

ALEXANDRE MARTINS COSTA SANTOS

***PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO
TRIPSINOGÊNIO, α - E ψ -TRIPSINA BOVINA E ANÁLISE
TERMODINÂMICA EM MEIO ÁCIDO POR CALORIMETRIA
DIFERENCIAL DE VARREDURA***

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro, UFMG.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Porto Bemquerer
EMBRAPA/ Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Fevereiro de 2009

A meus pais, que me proporcionaram tudo que tenho hoje, meus irmãos Daniel e Fábio pelo apoio e a minha querida esposa Márcia e minha filha Luísa por todo amor e companheirismo que tem me dado.

Agradecimentos

A *Deus* por ter permitido que tudo isso acontecesse.

A meus pais *Ilma Martins Costa Santos* e *Guilherme Costa Santos*, meus irmãos *Daniel Martins Costa Santos*, *Fábio Martins Costa Santos* que sempre me deram apoio e acreditaram nesta longa jornada.

A minha amada esposa *Márcia Ribeiro Costa Santos* e minha filha *Luísa Ribeiro Costa Santos*, por todo carinho, apoio e principalmente compreensão pelos meus momentos de ausência devido ao envolvimento científico.

Ao *Professor Dr. Marcelo Matos Santoro*, por sua amizade, por sua paciência, pelos conselhos em minha vida acadêmica e por me direcionar durante o percurso deste trabalho tão brilhantemente e, mais ainda, por ter se tornado um grande amigo e conselheiro.

Ao *Professor Dr. Marcelo Porto Bemquerer*, por sua amizade a quem me orgulho de chamá-lo de “amigo”, por sua orientação que sempre esteve presente em todos os momentos de minha vida universitária indo além do limite de orientação acadêmica. Pelos momentos felizes de convivência, aprendizado e conversas principalmente nos infinitos sábados e noitadas de trabalho.

Ao **Jamil Silvano de Oliveira** por dividir comigo seus conhecimentos que foram de suma importância para o desenvolvimento de todo meu trabalho e aprendizado em química de proteínas no laboratório e, mais ainda, por sua amizade e companheirismo em tudo que dividimos durante estes dez anos de laboratório.

Ao professor **Dr. Marcos Luiz dos Mares Guia**, por ter me estimulado em seguir em um caminho, tão difícil de trilhar, quando iniciei este trabalho em minha iniciação científica.

Ao **Dr. Thiago Rennó dos Mares Guia** pelo seu incentivo e colaboração neste projeto, pela sua amizade e por sua paciência em sempre dar ouvidos às minhas idéias e mais ainda, por me aconselhar quando me sentia confuso.

Aos alunos de iniciação científica **Anderson Lourenço da Silva e Fabrício Villas Boas** por sua grande contribuição em todo este trabalho científico e aos alunos **Felipe Tadeu Gomide Fiorini e Alexandre Amadeu Cerqueira de Miranda** que além de serem ótimos alunos de iniciação científica se tornaram amigos e peças fundamentais neste projeto de doutorado.

Agradeço a colaboração científica do nosso “grupinho” interno de pesquisa do laboratório, principalmente a nossa amizade e união que se fortaleceu durante os anos de pesquisa. Grupo este que espero que se mantenha por muito tempo. Agradeço a todos e principalmente a **Jamil Silvano de Oliveira, Marcos Aurélio de Santana, Kádima Nayara Teixeira, André Bélico de Vasconcelos, Rodrigo da Silva Reston, Felipe Tadeu Gomide Fiorini e Alexandre Amadeu Miranda de Cerqueira.**

Aos meus grandes amigos e amigas do Laboratório de Enzimologia e Físico-química de Proteínas- Marcos Luiz dos Mares Guia (LEFQP-ICB-UFMG): ***Agenor, Bruna, Cecília, Daniel, Débora, Denise (UFV), Felipe (LVTA), Jacqueline, Pollyanna (UFV), Thaís, Vivian, William...*** A todos vocês que conviveram comigo durante esses dez anos, o meu agradecimento pela amizade.

A todos os meus amigos professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia-ICB e do Departamento de Química pelas oportunidades que me proporcionaram.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia ***Celise, Grazielle e Polliana*** pela ajuda nas questões “burocráticas” e por tudo que contribuíram para a conclusão deste trabalho científico.

A CAPES e ao CNPq pela concessão fornecimento da bolsa de estudo.

Agradeço a todos aqueles, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a finalização desse trabalho.

A todos meus sinceros agradecimentos.

“The trouble with simple things is that one must understand them very well.”

ANONYMOUS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Termodinâmica de proteínas	22
1.1.1. Microcalorimetria.....	25
1.1.2. Parâmetros avaliados pelo DSC.....	26
1.2. . Serino Proteases.....	29
1.2.1. Características das serino proteases.	29
1.2.2. Estrutura primária do tripsinogênio e das isoformas de tripsina.	30
1.2.3. Ativação do tripsinogênio e formação das isoformas de tripsina.	34
1.2.4 Estruturas secundária e terciária.....	37
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE CENTRAL DO PROJETO	42
3. OBJETIVOS	44
3.1. Objetivo geral	44
3.2. Objetivos específicos.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1. Otimização do processo cromatográfico e caracterização físico-química das isoformas de tripsina.....	46
4.1.1. Montagem do sistema cromatográfico.....	46
4.1.2. Procedimento cromatográfico.....	47
4.1.3. Testes de otimização cromatográfica.....	48
4.1.4. Avaliação da eficiência do sistema cromatográfico.....	52
4.1.5. Seleção das isoformas de tripsina e diálise.....	54

4.1.6. Liofilização, armazenamento da amostra e determinação da concentração de tripsina.....	54
4.1.7. Determinação da identidade e pureza das isoformas de tripsina e de tripsinogênio.	55
4.1.7.1. ESI-MS.....	55
4.1.7.2. MALDI-TOF.....	56
4.1.8. Atividade enzimática das isoformas de tripsina e perfil de atividade amidásica de α-tripsina em função do pH.....	57
4.1.8.1. Atividade amidásica	57
4.1.8.2. Atividade esterásica da isoforma ψ -tripsina.....	58
4.1.8.3. Atividade amidásica de α -tripsina em função do pH.....	58
4.1.8.4. Titulação do centro ativo.....	59
4.1.9. Teste do sistema cromatográfico otimizado com outras amostras comerciais para avaliação da quantidade relativa de isoformas de tripsina e atividade da amostra bruta em amostras comerciais.	60
4.2. Controle de qualidade das enzimas purificadas e armazenadas.	61
4.2.1. Estimativa de “Shelf-life” ($t_{95\%}$) e meia vida ($t_{50\%}$) de α-tripsina e medida real da perda de atividade amidásica em função do tempo de armazenamento.....	61
4.2.2. Determinação da porcentagem de formação de ψ-tripsina inativas (agregadas) em função do tempo de armazenamento por calorimetria diferencial de varredura (DSC).	62
4.2.3. Determinação da porcentagem de transformação de α- em ψ-tripsina em função do tempo de armazenamento e a influência das misturas de isoformas de tripsina nos resultados calorimétricos.	63

4.3. Aumento na produção da quantidade de isoformas de tripsina.....	65
4.4. Purificação e determinação da identidade e pureza de tripsinogênio.....	65
4.5. Microcalorimetria.....	66
<i>4.5.1. Metodologia de aplicação de amostra e parâmetros de corrida no DSC para as proteínas analisadas:.....</i>	<i>69</i>
<i>4.5.2. Teste comparativo de alguns parâmetros termodinâmicos obtidos com β-tripsina por Bittar, 2003 com aqueles obtidos nesta tese para a isoforma β-tripsina.</i>	<i>70</i>
<i>4.5.3. Teste para determinar se a desnaturação térmica de tripsinogênio, α- e ψ-tripsina são termodinamicamente ou cineticamente dirigidas.</i>	<i>71</i>
<i>4.5.4 Influência do pH e da concentração de proteínas na relação de $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ para tripsinogênio, α- e ψ- tripsina</i>	<i>72</i>
<i>4.5.5. Determinação do T_m, $\Delta H_{(cal)}$, $\Delta T_{1/2}$ (índice de cooperatividade) $\Delta S_{(T_m)}$, ΔC_p, $\Delta S_{(298 K)}$, $\Delta H_{(298 K)}$, $\Delta G_{(298 K)}$, T_s e T_m' (temperatura de desnaturação a frio) de tripsinogênio α- e ψ-tripsina</i>	<i>72</i>
4.6. Determinação do raio de Stokes em pH 3,0 para tripsinogênio, β -, α - e ψ -tripsina.....	73
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1. Otimização do processo cromatográfico e caracterização bioquímica das isoformas de tripsina.....	75
<i>5.1.1. Teste da influência do fluxo cromatográfico sobre a resolução cromatográfica.....</i>	<i>77</i>
<i>5.1.2. Teste da influência da concentração salina ou força iônica sobre a resolução cromatográfica.....</i>	<i>78</i>

5.1.3. Refinamento do teste da influência do fluxo sobre a resolução cromatográfica.....	84
5.1.4. Influência da quantidade de partida aplicada na coluna (capacidade trocadora) sobre a resolução cromatográfica.....	90
5.1.5. Influência do pH da fase móvel sobre a resolução cromatográfica.	92
5.1.6. Teste de precisão do sistema cromatográfico.	98
5.1.7. Atividade amidásica da isoforma α -tripsina em função do pH e determinação da porcentagem dos sítios ativos nas enzimas purificadas.....	101
5.1.8 Teste do sistema cromatográfico, determinação da quantidade relativa de isoformas de tripsina e atividade de outras amostras comerciais.....	105
5.1.9. Aumento na produção da quantidade de isoformas de tripsina	108
5.1.10. Estimativa do “shelf-life” e meia vida da α -tripsina e de tempo real da perda da atividade amidásica em função do tempo de armazenamento.....	118
5.1.11. Determinação da porcentagem de formação de ψ -tripsina inativa ($t_{95\%}$) em função do tempo por calorimetria diferencial de varredura e medida da atividade esterásica.	122
5.1.12. Determinação da porcentagem de transformação de α -tripsina em ψ -tripsina em função do tempo de armazenamento e influência da concentração das isoformas de tripsina no resultado calorimétrico.	127
5.1.13. Purificação e determinação da identidade e pureza do tripsinogênio...	131
5.2. Microcalorimetria	135
5.2.1 Análise das curvas de desnaturação.	135
5.2.2. Teste para determinar se os procesos de desnaturação de tripsinogênio, α e ψ -tripsina tem sua desnaturação térmica termodinamicamente ou cineticamente dirigidas.....	141

5.2.3. Determinação do T_m , T_m' , $\Delta H(T_m)$, $\Delta T_{1/2}$ (índice de cooperatividade) $\Delta S(T_m)$, ΔC_p , $\Delta S(298K)$, $\Delta H(298K)$, $\Delta G(298K)$ e T_s de tripsinogênio, α - e ψ -TRIPSINA em pH 3,0.....	144
5.2.3.1. Determinação do T_m e $\Delta H(T_m)$ de tripsinogênio, α -, ψ -tripsina em pH 3,0.	145
5.2.3.2. Influência do pH e da contração de proteínas na relação de $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$	147
5.2.3.3. Determinação do $\Delta T_{1/2}$ (índice de relativo de cooperatividade) de tripsinogênio, α - e ψ -tripsina em pH 3,0.	151
5.2.3.4. Determinação do $\Delta S(T_m)$ de tripsinogênio, α - e ψ -tripsina em pH 3,0.	152
5.2.3.5. Determinação do ΔC_p , de $\Delta S(298K)$ e $\Delta H(298K)$ do tripsinogênio α - e ψ -tripsina em pH 3,0.	153
5.2.3.6. Determinação do $\Delta G(298k)$, $T_s=T_{max}$ (temperatura de máxima estabilidade) e do T_m' (temperatura de desnaturação a frio) de tripsinogênio, α - e ψ -tripsina em pH 3,0.....	162
5.3. Determinação do raio de Stokes (RS) em pH 3,0 para tripsinogênio, e para as isoformas β -, α -, ψ - tripsina.	167
6. CONCLUSÕES	171
7. PERSPECTIVAS	176
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	177
9. APÊNDICES	190
10. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	198

RESUMO

O tripsinogênio e as isoformas de tripsina (β -, α - e ψ -tripsina) são serino proteases com uma cadeia polipeptídica contendo 229 e 223 resíduos de aminoácidos, respectivamente. São proteínas globulares com predominância de folhas beta antiparalelas e segmentos curtos em alfa-hélice em sua estrutura secundária e apresentando dois domínios com estruturas similares. O estudo da atividade e estabilidade destas enzimas tem sido de grande interesse durante anos de pesquisa devido à grande importância bioquímica e biotecnológica em que a enzima atua. No presente estudo investigou uma metodologia de otimização de purificação de isoformas de tripsina a fim obter proteínas mais puras, ativas e em maior quantidade do que os métodos usados anteriormente. As proteínas purificadas foram caracterizadas por sua massa molecular, atividade enzimática, tempos para decaimento de atividade de 5% e de 50% e outros parâmetros físico-químicos. A estabilidade termodinâmica de tripsinogênio α - e ψ -tripsina em meio ácido foi investigada usando-se a técnica de calorimetria diferencial de varredura. A metodologia de purificação de isoformas de tripsina desenvolvida neste trabalho foi considerada satisfatória quanto à pureza, atividade e quantidades obtidas. Os resultados termodinâmicos para o tripsinogênio e para as isoformas de tripsina sugerem a ocorrência de uma mesma transição conformacional em dois estados é sofrida em todas as situações experimentais, possibilitando realizar a caracterização termodinâmica. Os resultados sugerem ainda que existe uma diminuição de estabilidade termodinâmica e estrutural à medida que a isoforma β -tripsina se converte em α - e esta em ψ -tripsina.

ABSTRACT

Trypsinogen and the trypsin isozymes (β -, α - and ψ - trypsin) are serino proteases with a polypeptide chain of 229 and 223 amino acid residues, respectively. They are typical globular proteins with a predominance of antiparalel beta sheet and small alpha-helical segments in their secondary structure, presenting two domains with similar structures. The study of the activity and stability of those enzyme has been of great interest during years due to their great biochemical importance and biotechnological applications. In the present work, our research group in protein chemistry and thermodynamics has performed an optimization of the purification methodology of the trypsin isoforms in order to furnish purer proteins, more active and in larger amount than the methods previously reported in the literature. The purified isoforms were characterized by their molecular mass, enzymatic activity, shelf-life, half-life and other physical-chemical parameters. The thermodynamic stability of trypsinogen and trypsin isoforms in acid media was accessed by using differential scanning calorimetry. The methodology of trypsin isoforms purification developed in this experimental work was considered satisfactory as wells as the purity, activity and amount of the proteins. The thermodynamic results suggest that the same two states conformational transition is occurs in all the experimental conditions, for trypsinogen and the trypsin isoforms, being thus possible to accomplish the thermodynamic characterization. The thermodynamic data show yet that a decrease in thermodynamic and structural stability is apparent when β - converts itself into α - trypsin and this isoform is converted into ψ - trypsin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Superposição estrutural de cinco serino proteases.....	30
Figura 2: Seqüência dos 229 aminoácidos do tripsinogênio bovino.	31
Figura 3: Seqüência dos 229 aminoácidos do tripsinogênio bovino. <i>Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys</i>	32
Figura 4: Estrutura primaria de β -tripsina, 5ptp.pdb.	33
Figura 5: Conversão de tripsinogênio nas isoformas de tripsina.....	34
Figura 6: Pontos de clivagem na conversão de tripsinogênio para as isoformas ativas de tripsina bovina	35
Figura 7: Estrutura tridimensional de β -tripsina bovina.....	38
Figura 8: Domínios isolados da isoforma β -beta tripsina em forma de beta-barris.	39
Figura 9: Disposição das pontes dissulfeto na isoforma β -tripsina.....	40
Figura 10: Sítio de ligação a íon cálcio na isoforma β -tripsina.....	41
Figura 11: Sistema cromatográfico de troca iônica catiônica de separação de proteínas. Dimensões de 90.0 x 2.2 cm Di.....	47
Figura 12: Cromatografia clássica de troca iônica catiônica de isoformas de tripsina em meio alcalino segundo Schroeder & Shawn.	48
Figura 13: Cromatografias de tripsina comercial bovina (Worthington) de Schroeder & Shaw (1968).....	49
Figura 14: Sistema de funcionamento do DSC.	66
Figura 15: Cromatografia de troca iônica catiônica usando fase estacionária SE-SEPHADEX C-50 [®] (Pharmacia [®]) reproduzindo o sistema clássico de Schroeder & Shaw (1968).....	76

Figura 16: Efeito da concentração de NaCl sobre a resolução cromatográfica.....	80
Figura 17: Efeito do fluxo sobre a resolução cromatográfica..	88
Figura 18: Efeito do fluxo sobre a resolução cromatográfica.	89
Figura 19: Efeito do pH da fase móvel sobre a resolução cromatográfica de α - e β -tripsina.	97
Figura 20: Atividade amidásica da isoforma α -tripsina em função do pH.	103
Figura 21: Frações utilizadas dos picos de β -, α -, e ψ - tripsina para testes físico-químicos..	104
Figura 22: Novo sistema cromatográfico operando nas seguintes condições: 500 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 1,2 g de quantidade de partida.....	112
Figura 23: Novo sistema cromatográfico operando nas seguintes condições: 300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 1,0 g de quantidade de partida.....	113
Figura 24: Novo sistema cromatográfico operando nas seguintes condições: 500 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 1,0 g de quantidade de partida.	114
Figura 25: Novo sistema cromatográfico operando nas seguintes condições: 400 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 0,8 mg de quantidade departida.....	115
Figura 26: Novo sistema cromatográfico operando nas seguintes condições: 350 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 500 mg de quantidade de partida.....	116
Figura 27: Frações utilizadas dos picos de β -, α -, e ψ -tripsina para testes físico-químicos.	117
Figura 28: Estimativa do “ <i>Shelf-life</i> ” da atividade amidásica residual da isoforma α -tripsina liofilizada armazenada.	119
Figura 29: Estimativa do “ <i>half life</i> ” ou <i>meia vida</i> da atividade amidásica residual da isoforma α -tripsina liofilizada armazenada.....	120

Figura 30: Decréscimo real da atividade da isoforma α -tripsina de 100% para 95%...	121
Figura 31: Determinação de $t_{95\%}$ para ψ -tripsina por calorimetria diferencial de varredura.....	124
Figura 32: Relacionamento entre ΔH_{cal} x tempo x % de moléculas inativas..	125
Figura 33: Monitoramento da transformação de α - em ψ -tripsina em função do tempo de armazenamento.	130
Figura 34: Cromatografia por exclusão molecular de tripsinogênio comercial bovino	133
Figura 35: Espectrometria de massa do tripsinogênio comercial bovino.....	134
Figura 36: Perfil característico de desnaturação térmica de proteínas em DSC.....	137
Figura 37: Curva de desnaturação térmica de tripsinogênio.	138
Figura 38: Curva de desnaturação térmica de α -tripsina.....	139
Figura 39: Curva de desnaturação térmica de ψ -tripsina	140
Figura 40: Influência do pH sobre a relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ para o tripsinogênio, α - e ψ -tripsina.	149
Figura 41: Influência da concentração de proteínas sobre a relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ de tripsinogênio, α - e ψ -tripsina..	150
Figura 42: Cálculo de capacidade calorífica (ΔH_{cal} x T_m) de tripsinogênio... ..	158
Figura 43: Cálculo de capacidade calorífica (ΔH_{cal} x T_m) de α -tripsina.....	159
Figura 44: Cálculo de capacidade calorífica (ΔH_{cal} x T_m) de ψ -tripsina..	160
Figura 45: Curva de estabilidade termodinâmica para tripsinogênio, β -, α - e ψ -tripsina em pH 3,0..	163
Figura 46: Determinação do raio de Stokes para o tripsinogênio, β -, α -, ψ -tripsina em pH 3,0	170
Figura 47: calibração do eixo das abscissas do DSC com lípedes-padrões.....	190

Figura 48: Calibração externa elétrica do calorímetro diferencial de varredura, usando pulsos elétricos, para aferência do eixo Y.....	192
Figura 49: Teste de precisão do DSC com uso de tripsina comercial bovina.....	193
Figura 50: Correlação entre parâmetro T_m para isoforma β -tripsina em épocas diferentes.	197

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação do fluxo cromatográfico quanto à resolução das isoformas β - e α -tripsina e quanto à variação do volume de fase estacionária.....	77
Tabela 2: Efeito da concentração salina sobre a resolução cromatográfica..	78
Tabela 3: Comparação dos tempos de retenção para as isoformas β - e α - tripsina quando aplicados no sistema cromatográfico, submetido a diferentes concentrações salinas....	82
Tabela 4: Efeito do fluxo sobre a resolução cromatográfica.....	85
Tabela 5: Comparação dos tempos de retenção para as isoformas β - e α - tripsina em quando aplicados no sistema cromatográfico submetido a diferentes fluxos cromatográficos.	86
Tabela 6: Efeito da quantidade de partida sobre a resolução cromatográfica.....	91
Tabela 7: Efeito do pH da fase móvel sobre a resolução cromatográfica de β - e α -tripsina.....	94
Tabela 8: Comparação dos tempos de retenção das isoformas de β - e α -tripsina em diferentes condições de pH da fase móvel.	95
Tabela 9: Efeito da reprodutibilidade sobre a resolução cromatográfica de β - e α -tripsina.....	100
Tabela 10: Comparação da quantidade das isoformas de tripsina, atividade amidásica das proteínas brutas e resolução cromatográfica entre as isoformas β - e α - tripsina de marcas diferentes de tripsinas comerciais bovinas usando o sistema cromatográfico otimizado.	107

Tabela 11: Comparação dos parâmetros cromatográficos para os testes de aumento de escala para obtenção das isoformas de tripsina.	110
Tabela 12: Relacionamento da atividade esterásica e dados calorimétricos com a agregação ou desnaturação irreversível para isoforma ψ -tripsina em função do tempo.	126
Tabela 13 : Influência da concentração das isoformas de tripsina no resultado calorimétrico obtido por DSC.	131
Tabela 14 Teste da influência da velocidade de varredura (“scan rate”) nos parâmetros T_m e ΔH_{cal} no tripsinogênio.....	142
Tabela 15: Teste da influência da velocidade de varredura (“scan rate”) nos parâmetros T_m e ΔH_{cal} na α -tripsina.	143
Tabela 16 Teste da influência da velocidade de varredura (“scan rate”) nos parâmetros T_m e ΔH_{cal} na ψ -tripsina.....	144
Tabela 17: Determinação de T_m e $\Delta H_{(T_m)}$ para tripsinogênio, β - α - e ψ -tripsina.	145
Tabela 18: Determinação de $\Delta H_{(298K)}$ e $\Delta S_{(298K)}$ para tripsinogênio, β -, α -, e ψ -tripsina em pH 3,0.	161
Tabela 19: Determinação de $\Delta G_{(298K)}$ e do T_m' para tripsinogênio, β -, α - e ψ -tripsina em pH 3,0.	162
Tabela 20: Análise comparativa de métodos de cálculo da determinação do T_s para tripsinogênio, β -, α - e ψ -tripsina em pH 3.0.....	166
Tabela 21: Dados de Bittar para isoforma β -tripsina no período de 1999 a 2003 foram os seguintes:	195
Tabela 22 Dados repetidos neste trabalho experimental para comparação dos dados de Bittar, (2003) foram os seguintes dispostos abaixo.....	196

LISTA DE ABREVIATURAS

- **BApNA**- N- α -Benzoil-DL-arginina *p*-nitroanilida.
- **D**- Denatured= desnaturada.
- **DSC**- Differential Scanning Calorimetry ,ou seja ,Calorimetria Diferencial de Varredura.
- **Gdn-HCl**- Cloridrato de guanidina.
- **HEPES**- 4-(2-Hidroxietil) piperazina-1-ácido etanosulfônico.
- **K**- constante de equilíbrio.
- **k**-constante de velocidade cinética.
- **MALDI-TOF**- Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation, Desorção/ionização por laser assistida por matriz.
- **N**-Nativa, Folded ou enovelada.
- **NPGB**- 4-nitrofenil-4-guanidinobenzoato.
- **PDB**- Protein Data Bank, banco de dados de estruturas e seqüência de proteínas.
- **psi**-unidade de pressão; um psi equivale a 0,068 atmosferas
- ΔQ - Variação da quantidade de calor absorvida ou liberada.
- **Q-TOF**- Quadrupole Time of Flight ou seja quadrupolo- tempo de vôo.
- **RMN**- Ressonância Nuclear Magnética
- **T_m**- Temperatura na qual o polímero tem sua estrutura desnaturada em 50 % a quente.
- **T_m**- Temperatura na qual o polímero tem sua estrutura desnaturada em 50 % a frio.

- $T_s = T_{\max}$ Temperatura de máxima estabilidade na curva de $\Delta G_D \times T$
- **Tris**- tris (hidroximetil) aminometano.
- **U**- Unfolded- desenovelada.
- **v/v**-porcentagem volume por volume.
- ΔC_p -Variação da capacidade calorífica entre estados organizados e desorganizados..
- ΔG -Variação de energia livre. de *Gibbs*.
- ΔH - Variação de entalpia.
- ΔH_{cal} - Variação de entalpia quando uma molécula desnatura, calculada pela integral da área da curva de $C_p \times T$.
- ΔH_{vH} - Descreve a dependência da constante de equilíbrio (K) em função da temperatura.
- ΔP - Variação da pressão.
- ΔS - Variação de entropia.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Termodinâmica de proteínas

O estudo da termodinâmica de proteínas tem atraído à atenção de várias linhas de pesquisa devido a razões diversas. Primeiro, por que tem sido compreendido nos últimos trinta anos que uma molécula de proteína, consiste em muitos milhares de átomos que estão em movimento (translacional, rotacional e vibracional) dependente de variação de temperatura e este conjunto de átomos é um sistema macroscópico. Como qualquer outro sistema macroscópico, o entendimento de uma proteína requer inicialmente um conhecimento da sua termodinâmica. O segundo aspecto é que, a termodinâmica de uma proteína é esperada ser muito incomum, devido á organização espacial deste sistema macromolecular ser especialmente bem ordenado (Privalov, 1989).

Cada átomo na proteína nativa ocupa uma posição definida (sujeita a oscilações) como em um cristal, mas ao contrário de um cristal a proteína não possui simetria e nem periodicidade na disposição de seus átomos. Tal sistema macroscópico ordenado e aperiódico nunca tinha sido tratado anteriormente do ponto de vista físico. Logo, não se pode prever propriedades termodinâmicas de uma dada proteína e correspondentemente, não se pode engenheirar uma nova molécula (Privalov, 1989). Sem o conhecimento da termodinâmica todas as discussões sobre os princípios da organização de uma proteína, mecanismos de enovelamento e estabilização de estruturas tridimensionais, são meras especulações. Isso tem-se tornado óbvio apenas

depois de muitos anos de tentativas, sem sucesso, de resolver esses problemas apenas analisando a informação estrutural das proteínas (Privalov, 1989).

A falha desses métodos de detecção agora torna-se clara, pois a informação estrutural revela apenas uma face da molécula de proteína, enquanto a outra face é revelada pela informação da base energética desta estrutura, ou seja, a sua termodinâmica. E esses dois tipos de informação não podem ser deduzidos um do outro (Privalov, 1989).

A estabilidade termodinâmica de uma proteína é a medida de quanto mais estável é a conformação globular ou nativa da molécula em comparação ao seu estado desnaturado (Pace e cols., 1990 e Ahmad e cols., 1992). A forma nativa da proteína, ou seja, sua estrutura terciária ou quaternária está em um mínimo de energia e demonstra vários graus de flexibilidade, principalmente na sua superfície e nas extremidades amino e carboxi-terminal, onde as cadeias laterais e as alças possuem conformações alternativas. Para que ocorra um processo no qual a proteína passe de um estado nativo para o desnaturado é necessário um aumento significativo da energia livre (Pace e cols., 1990), a temperatura ambiente e sem a ajuda de desestabilizantes.

Em contrapartida, sabendo-se que a conformação nativa das proteínas pode ser facilmente desfeita e que a cadeia polipeptídica pode desenovelar-se por meio de processos físicos (temperatura e pressão) ou químicos (variação do pH e adição de substâncias desnaturantes) (Privalov, 1997), torna-se importante entender os mecanismos relacionados à estabilidade das proteínas.

A estabilidade é importante para manter a estrutura nativa da proteína, evitando-se que ela adquira outras conformações que sejam diferentes da nativa, mas também essa estabilidade não pode ser tão rígida a ponto de impedir mudanças conformacionais

ou ajustes necessários às funções das mesmas (Becktel & Schellman, 1987 e Dill, e cols., 2008).

O processo reversível de enovelamento e desenovelamento das proteínas podem ser estudados por vários métodos sensíveis capazes de detectar mudanças na estrutura das moléculas, como espectrofotometria e espectroscopia de dicroísmo circular (CD) (Martins, 1999; Martins & Santoro, 1999; Martins e cols., 2003 e Brumano e cols., 2000), ressonância magnética nuclear (RMN) (Tamura & Privalov 1997), espectroscopia de fluorescência (Hilser, 2001), etc. Apesar de estes métodos espectroscópicos serem extremamente sensíveis e capazes de fornecer informação estrutural de alta resolução e parâmetros termodinâmicos, eles fornecem informações indiretas, ou seja, uma determinação termodinâmica modelo dependente, e ou seja, os principais parâmetros termodinâmicos (T_m e ΔH_{cal}) são determinados através de ajustes matemáticos de medidas indiretas.

Ao contrário dos métodos espectroscópicos a análise termodinâmica por calorimetria é capaz de fornecer informações sobre quantidades termodinâmicas de um modo direto e não dependente de um modelo. Logo a análise calorimétrica complementa os estudos espectroscópicos, fornecendo uma descrição mais completa do sistema de interesse (Cooper e Johnson, 1994 e Haynie, 2001-a).

Para que se conheça a descrição termodinâmica do sistema torna-se necessário obter dados sobre as variações de *entalpia* (H) e *entropia* (S) dos processos relacionados ao enovelamento e desenovelamento das proteínas, bem como a respeito da variação da *capacidade calorífica* (ΔC_p) desses estados e a sua dependência de diferentes condições de solventes sob variações de temperatura em diferentes faixas de pH, e finalmente a

determinação da variação da *energia livre de Gibbs* (ΔG) para os processos de desnaturação térmica (Haynie, 2001-b).

Segundo Jackson & Brandts (1970) e Tishchenko & Gorodkov (1979), o processo de desnaturação em dois estados que considera apenas os extremos, pode ser utilizado para análise de proteínas pequenas e de estruturas tridimensionais simples. A análise termodinâmica permite considerar o processo de desnaturação como sendo uma transição simples entre dois estados macroscópicos (nativo e desnaturado); em contrapartida, para proteínas constituídas de mais de um domínio estrutural a temperatura induz um desenovelamento em domínios isolados e, portanto, este processo não pode ser visto como sendo um processo simples com dois estados termodinâmicos (Privalov & Potekhin, 1986).

1.1.1. Microcalorimetria

A microcalorimetria é uma técnica sensível, precisa e exata capaz de gerar dados de temperatura média de desnaturação- T_m (temperatura onde 50% das moléculas estão desnaturadas), variação de entalpia de desnaturação- ΔH (variação da energia absorvida ou liberada durante uma transição térmica), variação de entropia- ΔS (variação dos estados entrópicos entre estados nativos e desnaturados), variação de capacidade calorífica- ΔC_p (variação da capacidade calorífica entre os estados nativos e desnaturados) e variação de energia livre de Gibbs (ΔG) entre os estados nativo e desnaturado.

Para estudar, enovelamento/desenovelamento de proteínas devem-se excluir as interações não específicas entre as macromoléculas; para que isso seja possível é

necessário trabalhar com soluções diluídas. Assim o efeito calorífico associado com interações proteína-proteína em soluções diluídas serão muitos pequenos, sendo o sinal do equipamento relacionado diretamente a efeitos de variação de capacidade calorífica originados de pequenas mudanças nos sistema em questão. Deste modo para realizar tais medidas é necessário utilizar um aparelho muito sensível que seja capaz de captar essas pequenas variações de capacidade calorífica.

Para esse tipo de estudo, necessita-se de um calorímetro especial que possua características técnicas adequadas para a aquisição de dados experimentais (Privalov, 1997). Esses requisitos técnicos são preenchidos pelo microcalorímetro do tipo Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC). O DSC possui características que integram *Hardware* e *Software* que permitem aquisição, análise e deconvolução dos dados (Brandts e cols., 1989) com precisão e exatidão elevadas. Este aparelho realiza suas medidas fornecendo a variação da capacidade calorífica de um processo (mudança de estados) durante uma dada variação de temperatura.

1.1.2. Parâmetros avaliados pelo DSC.

A temperatura é a principal variável independente em um experimento realizado por calorimetria diferencial de varredura, concentração, co-solventes, concentração da amostra, pH ou concentração de íons pode ser uma segunda variável independente útil em alguns estudos sobre estabilidade de proteínas. Os experimentos no DSC são realizados a uma pressão constante ($\Delta P=0$), para que o efeito calorífico (ΔQ) corresponda à variação de entalpia da reação (ΔH) (equação-1) onde E é a energia do sistema. Considerando o termo $P\Delta V$ na equação-1, e lembrando-se que em sistemas

condensados a variação de volume é quase nula, uma vez que não existe geração ou consumo de gases ($P\Delta V=0$) (Eisenberg & Crothers, 1979) então:

$$H = E + PV \quad \text{Equação-1}$$

$$dH = dE + d(PV)$$

$$dH = dE + dV.P + V.dP$$

$$\Delta H = \Delta E + \Delta V.P + V.\Delta P$$

$$\Delta H = Q - P\Delta V + P\Delta V + V.\Delta P$$

$$\Delta H = Q + 0$$

$$\Delta H = Q_p$$

Como pode ser visto acima na dedução da equação-1, quando o sistema funciona à pressão constante o calor trocado ou absorvido durante o evento analisado é igual à variação da entalpia calorimétrica do processo em questão.

A curva endotérmica gerada pelo microcalorímetro na forma da função capacidade calorífica ($C_p \times T$) fornece informação sobre a termodinâmica da ordem/desordem da transição de estados pela qual a molécula está passando e a análise feita pelo DSC é modelo-independente na determinação de ΔH , ΔC_p , T_m e ainda a cooperatividade de uma mudança estrutural em uma macromolécula. O parâmetro capacidade calorífica relaciona-se a quantidade de calor que uma molécula tem que absorver para que um mol de proteína possa mudar de 1 K e variação da capacidade calorífica refere-se a diferença entre as capacidades caloríficas do estado nativo menos o desnaturado e o T_m relaciona-se a temperatura na qual 50% das moléculas estão em um estadoo desordenado.

A medida dessas quantidades termodinâmicas fornece uma descrição termodinâmica completa de uma transição ordem - desordem (Nativo - Desnaturado),

porque essas quantidades são suficientes para simular a função de capacidade calorífica ($C_p \times T$) (Haynie, 2001-a).

A análise dos dados experimentais ($C_p \times$ Temperatura) permite avaliar dois tipos de variação de entalpia (Privalov & Potekhin, 1986):

- a) A variação da entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}) representa a área sob a curva de desnaturação, descontado-se a contribuição da variação de capacidade calorífica (ΔC_p) entre a forma nativa e a forma desnaturada da proteína. Este é um parâmetro modelo-independente e a unidade é cal.mol^{-1} de proteína (monômero), mas também pode ser expresso como cal.mol^{-1} dímero ou oligômero, se necessário.

- b) A variação da entalpia de vant'Hoff (ΔH_{vH}) reflete o formato da curva de desnaturação e descreve a dependência da constante de equilíbrio (K) em função da temperatura. Esse é um parâmetro modelo-dependente (assume uma transição de dois estados), e as unidades são cal/mol de unidades cooperativas (menor unidade termodinâmica capaz de transmitir um sinal), responsáveis pelas transições conformacionais observadas.

Um importante parâmetro experimental é a razão ($\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$), que representa:

$$\frac{\text{Cal}}{\text{mol Proteína}} \bigg/ \frac{\text{Cal}}{\text{mol unidades cooperativas}} = \frac{\text{mol unidades cooperativas}}{\text{mol proteína (monômero)}}$$

Para um monômero, uma transição de dois estados é descrita por um valor ($\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$) $\cong 1,0$ isto é, o monômero é a unidade cooperativa responsável pela transição conformacional. No caso de um dímero, a razão ($\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$) $\cong 0,5$ isto é tem se 0,5 mol de unidade cooperativa por mol de monômero. Um *monômero com dois domínios de tamanhos semelhantes*, quando desacoplados termodinamicamente, deve gerar uma razão ($\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$) $\cong 2,0$, ou seja, detectaríamos 2 mols de unidades cooperativas equivalentes por mol de monômero.

1.2. Serino proteases

A tripsina é um modelo interessante para o estudo microcalorimétrico, já que a estrutura tridimensional de sua principal isoforma a β -tripsina é conhecida e possui alta reversibilidade após desnaturação térmica e suas formas nativas apresentam alta estabilidade térmica.

1.2.1. Características das serino proteases.

A tripsina, quimotripsina, elastase e trombina fazem parte da super família das enzimas homólogas da quimotripsina (Fig. 1). Essas enzimas apresentam dois domínios similares, provavelmente originados por meio de duplicação gênica divergente contendo a tríade catalítica e a fenda oxianiónica em seu centro ativo (Lesk & Fordamn, 1996 e 2001).

Vários processos fisiológicos são relacionados às atividades dessas enzimas como, por exemplo, a digestão (Barrett, 1970), a coagulação sanguínea (Davie e cols., 1991), fertilização (Baba e cols., 1989) e outros. Essas enzimas estão presentes em vírus, bactérias, plantas e animais (Lesk & Fordman, 1996 e Lesk, 2001).



