times 10^{-6}$	1,5	1,5	2,0	3,0	0,294
$1,5 \times 10^{-6}$	1,2	1,8	2,0	3,0	0,253
$1,25 \times 10^{-6}$	1,0	2,0	2,0	3,0	0,221
$1,0 \times 10^{-6}$	0,8	2,2	2,0	3,0	0,190
$6,25 \times 10^{-7}$	0,5	2,5	2,0	3,0	0,136
$6,25 \times 10^{-8}$	0,05	2,95	2,0	3,0	0,067

Os dados apresentados nesta tabela foram obtidos usando solução estoque de DSS em tampão acetato na concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ M. As curvas de calibração para a determinação da concentração de tensoativo livre foram sempre preparados utilizando de sete a doze tubos de ensaio contendo tensoativo aniônico, tampão, azul de metileno (AZM) $2,0 \times 10^{-4}$ M e clorofórmio. Estes tubos foram colocados dentro de um banho termostaticado a 25 °C durante 2 horas com agitação a cada 20 minutos. Constatamos que o tempo necessário para extrair o par iônico tensoativo-AZM foi de duas horas.

Em seguida os tubos foram centrifugados à 2000 RPM por 5 minutos e posteriormente a fase orgânica foi analisada no espectrofotômetro (DMS100 e Cary 2300) no comprimento de onda 660 nm, usando uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm. O mesmo procedimento foi adotado para a determinação do tensoativo catiônico DTAB sendo que neste caso utilizou-se o corante aniônico Orange II. Dados das curvas de calibração utilizadas nos experimentos de equilíbrio de diálise para os outros tensoativos estão contidos no apêndice IV.

2.4.3 TITULAÇÃO MICROCALORIMÉTRICA

Neste trabalho, a determinação da variação da entalpia de interação Tripsina-Tensoativo foi feita utilizando um microcalorímetro TAM (*Thermal Activity Monitor*), LKB 2277, no seu modo de titulação. Este microcalorímetro tem um limite de sensibilidade de $0,15 \mu\text{Watts}$.⁷⁹ A unidade microcalorimétrica (1) e a cela de reação (2) estão mostradas na figura 2.4.3.1.

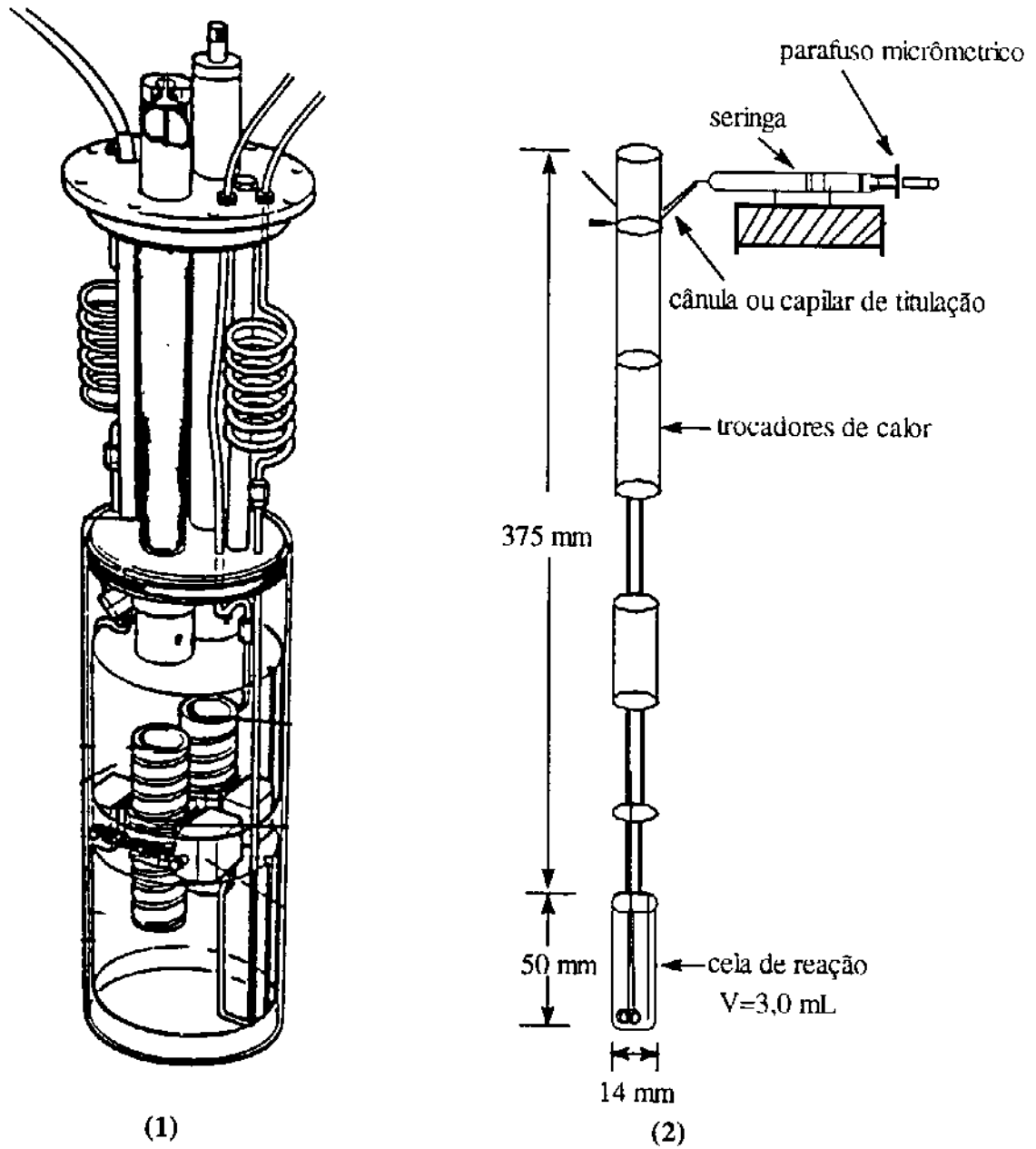
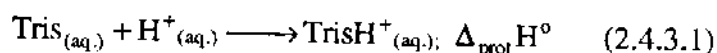


Fig. 2.4.3.1 Unidade microcalorimétrica (1), e cela de reação (2).

Antes de iniciarmos o estudo térmico da interação Tripsina-Tensoativo usando o microcalorímetro TAM, fizemos uma calibração no sistema microcalorimétrico no seu modo de titulação utilizando para isto a reação de protonação do Tris(hidroximetilaminometano). Esta reação, proposta por Wadsö⁸⁰ é atualmente recomendada pela IUPAC passando a ser uma reação padrão em diversos laboratórios que utilizam técnicas microcalorimétricas para verificar a precisão e exatidão do calorímetro.^{81,82,83}

A medida da variação da entalpia de protonação do Tris:



foi feita utilizando solução de Tris 1,0 mM e solução titulante de HCl 10 mM. 2,0 mL da solução de Tris foi colocada no interior da cela de reação, figura 2.4.3.1 é através de uma microseringa Hamilton (500 µL) previamente calibrada (cada 3 voltas no parafuso micrométrico corresponde a 26,0±0,13 µL) foram feitas adições de 26 µL da solução titulante de HCl. O registro da curva de titulação entalpimétrica foi feito com o auxílio de um registrador (KNAUER modelo D-6360) acoplado ao microcalorímetro. A figura 2.4.3.2 mostra o perfil da parte do entalpograma de titulação do Tris com HCl para apenas as tres primeiras adições. Sete aliquotas de 26 µL de HCl foram adicionadas para a calibração.

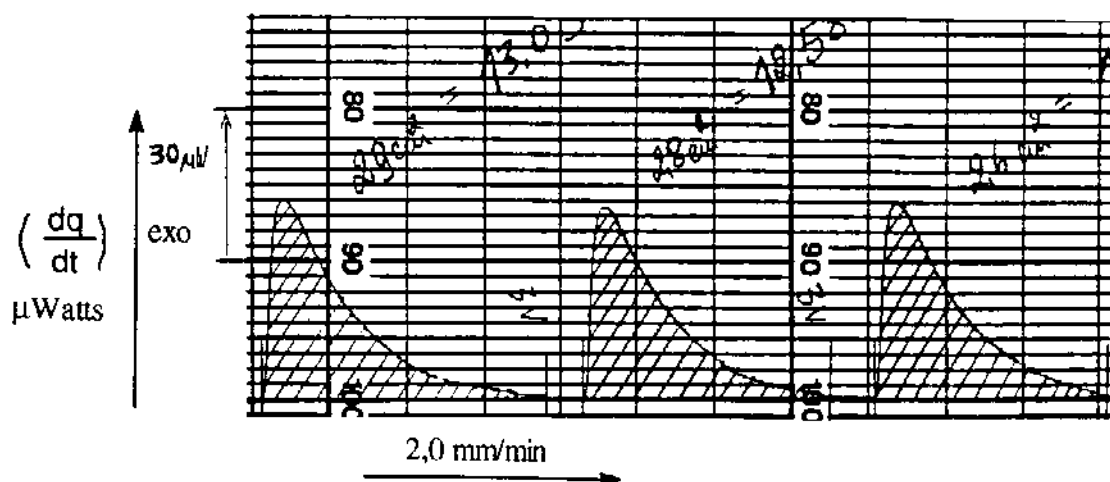


Fig.2.4.3.2 Parte do entalpograma de titulação da reação do Tris 1 mM com HCl 10 mM a 298 K.

O calor observado para cada uma das sete adições de 26 μL de HCl esta contido na tabela 2.4.3.

Tab. 2.4.3 Titulação do Tris 1,0 mM com HCl 10,0 mM a 298 K

N ^o moles de HCl	- Q _{obs} (mJ)	- ΣQ_{obs} (mJ)
0,0	0,0	0,0
$2,6 \times 10^{-7}$	8,54	8,54
$5,17 \times 10^{-7}$	13,03	21,57
$7,77 \times 10^{-7}$	13,03	34,60
$1,04 \times 10^{-6}$	13,03	47,63
$1,30 \times 10^{-6}$	13,03	60,66
$1,56 \times 10^{-6}$	12,58	73,24
$1,82 \times 10^{-6}$	11,68	84,92

O cálculo da entalpia de protonação $\Delta_{\text{prot}}\text{H}^\circ$ corresponde ao coeficiente angular da reta,⁸⁴ figura 2.4.3.3 obtida do gráfico ΣQ_{obs} em função do número de moles de HCl para os dados da tabela 2.4.3.

$$Q_{obs} = \Delta_{\text{prot}}\text{H}^\circ \cdot n \quad (2.4.3.2)$$

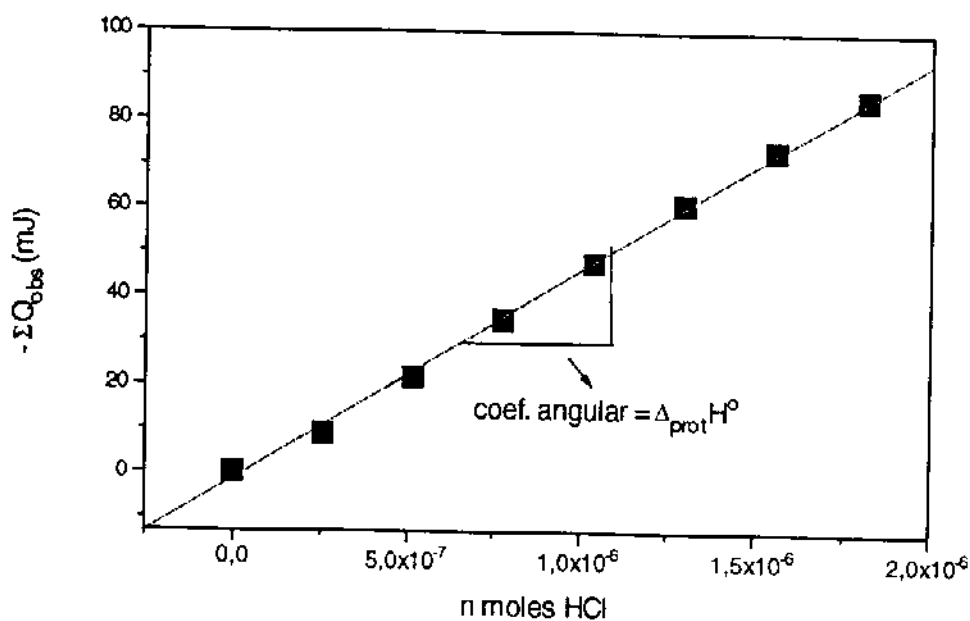


Fig. 2.4.3.3. Titulação microcalorimétrica do Tris 1 mM com HCl 10 mM a 298 K.

O valor da entalpia de protonação do Tris $\Delta_{\text{prot}}H^\circ$ calculado do gráfico utilizando o método de regressão linear foi de $-47,43 \pm 0,70 \text{ kJ.mol}^{-1}$, concordante com os valores encontrados na literatura, na faixa de $(-47,44 \pm 0,05 \text{ a } -47,04 \pm 0,06 \text{ kJ.mol}^{-1})$.^{85,86}

A calibração com sistemas em que o efeito térmico é muito pequeno foi feita através da medida da entalpia de micelização do tensoativo aniônico SDS ($\Delta_f H_{\text{mic}}^\circ$) em água a 25°C utilizando a técnica de titulação microcalorimétrica, que resultou no valor de $-1,45 \pm 0,20 \text{ kJ.mol}^{-1}$ sendo concordante com a maioria dos valores negativos descritos na literatura (faixa de $-0,20 \text{ a } -2,13 \text{ kJ.mol}^{-1}$).⁸⁷

Além da calibração utilizando uma reação química padrão o microcalorímetro foi também calibrado utilizando o recurso de calibração elétrica estática. Esta calibração recomendada no manual do equipamento pode ser programada e é baseada no calor dissipado por uma resistência elétrica padrão alojada na base da cela de reação. O valor da corrente elétrica i (ampére), da resistência R (ohms) e do tempo t (segundos) são conhecidos e um microprocessador contido no microcalorímetro realiza a operação de calibração elétrica automaticamente sempre que requisitada. O calor dissipado na cela de reação ou trabalho elétrico⁸⁸ é: $W_{\text{el}} = R(\text{ohm}) \cdot i^2(\text{ampére})^2 \cdot t(\text{segundos}) = \text{Joules}$.

A figura 2.4.3.4 mostra o perfil da curva de uma calibração elétrica realizada durante um determinado tempo. No ponto "F", o microcalorímetro interrompe automaticamente a calibração.

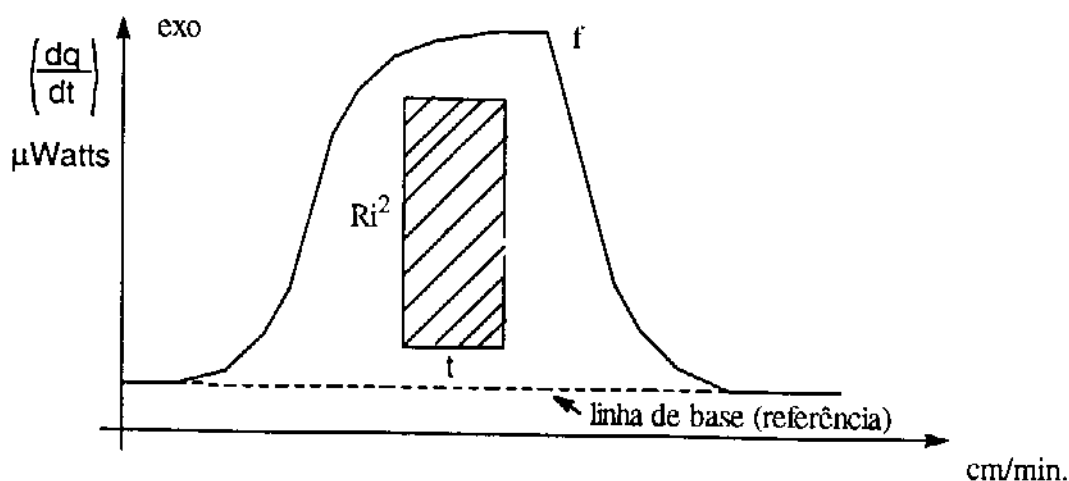


Fig. 2.4.3.4 Representação esquemática da curva de calibração elétrica estática.

O método utilizado para calcular o efeito térmico da reação de interação Tripsina-Tensoativo e conseqüentemente a variação da entalpia de interação foi baseado na calibração elétrica. Este método constitui em calcular em termos de energia (Joules), a área de uma figura retangular debaixo do entalpograma dq/dt (mWatts) versus t (segundos), figura 2.4.3.4. O lado maior deste retângulo tem unidades de fluxo de calor dq/dt (mWatts) = Ri^2 e o lado menor tem unidade de tempo (segundos), portanto a área deste retângulo é: $\text{Área} = (dq/dt) \cdot t = Ri^2 t = \text{Joules}$.

Uma vez determinada uma área em unidade de energia no papel do registrador, o efeito térmico da interação Tripsina-Tensoativo é calculado por comparação.

PARTE III
RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 VARIAÇÃO DA ENERGIA LIVRE DE INTERAÇÃO TRIPSINA-TENSOATIVO

A interação Proteína-Tensoativo é um processo cooperativo, isto é, quando uma molécula do tensoativo interage com um sítio ativo da proteína (regiões hidrofóbicas e ionizadas), favorece diferentes interações subsequentes. Os tensoativos podem interagir com proteínas através de tres modos distintos;⁹

- i) interação com sítios ligantes específicos da proteína nativa;
- ii) interação cooperativa com a proteína sem grandes mudanças conformacionais;
- iii) interação cooperativa com consequente desnaturação da proteína.

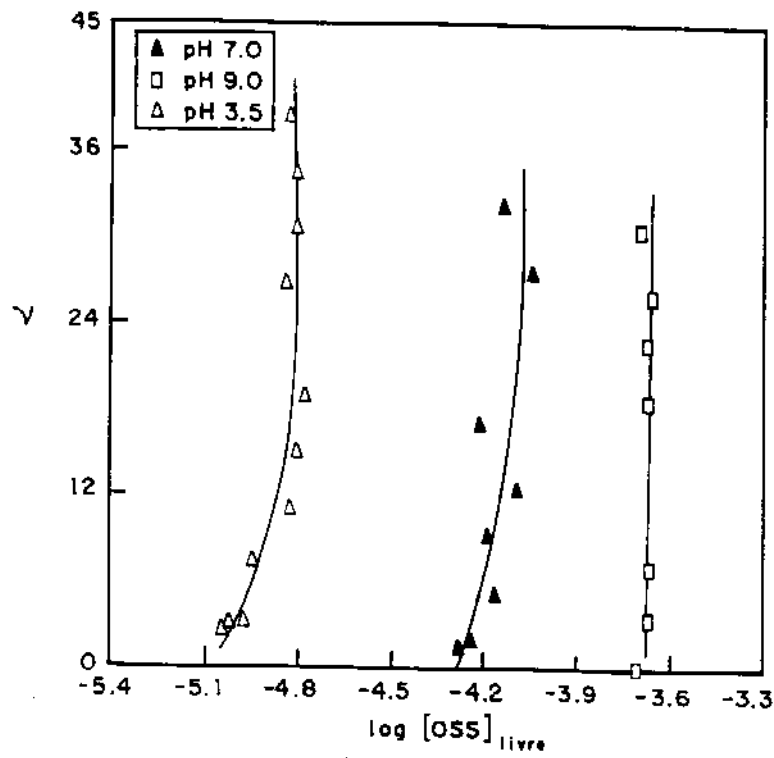
Este último tipo de interação é comum entre tensoativos e proteínas globulares, onde geralmente com baixas concentrações do tensoativo a estrutura nativa da proteína é modificada, passando a ter uma conformação estendida com os seus resíduos hidrofóbicos desprotegidos e interagindo com a molécula de tensoativo.⁹ Em geral, os tres modos de interação Proteína-Tensoativo são interpretados pelos modelos propostos por Scatchard e Wyman.⁸⁹

Neste trabalho, realizamos um estudo sistemático da interação Tripsina-Tensoativo com uma série homóloga de tensoativo aniônico n-alkilsulfato de sódio [C₈ (OSS), C₁₀ (DSS), C₁₂ (SDS) e C₁₄ (TDSS)] em pH 3,5; 7,0 e 9,0. A interação com dois tensoativos catiônicos CPC e DTAB foi também estudada nas mesmas condições.

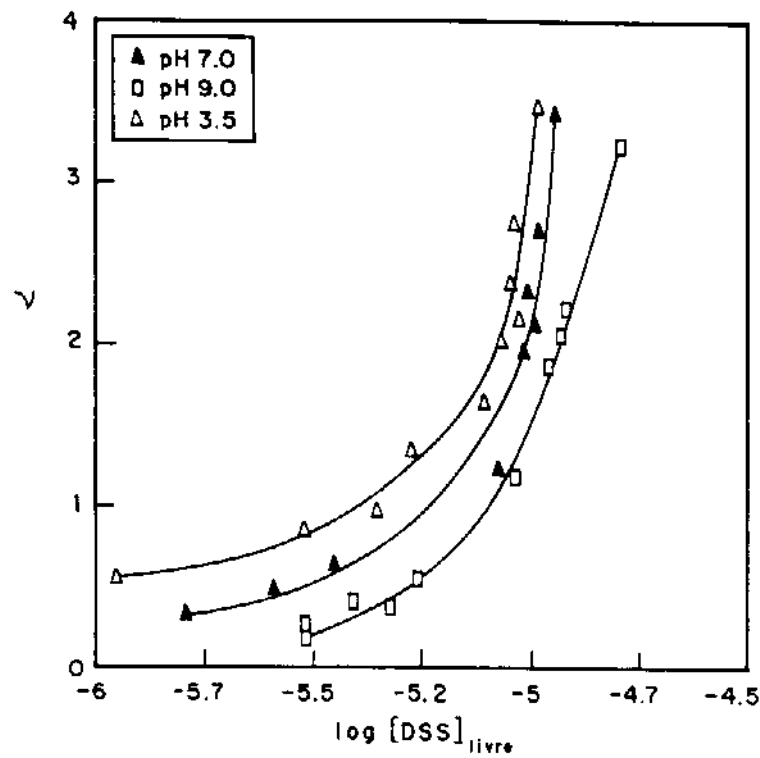
As isotermas de interação dos tensoativos OSS, DSS, SDS, TDSS, CPC e DTAB com Tripsina em tres soluções tampão pH 3,5; 7,0 e 9,0 com força iônica 10 mM obtidas por equilíbrio de diálise são mostradas nas figuras 3.1.(a) a 3.1.(f) respectivamente. Dependendo do pH, as isotermas de interação Tripsina-Tensoativo mostram cooperatividade diferente para cada tensoativo, indicando um aumento da afinidade do sítio ligante da proteína em relação ao aumento da concentração do tensoativo livre. A cooperatividade no sistema Tripsina-Tensoativo pode ser observada pela grande variação do valor de v em função da concentração de tensoativo livre.

Para valores de v maiores que 40 (SDS, OSS e DTAB), maiores que 3 (DSS e TDSS) e maior que 10 (CPC), ocorre a precipitação da Tripsina. Verificamos que as isotermas de interação Tripsina/SDS, Tripsina/OSS e Tripsina/DTAB apresentaram um valor muito alto para v em comparação com os tensoativos DSS, TDSS e CPC, indicando uma maior cooperatividade com o aumento da concentração do tensoativo livre. Este comportamento para o SDS e OSS, foi também confirmado recentemente por Sarmiento et al ¹⁸ que estudaram a interação de n-alkilsulfato de sódio com insulina em solução aquosa nos pH's 3,2 e 10 a 25 °C. Neste estudo verificaram que a isoterma de interação Insulina-Tensoativo é pouco dependente do pH do meio e v ocorre numa faixa de 60 a 70 moléculas de tensoativo por molécula de Insulina.

Neste trabalho, observamos que embora o valor de v para as isotermas Tripsina-OSS, figura 3.1(a) e Tripsina-SDS, figura 3.1(c) tenham a mesma ordem de grandeza, comparados com os dados para insulina,¹⁸ a isoterma de interação Tripsina-OSS é altamente dependente do pH do meio, o que mostra diferença nos sítios de interação destas enzimas, além do fato de que para a interação com a Tripsina, a hidrofobicidade do tensoativo tem importante contribuição.

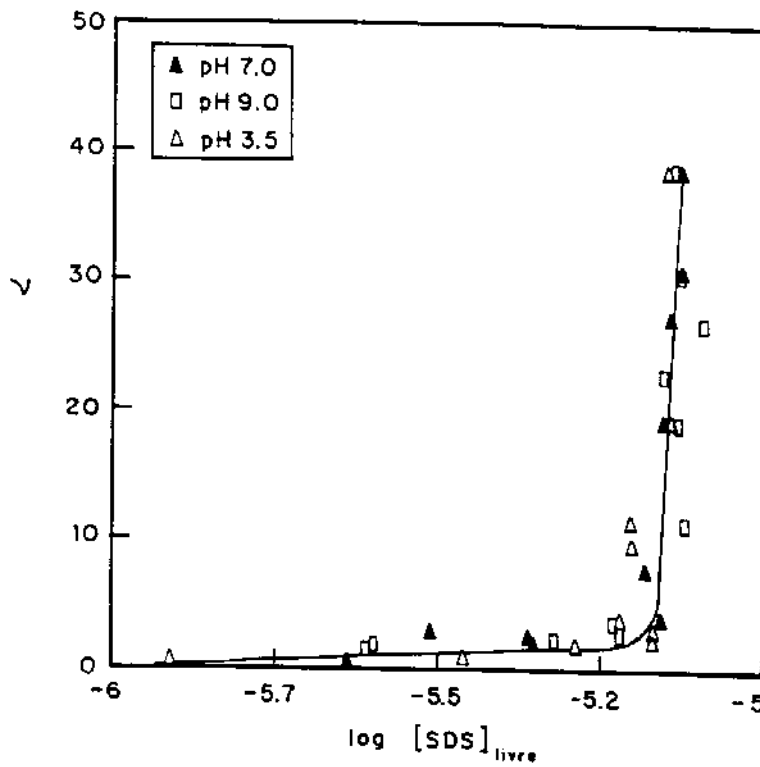


(a) OSS (C₈)

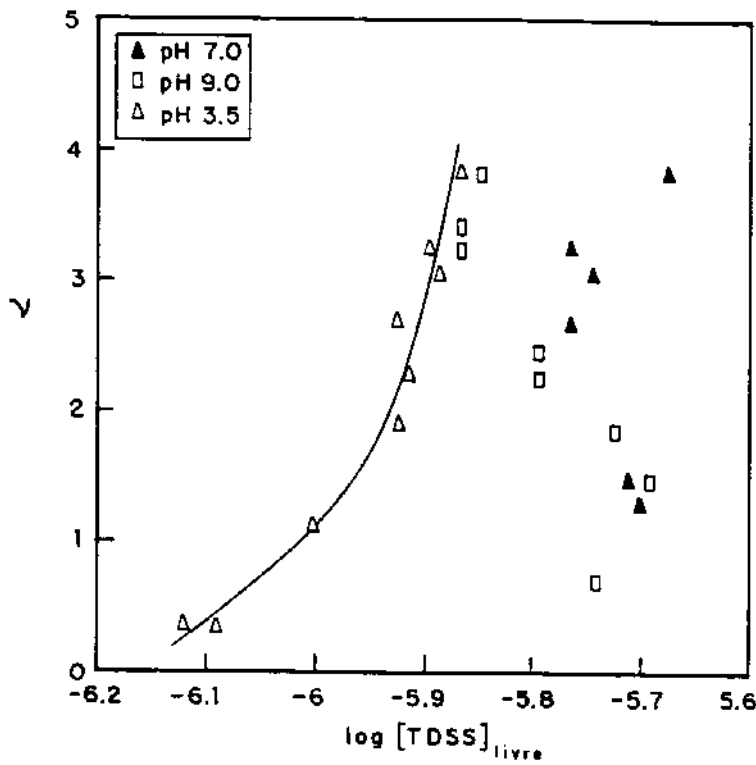


(b) DSS (C₁₀)

Fig. 3.1. Isoterma de interação (a) Tripsina-OSS (C₈), (b) Tripsina-DSS (C₁₀) nos pH's 3,5; 7,0 e 9,0 a 298 K.

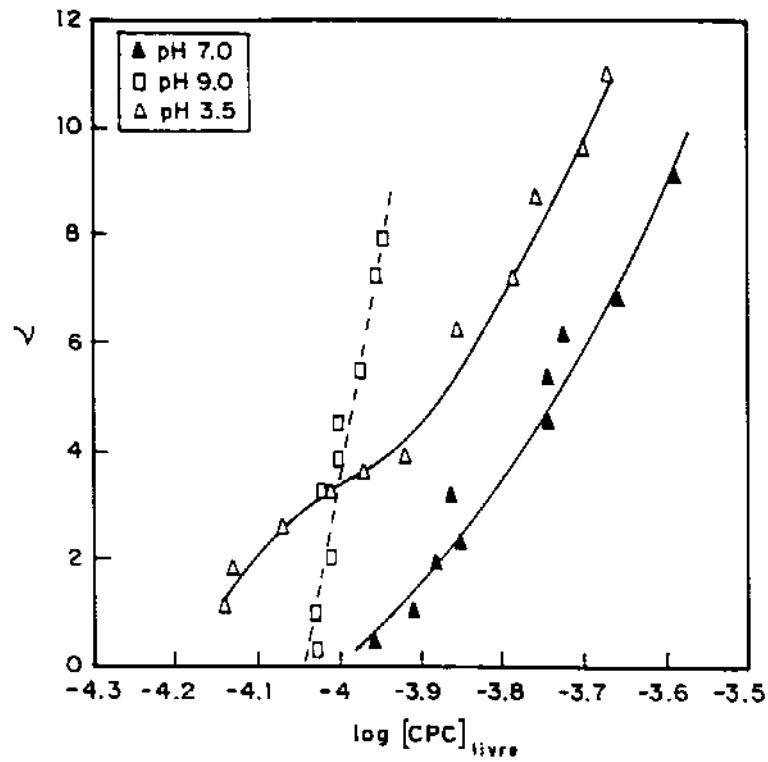


(c) SDS (C₁₂)

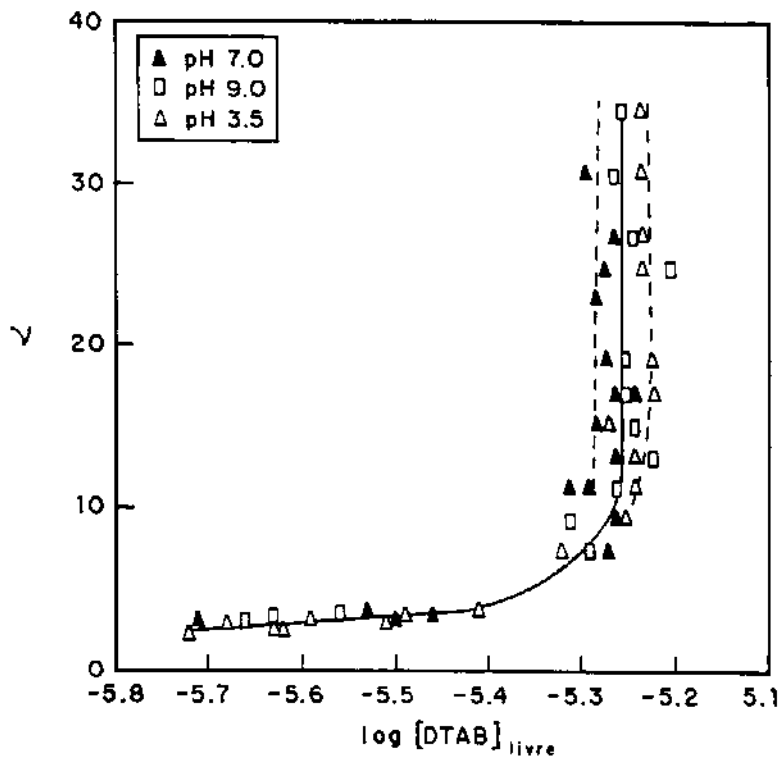


(d) TDSS (C₁₄)

Fig. 3.1 Isotherma de Interação (c) Tripsina-SDS (C₁₂), (d) Tripsina-TDSS (C₁₄) nos pH's 3,5; 7,0 e 9,0 a 298 K.



(e) CPC



(f) DTAB

Fig. 3.1 Isotherma de Interação (e) Tripsina-CPC, (f) Tripsina-DTAB nos pH's 3,5; 7,0 e 9,0 a 298 K.

Analisando as isotermas de interação da série homóloga dos tensoativos aniônicos n-alkilsulfato de sódio OSS, DSS, SDS e TDSS com a Tripsina em pH 3,5; 7,0 e 9,0, figuras 3.1(a) a 3.1(d) observamos que com o aumento da cadeia carbônica do tensoativo e conseqüentemente da sua hidrofobicidade, a isoterma de interação torna-se menos dependente do pH, isto é, as isotermas se aproximam. A interação do tensoativo SDS é o exemplo marcante desta situação. Entretanto, para o tensoativo TDSS o mais hidrofóbico da série, a isoterma de interação torna-se novamente dependente do pH.

Para a interação Tripsina-TDSS não conseguimos uma resolução da isoterma para os pH's 7,0 e 9,0. Observamos nestas condições a precipitação da enzima.

Para os tensoativos OSS, DSS e TDSS, figuras 3.1(a,b,d) observamos que a cooperatividade aumenta com o pH e que os modos cooperativos de interação requerem maior concentração do tensoativo na forma monomérica que aquela necessária para a interação com sítios específicos na proteína nativa.

Para os tensoativos aniônicos da série homóloga dos n-alkilsulfato de sódio observamos que a concentração de tensoativo livre na região de saturação no pH 3,5 diminui na ordem TDSS<SDS<DSS<OSS isto é com o aumento do caráter hidrofóbico do tensoativo da série, pois a isoterma de interação Tripsina-SDS apresenta comportamento semelhante nos tres pH's.

A solubilidade da tripsina na solução tampão pH 3,5; 7,0 e 9,0 é um balanço crítico entre a sua carga e sua hidrofobicidade. O efeito da carga na sua solubilidade é demonstrado no caso da sua precipitação em pH 4,0 (ponto isoelétrico). Da mesma maneira, a interação de um tensoativo com uma proteína globular é determinada pela densidade de carga da parte polar e da sua hidrofobicidade.

Estudos estruturais ³⁷ mostram que a molécula da Tripsina tem resíduos ionizáveis, como os resíduos de aminoácidos básicos (15 lisina, 2 arginina e 4 histidina) e resíduos ácidos (5 ácido aspártico e 3 ácido glutâmico). No pH 3,5 lisina e arginina estão ionizadas, pois os valores de pK destes aminoácidos estão na faixa de 10,3 a 10,6 e de 12,7 a 13,3 ²⁸ respectivamente, significando que a molécula de Tripsina neste pH tem 17 cargas positivas. Por outro lado, em pH 7,0 os resíduos ionizados são 5 ácido aspártico e 3 ácido glutâmico, pois os valores de pK destes aminoácidos estão na faixa de 3,0 a 4,7 e de 2,7 a 4,7 respectivamente.

Portanto, o valor da carga líquida da Tripsina em tampão acetato pH 3,5 é +17 e em tampão fosfato pH 7,0 e tampão borato pH 9,0 é -8. Em pH 3,5 predomina na Tripsina uma carga líquida positiva e as figuras 3.1.(a), 3.1.(b) e 3.1.(d) mostram uma maior interação dos tensoativos aniônicos OSS, DSS e TDSS com a Tripsina em pH baixo, provavelmente devido à interação eletrostática entre o ânion OS⁻, DS⁻ e TDS⁻ e a superfície da proteína.

Para o tensoativo aniônico SDS, não observamos diferença na isoterma de interação com a Tripsina nos pH's 3,5; 7,0 e 9,0, figura 3.1(c). Em adição à neutralização das cargas positivas da Tripsina, a interação do íon DS^- devido ao tamanho da sua cadeia carbônica introduz grande hidrofobicidade à superfície da Tripsina. Não foi possível obter a isoterma de interação Tripsina-Tensoativo nos pH's 7,0 e 9,0 devido à precipitação da proteína.

No caso da interação do tensoativo catiônico CPC com a Tripsina em pH 3,5 e 7,0, observa-se que mesmo em pH baixo, o favorecimento de uma maior interação dos cátions CP^+ com a Tripsina deve-se provavelmente a grande hidrofobicidade do CPC. Em pH 9,0 esta interação foi mais forte com pequena variação na concentração do CPC livre, conforme é mostrado na figura 3.1(e), sendo que para a interação Tripsina/DTAB não observamos diferença na isoterma de interação.

As isotermas de interação Tripsina-Tensoativo mostram uma significativa mudança na forma com a hidrofobicidade da cadeia do tensoativo. Para SDS (C_{12}) há uma quebra na isoterma a $v \cong 3$, figura 3.1(c) enquanto para o DSS (C_{10}), figura 3.1 (b) ocorre uma quebra na isoterma a $v \cong 1,5$ para pH 3,5 e menos do que 1 para pH's 7,0 e 9,0 respectivamente. Para o TDSS (C_{14}), figura 3.1(d) ocorre uma quebra na isoterma a $v \cong 1,5$ em pH 3,5. O OSS (C_8), figura 3.1(a), pelo fato de ser o tensoativo aniônico menos hidrofóbico da série, mostrou alta cooperatividade e conseqüentemente uma quebra na isoterma com valor de v muito pequeno.

É possível que a quebra na isoterma do SDS, figura 3.1(c) corresponde à interação iônica específica inicial de cerca de 3 íons tensoativos DS^- nos sítios catiônicos da lisina, muitos dos quais estão localizados próximos à superfície da proteína. Estudos cristalográficos do sistema lisozima-SDS foram feitos por Yonath et al,⁹⁰ mostraram que o SDS interagiu em três lugares diferentes da proteína mas com um aspecto comum o qual é provavelmente característico da interação do SDS: a cadeia carbônica forma interações hidrofóbicas, enquanto a parte polar OSO_3^- interage com aminoácidos carregados.

A região inicial da isoterma de interação do SDS presumivelmente representa a saturação de quase todos os sítios de interação catiônicos. O DSS e o OSS por serem menos hidrofóbicos que o SDS apresentaram um menor valor de v na região de quebra da isoterma.

A taxa de aumento de v no início das isotermas dos n-alkilsulfato de sódio, OSS, DSS, SDS e TDSS em pH 3,5, figuras 3.1 (a) a 3.1 (d) comparativamente ao aumento do comprimento da cadeia carbônica do íon tensoativo demonstra o papel relativo das interações iônicas e hidrofóbicas isto é em baixas concentrações do tensoativo predominam as interações iônicas. Para que ocorram interações específicas, é claramente necessário ter ambos o grupo polar e a cadeia carbônica para fazer a interação hidrofóbica com a proteína. Em pH 7,0 e 9,0 as isotermas de interação do OSS e DSS figuras 3.1(a) e 3.1(b) respectivamente é deslocada para valores mais altos de concentração de tensoativo livre indicando que as interações iônicas específicas não são tão evidentes.

A região inicial horizontal de uma isoterma obtida com o tratamento de Wyman é em geral atribuída à interação hidrofóbica.⁹¹ Este comportamento reforça o observado para os tensoativos DSS e OSS os quais apresentam uma isoterma com região inicial inclinada sendo menos hidrofóbicos que os tensoativos SDS e TDSS.

Em contraste com as interações específicas altamente cooperativas dos tensoativos aniônicos com a Tripsina em pH baixo, o tensoativo catiônico CPC fornece uma isoterma característica de uma interação fracamente cooperativa e não específica, predominando certamente a contribuição hidrofóbica devido ao tamanho da sua cadeia carbônica pois de todos os tensoativos estudados, o CPC apresenta maior cadeia carbônica.

A interação Tripsina-CPC nos pH's 3,5; 7,0 e 9,0 figuras 3.1(e) ocorre em concentrações mais próximas da sua CMC devido à sua alta hidrofobicidade, enquanto que para os tensoativos aniônicos ocorre muito abaixo da CMC. No pH 9,0 a interação do CPC é altamente cooperativa certamente devido a contribuição das interações iônicas do tensoativo PC^+ com as cargas negativas da Tripsina neste pH. Em pH baixo a interação dos cations PC^+ com a Tripsina deve-se à interação hidrofóbica.

O tensoativo DTAB (C_{12}) mostrou interagir com a Tripsina de modo altamente cooperativo, praticamente insensível ao pH do meio no início do processo de interação apresentando uma isoterma, figura 3.1(f) semelhante ao SDS (C_{12}), ocorrendo uma quebra na isoterma a $v \cong 5$, concordando com o fato de que tensoativos mais hidrofóbicos apresentam um maior valor de v na região de quebra da isoterma. Devido ao erro inerente ao método de determinação de tensoativo livre não foi possível separar a isoterma nos tres pH's utilizadas apos $v \cong 5$.

Os resultados de equilíbrio de diálise obtidos utilizando o tensoativo aniônico SDS (C_{12}) e catiônico DTAB (C_{12}) mostraram que independente da carga do tensoativo, a isoterma de interação destes com a Tripsina tem a mesma forma.

A tabela 3.1, contém os valores da variação da energia livre de interação Tripsina-Tensoativo obtidos pela integração da área sob a isoterma (equações 1.7.7 e 1.7.8), os dados são consistentes com o requisito de que para valores de $v \rightarrow 0$ ΔG_v^0 é uma constante.

Tab. 3.1 Valores da variação da energia livre de interação Tripsina-Tensoativo, nos pH's 3,5; 7,0 e 9,0 a 298 K.

Interação	Faixa de $[S]_{\text{livre}} \text{ mol.L}^{-1}$	Faixa de v	Faixa de $-\Delta G_v^0 \text{ kJ.mol}^{-1}$
Tripsina/TDSS			
pH 3,5	$8,1 \times 10^{-7}$	0,3 - 4,0	4,0 - 8,3
pH 7,0	a	-	-
pH 9,0	$2,2 \times 10^{-6}$	-	-
Tripsina/SDS			
pH 3,5	$2,3 \times 10^{-6}$	0,3 - 40,0	3,4 - 9,8
pH 7,0	a	0,3 - 40,0	2,3 - 9,7
pH 9,0	$8,0 \times 10^{-5}$	0,7 - 40,0	4,3 - 9,8
Tripsina/DSS			
pH 3,5	$2,2 \times 10^{-6}$	0,5 - 3,0	3,0 - 5,0
pH 7,0	a	0,5 - 3,0	1,6 - 3,5
pH 9,0	$1,5 \times 10^{-5}$	0,2 - 3,5	1,4 - 3,6
Tripsina/OSS			
pH 3,5	$9,1 \times 10^{-6}$	2,0 - 38,0	3,6 - 8,0
pH 7,0	a	0,2 - 32,0	0,1 - 4,0
pH 9,0	$2,3 \times 10^{-4}$	0,1 - 34,0	0,1 - 3,5
Tripsina/CPC			
pH 3,5	$1,1 \times 10^{-4}$	0,2 - 10,0	0,1 - 1,2
pH 7,0	a	0,4 - 8,5	0,1 - 1,0
pH 9,0	$2,7 \times 10^{-4}$	0,3 - 10,0	0,1 - 1,5
Tripsina/DTAB			
pH 3,5	$2,0 \times 10^{-6}$	1,0 - 30,0	6,0 - 10,0
pH 7,0	a	1,0 - 30,0	6,0 - 10,0
pH 9,0	$5,9 \times 10^{-6}$	1,0 - 30,0	6,0 - 10,0

Com exceção dos extremos da série homóloga dos n-alquilsulfato de sódio OSS (C_8) e TDSS (C_{14}), observamos que ΔG_v^0 para os tensoativos aniônicos torna-se mais negativo com o aumento do comprimento da cadeia carbônica do DSS (C_{10}) para SDS (C_{12}). Esta tendência não pode ser observada para o TDSS (C_{14}) pelo fato de que este tensoativo precipita a Tripsina em pH 7,0 e 9,0 devido as interações iônicas e efeitos hidrofóbicos. Entretanto no pH 3,5, o valor de ΔG_v^0 é da mesma ordem de grandeza dos outros tensoativos da série. O valor negativo de ΔG_v^0 para o OSS é devido predominantemente à interação iônica, e os dados da tabela 4.1 mostram que para o OSS, ΔG_v^0 torna-se mais negativo no pH 3,5.

Para os tensoativos estudados ΔG_v^0 torna-se mais negativo com o aumento de v . A variação em ΔG_v^0 com o aumento de v implica que após a interação inicial aos sítios da proteína, as interações subsequentes são mais fracas.

Dos resultados obtidos por equilíbrio de diálise concluímos que a interação dos tensoativos aniônicos da série homóloga dos n-alquilsulfato de sódio com a Tripsina em pH 3,5 é de natureza iônica específica seguida de uma interação hidrofóbica não específica. A interação inicial ocorre nos sítios catiônicos da superfície da proteína especificamente nos resíduos lisina, arginina e histidina. Nos pH's 7,0 e 9,0 provavelmente há uma maior contribuição da interação hidrofóbica. No caso dos tensoativos catiônico CPC e DTAB, ΔG_v^0 é insensível ao pH do meio.

Acreditamos que este comportamento se deva a predominância da interação hidrofóbica, uma vez que a parte polar positiva destes tensoativos é muito volumosa e consequentemente com baixa densidade de carga. Embora o CPC tenha 16 carbonos na cadeia carbônica, a variação da energia livre de interação com a Tripsina é menor do que com o DTAB. Este comportamento é provavelmente devido a diminuição de entropia do processo.

3.2 VARIAÇÃO DA ENTALPIA DE INTERAÇÃO TRIPSINA-TENSOATIVO

A variação da entalpia de interação ($\Delta_{int}H^\circ / \text{kJ.mol}^{-1}$) Tripsina-Tensoativo foi determinada experimentalmente utilizando a técnica de titulação microcalorimétrica, conforme foi descrita anteriormente (seção 2.4.3). As medidas foram realizadas usando soluções dos tensoativos aniônicos da série dos n-alkilsulfato de sódio (C_8 , C_{10} , C_{12} e C_{14}), soluções dos tensoativos catiônicos CPC e DTAB em concentrações abaixo da CMC e soluções de Tripsina na faixa de concentração 0,6 a 4,0 mg/mL, todas preparadas no tampão pH 3,5; 7,0 e 9,0 com força iônica 10 mM. Para uma melhor compreensão de como foi determinada a variação da entalpia de interação, descrevemos o exemplo de cálculo da variação da entalpia de interação ($\Delta_{int}H^\circ$) para a titulação do tensoativo OSS com a solução de Tripsina de concentração 2,0 mg/mL. Os dados experimentais obtidos são mostrados na tabela 3.2.1.