Figura 1: Superposição estrutural de cinco serino proteases e de seus sítios ativos nas respectivas enzimas: quimotripsina bovina (amarelo), calicreina porcina (rosa), tripsina bovina (azul), tonina de rato (cinza) e elastase porcina (verde). (Prolysis: <http://delphy.phis.univ-tours.fr/Prolysis>).

1.2.2. Estrutura primária do tripsinogênio e das isoformas de tripsina.

Muitas são as fontes onde podem ser encontradas as sequências primárias de tripsinogênio e de tripsina (Walsh. & Neurath., 1964a; Mikes e cols., 1966 e Eyl & Inagami, 1970). Apesar disso existe uma ligeira confusão em relação à numeração dos

resíduos de aminoácidos devido ao modo como foi feita a descrição da sequência por alguns autores.

Quando a sequência foi descrita comparando-se com a do quimotripsinogênio (sequências mais antigas) gerou-se uma sequência de tripsina que tem seu N-terminal iniciando-se com Ile (16) (Fig.2).

Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys Ile Val Gly Gly Tyr Thr Cys Gly Ala Asn Thr Val Pro Tyr Gln Val
 Ser Leu Asn Ser Gly Tyr His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile Asn Ser Gln Trp Val Val Ser Ala Ala
 His Cys Tyr Lys Ser Gly Ile Gln Val Arg Leu Gly Gln Asp Asn Ile Asn Val Val Glu Gly Asn
 Glu Gln Phe Ile Ser Ala Ser Lys Ser Ile Val His Pro Ser Tyr Asn Ser Asn Thr Leu Asn Asn Asp
 Ile Met Leu Ile Lys Leu Lys Ser Ala Ala Ser Leu Asn Ser Arg Val Ala Ser Ile Ser Leu Pro Thr
 Ser Cys Ala Ser Ala Gly Thr Gln Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Asn Thr Lys Ser Ser Gly Thr Ser
 Tyr Pro Asp Val Leu Lys Cys Leu Lys Ala Pro Ile Leu Ser Asp Ser Ser Cys Lys Ser Ala Tyr
 Pro Gly Gln Ile Thr Ser Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln
 Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Ser Gly Lys Leu Gln Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Gly
 Cys Ala Gln Lys Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Cys Asn Tyr Val Ser Trp Ile Lys Gln
 Thr Ile Ala Ser Asn

Figura 2: Sequência dos 229 resíduos de aminoácidos do tripsinogênio bovino. *Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys* (verde) é o hexapeptídeo N-terminal liberado na conversão de tripsinogênio à β -tripsina. His (57) (vermelho), Asp (102) (amarelo), Ser (195) (azul) são os aminoácidos que participam da tríade catalítica.

Quando a sequência da tripsina é descrita utilizando-se como base de comparação a sequência do tripsinogênio o seu N-terminal inicia-se na Ile (7) (fig.3).

					VAL	ASP	ASP	ASP	ASP	LYS	006
007	ILE	VAL	GLY	GLY	TYR	THR	CYS	GLY	ALA	ASN	016
	THR	VAL	PRO	TYR	GLN	VAL	SER	LEU	ASN	SER	026
	GLY	TYR	HIS	PHE	CYS	GLY	GLY	SER	LEU	ILE	036
	ASN	SER	GLN	TRP	VAL	VAL	SER	ALA	ALA	HIS	046
	CYS	TYR	LYS	SER	GLY	ILE	GLN	VAL	ARG	LEU	056
	GLY	GLN	ASP	ASN	ILE	ASN	VAL	VAL	GLU	GLY	066
	ASN	GLU	GLN	PHE	ILE	SER	ALA	SER	LYS	SER	076
	ILE	VAL	HIS	PRO	SER	TYR	ASN	SER	ASN	THR	086
	LEU	ASN	ASN	ASP	ILE	MET	LEU	ILE	LYS	LEU	096
	LYS	SER	ALA	ALA	SER	LEU	ASN	SER	ARG	VAL	106
	ALA	SER	ILE	SER	LEU	PRO	THR	SER	CYS	ALA	116
	SER	ALA	GLY	THR	GLN	CYS	LEU	ILE	SER	GLY	126
	TRP	GLY	ASN	THR	LYS	SER	SER	GLY	THR	SER	136
	TYR	PRO	ASP	VAL	LEU	LYS	CYS	LEU	LYS	ALA	146
	PRO	ILE	LEU	SER	ASP	SER	SER	CYS	LYS	SER	156
	ALA	TYR	PRO	GLY	GLN	ILE	THR	SER	ASN	MET	166
	PHE	CYS	ALA	GLY	TYR	LEU	GLU	GLY	GLY	LYS	176
	ASP	SER	CYS	GLN	GLY	ASP	SER	GLY	GLY	PRO	186
	VAL	VAL	CYS	SER	GLY	LYS	LEU	GLN	GLY	ILE	196
	VAL	SER	TRP	GLY	SER	GLY	CYS	ALA	GLN	LYS	206
	ASN	LYS	PRO	GLY	VAL	TYR	THR	LYS	VAL	CYS	216
	ASN	TYR	VAL	SER	TRP	ILE	LYS	GLN	THR	ILE	226
	ALA	SER	ASN								

Figura 3: Sequência dos 229 resíduos de aminoácidos do tripsinogênio bovino. *Val-Asp-Asp-Asp-Lys* é o hexapeptídeo N-terminal liberado na conversão de tripsinogênio à β -tripsina. His (46), Asp (90), Ser (183) são os aminoácidos que participam da tríade catalítica. CYS são as cisteínas que participam das pontes dissulfeto e Lys (131)-Ser (132) indica o ponto de clivagem para conversão de β - para α -tripsina e Lys (176)-Asp (177) mostra o ponto de clivagem para conversão de α - em ψ - tripsina. Numeração baseada na seqüência da β -tripsina (5ptp-Protein Data Bank).

Para obtenção dessa sequência (Fig.3) foi necessário observar atentamente a sequência fornecida pelo arquivo 5ptp.pdb para posteriormente escrever a sequência a partir de dados da sequência mãe que é baseada na sequência do quimotripsinogênio. Uma das dificuldades encontradas na sequência fornecida pelo Protein Data Bank é existência de muitos “gaps” ou espaços, e repetições numéricas entre aminoácidos que não são descontadas da numeração linear. Assim o erro se propaga e provoca um deslocamento de aminoácidos de sua posição natural. Muitos destes “gaps” são devidos a baixos índices de alinhamento (dados cristalográficos) entre a molécula teste e a molécula mãe (fig.4).

ILE16	VAL17	GLY18	GLY19	TYR20	THR21	CYS22	GLY23	ALA24	ASN25
THR26	VAL27	PRO28	TYR29	GLN30	VAL31	SER32	LEU33	ASN34	SER37
GLY38	TYR39	HIS40	PHE41	CYS42	GLY43	GLY44	SER45	LEU46	ILE47
ASN48	SER49	GLN50	TRP51	VAL52	VAL53	SER54	ALA55	ALA56	HIS57
CYS58	TYR59	LYS60	SER61	GLY62	ILE63	GLN64	VAL65	ARG65	LEU66
GLY69	GLU70	ASP71	ASN72	ILE73	ASN74	VAL75	VAL76	GLU77	GLY78
ASN79	GLU80	GLN81	PHE82	ILE83	SER84	ALA85	SER86	LYS87	SER88
ILE89	VAL90	HIS91	PRO92	SER93	TYR94	ASN95	SER96	ASN97	THR98
LEU99	ASN100	ASN101	ASP102	ILE103	MET104	LEU105	ILE106	LYS107	LEU108
LYS109	SER110	ALA111	ALA112	SER113	LEU114	ASN115	SER116	ARG117	VAL118
ALA119	SER120	ILE121	SER122	LEU123	PRO124	THR125	SER127	CYS128	ALA129
SER130	ALA132	GLY133	THR134	GLN135	CYS136	LEU137	ILE138	SER139	GLY140
TRP141	GLY142	ASN143	THR144	LYS145	SER146	SER147	GLY148	THR149	SER150
TYR151	PRO152	ASP153	VAL154	LEU155	LYS156	CYS157	LEU158	LYS159	ALA160
PRO161	ILE162	LEU163	SER164	ASP165	SER166	SER167	CYS168	LYS169	SER170
ALA171	TYR172	PRO173	GLY174	GLN175	ILE176	THR177	SER178	ASN179	MET180
PHE181	CYS182	ALA183	GLY184	TYR184	LEU185	GLU186	GLY187	GLY188	LYS188
ASP189	SER190	CYS191	GLN192	GLY193	ASP194	GLY196	GLY197	PRO198	VAL199
VAL200	CYS201	SER202	GLY203	LYS204	LEU209	GLN210	GLY211	ILE212	VAL213
SER214	TRP215	GLY216	SER217	GLY219	CYS220	ALA221	GLN221	LYS222	ASN223
LYS224	PRO225	GLY226	VAL227	TYR228	THR229	LYS230	VAL231	CYS232	ASN233
TYR234	VAL235	SER236	TRP237	ILE238	LYS239	GLN240	THR241	ILE242	ALA243
SER244	ASN245								

● GAPS ● Repetições numéricas

Figura 4: Estrutura primária de β -tripsina, 5ptp.pdb. “gaps” são as inserções em branco inseridas pelos programas de alinhamento.

A numeração usada nesta tese foi fornecida por Keil., 1971 onde a sequência N-terminal inicia-se com a Ile (7).

1.2.3. Ativação do tripsinogênio e formação das isoformas de tripsina.

A tripsina bovina é uma enzima proteolítica produzida nas células acinares do tecido pancreático, na forma de seu zimogênio (tripsinogênio) que tem atividade proteolítica restrita. Seguindo sua secreção no intestino, o tripsinogênio é convertido para a forma ativa da tripsina (β -tripsina), reação esta catalisada pela enteroquinase e pela própria β -tripsina, recém formada (auto-ativação) (Bode e cols., 1976 e 1978) (Fig.5).

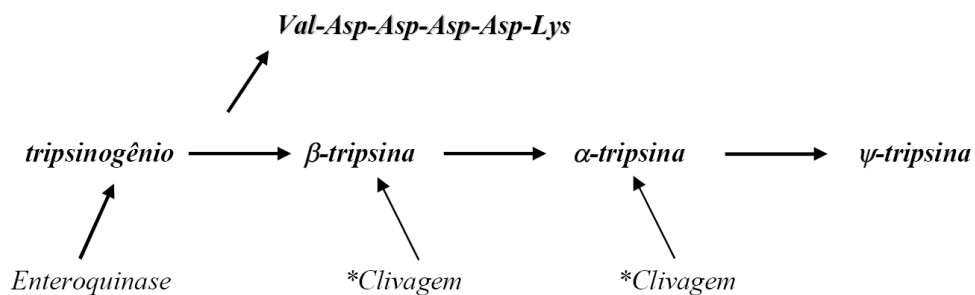


Figura 5: Conversão de tripsinogênio nas isoformas de tripsina. *A β -tripsina recém formada também atua na ativação junto à enteroquinase e nas clivagens adicionais

A conversão do tripsinogênio na isoforma β -tripsina consiste na clivagem da ligação peptídica entre os resíduos de aminoácidos Lys (6) e Ile (7) (nomenclatura baseada na sequência do tripsinogênio) no lado carboxílico o que promove a saída do hexapeptídeo N-terminal (Fig.5) *Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys...* (Davie & Neurath, 1955).

O recém formado grupo α -amino da Ile (7) forma uma ponte salina com o resíduo Asp (194) (Perkins, 1980) introduzindo, assim, significativas modificações estruturais na nova molécula formada (β -tripsina). No tripsinogênio o sítio de

especificidade e o espaço oxianiónico estão impropriamente formados, mas mesmo assim este apresenta uma atividade residual de aproximadamente 0,5 % da atividade da β -tripsina. Essa nova conformação assumida pela β -tripsina faz com que ela se torne 200 vezes mais ativa (Robinson e cols., 1973) que o tripsinogênio.

Seguindo-se o processo de autólise após a formação da β -tripsina, a seqüência peptídica desta isoforma sofre uma clivagem adicional entre os resíduos Lys (131) e Ser (132) (Fig.6), originando uma segunda forma ativa da tripsina, conhecida como α -tripsina (Schroeder & Shaw, 1968). A α -tripsina formada possui basicamente a mesma estrutura terciária da isoforma β -tripsina, sendo a diferença baseada na menor porcentagem de estruturas em folha beta (Foucault e cols., 1974a). Contudo, apresenta-se 40% menos ativa que a β -tripsina frente ao substrato amidásico N- α -Benzoyl-DL-arginina p-Nitroanilida (BApNA) e nenhuma diferença significativa frente a substratos ésteres como acetato de p-nitrofenila, em pH ótimo (Foucault et al., 1974b).

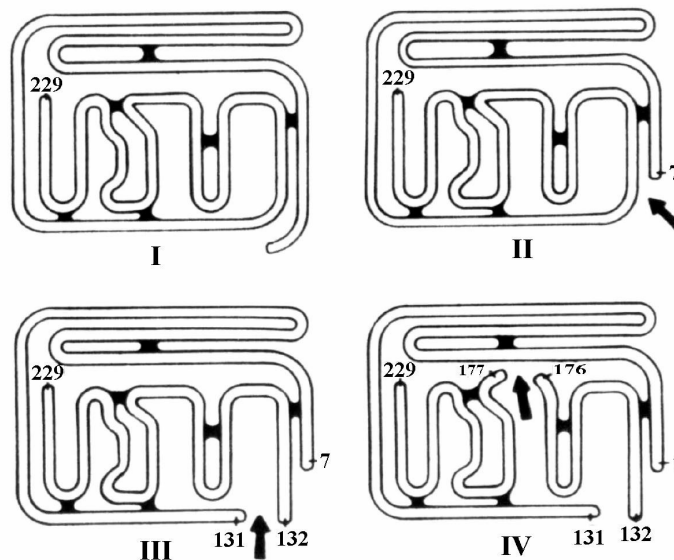


Figura 6: Pontos de clivagem na conversão de tripsinogênio para as isoformas ativas de tripsina bovina, as setas indicam onde ocorreu uma clivagem proteolítica. I- tripsinogênio, II- β -tripsina, III α -tripsina, IV pseudotripsina (ψ -tripsina). (Keil, 1971).

Uma terceira isoforma de tripsina é formada quando ocorre uma nova clivagem entre os resíduos Lys (176) e Asp (177) (Fig.6) resultando na ψ -tripsina, que possui três cadeias polipeptídicas interligadas por pontes dissulfeto (Smith & Shaw, 1969). Essa nova isoforma é menos específica que as demais isoformas e possui uma insignificante atividade amidásica frente a substratos sintéticos (Foucault e cols., 1974 a, b).

Uma quarta isoforma ativa da tripsina (não apresentada na Figura-6) observada após a clivagem entre os resíduos Lys (155) e Ser (156) foi purificada, parcialmente caracterizada e denominada de δ -tripsina (Teixeira., 1977).

Outras isoformas de tripsina se formam ainda durante o processo de ativação, porém algumas delas possuem atividades proteolíticas muito baixas ou nenhuma atividade amidásica ou esterásica e algumas ainda não foram caracterizadas (Maroux e cols., 1966 e 1967). A formação destes produtos inativos é fortemente inibida por cátions divalentes tais como cálcio. Na ausência destes íons a quantidade de proteínas sem atividade enzimática pode resultar até em 50% do zimogênio que foi ativado. Em concentrações de 0,02-0,10 mol.L⁻¹ de íons cálcio, estes aceleram a quebra seletiva da ligação entre Lys (6) e Ile (7), deste modo promovendo a formação de β -tripsina, evitando-se assim clivagens não específicas (McDonald & Kunitz, 1942).

1.2.4 Estruturas secundária e terciária.

No que se refere à estrutura tridimensional da tripsina pode-se observar, por métodos cristalográficos, segundo Bode e cols., (1975a, 1978 e 1983) que a molécula de β -tripsina apresenta um arranjo tridimensional globular com dois domínios de estruturas

similares. O primeiro domínio compreende do 1º resíduo de aminoácido ao 105º e o segundo do 106º ao 223º, estes domínios estão unidos assimetricamente, e entre eles está localizado o sítio catalítico. A estrutura secundária da isoforma β -tripsina apresenta 85% de identidade com o tripsinogênio e é principalmente caracterizada por apresentar estruturas do tipo folhas beta-antiparalelas (Fig.7) que juntas se organizam formando dois beta barris unidos assimetricamente (Fig.8) contendo pequenos segmentos de alfa-hélice (fig.7).



Figura 7: Estrutura tridimensional de β -tripsina bovina. O primeiro domínio está realçado em cor azul (1-105) e o segundo domínio realçado em cor vermelha (106-223). O resíduo de aminoácido N-terminal está representado em cor laranja e o C-terminal em cor verde. Os resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica estão representados em modo de bastão: Ser (**amarelo**), His (**lilás**) e Asp (**verde**).

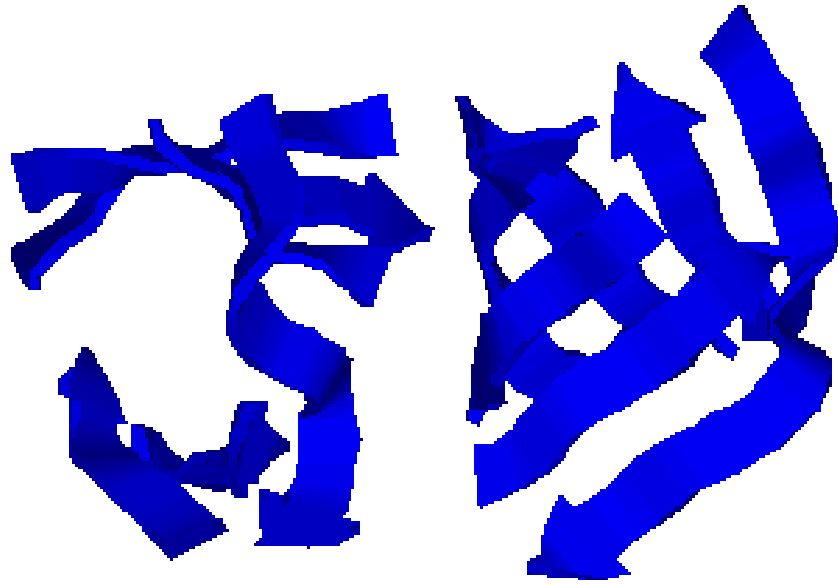


Figura 8: Domínios isolados da isoforma β -tripsina em forma de beta-barris (figura feita no Rasmol a partir de 5ptp.pdb).

O tripsinogênio e as isoformas de tripsina (β , α e ψ) são constituídos, respectivamente, por uma, duas e três cadeias polipeptídicas sendo essas cadeias interligadas por seis pontes dissulfeto (Fig-9) localizadas nos resíduos Cys (13)-Cys (143), Cys (31)-Cys (47), Cys (115)-Cys (216), Cys (122)-Cys (189), Cys (154)-Cys (168) e Cys (179)-Cys (203) (Walsh & Neurath, 1964b e Mikes e cols., 1966). A ponte dissulfeto (13-143) interliga os dois domínios, enquanto que as pontes dissulfeto restantes são intradomínios. O primeiro domínio possui uma ponte dissulfeto (Cys (31)-Cys (47)) e as outras quatro pontes estão no segundo domínio.

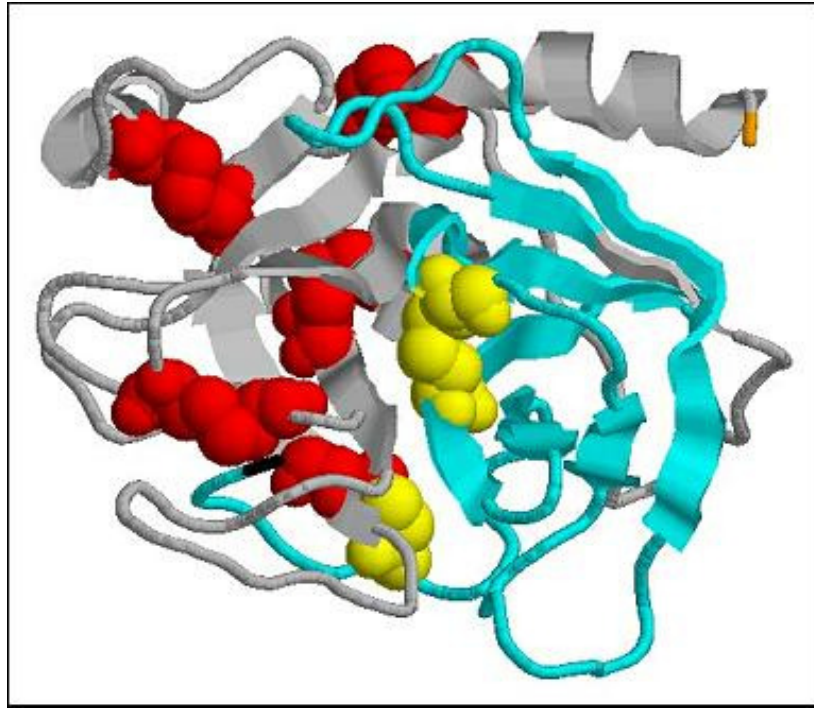


Figura 9: Disposição das pontes dissulfeto na isoforma β -tripsina. O primeiro domínio (verde) possui uma ponte dissulfeto (amarelo). O segundo domínio (cinza) possui quatro pontes dissulfeto (vermelho). Os dois domínios são ligados por uma ponte dissulfeto (ponte interdomínio) (amarelo-vermelho) (5ptp.pdb *Protein Data Bank*).

Tanto o tripsinogênio como as moléculas de tripsina possuem sítios específicos para ligação do íon metálico cálcio. No tripsinogênio o primeiro sítio de baixa afinidade com $pKCa^{2+} = 1,8$ é constituído principalmente pelas cadeias laterais de dois resíduos de aminoácidos na porção N-terminal Asp (4) e (5) e outros aminoácidos mais internos e uma molécula de água, o outro sítio de ligação possui alta afinidade com $pKCa^{2+} = 3,4$ e é formado por um grupo de aminoácidos e duas moléculas de água (Glu (58), Asn (60), Val (63), Gln (68), H₂O (711) e (714)). As isoformas de tripsina possuem apenas um sítio de ligação ao cálcio (correspondente ao segundo sítio do tripsinogênio) (Fig.10),

pois, o primeiro sítio de ligação é perdido com a clivagem do hexapeptídeo N-terminal (Bode & Schawager, 1975b e Chiancone e cols., 1985).



Figura 10: Sítio de ligação ao íon metálico cálcio na isoforma β -tripsina. O íon metálico Ca(II) é representado por uma esfera de cor laranja acondicionada em uma alça da molécula de proteína.

As moléculas de α - e ψ -tripsina até a presente data não possuem suas estruturas tridimensionais determinadas; assim todos os estudos sobre as isoformas de tripsina bovina se baseiam na estrutura de sua molécula precursora, a β -tripsina. Embora algumas características cinéticas da α - e ψ -tripsina já tenham sido descritas (Foucault e cols., 1974a,b), pouco se sabe da sua caracterização termodinâmica. Devido à semelhança estrutural pode-se esperar que a isoforma α -tripsina apresente características termodinâmicas próximas às da β -tripsina, já descritas na literatura (Bittar e cols., 2003) e que a isoforma ψ -tripsina apresente alguma diferença significativa frente as outras isoformas estudadas.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE CENTRAL DO PROJETO

O nosso grupo de pesquisa (grupo de pesquisa em físico-química e termodinâmica de macromoléculas) dedica-se, há aproximadamente quarenta anos, inicialmente sob a direção do Prof. Marcos Luiz dos Mares Guia e atualmente sob a direção do Prof. Marcelo Matos Santoro, em investigar parâmetros físico-químicos e termodinâmicos de algumas serino-proteases. Já foram realizados alguns estudos termodinâmicos da isoforma β -tripsina (Gunther e cols, 1997; Martins e cols., 2003; Bittar e cols, 2003; Pereira e cols., 2005).

A partir do momento que foi possível isolar, caracterizar, obter quantidades suficientes para ensaios calorimétricos e ter um controle de qualidade sobre as três isoformas da tripsina foi possível tentar determinar a estabilidade termodinâmica do tripsinogênio e das isoformas α - e ψ - tripsina em meio ácido (pH 3,0).

A fim de continuar a pesquisa sobre o comportamento termodinâmico do sistema de conversão de isoformas de tripsina este trabalho visou a utilizar ferramentas termodinâmicas, bioinformática e de físico-química de proteínas para fazer inferências de como discretas modificações estruturais discretas podem alterar a estabilidade termodinâmica das proteínas e entender, do ponto de vista termodinâmico, o processo de conversões químicas de uma serino-protease, passando de tripsinogênio até ψ -tripsina.

Três hipóteses dirigiram este projeto; a primeira a de que a metodologia de purificação de isoformas de tripsina previamente usada era ineficiente devido a alguns problemas analíticos e outros na determinação de alguns parâmetros físico-químicos do processo. Se estes pontos fossem analisados e revisados finamente uma melhoria poderia ser alcançada. A segunda hipótese foi a de que os parâmetros termodinâmicos

determinados para algumas isoformas de tripsina anteriormente usavam amostras impuras de tripsina quanto a misturas de isoformas devido à conversão temporal. A terceira hipótese foi a de que a conversão de tripsinogênio à isoforma β -tripsina ocasiona uma maior estabilidade termodinâmica para a molécula formada. E que para as outras isoformas a α - e ψ -tripsina que são isoformas menos ativas e abundantes que sua precursora a β -tripsina, ao serem formadas podem ter sua estabilidade diminuída e apresentar características físico-químicas que justifiquem esta instabilidade.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Purificação, isolamento, caracterização físico-química e bioquímica, de tripsinogênio e das isoformas β -, α -, e ψ - tripsina.

3.2 Objetivos específicos

- Otimização da metodologia de purificação de isoformas de tripsina (β -, α -, e ψ - tripsina) em meio alcalino, utilizando-se conceitos analíticos quantitativos a fim de aumentar o grau de pureza, rendimento e ainda a manutenção da atividade destas enzimas;
- Aumento da escala de produção de isoformas de tripsina a partir de parâmetros obtidos no método cromatográfico analítico;
- Caracterização bioquímica (massa molecular e atividade enzimática) das isoformas de tripsina;
- Desenvolvimento de metodologia de controle de qualidade para as isoformas de tripsina purificadas a partir da metodologia proposta de purificação ;
- Isolamento e caracterização bioquímica da molécula de tripsinogênio bovino a partir de amostra comercial;
- Confirmação dos dados termodinâmicos obtidos por Bittar, e cols., (2003), para a isoforma β -tripsina para uso de comparação com as outras isoformas;

- Determinação dos parâmetros termodinâmicos possíveis por calorimetria diferencial de varredura para o de tripsinogênio, e as isoformas α -e ψ -tripsina em pH 3,0.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Otimização do processo cromatográfico e caracterização físico-química das isoformas de tripsina.

4.1.1. Montagem do sistema cromatográfico.

A fim de aperfeiçoar o processo desenvolvido por Schroeder & Shaw (1968), nosso grupo de pesquisa decidiu reproduzir o sistema cromatográfico usado em 1968 pelos autores acima citados com pequenas modificações na metodologia. O sistema cromatográfico (Fig.11) é composto de uma fase estacionária constituída de SE-Sephadex[®] C-50 (323 mL ou 85 cm de altura na coluna) (Pharmacia[®], 1977) que foi preparada nas mesmas condições descritas no artigo clássico de Schroeder & Shaw (1968) montada em uma coluna de vidro (90.0 x 2.2 cm Di) usando uma fase móvel (solução tampão) constituída de tampão a 0,1 mol.L⁻¹ de tris-HCl, pH 7,1 (25°C), contendo NaCl a 0,1 mol.L⁻¹, CaCl₂ a 0,02 mol.L⁻¹ de e benzamidina a 1,0 mmol.L⁻¹. Todos os reagentes usados na montagem do sistema cromatográfico foram de grau reagente (P.A) e a água utilizada foi água reagente tipo II (destilada).

A fase estacionária depois de acondicionada na coluna foi equilibrada com a fase móvel, ou seja, a solução tampão com aproximadamente cinco vezes o volume da coluna e o equilíbrio foi verificado por meio da comparação da absorbância e do pH entre a solução tampão aplicada (fase móvel) no topo da coluna com aquela que era eluída do sistema cromatográfico. A fim de evitar que a resolução cromatográfica fosse influenciada pela compressão da fase estacionária durante o processo de separação, para cada condição experimental diferente testada foi repetido o processo de remoção de fase

estacionária da coluna cromatográfica seguido por regeneração e por novo empacotamento (Santos e cols., 2008 e Bollag e cols., 1996).

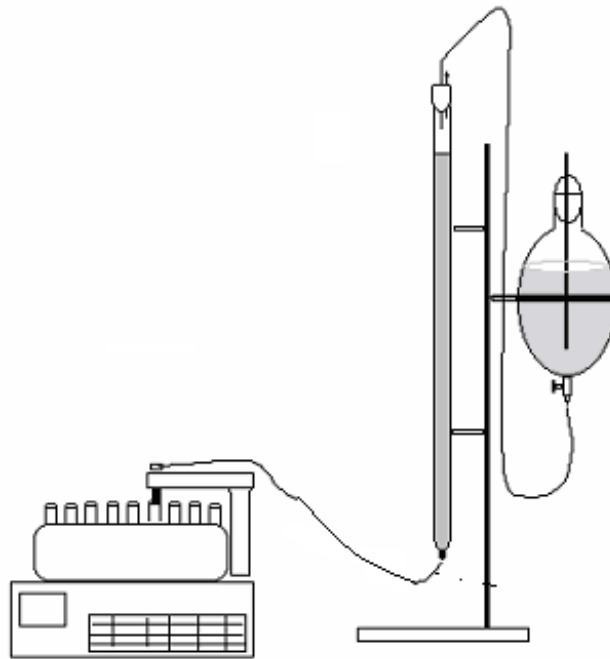


Figura 11: Sistema cromatográfico de troca iônica catiônica de separação de proteínas. Coluna (90.0 x 2.2 cm Di).

4.1.2. Procedimento cromatográfico.

As isoformas de tripsina foram obtidas a partir de tripsina comercial de pâncreas bovino (SIGMA, tripsina tipo III T8253, lote 125HO676, **EC 3.4.21.4**) e foram purificadas por cromatografia líquida de troca iônica (catiônica) em um sistema de bancada com eluição do tipo isocrática. O sistema cromatográfico operou a uma temperatura de 4°C sob pressão hidrostática (20 cm de coluna de água) e com reservatório de solvente abaixo do nível do topo da coluna a fim de evitar empacotamento da fase estacionária (Fig. 11). As frações foram coletadas usando um coletor automático (LKB-Frac-100-Pharmacia[®]) (Fig. 11) contendo tubos de 14 mL aos quais foram adicionados 250 µL de solução aquosa de ácido fórmico a 1,5 mol.L⁻¹ para

evitar a autólise das proteínas até que as enzimas fossem processadas (dialisadas e liofilizadas) e armazenadas. As frações eluídas tiveram suas absorbâncias lidas em espectrofotômetro a 280 nm.

4.1.3. Testes de otimização cromatográfica.

A análise dos resultados de Schroeder & Shawn (1968) (Fig.12) tornou possível levantar algumas hipóteses para melhorar a resolução cromatográfica das isoformas de tripsina.

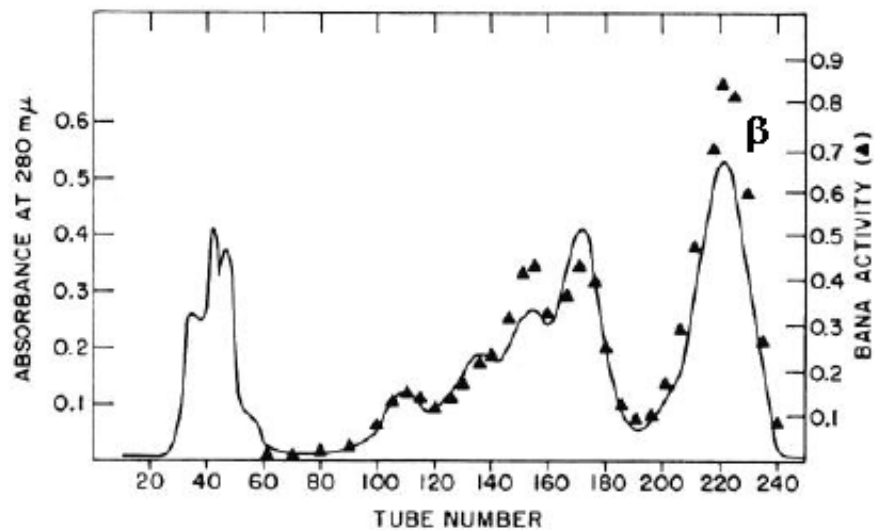


Figura 12: Cromatografia clássica de troca iônica catiônica de isoformas de tripsina em meio alcalino segundo por Schroeder & Shaw em 1968. Fase móvel com tampão tris-HCl a 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,1 usando 220 mg de tripsina comercial da marca Seravac.

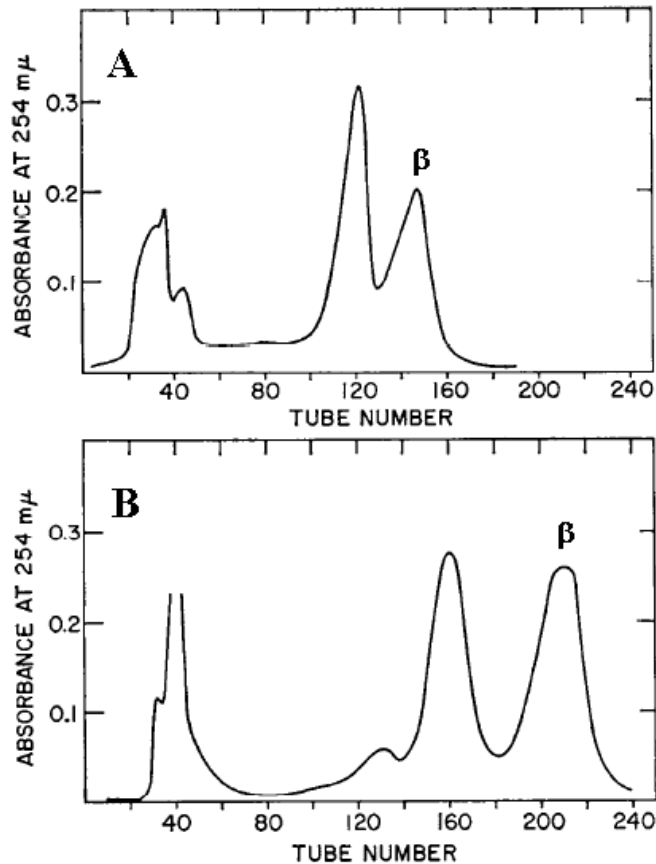


Figura 13: Cromatografias de tripsina comercial bovina (Worthington) segundo Schroeder & Shaw 1968. Perfil A usando tampão tris-HCl a $0,125 \text{ mol. L}^{-1}$ pH 7,1 e 240 mg de tripsina comercial e o B com tampão tris-HCl a $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ de tris-HCl, pH 7,1 usando 252 mg de tripsina comercial.

Observações sobre os perfis cromatográficos de Schroeder & Shawn:

- Resolução baixa entre as principais isoformas de tripsina (β e α), fig. 12 e 13-A e B;
- Altas atividades amidásicas para isoformas conhecidamente com baixas atividades (ψ , γ , Z, e Δ -tripsina) (Fig.12);

- Atividades amidásicas relativamente baixas para a concentração de proteína usada, sugerindo que a proteína de partida poderia estar parcialmente desnaturada ou que o processo de purificação ocasionou mudanças irreversíveis nas moléculas fazendo que sua atividade diminuísse quando mensurada;
- Frações com bandas muito largas e com simetria reduzida, sugerindo que a coluna está trabalhando sobrecarregada;
- Apesar de o fluxo ser alto para uma fase estacionária que opera usualmente a fluxos mais baixos, as frações protéicas são eluidas em um volume superior ao esperado para fluxos rápidos. Este resultado sugere mais uma vez que a fase estacionária está comprimida pela pressão excessiva;
- Número de moléculas além do que é conhecido atualmente, sugerindo fragmentações ou clivagens inespecíficas;
- Tempo de corrida experimental muito longo.

Por meio destas observações foram levantadas as seguintes hipóteses:

Hipótese-1 (H-1): A resolução baixa entre as isoformas de tripsina é devido a fatores como:

- Fluxo muito alto (Fluxo médio de $290,0 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$), levando a um empacotamento excessivo da fase estacionária;
- Sistema cromatográfico pode estar sobrecarregado de proteínas.

Hipótese-2 (H-2). As condições físico-químicas do processo cromatográfico não foram sistematicamente controladas:

- Temperatura cromatográfica é diferente da temperatura de ajuste da fase móvel, ocasionando mudanças nos valores de pH em diferentes ambientes;
- Concentração dos reagentes e força iônica não foram otimizadas para uma melhor resolução cromatográfica.

Estas hipóteses foram testadas no sistema cromatográfico a fim de observar a resolução entre as principais isoformas de tripsina, ou seja, β - e α -tripsina variando-se as seguintes condições experimentais:

- Fluxo cromatográfico de 60,0; 70,0; 100,0 e 150,0 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$;
- Concentração de NaCl de 90; 100; 125 e 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$;
- Capacidade trocadora da coluna com quantidades de partida de 60; 80; 100; 150; 200; 250 e 300 mg de tripsina comercial bovina dissolvida em 10mL da fase móvel;
- Variação de pH da fase móvel usando-se os valores de 7,69 ou 7,10 medidos a 4°C *;
- Medida da precisão cromatográfica através de dez experimentos consecutivos sem desempacotamento e regeneração do sistema cromatográfico.

*A fase móvel foi preparada considerando a temperatura na qual operava o sistema cromatográfico, de tal maneira que a 4°C (temperatura cromatográfica) o valor do pH ajustado a 25°C sofria um acréscimo. Isto foi possível devido ao conhecimento do coeficiente dpK_a/dT do tris-HCl (-0,028/°C) (Beynon & Easterby, 1996). Estas variações no valor do pH foram confirmadas experimentalmente sendo feitas medidas periódicas durante o intervalo cromatográfico.

Todas as condições experimentais foram testadas pelo menos em triplicata para poder observar a reprodutibilidade do processo e para cada teste realizado com o sistema cromatográfico o mesmo foi desempacotado e regenerado a fim de evitar erros sistemáticos durante avaliação do sistema. Em média cada ponto experimental isolado foi ensaiado em intervalos de quinze dias.

4.1.4 . Avaliação da eficiência do sistema cromatográfico.

A avaliação da eficiência do sistema cromatográfico foi feita através de três parâmetros:

- Medida do nível (altura) da fase estacionária em função do tempo cromatográfico (indicativo de compressão da fase estacionária e consequentemente diminuição dos números de pratos teóricos, Harris, 2001);
- Simetria dos picos (gaussianas) feita pela comparação da largura na meia altura dos picos (indicativo de sobrecarga da coluna);
- Resolução cromatográfica entre as isoformas β e α -tripsina obtida através da seguinte equação:

$$R = \frac{V_r \text{ pico2} - V_r \text{ pico1}}{0,5x(W2 + W1)} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

- $V_r \text{ pico}$ = volume de retenção do pico
- W = largura da base do pico

Os valores de W e de V_r foram obtidos por meio de análise de deconvolução usando cálculos com modelos de Gaussianas dos picos cromatográficos do programa de análise Origin[®] Scientific 5.0.(Harris, 2001 e Skoog, 1980).

4.1.5. Seleção das isoformas de tripsina e diálise.

As frações de tripsina originadas do processo cromatográfico foram selecionadas, visualmente fração por fração por meio do perfil de eluição cromatográfica. Posteriormente, as atividades das frações foram ensaiadas assim como as massas moleculares das proteínas foram determinadas.

As frações selecionadas foram submetidas a um processo de diálise em uma membrana de diálise com limite de exclusão de 12 kDa (Espectrapor®). A solução protéica foi submetida a uma diálise contra um fator de diluição de 10^6 vezes o volume da amostra durante 24 horas em uma solução aquosa de HCl a $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ a 4°C .

4.1.6. Liofilização, armazenamento da amostra e determinação da concentração de tripsina.

O material dialisado foi submetido a um processo de liofilização (Everse, & Stolzenbach, 1971) e logo depois fracionado em alíquotas de 5 mg e acondicionado em tubos Falcon® de 15 mL sob pressão de nitrogênio gasoso e estocado em geladeira à temperatura de 4°C .

A determinação das concentrações do tripsinogênio e das isoformas de tripsina foi conduzida espectrofotometricamente usando-se os respectivos coeficientes de extinção molar a 278 nm, $33.360 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Vincent & Lazdunski, 1976) e $40.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Walsh & Wilcox, 1971), respectivamente.

4.1.7. Determinação da identidade e pureza das isoformas de tripsina e de tripsinogênio.

As massas moleculares e a pureza das isoformas de tripsina foram determinadas por meio da técnica de espectrometria de massa usando dois tipos diferentes tipos de ionização: A ionização por eletronebulização (ESI-MS “Electrospray ionisation mass spectrometry”) para isoformas de tripsina e a desorção/ionização por laser assistida por matriz (MALDI-TOF-“Matrix assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight”) para o tripsinogênio.

4.1.7.1. ESI-MS

A espectrometria de massa do tipo ESI-MS foi realizada usando um equipamento do tipo Q-TOF MicroTM (Micromass, UK) equipado com uma fonte de ionização tipo *electrospray* operando no modo positivo. Amostras (20 µL) originadas de 1,0 mL na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹ foram ressuspendidas em 20 µL de uma solução aquosa de acetonitrila a 50 % (em volume) e 0,2 % (em volume) de ácido fórmico. As amostras foram injetadas diretamente na fonte de ionização via canalículo de injeção a um fluxo de solvente de 10 µL.min⁻¹. As condições experimentais foram as seguintes:

- Fonte (capilar = 3000 V, cone de amostra = 70 V e cone de extração = 2 V)
- TOF (tubo de vôo= 2500 V e detector de MCP= 5630 V).

As aquisições dos espectros de massas foram rotineiramente obtidas na faixa de 100 a 3000 m/z e esta escala foi calibrada usando uma solução alcoólica de NaI. Os espectros usados resultaram de vinte aquisições combinadas (aquisição/2 seg.). Os dados

originais (m/z) foram tratados (subtração de linha de base, suavização, e centralização) e os dados resultantes foram analisados usando o programa computacional Masslynx® 4.0.

4.1.7.2. MALDI-TOF

As amostras foram dissolvidas em uma solução saturada de ácido sinapínico (5,0 mg solução aquosa de TFA a 3%:acetonitrila: água 1:4:5, v/v) na proporção de 1:3 (v/v) amostra:matriz, e em seguida colocadas em triplicata (0,5 µL/poço) sobre uma placa de aquisição de dados do MALDI (MTP Anchorchip® 384x600) e deixada secar à temperatura ambiente. A massa molecular foi obtida usando um AUTOFLEX® III MALDI-ToF/ToF (Bruker™) operando no modo linear positivo.

Foi realizada uma calibração linear usando o Kit de calibração da Bruker (Protein Calibration Standard II):

- Tripsinogênio $[M+ H]^+ = 23.982$
- Proteína A $[M+ H]^+ = 44.613$
- Albumina-Bovina $[M+ H]^+ = 66.431$
- Proteína A $[M+ 2H]^{2+} = 22.306$
- Albumina-Bovina $[M+ 2H]^{2+} = 33.216$

Para análise dos dados foi usado o programa Flex Analysis® (Bruker Daltonics), onde o dado bruto teve subtraída a linha de base seguido de um tratamento de suavização das curvas e então a proteína teve determinada sua massa molecular.

4.1.8. Atividades enzimáticas das isoformas de tripsina e perfil de atividade amidásica de α -tripsina em função do pH.

As atividades amidásicas das isoformas de tripsina foram ensaiadas utilizando a metodologia descrita por Ascenzi e cols., (1981) usando-se o substrato sintético cromogênico N α -Benzoil-DL-Arginina-*p*-Nitroanilida (DL-BAPNA) (Erlanger e cols., 1961). Os ensaios foram conduzidos a uma temperatura de 37°C, em triplicata para cada fração e o produto cromogênico foi lido em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 410 nm.

4.1.8.1. Atividade amidásica

Em alguns momentos do projeto a atividade amidásica foi medida em todos os tubos do eluato da cromatografia para que atividade amidásica fosse detectada em todo o perfil. Em outros momentos a medida de atividade foi conduzida somente na fração já selecionada e identificada por ESI-MS como uma isoforma de tripsina. A metodologia foi a seguinte:

- Alíquota de 50,0 μ L de cada amostra (a 1,0 mg.mL⁻¹) foi acrescida de 0,9 mL de tampão específico para cada valor de pH desejado (0,10 mol.L⁻¹ de tampão citrato de sódio ou β -alanina ou tris-HCl ou ainda tampão acetato de sódio ou tampão Hepes mais 20,0 mmol.L⁻¹ de CaCl₂) e 5,0 mmol.L⁻¹ de DL-BAPNA;
- Incubação por 10 minutos a 37°C;
- Adição de 250,0 μ L de solução aquosa de ácido acético a 60% (v/v) para paralisar a reação;

- Leitura de absorbância a 410 nm;
- O controle inclui todos os passos anteriores, mas sem a adição de enzima.

4.1.8.2. Atividade esterásica da isoforma ψ -tripsina.

A atividade esterásica (Schroeder & Shaw, 1968) foi determinada somente na isoforma ψ -tripsina, pois esta possui uma atividade amidásica pouco significativa (Smith, 1969) não sendo possível utilizá-la como controle para esta enzima. A metodologia da medida foi a seguinte:

- Alíquota de 50,0 μL de cada amostra (estoque de tripsina a 0,5 mg.mL^{-1}) foi acrescida de 0,9 mL de solução tampão tris-HCl (0,10 mol.L^{-1} de tampão tris-HCl, pH 7,5) mais 20,0 mmol.L^{-1} de CaCl_2 e 5,0 mmol.L^{-1} de éster etílico de N_α - acetil L-tirosina (ATEE) ou éster etílico de N_α - benzoil-arginina (BAEE).
- Incubação por 10 minutos a 37°C;
- Adição de 250,0 μL de solução aquosa de ácido acético a 60% (v/v);
- Leitura de absorbância a 247 nm;
- O controle inclui todos os passos anteriores, mas sem a adição de enzima.

4.1.8.3. Atividade amidásica de α -tripsina em função do pH.

A atividade amidásica da isoforma α -tripsina em função do pH foi conduzida na faixa de pH 2,0-8,0 com incrementos de 0,5 unidade de pH a fim de usar a enzima para verificar se as proteínas purificadas não sofreram danos no processo de purificação. Os tampões utilizados foram: glicina (pH 2,0-3,5), acetato de sódio (pH 3,7-4,7), citrato de

sódio (pH 4,8-5,8), hepes (pH 6,3-7,3) e tris-HCl (pH 7,0-9,0) na concentração de 50 mmol.L⁻¹ mais 20 mmol.L⁻¹ de CaCl₂.

4.1.8.4 Titulação do centro ativo

As titulações dos centros ativos das isoformas purificadas foram conduzidas segundo a metodologia descrita por Davie & Neurath, (1955); Dias., (1986) e Chase & Shaw, (1967) com pequenas modificações na metodologia.

Neste método a tripsina catalisa a hidrólise do substrato NPGB (4-guanidinobenzoato de p-nitrofenila), onde a primeira etapa da catálise (acilação) é varias vezes mais rápida que a segunda (desacilação), o que torna possível a detecção espectrofotométrica da enzima acilada em um comprimento de onda de 410 nm.

Para a realização da titulação utilizou-se cubeta de referência com 0,9 mL de tampão Veronal (ácido dietil barbitúrico) a 100 mmol.L⁻¹, pH 8,3, contendo 0,1 mL de NPGB (5 m.mol.L⁻¹) e cubeta de amostra contendo 0,85 mL de tampão Veronal, pH 8,3, 0,1 mL de NPGB e 50 µL de amostra de tripsina (solução estoque a 0,5 mg.mL⁻¹) a ser testada.

Adotou-se o valor de 40.000 e 16.595 M⁻¹ cm⁻¹ (Walsh & Wilcox, 1971) para o coeficiente de extinção molar das isoformas de tripsina e p-Nitrofenol em pH 8,3 respectivamente. Os comprimentos de onda utilizados foram de 280 e 410 nm para as isoformas de tripsina e o NPGB respectivamente.

Para se calcular a quantidade de centros ativos foi utilizada a seguinte equação:

$$[\text{Centro ativo}] \% = \frac{Abs_{(280)} / 40.000}{Abs_{(410)} / 16.595} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde: f = fator de diluição da enzima.

- Foram realizados testes para determinação dos valores de centro ativo da tripsina comercial antes do processo cromatográfico e das isoformas de tripsina depois da purificação.

4.1.9. Teste do sistema cromatográfico otimizado com outras amostras de tripsinas comerciais para avaliação da quantidade relativa de isoformas de tripsina e atividade da amostra bruta em amostras comerciais.

A fim de testar a eficiência do sistema cromatográfico otimizado, outras amostras comerciais de tripsina foram aplicadas no sistema para determinar a quantidade relativa de isoformas de tripsina, resolução cromatográfica e outros parâmetros. Foram usadas as seguintes marcas de tripsinas comerciais disponíveis no Laboratório de Enzimologia e Físico-química de Proteínas:

- Sigma Tipo III Lote 8253
- Sigma Tipo III Lote 8003
- Sigma Tipo I Lote 8003
- Boeringer Lote 1247
- Seravac Lote 1235
- Worthington (LS003667)

Os resultados sobre as quantidades relativas de cada isoforma foram analisados no programa Origin[®] scientific. 5.0.

4.2. Controle de qualidade das enzimas purificadas e armazenadas.

4.2.1. Estimativa de “Shelf-life” (t95%) e meia vida (t50%) de α -tripsina e medida real da perda de atividade amidásica em função do tempo de armazenamento.

Para obtenção de dados sobre a estabilidade cinética das enzimas purificadas, foram conduzidos ensaios para determinar o tempo no qual a enzima estocada tem sua atividade diminuída de 5% (*shelf-life*) e de 50% (*half-life*). As amostras de α -tripsina estocadas foram ensaiadas para a determinação de estabilidade cinética nas seguintes condições:

- Foram testadas as atividades amidásicas em pH 8,0 das amostras armazenadas em temperaturas de 4°C com 50% de umidade relativa em intervalos de 15 e algumas medidas com 25 dias num intervalo de 340 dias, a fim de observar qual o efeito do tempo de armazenamento sobre a atividade da enzima. A metodologia do teste de atividade amidásica foi a mesma do item 4.1.8.1;
- As leituras foram feitas em triplicata e os resultados obtidos representam as médias dos valores mais ou menos um desvio padrão.

Os cálculos de estimativa de “*shelf-life*” e da meia vida foram feitos usando o programa SIGMA PLOT[®] versão 8.0 usando o macro “*shelf-life*” disponível na ferramenta PHARMACOLOGY (Bhardwaj e cols., 2005). Para validar o uso do macro que calcula o “*shelf-life*” o teste de decaimento de atividade foi continuado até que se

obtivesse o valor experimental do tempo de decaimento da atividade amidásica para 95% da atividade inicial da enzima (Shaw, 1987). O gráfico dos resultados foi plotado no Origin Scientific[®] 5.0.

4.2.2. Determinação da porcentagem de formação de ψ -tripsina inativas (agregadas) em função do tempo de armazenamento por calorimetria diferencial de varredura (DSC).

A fim de avaliar qual a porcentagem de ψ -tripsina estaria na condição nativa para realização dos experimentos foram feitas medidas no DSC para avaliação deste conteúdo a partir do momento do armazenamento (proteína liofilizada e mantida a 4^o C). A metodologia de aplicação e o funcionamento do DSC estão apresentados no item 4.5. As medidas realizadas no DSC foram feitas nas seguintes condições, com intervalos de 30 dias durante 8 meses:

- Solução de ψ - tripsina a 1,0 mg.mL⁻¹ em solução tampão glicina a 50 mmol.L⁻¹, pH 3,0 , contendo CaCl₂ a 20,0 mmol.L⁻¹;
- A proteína foi submetida a uma velocidade de varredura de 60 K.h⁻¹ em uma faixa de temperatura de 20 a 85 °C (193-253 K);
- Os termogramas foram analisados e os valores de ΔH_{cal} (que são numericamente iguais à quantidade de proteína nativa da amostra analisada naquele momento) foram obtidos e comparados com as medidas mensais anteriores para resultar no valor da porcentagem de proteínas nativas ou de agregados naquela condição (% proteínas nativas = $\Delta H_{cal 2} / \Delta H_{cal 1} \times 100$).

Os dados foram analisados com os programas computacionais Origin[®] DSC 4.0 e Origin[®] Scientific 5.0.

4.2.3. Determinação da porcentagem de transformação de α - em ψ -tripsina em função do tempo de armazenamento e a influência das misturas de isoformas de tripsina nos resultados calorimétricos.

A determinação da quantidade de α -tripsina armazenada que se transforma na isoforma ψ -tripsina por autólise é um importante parâmetro a se determinar, pois é necessário saber exatamente qual a isoforma está sendo usada na caracterização termodinâmica. Para isto tornou-se necessário monitorar durante o tempo de armazenamento (proteína liofilizada e acondicionada a 4°C) como se passa esta transformação de uma isoforma em outra e qual a quantidade relativa de cada uma em um determinado tempo.

Para monitorar esta transformação foi utilizado um sistema cromatográfico de bancada semelhante ao usado para purificar as isoformas de tripsina (Santos e cols., 2008), porém em menor escala para diminuir o tempo de separação das isoformas. As isoformas foram identificadas por espectroscopia no UV a 280nm e por espectrometria de massas do tipo ESI-MS .

Descrição dos sistemas cromatográficos (C- comprimento e R- raio)

Características da coluna (grande):	Características da coluna (pequena):
Resina SE- Sephadex- C50 [®]	Resina SE- Sephadex- C50 [®]
Dimensões da coluna: 90 cm (C) x 1,1 cm (R)	Dimensões da coluna: 30,0 cm (C) x 0,6 cm (R)

Fluxo: 0,120 mL/min

Fluxo: ? mL/min

Quantidade aplicada: 100,0 mg

Quantidade aplicada: ? mg

Para calcular a quantidade de proteína a ser aplicada e qual fluxo dever-se-ia usar na coluna de escala menor, foram feitas as seguintes análises:

$$\frac{M_{pequena}}{M_{grande}} = \frac{(R_{pequena})^2}{(R_{grande})^2} \quad \therefore \quad \text{Equação 3(Harris, 2001),}$$

M = quantidade de proteína aplicada na coluna, R = raio da coluna.

$$M_{pequena} = 29,7 \text{ mg}$$

A quantidade teórica que poderia ser aplicada para manter a mesma resolução obtida para a “coluna grande” (Santos, e cols., 2008) para as isoformas é de até 29,7 mg de amostra inicial. Porém, optou-se em aplicar apenas 15 mg, pois a resolução seria ainda maior com uma massa menor de proteínas. Outro cálculo necessário foi a determinação do fluxo para a “coluna menor”. O fluxo que deveria ser mantido pra que a resolução permanecesse a mesma daquela obtida para a “coluna maior” segue a

$$\text{seguinte relação: } \frac{(R_{grande})^2}{(R_{pequena})^2} = \frac{F_{grande}}{F_{pequena}} \quad \therefore \quad \text{Equação 4 (Harris,. 2001)}$$

R = raio da coluna, F = fluxo da fase móvel.

$$F_{pequena} = 0,036 \text{ mL.min}^{-1}$$

-As proteínas foram eluídas com fase móvel de tampão tris-HCl a 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,1 a 4°C, contendo NaCl a 0,1 mol.L⁻¹, CaCl₂ a 20,0 mmol.L⁻¹ e benzamidina a 1,0 mmol.L⁻¹, com um fluxo de 0,03 mL.mim⁻¹.

-A proteínas foram coletadas e os valores de absorvância foram determinados em um espectrofotômetro a 280 nm.

-As isoformas foram identificadas pela sua massa molecular e assim selecionadas. O protocolo de aplicação e detecção no ESI-MS foi o mesmo da técnica descrita no item 4.1.7.1.

4.3. Aumento na produção da quantidade de isoformas de tripsina.

Para aumentar as quantidades de isoformas de tripsina puras para os ensaios calorimétricos e físico-químicos foi montado um sistema cromatográfico para separar as enzimas em uma escala maior seguindo os parâmetros já obtidos e padronizados para a separação em menor escala. O novo sistema apresenta dimensões de 130,0 cm x 7,4 cm D.i. A fase estacionária e fase móvel foram as mesmas otimizadas para coluna de menor porte (90,0 x 2,2 cm Di). Para aperfeiçoar a resolução cromatográfica do novo sistema foram testados os seguintes parâmetros:

- Fluxo cromatográfico (0,25 a 0,30 mL.min⁻¹);
- Quantidade inicial aplicada de tripsina comercial bovina (800 a 1000 mg)

Todos os procedimentos analíticos usados para fazer a otimização do processo cromatográfico desenvolvidos por Santos e cols., (2008) foram também usados nesta etapa de aumento de escala de purificação.

4.4. Purificação e determinação da identidade e pureza de tripsinogênio.

Para determinar a pureza do tripsinogênio comercial bovino SIGMA[®] (E.C N^o 232-651-3 lote 033k7680) e averiguar a necessidade de aplicação de metodologia de separação de proteínas realizou-se um experimento cromatográfico de exclusão

molecular em uma coluna Superose-12[®] (HR 10/30 Pharmacia[®]), operando com um fluxo de 0,5 mLmin⁻¹ em um sistema de FPLC (“Fast Liquid Performance Chromatography”). A fase móvel foi uma solução tampão de β-alanina a 50,0 mmol.L⁻¹, pH 3,0, contendo CaCl₂ a 20,0 mmolL⁻¹. Foram aplicadas 0,5 mg de tripsinogênio para análise de pureza. As análises de espectrometria de massas foram feitas seguindo a metodologia do item 4.1.7.2.

4.5. Microcalorimetria

O calorímetro diferencial de varredura é um equipamento (Fig.14) que possui duas câmaras (adiabáticas), ou seja, a célula de referência (R) e a célula de amostra (S= *sample*), ambas possuindo volume de 0,5 mL. Basicamente o aparelho registra a diferença de temperatura entre a célula de referência e a célula de amostra gerando um gráfico de capacidade calorífica em função da temperatura (Fig.14).

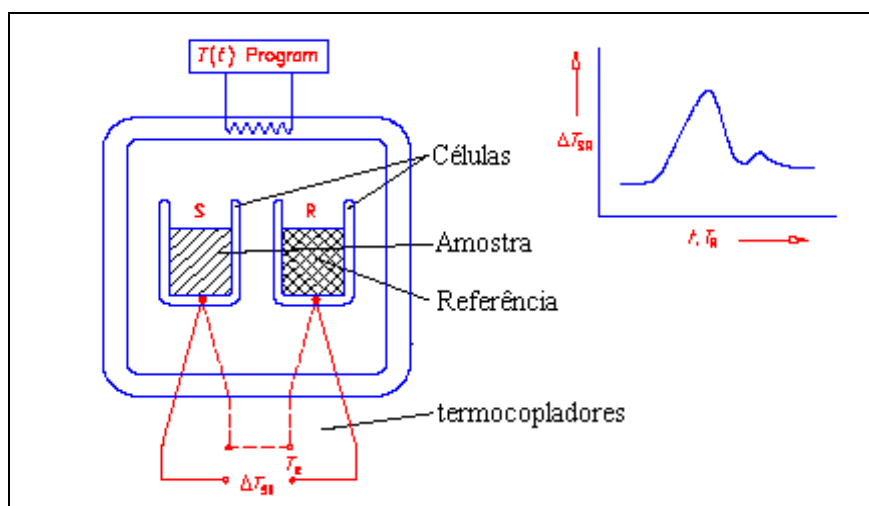


Figura 14: Sistema de funcionamento do DSC. (Hemminger & Sage, 2000)

As medidas dos parâmetros termodinâmicos foram obtidas por calorimetria diferencial de varredura (DSC, *Differential scanning calorimetry*) por meio da utilização de um calorímetro VP-DSC (MicroCal® (Northampton, EUA)).

As soluções protéicas usadas foram exaustivamente dialisadas (6h) contra o respectivo tampão que é colocado na câmara de referência. As aquisições foram conduzidas dentro de séries a fim de reduzir artefatos devido ao histórico térmico do instrumento. As soluções protéicas foram degaseificadas (20 min) antes da aplicação nas câmaras e as aquisições foram feitas na faixa de temperatura de 20-80 °C (193-253 K) usando preferencialmente uma velocidade de varredura de 1 K·min⁻¹ e o sistema foi submetido a uma pressão de 20 psi em ambas as câmaras.

Os parâmetros termodinâmicos foram calculados usando-se o pacote de análises do software “Origin-DSC” fornecido pela empresa MicroCal® (Inc., Northampton, MA, USA). Este pacote de análise envolve subtração da linha de base, definição de uma conexão linear para o estado nativo e desnaturado e ajuste de curvas do dado processado a modelos pré-definidos.

O modelo clássico de transição em dois estados foi aplicado para a deconvolução da maioria das curvas experimentais obtidas. Cada transição ajustada no modelo de dois estados fornece dois parâmetros, T_m e ΔH_{cal} . T_m é o ponto médio da curva de desnaturação e ΔH_{cal} é mudança de calor obtida por meio da deconvolução da curva de capacidade calorífica x T, ou seja, é a quantidade de calor que o sistema consome ou libera para que ocorra uma transição. As equações básicas usadas para deconvoluir os dados de DSC estão descritas nas referências Sturtevant, (1987) e Privalov, (1986).

Outro parâmetro importante é a entalpia de van't Hoff que é relacionada com a forma do pico (Gaussianas de desnaturação) por meio da seguinte expressão:

$$\Delta H_{vH} = C_{p_{\max}} \cdot \frac{4Rt_m^2}{\Delta H_{cal}} \quad \text{Equação 5}$$

Onde o ΔH_{cal} é a variação da entalpia calorimétrica, $C_{p_{\max}}$ o máximo da função capacidade calorífica, R é a constante dos gases e T_m é a temperatura média da curva de desnaturação.

Para obter o valor da entalpia de van't Hoff, a função de ajuste não dois estados, para estados múltiplos (“no two state”) do programa de análise Origin. DSC[®] 4.0 pode ser usada. Para transições em dois estados o quociente entre as entalpias calorimétricas (ΔH_{cal}) e van't Hoff (ΔH_{vH}), $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ deve ser próximo da unidade. Uma razão maior que a unidade sugere que intermediários de desnaturação podem estar presentes e uma razão menor que a unidade sugere que podem estar ocorrendo interações intermoleculares, tais como mudanças no estado de oligomerização.

A entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}) é a área total integrada sob a curva do termograma, a qual depois de correção apropriada da linha de base representa a energia total absorvida ou liberada pela amostra passando por uma transição. Esta absorção/liberação *depende da quantidade* de amostra presente no volume aplicado nas células do DSC, e é em princípio uma medida não *dependente de modelo* para determinação da entalpia absoluta envolvida no processo de transição de estados. Por outro lado, a entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}) é uma estimativa da entalpia da transição baseada sobre um modelo assumido para aquele processo analisado. Onde se usa a área sob a curva de C_p em qualquer temperatura, dividida pela área total do termograma,

como uma medida da extensão da fração de moléculas desnaturadas que ocorrem naquela temperatura. Desde que o tratamento de van't Hoff (ΔH_{vH}) se baseia apenas nas razões das áreas sob a curva experimental, ela não *requer nenhuma informação sobre concentração ou pureza da amostra*. A comparação da entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}) e da entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}) pode fornecer informações importantes sobre os mecanismos de alguns processos e molecularidade de alguns eventos (Lehane e cols., 1998).

O estudo microcalorimétrico da desnaturação térmica do tripsinogênio e das isoformas α - e ψ -tripsina em meio ácido foi realizado conforme metodologia descrita por Privalov & Potekhin, (1986) e Freire e cols., (1992).

4.5.1. Metodologia de aplicação de amostra e parâmetros de corrida no DSC para as proteínas analisadas:

- Dissolução da proteína em solução tampão;
- Determinação da concentração através de método espectrofotométrico UV (280nm);
- Diálise das amostras; contra a solução contida na câmara de referência;
- Degaseificação da solução protéica e do tampão da célula de referência durante 30 minutos;

- **Linha de base:**

Foram realizados registros de linhas de base com solução tampão na célula de amostra e na célula de referência para cada tipo de experimento a ser realizado, para posterior subtração no processamento de dados, seguindo-se os seguintes parâmetros:

- Cinco corridas consecutivas na faixa de temperatura de 20 a 80 °C (193-253 K);
- Velocidade de varredura podendo variar de 1-90 K.h⁻¹;

- A linha de base foi obtida pela média entre as cinco corridas realizadas anteriormente;
- Antes de aplicar as amostras no calorímetro cada célula foi lavada com água reagente tipo I com aproximadamente dez vezes o volume das câmaras;
- Aplicação de 500 μL da solução tampão que contem amostra na célula S (amostra) e da mesma quantidade de tampão na célula R (referência);
- Depois da aplicação foi realizada uma pressão positiva de 20,0 psi em ambas as câmaras por meio de um dispositivo próprio do aparelho;
- Inicia-se então a varredura de temperatura.

4.5.2 Teste comparativo de alguns parâmetros termodinâmicos obtidos com β -tripsina por Bittar e cols., (2003) com aqueles obtidos nesta tese para a isoforma β -tripsina.

Pretendendo-se utilizar os dados obtidos por Bittar e cols., (2003) para a isoforma β -tripsina como comparativo para os experimentos ora realizados, e poder relacioná-los com os outros resultados das isoformas α - e ψ -tripsina tornou-se necessário realizar alguns experimentos. Assim foram escolhidos dentro da curva de ΔC_p para isoforma β -tripsina no trabalho de Bittar e cols., 2003 oito pontos experimentais aleatórios para serem repetidos nas mesmas condições.

Os pontos experimentais e as condições de aplicação no DSC foram as seguintes:

- Solução tampão de glicina a 50,0 mmol.L^{-1} , pH 2,5; 2,7; 2,9 e 3,0;
- Solução tampão de glicina a 50,0 mmol.L^{-1} , pH 3,2 e sorbitol a 1,0 mol.L^{-1} ;
- Solução tampão de glicina a 50,0 mmol.L^{-1} , pH 3,0; contendo cloreto de guanidínio a 0,7 e 1,0 mol.L^{-1} (GdNCl);

- 0,5 mL de uma solução de β -tripsina a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ em sistema tamponante para todos os pontos experimentais;
- Os testes foram conduzidos no DSC a uma velocidade de varredura de 60 K.h^{-1} , na faixa de temperatura de 20 a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ (193-253 K) a uma pressão constante de 20 psi.

Os resultados foram analisados através do programa Origin.DSC[®] 4.0. e os parâmetros termodinâmicos foram comparados quanto à similaridade através do programa de análise Origin. Scientific[®] 5.0 usando-se uma análise estatística através do teste *t de Student*.

4.5.3. Teste para determinar se a desnaturação térmica de tripsinogênio, α - e ψ -tripsina são termodinamicamente ou cineticamente dirigidas.

Com o intuito de determinar se as proteínas de interesse poderiam submeter-se às leis termodinâmicas para transições reversíveis, testou-se a dependência de T_m e de ΔH_{cal} em função da velocidade de varredura nas seguintes condições experimentais:

- Foram preparadas as amostras de tripsinogênio, α -, e ψ -tripsina em condições semelhantes conforme descrito no item 4.5.1. e essas foram aplicadas separadamente no microcalorímetro uma de cada vez;
- Foram ajustados os seguintes parâmetros:
 - Cada corrida foi submetida à faixa de temperatura de 20-80 $^\circ\text{C}$ (193-253 K);

- Cada uma das corridas independentes foi submetida às seguintes velocidades de varredura diferentes sendo as mesmas as seguintes: 0,5; 3,0; 5,0; 15; 30; 60 e 90 °K.h⁻¹;
- Os valores médios de T_m e ΔH_{cal} das corridas foram calculados e comparados para decidir qual seria o tipo de controle do processo de desnaturação térmica para análise posterior dos dados de modo que se os parâmetros termodinâmicos fossem dependentes de velocidade de varredura o processo seria controlado cineticamente.

4.5.4. Influência do pH e da concentração de proteínas na relação de $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ para tripsinogênio, α - e ψ -tripsina .

Para determinar a influência do pH e da concentração de proteínas sobre os parâmetros termodinâmicos foram realizados experimentos no DSC, variando-se o pH de 1,0 a 4,0 e a concentração das proteínas de 0,25 a 2,0 mg.mL⁻¹. Nos testes onde foram avaliados o efeito do pH todas as amostras continham 1,0 mg.mL⁻¹ de tripsinogênio α - e ψ -tripsina. Depois de realizadas as corridas calculou-se a relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ para fornecer o indicativo do desacoplamento dos domínios e do estado oligomérico da proteína em questão.. Todos os testes foram feitos em triplicata.

4.5.5. Determinação do T_m , $\Delta H_{(cal)}$, $\Delta T_{1/2}$ (índice de cooperatividade) $\Delta S_{(Tm)}$, ΔC_p , $\Delta S_{(298 K)}$, $\Delta H_{(298 K)}$, $\Delta G_{(298 K)}$, T_s e T_m' (temperatura de desnaturação a frio) de tripsinogênio, α - e ψ -tripsina .

Para determinação dos parâmetros termodinâmicos foi necessário perturbar o sistema termodinâmico das proteínas de modo a que se permitisse o acesso às

informações de seus estados. Assim realizaram-se vários ensaios com valores de pH variando de 1,0 a 5,0 e outras em pH fixo, porém com a adição de um estabilizante como, por exemplo, sorbitol, manitol ou outro tipo de estabilizante, variando-se a sua concentração de 0,5 a 1,5 mol.L⁻¹, ou de um desestabilizante como o cloreto de guanidínio variando-se a sua concentração desde 0,3 a 0,75 mol.L⁻¹ a fim de perturbar a estabilidade protéica.

Todos os ensaios foram realizadas com o mesmo procedimento conforme descrito no item 4.5.1. Os tampões utilizados nos ensaios foram: glicina, β-alanina, citrato de sódio, acetato de sódio e KCl nas concentrações de 50,0 mmol.L⁻¹ da solução tamponante contendo ainda CaCl₂ a 20,0 mmol.L⁻¹ em um determinado valor de pH.

4.6. Determinação do Raio de Stokes em pH 3,0 para o tripsinogênio, β-, α- e ψ-tripsina.

A determinação do Raio de Stokes para o tripsinogênio, β-, α- e ψ-tripsina foi realizada por cromatografia de exclusão molecular usando uma coluna cromatográfica Ultra Hydrogel Tm 250 da Millipore (7,8 x 300 mm) acoplada a um sistema de cromatografia líquida de alta performance ou HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) seguindo a metodologia descrita por Al- Obeidi & Light (1988).

O procedimento de determinação do Raio de Stokes (RS) foi o seguinte:

a- Calibração da coluna de exclusão molecular com marcadores de massa molecular específicos para calibração de colunas da Sigma[®] com raios de Stokes conhecidos (Laurent & Killander , 1964 e Corbett & Roche 1984):

- Ovoalbumina: Massa molecular (MM) de 43,5 kDa e RS de 31,2 Å;

- Tripsinogênio bovino: MM de 24 kDa e RS de 22,4 Å;
- Citocromo C: MM de 12,3 kDa e RS 17,0 Å;

A fase móvel utilizada foi uma solução tampão de glicina a 100,0 mmol.L⁻¹, pH 3,0, contendo CaCl₂ a 20,0 mmol.L⁻¹. A fase móvel foi injetada a 800 µL.min⁻¹ a 25°C e o eluato foi monitorado no ultravioleta a 220 e a 280 nm respectivamente.

Todos os marcadores moleculares e a amostra teste foram aplicados em triplicata no sistema cromatográfico a fim de se obter uma precisão elevada no valor do tempo de retenção. Com os valores dos tempos de retenção dos padrões e da amostra teste foi possível estimar a massa molecular das últimas (Equação 6) e consequentemente o Raio de Stokes seguindo-se a equação- 7.

- $\text{Log MM} = a (\text{Tr}) + b$ Equação-6
- $\text{RS} = a (\text{MM}) + b$ Equação-7

MM (massa molecular), RS (raio de Stokes), Tr (tempo de retenção cromatográfico), a e b são coeficientes angular e linear da equação de primeiro grau.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização do processo cromatográfico e caracterização bioquímica das isoformas de tripsina.

Para utilizar o sistema desenvolvido por Schroeder & Shaw (1968) como base de comparação para a otimização cromatográfica foi necessário reproduzi-lo experimentalmente seguindo fielmente as condições definidas pelos autores. Uma única condição experimental foi mudada:

- A proteína comercial usada no clássico experimento de purificação de isoformas de tripsina foi da marca Seravac e Worthington e no presente estudo foram preferencialmente usadas tripsinas comerciais da marca Sigma[®].

Como pode ser observado na Figura-15 o perfil cromatográfico obtido assemelha-se muito com os dos obtidos por Schroeder & Shaw (1968) (Fig.13 A e B), apresentando seis frações facilmente distinguíveis. Duas das cinco frações, a última e a penúltima em ordem de eluição e que são as isoformas β - e α - tripsina foram caracterizadas por ordem de eluição, atividade amidásica e massa molecular por ESI-MS (fig.15). Podem-se notar ainda quatro frações eluídas anteriormente à isoforma α -tripsina, que são as isoformas ψ -, γ -, Z -, e Δ -tripsina (caracterizados somente pelo perfil de eluição). Como pode ser visto na figura-15 a resolução entre as três principais isoformas de tripsina (β -, α - e ψ) foi baixa seguindo a metodologia descrita por Schroeder & Shaw (1968) usando a proteína comercial Sigma[®], reproduzindo-se assim um perfil semelhante ao do clássico artigo citado acima.

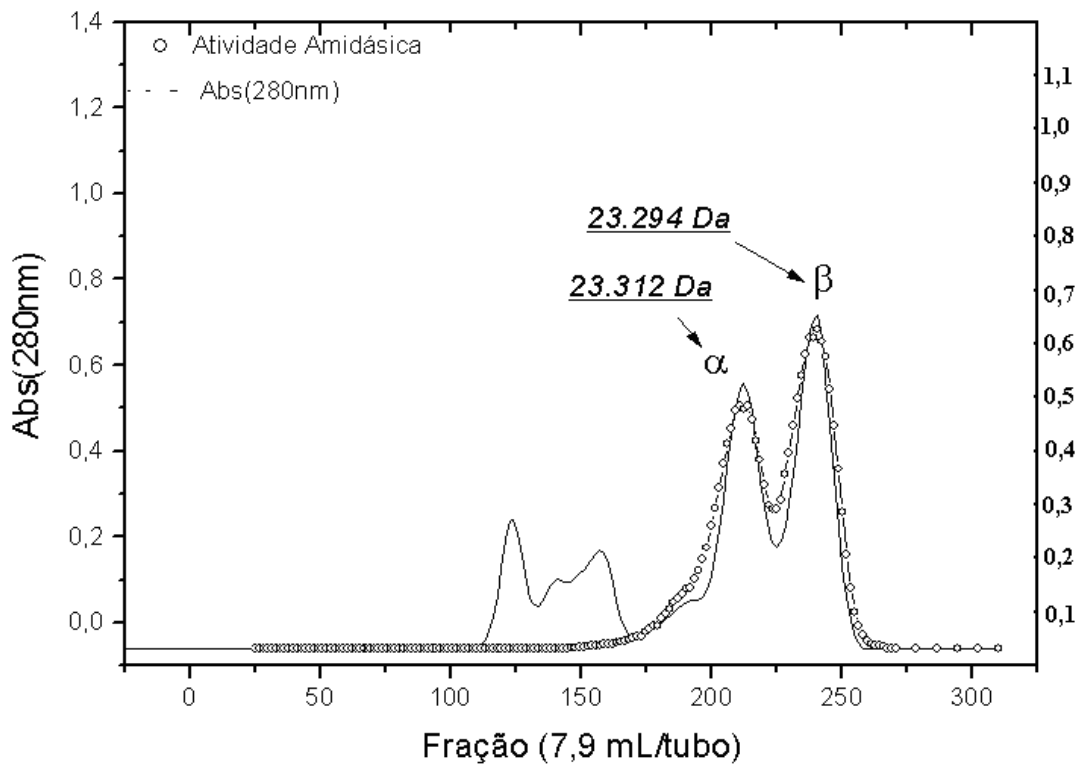


Figura 15: Cromatografia de troca iônica catiônica usando como fase estacionária SE-SEPHADEX C-50[®] (Pharmacia[®]) reproduzindo o sistema clássico de Schroeder & Shaw (1968). Condições experimentais cromatográficas foram: coluna com 99cm x 1,1 cm, fase móvel de tampão tris-HCl a 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,69 a 4°C, a um fluxo de 0,3 mL.min⁻¹. Foram aplicados 240 mg de tripsina comercial bovina Sigma tipo III. (—) absorvância a 280 nm e (o) atividade amidásica monitorada a 410 nm, utilizando-se BApNA como substrato.