Tab. 3.2.1. Resultados da titulação microcalorimétrica Tripsina-OSS em pH 3,5; 7,0 e 9,0 a 298 K.

V_{total} (mL)	N.moles·10 ⁻⁶ de OSS	[OSS]·10 ⁻³ mol.L ⁻¹	$\Sigma Q_{\text{obs}}/\text{mJ}$ pH 3,5	$\Sigma Q_{\text{obs}}/\text{mJ}$ pH 7,0	$\Sigma Q_{\text{obs}}/\text{mJ}$ pH 9,0
2,026	2,6	1,30	14,90	5,74	0,91
2,052	5,2	2,53	29,87	12,00	2,07
2,078	7,8	3,75	44,64	17,88	2,90
2,104	10,4	4,94	57,90	23,62	3,73
2,130	13,0	6,10	70,84	28,77	4,56
2,156	15,6	7,24	82,53	34,29	5,22

Os dados contidos na tabela 3.2.1 mostram o calor observado para cada mol de OSS adicionado na solução de Tripsina, sendo o calor de diluição do OSS na solução tampão e o calor de diluição da Tripsina foram descontados. Em todos os dados tabelados de titulação microcalorimétrica Tripsina-Tensoativo (apêndice V), foram sempre descontados o calor de diluição das soluções. A entalpia de interação Tripsina-OSS, foi calculada utilizando o gráfico da figura 3.2.1, construído com os dados experimentais da tabela 3.2.1, onde na abscissa representamos o número de moles do tensoativo OSS e na ordenada o somatório do calor observado ($\Sigma Q_{\text{obs}}/\text{mJ}$). O coeficiente angular da reta da figura 3.2.1 corresponde ao valor de $\Delta_{\text{int}} H^\circ$ (equação 2.4.3.2).

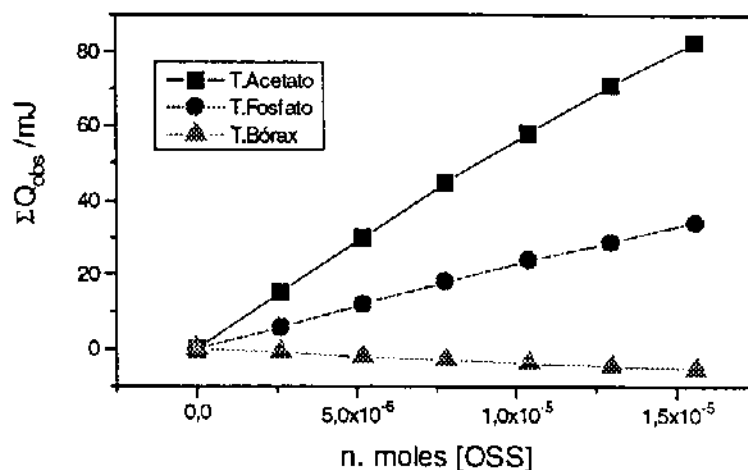


Fig. 3.2.1 - Titulação microcalorimétrica do OSS com a Tripsina nos pH's 3,5; 7,0 e 9,0 a 298 K.

A interação Tripsina-Tensoativo quando estudada pelo método do equilíbrio de diálise (seção 2.4.1) consiste num processo lento de difusão do tensoativo através de uma membrana de diálise e conseqüente interação deste tensoativo, inicialmente em baixíssimas concentrações, com a molécula da proteína. Nestas condições, interações cooperativas de natureza iônica e hidrofóbica ocorrem lentamente com a proteína e são monitoradas até atingir o equilíbrio permitindo desta maneira a construção das isotermas de interação.

No processo de titulação microcalorimétrica para a determinação da variação da entalpia de interação $\Delta_m H^\circ$ Tripsina-Tensoativo, imediatamente após adição do titulante (tensoativo), a concentração deste em contato com a Tripsina é alta e o calor observado é na realidade, mesmo descontando o efeito da diluição dos reagentes, o resultado líquido de todas as interações que ocorrem.

Jones ⁹² e Pfeil ⁹³ verificaram que a desnaturação de proteínas globulares devido à desnaturação de n-alkilsulfato de sódio, é um processo endotérmico.

O valor da variação da entalpia de interação $\Delta_{int}H^\circ$ dos demais tensoativos com a Tripsina foram obtidos segundo o mesmo procedimento descrito para o tensoativo OSS e estão contidos na tabela 3.2.2. Os dados experimentais das titulações microcalorimétricas estão contidos no apêndice V.

Tab. 3.2.2 Valores da variação da entalpia de interação Tripsina-Tensoativo em pH 3,5; 7,0 e 9,0 a 298 K.

SISTEMA	$\Delta_{int}H^\circ$ kJ.mol ⁻¹	[TENSOATIVO]] mol.L ⁻¹
Tripsina/TDSS pH 3,5 pH 7,0 pH 9,0	1,18 ± 0,20 0,90 ± 0,02 2,36 ± 0,20	1,3x10 ⁻⁴ a 7,3x10 ⁻⁴
Tripsina/SDS pH 3,5 pH 7,0 pH 9,0	2,23 ± 0,11 - 8,65 ± 0,10 2,97 ± 0,01	6,4x10 ⁻⁵ a 5,2x10 ⁻⁴
Tripsina/DSS pH 3,5 pH 7,0 pH 9,0	2,50 ± 0,11 - 4,24 ± 0,20 2,46 ± 0,10	1,3x10 ⁻⁴ a 9,4x10 ⁻⁴
Tripsina/OSS pH 3,5 pH 7,0 pH 9,0	5,30 ± 0,11 2,21 ± 0,03 - 0,34 ± 0,01	1,3x10 ⁻³ a 7,3x10 ⁻³
Tripsina/CPC pH 3,5 pH 7,0 pH 9,0	19,63 ± 3,00 15,87 ± 2,50 4,02 ± 0,40	6,4x10 ⁻⁵ a 3,6x10 ⁻⁴
Tripsina/DTAB pH 3,5 pH 7,0 pH 9,0	-0,64 ± 0,03 0,06 ± 0,01 0,30 ± 0,01	1,3x10 ⁻³ a 9,4x10 ⁻³

Podemos observar na tabela 3.2.2 que o valor de $\Delta_{\text{int}}H^\circ$ para a série homóloga dos n-alkilsulfato de sódio no pH 3,5 diminui com o aumento da cadeia carbônica do tensoativo. Esta diminuição no valor de $\Delta_{\text{int}}H^\circ$ pode ser melhor observado na figura 3.2.2 e nos respectivos entalpogramas (fig.3.2.3).

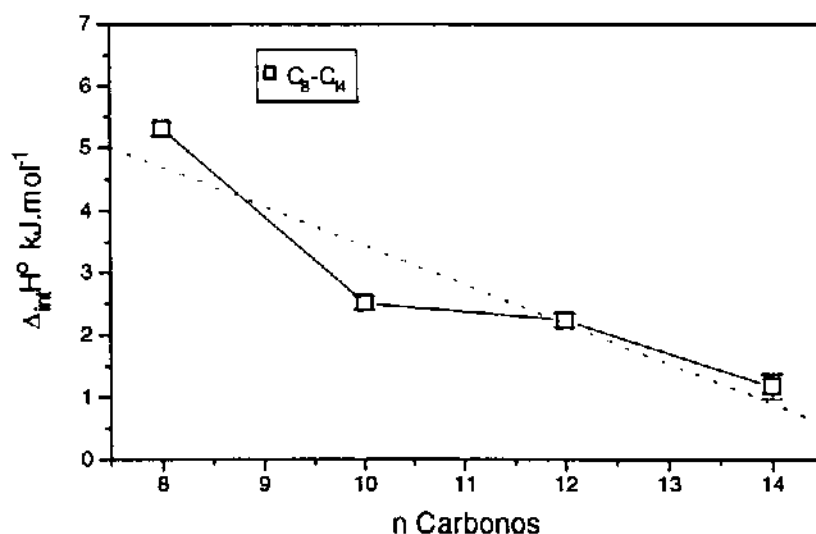


Fig. 3.2.2. Variação da entalpia de interação da série homóloga dos n-alkilsulfato de sódio com Tripsina no pH 3,5 a 298 K.

Na figura 3.2.2, observamos que a variação da entalpia de interação Tripsina-Tensoativo (série homóloga dos n-alkilsulfato de sódio) no pH 3,5 diminuiu linearmente com o aumento da cadeia carbônica do tensoativo. Esta diminuição de $\Delta_{\text{int}}H^\circ$ com o aumento da hidrofobicidade provavelmente deve-se a interação cooperativa, prevalecendo nestas condições o efeito hidrofóbico na desnaturação da Tripsina. Este comportamento é concordante com o observado nas isotermas de interação e comentado na página 59.

A relação linear observada entre a entalpia de interação $\Delta_{\text{int}}H^\circ$ versus número de carbonos da cadeia alquílica é concordante com o comportamento conhecido como regra de Traube.⁹⁴ Embora o valor de $\Delta_{\text{int}}H^\circ$ seja pequeno e endotérmico, com o aumento da cadeia carbônica do tensoativo o processo tende a tornar-se exotérmico, significando que o processo de desnaturação deva ser entropicamente dirigido.

A figura 3.2.3 mostra partes dos entalpograma da titulação microcalorimétrica dos n-alkilsulfato de sódio com Tripsina na solução tampão acetato, pH 3,5.

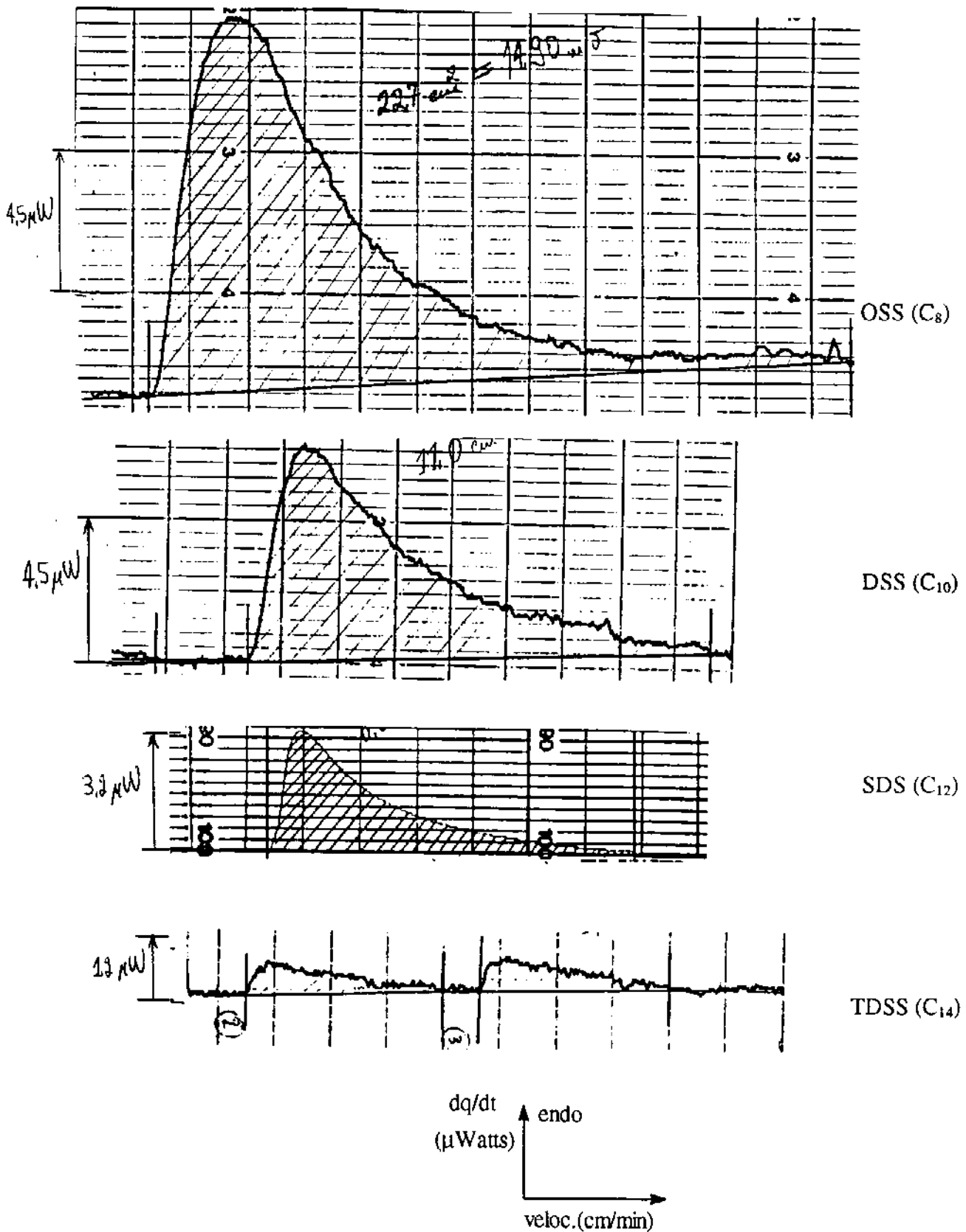


Fig.3.2.3. Partes do entalpograma da titulação microcalorimétrica Tripsina-Tensoativo em tampão acetato pH 3,5, força iônica 10 mM a 298 K.

Utilizando técnicas microcalorimétricas e espectroscópicas, Housaindokht et ali ⁹⁵ estudaram recentemente a interação da proteína globular insulina com n-alkilsulfato de sódio e concluíram que a entalpia de desnaturação contribui com cerca de 85% no valor da entalpia de interação. Estes autores mostraram também, que numa primeira aproximação, a entalpia de interação medida $\Delta_{int}H^{\circ}$ poderá ser expressa em termos da contribuição da entalpia de interação com sítios catiônicos, $\Delta_{cat}H^{\circ}$, de interação hidrofóbica do tensoativo Δ_tH° e da entalpia de desnaturação da proteína Δ_dH° , ou seja;⁹⁵

$$\Delta_{int}H^{\circ} = \Delta_{cat}H^{\circ} + \Delta_tH^{\circ} + \Delta_dH^{\circ} \quad (3.2.1)$$

Nesta aproximação, os autores consideram que extrapolando o valor de $\Delta_{int}H^{\circ}$ para número de carbono zero na cadeia do tensoativo, $\Delta_tH^{\circ} \rightarrow 0$, e Δ_dH° pode ser estimado desde que as interações hidrofóbicas predominam. Utilizando esta aproximação obtivemos os valores de Δ_dH° da ordem de 10 kJ.mol⁻¹ e 24 kJ.mol⁻¹ nos pH's 3,5 e 7,0 respectivamente para a série dos n-alkilsulfato de sódio. O valor endotérmico estimado para Δ_dH° em pH 3,5 é menor do que em pH 7,0 e portanto coerente com o fato de que em pH 3,5 a contribuição de sítios catiônicos na interação é maior do que em pH 7,0, isto é, o termo $\Delta_{cat}H^{\circ}$ contribui no abaixamento de Δ_dH° .

Uma revisão da literatura confirma que há uma ampla variação de valores de Δ_dH° para a Tripsina. Os valores obtidos dependem dos métodos usados e da precisão das condições experimentais. Valores desde 30 até 280 kJ.mol⁻¹ tem sido publicados.^{96,97,98}

No tampão fosfato pH 7,0, observamos para os tres primeiros membros da série homóloga dos tensoativos n-alkilsulfato de sódio, a mesma tendência que em pH 3,5, isto é, a variação da entalpia de interação Tripsina-Tensoativo diminui linearmente com o aumento da cadeia carbônica do tensoativo, sendo que nestas condições $\Delta_{int}H^\circ$ tende para valores mais exotérmicos, figura 3.2.4. Este comportamento nos faz crer que $\Delta_{int}H^\circ$ deve-se predominantemente as interações de natureza hidrofóbica, pois neste pH a carga líquida da Tripsina tem o mesmo sinal do tensoativo, dependendo apenas do caráter hidrofóbico deste. Entretanto, no pH 7,0 o TDSS mostrou uma quebra no comportamento linear com um valor de $\Delta_{int}H^\circ$ da mesma ordem de grandeza que no pH 3,5, isto é, $\approx 1 \text{ kJ.mol}^{-1}$, (comparar entalpograma das figuras 3.2.3 e 3.2.5). Não temos uma explicação para este comportamento, podendo apenas especular em termos de precipitação conforme observado também nos experimentos de equilíbrio de diálise.

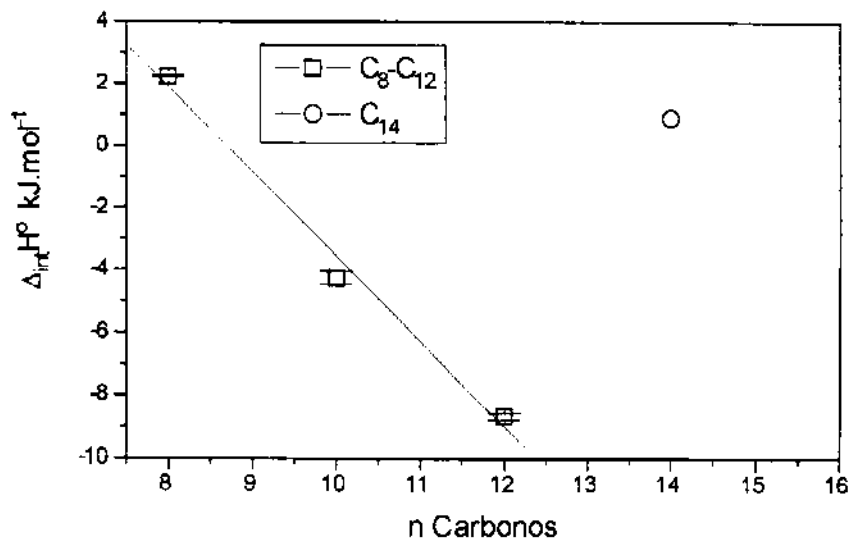


Fig. 3.2.4. Variação da entalpia de interação da série homóloga dos n-alkilsulfato de sódio com Tripsina no pH 7,0 a 298 K

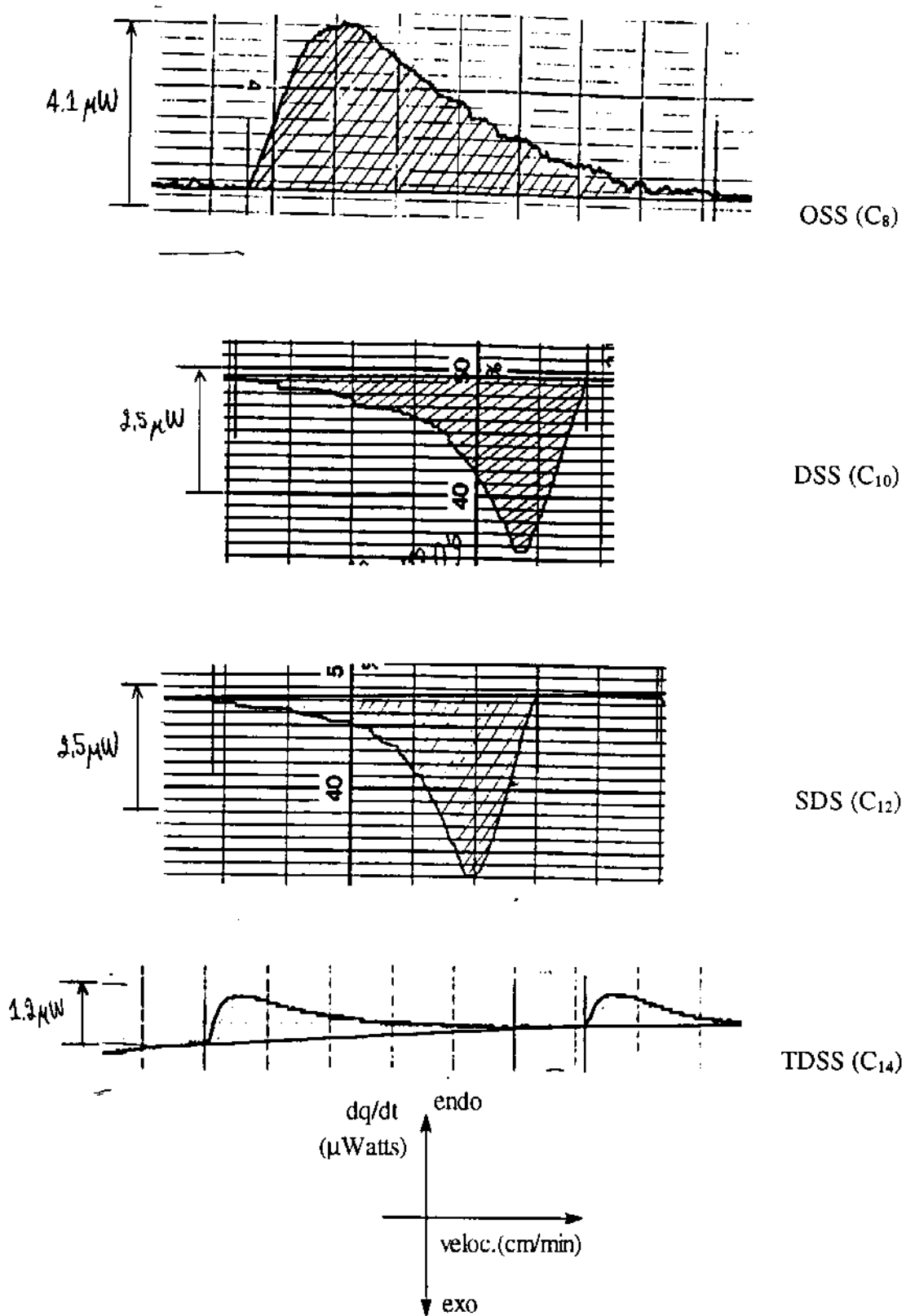


Fig. 3.2.5. Partes do entalpograma da titulação microcalorimétrica Tripsina-Tensoativo em tampão fosfato pH 7,0, força iônica 10 mM a 298 K.

No tampão bórax pH 9,0 não observamos a tendência da variação linear de $\Delta_{int}H^\circ$ com a hidrofobicidade do tensoativo, figura 3.2.6. Nestas condições o tensoativo OSS apresentou $\Delta_{int}H^\circ$ próximo de zero e os tensoativos DSS, SDS e TDSS apresentaram praticamente o mesmo valor para $\Delta_{int}H^\circ$, sendo a interação neste pH insensível ao aumento da hidrofobicidade do tensoativo, certamente devido a Tripsina encontrar-se desnaturada nestas condições.