O perfil cromatográfico da figura-15 atuou como padrão de comparação para otimização dos parâmetros cromatográficos desenvolvidos nesta tese.

Para todos os testes descritos abaixo as frações só começaram a ser coletadas após passagem em média de aproximadamente 140 mL da fase móvel pela coluna.

5.1.1. Teste da influência do fluxo cromatográfico sobre a resolução cromatográfica.

A fim de testar a hipótese H-1 do item 4.1.3. foram ensaiados os seguintes fluxos no sistema cromatográfico (60; 70; 100; 150 e 290 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) e os resultados relativos à resolução entre as isoformas de tripsina e à variação no volume da fase estacionária devido a uma pressão excessiva são mostrados na Tabela-1. Para todos os testes acima citados variando-se o fluxo, perfis semelhantes ao da Figura-15 foram obtidos com pequenas variações nas formas gaussianas dos picos (dados não mostrados).

Tabela 1: Avaliação da resolução das isoformas β - e α -tripsina e do volume de compactação da fase estacionária em função do fluxo cromatográfico, durante o período experimental de separação de proteínas. $R_{\beta-\alpha}$ (resolução entre as isoformas β - e α -tripsina) e ΔV_{fs} (variação do volume da fase estacionária) O desvio padrão da resolução foi de 0,01.

Fluxo	$R_{\beta-\alpha}$	ΔV_{fs} (mL)
290 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	0,75	15,0
150 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	0,60	4,6
100 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	0,92	0,37
70 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	0,81	0,37
60 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	0,78	0,37

Como pode ser visto na tabela-1 o melhor resultado alcançado para a resolução entre as isoformas de tripsina foi encontrado entre fluxos de 60 a 100 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e nesta mesma faixa existe uma menor variação no volume de fase estacionária durante o período do experimento cromatográfico. Esses resultados demonstram bem a característica física da fase estacionária, que tem resistência baixa a fluxos muito elevados acima de 100 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para o sistema montado. Assim em fluxos acima de 100 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ a fase estacionária sofre um significativo empacotamento diminuindo deste modo o número de pratos teóricos e conseqüentemente a resolução cromatográfica (resolução cromatográfica $\cong \sqrt{\text{Números de pratos teóricos}}$, Harris, 2001).

Uma explicação para a baixa resolução entre as isoformas de tripsina pode ser relacionada à velocidade de eluição das proteínas a interações inespecíficas da proteína com a fase estacionária, pois em fluxos muito altos o equilíbrio entre fase estacionária e as proteínas não é alcançado idealmente nos tempos de contatos entre os mesmos, conseqüentemente a separação fica comprometida. Já que não foi encontrada diferença significativa na resolução cromatográfica entre as isoformas de tripsina na faixa de fluxo de 60 a 100 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, decidiu-se inicialmente trabalhar com o fluxo de 60 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, com o objetivo de alcançar o equilíbrio entre as proteínas e a fase estacionária e obter assim uma resolução satisfatória.

5.1.2. Teste da influência da concentração salina ou força iônica sobre a resolução cromatográfica.

Para se avaliar a influência da concentração salina sobre o sistema cromatográfico foram testadas as variadas concentrações de NaCl (0,090; 0,100; 0,125; 0,150 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e os resultados estão na Tabela-2 e na figura-16 onde são demonstrados

apenas os resultados dos cromatogramas que apresentaram variações estatisticamente significantes.

Tabela 2: Efeito da concentração salina (NaCl) sobre a resolução cromatográfica. As condições cromatográficas foram: fluxo de 60 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 100 mg de proteína aplicada, fase móvel constituída de tampão tris-HCl a 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,69 a 4 °C, contendo CaCl_2 a 20,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e benzamidina a 1,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Fase estacionária SE-Sephadex C50[®]. As concentrações de NaCl, estão indicadas na Tabela. A resolução cromatográfica foi calculada a partir da equação-2. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e os resultados apresentados são valores de médias com mais ou menos um desvio padrão (DP).

Concentração Salina (NaCl, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Resolução (β - α tripsina)	DP
0,090	0,42	0,01
0,100	0,95	0,01
0,125	0,81	0,01
0,150	0,61	0,01

Como pode ser visto na Tabela-2 o melhor resultado quantitativo para a resolução cromatográfica foi obtido quando se usou a concentração de NaCl de 0,100 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. O perfil mostrado na Figura-16 é representativo do teste da influência da concentração salina sobre o sistema cromatográfico para algumas das concentrações testadas que apresentaram os resultados mais significativos. Pode se observar na figura-16 que para as as concentrações salinas testadas (i.e. 0,100; 0,125 e 0,150 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) o perfil de eluição foi semelhante, apresentando duas frações visualmente definidas e uma terceira sem definição. As frações com picos em 300, 275 e 235 mL correspondem à

isoforma β -tripsina, identificada pela sua massa molecular obtida por ESI-MS e por determinação de atividade amidásica e as frações com picos em 236, 219 e 199 correspondem a uma

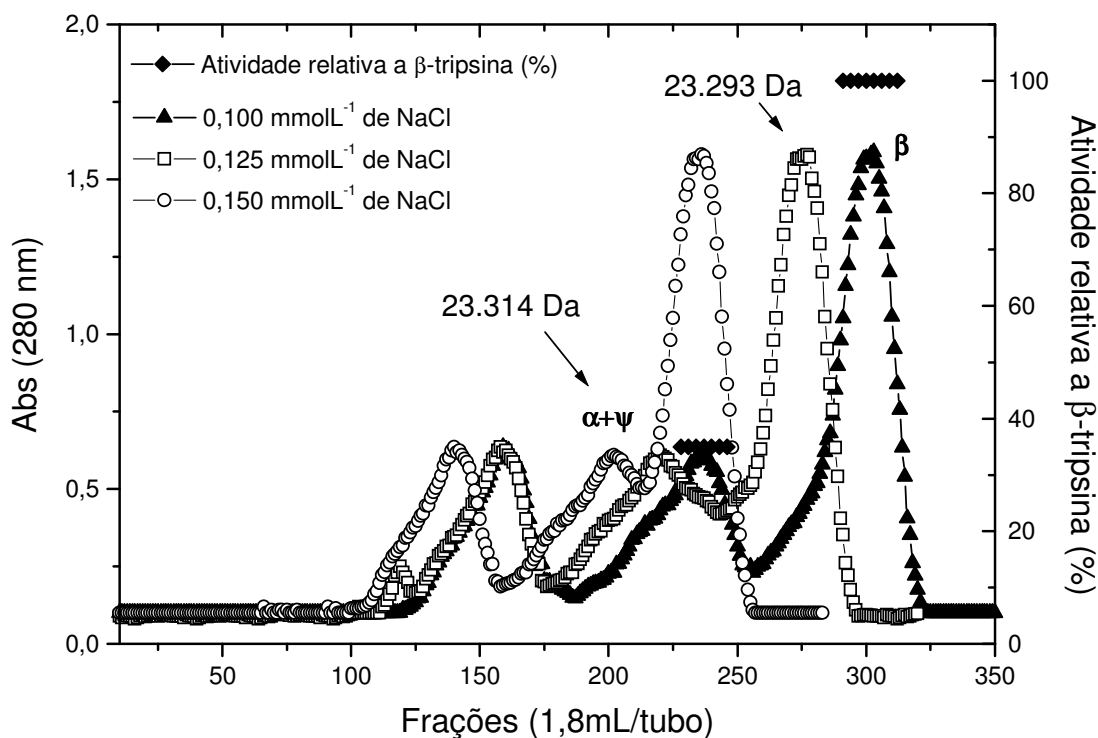


Figura 16: Efeito da concentração de NaCl sobre a resolução cromatográfica. As condições cromatográficas foram: fluxo de $60 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 100 mg proteína de quantidade de partida, fase móvel constituída tampão tris-HCl a $0,100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,69 a 4°C , contendo CaCl_2 a $20,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, benzamidina a $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de e NaCl a 100, 125 e $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sobre a fase estacionária SE-Sephadex C50[®]. A atividade demonstrada na figura (-♦-) é a medida da atividade amidásica relativa à isoforma β -tripsina. Os dados de massa molecular foram obtidos por meio de ESI-MS.

mistura das isoformas α - e ψ -tripsina que apresentaram valores de massa molecular e atividade amidásica característicos relativo a da isoforma β -tripsina (schroeder & Shaw, 1968 e Smith & ShaW, 1969).

Este resultado foi interessante, pois a partir da quantidade de NaCl empregada na coluna pode-se controlar o tempo de retenção das moléculas de tripsina aplicadas no sistema cromatográfico. Aparentemente pode-se supor que para as condições testadas valores de concentrações de NaCl acima de $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ o tempo necessário para o equilíbrio da proteína entre a fase estacionária e a fase móvel aumenta, ou seja, a proteína passa mais tempo em solução do que ligada à fase estacionária, ocasionando desta forma uma resolução baixa entre as isoformas de tripsina.

Por outro lado valores de concentrações salinas (NaCl) abaixo de $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ fazem com que a proteína fique muito tempo retida na fase estacionária, ocasionando uma resolução baixa entre proteínas correlatas como as isoformas de tripsina que diferem muito pouco na sua carga superficial líquida. Este fato poder ser visualizado com clareza quando é observada a variação do tempo de retenção das isoformas de tripsina em função da alteração da concentração salina da fase móvel. Além disso, o tempo de retenção entre as proteínas em um sistema cromatográfico foi outro parâmetro importante usado para avaliar a qualidade do sistema cromatográfico e os resultados podem ser vistos na tabela-3.

Tabela 3: Comparação dos tempos de retenção para as isoformas β - e α - tripsina quando aplicadas no sistema cromatográfico submetido a diferentes concentrações salinas. Tr (tempo de retenção médio).

	0,100 molL ⁻¹	0,125 molL ⁻¹	0,150 molL ⁻¹ NaCl
	NaCl	NaCl	
Tr β -tripsina (dias)	7,9	7,3	6,5
Tr α + ψ -tripsina (dias)	6,5	6,2	5,8

Como pode ser visto na tabela-3 o menor tempo de retenção para as isoformas β - e α + ψ - tripsina obtido para as concentrações salinas testadas foi em 0,150 mol.L⁻¹ de NaCl, sendo que para as outras concentrações o tempo de retenção foi significativamente* ($p < 0,05$) maior do que comparado ao de 0,150 mol.L⁻¹ de NaCl.

*A análise estatística da variação dos tempos de retenção foi feita usando o teste *t de student* no pacote de análise do Origin 5.0[®] para os tempos de retenção médios da isoforma β -tripsina: 6,52 (A); 7,35 (B) e 7,9 (C) dias, e os resultados estão dispostos abaixo:

Insero-1

Dados	Média	Variância	N
A	6,52	0,0111	3
B	7,35	0,01123	3

$$t = 9,31064$$

$$p = 7,40543E-4$$

Dados	Média	Variância	N
B	7,90	0,01003	3
C	7,35	0,01123	3

t = -6,88873
p = 0,00233

No nível de 0,05% de confiança, as três médias dos tempos de retenção **são** significativamente diferentes.

O mesmo procedimento descrito acima foi feito para analisar os tempos de retenção médios da isoforma $\alpha + \psi$ -tripsina: 5,8 (C); 6,1 (B) e 6,5 (A) dias.

Inserto-2

Dados	Média	Variância	N
A	5,8	0,01	3
B	6,1	0,01	3

t = 3,67423
p = 0,02131

Dados	Média	Variância	N
c	6,5	0,01	3
b	6,1	0,01	3

t = -4,89898
p = 0,00805

No nível de 0,05% de confiança, as três medias são significativamente diferentes.

Apesar do tempo de retenção apresentar valores um pouco maiores quando aplicou-se 0,100 mol.L⁻¹ de NaCl no sistema cromatográfico, quando comparado a aplicação no sistema de 0,125 mol.L⁻¹ ou mesmo 0,150 mol.L⁻¹ de NaCl (para as isoformas β e $\alpha + \psi$), a resolução cromatográfica foi significativamente maior quando foi usado 0,100 mol.L⁻¹. Assim, a partir da análise dos dados apresentados neste item todos os testes seguintes usaram a concentração salina de 0,100 mol.L⁻¹ de NaCl em sua fase móvel para poder realizar a otimização do sistema cromatográfico.

5.1.3. Refinamento do teste da influência do fluxo sobre a resolução cromatográfica.

A partir dos dados obtidos da influência do fluxo cromatográfico e da concentração salina (NaCl) foram feitos outros testes mais refinados sobre a variação do fluxo na a resolução cromatográfica de modo a otimizar este parâmetro, pois o fluxo usado de 60 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ apesar de fornecer resultados satisfatórios resultava em tempos cromatográficos muito longos. Deste modo foram testados fluxos maiores para tentar diminuir o tempo de separação experimental e ao menos manter a e resolução entre as isoformas β - e α - tripsina. Os resultados destes testes estão dispostos na Tabela-4 e na Figura-17.

Tabela 4: Efeito do fluxo sobre a resolução cromatográfica. As condições experimentais foram as seguintes: 100 mg de tripsina, fase móvel constituída de tampão tris-HCl a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,69 a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, contendo CaCl_2 a $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, benzamidina a $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ e NaCl a 100 mmol.L^{-1} sobre a fase estacionária SE-Sephadex C50[®]. A resolução cromatográfica foi calculada a partir da equação-2. Os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados apresentados são valores de médias com mais ou menos um desvio padrão (DP).

Fluxo ($\mu\text{L.min}^{-1}$)	Resolução (β - α tripsina)	DP
100,0	1,05	0,01
110,0	1,10	0,01
120,0	1,28	0,01
130,0	1,17	0,02
140,0	1,08	0,01

Como pode ser observado na tabela-4 os melhores resultados relativos à resolução cromatográfica entre as isoformas de tripsina foram encontrados para fluxos entre 110 e $130 \mu\text{L.min}^{-1}$, sendo o mais eficiente em $120 \mu\text{L.min}^{-1}$. Fluxos com valores de 90, 80 e $70 \mu\text{L.min}^{-1}$ não são mostrados devido aos resultados experimentais não serem significantes, pois os mesmos não mostraram qualquer melhoria tanto no tempo cromatográfico quanto na resolução.

Quanto à avaliação da variação dos tempos de retenção (Tabela-5) entre os fluxos testados pode-se observar que a diferença entre eles é muito pequena e não

significativa estatisticamente (teste *t de student*) apesar do resultado quanto à resolução ser claramente visível na figura-17.

Tabela 5: Comparação dos tempos de retenção para as isoformas β - e α - tripsina quando aplicados no sistema cromatográfico submetido a diferentes fluxos cromatográficos. Tr (tempo de retenção médio).

Fluxo	Tr β -tripsina (dias)	Tr α -tripsina (dias)
A) 100 μ L.min ⁻¹	3,7	3,3
B) 110 μ L.min ⁻¹	3,5	3,2
C) 120 μ L.min ⁻¹	3,6	3,2
D) 130 μ L.min ⁻¹	3,7	3,3
E) 140 μ L.min ⁻¹	3,6	3,1

A análise estatística dos tempos de retenção foi feita usando o teste *t de student* no pacote de análise do Origin[®] 5.0 scientific para os tempos de retenção médios da isoforma β -tripsina (inserto-3).

Inserto-3

Dados	Média	Variância	N
A	3,7	0,01	3
B	3,5	0,01	3
C	3,6	0,01	3
D	3,7	0,01	3
E	3,6	0,01	3

No nível de 0,05% de confiança, as médias dos tempos de retenção não são significativamente diferentes.

Nos perfis cromatográficos da figura-17 podem ser observados claramente que em cada teste realizado o perfil é caracterizado por três frações discretas, que podem ser qualitativamente e quantitativamente (atividade amidásica e massa molecular) caracterizadas (β -, α -, e ψ - tripsina) e pelo menos mais três frações com baixa resolução saem no início do perfil cromatográfico. Pode-se notar ainda que na Figura-17 que a melhor resolução entre as isoformas β - e α - tripsina é alcançada quando o sistema opera a $120 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. A influência do fluxo cromatográfico foi marcante neste ponto da pesquisa, pois como pode ser observado, o ganho em tempo cromatográfico e em resolução obtidos quando comparados com os perfis dos sistemas cromatográficos operando a 60 e a $120 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (Fig.18) foi considerado satisfatório, uma vez que o tempo de retenção, por exemplo, da isoforma β -tripsina foi reduzido de 7,9 para 3,7 dias quando o fluxo foi de $120 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e as isoformas de tripsina ficaram melhor resolvidas do que no fluxo menor de $60 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

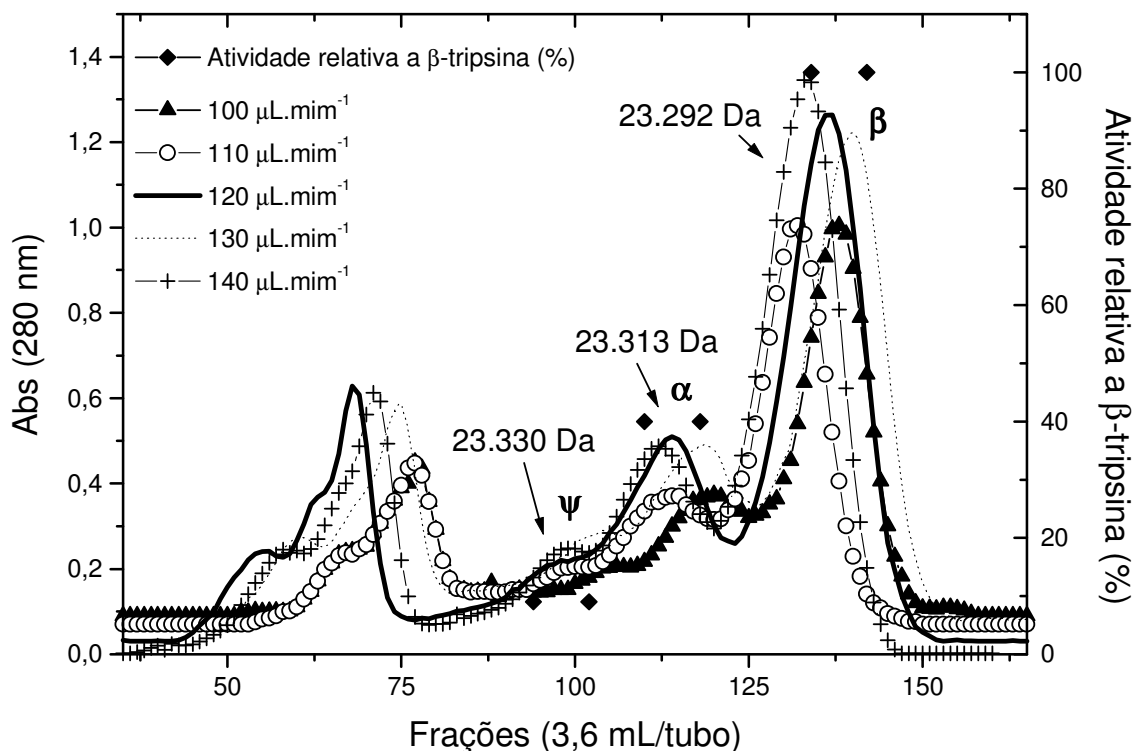


Figura 17: Efeito do fluxo sobre a resolução cromatográfica. As condições cromatográficas foram as seguintes: fluxo de 100-140 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 100 mg de quantidade de partida de proteína, fase móvel constituída de tampão tris-HCl a 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,69 a 4 $^{\circ}\text{C}$, contendo CaCl_2 a 20,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, benzamidina a 1,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e NaCl a 100,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sobre a fase estacionária SE-Sephadex C50[®]. A atividade demonstrada na figura (-♦-) é a medida da atividade amidásica relativa à isoforma β -tripsina. Os dados de massa molecular foram obtidos por meio de ESI-MS.

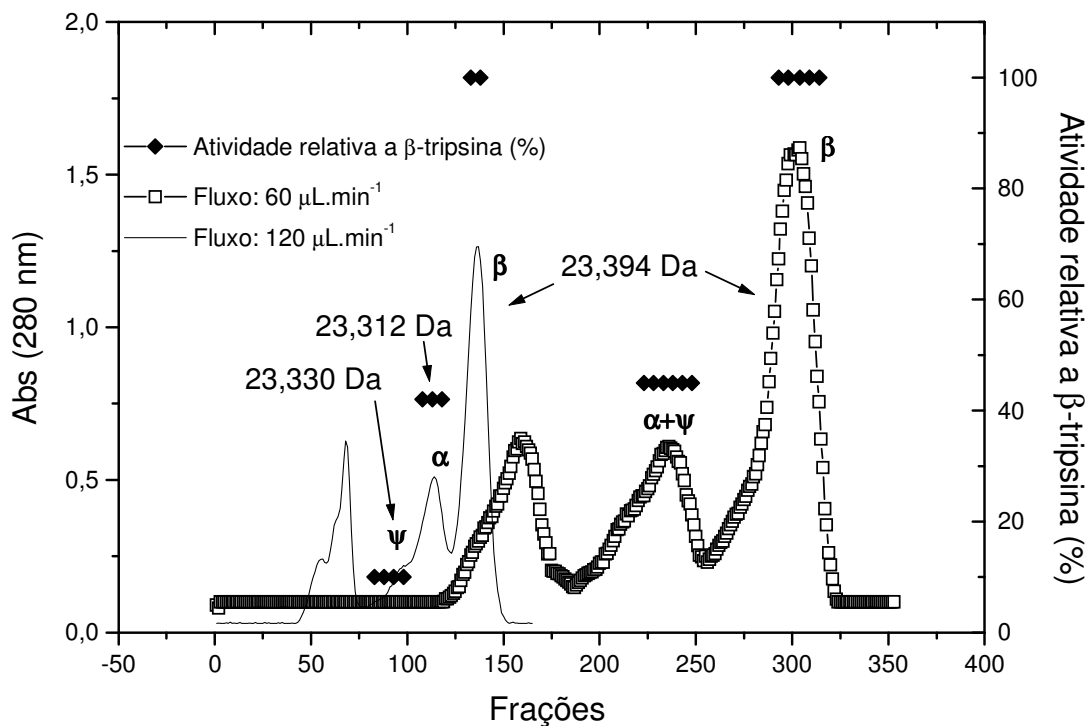


Figura 18: Efeito do fluxo sobre a resolução cromatográfica. As condições cromatográficas foram: fluxo de 60 e 120 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 100 mg de quantidade de partida de proteína, fase móvel constituída de tampão tris-HCl a 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.69 a 4 °C, CaCl_2 a 20,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, benzamidina a de 1,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e NaCl a 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sobre a fase estacionária SE-Sephadex C50[®]. A atividade demonstrada na figura (-◆-) é a medida da atividade amidásica relativa à isoforma β -tripsina. Para a corrida cromatográfica com fluxo de 60 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ foram coletados frações de 1,8 $\text{mL}\cdot\text{tubo}^{-1}$ e para de 120 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ foram coletados frações de 3,6 $\text{mL}\cdot\text{tubo}^{-1}$. Os dados de massa molecular foram obtidos por meio de ESI-MS.

5.1.4. Influência da quantidade de partida aplicada na coluna (capacidade trocadora) sobre a resolução cromatográfica.

Após a incorporação dos resultados obtidos anteriormente para fluxo e concentração de NaCl foi necessário determinar a capacidade trocadora do sistema desenvolvido. Esta variável testa um dos itens da Hipótese 1 (H1) do item 4.1.3. de que o sistema cromatográfico desenvolvido por Schroeder & Shaw (1968) possuía baixa resolução devido a uma sobrecarga de proteínas no sistema. Assim foram testadas quantidades de partida de 100 mg (3,33 mg.mL⁻¹), 150 mg (5,0 mg.mL⁻¹), 200 mg (6,6 mg.mL⁻¹), 250 mg (8,3 mg.mL⁻¹) e 300 mg (10,0 mg.mL⁻¹) em um volume de aplicação de 10 mL. Os resultados relativos à resolução cromatográfica entre as isoformas β- e α-tripsina obtidos da análise dos perfis cromatográficos estão apresentados na Tabela-6.

Como pode ser observado na tabela-6, a melhor resolução entre as isoformas β- e α-tripsina foi alcançada quando foram aplicadas quantidades de 65, 80 ou 100 mg de tripsina comercial bovina, pois a resolução e os perfis cromatográficos foram semelhantes para as três condições, com frações apresentando formas gaussianas simétricas (dados não mostrados). Pode se notar na tabela-6 que os testes realizados com 150 e 200 mg de tripsina comercial resultaram em resoluções comparativamente mais baixas àquelas obtidas para quantidades menores de proteínas. A análise comparativa dos cromatogramas (dados não mostrados) permitiu verificar que o tempo de retenção médio para a isoformas β- e α- tripsina diminui significativamente e que seus picos perdem a simetria tipicamente gaussiana para valores entre 150 e 200 mg de proteína de partida. Para valores acima de 250 mg a resolução entre as isoformas β- e α-tripsina diminui ainda mais e os picos perdem totalmente sua simetria tornando-se muito alargados (dados não mostrados).

Tabela 6: Efeito da quantidade de partida sobre a resolução cromatográfica. As condições experimentais foram: fase móvel constituída de tampão tris-HCl a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,69 a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, contendo CaCl_2 a $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, benzamidina a $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ e NaCl a $100,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ sobre a fase estacionária SE-Sephadex C50[®]. A resolução cromatográfica foi calculada a partir da equação-2. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e os resultados apresentados são valores de médias com mais ou menos um desvio padrão (DP).

Quantidade de partida (mg)	Resolução (β - α tripsina)	DP
65,0	1,27	0,01
80,0	1,28	0,01
100,0	1,28	0,02
150,0	1,16	0,02
200,0	1,03	0,01
250,0	0,86	0,02
300,0	0,62	0,01

Já que quantidades de partida de proteína entre 80 e 100 mg forneceram resoluções semelhantes no sistema cromatográfico decidiu-se por motivo de rendimento manter a quantidade de partida na quantidade de 100 mg de tripsina comercial bovina para todos os experimentos seguintes.

5.1.5. Influência do pH da fase móvel sobre a resolução cromatográfica.

Incorporados os resultados de fluxo, concentração salina e quantidade de partida de proteína, foi testada a influência do pH da fase móvel na resolução cromatográfica das isoformas de tripsina. A escolha de testar o valor de pH 7,1 a 4°C não foi aleatória, tendo vindo de uma observação no artigo de Schroeder & Shaw (1968), em que os autores afirmam que *“all pH adjustments were made at room temperature, and the values cited in this paper refer to such measurements regardless of the temperature of chromatography, which was often 2- 4 °C...”*. Assim todos os experimentos cromatográficos deste clássico artigo foram conduzidos a 2-4 °C como citado acima e o sistema cromatográfico desenvolvido pelos citados autores operou com uma fase móvel com tampão tris-HCl a 100 mmol.L⁻¹, pH 7,1 a 25°C.

Observando a afirmação citada acima, um erro de química analítica foi cometido por tais pesquisadores, pois o pH aumenta para 7,69 quando o sistema tamponante (fase móvel) é ajustado à temperatura ambiente para pH 7,1 a 25°C e levado a 4° C o pH aumenta para 7,69, pois:

$$\text{pH}^{4^{\circ}\text{C}} = \text{dpK} / \text{dt (tris)} \times \Delta T + \text{pH}^{25^{\circ}\text{C}} \therefore$$

$$\text{pH}^{4^{\circ}\text{C}} = 0,028 \quad \times(25-4) + 7,1 \therefore$$

$$\text{pH}^{4^{\circ}\text{C}} = 0,588 + 7,1 \therefore$$

$$\text{pH}^{4^{\circ}\text{C}} = 7,69$$

Deste modo o experimento realizado por Schroeder & Shaw (1968) foi conduzido a um pH 7,69 a 4°C e não a 7,1 a 4°C. Com esta nova informação foi aventada para otimizar a resolução cromatográfica:

- Como a tripsina tem um pI de 8,69 é de se esperar que se a proteína fosse submetida a um pH mais baixo do que usado por Schroeder & Shaw,

(1968) mais protonada ela estaria e assim sua interação com a fase estacionária (aniônica) seria mais intensa, deste modo aumentando a resolução cromatográfica e conseqüentemente seu tempo de retenção.

Para testar a hipótese acima foi necessário preparar uma solução tampão que atuaria como fase móvel a 4°C com um pH de 7,1. Assim foi feito seguinte cálculo:

$$\text{pH } 25^{\circ}\text{C} = 7,1 - 0,588 \text{ (acrécimo devido à variação de temperatura de } 25-4^{\circ}\text{C)}$$

$$\text{pH } 25^{\circ}\text{C} = 6,512 \therefore$$

Assim o quando o pH de 6,512 fosse levado à temperatura de 4°C:

$$\text{pH } 4^{\circ}\text{C} = \text{dpK} / \text{dt (tris)} \times \Delta T + \text{pH}25^{\circ}\text{C} \therefore$$

$$\text{pH } 4^{\circ}\text{C} = 0,028 \quad \times(25-4) + 7,1 \therefore$$

$$\text{pH } 4^{\circ}\text{C} = 0,588 + 6,512 \therefore$$

$$\text{pH } 4^{\circ}\text{C} = 7,1$$

Foram realizadas medidas de pH na solução cromatográfica a 4° após 4 horas de equilíbrio térmico para confirmar o valor calculado e esperado. Foram observados valores de pH oscilando entre 7,05 e 7,13. Confirmando assim a predição feita pelo uso do dpK_a/dt do tris-HCl.

Deste modo a hipótese da variação do pH foi testada e os resultados podem ser vistos na Tabela-7 e na Figura-19.

Tabela 7: Efeito do pH da fase móvel sobre a resolução cromatográfica de β - e α -tripsina. As condições experimentais foram as seguintes: fase móvel constituída de tampão tris-HCl a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,69 e 7,10 a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, contendo CaCl_2 a $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ e benzamidina a $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ e NaCl a $100,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ sobre a fase estacionária SE-Sephadex C50[®]. A resolução cromatográfica foi calculada a partir da equação-2. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e os resultados apresentados são valores de médias com mais ou menos um desvio padrão (DP).

pH 4°C	Resolução (β - α tripsina)	DP
7,69	1,28	0,08
7,10	1,60	0,05

Conforme pode ser observado na Tabela-7 a resolução cromatográfica para β - e α -tripsina foi melhor obtida quando o pH da fase móvel foi de 7,10 a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Este resultado de resolução de 1,60 significa que a isoforma β -tripsina está totalmente separada da sua isoforma α -tripsina, já que um valor superior a 1,50 tem significado analítico que dois analitos estão separados totalmente entre si (Harris, 2001). Este dado quantitativo poder ainda ser qualitativamente observado na Figura-19 onde a proteína β -tripsina esta isolada da sua isoforma α -tripsina por aproximadamente 43,0 mL de fase móvel e a isoforma α - tripsina apresenta uma resolução satisfatória para a isoforma ψ -tripsina.

È interessante salientar que na cromatografia realizada em pH 7,1 a 4°C as frações eluidas exibem uma forma gaussiana bem definida e com simetria elevada, mostrando com isto que o sistema não está sobrecarregado de proteínas, que não existe

arraste de proteínas durante o percurso da coluna e que a difusão longitudinal está minimizada. Outro fato importante notado com a variação do pH é que a separação entre as isoformas α - e ψ -tripsina tornou-se evidente e a quantidade de ψ -tripsina aumentou significativamente em relação aos outros testes anteriores. As proteínas purificadas apresentaram atividade semelhante aos testes anteriores e foram identificadas por sua atividade amidásica e massas moleculares.

Quanto ao tempo de retenção médio para as isoformas β - e α -tripsina, pode-se notar na Tabela-8 que houve um aumento significativo para ambas as isoformas quando o experimento foi conduzido a pH 7,1 a 4°C, porém aceitável operacionalmente, pois este efeito negativo é compensado pelo aumento da resolução cromatográfica quando o pH da fase móvel foi 7,1 a 4 °C.

Tabela 8: Comparação dos tempos de retenção das isoformas de β -, α e ψ -tripsina em diferentes condições de pH da fase móvel. T_R (tempo de retenção).

	pH 7,69 a 4°C	pH 7,10 a 4°C
$T_{R\beta}$ -tripsina (dias)	3,6 \pm 0,1	7,1 \pm 0,2
$T_{R\alpha}$ -tripsina (dias)	3,1 \pm 0,1	6,0 \pm 0,2
$T_{R\psi}$ -tripsina (dias)	2,7 \pm 0,1	5,2 \pm 0,2

Assim, conforme visto na Figura-19 e nas Tabelas 7 e 8 um abaixamento no pH da fase móvel ocasionou uma maior protonação das isoformas de tripsina fazendo com que estas tivessem uma adsorção mais forte à fase estacionária e aumentando assim a resolução entre as mesmas. Este ponto da pesquisa de otimização da metodologia de purificação das isoformas de tripsina foi de suma importância para a tese mostrando como um pequeno erro de química analítica e de cálculo de pH pode ocasionar uma

mudança tão significativa no perfil cromatográfico. Vale a pena enfatizar aqui que a predição de aumento de retenção e de resolução baseou-se em um modelo simples e confirmou-se.

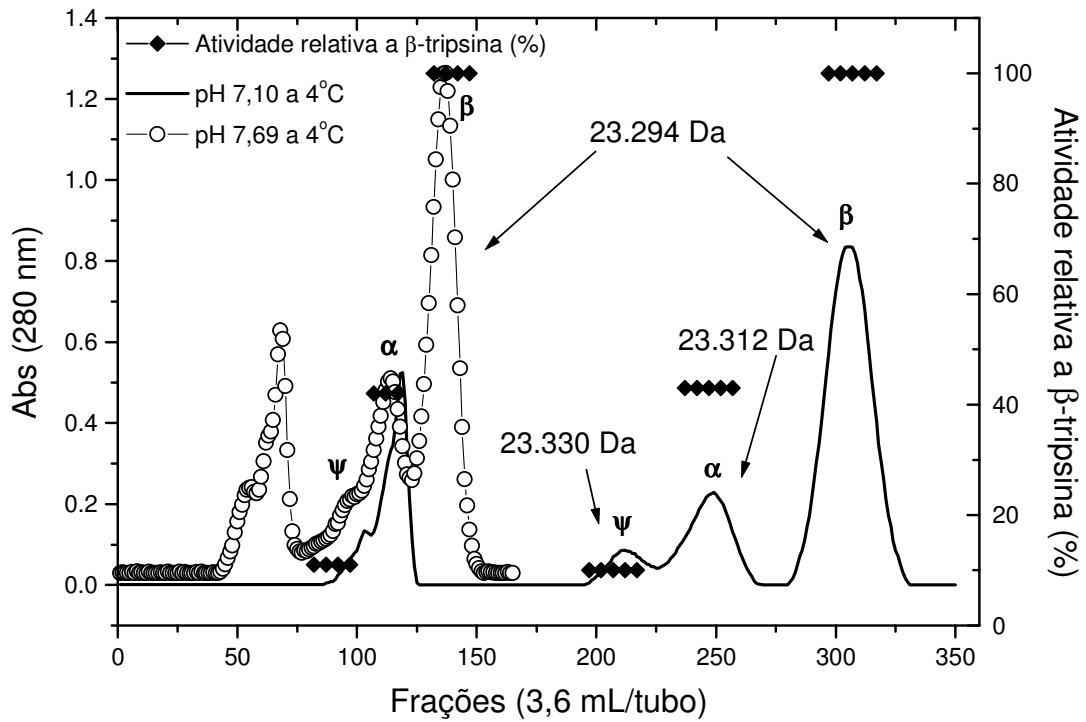


Figura 19: Efeito do pH da fase móvel sobre a resolução cromatográfica de β - e α -tripsina. As condições cromatográficas foram: fluxo de $120 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 100 mg de quantidade de partida de proteína, fase móvel constituída de tampão tris-HCl a $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,69 e 7,10 a 4°C , contendo CaCl_2 a $20,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, benzamidina a $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e NaCl a $100,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sobre a fase estacionária SE-Sephadex C50[®]. A atividade demonstrada na figura (-♦-) é a medida da atividade amidásica relativa à isoforma β -tripsina. Os dados de massa molecular foram obtidos por meio de ESI-MS.