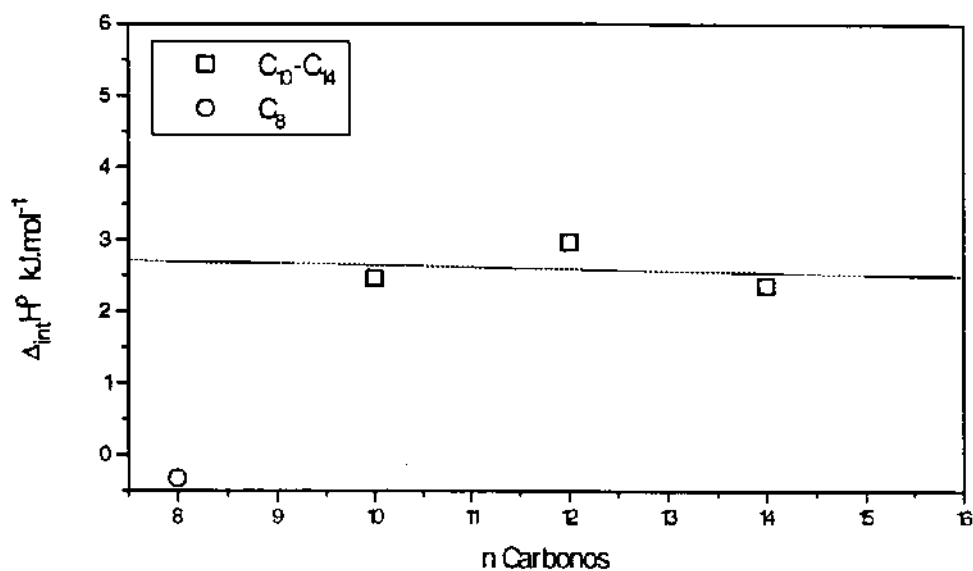


Fig. 3.2.6 Variação da entalpia de interação da série homóloga dos n-alkilsulfato de sódio com Tripsina no pH 9,0 a 298 K.

A figura 3.2.7 mostra partes do entalpograma da titulação microcalorimétrica da série homóloga dos n-alkilsulfato de sódio com a Tripsina em pH 9,0.

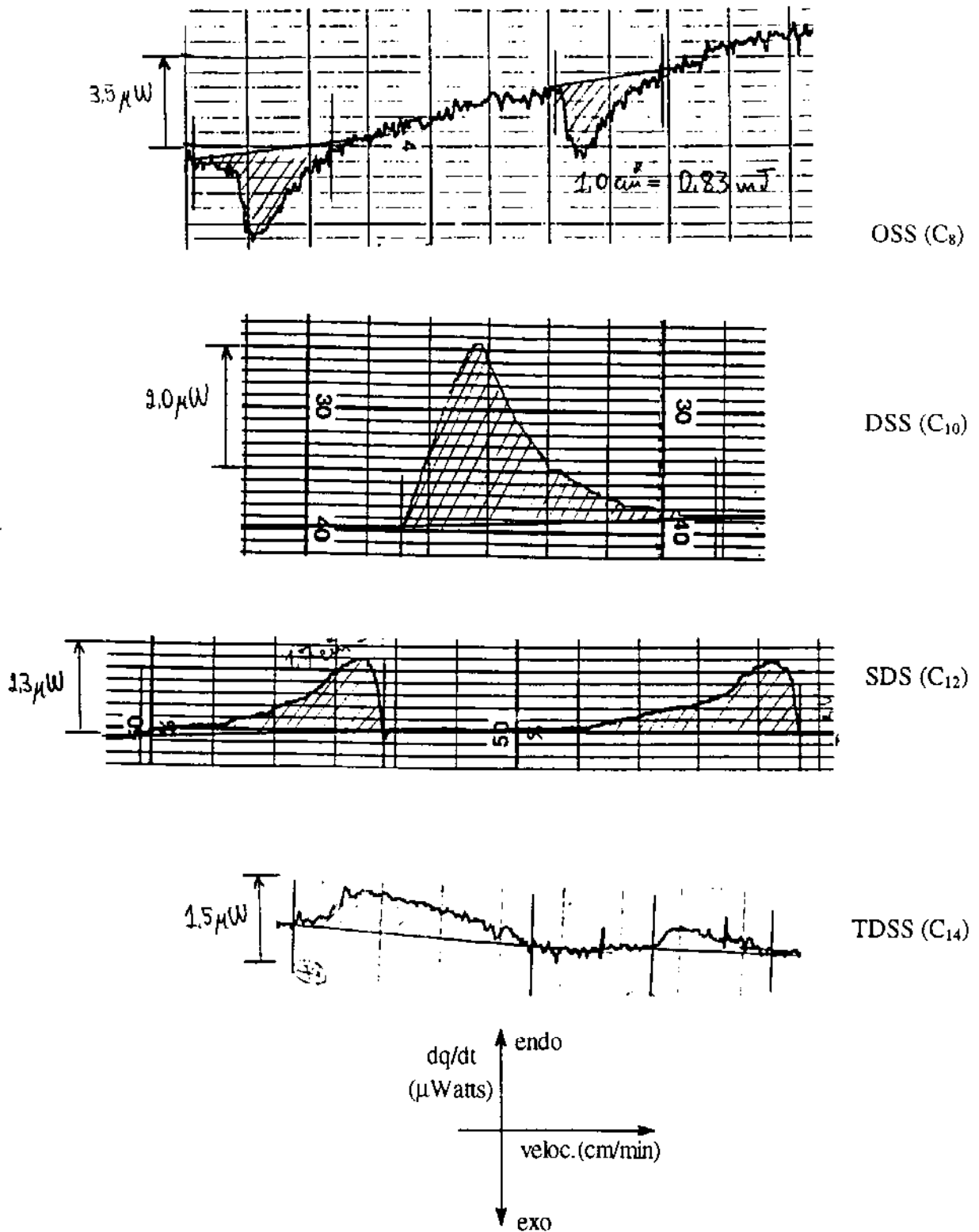


Fig. 3.2.7. Partes de entalograma da titulação microcalorimétrica Tripsina-Tensoativo em tampão bórax pH 9,0, força iônica 10 mM a 298 K.

Para os tensoativos catiônicos estudados nos tres pH's, observamos que $\Delta_{int}H^\circ$ do DTAB com a Tripsina é muito pequeno e independe do pH do meio. Em pH 3,5 e 7,0, o CPC apresentou $\Delta_{int}H^\circ$ de ≈ 19 e 16 kJ.mol^{-1} respectivamente, sendo que em pH 9,0 este valor foi drasticamente reduzido, certamente devido a Tripsina estar desnaturada.

Acreditamos que as diferenças na interação do tensoativos catiônicos DTAB e CPC com a Tripsina deva-se à alta alta hidrofobicidade do CPC aliada ao seu baixo impedimento estérico comparada com o DTAB. O efeito atérmico observado para a interação Tripsina DTAB neste trabalho é concordante com o observado para a interação Catalase-DTAB.¹⁵

3.3 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE SÍTIOS DA INTERAÇÃO TRIPSINA-TENSOATIVO

A determinação do número de sítios de interação Tripsina-Tensoativo foi feita utilizando o modelo de distribuição livre.⁴⁷ Este modelo é utilizado para se estimar o número de sítios de interação Tripsina-Tensoativo, utilizando a equação de Scatchard (eq.1.6.2, seção 1.7) na região de baixa concentração do tensoativo livre. Este tratamento permite que os parâmetros da equação de Scatchard tenham tres diferentes opções de serem representados graficamente, como é mostrado na seguinte tabela.

Tab. 3.3.1 Representação gráfica dos parâmetros da equação de Scatchard.

OPÇÕES	Y	X	Coef. Angular	Coef. Linear Y	Coef. Linear X
1	n	K	$v/[S]_{livre}$	v	$- [S]_{livre}$
2	K/n	$1/n$	$- [S]_{livre}$	$[S]_{livre}/v$	$1/v$
3	n/K	$1/K$	v	$v/[S]_{livre}$	$- 1/[S]_{livre}$

A aplicação deste modelo foi feita utilizando o programa LIGAND desenvolvido em linguagem Basic (listagem no apêndice I) usando o algoritmo descrito por Crabbe.⁴⁷ A entrada de dados foi feita a partir dos valores de v e $[S]_{\text{livre}}$ obtidos experimentalmente por medidas de equilíbrio de diálise. Como exemplo da entrada de dados e execução deste programa, mostraremos o cálculo feito para a isoterma de interação Tripsina-CPC na solução tampão Acetato 10 mM pH 3,5.

```
PROTEÍNA: Tripsina 0,6 mg/mL (Tampão Acetato)
SURFATANTE: CPC (Tampão Acetato)
ENTER NUMBER OF OBSERVATIONS: 13
ENTER FREE LIGAND CONCENTRATION
ENTER BOUND LIGAND CONCENTRATION
2.17E-4, 10.97
2.02E-4, 9.61
1.76E-4, 8.68
1.69E-4, 5.85
1.40E-4, 6.20
1.39E-4, 4.30
1.19E-4, 3.91
1.08E-4, 3.57
9.70E-5, 3.22
8.46E-5, 2.53
7.38E-5, 1.79
7.16E-5, 1.10
4.56E-5, 0.17
```

OUTPUT

```
RESIDUAL: N=1.273997 KD=-7.728086E-03
RESIDUAL: N=1.246344 KD=-4.69017E-03
RESIDUAL: N=1.231871 KD=-3.540171E-03
RESIDUAL: N=1.208045 KD=-3.480045E-03
RESIDUAL: N=1.196733 KD=-3.024491E-03
RESIDUAL: N=1.196064 KD=-2.671822E-03
RESIDUAL: N=1.193574 KD=-2.463797E-03
RESIDUAL: N=1.191083 KD=-2.317932E-03
RESIDUAL: N=1.167377 KD=-2.15594E-03
RESIDUAL: N=1.158995 KD=-2.136508E-03
RESIDUAL: N=1.154282 KD=-2.016571E-03
RESIDUAL: N=1.143101 KD=-1.97788E-03
RESIDUAL: N=1.125598 KD=-1.896349E-03
RESIDUAL: N=1.117316 KD=-1.863035E-03
RESIDUAL: N=1.115453 KD=-1.334142E-03
RESIDUAL: N=1.096887 KD=-9.119634E-04
RESIDUAL: N=1.093266 KD=-7.445785E-04
RESIDUAL: N=1.092748 KD=-6.544215E-04
RESIDUAL: N=1.092133 KD=-6.106744E-04
RESIDUAL: N=1.083394 KD=-5.566673E-04
RESIDUAL: N=1.081241 KD=-5.424578E-04
RESIDUAL: N=1.076304 KD=-5.339751E-04
RESIDUAL: N=1.074874 KD=-5.263813E-04
RESIDUAL: N=1.073674 KD=-4.975529E-04
RESIDUAL: N=1.070747 KD=-4.870406E-04
```


RESIDUAL: N=1.066023 KD=-4.575711E-04
RESIDUAL: N=1.054803 KD=-4.323651E-04
RESIDUAL: N=1.052448 KD=-4.265858E-04
RESIDUAL: N=1.049778 KD=-4.176011E-04
RESIDUAL: N=1.043276 KD=-3.617361E-04
RESIDUAL: N=1.042901 KD=-3.569286E-04
RESIDUAL: N=1.03545 KD=-3.455886E-04
RESIDUAL: N=1.032757 KD=-3.279519E-04
RESIDUAL: N=1.029682 KD=-3.191297E-04
RESIDUAL: N=1.021819 KD=-3.140536E-04
RESIDUAL: N=1.018632 KD=-3.128503E-04
RESIDUAL: N=1.018104 KD=-3.123432E-04
RESIDUAL: N=1.004025 KD=-3.118851E-04
RESIDUAL: N=1.001242 KD=-3.04698E-04
RESIDUAL: N=1 KD=-2.945704E-04
RESIDUAL: N=0.9834629 KD=-2.913367E-04
RESIDUAL: N=0.9797149 KD=-2.877701E-04
RESIDUAL: N=0.974442 KD=-2.859005E-04
RESIDUAL: N=0.9406459 KD=-2.787285E-04
RESIDUAL: N=0.9397243 KD=-2.765883E-04
RESIDUAL: N=0.9307247 KD=-2.626872E-04
RESIDUAL: N=0.9121579 KD=-2.568618E-04
RESIDUAL: N=0.8977593 KD=-2.542206E-04
RESIDUAL: N=0.8678363 KD=-2.505312E-04
RESIDUAL: N=0.8584938 KD=-2.47466E-04
RESIDUAL: N=0.8538064 KD=-2.450118E-04
RESIDUAL: N=0.8414884 KD=-2.448127E-04
RESIDUAL: N=0.821264 KD=-2.416801E-04
RESIDUAL: N=0.805451 KD=-2.362011E-04
RESIDUAL: N=0.7502005 KD=-2.352412E-04
RESIDUAL: N=0.7289395 KD=-2.349613E-04
RESIDUAL: N=0.7008006 KD=-2.276835E-04
RESIDUAL: N=0.6933248 KD=-2.274991E-04
RESIDUAL: N=0.5579623 KD=-2.263877E-04
RESIDUAL: N=0.458131 KD=-2.243922E-04
RESIDUAL: N=0.4483153 KD=-2.147308E-04
RESIDUAL: N=0.2223472 KD=-2.10072E-04
RESIDUAL: N=-0.1971841 KD=-2.10072E-04
RESIDUAL: N=-0.2700998 KD=-1.95979E-04
RESIDUAL: N=-0.4012047 KD=-1.853691E-04
RESIDUAL: N=-0.7220674 KD=-1.777542E-04
RESIDUAL: N=-0.8743346 KD=-1.757591E-04
RESIDUAL: N=-1.255326 KD=-1.615792E-04
RESIDUAL: N=-1.346343 KD=-1.602328E-04
RESIDUAL: N=-1.422817 KD=-1.585811E-04
RESIDUAL: N=-2.060333 KD=-1.5419E-04
RESIDUAL: N=-2.634377 KD=-1.454676E-04
RESIDUAL: N=-3.453054 KD=-1.395326E-04
RESIDUAL: N=-4.840969 KD=-1.283223E-04
RESIDUAL: N=-6.63379 KD=-1.248351E-04
RESIDUAL: N=-6.87041 KD=-1.123498E-04
RESIDUAL: N=-8.565402 KD=-1.069031E-04

Os valores residuais de N e KD correspondem a diferença entre cada intersecção calculada para os valores experimentais de v e $[S]_{livre}$ e seu valor médio. A estimativa do número de sítios de interação Tripsina-CPC foi feita a partir da representação gráfica de KD/N em função de $1/N$, como pode ser observado no seguinte gráfico.

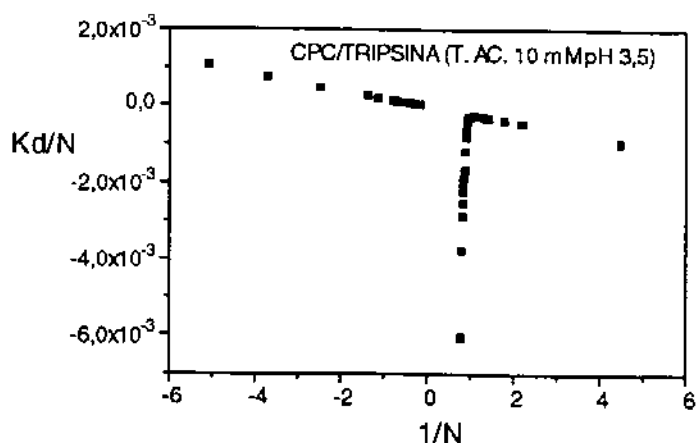


Fig. 3.3 Distribuição livre dos valores residuais da interação Tripsina-CPC, pH 3,5 a 298 K.

A determinação do número de sítios de interação foi feita pela interpretação gráfica e tomando como base a intersecção dos valores residuais de N e KD . Deste modo pode-se analisar se a interação Tripsina-CPC poderá ser classificada numa população de um único sítio de interação ou múltiplos sítios de interação. Deste modo foi claramente observado no gráfico que existem duas linhas de intersecção correspondendo a uma população de dois sítios de interação. Fazendo esta mesma interpretação para as demais isotermas de interação Tripsina-Tensoativo (apêndice VI), obteve-se os sítios de interação os quais são mostrados na tabela 3.3.2.

Tab. 3.3.2 Estimativa dos sítios de interação Tripsina-Tensoativo.

ISOTERMA INTERAÇÃO	DE	Nº SÍTIOS DE INTERAÇÃO
Tripsina-OSS pH 3,5 pH 7,0 pH 9,0		01 - -
Tripsina-DSS pH 3,5 pH 7,0 pH 9,0		02 02 02
Tripsina-SDS pH 3,5 pH 7,0 pH 9,0		01 01 01
Tripsina-TDSS pH 3,5		01
Tripsina-CPC pH 3,5 pH 7,0 pH 9,0		02 01 01
Tripsina-DTAB pH 3,5 pH 7,0 pH 9,0		01 01 01

CONCLUSÕES

Na seção 3.0 apresentamos e discutimos por etapas os dados obtidos, acompanhados de uma conclusão. A seguir apresentamos as seguintes conclusões gerais.

- Concluimos que na literatura não existe nenhum estudo sistemático da interação Tripsina com séries homólogas de tensoativos em soluções tampão, pH's 3,5, 7,0 e 9,0, força iônica 10 mM a 25 °C utilizando as técnicas do equilíbrio de diálise e titulação microcalorimétrica.
- Dos resultados obtidos por equilíbrio de diálise concluímos que a interação entre tensoativo aniônico n-alkil sulfato de sódio e Tripsina em pH 3,5 ocorre com interação inicial dos tensoativos iônicos nos sítios aminoácidos carregados com carga positiva da superfície da proteína especificamente nos resíduos lisina, histidina e arginina.
- Na isoterma de interação Tripsina-(n-alkilsulfato de sódio), pH 3,5, a concentração de tensoativo livre na região de saturação diminui na ordem TDSS<SDS<DSS<OSS, isto é, com o aumento do caráter hidrofóbico do tensoativo.
- A taxa de aumento de ν na parte inicial das isotermas de interação Tripsina-Tensoativo n-alkilsulfato de sódio, pH 3,5, comparativamente ao aumento da hidrofobicidade do tensoativo demonstra que em baixas concentrações de tensoativo predomina interações iônicas.
- Em baixas concentrações do tensoativo, os resíduos de aminoácidos carregados da Tripsina estão na superfície da proteína nativa e portanto acessíveis ao tensoativo, de maneira que a interação iônica não é marcadamente afetada pelo estado de desenrolamento da estrutura terciária.

- Embora a natureza total das interações Proteína-Tensoativo, (interações iônicas principalmente na superfície da proteína quando a concentração do tensoativo é muito pequena, seguida pela interação hidrofóbica não específica), no caso dos tensoativos aniônicos, o fator determinante no processo de interação depende da estrutura terciária da Tripsina.
- A desnaturação da Tripsina com tensoativos aniônicos ocorrem com concentrações do tensoativo extremamente baixas, 10^{-4} M.
- Em termos termodinâmicos, a variação de energia livre de interação ΔG_v na saturação tabela 3.1 é da mesma ordem de grandeza da variação da energia livre de Gibbs de micelização.³⁵ O complexo Tripsina-Tensoativo satura quando o tensoativo livre em equilíbrio com o complexo se aproxima da CMC. Como a saturação ocorre em concentrações do tensoativo abaixo da CMC, o complexo Tripsina-Tensoativo é mais estável que micelas. Nestas condições, a proteína já esta desnaturada, e o complexo pode ser do tipo micelar, no qual a molécula hidrofóbica da Tripsina forma uma parte integral de uma estrutura micelar.
- No caso dos tensoativos catiônicos, o CPC interage com a Tripsina nos pH 3,5 e 7,0 endotermicamente enquanto a interação com DTAB ocorre quase que atermicamente.
- A relação linear observada entre a entalpia de interação da Tripsina versus a hidrofobicidade dos tensoativos da série homóloga dos n-alquilsulfato de sódio nos pH's 3,5 e 7,0 é concordante com o comportamento conhecido como regra de Traube,⁹⁷ mas observado para processos de partição e interação de série homólogas de compostos tensoativos, anestésicos, etc, com sistemas organizados modelos como: água/octanol, micelas de tensoativos, lipossomas naturais e sintéticos e membrans biológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Mossavi, A. A.; Razenghifard, M. R.; "Thermodynamic studies on the interaction between sodium n-dodecyl sulphate and histone H₂A", *Thermochim. Acta*, (1991), **188**, 183.
- ² Lundgren, H. P.; Elan, D. W.; O'Connell, R. A.; "The electrophoretic properties of complexes between egg albumin and alkylbenzenesulfonates", *J. Biol. Chem.*, (1943), **149**, 183
- ³ Putnam, F. W.; Neurath, H.; "Complex formation between synthetic detergents and proteins", *J. Biol. Chem.*, (1943), **150**, 263.
- ⁴ Benzonana, G.; "Study of bile salts micelles: properties of mixed oleate-deoxycholate solutions at pH 9,0", *Biochim. Biophys. Acta*, (1969), **176**, 836.
- ⁵ Knox Jr., W. J.; Parshall, T. O.; "The interaction of sodium dodecyl sulfate with gelatin", *J. Colloid Interface Sci.*, (1970), **33(1)**, 17.
- ⁶ Knox Jr., W. O.; Parshall, T. O.; "The interaction of aerosol OT with gelatin", *J. Colloid Interface Sci.*, (1972), **40(2)**, 290.
- ⁷ Jones, M. N.; Skinner, H.; Tipping, E.; Wilkinson, A.; "The interaction between ribonuclease A and surfactants", *Biochem. J.*, (1973), **135**, 231.
- ⁸ Makino, S.; Reynolds, J. A.; Tanford, C.; "The binding of deoxycholate and triton X-100 to proteins", *J. Biol. Chem.*, (1973), **248**, 4926.
- ⁹ Nozaki, Y.; Reynolds, J. A.; Tanford, C.; "The interaction of a cationic detergent with bovine serum albumin and other proteins", *J. Biol. Chem.*, (1974), **249(14)**, 4452.
- ¹⁰ Jones, M. N.; "A Theoretical approach to the binding of amphipathic molecules to globular proteins", *Biochem. J.*, (1975), **151**, 109.
- ¹¹ Jones, M. N.; "A microcalorimetric study of the interaction between trypsin and sodium n-dodecyl Sulphate", *Biochim. Biophys. Acta*, (1977), **491**, 121.
- ¹² Andrade, M. I. P.; Boitard, E.; Saghal, M. A.; Manley, P.; Jones, M. N.; Skinner, H. A.; "Enthalpy of interaction of ribonuclease A and n-alkyl sulphates in aqueous solution", *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, (1981), **77**, 2939.
- ¹³ Jones, M. M.; Manley, P.; "Binding of sodium n-dodecyl sulphate and protons to catalase", *Int. J. Biol. Macromol.*, (1982), **4**, 201.

- ¹⁴ Lundahl, P.; Greijer, E.; Sandberg, M.; Cardell, S.; Eriksson, K. O.; "A model for ionic hydrophobic interactions and hydrogen-bonding in sodium dodecyl sulfate-protein complexes", *Biochim. Biophys. Acta*, (1986), **873**, 20.
- ¹⁵ Mosavi-Movahedi, A. A.; Pilcher, G.; Jones, M. N.; "Thermodynamics of the interaction between n-dodecyltrimethylammonium bromide and catalases", *Thermochim. Acta*, (1989), **146**, 215.
- ¹⁶ Luisi, P. L.; Häring, G.; Maestro, M.; Rialdi, G.; "Proteins solubilized in organic solvents via reverse micelles: Thermodynamic studies", *Thermochim. Acta*, (1990), **162**, 1.
- ¹⁷ Moosavi-Movahedi, A. A.; Ghobadi, S.; "Thermochemical analysis of aspergillus niger catalase and sodium n-dodecyl sulphate interaction", *Thermochim. Acta*, (1991), **189**, 201.
- ¹⁸ Sarmiento, F.; Prieto, G.; Jones, M. N.; "Thermodynamic studies on the interaction of n-alkyl sulfates with insulin in aqueous solution", *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, (1992), **88(7)**, 1003.
- ¹⁹ Miller, D. D.; Lenhart, W.; Antalek, B. J.; Williams, A. J.; Hewitt, J. M.; "The use of NMR to study sodium dodecyl sulfate-gelatin interactions", *Langmuir*, (1994), **10**, 68.
- ²⁰ A. A. Moosavi-Movahedi, A. A.; *Pure & Appl. Chem.*, "Interaction of aspergillus niger catalase with sodium N-dodecyl sulphate", (1994), **66(1)**, 71.
- ²¹ M. N. Jones; A. J. B. MacFariane; M. I. P. Andrade; F. Sarmiento; "Thermodynamics studies on the interaction of n-alkyltrimethylammonium bromides with anionic polypeptides in aqueous solution", *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, (1994), **90(17)**, 2511.
- ²² Whitesides, T. H.; Miller, D. D.; "Interaction between photographic gelatin and sodium dodecyl sulfate", *Langmuir*, (1994), **10**, 2899.
- ²³ Chen, A.; Wu, D.; Johnson Jr., C. S.; "Determination of the binding isotherm and size of the bovine serum albumin-sodium dodecyl sulfate complex by diffusion-ordered 2D NMR", *J. Phys. Chem.*, (1995), **99**, 828.
- ²⁴ Fendler, J. H.; *Membrane Mimetic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1982.
- ²⁵ Silva Filho, E. A.; "Termodinâmica da contribuição de grupos -CH₂ no processo de transferência de fase: I-álcool/micelas II-álcool/microorganismo", *Tese de Mestrado*, IQ-UNICAMP, Campinas-SP, 1988.
- ²⁶ Seganfredo, M. A.; "Agentes tensoativos e suas aplicações na indústria cosmética", *Cosmetics & Toiletries*, (1994), **6**, 28.

- ²⁷ Garcia, M. E. D.; Sanz-Medel, A.; "Dye-surfactant interactions: A review", *Talanta*, (1986), **33(3)**, 255.
- ²⁸ Stryer, L.; *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 1988.
- ²⁹ Morrison, R.; Boyd, R.; *Química Orgânica*, 7ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1981.
- ³⁰ Voet, D.; Voet, J. G.; *Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1990.
- ³¹ Tanford, C.; *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*; 2ª ed., Wiley-Interscience publication: New York, 1973.
- ³² Rawn, J. D.; *The conformations of globular proteins. In Biochemistry Burlington*, Neil Patterson Publishers, 1989.
- ³³ Basilio, C. A.; "Extração, purificação, imobilização, estudo cinético e calorimétrico das enzimas proteolíticas do mamoeiro", *Tese de Doutorado*, IQ-UNICAMP, Campinas-SP, 1993.
- ³⁴ Kauzmann, W.; *Advances in Protein Chemistry*, (1959), **14**, 1.
- ³⁵ Atkins, P. W.; *Physical Chemistry*, 5ª ed., Oxford University Press, 1990.
- ³⁶ Neurath, H.; "Evolution of proteolytic enzymes", *Science*, (1984), **224**, 350.
- ³⁷ Vestling, M. M.; Murphy, C. M.; Fenselau, C.; "Recognition of trypsin autolysis products by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry", *Anal. Chem.*, (1990), **62**, 2391.
- ³⁸ Hubert, R.; Kurla, D.; Bode, W.; Schwager, P.; Bartels, K.; Deisenhofer, J.; Steigemann, W.; "Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor", *J. Mol. Biol.*, (1974), **89**, 73.
- ³⁹ Bigelow, C. C.; "On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure", *J. Theoret. Biol.*, (1967), **16**, 187.
- ⁴⁰ a) Teppen, B. J.; "HyperChem, Release 2: Molecular modeling for the personal computer", *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, (1992), **32(6)**, 757.
b) HyperChem, *Programa de Modelagem Molecular*, Autodesk, Inc., 1992.
- ⁴¹ Scatchard, G.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, (1949), **51**, 660.

- ⁴² Wyman, J.; "The binding potential, a neglected linkage concept", *J. Mol. Biol.*, (1965), **11**, 631.
- ⁴³ Jones, M. N.; *Biochemical Thermodynamics*, Elsevier, 2^a ed., New York, 1988.
- ⁴⁴ Wyman, J.; Gill, S. J.; *Binding and Linkage*; University Science Books: Mill Valley, CA, 1990.
- ⁴⁵ Alberty, R. A.; "Legendre transforms in chemical thermodynamics", *Chemical Reviews*, (1994), **94(6)**, 1457.
- ⁴⁶ Hill, A. V.; *J. Physiol.*, (1910), **40**, 4P.
- ⁴⁷ Crabbe, M. J.; *The Analysis of Enzyme Reactions*, Ireland & S. P. Long, Irlpress, Oxford, 1989.
- ⁴⁸ Howells, R. D.; Groth, J.; Hiller, J. M.; Simon, E. J.; "Opiate binding sites in retina: Properties and distribution", *J. Pharm. Exp. Therapeutics*, (1980), **215(1)**, 60.
- ⁴⁹ Schreiner, A. A.; Schimmel, P. R.; "Interaction of Manganese with fragments, complementary fragment recombinations, and whole molecules of yeast phenylalanine specific transfer RNA", *J. Mol. Biol.*, (1974), **86**, 601.
- ⁵⁰ Katherine, E.; Hecht, M.; Cooper, A.; "Microcalorimetry of enzyme-substrate binding: Yeast phosphoglycerate kinase", *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, (1993), **89**, 2693.
- ⁵¹ Volpe, P. L.; "O que são termopilhas, como funcionam e como os químicos podem utilizar estes componentes", *Química Nova*, (1993), **16(1)**, 49.
- ⁵² Beezer, A. E.; *Biological Microcalorimetry*, Academic Press, London, 1980, 343.
- ⁵³ Johnson, E. R.; Biltonen, R. L.; "Determination of reaction rate parameters by flow microcalorimetry", *J. Am. Chem. Soc.*, (1975), **97**, 2349.
- ⁵⁴ Stahl, J. W.; "Nomenclature of thermometric and enthalpimetric methods in chemical analysis", *Pure & Appl. Chem.*, (1994), **66(12)**, 2487.
- ⁵⁵ Wadsö, I.; "Some developments in reaction and solution microcalorimetry, with particular reference to its use in biochemical and cellular biology", *Thermochim. Acta*, (1985), **96**, 313.
- ⁵⁶ Hayashi, S.; Ikeda, S.; "Micelle size and shape of sodium dodecyl sulfate in concentrated NaCl solutions", *J. Phys. Chem.*, (1980), **84**, 744.

- ⁵⁷ Ray, A.; Némethy, G.; "A difference spectrophotometric method for the determination of critical micelle concentrations", *J. Phys. Chem.*, (1971), **75**(6), 804.
- ⁵⁸ Mazer, N. A.; Olofsson, G.; "Calorimetric studies of micelle formation and micellar growth in sodium dodecyl sulfate solutions", *J. Phys. Chem.*, (1982), **86**, 4584.
- ⁵⁹ Abu-Hamdlyyah, M.; El-Danabe, C. M.; " Strengthening of hydrophobic bonding and the increase in the degree of ionization of sodium lauryl sulfate micelles by amphiphiles and the micelle-water distribution coefficient", *J. Phys. Chem.*, (1983), **87**, 5443.
- ⁶⁰ Loh, W.; *Tese de Doutorado*, "Comportamento da série homóloga dos p-hidroxibenzoatos de alquila em solução e sua interação com sistemas biomiméticos", IQ-Unicamp, Campinas-SP, 1992.
- ⁶¹ Fendler, J. H., *Membrane Mimetic Chemistry*, Wiley, N.York, 1982.
- ⁶² Neurath, H.; Hill, R. L.; *The Proteins*, 3^a ed., Academic Press, Inc., Vol. I, New York, 1975.
- ⁶³ Lowry, O. H.; Rosebrouch, J. N.; Farr, L. A.; Randall, R. J.; "A modification of the Folin-Ciocalteau method based on the presence of tyrosine and tryptophan in proteins", *J. Biol. Chem.*, (1951), **193**, 265.
- ⁶⁴ Koch, W. F.; Bigg, D. L.; Dieh, H.; "Tris(hydroxymethyl)aminomethane - A primary standard", *Talanta*, (1975), **22**, 637.
- ⁶⁵ Deutscher, M. P.; *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc., New York, 1990.
- ⁶⁶ Livingston JR., J. R.; Drogin, R.; Kelly, R. J.; "Detergency and biodegradability of alcohol-based sec-sulfates", *I & EC Product Research and Development*, (1965), **4**, 28.
- ⁶⁷ Van OS, N. M.; Haak, J. R.; Rupert, L. A. M.; AMER.88.020, Shell Internationale Maatschappij B. V. 1989.
- ⁶⁸ Nunes, S. P.; "Membranas assimétricas de acetato de celulose para Osmossedimentação e Ultrafiltração", *Tese de Mestrado*, IQ-UNICAMP, 1983.
- ⁶⁹ Hayashi, K.; "A rapid determination of sodium dodecyl sulfate with methylene blue", *Anal. Biochem.*, (1975), **67** 503.
- ⁷⁰ Few, A. V.; Ottewill, R. H.; "A spectrophotometric method for the determination of cationic detergents", *J. Colloid Sci.*, (1956), **11**, 34.

- ⁷¹ Fendler, J. H., *Catalysis in micellar and macromolecular systems*, Academic Press: New York, San Francisco, London, 1975.
- ⁷² a) Linhart, K.; "Die polarographische bestimmung von grenzflächenaktiven stoffen in wasser und abwasser sowie die bestimmung von deren abaubarkeit", *Tenside*, (1972), **9**, 241.
b) Rupp, E.; Zuman, P.; "The use of differential pulse and D.C. polarography in the analysis of solutions containing surfactants", *Anal. Lett.*, (1994), **27(5)**, 939.
- ⁷³ Courtot-Coupez, J.; Le Bihan, A.; "Determination of anionic detergents in sea water. Generalisation from the method for fresh water and for the determination of cationic detergents", *Anal. Lett.*, (1969), **2**, 211.
- ⁷⁴ Taylor, C. G.; Waters, J.; "Radiometric determination of trace amounts of anionic surfactants in ground water and potable water", *Analyst*, (1972), **97**, 533.
- ⁷⁵ Saraste, M.; Korhonen, T.; "Determination of protein-bound dodecyl sulfate by gas chromatography", *Anal. Biochem.*, (1979), **92**, 444.
- ⁷⁶ a) Arand, M.; Friedberg, T.; Oesch, F.; "Colorimetric quantitation of trace amounts of sodium lauryl sulfate in the presence of nucleic acids and proteins", *Anal. Biochem.*, (1992), **207**, 73.
b) Botello, J. C.; Pérez-Caballero, G.; "Spectrophotometric determination of diclofenac sodium with methylene blue", *Talanta* (1995), **42(1)**, 105.
- ⁷⁷ Mukerjee, P.; "Use of ionic dyes in the analysis of ionic surfactants and other ionic compounds", *Anal. Chem.*, (1956), **28**, 870.
- ⁷⁸ Anionic Surfactants-Chemical Analysis, John Cross, Marcel Dekker, Inc., New York, 1977, vol.8, Cap. 5.
- ⁷⁹ Manual do LKB-2277, *Thermal Activity Monitor*.
- ⁸⁰ Wadsö, I.; "Design and testing of a micro reaction calorimeter", *Acta Chem. Scand.*, (1968), **22**, 927.
- ⁸¹ Herington, E. F. G.; *Pure & Appl. Chem.*, (1974), **40**, 392.
- ⁸² Poore, V. M.; Beezer, A. E.; "A simple, rapid method for the generation of ligand binding isotherms", *Thermochim. Acta*, (1983), **63**, 83.
- ⁸³ Grenthe, I.; Ots, H.; Ginstrup, O.; "A calorimetric determination of the enthalpy of ionization of water and the enthalpy of protonation of THAM at 5, 20, 25, 35, and 50 °C", *Acta Chem. Scand.*; (1970), **24**, 1067.

- ⁸⁴ Arena, G.; Maccarrone, G.; Purrello, R.; "Critical review of the calorimetric method for equilibrium constant determination", *Thermochim. Acta* (1989), **155**, 353.
- ⁸⁵ Hill, J. O.; Öjelund, G.; Wadsö, I., "Thermochemical results for tris as a test substance in solution calorimetry", *J. Chem. Thermodyn.*, (1969), **1**, 111.
- ⁸⁶ Öjelund, G.; Wadsö, I., "Heats of ionization of some alkylammonium and hydroxy alkylammonium compounds", *Acta Chem. Scand.*, (1968), **22**, 2691.
- ⁸⁷ Volpe, P. L. O.; Silva Filho, E. A., "Calorimetric study of SDS micelle formation in water and in NaCl solution at 298 K", *Thermochim. Acta*, (1995), trabalho aceito.
- ⁸⁸ McGlashan, M. Len.; *Chemical Thermodynamics*, 1979, Academic Press Inc.
- ⁸⁹ Volpe, P. L. O.; Silva Filho, E. A.; "Estudo da interação Proteína-Surfatante pelo método do equilíbrio de diálise", *Química Nova*, (1994), **17(3)**, 199.
- ⁹⁰ Yonath, A. P.; Honig, B. S.; Traub, W.; "Crystallographic studies of protein denaturation and renaturation. 2. sodium dodecyl sulfate induced structural changes in triclinic lysozyme", *Biochemistry*, (1977), **16**, 1418.
- ⁹¹ Jones, M. N.; *Biological Interface*, Elsevier, Amsterdan, 1975, p.101.
- ⁹² Jones, M. N.; *Biochemical Thermodynamics*, Elsevier, 2^a ed., editado por Jones, M. N., 1979.
- ⁹³ Pfeil, W.; *Biochemical Thermodynamics*, Elsevier, 2^a ed., editado por Jones, M. N., 1979.
- ⁹⁴ Shinoda, K.; Nakagawa, T.; Tamamushi, B.; Isemra, T.; *Colloidal Surfactants*, Academic Press, New York, 2^a ed., 1969.
- ⁹⁵ Housaindokht, M. R.; Jones, M. N.; Newall, J. F.; G. Prieto e F. Sarmiento, "Spectroscopic and microcalorimetric study of the interaction of n-alkyl sulfates with insulin in aqueous solution", *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, (1993), **89(12)**, 1963.
- ⁹⁶ Anson, M. L.; Mirsky, A. E., *J. Gen. Physiol.*, (1933), **17**, 393.
- ⁹⁷ Gutfreund, H.; Sturtevant, J. M., "A reversible reaction of bovine serum albumin", *J. Am. Chem. Soc.*, (1953), **75**, 5447.
- ⁹⁸ Lazdunski, M.; Delaage, M., "Sur la morphologie des trypsines de porc et de boeuf étude des dénaturations réversibles", *Biochim. Biophys. Acta*, (1965), **105**, 541.

APÊNDICES

Apêndice I - Listagem do programa LIGAND.

Apêndice II - Espectro no infravermelho, para os tensoativos TDSS e OSS.

Apêndice III - Espectro de Absorção da solução do tensoativo CPC $5,0 \times 10^{-3}$ M no pH 7,0.

Apêndice IV - Dados da curva de calibração - Método de extração do par iônico Tensoativo-Corante.

Apêndice V - Dados da titulação microcalorimétrica.

Apêndice VI - Entrada de dados - Programa LIGAND.

```

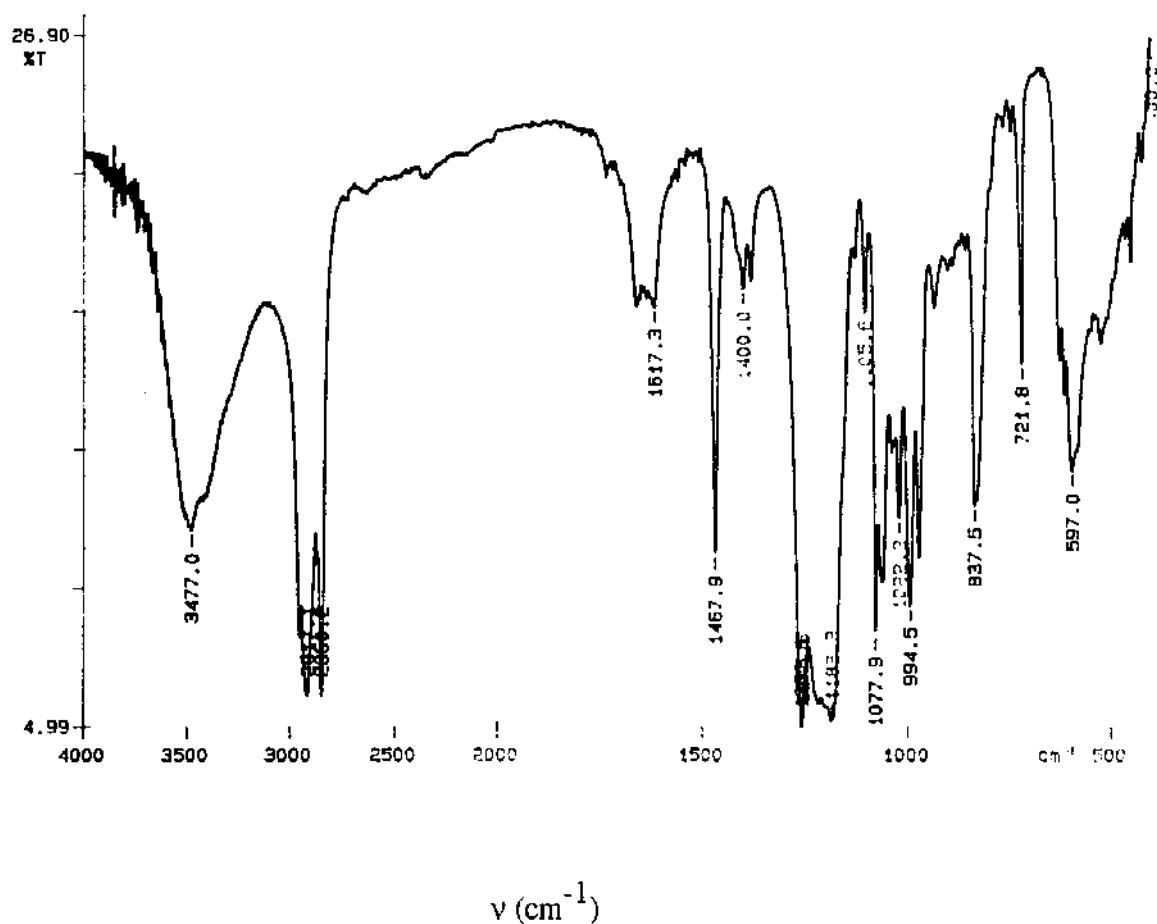
5 CLS
6 PRINT
10 PRINT "*****"
15 PRINT "**          PROGRAMA - LIGAND          **"
20 PRINT "** FAZ A INTERPRETACAO DA ISOTERMA DE INTERACAO"
22 PRINT "** PROTEINA-SURFATANTE ATRAVES DO MODELO DE **"
25 PRINT "** DISTRIBUICAO LIVRE **"
30 PRINT "**          **"
35 PRINT "** ADAPTADO POR: ELOI A. SILVA FILHO          **"
40 PRINT "** CAMPINAS-SP 25/01/93          **"
45 PRINT "*****"
46 PRINT "** O ALGORITMO FOI ADAPTADO DA REFERENCIA          **"
47 PRINT "** The Analysis of Enzyme Reactions, M. J. C. Crabbe **"
48 PRINT "** Microcomputadors in Biology a Practical Approach, ed. **"
49 PRINT "** by C. R. Ireland & S. P. Long, Published in the **"
50 PRINT "** Practical Approach Series editors: D. Rickwood and **"
51 PRINT "** B. D. Hames. Irlpress, Oxford, Washington DC **"
52 PRINT "*****"
53 PRINT
55 PRINT "PROTEINA:"
60 INPUT P$
65 PRINT "PROTEINA:;",P
70 PRINT "SURFATANTE:";
75 INPUT S$
80 PRINT "SURFATANTE:;",S
85 PRINT "DATA DO EXPERIMENTO:";
90 INPUT D$
95 PRINT "DATA DO EXPERIMENTO:;",D
110 print
300 PRINT "ENTER NUMBER OF OBSERVATIONS"
400 INPUT N
405 PRINT "ENTER NUMBER OF OBSERVATIONS";N
410 DIM S(30),V(30),M(200),K(200),P(30),A(200),B(200)
420 FOR I=1 TO N
425 INPUT "ENTER FREE LIGAND CONCENTRATION";S(I)
430 INPUT "ENTER BOUND LIGAND CONCENTRATION";V(I)
435 PRINT "FREE=";S(I)
440 PRINT "BOUND=";V(I)
445 PRINT "FREE=";S(I)
450 PRINT "BOUND=";V(I)
470 P(I)=S(I):S(I)=1/V(I):V(I)=P(I)/V(I)