5.1.6. Teste de precisão do sistema cromatográfico.

A fim de se testar a reprodutibilidade do processo cromatográfico otimizado nas condições anteriormente descritas (tampão tris-HCl a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,10 a 4°C , contendo NaCl a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, CaCl_2 a $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ e benzamidina a $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$; 100,0 mg de quantidade de partida de tripsina comercial bovina; fluxo de $120 \mu\text{L.min}^{-1}$), dez corridas consecutivas sem desempacotamento nem regeneração do sistema foram conduzidas e avaliadas quanto à resolução entre as isoformas β - e α -tripsina. Os resultados destes testes estão dispostos na Tabela-9.

Tabela 9: Efeito da reprodutibilidade sobre a resolução cromatográfica de β - e α -tripsina. As condições experimentais foram as seguintes: fase móvel constituída de tampão tris-HCl a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,10 a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, contendo CaCl_2 a $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, benzamidina a $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ NaCl a $100,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ sobre a fase estacionária SE-Sephadex C50[®]. A resolução cromatográfica foi calculada a partir da equação-2. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e os resultados apresentados são valores de médias com mais ou menos um desvio padrão.

Corrida	Resolução	DP
(número)	(β - α tripsina)	
1	1,63	0,02
2	1,60	0,01
3	1,59	0,02
4	1,59	0,03
5	1,56	0,02
6	1,50	0,03
7	1,42	0,03
8	1,32	0,04
9	1,12	0,03
10	1,03	0,02

Como pode ser observado na Tabela-9 o sistema cromatográfico tem seu funcionamento otimizado para operar consecutivamente até seis vezes sem processo de desempacotamento e regeneração do sistema. Este resultado é significativo e útil para o controle de qualidade de utilização do sistema cromatográfico, pois o desempacotamento e regeneração de uma coluna cromatográfica são processos que demandam muito tempo e trabalho. A determinação da precisão cromatográfica do sistema demonstrou que ele pode ser considerado robusto e preciso dentro dos parâmetros delimitados para este projeto.

5.1.7 Atividade amidásica da isoforma α -tripsina em função do pH e determinação da porcentagem dos sítios ativos nas enzimas purificadas.

A fim de verificar se o processo cromatográfico havia influenciado as propriedades enzimáticas das proteínas isoladas foi feita uma análise da atividade enzimática em função do pH para verificação do perfil enzimático bem estabelecido para tripsinas e para isoforma α -tripsina. Para conduzir esta avaliação usou-se a isoforma α -tripsina como moléculas teste, porém poderia ser usado também a isoforma β -tripsina se fosse necessário. O resultado deste teste pode ser visto na figura-20 que mostra um perfil típico de atividade em função do pH para tripsinas e para própria isoforma α -tripsina. As tripsinas geralmente em soluções ácidas (pH 2,0 – 4,5) apresentam uma atividade residual baixa e pouco significativa, já na faixa de pH de 5,0-8,0 sua atividade aumenta significativamente, sendo que o valor máximo alcançado para atividade amidásica pode ser visto no pH 8,0 que é o valor mais próximo do pH fisiológico da enzima no animal de origem. Valores de pH acima de 8,5 dão origem a processos como agregação protéica, deamidação e outros processos irreversíveis que

fazem com que a atividade enzimática diminua. Este perfil está de acordo com o resultado esperado para a atividade amidásica da tripsina comercial bovina, mostrando assim que a metodologia de purificação não ocasionou nenhuma mudança irreversível nas proteínas em questão.

Este perfil se encaixa perfeitamente com o perfil de atividade amidásica da tripsina comercial bovina mostrando assim que a metodologia de purificação não ocasionou nenhuma mudança irreversível nas proteínas em questão.

A Figura-21 mostra o perfil cromatográfico final deconvulvido pelo programa de análise *Origin[®] 5.0 Scientific* mostrando as frações realmente utilizadas (delimitadas por retângulos tracejados) de cada isoforma para os ensaios físico-químicos. Pode ser notar que a isoforma β -tripsina é completamente aproveitada, e para as isoformas α - e ψ -tripsinas são usadas apenas às frações puras, selecionadas dentro do perfil deconvulvido (pontilhado) inscrito no retângulo tracejado.

Ainda se pode notar na Figura-21 que as proteínas purificadas apresentam-se altamente ativas, pois todas as amostras que passaram pelo ensaio de titulação de centro ativo apresentaram valores superiores a 95%. A isoforma ψ -tripsina não teve seu sítio ativo determinado visto que possui baixa afinidade por substratos carregados positivamente (Smith & Shaw, 1969) e os resultados obtidos usando NPGB não foram precisos. Estes valores da porcentagem de sítios ativos reportam mais uma vez ao que foi dito acima sobre a metodologia de purificação não interferir de modo irreversível na atividade ou na estrutura das proteínas purificadas.

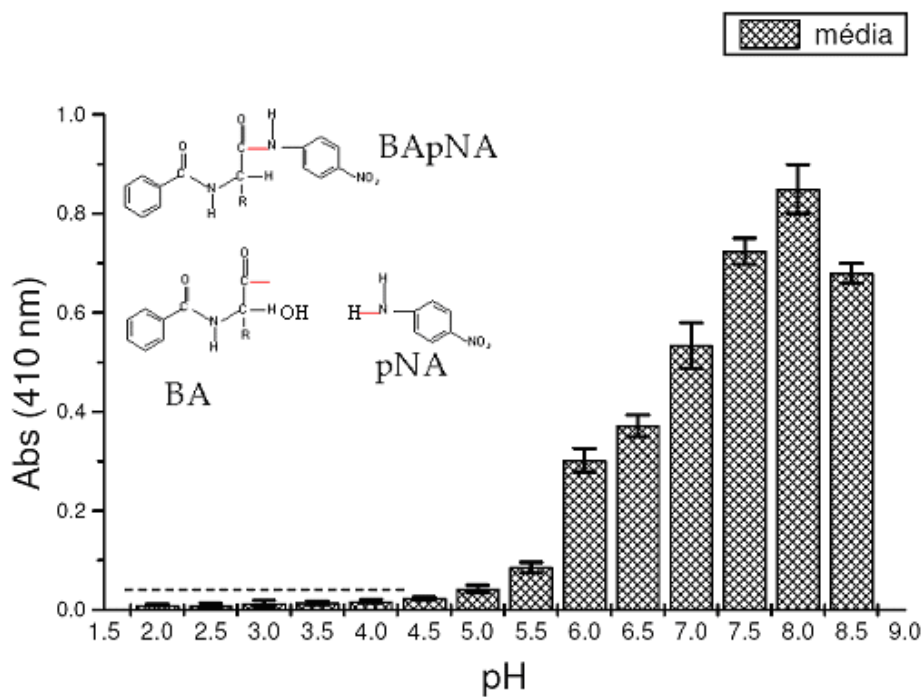


Figura 20: Atividade amidásica da isoforma α -tripsina em função do pH usando como substrato o BApNA. O inserto mostra como se processa a clivagem do BApNA pela enzima gerando o cromóforo *p*-Nitro anilina detectado a 410 nm. BApNA (para-nitro anilida de N α -benzoil-arginina); BA (N α -Benzoil Arginina); pNA (para-nitro anilina), a ligação em cor vermelho no BApNA é o ponto onde a enzima faz a hidrólise da molécula. O tempo reacional foi de dez minutos a 37°C. Os valores são expressos como média (n=3) e mais ou menos um desvio padrão.

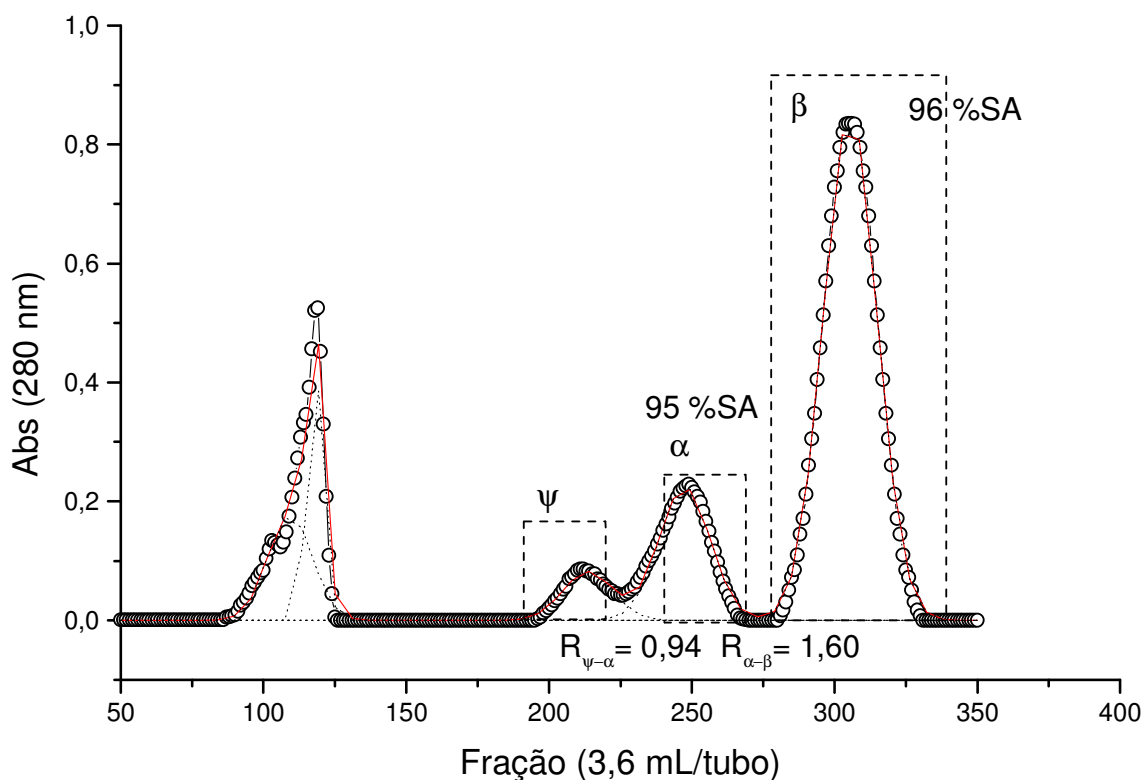


Figura 21: Frações utilizadas dos picos cromatográficos de β -, α -, e ψ -tripsina para os estudos físico-químicos. As condições experimentais foram: fase móvel constituída de tampão tris-HCl a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,10 a 4°C , contendo CaCl_2 a $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, benzamidina a $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ e NaCl a $100,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de sobre a fase estacionária SE-Sephadex C50[®]. A resolução cromatográfica foi calculada a partir da equação-2. Os experimentos de determinação de sítio ativos foram conduzidos em triplicata e os resultados apresentados são valores de médias com mais ou menos um desvio padrão. % SA – porcentagem de sítios ativos. R-resolução entre as isoformas.

5.1.8 Teste do sistema cromatográfico, determinação da quantidade relativa de isoformas de tripsina e atividade de outras amostras comerciais.

O teste do sistema cromatográfico otimizado usando outras amostras comerciais de tripsina mostrou que o mesmo foi eficiente para todos os lotes testados neste estudo, pois a resolução cromatográfica entre as principais isoformas de tripsina (β - e α -tripsina) apresentou valores acima de 1,5 (Tabela-10), o que analiticamente, significa que houve separação total entre os dois analitos em questão (Harris, 2001). Ainda é possível notar na tabela-10 que algumas marcas comerciais possuem conteúdo baixo ou mesmo não possuem a isoforma ψ -tripsina. Este fato deve-se ao procedimento de extração do material primário, pois algumas proteínas são purificadas por precipitação, outras por precipitação seguida de diálise. Alguns destes processos são feitos com a presença de inibidores reversíveis e outros não, possibilitando assim tempo suficiente para formação de mais isoformas por meio de autólise.

Um resultado importante é o relativo à quantidade das outras isoformas γ -, Z -, Δ -tripsina, que são isoformas inativas ou que não possuem atividade amidásica. Estas outras isoformas contribuem, em todos os lotes analisados na faixa de 20 a 35 % da quantidade relativa de proteína total. Assim a atividade amidásica da tripsina comercial é quase completamente dada pelas isoformas β e α -tripsina.

Analisando-se a Tabela-10 pode-se observar que quantidade relativa de isoformas de tripsina mostrou ser diferenciada dependendo da marca ou lote analisado, sendo possível escolher, dependendo do interesse do estudo, qual marca ou lote fornece maior quantidade relativa da isoforma de interesse. Apesar desta variação encontrada a isoforma β -tripsina sempre está presente em maior quantidade e nunca menor que 50% de abundância relativa nas marcas testadas.

Dentre as mostras comerciais analisadas algumas mostraram atividades amidásicas bastante elevadas, (e.g. Tipo III da Sigma) e outras mostraram atividades amidásicas moderadas (e.g. Tipo I da Sigma, Boeringer e Seravac) e uma apresentou uma atividade considerada baixa (Wortington) para a quantidade de proteína ensaiada.

Tabela 10: Comparação das quantidades das isoformas de tripsina, atividades amidásicas das proteínas brutas e resolução cromatográfica entre as isoformas β - e α -tripsina de marcas diferentes de tripsina comercial bovina usando o sistema cromatográfico otimizado.

	Sigma	Sigma	Sigma	Boeringer	Seravac	Worthington
	Tipo III	Tipo III	Tipo I	Lote 1247	Lote 1247	Lote
	Lote 8253	Lote 8003	Lote 8003			LS003667
^a % de β -tripsina	60,0	55,0	50,0	55,0	50,0	52,0
^a % de α -tripsina	15,0	10,0	6,0	10,0	10,0	20,0
^a % de ψ -tripsina	5,0	5,0	4,0	5,0	-	-
^a % outras isoformas	20,0	30,0	40,0	18,0	30,0	28,0
^b Atividade específica (A/mg ⁻¹)	12,8	11,0	9,0	8,0	9,0	7,6
^c Massa molecular β -tripsina (Da)	23294,49	23294,78	23295,05	23293,58	23292,35	23294,35
^c Massa molecular α -tripsina (Da)	23312,07	23312,50	23313,25	23315,12	23310,28	23312,50
^c Massa molecular ψ -tripsina (Da)	23329,87	23330,12	23331,65	23334,90	-	-
^d R_{β} e α tripsina	1,60	1,58	1,55	1,56	1,58	1,58

^aDados obtidos por cromatografia de troca iônica catiônica em SE-SEPHADEX C50[®] conforme metodologia de Santos e cols., (2008).

^b Atividade amidásica específica foi obtida conforme metodologia descrita no item 4.1.8.1. do presente trabalho de proteína comercial antes de ser submetida a método de purificação dividido pela concentração de proteínas usada em cada amostra..

^cDados obtidos por espectrometria de massas do tipo ESI-MS conforme o item 4.1.7. do presente trabalho.

^d R_{β} e α tripsina: resolução cromatográfica entre as isoformas β - e α - tripsina no sistema desenvolvido nesta tese.

5.1.9. Aumento na produção da quantidade de isoformas de tripsina

Para obtenção de maiores quantidades das isoformas de tripsina puras para os estudos físico-químicos foi montada uma coluna com capacidade trocadora maior. Cálculos como os que foram feitos no item 4.2.3. para estimar parâmetros como quantidade de proteína comercial que deveria ser aplicada na coluna e o fluxo na qual operaria foram feitos e os resultados teóricos encontrados foram os seguintes para a nova coluna montada com dimensões de 130,0 cm x 7,4 cm D.i.:

- Quantidade de partida de tripsina comercial bovina: 1,13 g;
- Fluxo cromatográfico: 1,35 mL.min⁻¹.

Os resultados teóricos acima calculados, porém, não foram possíveis de ser aplicados no sistema cromatográfico de bancada, pois excediam os valores das propriedades físicas da fase estacionária, ocasionando empacotamento da fase estacionária durante o intervalo de purificação. Alguns testes com fluxos entre 0,1 a 0,5 mL.min⁻¹ e com quantidades totais de proteína variando de 0,5 g a 1,2 g de foram conduzidos e os resultados mais significativos são mostrados abaixo. Para todos os

resultados descritos abaixo as frações protéicas somente começaram ser eluídas após passar, em média, 2700 mL de fase móvel pela coluna cromatográfica.

Conforme pode ser visto na Figura-22, quando foram aplicados 1,2 g de tripsina comercial, três frações bem definidas foram obtidas, dentre estas duas foram identificadas pela massa molecular e atividade amidásica como a isoforma β -tripsina e uma mistura das isoformas α - e ψ - tripsina. Estas frações principais apresentaram uma baixa resolução entre elas (Tabela-11), principalmente entre α - e ψ -tripsina. Uma terceira fração (com tempo de retenção menor que as anteriores) pode ser vista contribuindo com alta porcentagem relativa das proteínas separadas no cromatograma, sendo provavelmente constituída das isoformas gama, zeta e delta-tripsina. Essas ficam separadas por um pequeno volume de solução da fração que contém as isoformas α - e ψ - tripsina. Uma observação interessante é que as frações resultantes apresentam gaussianas largas e com baixa simetria sugerindo assim que a coluna poderia estar sobre carregada com proteínas.

A Figura-23 demonstra a tentativa de aumentar a resolução cromatográfica diminuindo-se a quantidade de proteína aplicada na coluna de 1,2 g para 1,0 g e diminuindo-se o fluxo cromatográfico para $300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Esta mudança nos parâmetros cromatográficos não ocasionam variação na resolução entre as isoformas de β - e α - tripsina (Tabela-11), porém as gaussianas das frações tornam-se menos largas, mais simétricas e a isoforma ψ -tripsina pode ser identificada claramente.

As Figuras 24 e 25 demonstram a tentativa de melhorar a resolução cromatográfica variando-se a quantidade de partida de tripsina comercial utilizada e o fluxo cromatográfico. Pode se notar que a resolução cromatográfica entre as isoformas β - e α - tripsina muda significativamente e a resolução da isoforma ψ - tripsina aumenta com a diminuição da quantidade de proteína bruta aplicada.

Na Figura-26 pode-se observar o melhor resultado encontrado para os testes de padronização do sistema cromatográfico em escala maior. Este sistema foi padronizado para operar a um fluxo cromatográfico de $350 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ com uma quantidade de partida de 0,5 g de tripsina comercial bovina. As isoformas de tripsina alcançaram resoluções satisfatórias para este projeto apresentando elevadas atividades amidásicas e porcentagens de sítios ativos (Fig.27), mostrando novamente que o sistema cromatográfico desenvolvido não provoca alterações irreversíveis nas proteínas que estão sendo separadas. As proteínas destinadas aos testes físico-químicos foram selecionadas e são mostradas na Figura-27 onde estão delimitadas por um retângulo tracejado.

Tabela 11: Comparação dos parâmetros cromatográficos para os testes de aumento de escala para a obtenção das isoformas de tripsina.

	t_R β -tripsina	t_R α -tripsina	t_R ψ -tripsina	Fluxo	Quantidade	$R_{\beta\alpha}$ α -tripsina
	(dias)	(dias)	(dias)	cromatográfico	de partida	
				($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)	(mg)	
Teste 1	10,5	8,1	8,1	500	1200	1,01
Teste 2	18,5	16,3	14,5	300	1000	1,01
Teste 3	10,65	9,35	8,45	500	1000	1,20
Teste 4	12,05	11,15	9,15	400	800	1,36
Teste 5	16,0	12,7	11,0	350	500	1,45

Assim a purificação de proteínas em escala maior foi possível no sistema desenvolvido podendo fornecer grandes quantidades de isoformas de tripsina puras em um tempo médio de 12 a 16 dias. Na Figura-27 ainda se pode notar que as proteínas

não sofreram qualquer tipo de modificação irreversível durante o processo cromatográfico, pois apresentaram valores característicos para a atividade amidásica identificada em cada isoforma além de valores elevados (e.g. superiores a 95%) de percentagem de sítios ativos.

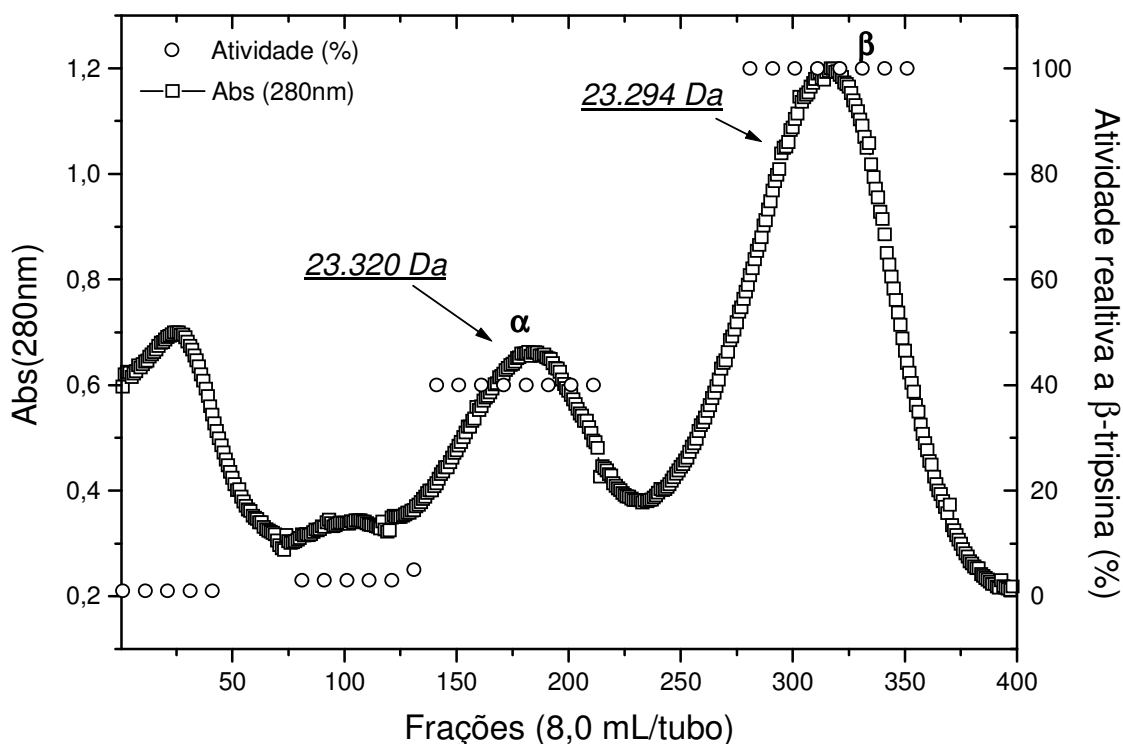


Figura 22: Novo sistema cromatográfico para separação das isoformas de tripsina operando nas seguintes condições: coluna com 130 cm x 7,4 cm Di, fluxo de 500 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 1,2 g de quantidade de partida, fase móvel constituída de tampão tris-HCl a 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,10 a 4 °C, CaCl_2 a 20,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, benzamidina a 1,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e NaCl a 100,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sobre a fase estacionária SE-Sephadex C50[®]. A atividade demonstrada na figura (-○-) é a medida da atividade amidásica relativa à isoforma β -tripsina. Os dados de massa molecular foram obtidos por meio de ESI-MS.

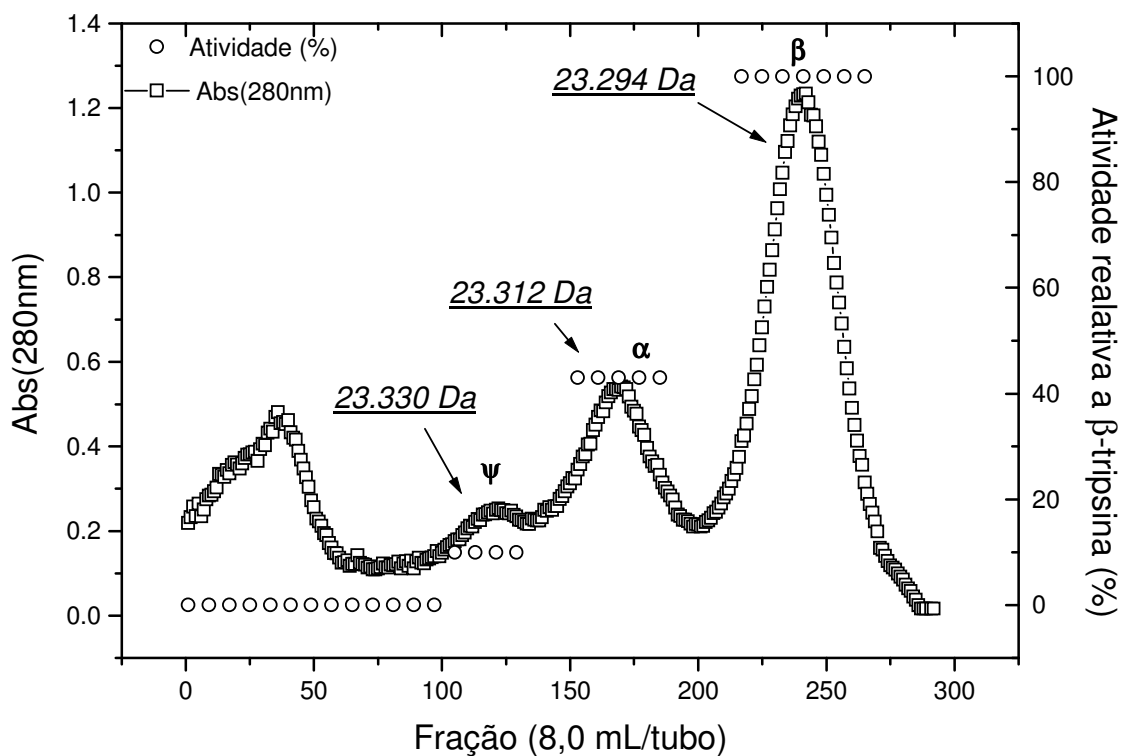


Figura 23: Novo sistema cromatográfico para separação das isoformas de tripsina operando nas seguintes condições: coluna com 130 cm x 7,4 cm Di fluxo, $300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 1,0 g de quantidade de proteína, fase móvel constituída de tampão tris-HCl a $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,10 a 4°C , contendo CaCl_2 a $20,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, benzamidina a $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e NaCl a $100,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sobre a fase estacionária SE-Sephadex C50[®]. A atividade demonstrada na figura (-o-) é a medida da atividade amidásica relativa à isoforma β -tripsina. Os dados de massa molecular foram obtidos por meio de ESI-MS.

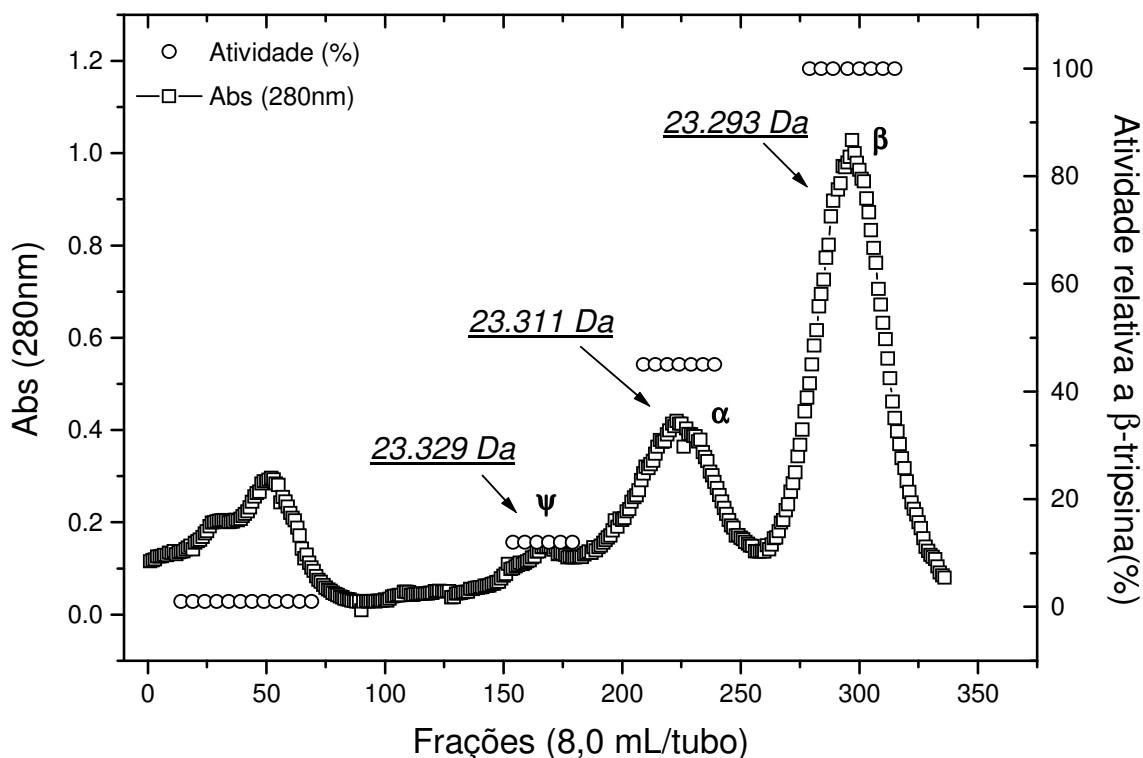


Figura 24: Novo sistema cromatográfico para separação das isoformas de tripsina operando nas seguintes condições: coluna com 130 cm x 7,4 cm Di, fluxo, $500 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 1,0 g de quantidade de partida, fase móvel constituída de tampão tris-HCl a $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,10 a 4°C , CaCl_2 a $20,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, benzamidina a $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e NaCl a $100,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sobre a fase estacionária SE-Sephadex C50[®]. A atividade demonstrada na figura (-o-) é a medida da atividade amidásica relativa à isoforma β-tripsina. Os dados de massa molecular foram obtidos por meio de ESI-MS.

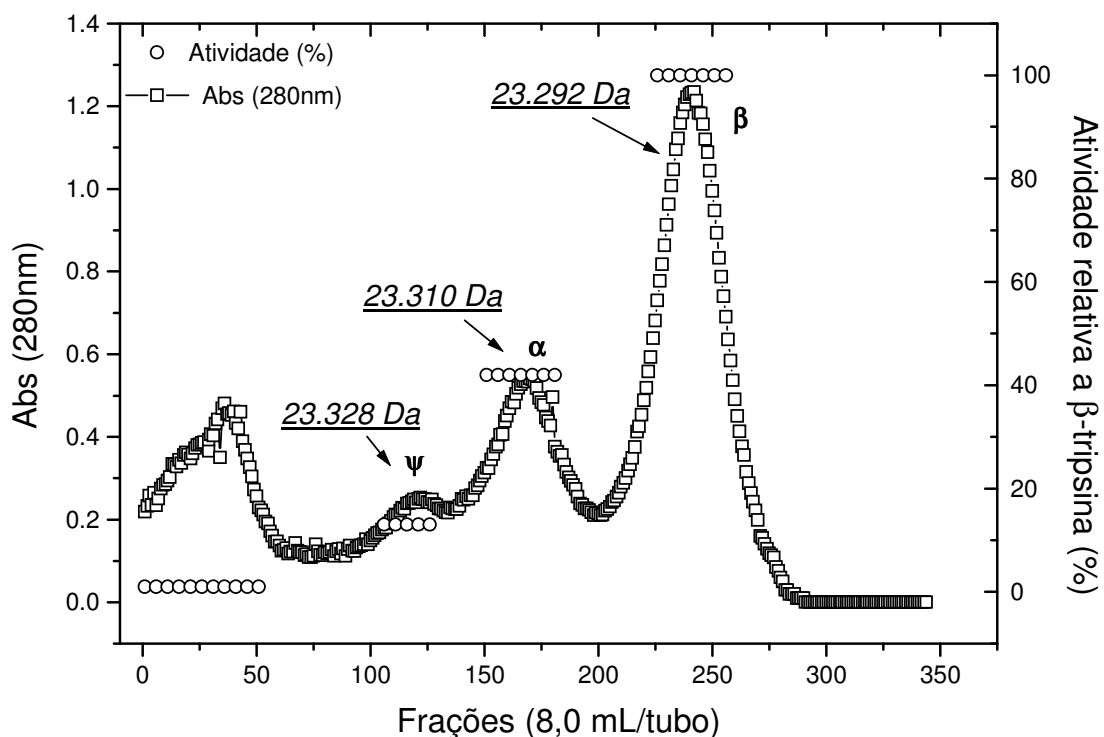


Figura 25: Novo sistema cromatográfico para separação das isoformas de tripsina, operando nas seguintes condições: coluna com 130 cm x 7,4 cm Di, fluxo, $400 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 0,8 g de quantidade de partida, fase móvel constituída de tampão tris-HCl a $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,10 a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, CaCl_2 a $20,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, benzamidina a $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de benzamidina e NaCl a $100,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sobre a fase estacionária SE-Sephadex C50[®]. A atividade demonstrada na figura (-○-) é a medida da atividade amidásica relativa à isoforma β-tripsina. Os dados de massa molecular foram obtidos por meio de ESI-MS.

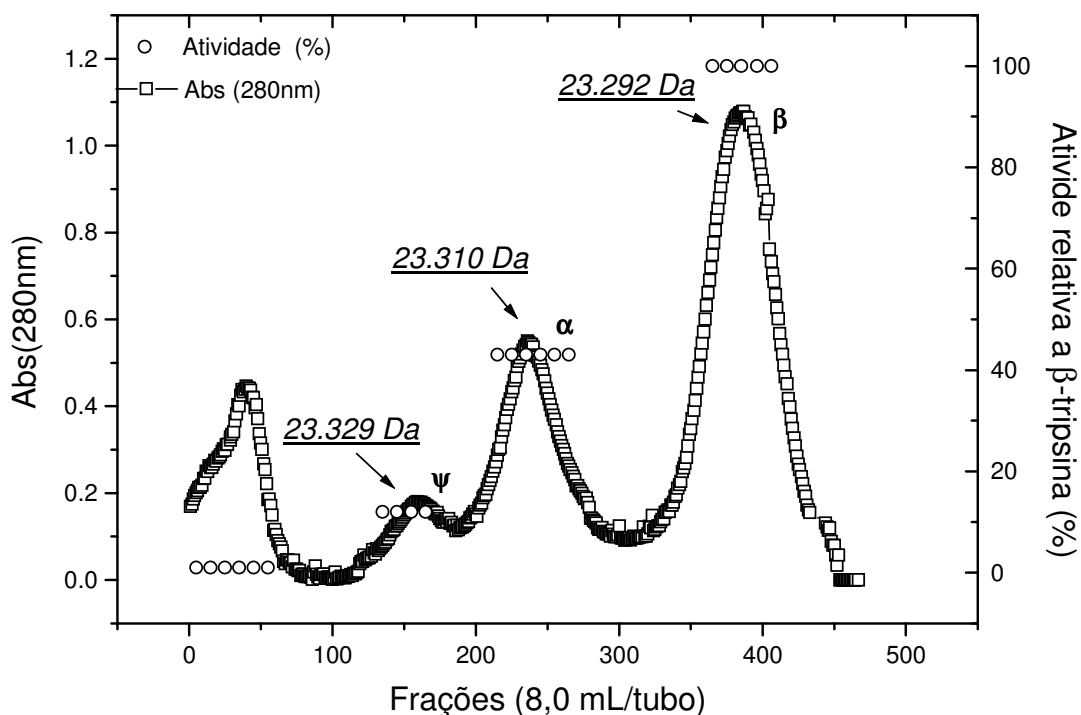


Figura 26: Novo sistema cromatográfico para separação das isoformas de tripsina operando nas seguintes condições: coluna com 130 cm x 7,4 cm Di, fluxo, $350 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 0,5 g de quantidade de partida, fase móvel constituída de tampão tris-HCl a $0,1 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,10 a 4°C , contendo CaCl_2 a $20,0 \text{ mmolL}^{-1}$, benzamidina a $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ e NaCl a $100,0 \text{ mmolL}^{-1}$ sobre a fase estacionária SE-Sephadex C50[®]. A Atividade demonstrada na figura (-○-) é a medida da atividade amidásica relativa à isoforma β-tripsina. Os dados de massa molecular foram obtidos por meio de ESI-MS.

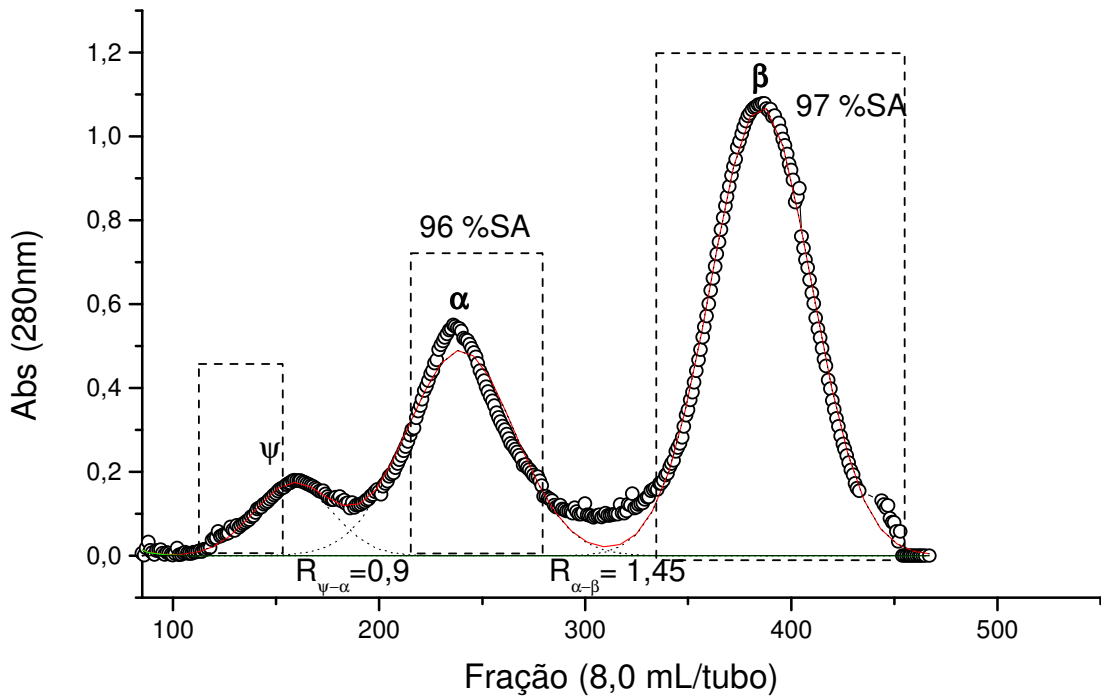


Figura 27: Frações utilizadas associadas aos picos cromatográficos de β -, α - e ψ -tripsina para ensaios físico-químicos. Os retângulos tracejados delimitam a fração selecionada dentro de cada pico para os ensaios bioquímicos e termodinâmicos. As condições experimentais foram as seguintes: quantidade de proteínas comercial aplicada de 0,5g, fase móvel constituída de tampão tris-HCl a 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,10 a 4 °C, CaCl₂ a 20,0 mmol.L⁻¹, benzamidina a 1,0 mmol.L⁻¹ e NaCl a 100,0 mmol.L⁻¹ sobre a fase estacionária SE-Sephadex C50[®]. %SA – porcentagem de sítios ativos, R-resolução entre as isoformas. A linha contínua vermelha é o resultado do ajuste matemático Gaussiano para obtenção das curvas deconvuluidas que são exemplificadas como linhas pontilhadas de cor preta.