```

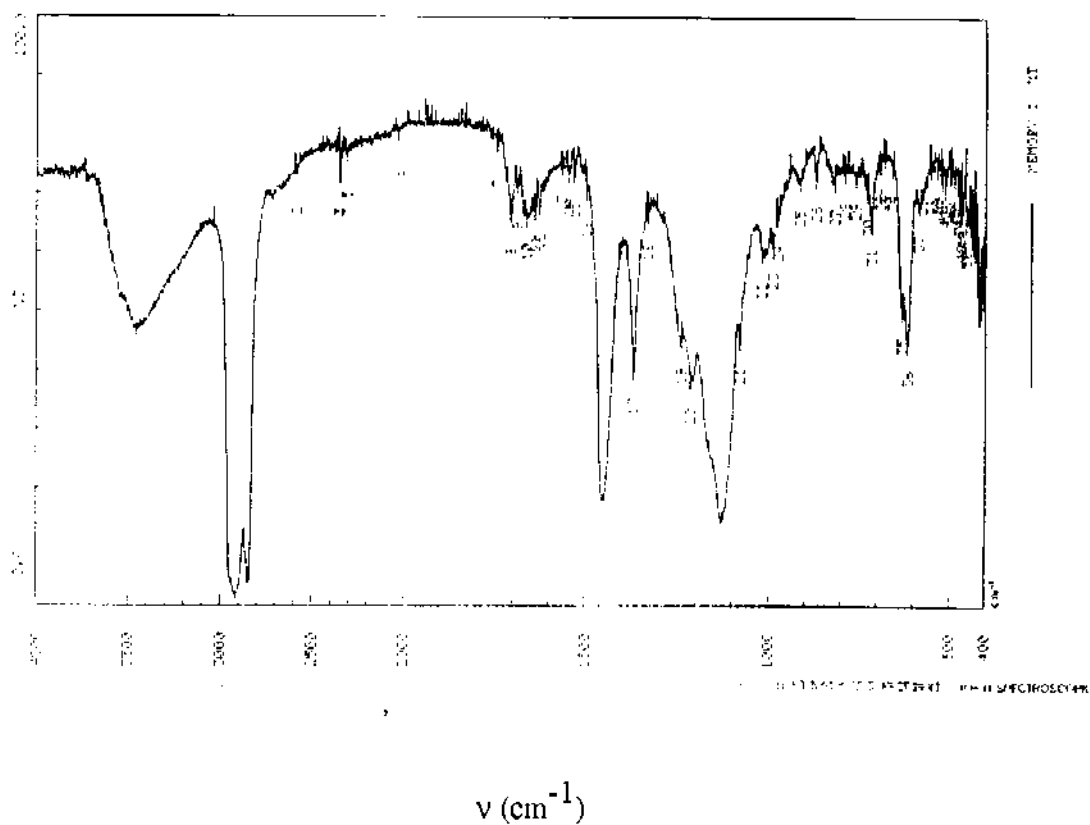
```
472 NEXT I
473 L=1
475 B=2
480 FOR I=1 TO N-1
485 FOR J=B TO N
490 W=V(J)/S(J)
500 U=V(I)/S(I)
505 IF W<>0 GOTO 510
506 IF U<>0 GOTO 510
510 K(L)=-((V(I)-V(J))/((W)-(U)))
520 M(L)=-((V(I)/S(I))*K(L))+V(I)
525 LPRINT "K(L)",K(L),"M(L)",M(L),"I",I,"J",J
530 L=L+1
535 NEXT J
540 B=B+1
542 NEXT I
545 I=L-1
550 B=2
555 FOR L=1 TO I-1
560 FOR J=B TO I
562 IF K(L)>=K(J) GOTO 570
563 T=K(L)
564 K(L)=K(J)
565 K(J)=T
570 IF M(L)>=M(J) GOTO 580
572 T=M(L)
573 M(L)=M(J)
574 M(J)=T
580 NEXT J
585 B=B+1
590 NEXT L
595 LPRINT "K(L)","V(L)""INTERCEPTS"
600 FOR L=1 TO I
610 PRINT K(L),M(L)
620 NEXT L
625 L=INT(L+.5)
630 X=L
640 X=(X/2)
645 L=INT(L/2)
646 IF (X-L)<0.1 GOTO 700
```

```
647 Z=X+(X-L)
648 L=Z
650 A1=1/K(L)
652 B1=M(L)*A1
653 LPRINT "1/NUMBER OF BINDING SITES (OR B(N)/A(N))="K(L)
655 LPRINT "1/NUMBER OF BINDING SITES (OR B(N)/A(N))="K(L)
660 LPRINT "MAXIMUM NUMBER OF BINDING SITES="A1
662 LPRINT "K(D)/N (OR B(0)/A1)="M(L)
663 LPRINT "CONSTANT (K(D))="B1
665 LPRINT "CONSTANT (K(D))="B1
670 GO TO 750
700 Y=(K(L)+K(L+1))/2
702 W=(M(L)+M(L+1))/2
704 A2=1/Y
705 B2=W*A2
710 LPRINT "NUMBER OF BINDING SITES="A2
720 LPRINT "K(D)="B2
730 GOTO 800
750 FOR L=1 TO I
755 A(L)=K(L)-K(Z)
756 B(L)=M(L)-M(Z)
757 B(L)=B(L)*A1
760 LPRINT A1+A(L),B1+B(L)
765 LPRINT "RESIDUAL:N=";1+A(L),"KD=";B1+B(L)
770 PRINT
772 NEXT L
790 END
800 FOR L=1 TO I
805 LPRINT K(L)-Y, M(L)-W
810 A(L)=K(L)
820 B(L)=M(L)-W
830 B(L)=B(L)*A2
840 LPRINT A2+A(L),B2+B(L)
850 LPRINT "RESIDUAL:N=";A2+A(L),"KD=";B2+B(L)
860 PRINT
870 NEXT L
880 PRINT "VOCE DESEJA FAZER OUTRO CALCULO (Y OU N):";
890 INPUT V$
892 PRINT
895 IF V$="Y" THEN 55
900 IF V$="N" THEN 910
910 END
```

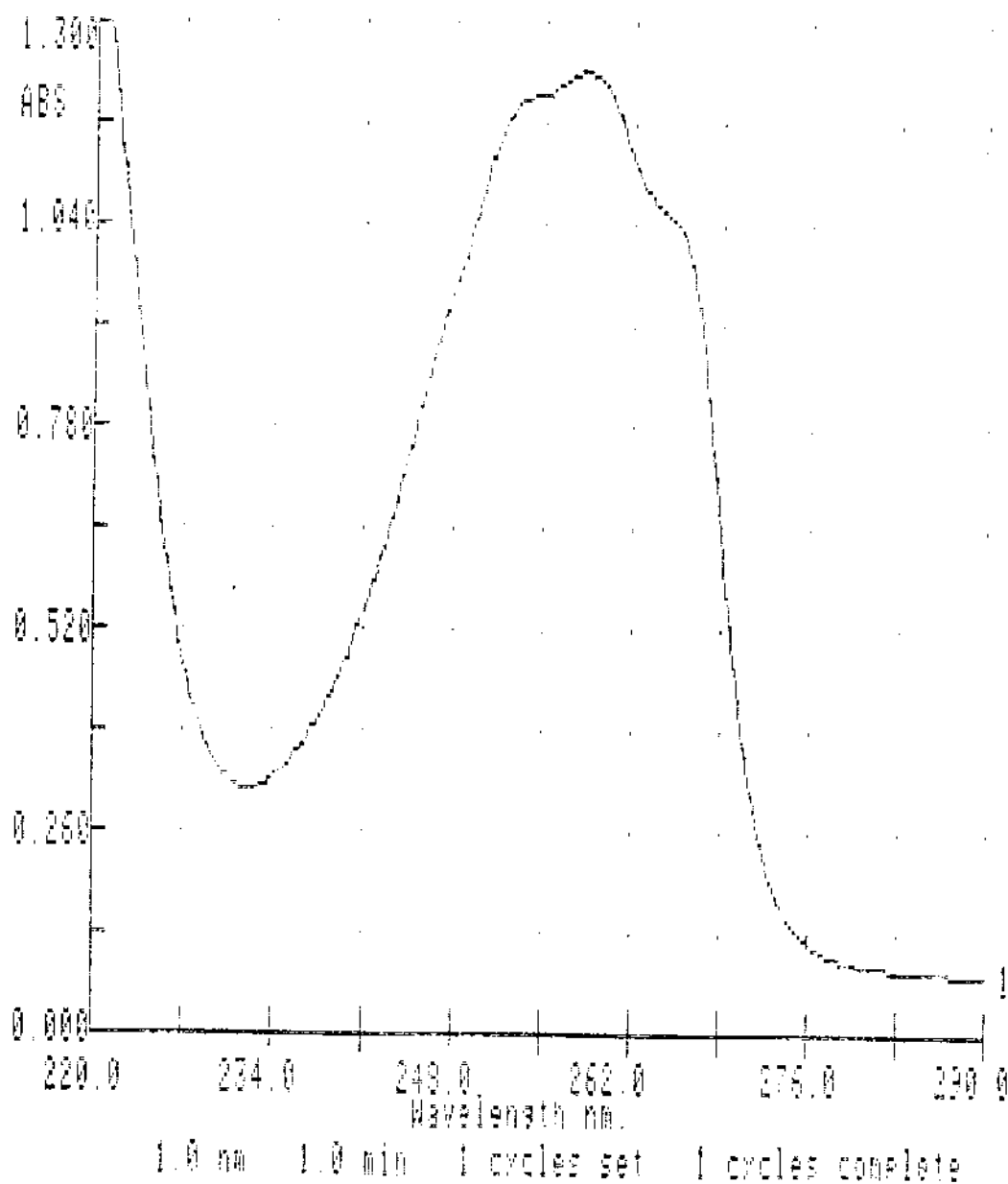

ESPECTRO NO INFRAVERMELHO



Espectro no infravermelho do Tetradecilsulfato de sódio (TDSS) em pastilha KBr



Espectro no infravermelho do Octilsulfato de sódio (OSS) em pastilha de KBr



**ESPECTRO ELETRÔNICO DE ABSORÇÃO DO TENSOATIVO
CPC $5,0 \times 10^{-3}$ M, A 25 °C.**

DADOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO - MÉTODO DE EXTRAÇÃO DO PAR IÔNICO TENSOATIVO-CORANTE

DSS $6,2 \times 10^{-5}$ M EM TAMPÃO FOSFATO, AZM $2,0 \times 10^{-4}$ M

[DSS] mol.L ⁻¹	Vol.(mL) [DSS]	Vol. (mL) T.Fosf.	Vol. (mL) AZM	Vol. (mL) CHCl ₃	Abs 660 nm
$1,78 \times 10^{-5}$	1,80	1,20	0,25	3,0	0,824
$1,49 \times 10^{-5}$	1,50	1,50	0,25	3,0	0,796
$1,20 \times 10^{-5}$	1,20	1,80	0,25	3,0	0,667
$7,94 \times 10^{-6}$	0,80	2,20	0,25	3,0	0,456
$4,96 \times 10^{-6}$	0,50	2,50	0,25	3,0	0,319
$9,92 \times 10^{-7}$	0,10	2,90	0,25	3,0	0,137
$4,96 \times 10^{-7}$	0,05	2,95	0,25	3,0	0,086

DSS $6,2 \times 10^{-5}$ M EM TAMPÃO BÓRAX, AZM $2,0 \times 10^{-4}$ M

[DSS] mol.L ⁻¹	Vol.(mL) [DSS]	Vol. (mL) T.Bórax.	Vol. (mL) AZM	Vol. (mL) CHCl ₃	Abs 660 nm
$2,97 \times 10^{-5}$	3,00	0,00	0,25	3,0	1,095
$2,48 \times 10^{-5}$	2,50	0,50	0,25	3,0	1,041
$1,98 \times 10^{-5}$	2,00	1,00	0,25	3,0	0,977
$1,79 \times 10^{-5}$	1,80	1,20	0,25	3,0	1,101
$1,50 \times 10^{-5}$	1,50	1,50	0,25	3,0	1,059
$1,20 \times 10^{-5}$	1,20	1,80	0,25	3,0	0,965
$9,92 \times 10^{-6}$	1,00	2,00	0,25	3,0	0,768
$7,94 \times 10^{-6}$	0,80	2,20	0,25	3,0	0,423
$4,96 \times 10^{-6}$	0,50	2,50	0,25	3,0	0,279
$1,98 \times 10^{-6}$	0,20	2,80	0,25	3,0	0,134

SDS $1,0 \times 10^{-5}$ M EM TAMPÃO ACETATO, AZM $2,0 \times 10^{-4}$ M

[SDS] mol.L ⁻¹	Vol.(mL) [SDS]	Vol. (mL) T.Ac.	Vol. (mL) AZM	Vol. (mL) CHCl ₃	Abs 660 nm
$3,75 \times 10^{-6}$	3,00	0,00	2,0	3,0	0,98
$3,50 \times 10^{-6}$	2,80	0,20	2,0	3,0	0,94
$3,13 \times 10^{-6}$	2,50	0,50	2,0	3,0	0,74
$2,25 \times 10^{-6}$	1,80	1,20	2,0	3,0	0,57
$1,87 \times 10^{-6}$	1,50	1,50	2,0	3,0	0,53
$1,50 \times 10^{-6}$	1,20	1,80	2,0	3,0	0,46
$1,25 \times 10^{-6}$	1,00	2,00	2,0	3,0	0,35
$1,00 \times 10^{-6}$	0,80	2,20	2,0	3,0	0,34
$6,25 \times 10^{-7}$	0,50	2,50	2,0	3,0	0,34
$6,25 \times 10^{-8}$	0,05	2,95	2,0	3,0	0,13

SDS $5,0 \times 10^{-5}$ M EM TAMPÃO FOSFATO, AZM $2,0 \times 10^{-4}$ M

[SDS] mol.L ⁻¹	Vol.(mL) [SDS]	Vol. (mL) T.Fosfato	Vol. (mL) AZM	Vol. (mL) CHCl ₃	Abs 660 nm
$1,07 \times 10^{-5}$	1,50	1,50	1,0	3,0	1,698
$8,57 \times 10^{-6}$	1,20	1,80	1,0	3,0	1,300
$6,26 \times 10^{-6}$	1,00	2,00	1,0	3,0	1,097
$5,71 \times 10^{-6}$	0,80	2,20	1,0	3,0	0,886
$4,28 \times 10^{-6}$	0,60	2,40	1,0	3,0	0,657
$3,57 \times 10^{-6}$	0,50	2,50	1,0	3,0	0,568
$1,43 \times 10^{-6}$	0,20	2,80	1,0	3,0	0,292
$7,14 \times 10^{-7}$	0,10	2,90	1,0	3,0	0,174
$3,57 \times 10^{-7}$	0,05	2,95	1,0	3,0	0,092

SDS $6,0 \times 10^{-5}$ M EM TAMPÃO BÓRAX, AZM $2,0 \times 10^{-4}$ M

[SDS] mol.L ⁻¹	Vol.(mL) [SDS]	Vol. (mL) T.Bórax	Vol. (mL) AZM	Vol. (mL) CHCl ₃	Abs 660 nm
$2,88 \times 10^{-5}$	3,00	0,00	0,25	3,0	0,944
$2,40 \times 10^{-5}$	2,50	0,50	0,25	3,0	0,940
$1,73 \times 10^{-5}$	1,80	1,20	0,25	3,0	0,919
$7,68 \times 10^{-6}$	0,80	2,20	0,25	3,0	0,897
$5,76 \times 10^{-6}$	0,60	2,40	0,25	3,0	0,850
$4,80 \times 10^{-6}$	0,50	2,50	0,25	3,0	0,798
$1,92 \times 10^{-6}$	0,20	2,80	0,25	3,0	0,397
$9,23 \times 10^{-7}$	0,10	2,90	0,25	3,0	0,24

TDSS $1,0 \times 10^{-5}$ M EM TAMPÃO ACETATO, AZM $1,0 \times 10^{-5}$ M

[TDSS] mol.L ⁻¹	Vol.(mL) [TDSS]	Vol. (mL) T.Acetato	Vol. (mL) AZM	Vol. (mL) CHCl ₃	Abs 660 nm
$3,74 \times 10^{-6}$	2,80	0,20	0,50	4,0	0,087
$2,40 \times 10^{-6}$	1,80	1,20	0,50	4,0	0,086
$2,00 \times 10^{-6}$	1,50	1,50	0,50	4,0	0,082
$1,60 \times 10^{-6}$	1,20	1,80	0,50	4,0	0,078
$1,34 \times 10^{-6}$	1,00	2,00	0,50	4,0	0,077
$1,07 \times 10^{-6}$	0,80	2,20	0,50	4,0	0,071
$6,67 \times 10^{-7}$	0,50	2,50	0,50	4,0	0,067

TDSS $1,0 \times 10^{-5}$ M EM TAMPÃO FOSFATO, AZM $1,0 \times 10^{-5}$ M

[TDSS] mol.L ⁻¹	Vol.(mL) [TDSS]	Vol. (mL) T.Fosfato	Vol. (mL) AZM	Vol. (mL) CHCl ₃	Abs 660 nm
$4,00 \times 10^{-6}$	3,00	0,00	0,50	4,0	0,082
$3,07 \times 10^{-6}$	2,30	0,70	0,50	4,0	0,088
$2,67 \times 10^{-6}$	2,00	1,00	0,50	4,0	0,083
$2,40 \times 10^{-6}$	1,80	1,20	0,50	4,0	0,078
$1,60 \times 10^{-6}$	1,20	1,80	0,50	4,0	0,073
$1,07 \times 10^{-6}$	0,80	2,20	0,50	4,0	0,068
$2,67 \times 10^{-7}$	0,20	2,80	0,50	4,0	0,046
$1,34 \times 10^{-7}$	0,10	2,90	0,50	4,0	0,030

TDSS $1,0 \times 10^{-5}$ M EM TAMPÃO BÓRAX, AZM $1,0 \times 10^{-5}$ M

[TDSS] mol.L ⁻¹	Vol.(mL) [TDSS]	Vol. (mL) T.Bórax	Vol. (mL) AZM	Vol. (mL) CHCl ₃	Abs 660 nm
$4,00 \times 10^{-6}$	3,00	0,00	0,50	4,0	0,084
$3,07 \times 10^{-6}$	2,30	0,70	0,50	4,0	0,120
$2,67 \times 10^{-6}$	2,00	1,00	0,50	4,0	0,106
$2,40 \times 10^{-6}$	1,80	1,20	0,50	4,0	0,092
$2,00 \times 10^{-6}$	1,50	1,50	0,50	4,0	0,085
$1,60 \times 10^{-6}$	1,20	1,80	0,50	4,0	0,075
$1,34 \times 10^{-7}$	1,00	2,00	0,50	4,0	0,076
$2,67 \times 10^{-7}$	0,20	2,80	0,50	4,0	0,055

OSS $1,0 \times 10^{-3}$ M EM TAMPÃO ACETATO, AZM $1,0 \times 10^{-5}$ M

[OSS] mol.L ⁻¹	Vol.(mL) [OSS]	Vol. (mL) T.Acetato	Vol. (mL) AZM	Vol. (mL) CHCl ₃	Abs 660 nm
$3,75 \times 10^{-4}$	3,00	0,00	1,0	4,0	0,1508
$2,50 \times 10^{-4}$	2,00	1,00	1,0	4,0	0,1730
$2,25 \times 10^{-4}$	1,80	1,20	1,0	4,0	0,1693
$1,88 \times 10^{-4}$	1,50	1,50	1,0	4,0	0,1633
$1,25 \times 10^{-4}$	1,00	2,00	1,0	4,0	0,1606
$1,00 \times 10^{-4}$	0,80	2,20	1,0	4,0	0,1574
$6,25 \times 10^{-5}$	0,50	2,50	1,0	4,0	0,1563
$5,00 \times 10^{-5}$	0,40	2,60	1,0	4,0	0,1530
$3,75 \times 10^{-5}$	0,30	2,70	1,0	4,0	0,1452
$1,25 \times 10^{-5}$	0,10	2,90	1,0	4,0	0,1012

OSS $1,0 \times 10^{-3}$ M EM TAMPÃO FOSFATO, AZM $1,0 \times 10^{-5}$ M

[OSS] mol.L ⁻¹	Vol.(mL) [OSS]	Vol. (mL) T.Fosfato	Vol. (mL) AZM	Vol. (mL) CHCl ₃	Abs 660 nm
$2,50 \times 10^{-4}$	2,00	1,00	1,0	4,0	0,1353
$1,00 \times 10^{-4}$	0,80	2,20	1,0	4,0	0,1420
$8,75 \times 10^{-5}$	0,70	2,30	1,0	4,0	0,1425
$5,00 \times 10^{-5}$	0,40	2,60	1,0	4,0	0,1352
$1,50 \times 10^{-5}$	0,12	2,88	1,0	4,0	0,1205
$1,00 \times 10^{-5}$	0,08	2,92	1,0	4,0	0,1109
$6,25 \times 10^{-6}$	0,05	2,95	1,0	4,0	0,1080
$2,50 \times 10^{-6}$	0,02	2,98	1,0	4,0	0,1034

OSS $1,0 \times 10^{-3}$ M EM TAMPÃO BÓRAX, AZM $1,0 \times 10^{-5}$ M

[OSS] mol.L ⁻¹	Vol.(mL) [OSS]	Vol. (mL) T.Bórax	Vol. (mL) AZM	Vol. (mL) CHCl ₃	Abs 660 nm
$2,50 \times 10^{-4}$	2,00	1,00	1,0	4,0	0,1208
$8,75 \times 10^{-5}$	0,70	2,30	1,0	4,0	0,1038
$6,25 \times 10^{-5}$	0,50	2,50	1,0	4,0	0,0870
$5,00 \times 10^{-5}$	0,40	2,60	1,0	4,0	0,0855
$2,50 \times 10^{-5}$	0,20	2,80	1,0	4,0	0,0721
$1,88 \times 10^{-5}$	0,15	2,85	1,0	4,0	0,0719
$1,00 \times 10^{-5}$	0,08	2,92	1,0	4,0	0,0622
$6,25 \times 10^{-6}$	0,05	2,95	1,0	4,0	0,0619

DTAB $1,0 \times 10^{-4}$ M EM TAMPÃO ACETATO, ORANGE II $4,0 \times 10^{-5}$ M

[DTAB] mol.L ⁻¹	Vol.(mL) [DTAB]	Vol. (mL) T.Acetato	Vol. (mL) OR. II	Vol. (mL) CHCl ₃	Abs 483 nm
$4,44 \times 10^{-5}$	4,00	0,00	1,0	4,0	0,167
$3,33 \times 10^{-5}$	3,00	1,00	1,0	4,0	0,165
$2,78 \times 10^{-5}$	2,50	1,50	1,0	4,0	0,162
$1,67 \times 10^{-5}$	1,50	2,50	1,0	4,0	0,164
$1,11 \times 10^{-5}$	1,00	3,00	1,0	4,0	0,152
$5,56 \times 10^{-6}$	0,50	3,50	1,0	4,0	0,151
$2,22 \times 10^{-6}$	0,20	3,80	1,0	4,0	0,083
$1,11 \times 10^{-6}$	0,10	3,90	1,0	4,0	0,066
$5,56 \times 10^{-7}$	0,05	3,95	1,0	4,0	0,024

DTAB $1,0 \times 10^{-4}$ M EM TAMPÃO FOSFATO, ORANGE II $4,0 \times 10^{-5}$ M

[DTAB] mol.L ⁻¹	Vol.(mL) [DTAB]	Vol. (mL) T.Fosfato	Vol. (mL) OR. II	Vol. (mL) CHCl ₃	Abs 483 nm
$3,89 \times 10^{-5}$	3,50	0,50	1,0	4,0	0,168
$2,78 \times 10^{-5}$	2,50	1,50	1,0	4,0	0,162
$2,22 \times 10^{-5}$	2,00	2,00	1,0	4,0	0,163
$1,67 \times 10^{-5}$	1,50	2,50	1,0	4,0	0,157
$1,11 \times 10^{-5}$	1,00	3,00	1,0	4,0	0,160
$5,56 \times 10^{-6}$	0,50	3,50	1,0	4,0	0,158
$2,22 \times 10^{-6}$	0,20	3,80	1,0	4,0	0,092
$1,11 \times 10^{-6}$	0,10	3,90	1,0	4,0	0,056
$5,56 \times 10^{-7}$	0,05	3,95	1,0	4,0	0,022

DTAB $1,0 \times 10^{-4}$ M EM TAMPÃO BÓRAX, ORANGE II $4,0 \times 10^{-5}$ M

[DTAB] mol.L ⁻¹	Vol.(mL) [DTAB]	Vol. (mL) T.Bórax	Vol. (mL) OR. II	Vol. (mL) CHCl ₃	Abs 483 nm
$3,33 \times 10^{-5}$	3,00	1,00	1,0	4,0	0,153
$2,78 \times 10^{-5}$	2,50	1,50	1,0	4,0	0,158
$2,22 \times 10^{-5}$	2,00	2,00	1,0	4,0	0,160
$1,11 \times 10^{-5}$	1,00	3,00	1,0	4,0	0,157
$8,89 \times 10^{-6}$	0,80	3,20	1,0	4,0	0,155
$5,56 \times 10^{-6}$	0,50	3,50	1,0	4,0	0,152
$2,22 \times 10^{-6}$	0,20	3,80	1,0	4,0	0,097
$1,11 \times 10^{-6}$	0,10	3,90	1,0	4,0	0,045
$5,56 \times 10^{-7}$	0,05	3,95	1,0	4,0	0,018

DADOS DA TITULAÇÃO MICROCALORIMÉTRICA

TAB.1-TITULAÇÃO TDSS 0,01 M /TRIPSINA 4,0 mg/mL

V_{total} mL	N.moles $\times 10^{-7}$ de TDSS	[TDSS] $\times 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$	ΣQ_{Obs} /mJ pH 7,0
2,026	0,6	0,3	1,01
2,052	1,19	0,58	2,02
2,078	1,79	0,86	2,53
2,104	2,39	1,14	3,24
2,130	3,00	1,40	4,05
2,156	3,59	1,66	4,86

TAB.2 -TITULAÇÃO TDSS $2,3 \times 10^{-3}$ M /TRIPSINA 1,2 mg/mL

V_{total} ml.	N.moles $\times 10^{-7}$ de TDSS	[TDSS] $\times 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$	ΣQ_{Obs} /mJ pH 3,5
2,078	1,79	0,863	0,086
2,104	2,39	1,14	0,172
2,130	3,00	1,40	0,258
2,156	3,60	1,66	0,387
2,208	4,78	2,17	0,588

TAB.3 -TITULAÇÃO TDSS 0,01 M /TRIPSINA 4,0 mg/mL

V_{total} mL	N.moles $\times 10^{-7}$ de TDSS	[TDSS] $\times 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$	ΣQ_{Obs} /mJ pH 9,0
2,026	2,60	1,28	0,312
2,052	5,20	2,53	0,935
2,104	10,40	4,94	1,715
2,130	13,00	6,10	2,965

TAB.4 -TITULAÇÃO SDS 5×10^{-3} M /TRIPSINA 1,2 mg/mL

V_{total} mL	N.moles $\times 10^{-7}$ de SDS	[SDS] $\times 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$	$-\Sigma Q_{Obs}$ /mJ pH 7,0	ΣQ_{Obs} /mJ pH 3,5	ΣQ_{Obs} /mJ pH 9,0
2,026	1,30	6,42	1,19	0,206	2,32
2,052	2,60	1,27	2,40	0,102	4,64
2,078	3,90	1,87	3,14	0,231	6,96
2,104	5,20	2,47	5,19	0,430	6,69
2,130	6,50	3,06	5,54	-	5,19
2,156	7,80	3,62	6,65	-	-
2,182	9,10	4,17	7,76	-	-
2,234	11,70	5,24	10,28	-	-

TAB.5 -TITULAÇÃO DSS 0.01 M /TRIPSINA 1.2 mg/mL

V_{total} mL	N.moles $\times 10^{-7}$ de DSS	[DSS] $\times 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$	- ΣQ_{obs} /mJ pH 7.0
2,026	2,60	1,26	-
2,052	5,20	2,53	1,91
2,078	7,80	3,75	3,82
2,104	10,40	4,94	-
2,130	13,00	6,10	5,73
2,156	15,60	7,24	-
2,182	18,20	8,34	7,83
2,234	23,40	10,50	9,81

TAB.6 -TITULAÇÃO DSS 0.1 M /TRIPSINA 2.0 mg/mL

V_{total} mL	N.moles $\times 10^{-6}$ de DSS	[DSS] $\times 10^{-3}$ mol.L $^{-1}$	ΣQ_{obs} /mJ pH 3.5
2,026	2,60	1,26	7,82
2,052	5,20	2,53	15,84
2,078	7,80	3,75	23,19
2,104	10,40	4,94	29,00
2,130	13,00	6,10	34,21
2,156	15,60	7,24	39,22

TAB.6 -TITULAÇÃO DSS 0,1 M /TRIPSINA 1.0 mg/mL

V_{total} mL	N.moles $\times 10^{-7}$ de DSS	[DSS] $\times 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$	ΣQ_{obs} /mJ pH 9.0
2,031	3,12	1,54	0,693
2,039	3,90	1,91	0,891
2,047	4,68	2,28	1,131
2,055	5,46	2,66	1,343
2,062	6,24	3,03	1,512

TAB. 7 -TITULAÇÃO CPC 5.0×10^{-3} M /TRIPSINA 2.0 mg/mL

V_{total} mL	N.moles $\times 10^{-7}$ de CPC	[CPC] $\times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹	ΣQ_{obs} /mJ pH 3.5	ΣQ_{obs} /mJ pH 7.0
2,026	1,30	6,42	5,45	-
2,052	2,60	1,27	9,98	-
2,078	3,90	1,88	10,41	-5,45
2,104	5,20	2,47	11,83	-4,51
2,130	6,50	3,05	13,29	-2,26
2,156	7,80	3,62	13,73	0,68

TAB. 8 -TITULAÇÃO CPC 5.0×10^{-3} M /TRIPSINA 1.2 mg/mL

V_{total} mL	N.moles $\times 10^{-7}$ de CPC	[CPC] $\times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹	ΣQ_{obs} /mJ pH 9,0
2,026	1,30	0,642	1,00
2,052	2,60	1,26	1,76
2,078	3,90	1,87	2,26
2,104	5,20	2,47	2,57
2,130	6,50	3,05	2,91
2,156	7,80	3,62	3,33

TAB. 9 -TITULAÇÃO DTAB 0.1 M /TRIPSINA 1.2 mg/mL

V_{total} mL	N.moles $\times 10^{-6}$ de DTAB	[DTAB] $\times 10^{-3}$ mol.L ⁻¹	ΣQ_{obs} /mJ pH 3,5	ΣQ_{obs} /mJ pH 7,0	ΣQ_{obs} /mJ pH 9,0
2,026	2,60	1,30	1,26	1,07	3,62
2,052	5,20	2,53	3,22	2,87	8,16
2,078	7,80	3,80	4,30	4,14	12,14
2,104	10,40	4,94	6,35	6,46	17,24
2,130	13,00	6,10	8,33	7,83	22,34
2,156	15,60	7,23	-	-	-
2,182	18,20	8,34	-	-	-
2,208	20,80	9,42	-	-	-

**ENTRADA DE DADOS - PROGRAMA LIGAND
GRÁFICOS: MODELO DE DISTRIBUIÇÃO LIVRE**

Tripsina-OSS (T. Acetato 10 mM pH 3,5)

PROTEÍNA: Tripsina 0,6 mg/mL (Tampão Acetato)

SURFATANTE: OSS (Tampão Acetato)

ENTER NUMBER OF OBSERVATIONS: 7

ENTER FREE LIGAND CONCENTRATION

ENTER BOUND LIGAND CONCENTRATION

1.61E-5, 30.38

1.57E-5, 14.89

1.51E-5, 11.04

1.16E-5, 7.30

1.06E-5, 3.08

9.61E-6, 2.92

9.08E-6, 2.36

OUTPUT

RESIDUAL: N=-2.001065 KD=-4.968853E-05

RESIDUAL: N=-2.216272 KD=-4.658935E-05

RESIDUAL: N=-2.283448 KD=-3.018252E-05

RESIDUAL: N=-2.3884 KD=-2.478279E-05

RESIDUAL: N=-2.503383 KD=-1.992397E-05

RESIDUAL: N=-2.520321 KD=-1.949156E-05

RESIDUAL: N=-2.578493 KD=-1.809228E-05

RESIDUAL: N=-2.613893 KD=-1.792739E-05

RESIDUAL: N=-2.621118 KD=-1.588869E-05

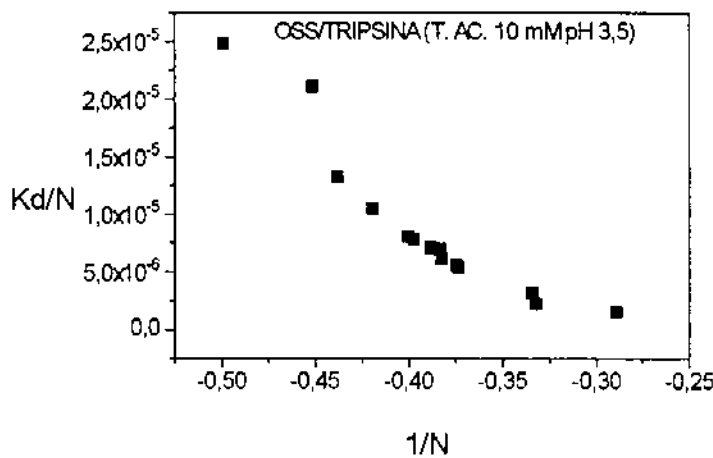
RESIDUAL: N=-2.675305 KD=-1.468507E-05

RESIDUAL: N=-2.68243 KD=-1.43346E-05

RESIDUAL: N=-2.990846 KD=-9.299294E-06

RESIDUAL: N=-3.008351 KD=-6.678079E-06

RESIDUAL: N=-3.464155 KD=-5.000346E-06



Tripsina-DSS (T. Acetato 10 mM pH 3,5)7

PROTEÍNA: Tripsina 0,6 mg/mL (Tampão Acetato)

SURFATANTE: DSS (Tampão Acetato)

ENTER NUMBER OF OBSERVATIONS: 10

ENTER FREE LIGAND CONCENTRATION

ENTER BOUND LIGAND CONCENTRATION

1.08E-5, 3.46

9.39E-6, 2.74

9.16E-6, 2.36

8.69E-6, 2.00

7.87E-6, 1.63

5.42E-6, 1.34

4.50E-6, 0.98

3.02E-6, 0.85

1.70E-6, 0.71

1.12E-6, 0.54

OUTPUT

RESIDUAL: N=1.769515 KD=1.193922E-04

RESIDUAL: N=1.676617 KD=9.801726E-05

RESIDUAL: N=1.670157 KD=8.749111E-05

RESIDUAL: N=1.636707 KD=8.699956E-05

RESIDUAL: N=1.593763 KD=8.673741E-05

RESIDUAL: N=1.444034 KD=7.510673E-05

RESIDUAL: N=1.350109 KD=6.717298E-05

RESIDUAL: N=1.335465 KD=5.214876E-05

RESIDUAL: N=1.299828 KD=4.878225E-05

RESIDUAL: N=1.286273 KD=4.598269E-05

RESIDUAL: N=1.21158 KD=4.48912E-05

RESIDUAL: N=1.191797 KD=3.957356E-05

RESIDUAL: N=1.170867 KD=3.952353E-05

RESIDUAL: N=1.154751 KD=3.438708E-05

RESIDUAL: N=1.116593 KD=3.27853E-05

RESIDUAL: N=1.096738 KD=3.134576E-05

RESIDUAL: N=1.091135 KD=2.893952E-05

RESIDUAL: N=1.031499 KD=2.711853E-05

RESIDUAL: N=1 KD=2.549921E-05

RESIDUAL: N=0.9836181 KD=2.136545E-05

RESIDUAL: N=0.9716989 KD=2.087509E-05

RESIDUAL: N=0.9619502 KD=1.899844E-05

RESIDUAL: N=0.9452943 KD=1.805004E-05

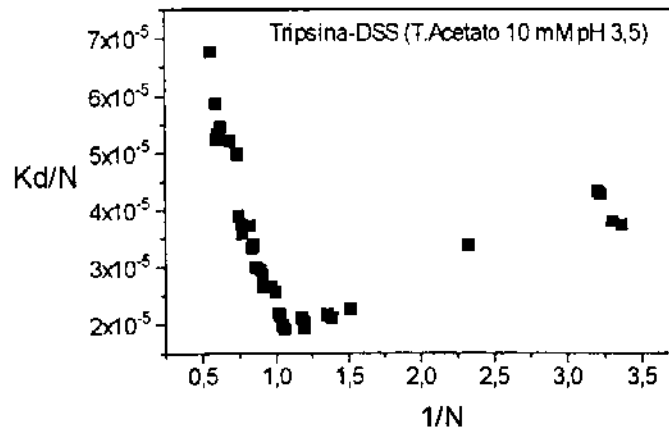
RESIDUAL: N=0.8481115 KD=1.774564E-05

RESIDUAL: N=0.8363369 KD=1.684309E-05

RESIDUAL: N=0.8328955 KD=1.606459E-05

RESIDUAL: N=0.7393429 KD=1.593232E-05

RESIDUAL: N=0.720173 KD=1.515938E-05
 RESIDUAL: N=0.6584019 KD=1.494627E-05
 RESIDUAL: N=0.4284107 KD=1.442577E-05
 RESIDUAL: N=0.3118954 KD=1.345347E-05
 RESIDUAL: N=0.3092693 KD=1.324508E-05
 RESIDUAL: N=0.3025118 KD=1.145896E-05
 RESIDUAL: N=0.2971745 KD=1.111269E-05
 RESIDUAL: N=0.1578026 KD=9.798994E-06



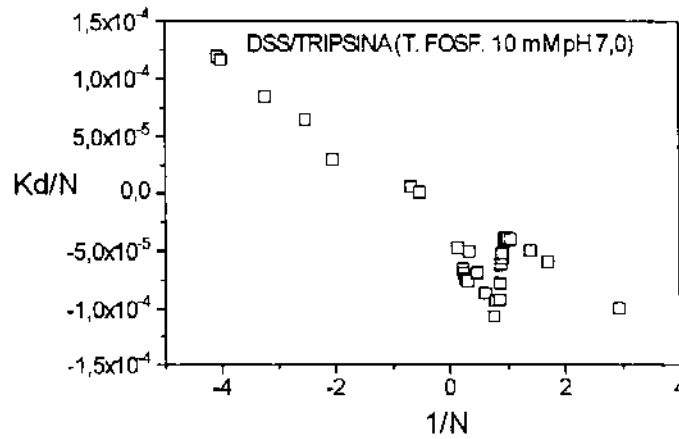
Tripsina-DSS (T. Fosfato 10 mM pH 7,0)

PROTEÍNA: Tripsina 0,6 mg/mL (Tampão Fosfato)
 SURFATANTE: DSS (Tampão Fosfato)
 ENTER NUMBER OF OBSERVATIONS: 9
 ENTER FREE LIGAND CONCENTRATION
 ENTER BOUND LIGAND CONCENTRATION

1.17E-5, 3.42
1.07E-5, 2.69
1.04E-5, 2.12
9.74E-6, 1.95
7.34E-6, 0.49
4.98E-6, 0.39
3.57E-6, 0.64
2.54E-6, 0.48
1.60E-6, 0.33

OUTPUT

RESIDUAL: N=6.716844 KD=-3.220562E-04
RESIDUAL: N=4.205905 KD=-2.769679E-04
RESIDUAL: N=3.924025 KD=-2.760454E-04
RESIDUAL: N=3.484746 KD=-2.6233E-04
RESIDUAL: N=3.159648 KD=-2.436725E-04
RESIDUAL: N=2.906331 KD=-1.479015E-04
RESIDUAL: N=2.077924 KD=-1.445087E-04
RESIDUAL: N=1.6128 KD=-1.414734E-04
RESIDUAL: N=1.287444 KD=-1.393682E-04
RESIDUAL: N=1.260847 KD=-1.187471E-04
RESIDUAL: N=1.159314 KD=-1.083633E-04
RESIDUAL: N=1.147827 KD=-9.067995E-05
RESIDUAL: N=1.128454 KD=-7.028782E-05
RESIDUAL: N=1.100108 KD=-6.23627E-05
RESIDUAL: N=1.09222 KD=-5.734804E-05
RESIDUAL: N=1.062782 KD=-4.465728E-05
RESIDUAL: N=1.045639 KD=-4.111212E-05
RESIDUAL: N=1.006162 KD=-4.033591E-05
RESIDUAL: N=1 KD=-3.91397E-05
RESIDUAL: N=0.980304 KD=-3.832455E-05
RESIDUAL: N=0.9371144 KD=-3.818277E-05
RESIDUAL: N=0.7143759 KD=-3.590614E-05
RESIDUAL: N=0.5846871 KD=-3.538946E-05
RESIDUAL: N=0.3383607 KD=-3.423258E-05
RESIDUAL: N=8.177084E-02 KD=-3.410255E-05
RESIDUAL: N=-6.763935E-04 KD=-3.070872E-05
RESIDUAL: N=-0.2453039 KD=-2.911954E-05
RESIDUAL: N=-0.249768 KD=-2.896861E-05
RESIDUAL: N=-0.3095133 KD=-2.59158E-05
RESIDUAL: N=-0.3956518 KD=-2.527219E-05
RESIDUAL: N=-0.4919386 KD=-1.432451E-05
RESIDUAL: N=-1.509711 KD=-7.776274E-06
RESIDUAL: N=-1.951884 KD=-1.168475E-06
RESIDUAL: N=-2.133043 KD=1.7635E-05
RESIDUAL: N=-2.150804 KD=3.852962E-05



PROTEÍNA: Tripsina 0,6 mg/mL (Tampão bórax)

SURFATANTE: DSS (Tampão bórax)

ENTER NUMBER OF OBSERVATIONS: 12

ENTER FREE LIGAND CONCENTRATION

ENTER BOUND LIGAND CONCENTRATION

1.12E-5, 3.44

1.44E-5, 2.54

1.24E-5, 2.23

1.19E-5, 2.06

1.12E-5, 1.89

7.92E-6, 1.63

6.41E-6, 1.30

5.15E-6, 0.77

5.54E-6, 0.56

3.92E-6, 0.429

3.05E-6, 0.269

2.98E-6, 0.195

OUTPUT

RESIDUAL: N=2.11487 KD=-9.941859E-05

RESIDUAL: N=1.902202 KD=-9.576618E-05

RESIDUAL: N=1.80983 KD=-8.106533E-05

RESIDUAL: N=1.712761 KD=-5.811101E-05

RESIDUAL: N=1.711272 KD=-5.187683E-05

RESIDUAL: N=1.688384 KD=-4.604568E-05

RESIDUAL: N=1.554101 KD=-3.291007E-05

RESIDUAL: N=1.537659 KD=-2.949278E-05
 RESIDUAL: N=1.52229 KD=-2.8735E-05
 RESIDUAL: N=1.454161 KD=-2.800755E-05
 RESIDUAL: N=1.444077 KD=-2.758616E-05
 RESIDUAL: N=1.313735 KD=-2.660931E-05
 RESIDUAL: N=1.26727 KD=-2.611831E-05
 RESIDUAL: N=1.245079 KD=-2.610532E-05
 RESIDUAL: N=1.212841 KD=-2.575165E-05
 RESIDUAL: N=1.207644 KD=-2.491233E-05
 RESIDUAL: N=1.137625 KD=-2.406523E-05
 RESIDUAL: N=1 KD=-2.128075E-05
 RESIDUAL: N=0.9364749 KD=-1.881925E-05
 RESIDUAL: N=0.8927816 KD=-1.833226E-05
 RESIDUAL: N=0.8655749 KD=-1.773644E-05
 RESIDUAL: N=0.8459435 KD=-1.566097E-05
 RESIDUAL: N=0.7832217 KD=-1.414456E-05
 RESIDUAL: N=0.7305275 KD=-1.412569E-05
 RESIDUAL: N=0.714412 KD=-1.349793E-05
 RESIDUAL: N=0.6898822 KD=-1.29894E-05
 RESIDUAL: N=0.6584353 KD=-1.203023E-05
 RESIDUAL: N=0.6046065 KD=-1.12412E-05
 RESIDUAL: N=0.5045462 KD=-1.066005E-05
 RESIDUAL: N=-0.2365046 KD=-1.047682E-05
 RESIDUAL: N=-0.5241125 KD=-9.800842E-06
 RESIDUAL: N=-2.347748 KD=-8.873854E-06
 RESIDUAL: N=-2.838599 KD=-7.139617E-06
 RESIDUAL: N=-6.173163 KD=-6.430029E-06

Tripsina-SDS (T. Acetato 10 mM pH 3,5)

PROTEÍNA: Tripsina 0,6 mg/mL (Tampão Acetato)

SURFATANTE: SDS (Tampão Acetato)

ENTER NUMBER OF OBSERVATIONS: 6

ENTER FREE LIGAND CONCENTRATION

ENTER BOUND LIGAND CONCENTRATION

7.26E-6, 19.1

6.31E-6, 11.38

6.03E-6, 3.64

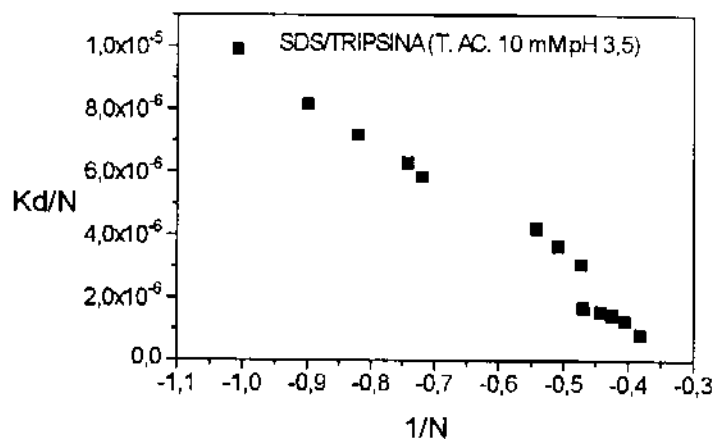
5.07E-6, 1.74

3.46E-6, 0.64

1.23E-6, 0.34

OUTPUT

RESIDUAL: N=-8.795202E-03	KD=-1.861127E-05
RESIDUAL: N=-0.9941546	KD=-9.809217E-06
RESIDUAL: N=-1.113618	KD=-9.048368E-06
RESIDUAL: N=-1.219412	KD=-8.727046E-06
RESIDUAL: N=-1.347765	KD=-8.477072E-06
RESIDUAL: N=-1.391553	KD=-8.094557E-06
RESIDUAL: N=-1.848655	KD=-7.746449E-06
RESIDUAL: N=-1.967795	KD=-7.118905E-06
RESIDUAL: N=-2.120443	KD=-6.417549E-06
RESIDUAL: N=-2.133529	KD=-3.512561E-06
RESIDUAL: N=-2.26987	KD=-3.468889E-06
RESIDUAL: N=-2.358969	KD=-3.340876E-06
RESIDUAL: N=-2.4735	KD=-3.116214E-06
RESIDUAL: N=-2.622204	KD=-2.133459E-06



Tripsina-SDS (T. Fosfato 10 mM pH 7,0)

PROTEÍNA: Tripsina 0,6 mg/mL (Tampão Fosfato)

SURFATANTE: SDS (Tampão Fosfato)