Deste modo, foi otimizado um sistema cromatográfico o qual pode fornecer em um tempo médio de 16 dias uma grande quantidade de isoformas de tripsina puras para ensaios bioquímicos e termodinâmicos, o que permitiu serem feitos testes pelo menos em triplicata pra cada ponto experimental para os ensaios descritos nas seções seguintes.

5.1.10. Estimativa do “shelf-life” e meia vida da α -tripsina e de tempo real da perda da atividade amidásica em função do tempo de armazenamento.

A determinação do “shelf-life” (tempo de prateleira ou de queda de 5% da atividade enzimática) e da meia vida da α -tripsina, calculada pelo programa Sigma Plot[®] (macro *pharmacology*) a partir dos dados de atividade enzimática foram obtidos valores de $t_{95\%}$ de 292 ± 15 dias (9,7 meses) (Fig.28) e um $t_{50\%}$ de 2662 ± 15 dias (aproximadamente 7,3 anos) (Fig.29) para a proteína liofilizada e armazenada sob pressão de nitrogênio e acondicionada a uma temperatura de 4°C.

A fim de validar a estimativa feita pelo programa de análise do Sigma Plot[®] as medidas de perda de atividade foram sendo feitas até se completar um ano de armazenamento. O resultado deste teste pode ser visto na Figura-30, onde nota-se que o tempo de queda de 5% da atividade amidásica é aproximadamente de 270 dias. Como pode ser visto, tanto na estimativa quanto na medida real de queda de atividade (Fig. 29 e 30), ambos resultaram em valores semelhantes com um pequeno desvio de 22 dias, ou seja, um erro dentro do esperado, próximo do erro desvio padrão da medida que era conduzida a cada 15 dias. Assim o uso do programa foi validado para sistemas que tem seu decaimento seguindo uma cinética de primeira ordem ou pseudo- primeira ordem (Bhardwaj e cols., 2005).

Análise de Shelf Life

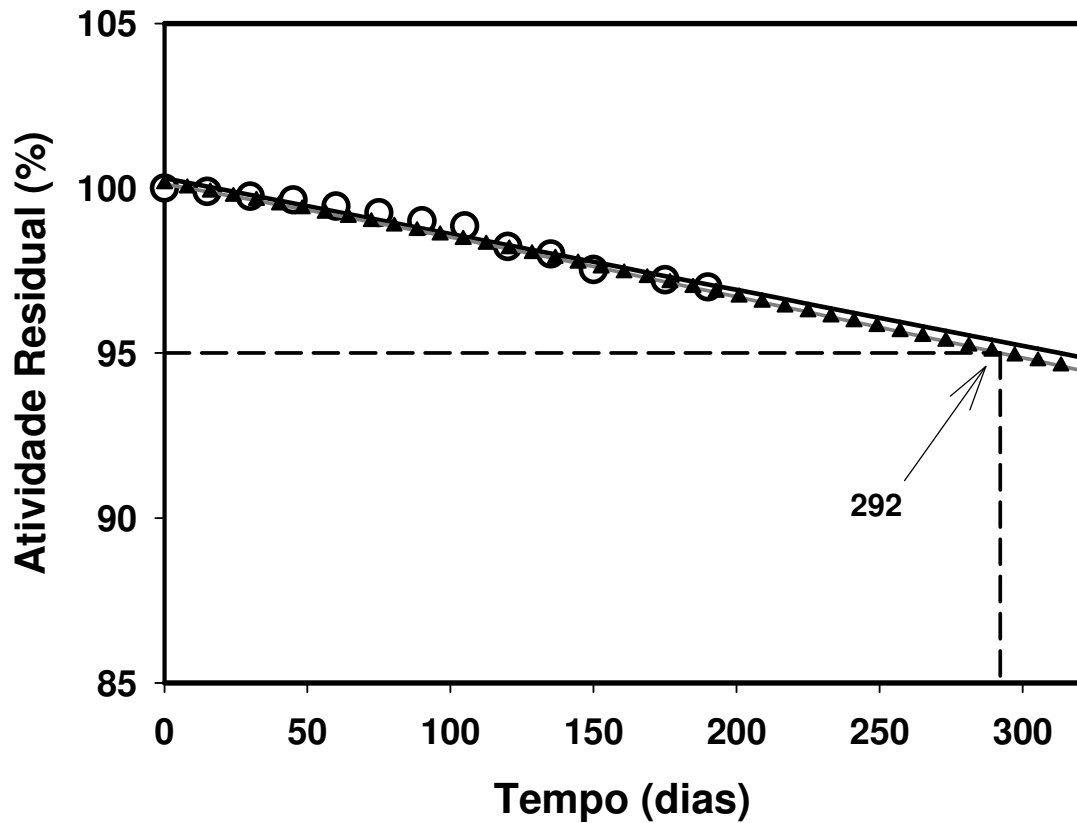


Figura 28: Estimativa do “*Shelf-life*” da atividade amidásica residual da isoforma α -tripsina liofilizada e armazenada sob pressão de nitrogênio e acondicionada a uma temperatura de 4°C. Foram realizadas medidas em triplicatas no intervalo de 15 dias durante sete meses. A atividade enzimática (○) tem uma regressão linear superimosta. A linha com 95% de confiança é mostrada (▲) e o $t_{95\%}$ (292 dias) é mostrado no intercepto da linha tracejada (-) com a linha (▲).

Análise de Meia Vida

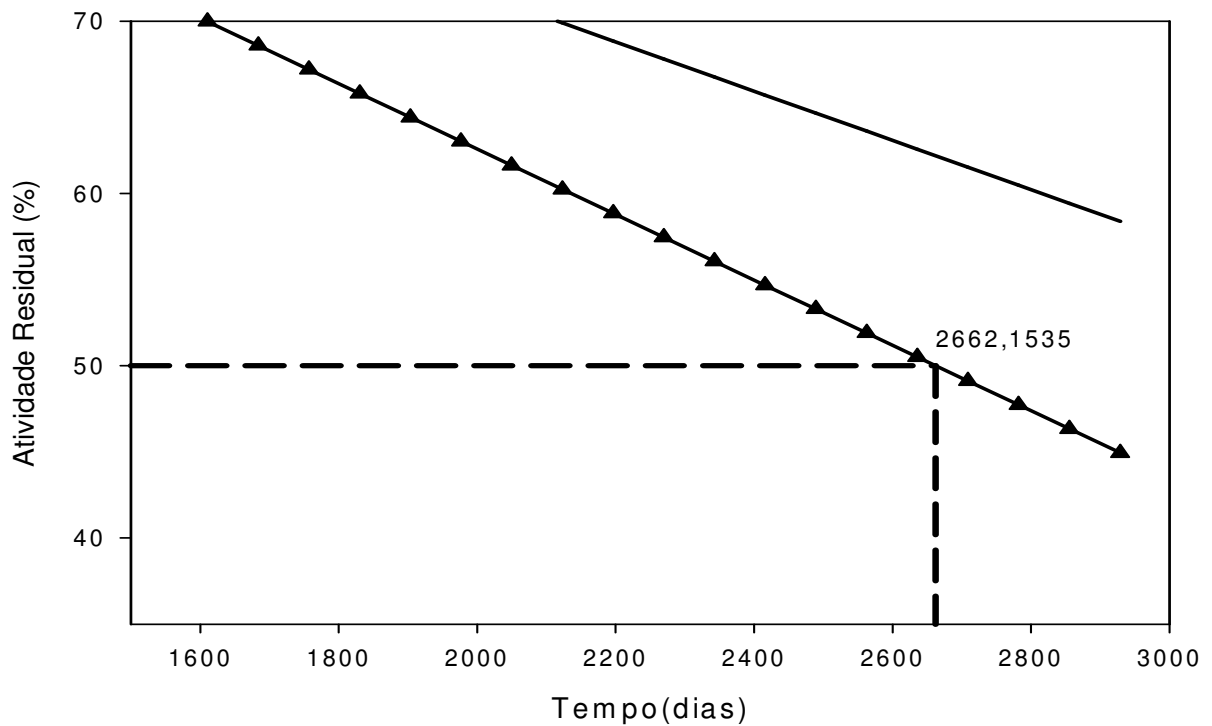


Figura 29: Estimativa do “*half-life*” ou *meia vida* da atividade amidásica residual da isoforma α -tripsina liofilizada armazenada sob pressão de nitrogênio e acondicionada a 4°C. Foram realizadas medidas em triplicata no intervalo de 15 dias durante 7 meses. A atividade enzimática (○) tem uma regressão linear superimposta. A linha com 95% de confiança mostrada (▲) e o $t_{50\%}$ (2262 dias) é mostrada no intercepto da linha tracejada (-) com a linha (▲).

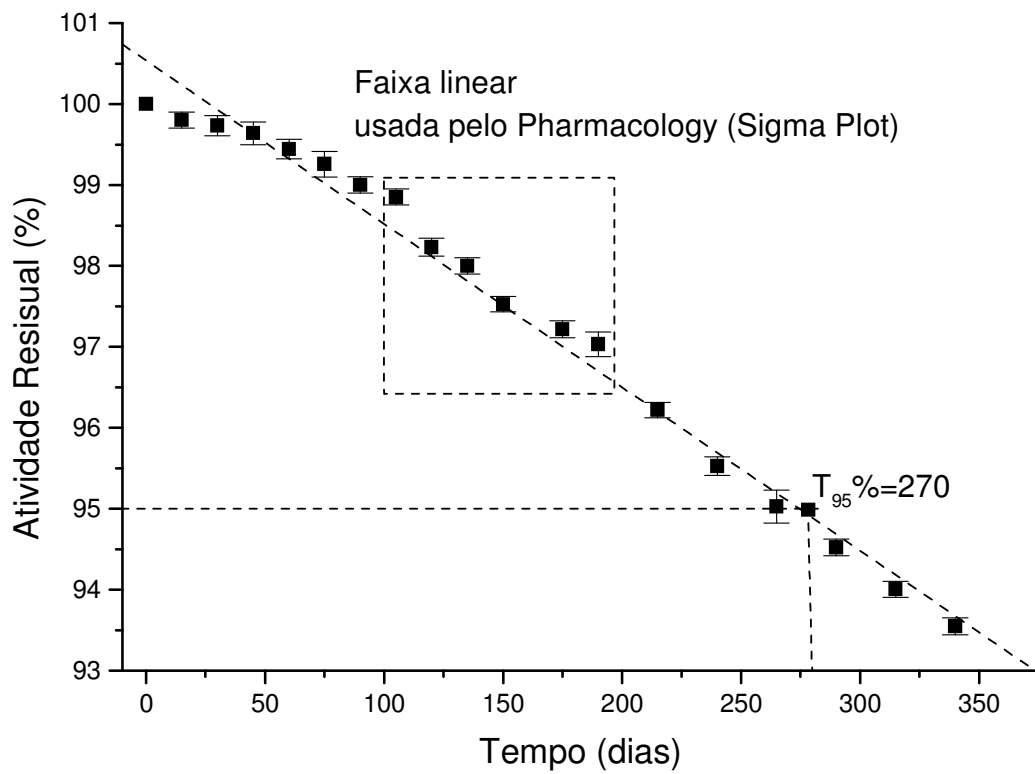


Figura 30: Decréscimo real da atividade amidásica da isoforma α -tripsina de 100% para 95%. As medidas foram feitas a cada 15 dias em um período de tempo de 340 dias. Os pontos delimitados pela caixa pontilhada são os pontos que foram usados para estimar o *Shelf-life* da enzima no programa Sigma Plot[®]. Os resultados são apresentados como médias de $n=3$ e mais ou menos um desvio padrão..

A partir destes resultados foi possível estabelecer um controle de qualidade para a isoforma α -tripsina onde as amostras para estudos físico-químicos foram usadas apenas com tempo de armazenamento inferior a 9,7 meses. Deste modo e com alguns outros resultados que serão descritos abaixo, criou-se um controle de qualidade para as enzimas purificadas, podendo monitorar-se tanto a perda de atividade como a degradação química.

5.1.11. Determinação da porcentagem de formação de ψ -tripsina inativa ($t_{95\%}$) em função do tempo por calorimetria diferencial de varredura e medida da atividade esterásica.

A fim de avaliar qual a porcentagem de ψ -tripsina estaria na condição nativa para a realização dos experimentos foram feitas medidas no calorímetro diferencial de varredura (DSC) para a avaliação deste conteúdo a partir do momento do armazenamento (proteína liofilizada e mantida a 4° C). Esta medida baseia-se no conceito de que a quantidade de calor absorvido ($\Delta H_{cal} t$) durante uma transição térmica de uma amostra no tempo t é indicativa da quantidade de proteína na forma nativa naquele momento. Após um tempo $t+1$ a quantidade relativa de proteína nativa vai ser a razão $\Delta H_{cal} t+1 / \Delta H_{cal} t$. Na Figura-31 pode-se notar que as medidas feitas no DSC a cada trinta dias mostram curvas endotérmicas com perfis semelhantes, com a mesma capacidade calorífica e T_m , porém diferem em seu ΔH_{cal} , que se tornam menores à medida que o tempo de armazenamento aumenta. Como pode ser visto na Figura-32, a quantidade de proteínas inativas em função do tempo possui uma relação aproximadamente linear e inversa com o ΔH_{cal} . A perda de atividade da enzima pode ser relacionada a fatores como agregação/ precipitação ou desnaturações irreversíveis que

podem ocasionar tais perdas de atividade, ou seja, diminuem o número de moléculas nativas e ativas. Pode-se notar na Figura-32 que o tempo necessário para que a isoforma ψ -tripsina tenha seu ΔH_{cal} diminuído de 5% é de aproximadamente 90 dias. Este valor (*shelf-life*) é muito menor quando comparado ao da isoforma α -tripsina que apresentou estabilidade cinética de 292 dias. Este dado sugere que a isoforma ψ -tripsina possui uma menor estabilidade cinética quanto ao tempo de armazenamento do que a isoforma α -tripsina nas condições estudadas, mostrando-se mais instável frente às condições de armazenamento.

A fim de validar o ensaio feito por calorimetria diferencial de varredura para determinação de *shelf-life* usou-se a metodologia de medir a atividade esterásica conhecida da enzima e relacionar seu decaimento com os dados calorimétricos (tabela-12). Nota-se na tabela-12 que os dados obtidos por DSC foram validados pela metodologia clássica de atividade esterásica dentro do erro experimental associado a cada metodologia.

O uso do DSC ainda fornece outras variáveis adicionais que podem auxiliar no desvendamento dos estados macromoleculares pela qual as moléculas passam durante o período de armazenamento. A partir destes dados todos os ensaios em que se usou a isoforma ψ -tripsina, esta foi usada somente até 90 dias de armazenamento nas condições pré-definidas.

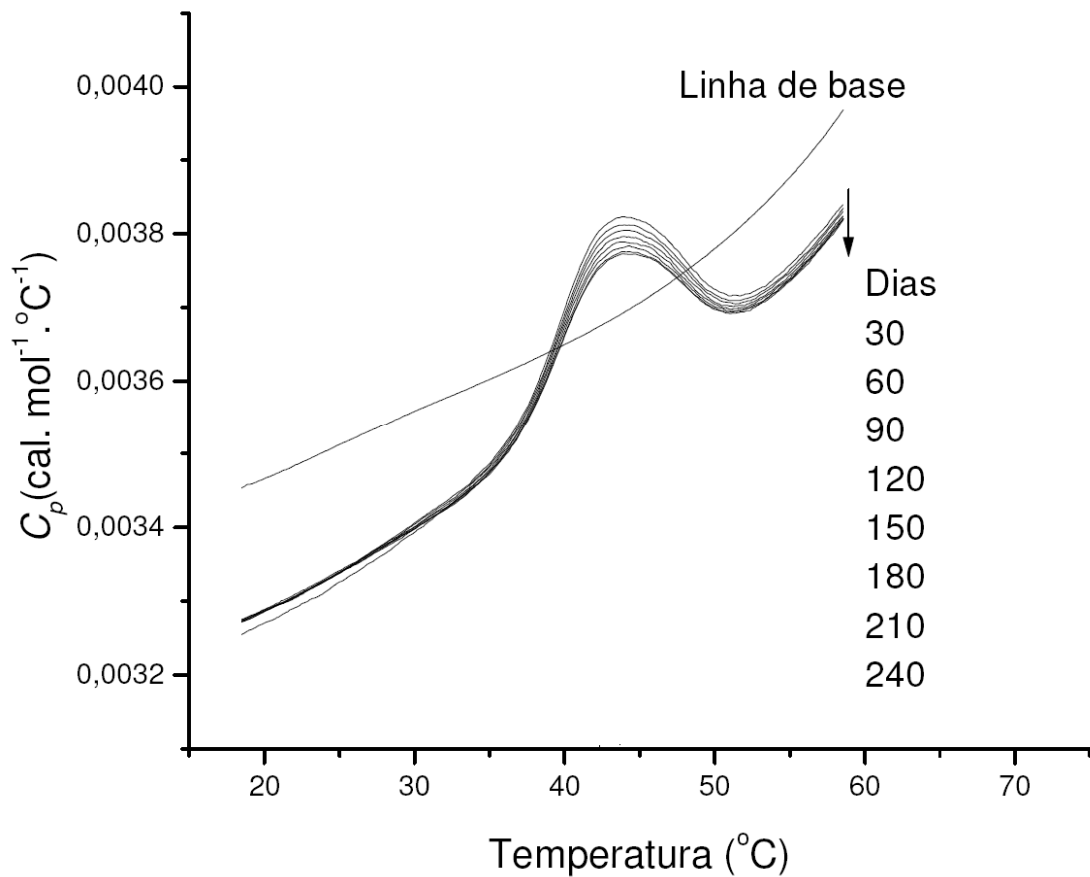


Figura 31: Determinação de $t_{95\%}$ (*shelf life*) para ψ -tripsina por calorimetria diferencial de varredura. As corridas foram realizadas no intervalo de trinta dias para determinação da quantidade de proteína que torna-se inativa. O símbolo ↓ indica a ordem temporal na qual foram feitas as medidas no DSC.

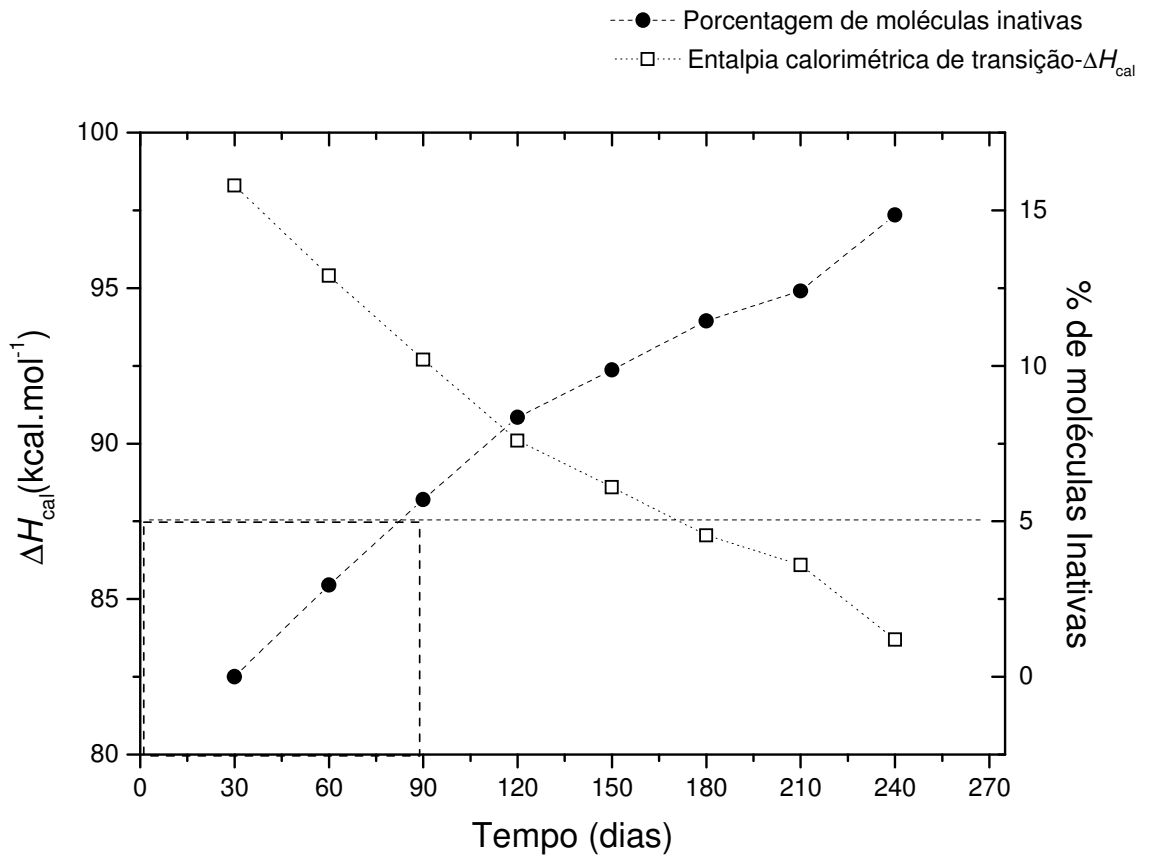


Figura 32: Relação entre ΔH_{cal} e porcentagem de formas inativas em função do o tempo de armazenamento. A determinação da porcentagem de ψ -tripsina inativa em função do tempo de armazenamento liofilizada e acondicionada a 4° C foi feita por calorimetria diferencial de varredura.

Tabela 12: Relação da atividade esterásica e dados calorimétricos (ΔH_{cal} e porcentagem de molécula inativas) com a agregação ou desnaturação irreversível para isoforma ψ -tripsina em função do tempo.

Tempo (dias)	ΔH_{cal} (kcal.mol ⁻¹)	% Inativos (DSC)	*Atividade Relativa (DP \pm 0,1)
0	85,30 \pm 0,21	0	100
30	84,44 \pm 0,32	1,2	99
60	82,78 \pm 0,23	2,4	98
90	80,44 \pm 0,33	4,4	96
120	78,18 \pm 0,42	6,3	94
150	76,88 \pm 0,24	9,9	90
180	72,89 \pm 0,42	11,5	88
210	74,71 \pm 0,35	13,4	87
240	72,54 \pm 0,42	15,9	84

* Atividade esterásica medida segundo o item 4.1.8.2. DP- Desvio padrão médio das medidas.

5.1.12. Determinação da porcentagem de transformação de α -tripsina em ψ -tripsina em função do tempo de armazenamento e influência da concentração das isoformas de tripsina no resultado calorimétrico.

O sistema cromatográfico em escala menor foi construído para poder acompanhar a transformação de α -tripsina em ψ -tripsina em função do tempo (Santos e cols., 2008). Para o cálculo das áreas foi usado o programa Origin[®] Scientific 5.0, para análise de deconvolução das curvas gaussianas das proteínas eluídas e determinação de valores das áreas sob as curvas. O sistema cromatográfico de monitoramento mostrou-se eficiente para o propósito ao qual se destinou, demonstrando as seguintes características:

- Limite de detecção para isoforma ψ -tripsina foi de 0,004 mg.mL⁻¹. O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (INMETRO-DOQ-CGCRE-008, 2003 e ICH- Q2B CPMP/ICH/281/95, 1995).
- Quantidade otimizada de amostra de partida foi de 15 mg, para a qual a resolução média entre as isoformas α - e ψ -tripsina tripsina foi de 0,92, Para valores maiores de quantidade de partida foram encontradas resoluções semelhantes não sendo necessário usar maiores quantidades de proteína sem razão específica;
- Tempo de total de corrida cromatográfica experimental de 3,2 dias (cromatograma não mostrado);
- Tempo de retenção de dois dias para a isoforma ψ -tripsina e de três dias para α -tripsina (cromatograma não mostrado);

O sistema cromatográfico e o método de análise demonstraram que para obter valores de áreas menores que 1% o programa de deconvolução encontrou dificuldades para realizar as análises com precisão e exatidão. Assim, foi decidido que valores abaixo de 1% da área total dos cromatogramas seriam expressos como sendo 1%. (Fig.33).

Como pode ser visto na Figura-33 a isoforma α -tripsina aparentemente fica estável por seis meses, porém existem pequenas oscilações nas porcentagens menores que 1% que são tomadas como 1% para facilidade de análise. Entre o sexto e o sétimo mês existe um aumento de 1% na quantidade formada de ψ - tripsina a qual se mantém e constante até o oitavo mês. Entre o oitavo e o décimo mês existe um crescimento da quantidade relativa de ψ -tripsina para 4% e este valor mantém-se até o décimo segundo mês de medida.

O resultado obtido foi testado no DSC a fim de definir o limite de mistura aceitável das proteínas α - e ψ -tripsina que não influenciavam no resultado termodinâmico e os resultados estão dispostos na Tabela-13.

Assim, baseando-se nos resultados obtidos (Tabela-13) ficou decidido que as amostras de α -tripsina posteriormente usadas para estudos físico-químicos seriam usadas no período de até seis meses de armazenamento nas condições de teste. Neste período, como pode ser observado na figura-33, a quantidade de ψ - tripsina como contaminante é menor ou igual a 1% da mistura de proteínas. Este valor de 1% de contaminação é um valor aceitável, pois como pode ser visto na tabela-13 não existe variação significativa tanto no T_m como na relação de $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ dentro da faixa de concentração de 0,5-1% de ψ - tripsina. Valores maiores de concentração relativa de ψ -tripsina podem ocasionar medidas calorimétricas pouco exatas devido a respostas

diferentes das proteínas ao “stress” térmico. Isto pode ser evidenciado na tabela-13 onde os valores de T_m e da relação de $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ variam significativamente ao nível do teste *t* de *student* para concentrações relativas de ψ - tripsina acima de 1%.

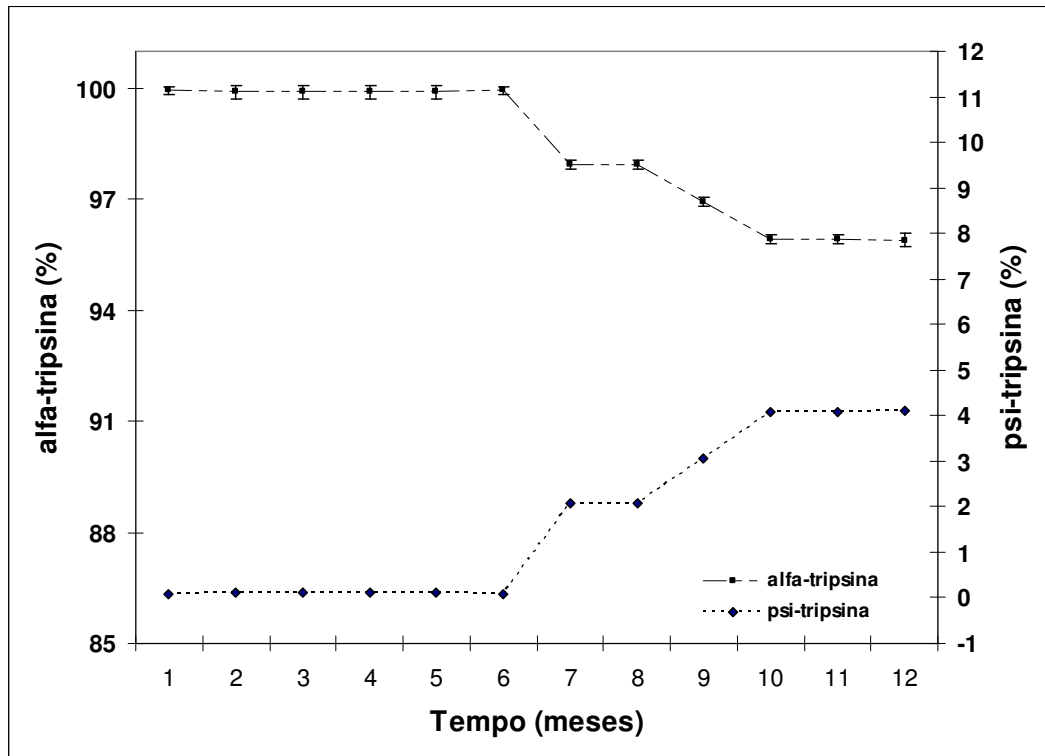


Figura 33: Monitoramento da transformação de α -tripsina em ψ -tripsina em função do tempo de armazenamento de proteína liofilizada e mantida a 4°C. A porcentagem relativa da isoforma α -tripsina foi calculada a partir do programa de análise Origin[®] Scientific 5.0 e a porcentagem da isoforma ψ -tripsina foi obtida como o valor da área total menos a área da isoforma α -tripsina. (♦) ψ -tripsina e (■) α -tripsina.

Tabela 13 : Influência da mistura das isoformas α - e ψ -tripsina em parâmetros calorimétricos obtidos por DSC.

% de ψ -tripsina	% de α -tripsina	T_m (K)	$\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ (kcal.mol ⁻¹)
0,5	99,5	325,9	1,1
1,0	99,0	325,9	1,1
2,0	98,0	325,2	1,0
3,0	97,0	324,4	0,97
4,0	96,0	323,5	0,89
5,0	95,0	322,6	0,81

5.1.13. Purificação e determinação da identidade e pureza do tripsinogênio.

A purificação do tripsinogênio bovino Sigma[®], que foi conduzida através de cromatografia de exclusão molecular usando-se uma coluna Superose-12[®] (Pharmacia), mostrou-se eficiente e satisfatória. Como pode ser visto no cromatograma da Figura-34 existe apenas um pico, agudo e simétrico, mostrando que o tripsinogênio comercial bovino (E.C N^o 232-651-3 lote 033k7680- SIGMA) está puro e livre de contaminantes. O espectro de massas (MALDI-MS) da amostra de tripsinogênio comercial (Fig.35) demonstra que existem os íons (M+H)⁺ com valor de 24032,7 Da e (M+2H)²⁺ com valor de 12000,2 Da. Deste modo a massa molecular experimental do tripsinogênio foi de 24032,7 Da. Pelo resultado obtido no MALDI-MS também se pode confirmar que a molécula de tripsinogênio esta pura e livre de contaminantes.

O valor da massa molecular obtido por MALDI-MS (24032,7 Da) para o tripsinogênio é maior do que o valor calculado pela sequência, que é de 23977,1 Da. Entretanto, o

resultado pode ser considerado satisfatório, pois o erro de 55,6 Da está dentro do erro experimental, esperando-se para a metodologia para a faixa de massa de 20-60 kDa um erro de até 60 Da. Para certificar se a amostra não estava contaminada com a isoforma β -tripsina foi conduzido no tripsinogênio um teste de atividade amidásica com a fração purificada, resultando em atividade de aproximadamente 0,3 % (atividade característica do tripsinogênio) da atividade da isoforma β -tripsina que foi usada como controle. Assim, a amostra comercial está livre de contaminantes, não necessitando ser conduzida nenhuma técnica adicional de purificação.

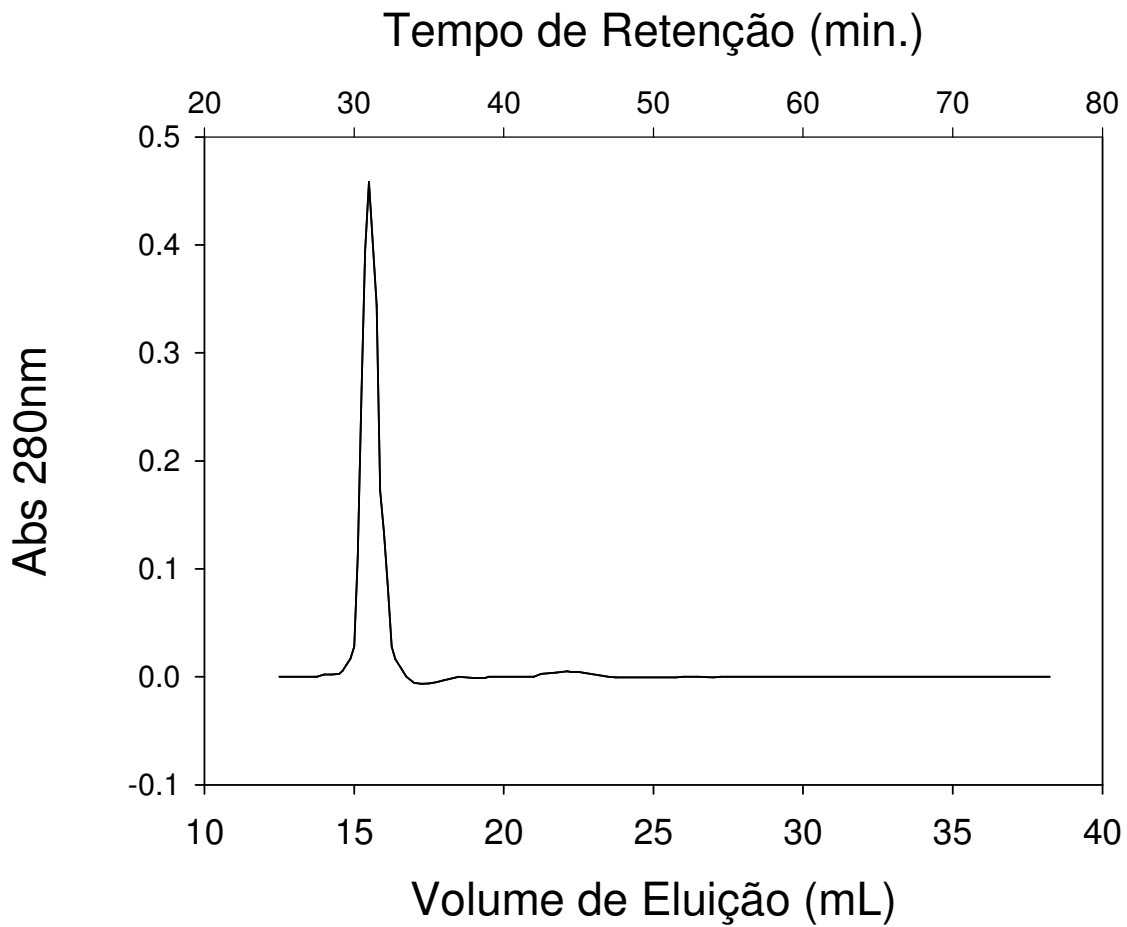


Figura 34: Cromatografia por exclusão molecular de tripsinogênio comercial bovino Sigma[®] em uma coluna Superose-12[®] (Pharmacia). Fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, fase móvel tampão β-alanina a 50,0 mmol.L⁻¹, pH 3,0, CaCl₂ a 20,0 mmol.L⁻¹ e NaCl a 50,0 mmol.L⁻¹. A detecção do eluato foi feita em 280 nm.

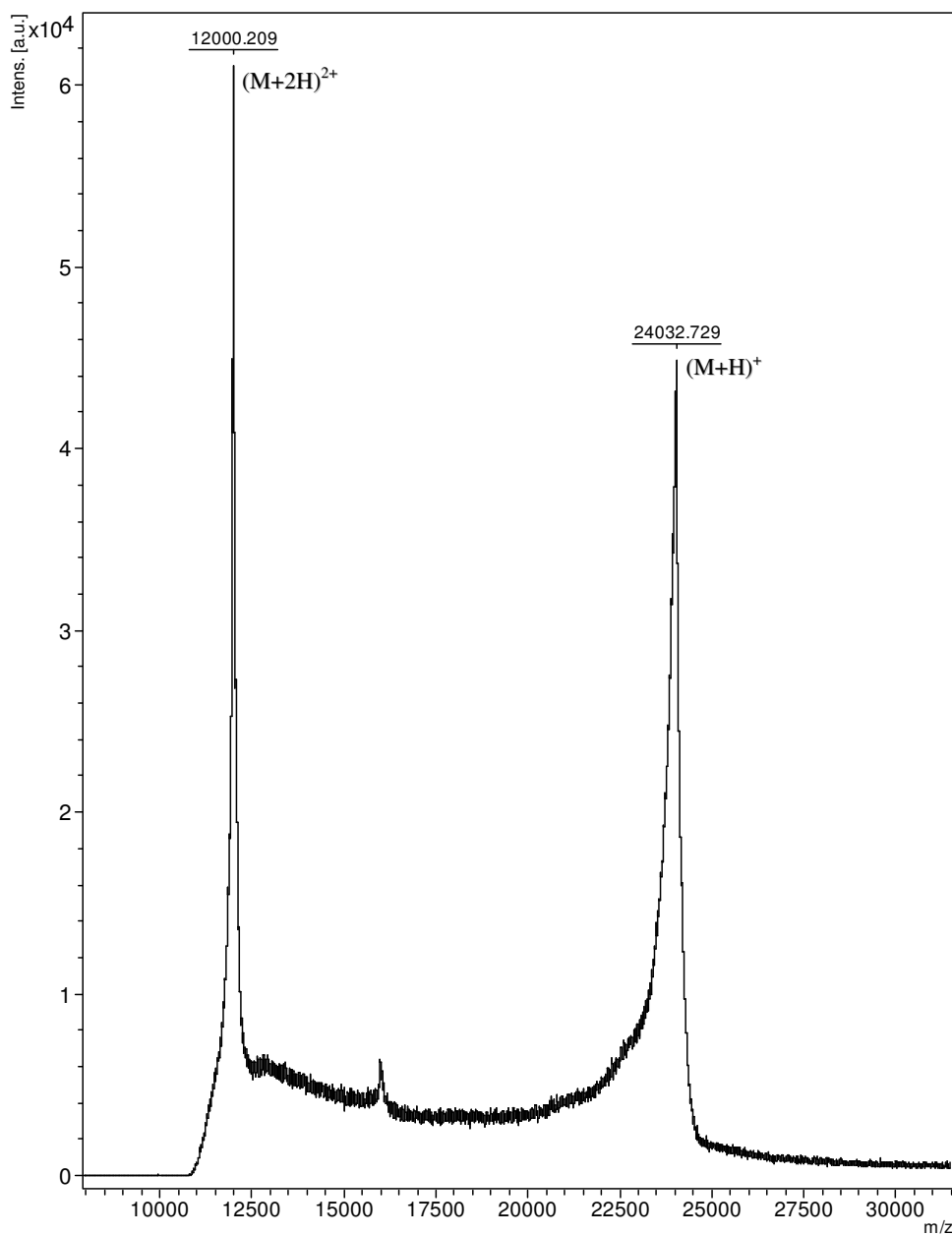


Figura 35: Espectrometria de massa do tripsinogênio comercial bovino Sigma[®]. Detecção realizada em MALDI-TOF no modo linear positivo. $(M+H)^+$ é a molécula de tripsinogênio carregada com um próton e $(M+2H)^{2+}$ é a molécula de tripsinogênio carregada com dois prótons.