ENTER NUMBER OF OBSERVATIONS: 6

ENTER FREE LIGAND CONCENTRATION

ENTER BOUND LIGAND CONCENTRATION

7.63E-6, 30.71

7.20E-6, 26.85

7.06E-6, 19.11

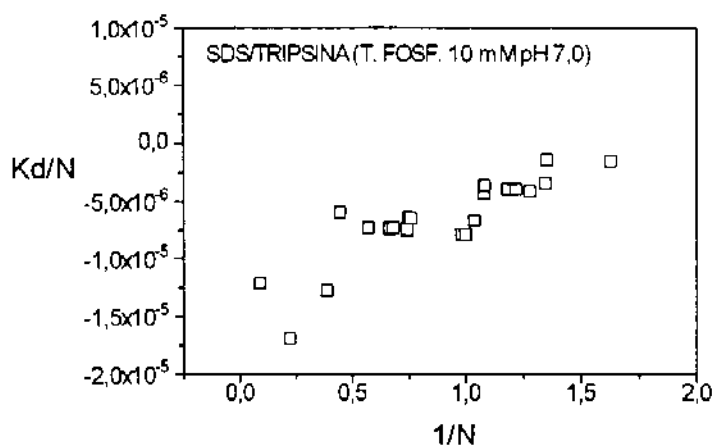
6.91E-6, 3.61

4.42E-6, 1.77

2.27E-6, 0.30

OUTPUT

RESIDUAL: N=11.02494 KD=-1.342301E-04
 RESIDUAL: N=4.435474 KD=-7.555993E-05
 RESIDUAL: N=2.573096 KD=-3.288109E-05
 RESIDUAL: N=2.235023 KD=-1.34921E-05
 RESIDUAL: N=1.743402 KD=-1.280647E-05
 RESIDUAL: N=1.501463 KD=-1.113095E-05
 RESIDUAL: N=1.498564 KD=-1.109721E-05
 RESIDUAL: N=1.460852 KD=-1.0777E-05
 RESIDUAL: N=1.343773 KD=-1.027498E-05
 RESIDUAL: N=1.342301 KD=-1.006096E-05
 RESIDUAL: N=1.332128 KD=-8.694497E-06
 RESIDUAL: N=1.325832 KD=-8.651334E-06
 RESIDUAL: N=1.310229 KD=-8.565835E-06
 RESIDUAL: N=1.016947 KD=-8.086394E-06
 RESIDUAL: N=1 KD=-7.950354E-06
 RESIDUAL: N=0.9657928 KD=-6.48832E-06
 RESIDUAL: N=0.9296235 KD=-4.060941E-06
 RESIDUAL: N=0.9242464 KD=-3.431353E-06
 RESIDUAL: N=0.8438485 KD=-3.38315E-06
 RESIDUAL: N=0.8209297 KD=-3.288763E-06
 RESIDUAL: N=0.7820176 KD=-3.280327E-06
 RESIDUAL: N=0.7425795 KD=-2.609319E-06
 RESIDUAL: N=0.7384247 KD=-1.098614E-06
 RESIDUAL: N=0.6133442 KD=-9.89955E-07
 RESIDUAL: N=0.55636 KD=1.827637E-06
 RESIDUAL: N=-0.7690511 KD=3.765216E-06
 RESIDUAL: N=-4.131384 KD=3.318111E-05



Tripsina-SDS (T. Bórax 10 mM pH 9,0)

PROTEÍNA: Tripsina 0,6 mg/mL (Tampão Bórax)

SURFATANTE: SDS (Tampão Bórax)

ENTER NUMBER OF OBSERVATIONS: 6

ENTER FREE LIGAND CONCENTRATION

ENTER BOUND LIGAND CONCENTRATION

8.09E-6, 26.82

7.34E-6, 19.09

6.09E-6, 2.86

4.81E-6, 2.14

2.58E-6, 1.84

2.43E-6, 1.46

OUTPUT

RESIDUAL: N=-5.971244 KD=-4.048705E-05

RESIDUAL: N=-6.068189 KD=-3.811774E-05

RESIDUAL: N=-6.101592 KD=-3.732936E-05

RESIDUAL: N=-6.139062 KD=-3.426602E-05

RESIDUAL: N=-6.202256 KD=-3.289064E-05

RESIDUAL: N=-6.293088 KD=-3.184661E-05

RESIDUAL: N=-6.387305 KD=-1.481475E-05

RESIDUAL: N=-6.467074 KD=-1.450294E-05

RESIDUAL: N=-6.507326 KD=-1.259662E-05

RESIDUAL: N=-6.512375 KD=-1.236268E-05

RESIDUAL: N=-6.557804 KD=-1.104013E-05

RESIDUAL: N=-6.647066 KD=-8.041792E-06

RESIDUAL: N=-6.66113 KD=-7.706878E-06

RESIDUAL: N=-6.688099 KD=-6.891231E-06

RESIDUAL: N=-6.708002 KD=-5.337352E-06

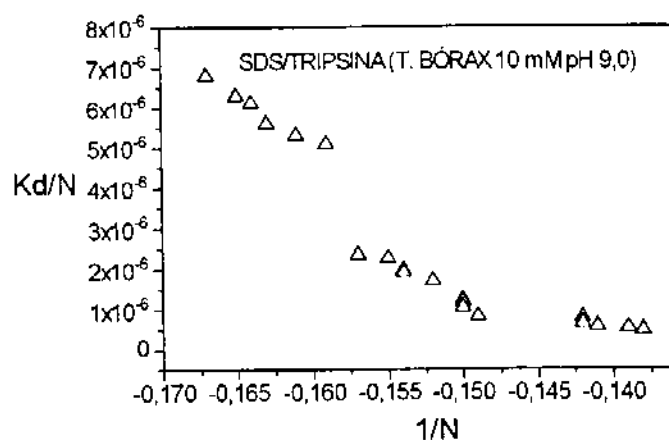
RESIDUAL: N=-7.020615 KD=-5.31808E-06

RESIDUAL: N=-7.040632 KD=-4.500375E-06

RESIDUAL: N=-7.084982 KD=-3.912483E-06

RESIDUAL: N=-7.183762 KD=-3.769468E-06

RESIDUAL: N=-7.250488 KD=-3.27195E-06



Tripsina-TDSS (T. Acetato 10 mM pH 3,5)

PROTEÍNA: Tripsina 0,6 mg/mL (Tampão Acetato)

SURFATANTE: TDSS (Tampão Acetato)

ENTER NUMBER OF OBSERVATIONS: 6

ENTER FREE LIGAND CONCENTRATION

ENTER BOUND LIGAND CONCENTRATION

1.37E-6, 3.82

1.29E-6, 3.24

1.22E-6, 2.28

1.21E-6, 1.89

1.02E-6, 1.51

6.45E-7, 0.75

OUTPUT

RESIDUAL: N=-1.394792 KD=-1.615375E-05

RESIDUAL: N=-1.542447 KD=-6.826859E-06

RESIDUAL: N=-1.598087 KD=-4.869004E-06

RESIDUAL: N=-1.70109 KD=-3.348683E-06

RESIDUAL: N=-1.774147 KD=-2.382139E-06

RESIDUAL: N=-1.900614 KD=-2.215357E-06

RESIDUAL: N=-1.911127 KD=-1.933214E-06

RESIDUAL: N=-1.957921 KD=-1.682537E-06

RESIDUAL: N=-2.11439 KD=-1.623798E-06

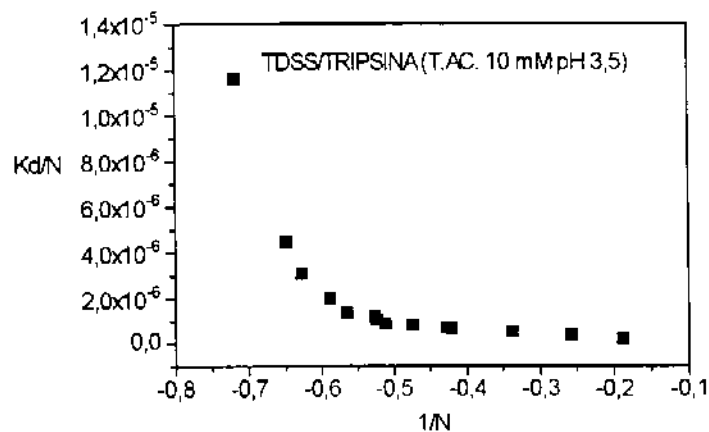
RESIDUAL: N=-2.343167 KD=-1.579107E-06

RESIDUAL: N=-2.385408 KD=-1.48048E-06

RESIDUAL: N=-2.968914 KD=-1.423507E-06

RESIDUAL: N=-4.071327 KD=-1.343179E-06

RESIDUAL: N=-5.346359 KD=-1.045761E-06



Tripsina-DTAB (T. Acetato 10 mM pH 3,5)

PROTEÍNA: Tripsina 0,6 mg/mL (Tampão Acetato)

SURFATANTE: DTAB (Tampão Acetato)

ENTER NUMBER OF OBSERVATIONS: 10

ENTER FREE LIGAND CONCENTRATION

ENTER BOUND LIGAND CONCENTRATION

6.07E-6, 19.14

5.81E-6, 17.22

5.68E-6, 11.41

5.59E-6, 9.47

4.76E-6, 7.57

3.89E-6, 3.73

3.23E-6, 3.36

3.10E-6, 2.98

2.36E-6, 2.62

1.88E-6, 2.25

OUTPUT

RESIDUAL: N=-7.006074 KD=-5.438703E-05

RESIDUAL: N=-7.062598 KD=-5.083241E-05

RESIDUAL: N=-7.109458 KD=-4.589238E-05

RESIDUAL: N=-7.121693 KD=-2.73244E-05

RESIDUAL: N=-7.142153 KD=-2.267155E-05

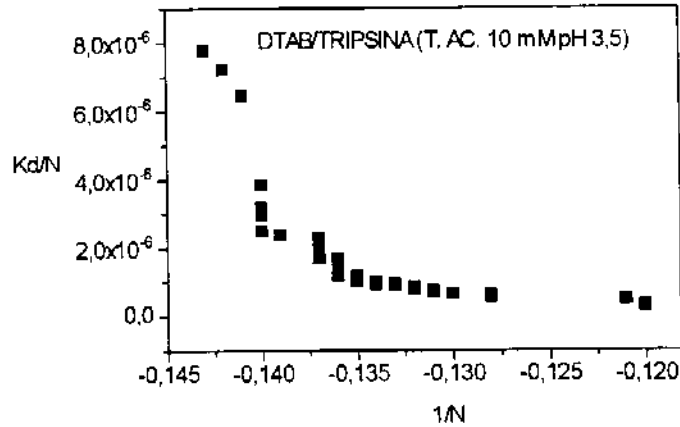
RESIDUAL: N=-7.152156 KD=-2.097107E-05

RESIDUAL: N=-7.152411 KD=-1.791229E-05

RESIDUAL: N=-7.175714 KD=-1.693911E-05

RESIDUAL: N=-7.291709 KD=-1.645558E-05

RESIDUAL: N=-7.304879	KD=-1.613869E-05
RESIDUAL: N=-7.311418	KD=-1.505991E-05
RESIDUAL: N=-7.312833	KD=-1.412697E-05
RESIDUAL: N=-7.317098	KD=-1.276077E-05
RESIDUAL: N=-7.320731	KD=-1.262428E-05
RESIDUAL: N=-7.323237	KD=-1.227313E-05
RESIDUAL: N=-7.334188	KD=-1.205096E-05
RESIDUAL: N=-7.340349	KD=-1.139233E-05
RESIDUAL: N=-7.341431	KD=-1.064415E-05
RESIDUAL: N=-7.358626	KD=-9.466161E-06
RESIDUAL: N=-7.366679	KD=-9.318464E-06
RESIDUAL: N=-7.369035	KD=-9.216171E-06
RESIDUAL: N=-7.372065	KD=-8.601635E-06
RESIDUAL: N=-7.38103	KD=-8.463941E-06
RESIDUAL: N=-7.385625	KD=-8.351273E-06
RESIDUAL: N=-7.387687	KD=-8.266708E-06
RESIDUAL: N=-7.402521	KD=-8.169914E-06
RESIDUAL: N=-7.402619	KD=-7.780443E-06
RESIDUAL: N=-7.408602	KD=-7.739173E-06
RESIDUAL: N=-7.434491	KD=-7.51804E-06
RESIDUAL: N=-7.462636	KD=-7.264517E-06
RESIDUAL: N=-7.472129	KD=-7.157017E-06
RESIDUAL: N=-7.483217	KD=-7.031733E-06
RESIDUAL: N=-7.487134	KD=-7.01167E-06
RESIDUAL: N=-7.511549	KD=-6.954362E-06
RESIDUAL: N=-7.522831	KD=-6.865294E-06
RESIDUAL: N=-7.549825	KD=-6.156094E-06
RESIDUAL: N=-7.578224	KD=-5.724987E-06
RESIDUAL: N=-7.612754	KD=-5.336339E-06
RESIDUAL: N=-7.708569	KD=-4.937873E-06
RESIDUAL: N=-7.721282	KD=-4.785029E-06
RESIDUAL: N=-7.814366	KD=-4.648775E-06
RESIDUAL: N=-7.826004	KD=-4.203424E-06
RESIDUAL: N=-8.272821	KD=-4.072102E-06
RESIDUAL: N=-8.394793	KD=-2.406581E-06



Tripsina-DTAB (T. Fosfato 10 mM pH 7,0)

PROTEÍNA: Tripsina 0,6 mg/mL (Tampão Fosfato)

SURFATANTE: DTAB (Tampão Fosfato)

ENTER NUMBER OF OBSERVATIONS: 6

ENTER FREE LIGAND CONCENTRATION

ENTER BOUND LIGAND CONCENTRATION

5.47E-6, 26.92

5.35E-6, 24.98

5.31E-6, 7.55

3.43E-6, 3.36

3.15E-6, 3.17

1.97E-6, 3.02

OUTPUT

RESIDUAL: N=-4.465828 KD=-4.967321E-05

RESIDUAL: N=-4.502718 KD=-2.680888E-05

RESIDUAL: N=-4.658189 KD=-1.041768E-05

RESIDUAL: N=-4.739859 KD=-9.784719E-06

RESIDUAL: N=-4.824435 KD=-9.739986E-06

RESIDUAL: N=-4.840882 KD=-8.599093E-06

RESIDUAL: N=-4.889562 KD=-8.495309E-06

RESIDUAL: N=-4.924021 KD=-7.608882E-06

RESIDUAL: N=-5.00683 KD=-6.738781E-06

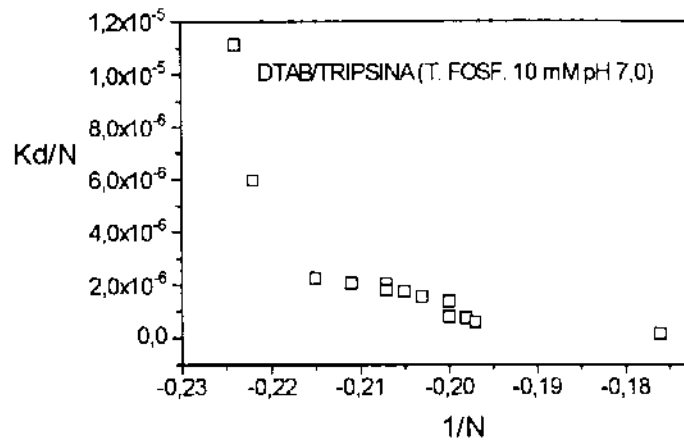
RESIDUAL: N=-5.013759 KD=-3.90518E-06

RESIDUAL: N=-5.054683 KD=-3.751109E-06

RESIDUAL: N=-5.057426 KD=-3.273127E-06

RESIDUAL: N=-5.080738 KD=-2.958835E-6

RESIDUAL: N=-5.684426 KD=-7.373978E-07



Tripsina-DTAB (T. Bórax 10 mM pH 9,0)

PROTEÍNA: Tripsina 0,6 mg/mL (Tampão Bórax)

SURFATANTE: DTAB (Tampão Bórax)

ENTER NUMBER OF OBSERVATIONS: 7

ENTER FREE LIGAND CONCENTRATION

ENTER BOUND LIGAND CONCENTRATION

6.26E-6, 24.95

5.98E-6, 13.33

5.52E-6, 11.41

5.08E-6, 7.56

2.72E-6, 3.77

2.37E-6, 3.39

2.21E-6, 3.02

OUTPUT

RESIDUAL: N=-8.370903 KD=-7.04672E-05

RESIDUAL: N=-8.44484 KD=-3.254672E-05

RESIDUAL: N=-8.45502 KD=-2.39927E-05

RESIDUAL: N=-8.455665 KD=-2.095748E-05

RESIDUAL: N=-8.455805 KD=-1.873355E-05

RESIDUAL: N=-8.503177 KD=-9.97911E-06

RESIDUAL: N=-8.509744 KD=-9.196189E-06

RESIDUAL: N=-8.519711 KD=-9.135447E-06

RESIDUAL: N=-8.548981 KD=-8.489733E-06

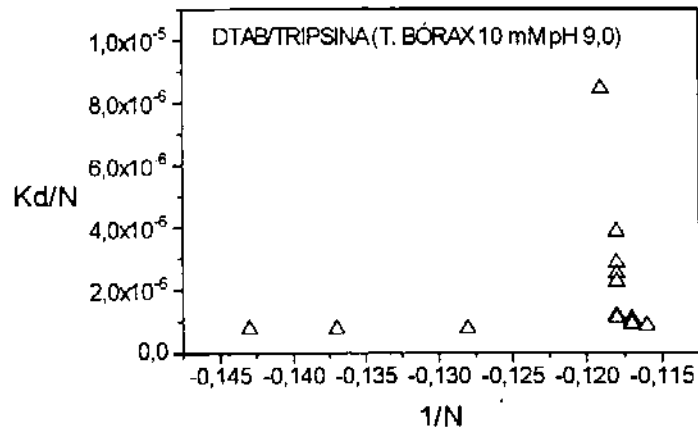
RESIDUAL: N=-8.55004 KD=-8.385876E-06

RESIDUAL: N=-8.553193 KD=-8.379123E-06

RESIDUAL: N=-8.553556 KD=-8.200254E-06

RESIDUAL: N=-8.555523 KD=-8.179075E-06

RESIDUAL: N=-8.567752 KD=-8.033265E-06
 RESIDUAL: N=-8.570399 KD=-7.569174E-06
 RESIDUAL: N=-8.639025 KD=-7.263428E-06
 RESIDUAL: N=-8.749527 KD=-6.567082E-06
 RESIDUAL: N=-8.791645 KD=-6.561105E-06
 RESIDUAL: N=-8.862481 KD=-6.54907E-06
 RESIDUAL: N=-9.062113 KD=-6.097236E-06



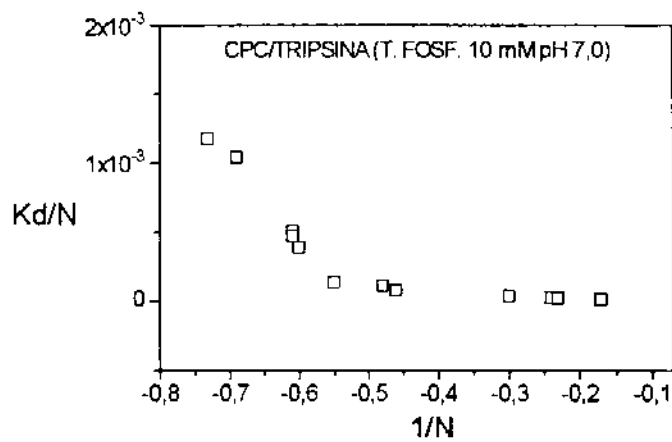
Tripsina-CPC (T. Fosfato 10 mM pH 7,0)

PROTEÍNA: Tripsina 0,6 mg/mL (Tampão Fosfato)
 SURFATANTE: CPC (Tampão Fosfato)
 ENTER NUMBER OF OBSERVATIONS: 7
 ENTER FREE LIGAND CONCENTRATION
 ENTER BOUND LIGAND CONCENTRATION
 2.71E-4, 6.94
 2.26E-4, 6.74
 1.92E-4, 6.12
 1.82E-4, 5.35
 1.42E-4, 2.25
 1.32E-4, 1.86
 1.09E-4, 0.43

OUTPUT

RESIDUAL: N=-1.366206 KD=-1.599082E-03
 RESIDUAL: N=-1.440775 KD=-1.491379E-03
 RESIDUAL: N=-1.541798 KD=-9.686741E-04
 RESIDUAL: N=-1.64282 KD=-8.309236E-04

RESIDUAL: N=-1.652355 KD=-7.794445E-04
 RESIDUAL: N=-1.694309 KD=-6.553802E-04
 RESIDUAL: N=-1.827956 KD=-2.409224E-04
 RESIDUAL: N=-2.089614 KD=-2.26002E-04
 RESIDUAL: N=-2.168675 KD=-1.766219E-04
 RESIDUAL: N=-3.30967 KD=-1.174901E-04
 RESIDUAL: N=-4.105789 KD=-1.059738E-04
 RESIDUAL: N=-4.436128 KD=-1.040926E-04
 RESIDUAL: N=-6.024934 KD=-8.416104E-05
 RESIDUAL: N=-8.674251 KD=-5.151947E-05



Tripsina-CPC (T. Bórax 10 mM pH 9,0)

PROTEÍNA: Tripsina 0,6 mg/mL (Tampão Bórax)

SURFATANTE: CPC (Tampão Bórax)

ENTER NUMBER OF OBSERVATIONS: 10

ENTER FREE LIGAND CONCENTRATION

ENTER BOUND LIGAND CONCENTRATION

1.68E-4, 10.93

1.16E-4, 11.01

1.14E-4, 7.98

1.12E-4, 7.28

1.08E-4, 5.50

1.02E-4, 4.57

1.01E-4, 3.84

9.69E-5, 2.06

9.41E-5, 1.04

9.25E-5, 0.29

OUTPUT

RESIDUAL: N=-0.853094 KD=-0.0127986
RESIDUAL: N=-0.925979 KD=-7.145754E-03
RESIDUAL: N=-0.9463196 KD=-3.314868E-03
RESIDUAL: N=-1.017165 KD=-3.034383E-03
RESIDUAL: N=-1.051355 KD=-2.666519E-03
RESIDUAL: N=-1.109226 KD=-1.991744E-03
RESIDUAL: N=-1.14425 KD=-1.664161E-03
RESIDUAL: N=-1.393254 KD=-1.541899E-03
RESIDUAL: N=-1.495521 KD=-1.45032E-03
RESIDUAL: N=-1.615548 KD=-9.136474E-04
RESIDUAL: N=-1.633135 KD=-8.537106E-04
RESIDUAL: N=-1.639553 KD=-6.536571E-04
RESIDUAL: N=-1.787753 KD=-5.39337E-04
RESIDUAL: N=-1.790445 KD=-4.59089E-04
RESIDUAL: N=-1.806421 KD=-4.264687E-04
RESIDUAL: N=-1.837842 KD=-4.105826E-04
RESIDUAL: N=-1.845775 KD=-4.054306E-04
RESIDUAL: N=-1.870404 KD=-2.157285E-04
RESIDUAL: N=-1.898314 KD=-1.76084E-04
RESIDUAL: N=-1.908902 KD=-1.429978E-04
RESIDUAL: N=-1.938564 KD=-1.422474E-04
RESIDUAL: N=-1.962445 KD=-1.348079E-04
RESIDUAL: N=-1.997148 KD=-1.271829E-04
RESIDUAL: N=-2.009001 KD=-1.253173E-04
RESIDUAL: N=-2.083628 KD=-1.197194E-04
RESIDUAL: N=-2.158255 KD=-1.158734E-04
RESIDUAL: N=-2.201332 KD=-1.156329E-04
RESIDUAL: N=-2.820986 KD=-1.132065E-04
RESIDUAL: N=-4.59652 KD=-1.098876E-04
RESIDUAL: N=-4.774966 KD=-1.096946E-04
RESIDUAL: N=-4.928648 KD=-1.063059E-04
RESIDUAL: N=-4.967194 KD=-1.048518E-04
RESIDUAL: N=-5.141383 KD=-1.023375E-04
RESIDUAL: N=-6.042792 KD=-9.053481E-05
RESIDUAL: N=-9.574087 KD=-8.803634E-05
RESIDUAL: N=-10.24735 KD=-8.571985E-05
RESIDUAL: N=-14.07073 KD=-7.277471E-05
RESIDUAL: N=-15.11722 KD=-6.426867E-05
RESIDUAL: N=-16.51431 KD=-4.604051E-05
RESIDUAL: N=-20.25764 KD=-4.047372E-05
RESIDUAL: N=-29.93699 KD=-3.127583E-05
RESIDUAL: N=-32.17197 KD=-2.584171E-05
RESIDUAL: N=-35.37709 KD=-1.458154E-05
RESIDUAL: N=-79.15299 KD=-1.134859E-05