5.2 Microcalorimetria

5.2.1 Análise das curvas de desnaturação.

A partir da análise dos dados de “*shelf-life*” das isoformas α e ψ -tripsina, do perfil de transformação de α -tripsina em ψ -tripsina, da atividade enzimática das isoformas e do cálculo da porcentagem de mistura das isoformas de α - e ψ -tripsina, foram usadas apenas amostras armazenadas a 4°C por menos que seis meses para a isoforma α -tripsina, e por menos que dois meses para isoforma ψ -tripsina para que se pudesse garantir que a isoforma analisada fosse somente à molécula de interesse com atividade enzimática maior ou igual a 95%. Todos os experimentos foram realizados na faixa ácida de pH abaixo de 5,0 para o tripsinogênio, α - e ψ -tripsina.

As caracterizações termodinâmicas do tripsinogênio α - e ψ -tripsina foram realizadas em um microcalorímetro VP-DSC da Microcal com precisão e exatidão elevadas, como pode ser visto no Apêndice-1. A caracterização termodinâmica foi conduzida em pH 3,0 e os dados utilizados para esta determinação na maioria das condições testadas apresentaram uma desnaturação térmica com uma transição em dois estados com a relação de $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ próxima à unidade.

Todos os testes calorimétricos tanto para as isoformas de tripsina quanto para o tripsinogênio resultaram em perfis semelhantes ao da Figura-36, onde se pode observar claramente uma curva endotérmica bastante simétrica, que é gerada pela absorção de calor pela proteína em processo de desnaturação térmica, além da linha de base que é originada da corrida de solução tampão contra ela mesma. Pode-se observar ainda na Figura-36 que existem duas curvas endotérmicas nas quais a mesma proteína é

aquecida, resfriada e novamente aquecida, sem a modificação de nenhum parâmetro da corrida. Estas corridas adicionais são feitas para calcular a reversibilidade do processo de desnaturação para a proteína em questão a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ Reversibilidade} = (\Delta H_{cal \text{ segunda corrida consecutiva}} / \Delta H_{cal \text{ primeira corrida}}) \times 100 \text{ (Equação-8)}$$

Todos os testes realizados com tripsinogênio, α - e ψ -tripsina apresentaram uma reversibilidade igual ou maior a 95% nas condições experimentais testadas em meio ácido.

A linha de base na Figura-36 representa a média de cinco varreduras consecutivas de solução tampão tanto na célula de amostra como na célula de referência e com essas corridas pode-se verificar pequenas variações entre as câmaras, bem como variações de estabilidade do aparelho. Estas corridas foram realizadas com o intuito de fornecer uma linha de base para subtrações dos resultados das corridas testes.

Os resultados apresentados nas Figuras 37, 38, e 39 são os dados analisados que passaram pelos seguintes tratamentos:

- Subtração da linha de base de tampão contra tampão, normalização da concentração de proteína que é corrigida em função do número de sítios ativos presente na proteína (determinado por meio dos valores da titulação do centro ativo para α -tripsina ou atividade esterásica residual de ψ -tripsina em função do tempo), subtração da contribuição da capacidade calorífica dos estados nativos e desnaturados e ajuste matemático da curva gaussiana mais próxima da experimental. Este ajuste pode ser usado para modelos que seguem uma transição em dois estados ou para alguns modelos que não passam somente por dois estados desde que apresentem uma transição cooperativa e os estados estejam em equilíbrio (Haynie, 2001);

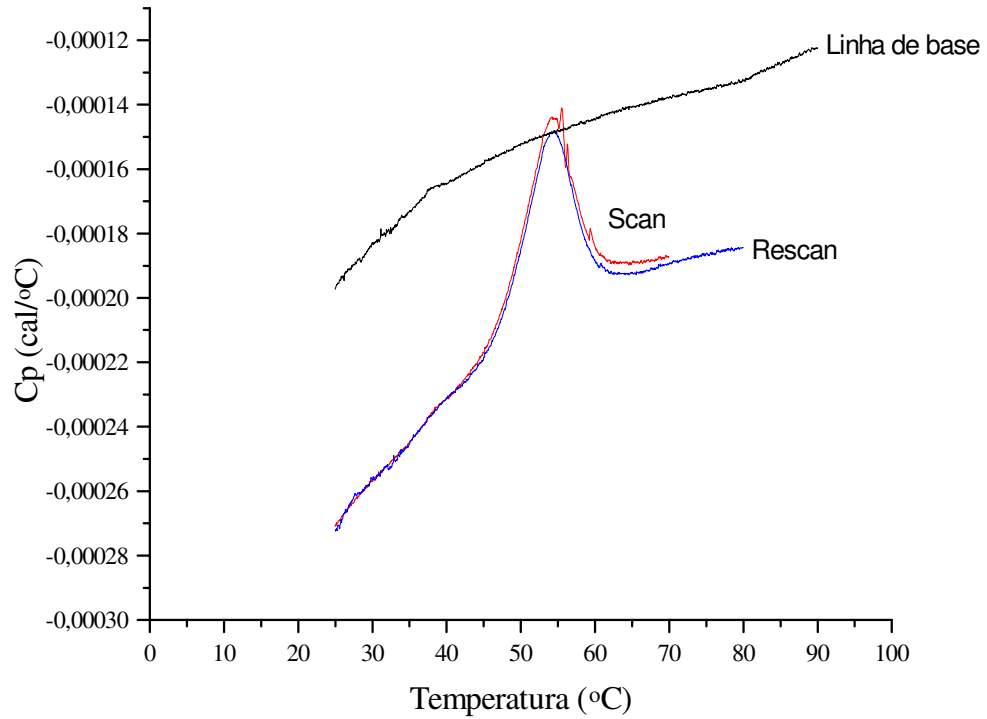


Figura 36: Perfil característico de desnaturação térmica de proteínas em DSC. Amostra α -tripsina $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão β -alanina a $50,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ pH 3,0, contendo CaCl_2 a $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura de 60 K.h^{-1} . Scan é a primeira corrida, res-scan é a segunda corrida consecutiva

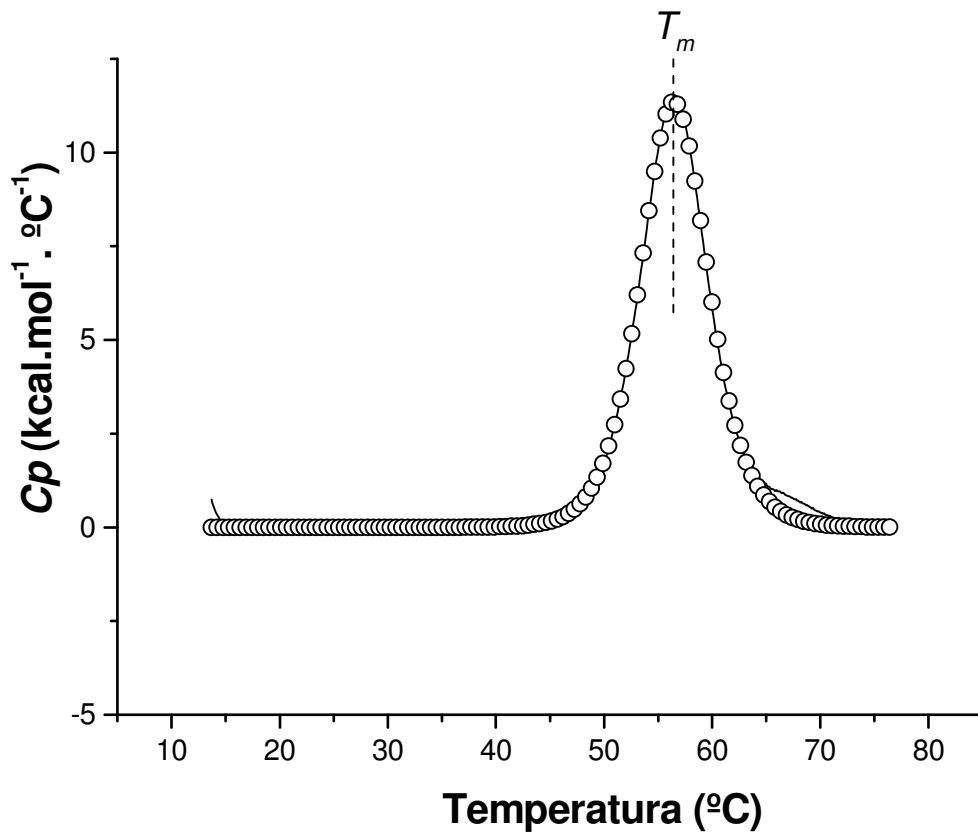


Figura 37: Curva de desnaturação de tripsinogênio a 1,0 mg.mL⁻¹ em tampão β -alanina a 50,0 mmol.L⁻¹, pH 3,0 e CaCl₂ a 20,0 mmol.L⁻¹. Linha contínua preta (—) é o dado original e linha com círculos (-O-) o dado submetido ao ajuste para uma transição em um modelo de dois estados (M2ST) e T_m é a temperatura média de desnaturação térmica.

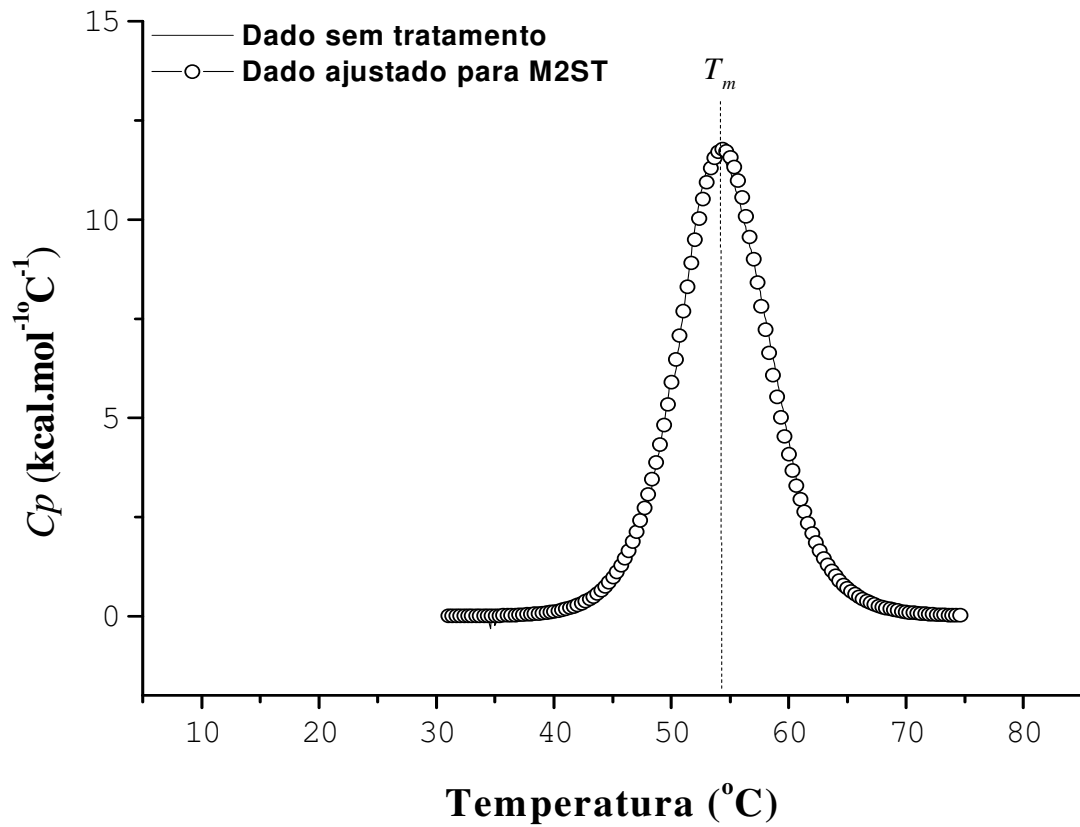


Figura 38: Curva de desnaturação térmica de α -tripsina a 1,0 mg.mL⁻¹ em tampão β -alanina a 50,0 mmol.L⁻¹, pH 3,0 e CaCl₂ a 20,0 mmol.L⁻¹. Linha contínua (—) é o dado original e linha com círculos (-O-) o dado submetido ao ajuste para uma transição em um modelo de dois estados (M2ST) e T_m é a temperatura média de desnaturação térmica.

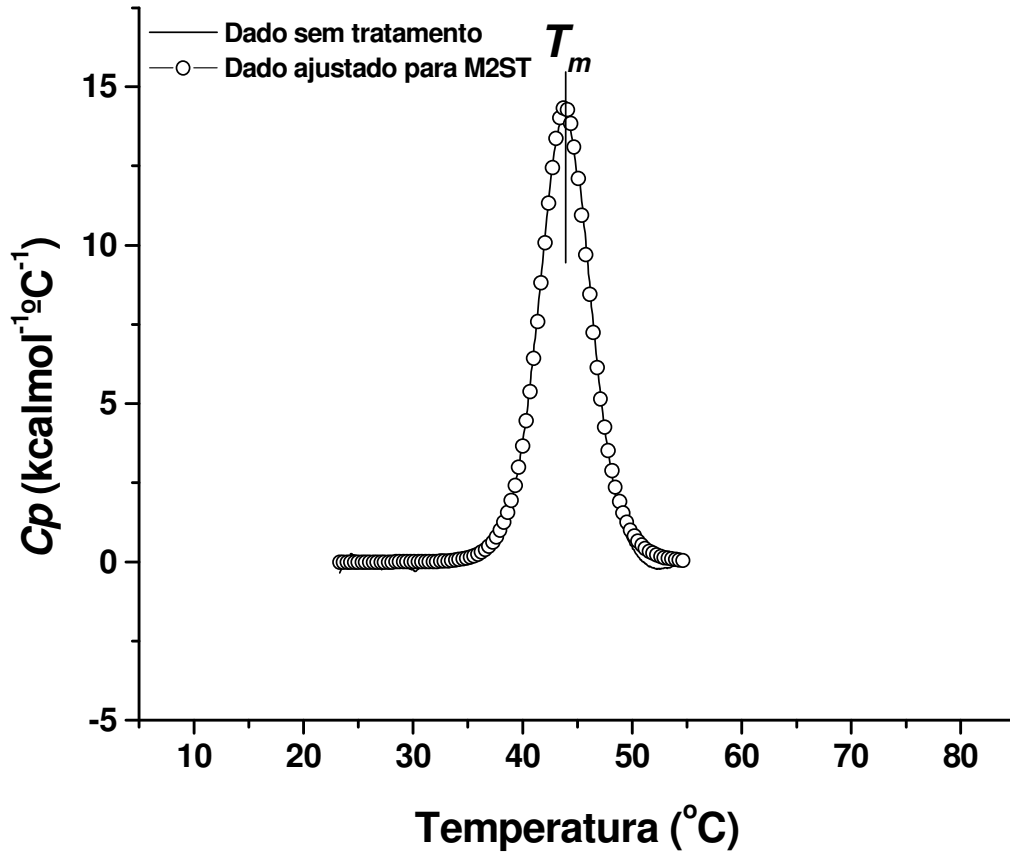


Figura 39: Curva de desnaturação de ψ -tripsina a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão β -alanina a $50,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 3,0 e CaCl_2 a $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$. Linha contínua (—) é o dado original e linha com círculos (-O-) o dado submetido ao ajuste para uma transição em um modelo de dois estados (M2ST) e T_m é a temperatura média de desnaturação térmica.

As curvas endotérmicas geradas a partir da desnaturação térmica, após serem analisadas pelo programa de análise Origin-DSC[®] 4.0 fornecem os valores de ΔH_{cal} e o ΔH_{vH} (Fig 11), sendo estes e mais o T_m os únicos parâmetros fornecidos pelo programa de análise.

5.2.2. Teste para determinar se os processos de desnaturação de tripsinogênio, α e ψ -tripsina tem sua desnaturação térmica termodinamicamente ou cineticamente dirigidas.

Geralmente é assumido que na interpretação dos resultados de DSC de proteínas que a medida de parâmetros calorimétricos de desnaturação protéica é independente da velocidade de varredura (“scan rate”). Logo, as espécies nativas e desnaturadas podem ser consideradas como estando em equilíbrio mesmo em taxas elevadas de varredura. A validade desta condição foi verificada completamente apenas em poucos casos (Privalov & Khechinashvili, 1974).

Entretanto, este teste é de importância primária para a escolha do método correto de interpretação e análise dos resultados calorimétricos. A interpretação pode ser termodinâmica ou cinética dependendo do efeito da velocidade de varredura sobre os parâmetros de transição na desnaturação da molécula.

A dependência da temperatura média de desnaturação (T_m) e da entalpia calorimétrica ΔH_{cal} da velocidade de varredura (“scan rate”) indica ser um caso de proteínas que não estão em equilíbrio (Nativo \rightleftharpoons Desnaturado), ou que este equilíbrio é muito lento comparado ao tempo de varredura de temperatura, sendo este processo dirigido cineticamente (Grinberg e cols., 2000).

A fim de testar se o processo desnaturação térmico das proteínas em estudo é dirigido cineticamente ou termodinamicamente foram testadas velocidades de varredura de 0,5; 3,0; 5,0; 15; 30; 60 e 90 K.h⁻¹ para o tripsinogênio (Tabela-14), a α -tripsina (Tabela-15) e a ψ -tripsina (Tabela-16). Como pode ser visto nas tabelas 14, 15 e 16 para variações em faixas amplas da velocidade de varredura, não houve mudança significativa dos parâmetros de desnaturação térmica T_m e ΔH_{cal} . Este fato é um indicativo forte de que o processo é dirigido termodinamicamente (Grasso, 1995), permitindo assim aplicar a análise termodinâmica de processos reversíveis nos resultados obtidos com tripsinogênio, α - e ψ -tripsina.

Tabela 14: Teste da influência da velocidade de varredura (“scan rate”) nos parâmetros T_m e ΔH_{cal} para o tripsinogênio a 1,0 mg.mL⁻¹ em tampão β -alanina a 50,0 mmol.L⁻¹, pH 3,0 contendo CaCl₂ a 20,0 mmol.L⁻¹.

Scan rate (K.h ⁻¹)	T_m (K)	ΔH_{cal} (kcal.mol ⁻¹)
0,5	327,7 ± 0,1	105,2 ± 0,4
3	327,8 ± 0,2	103,9 ± 0,2
5	327,7 ± 0,2	101,2 ± 0,6
15	327,4 ± 0,1	89,8 ± 0,5
30	327,5 ± 0,2	88,3 ± 0,5
60	327,6 ± 0,1	87,7 ± 0,4
90	327,6 ± 0,2	87,8 ± 0,3

Tabela 15: Teste da influência da velocidade de varredura (“scan rate”) nos parâmetros T_m e ΔH_{cal} em α -tripsina a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ em $50,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de tampão β -alanina, pH 3,0 contendo $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ CaCl_2 .

Scan rate (K. h^{-1})	T_m (K)	ΔH_{cal} (kcal. mol^{-1})
0,5	$325,5 \pm 0,2$	$100, \pm 0,6$
3	$325,4 \pm 0,2$	$101,2 \pm 0,3$
5	$325,7 \pm 0,1$	$98,4 \pm 0,7$
15	$325,6 \pm 0,2$	$99,3 \pm 0,4$
30	$325,5 \pm 0,1$	$96,5 \pm 0,4$
60	$325,9 \pm 0,1$	$97,5 \pm 0,5$
90	$325,6 \pm 0,1$	$98,2 \pm 0,2$

Como pode ser vistos nas tabelas 14, 15, 16 as proteínas estudadas tem sua desnaturação térmica controlada por processos termodinâmicos, deste modo a velocidade de varredura não tem influência significativa sobre os parâmetros termodinâmicos.

Apesar de velocidades de varreduras menores ou iguais a 30 K.h^{-1} não influenciarem na medida dos parâmetros calorimétricos elas rendem tempos experimentais muito longos, assim ficou decidido usar a velocidade de varredura de 60 K.h^{-1} , por dois motivos: rapidez na aquisição dos dados e para que os dados gerados pudessem ser comparados àqueles obtidos por Bittar e cols., (2003).

Tabela 16: Teste da influência da velocidade de varredura (“scan rate”) nos parâmetros T_m e ΔH_{cal} para a ψ -tripsina a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão β -alanina a $50,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 3,0 contendo CaCl_2 a $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$

Scan rate (K. h^{-1})	T_m (K)	ΔH_{cal} (kcal. mol^{-1})
0,5	$316,4 \pm 0,1$	$92,6 \pm 0,3$
3	$316,3 \pm 0,2$	$91,2 \pm 0,2$
5	$316,6 \pm 0,2$	$89,7 \pm 0,5$
15	$316,5 \pm 0,1$	$88,3 \pm 0,3$
30	$316,4 \pm 0,2$	$86,2 \pm 0,5$
60	$316,8 \pm 0,1$	$85,3 \pm 0,2$
90	$316,5 \pm 0,2$	$85,3 \pm 0,3$

5.2.3. Determinação do T_m , T_m' , $\Delta H_{(cal)}$, $\Delta T1/2$ (índice de cooperatividade) $\Delta S_{(Tm)}$, ΔC_p , $\Delta S_{(298K)}$, $\Delta H_{(298K)}$, $\Delta G_{(298K)}$ e T_s de tripsinogênio, α - e ψ -tripsina em pH 3,0.

A caracterização termodinâmica de tripsinogênio e das isoformas de tripsina foram feitas em meio ácido e os principais parâmetros termodinâmicos foram obtidos em soluções em pH 3,0 para comparar com os dados obtidos por Bittar e cols., (2003) e outros estudos feitos nesta mesma condição.

O estudo das propriedades termodinâmicas das isoformas de tripsina é um tema que faz parte da tradição do nosso laboratório na pesquisa de termodinâmica e enzimologia de serino proteases. A fim de poder realizar um estudo comparativo das propriedades termodinâmicas das isoformas principais de tripsina optou-se por utilizar os parâmetros termodinâmicos da isoforma β -tripsina para comparação com os

resultados novos obtidos para α - e ψ -tripsina. Porém para a confirmação dos dados de Bittar e cols., (2003) e comparação com novos resultados obtidos no período de 2005-2008, tornou-se necessário repetir alguns experimentos com a isoforma β -tripsina. Os resultados destes experimentos estão dispostos no **apêndice 2** e mostram que os dados obtidos em 2003 podem ser utilizados com confiança uma vez que os resultados obtidos no período de 2005-2008 foram equivalentes.

5.2.3.1 Determinação do T_m e $\Delta H_{(cal)}$ de tripsinogênio, α -, ψ -tripsina em pH 3,0.

Para a determinação dos parâmetros termodinâmicos T_m (temperatura medida de desnaturação) e $\Delta H_{(cal)}$ (entalpia calorimétrica) foram realizados dez corridas isoladas no DSC para cada proteína a fim de verificar a exatidão e o erro experimental das medidas para o tripsinogênio, α - e ψ -tripsina nas seguintes condições experimentais: 1,0 mg.mL⁻¹ de proteína submetida a uma velocidade de varredura de 60 K.h⁻¹ a uma faixa de temperatura de 20 a 80 °C (193 a 253 K). Os resultados para estas análises estão dispostos na Tabela-17

Tabela 17: Determinação de T_m e $\Delta H_{(T_m)}$ para tripsinogênio, β - α - e ψ -tripsina a 1,0 mg.mL⁻¹ em solução de glicina a 50 mmol.L⁻¹ e pH 3,0 mais CaCl₂ a 20 mmol.L⁻¹.

	T_m (K)	$\Delta H_{(cal)}$ (kcal.mol ⁻¹)
tripsinogênio	327,6 ± 0,1	87,7 ± 0,9
β -tripsina*	327,0 ± 0,1	101,8 ± 0,7
α -tripsina	325,9 ± 0,1	99,1 ± 0,8
ψ -tripsina	316,8 ± 0,1	85,3 ± 0,9

* Valores obtidos de Bittar e cols., (2003)

Analisando a Tabela-17 pode se observar que o T_m da α -tripsina em pH 3,0 ($325,9 \pm 0,1$) determinado neste trabalho experimental mostrou ser um pouco menor do que o de β -tripsina (Bittar e cols., 2003) que é de $327 \pm 0,1$ K enquanto o tripsinogênio apresentou um valor maior que aqueles obtidos para as duas isoformas (α - e ψ -). Apesar de próximos estes valores são estatisticamente diferentes quando analisados pelo teste *t de student* e ainda levando em conta que o DSC tem resolução suficiente para poder diferir $\pm 0,1$ K. Estes valores próximos de T_m refletem bem a similaridade estrutural e funcional das isoformas β - e α -tripsina, pois ambas possuem atividade, estruturas secundária e terciária semelhantes (Foucault e cols., 1974a) e são as mais abundantes das isoformas ativas de tripsina bovina.

A isoforma ψ -tripsina apresentou um valor T_m bem diferente das outras isoformas testadas e do tripsinogênio, pois a diferença no T_m para a isoforma que lhe deu origem (α -tripsina) é de 9,1 K. Este valor sugere que a isoforma ψ -tripsina, que é formada pela mesma sequência primária das outras isoformas é muito menos estável comparativamente. Esta menor estabilidade pode ser explicada devido a uma clivagem adicional que a ψ -tripsina possui na cadeia polipeptídica (dois pontos de clivagem), tornando-a mais flexível e conseqüentemente com menor estabilidade conformacional.

As diferenças no T_m encontradas para as moléculas testadas sugerem que a mudança de tripsinogênio para β -tripsina e desta isoforma para a α -tripsina provocam mudanças no sistema termodinâmico mais brandas do que quando a isoforma α -tripsina se converte a ψ -tripsina. Estas mudanças no sistema termodinâmico poderão ser melhor entendidas principalmente quando os parâmetros termodinâmicos como ΔC_p e ΔG forem elucidados.

O $\Delta H_{(cal)}$ do tripsinogênio e de α - e β -tripsina mostrou estar oscilando em um valor próximo de $100,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$, que é semelhante ao valor de $101,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ obtido para β -tripsina (Bittar e cols., 2003). Este valor está dentro do esperado para pequenas proteínas globulares (Becktel & Schellman, 1987), a única diferença marcante foi encontrada na variação de entalpia de desnaturação de ψ -tripsina que tem um valor consideravelmente menor sugerindo mais uma vez que esta isoforma apresenta uma menor estabilidade termodinâmica do que as outras anteriores a ela.

5.2.3.2 Influência do pH e da concentração de proteínas na relação de $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$.

As influências do pH e da concentração de proteínas foram testadas para o tripsinogênio, e para as isoformas β -, α - e ψ -tripsina a fim de verificar a influência destes sobre a termodinâmica destes sistemas protéicos.

Relembrando que (Privalov & Potekhin, 1986):

- Se $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH} \cong 1$, a unidade cooperativa é monomérica;
- Se $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH} \cong 0,5$, a unidade cooperativa é dimérica;
- Se $1,0 < \Delta H_{cal}/\Delta H_{vH} < 2,0$ os domínios estão desacoplados (para proteínas com dois domínios).

Os resultados para tais testes podem ser vistos abaixo como demonstrados nas Figuras 40 e 41. Na Figura-40 pode ser visto que a dependência da relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ em função do pH para as três moléculas testadas apresentou um comportamento praticamente invariável com pequenas oscilações na faixa de pH de 2,5-3,0 caracterizando as moléculas como monômeros ($\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH} \cong 1$) e um comportamento decrescente após valores de pH acima de 3,0 indicando uma tendência à formação de dímeros ($\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH} \cong 0,5$). Ainda na Figura-40 fica evidente que a isoforma ψ -tripsina

possui uma maior tendência a formar dímeros do que as outras isoformas de tripsina e o tripsinogênio para faixa de pH estudada. Este relacionamento do pH com estados de moleculares das proteínas sugere como a conversão de tripsinogênio- β -tripsina- α -tripsina- ψ -tripsina atua na mudança da carga líquida superficial destas proteínas, fazendo que algumas proteínas da série de conversão tenham mais propensão a formar dímeros inativos em determinados valores de pH. Este fato pode ser interpretado como uma maneira de inativar estas enzimas, ou seja, uma via natural de degradação e inativação das enzimas no meio fisiológico.

Em relação à influência da concentração de proteínas na relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$, pode-se observar na Figura-41 que para que se obtenham valores de $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ próximos a 1, ou seja para obter sinais no DSC para proteínas monoméricas, é necessário trabalhar com concentrações de proteína abaixo de $0,75 \text{ mg.mL}^{-1}$ para as três moléculas analisadas. E dentre estas três pode-se notar que a molécula de ψ -tripsina novamente mostra-se a mais sensível em relação à mudança da condição físico-química. Esta isoforma em concentrações acima de $1,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ apresenta uma forte tendência à dimerização e agregação e em valores de concentrações acima de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, formando-se visualmente agregados/precipitados protéicos irreversíveis.

Apesar da concentração ideal para a obtenção de valores de $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH} \cong 1$ ser usualmente inferior a $0,75 \text{ mg.mL}^{-1}$, operacionalmente esta concentração só rende bons resultados para análise de T_m , sendo os valores ΔH_{cal} pouco precisos e difíceis de serem analisados. Assim optou-se em trabalhar com concentrações de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ onde o sinal proporciona uma análise satisfatória dos parâmetros termodinâmicos para as três moléculas testadas.

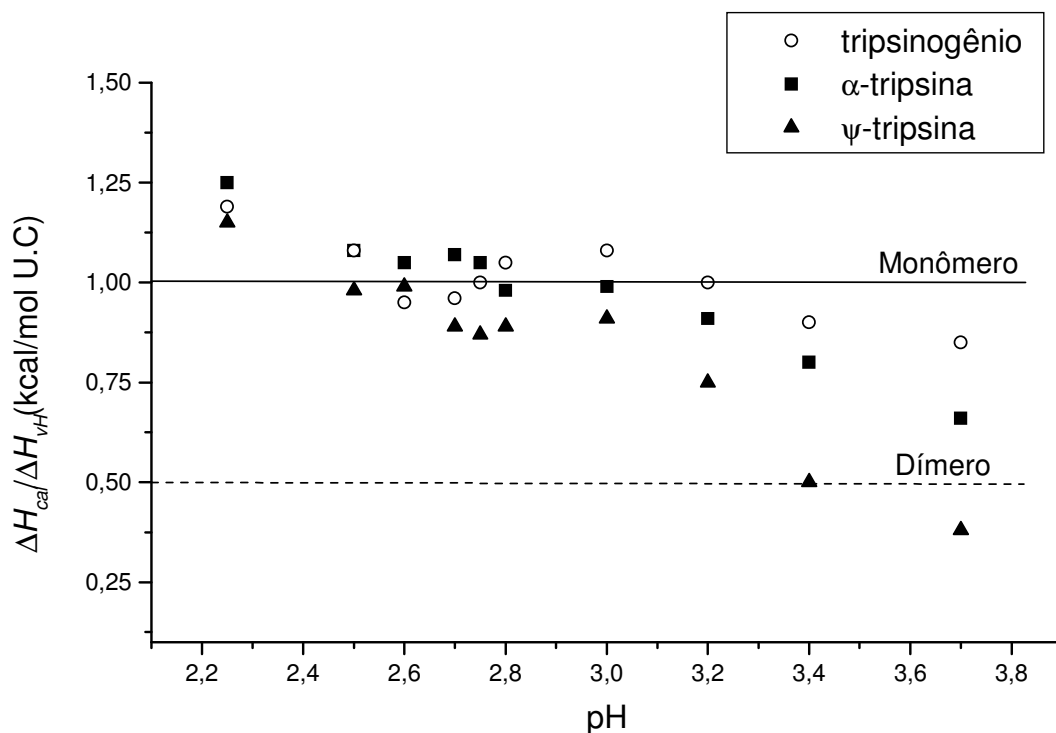


Figura 40: Influência do pH sobre a relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ para o tripsinogênio, α - e ψ -tripsina. Os pontos experimentais são médias originadas de triplicatas. UC (Unidades cooperativas). Para faixa de pH 2 a 3 foi usado o tampão glicina e para faixa de pH acima de 3,0 foi usado o tampão acetato de sódio ambos a 50 mmol.L^{-1} , mais CaCl_2 a 20 mmol.L^{-1} . Concentração de proteínas: 1.0 mg.mL^{-1}

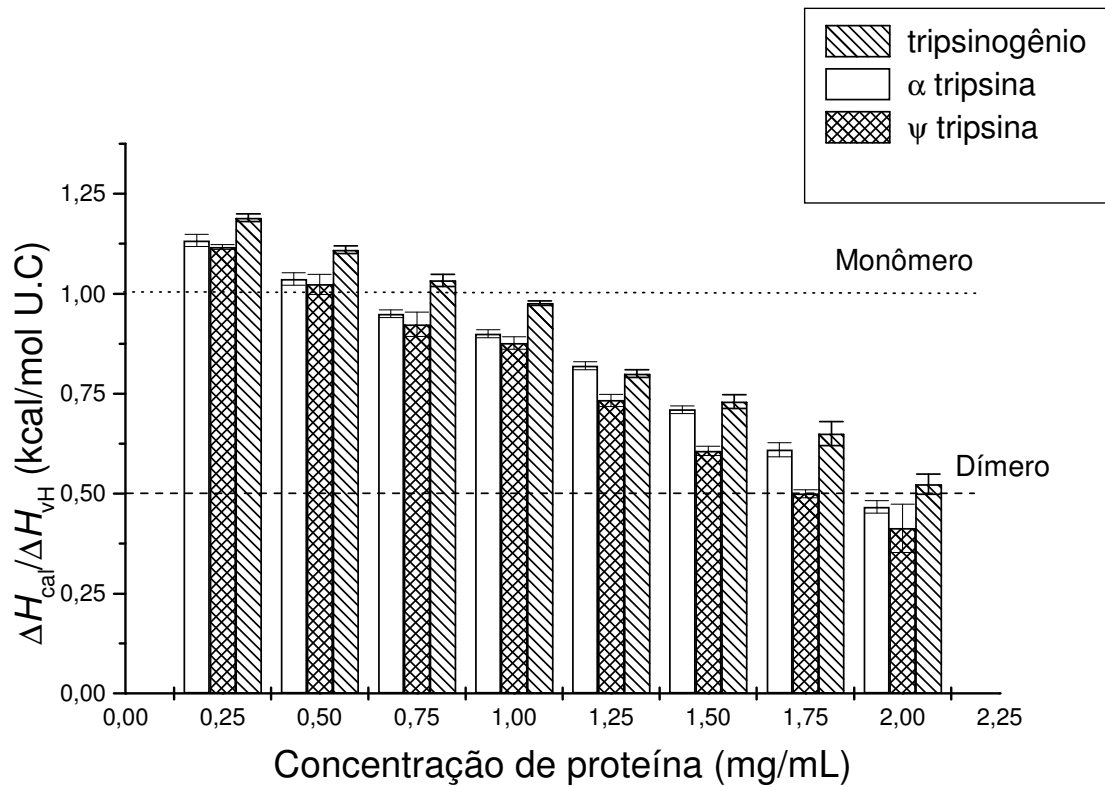


Figura 41: Influência da concentração de proteínas sobre a relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ de trypsinogênio, α - e ψ -tripsina em solução de glicina 50 mmol.L⁻¹ pH 3.0, mais CaCl₂ a 20 mmol.L⁻¹. Os pontos experimentais são resultados médios originados de triplicatas mais ou menos um desvio padrão. U.C (unidade cooperativa).

5.2.3.3 Determinação do $\Delta T_{1/2}$ (índice de cooperatividade relativo) de tripsinogênio, α - e ψ -tripsina em pH 3,0.

A determinação do índice de cooperatividade relativo ($\Delta T_{1/2}$) baseia-se na seguinte relação: “o grau de cooperatividade da desnaturação é inversamente proporcional à largura à meia altura na curva de desnaturação de uma molécula” (Relkin, 1994). Portanto, processos físico-químicos muito cooperativos completam-se em uma faixa estreita de temperatura. A partir da análise das curvas de desnaturação térmica em pH 3,0 neste projeto e dos dados obtidos por Bittar e cols., (2003) os resultados foram os seguintes:

- $\Delta T_{1/2}$ para tripsinogênio= $7,0 \pm 0,2$ K
- $\Delta T_{1/2}$ para β -tripsina= $8,0 \pm 0,1$ K (Bittar e cols., 2003)
- $\Delta T_{1/2}$ para α -tripsina = $10,0 \pm 0,2$ K
- $\Delta T_{1/2}$ para ψ -tripsina= $13,0 \pm 0,1$ K

Com base nestes resultados pode-se dizer que a ordem decrescente de cooperatividade durante a desnaturação térmica em pH 3,0 é: tripsinogênio > β -tripsina > α -tripsina > ψ -tripsina. Estes resultados refletem as mudanças estruturais por que passa sequencialmente o tripsinogênio ao transformar-se nas isoformas de tripsina. Os valores encontrados para a cooperatividade sugerem que a mudança de tripsinogênio para β -tripsina não altera significativamente a cooperatividade do processo de desnaturação destas moléculas, porém as moléculas com uma e duas quebras na cadeia polipeptídica

(α - e ψ -tripsina) exibem menores valores de índice de cooperatividade, possivelmente devido a estas quebras e a maior flexibilidade destas.

5.2.3.4 Determinação do $\Delta S_{(T_m)}$ de tripsinogênio, α - e ψ -tripsina em pH 3,0.

A variação da entropia calorimétrica determinada no T_m é um importante parâmetro termodinâmico, pois estes valores relacionam-se com compensações entálpico-entrópicas e com diminuição de efeito hidrofóbico com aumento da temperatura. Para calcular o $\Delta S_{(T_m)}$ é necessário lembrar que na temperatura de transição (T_m) o valor de $\Delta G_{(T_m)}$ é igual a zero kcal.mol⁻¹ e que, para uma transição que ocorre em dois estados, a constante de equilíbrio entre os estados nativo e desnaturado (K_D) é igual a 1,0 no T_m então:

$$\Delta G_{(T_m)} = \Delta H_{(T_m)} - T_m \times \Delta S_{(T_m)} \therefore \text{Equação-9 (Cooper e cols., 2001)}$$

$$\Delta S_{(T_m)} = \frac{\Delta H_{(cal)}}{T_m} \therefore \text{Equação-10 (Cooper e cols., 2001)}$$

- Usando a equação-10 e os valores já conhecidos de $\Delta H_{(T_m)}$ e T_m pode se calcular o $\Delta S_{(T_m)}$, assim:
- $\Delta S_{(T_m)}$ do tripsinogênio = $0,268 \pm 0,010$ kcal. mol⁻¹.K⁻¹
- $\Delta S_{(T_m)}$ da β -tripsina = $0,311 \pm 0,010$ kcal.mol⁻¹.K⁻¹ (Bittar e cols., 2003)
- $\Delta S_{(T_m)}$ da α -tripsina = $0,304 \pm 0,010$ kcal.mol⁻¹. K⁻¹
- $\Delta S_{(T_m)}$ da ψ -tripsina = $0,269 \pm 0,010$ kcal.mol⁻¹. K⁻¹

A partir da análise deste parâmetro podem-se obter algumas informações importantes como a semelhança dos valores de $\Delta S_{(T_m)}$ para as isoformas β - e α -tripsina e para ψ -tripsina e tripsinogênio. Estas semelhanças quanto ao valor de $\Delta S_{(T_m)}$ sugerem que possivelmente no momento da transição térmica especificamente no T_m , entropicamente os sistema termodinâmico de ψ -tripsina assemelha-se ao tripsinogênio e β - ao de α -tripsina em pH 3,0. Estas semelhanças podem ser devido a uma semelhança no sistema termodinâmico no T_m para estas proteínas.

5.5.3.5 Determinação do ΔC_p , de $\Delta S_{(298K)}$ e $\Delta H_{(298K)}$ do tripsinogênio α - e ψ -tripsina em pH 3,0.

O calorímetro diferencial de varredura permite a medida direta dos valores de variação na capacidade calorífica entre o estado nativo e o estado desnaturado (ΔC_p) para sistemas termodinâmicos simples. Porém, a baixa exatidão devido a imperfeições nas linhas de base pós-transição, que são um problema técnico inerente quando se trabalha com proteínas, faz que algumas medidas diretas de ΔC_p nas curvas endotérmicas de transição sejam distorcidas e errôneas. Portanto, quando medidas de variação de capacidade calorífica são determinadas a partir de uma única corrida, os valores obtidos podem ser sistematicamente menores que aqueles fornecidos por meio de ajustes lineares de gráficos de ΔH_{cal} em função de T_m . Como o presente estudo trata de isoformas de tripsina intimamente relacionadas e com estruturas e propriedades físico-químicas semelhantes, espera-se que os valores de ΔC_p sejam todos muito parecidos, o que deve tornar ainda mais imprecisas e inexatas as medidas diretas dessa grandeza termodinâmica. Assim as diferenças de capacidade calorífica entre os estados nativo ($C_{p,N}$) e desnaturado ($C_{p,D}$) das isoformas de tripsina foram obtidas através da

perturbação do sistema termodinâmico a fim de gerar dados para um ajuste linear de ΔH_{cal} x T_m (equações 11 a 13).

A dependência de $\Delta H_{(T_m)}$ e T_m permitem calcular ΔC_p , que é a variação da capacidade calorífica entre a forma nativa e desnaturada da proteína. De fato, tem-se:

$$\Delta C_p = \left(\frac{\partial \Delta H_{cal}}{\partial T_m} \right)_p \therefore \text{Equação-11 (Cooper, 2001)}$$

Integrando-se entre os limites (para ΔC_p constante) tem-se:

$$\int_{\Delta H(T_m)}^{\Delta H(T)} d\Delta H = \Delta C_p \times \int_{T_m}^T dT \quad \text{Equação-12 (Cooper, 2001)}$$

$$\Delta H_{(T)} = \Delta H_{(T_m)} + \Delta C_p \times (T - T_m), \quad \text{Equação-13 (Cooper, 2001)}$$

$$Y = b + ax$$

De acordo com a equação-13 deve existir uma relação linear entre ΔH e T , e um coeficiente angular que permite avaliar o ΔC_p . De maneira análoga, pode-se demonstrar que:

$$\Delta S_{(T)} = \Delta S_{(T_m)} + \Delta C_p \times \ln(T / T_m) \therefore \text{Equação-14 (Cooper, 2001)}$$

$$\Delta H_{(T)} = \Delta H_{(T_m)} + \Delta C_p \times (T - T_m) \therefore \text{Equação-15 (Cooper, 2001)}$$

Assim, observando-se as equações 11 e 13 é fácil deduzir que para poder determinar-se o ΔC_p do tripsinogênio e das isoformas α - e ψ -tripsina é necessário construir um gráfico de $\Delta H_{cal} \times T_m$ (Fig.42) que gerará uma reta onde a inclinação desta será o ΔC_p . Portanto é necessário conduzir a desnaturação térmica de cada proteína em condições físico-químicas diferentes.

Como pode ser visto nas Figuras 42, 43 e 44, para as três moléculas, os ajustes lineares dos dados mostraram-se satisfatórios, apresentando valores de $R \geq 0,95$. Todos os ajustes forneceram um valor de inclinação, ou seja, coeficiente angular da reta sendo: $1,90 \pm 0,13$; $1,96 \pm 0,18$; $1,51 \pm 0,16$ respectivamente para tripsinogênio, α - e ψ -tripsina e estes valores são as respectivas diferenças de capacidades caloríficas ($\text{kcal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) entre o estado nativo e o estado desnaturado. Também poder ser notado que para faixa de temperatura em que as proteínas foram investigadas ($20-80^\circ$ ou $293-353 \text{ K}$) a capacidade calorífica foi constante, podendo assim os valores ΔC_p obtidos ser relacionados confiantemente às moléculas em questão.

Quando são comparados os resultados de ΔC_p para as moléculas testadas e o valor obtido para β -tripsina por Bittar e cols., (2003) que foi de $2,60 \pm 0,007 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ pode se notar que o ΔC_p tem a seguinte ordem: β -tripsina > α -tripsina > tripsinogênio > ψ -tripsina.

O efeito da variação da capacidade calorífica é um importante parâmetro termodinâmico porque ele é principalmente determinado pela mudança na hidratação da proteína quando se desnatura. Desde que efeitos de hidratação são proporcionais a áreas superficiais expostas de resíduos apolares, a mudança da capacidade calorífica rende extensa informação sobre a distribuição de polaridade das isoformas (Spolar & Record J.r. ,1994).

Tomando em conta o que foi dito acima, os dados sugerem que a isoforma α -tripsina nativa expõe uma menor área superficial apolar ao desnaturar-se que a β -tripsina. Portanto, possivelmente a estrutura globular da α -tripsina é menos compacta e possui menor número de contatos entre resíduos hidrofóbicos quando comparada à β -tripsina (Spolar & Record J.r. ,1994) Este mesmo raciocínio pode ser aplicado para a isoforma ψ -tripsina para explicar a diminuição do ΔC_p relativo à sua isoforma precursora a α -tripsina.

A comparação dos valores de ΔC_p revela que durante fluxo de conversão de tripsinogênio até ψ -tripsina existe uma relação direta entre mudanças estruturais (secundárias e terciárias) e a variação da capacidade calorífica. Um exemplo claro desta afirmação pode ser vista a partir de nossos dados experimentais de calorimetria para a molécula de tripsinogênio, pois o ΔC_p da molécula precursora e inativa enzimaticamente (tripsinogênio) ao converter-se na a primeira molécula ativa da série (i.e. a β -tripsina) tem o valor de ΔC_p aumentado. Esta observação experimental é condizente com dados estruturais relativos à conversão, pois a formação de β -tripsina é feita pela perda de um hexapeptídeo N- terminal superficial e logo após a clivagem o novo grupamento α -amino da ILE-7 faz uma ponte salina com a cadeia lateral do resíduo ASP-194 no interior da molécula diminuindo-se assim a flexibilidade do N-terminal. Outras mudanças em relação à estrutura secundária também acontecem durante a conversão, fazendo que a β -tripsina seja uma molécula mais compacta, rígida e mais estável do que seu precursor.

Este raciocínio de aumento da capacidade calorífica é valido somente para a transformação do precursor inativo na molécula mais ativa de tripsina (β -tripsina) que não possui nenhuma clivagem interna na cadeia polipeptídica. Para as outras isoformas

a α - e ψ -tripsina que possuem ambas uma e duas clivagens internas na cadeia polipeptídica, as suas formações são seguidas de diminuição da diferença da capacidade calorífica entre os estados nativo e desnaturado e de perda da estabilidade (T_m).

Como indicam dados da variação da capacidade calorífica a sequência de eventos e ajustes conformacionais durante a conversão de β até ψ -tripsina deve ocasionar uma diminuição do número de contatos hidrofóbicos na proteína enovelada e conseqüentemente um arranjo tridimensional mais frouxo (maior volume hidrodinâmico). Para testar esta hipótese, testes de variação do raio hidrodinâmico foram conduzidos e os resultados serão mostrados nos itens seguintes.

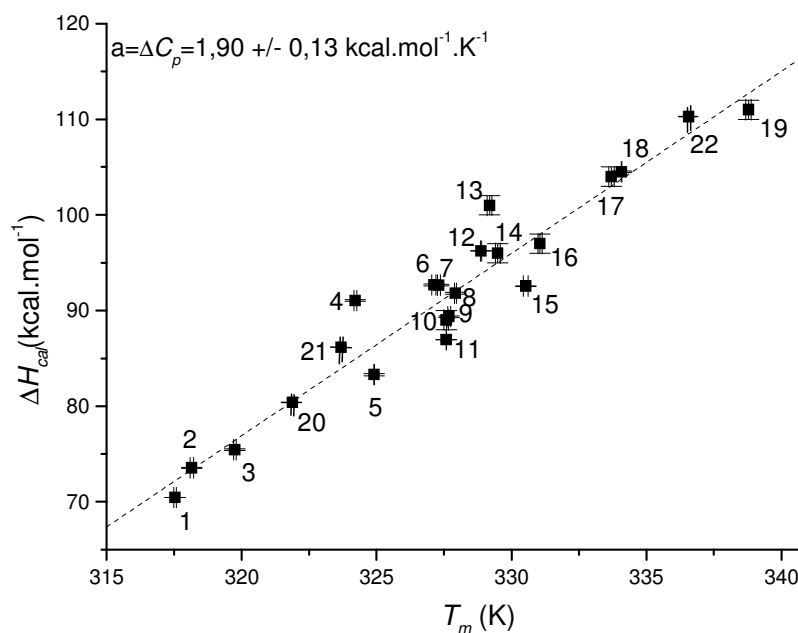


Figura 42: ΔH_{cal} em função de T_m para o tripsinogênio. Os dados representados são valores de ΔH_{cal} e T_m originados da desnaturação térmica em testes de variação de pH e em outras condições: 50 mmol.L⁻¹ de uma solução tampão específica (acetato de sódio ou glicina), mais CaCl₂ a 20 mmol L⁻¹. 1 (pH 2,7); 2 (pH 2,8); 3 (pH 3,0); 4 (1,8 mg. mL⁻¹ de tripsinogênio em pH); 5 (1,8 mg. mL⁻¹ de tripsinogênio em pH 3,0); 6 (2,0 mg. mL⁻¹ de tripsinogênio em pH 3,0); 7 (cloreto de guanidínio-Gdn-HCl, 500 mmol.L⁻¹, pH 3,0); 8 (Gdn-HCl a 625 mmol.L⁻¹, pH 3,0); 9 (Gdn-HCl a 750 mmol.L⁻¹, pH 3,0); 10 (sarcosina-HCl a 100 mmol.L⁻¹, pH 3,0); 11 (manitol a 250 mmol.L⁻¹, pH 3,0); 12 (manitol a 500 mmol.L⁻¹, pH 3,0) e 13 (NaCl a 50 mmol.L⁻¹, pH 3,0), 14 (NaCl a 100 mmol.L⁻¹, pH 3,0), 15 (NaCl a 250 mmol.L⁻¹, pH 3,0); 16 (manitol a 500 mmol.L⁻¹, pH 3,2); 17 (manitol a 500 mmol.L⁻¹, pH 3,75), 18 (pH 4,0), 19 (pH 4,5), 20 (pH 3,3), 21 (pH 3,7). Uma regressão linear foi imposta aos dados para fazer o ajuste e o ΔC_p foi determinado pela inclinação da reta originada. Erros verticais e horizontais são representados por barras nos pontos experimentais, ilustrando os desvios padrões obtidos de medidas em triplicatas.

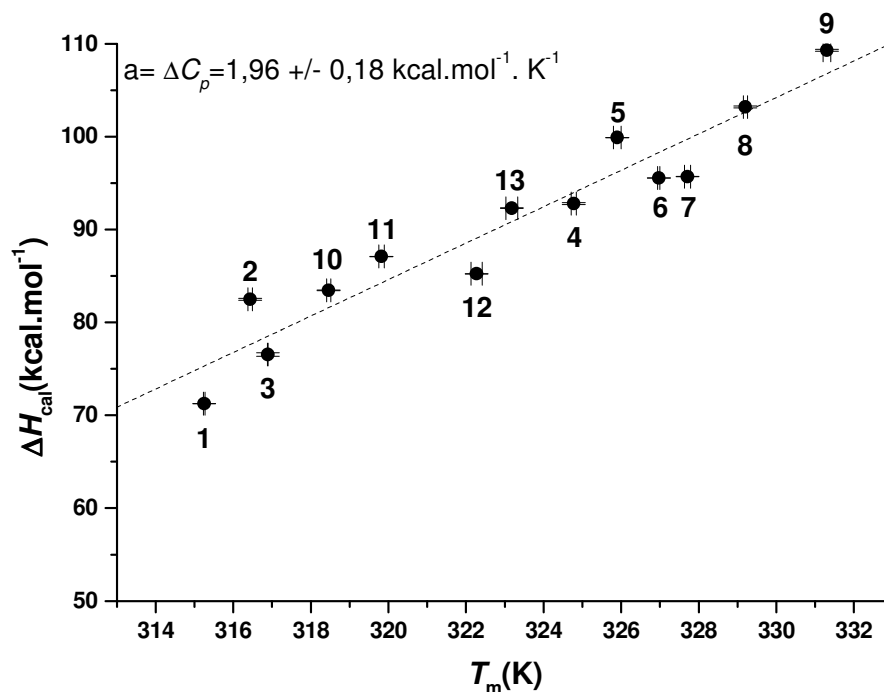


Figura 43: ΔH_{cal} em função de T_m para a α -tripsina. Condições experimentais foram 50,0 mmol.L⁻¹ de uma solução tampão para um dado valor de pH (β -alanina, acetato de sódio, citrato de sódio), CaCl₂ a 20,0 mol.L⁻¹ mais: 1 (cloreto de guanidínio-GdnHCl- a 0,50 mol.L⁻¹, pH 3,0); 2 (Gdn-HCl a 0,40 mol.L⁻¹, pH 3,0); 3 (pH 2,25); 4 (pH 2,8); 5 (pH 3,0); 6 (sorbitol a 0,50 mol.L⁻¹, pH 3,0); 7 (pH 3,0 sem CaCl₂); 8 (pH 3,2); 9 (sorbitol a 1,50 mol.L⁻¹, pH 3,0); 10 (pH 2,5); 11 (pH 2,6); 12 (pH 2,7) e 13 (pH 2,75). Uma regressão linear foi imposta aos dados para fazer o ajuste e o ΔC_p foi determinado pela inclinação da reta originada. Erros verticais e horizontais são representados por barras nos pontos experimentais, ilustrando os desvios padrões obtidos de medidas em triplicatas.

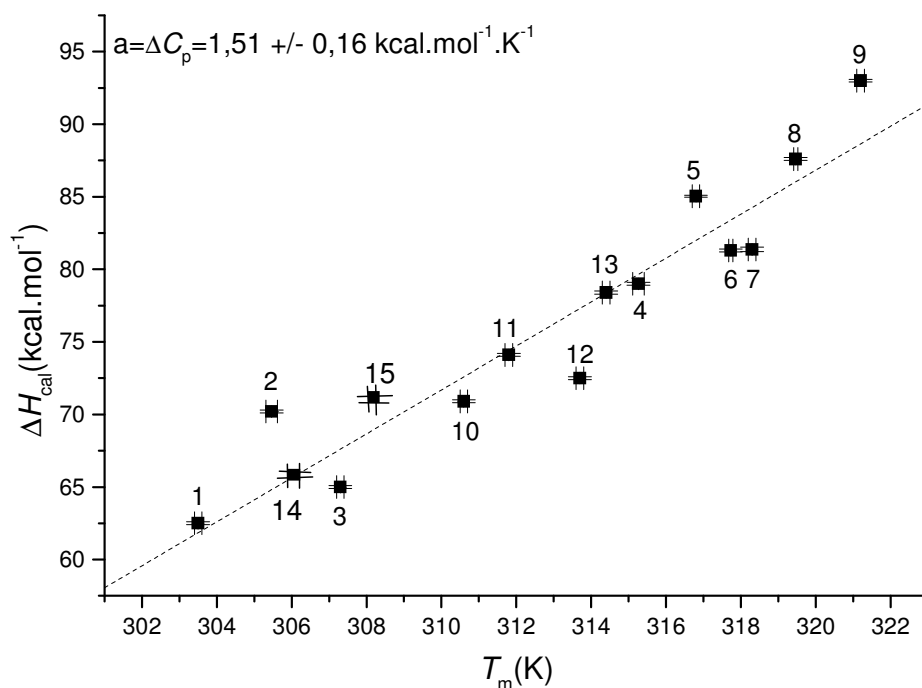


Figura 44: ΔH_{cal} em função de T_m para a ψ -tripsina. Dados representados são valores de ΔH_{cal} e T_m originados da desnaturação térmica em testes de variação de pH e em outras condições: 50 mmol.L⁻¹ de um tampão específico (acetato de sódio ou glicina), mais 20 mmol L⁻¹ CaCl₂: 1 (cloreto de guanidínio-Gdn-HCl- a 0,50 mol L⁻¹, pH 3,0); 2 (GdnCl a 0,40 mol L⁻¹, pH 3,0); 3 (pH 2,2); 4 (pH 2,9); 5 (pH 3,0); 6 (sorbitol a 0,50 mol L⁻¹, pH 3,0); 7 (pH 3,0 sem CaCl₂); 8 (pH 3,2); 9 (sorbitol a 1,50 mol L⁻¹, pH 3,0); 10 (pH 2,5); 11 (pH 2,6); 12 (pH 2,7) e 13 (pH 2,8), 14 (pH 2,0), 15 (GdnCl a 0,1 mol.L⁻¹, pH 2,5). Uma regressão linear foi imposta aos dados para fazer o ajuste e o ΔC_p foi determinado pela inclinação da reta originada. Erros verticais e horizontais são representados por barras nos pontos experimentais, ilustrando os desvios padrões obtidos de medidas em triplicatas.

Desde que o valor de ΔC_p foi calculado para o tripsinogênio e para as isoformas α - e ψ - tripsina , pode-se calcular a $\Delta S_{(298K)}$ a partir da equação-14 e a $\Delta H_{(298K)}$ pela equação-15 para ambas as moléculas. Os resultados para $\Delta H_{(298K)}$ e $\Delta S_{(298K)}$ estão apresentados na Tabela-18:

Tabela 18: Determinação de $\Delta H_{(298K)}$ e $\Delta S_{(298K)}$ para tripsinogênio, β -, α -, e ψ -tripsina em pH 3,0.

	$\Delta H_{(298K)}$ (kcal.mol ⁻¹)	$\Delta S_{(298K)}$ (kcal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
Tripsinogênio	31,46	0,088
β -tripsina*	29,30	0,079
α -tripsina	44,41	0,128
ψ -tripsina	56,91	0,177

* Valores obtidos com dados de Bittar e cols., (2003).

Como pode ser observado na Tabela-18, tanto a $\Delta H_{(298K)}$ como a $\Delta S_{(298K)}$ sofrem um aumento durante a conversão de tripsinogênio a ψ -tripsina. O aumento da entropia do sistema a 298K pode ser relacionado juntamente com os outros parâmetros como o ΔC_p , mostrando que a entropia conformacional do sistema aumenta e que provavelmente o volume hidrodinâmico das isoformas de tripsina aumenta e ocorre uma diminuição da estabilidade das proteínas após a conversão enzimática.

5.2.3.6 Determinação do $\Delta G_{(298K)}$, $T_s=T_{max}$ (temperatura de máxima estabilidade) e do T_m' (temperatura de desnaturação a frio) de tripsinogênio, α - e ψ -tripsina em pH 3,0.

Uma vez conhecidos $\Delta H_{(T_m)}$, T_m e ΔC_p , para o tripsinogênio e para as isoformas de tripsina pode-se calcular a estabilidade das proteínas através da energia livre de Gibbs (ΔG) na faixa de temperatura de interesse de acordo com a equação descrita por Pace e cols., (1990):

$$\Delta G_{(T)} = \Delta H_{(T_m)} \times (1 - T/T_m) - \Delta C_p \times [(T_m - T) + T \times \ln(T/T_m)] \quad \text{Equação-16:}$$

Para visualizar melhor a tendência da curva de $\Delta G_{(T)} \times T$ utilizou-se a equação-16 para construir um gráfico de $\Delta G_{(T)} \times T$ (Fig.45). Os resultados de $\Delta G_{(298K)}$ e T_m' obtidos com aplicação da equação-16 estão dispostos na Tabela-19.

Tabela 19: Determinação de $\Delta G_{(298K)}$ e do T_m' para tripsinogênio, β -, α - e ψ -tripsina em pH 3,0. Os erros experimentais para os valores de ΔG_{298K} foram determinados através do método descrito por Becketl & Schellman (1987) para curvas de estabilidade termodinâmicas.

	$\Delta G_{(298K)}$	T_m'
	(kcal.mol ⁻¹)	(K)
tripsinogênio	5,2 ± 0,2	242
* β -tripsina	5,7 ± 0,2	249
α -tripsina	6,1 ± 0,5	236
ψ -tripsina	4,2 ± 0,8	216

* Valores obtidos com dados de Bittar e cols., (2003).

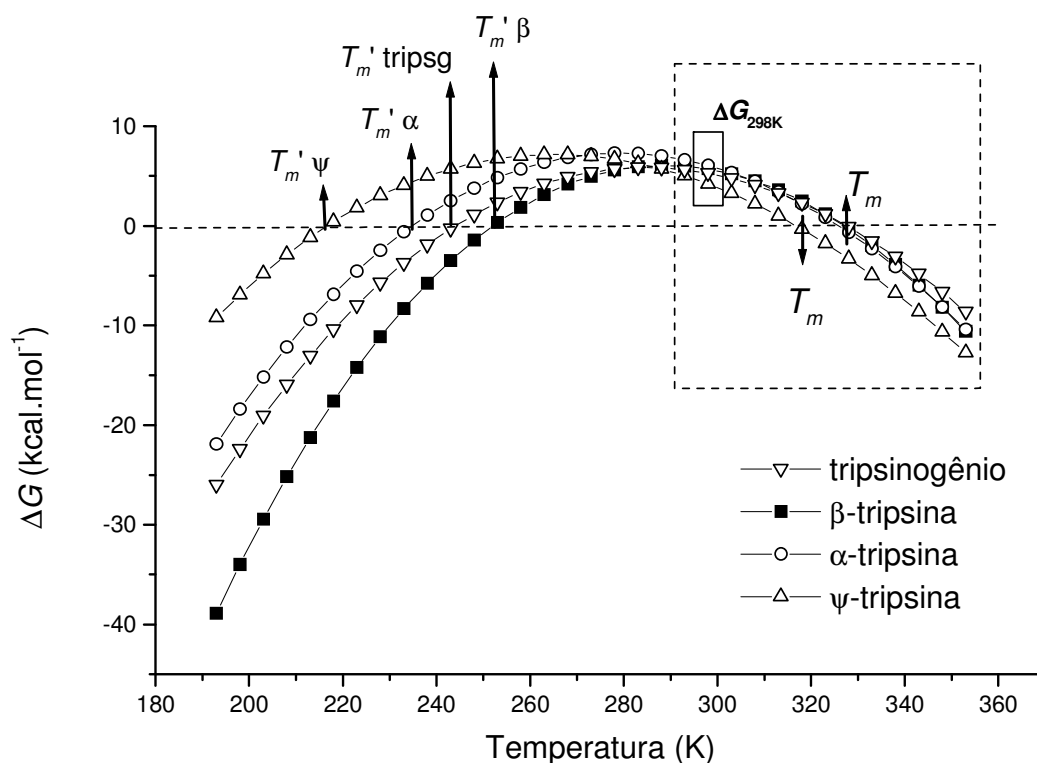


Figura 45: Curva de estabilidade termodinâmica para tripsinogênio, β -, α - e ψ -tripsina em pH 3,0. T_m = Temperatura de desnaturação a quente e T_m' = temperatura de desnaturação a frio, $\Delta G_{(298K)} = \Delta G$ calculado para a temperatura de 25°C circunscrito no retângulo com linha sólida, tripsg= tripsinogênio, retângulo com linha tracejada demonstra a faixa de temperatura acessada experimentalmente no DSC.

Como pode ser visto na Tabela-19, as diferenças nas estabilidades termodinâmicas relativo as variações de energia livre de *Gibbs* à temperatura ambiente reforçam a idéia que os outros parâmetros termodinâmicos têm apontado nos itens acima. Assim a molécula de tripsinogênio ao se converter-se na molécula ativa a β -tripsina torna-se mais estável (aumento de 0,5 Kcal.mol) e a molécula de β -tripsina ao se converter-se em α -tripsina permanece estatisticamente (teste *t de student*) com a mesma estabilidade. A semelhança de estabilidade entre as isoformas β - e α -tripsina possivelmente refletem semelhanças estruturais e de atividade enzimática.

Um aspecto interessante e que também foi observado para outros parâmetros é que após a conversão de α - em ψ -tripsina a estabilidade da enzima diminui para um valor um pouco menor que aquele encontrado para molécula de tripsinogênio. O valor de ΔG_{298K} para ψ -tripsina indica que após a última etapa de conversão, a isoforma enzimática torna-se a menos estável da série. Isto pode ser justificado devido a uma possível marcante diferença estrutural (estrutura secundária) e enzimática (possui atividade amidásica quase nula) que esta isoforma apresenta em relação às outras isoformas.

A Figura-45 permite comparar as tendências de estabilidade entre o tripsinogênio e as isoformas de tripsina. O tripsinogênio e as isoformas β - e α -tripsina na faixa de temperatura de 353 a 288 K seguem um comportamento termodinâmico semelhante com pequenas diferenças no valor no eixo Y, já a isoforma ψ -tripsina nesta faixa de temperatura apresentou um valor menor no eixo Y, que ocasiona um deslocamento na curva, porém a mesma apresenta para esta faixa de temperatura analisada uma semelhança com as outras curvas relativo ao setor analisado das outras

isoformas de tripsina e o tripsinogênio. Para temperaturas abaixo de 288 K tanto tripsinogênio quanto as isoformas de tripsina diferem em seu comportamento termodinâmico na curva de estabilidade.

Outro parâmetro importante que pode ser obtido por extrapolação das curvas de estabilidade termodinâmica é a temperatura de desnaturação a frio ou T_m' que pode ser obtida do ponto (com $T < 273$ K) onde a curva de estabilidade de proteínas tem valor de $\Delta G = 0$. Deve se salientar que o valor de T_m' é um valor estimado na curva de estabilidade, pois este parâmetro é de difícil obtenção experimentalmente sendo poucas vezes medido para algumas proteínas (Privalov, 1990). Pode-se notar na Figura-45 que as curvas de estabilidade apresentam larguras fortemente influenciadas (Equação-16) pelo valor de ΔC_p , ou seja, quanto menor o valor de ΔC_p maior será a concavidade da curva (Becktel & Schellman, 1987 e Haynie, 2001-b e c). Esta observação é interessante visto que esta variação da concavidade da curva influencia diretamente no valor do parâmetro T_m' , mostrando mais uma vez a importância na determinação exata e precisa da grandeza termodinâmica ΔC_p . Estas informações sobre o T_m' das moléculas testadas são de grande importância no que diz respeito às condições de armazenamento destas enzimas a baixas temperaturas. Pode-se notar na curva da Figura-45 que a ordem crescente de estabilidade relativo a T_m é β -tripsina < tripsinogênio < α -tripsina < ψ -tripsina. Uma informação interessante e vista nesta relação, porém não é possível saber se as proteínas submetidas a baixas temperaturas continuam sendo monoméricas ou passam por transformações supramoleculares assumindo outras ordens de organização estrutural (dímeros, trímeros...). Apesar disto algumas informações úteis podem ser tiradas destes valores referentes a condições de temperatura de armazenamento. A curva de estabilidade ainda fornece outro parâmetro importante, o $T_s = T_{max}$ que é a

temperatura de máxima estabilidade da molécula, ou seja, o ponto máximo da função de segundo grau e que pode ser obtido por duas maneiras:

1- Quando a primeira derivada da equação da parábola invertida é igual a zero ($y'=0$), pois o resultado irá apontar para o máximo da função, assim, por exemplo, para isoforma α -tripsina tem-se que:

$$Y = -0,00364X^2 + 2,04757X - 280,65194$$

$$Y' = 0 = 2 \times (-0,00364 X) + 2,04757 + 0$$

$$X = 2,04757 / 2 \times (0,00364)$$

$$X = 281,0 = 281 \text{ K} = T_s$$

2- Uma segunda alternativa para se calcular o T_s é usar a equação descrita por Becketl & Schellman, (1987) que demonstra que:

$$\ln\left(\frac{T_m}{T_s}\right) = \frac{\Delta S_{T_m}}{\Delta C_p} \quad \text{Equação-17}$$

O resultado dos valores calculados de T_s para tripsinogênio, e para as isoformas de tripsina usando os dois modos de cálculo estão disposto na Tabela-20.

Tabela 20: Análise comparativa de métodos de cálculo da determinação do T_s para tripsinogênio, β -, α - e ψ -tripsina em pH 3.0.

	T_s (K)	T_s (K)
	Equação -17	Cálculo diferencial
tripsinogênio	287,1	287,2
* β -tripsina	290,0	289,8
α -tripsina	281,4	281,2
ψ -tripsina	267,7	267,8

* Valores obtidos com dados de Bittar e cols., (2003).

A determinação deste parâmetro (T_s) tem importância relevante no estudo de estabilidade e armazenamento de proteínas, pois o valor de T_s revela a temperatura na qual a proteína é mais estável, ou seja, aquela na qual a proteína tem maior resistência à desnaturação por agentes químicos. Deste modo, analisando-se a tabela-20, pode-se observar que o tripsinogênio e as isoformas β - e α -tripsina apresentam valores positivos de T_s , não sendo portanto necessário armazenar estas proteínas em temperaturas abaixo de 273 K para fins de estabilidade (termodinâmica) protéica.

Apenas a isoforma ψ -tripsina apresentou valor de T_s inferior a 273 K, sugerindo que a proteína deva ser armazenada sob refrigeração.

5.3 Determinação do Raio de Stokes (RS) em pH 3,0 para tripsinogênio, e para as isoformas β -, α -, ψ - tripsina.

O sistema cromatográfico utilizado para a determinação do raio de Stokes do tripsinogênio e das isoformas de tripsina foi padronizado com sucesso e apresentou resultados satisfatórios visto que os valor dos coeficientes de correlação para os ajuste lineares entre log MM (logaritmo da massa molecular) e o tempo de retenção foi de 0,9973 e o do ajuste linear para a relação entre o Raio de Stokes e MM (massa molecular) foi de 0,9998. A exatidão do sistema montado para a determinação da massa molecular foi testada usando uma amostra de tripsina comercial bovina, cujo valor determinado por MALDI-TOF é de 23.294 Da e no sistema cromatográfico apresentou um valor de 23.150 Da, ou seja, um erro de 144 Da. Assim o sistema mostrou, dentro de condições experimentais e técnicas que admitem um erro de $\pm 10\%$ MM (Witaker., 1963 e Goetz e cols., 2004), ser útil para o propósito ao qual foi destinado.

Após a determinação dos parâmetros termodinâmicos (ΔC_p , $\Delta T_{1/2}$, T_m e ΔG_T) uma hipótese foi levantada de que a conversão de tripsinogênio até ψ -tripsina ocasiona mudanças no volume hidrodinâmico das proteínas em questão e que a ordenação dos volumes hidrodinâmicos seria a seguinte: ψ -tripsina < tripsinogênio \cong α -tripsina > β -tripsina.

A determinação do Raio de Stokes (RS) e conseqüentemente a avaliação do volume hidrodinâmico ($V_H=4/3 \pi R^3$) do tripsinogênio e das isoformas de tripsina por meio de cromatografia de exclusão molecular permitiu observar as variações neste parâmetro quando ocorrem a ativação e a conversão enzimática destas proteínas e também confirmar a hipótese e que à medida que a capacidade calorífica abaixa o número de contatos hidrofóbicos na proteína nativa diminui ocasionando uma pequena variação no Raio de Stokes, ou seja, no volume hidrodinâmico da proteína.

Conforme pode ser visto na Figura-46, a variação do raio de Stokes segue uma tendência prevista por toda esta tese de que a molécula de tripsinogênio ao converter-se em β -tripsina torna-se mais estável e por conseqüência o volume hidrodinâmico diminui dando origem a uma proteína de estrutura mais compacta. Esta previsão foi confirmada com a variação do RS de tripsinogênio para β -tripsina de um valor de $-0,19 \text{ \AA}$. A partir de β -tripsina a predição é que as isoformas devem ter o número de contatos hidrofóbicos reduzidos e conseqüentemente devem ficar menos estáveis, com um aumento do raio de Stokes (volume hidrodinâmico). A variação do raio de Stokes na conversão de β - para α -tripsina foi de $0,27 \text{ \AA}$ e de α - para ψ -tripsina foi de $2,22 \text{ \AA}$. Assim as determinações de raios de Stokes (volumes hidrodinâmicos foram importantes para confirmar as predições feitas por parâmetros termodinâmicos e mostrar a

confiabilidade de medidas termodinâmicas para sistemas poliméricos e biomoléculas (Privalov & Dragan, 2004).

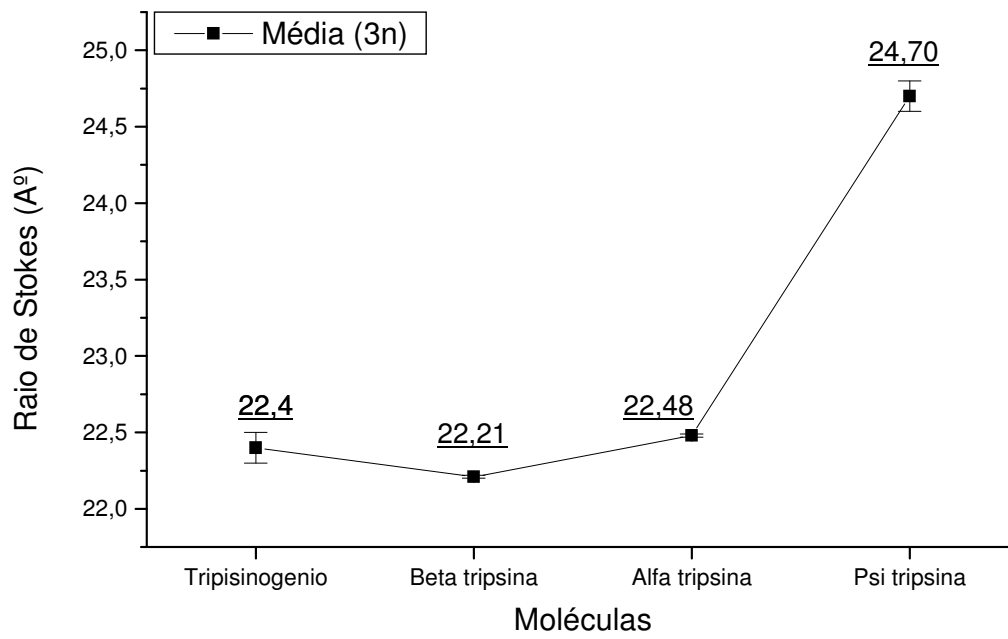


Figura 46: Determinação do Raio de Stokes para o tripsinogênio e para as isoformas β -, α -, ψ -tripsina em pH 3,0, usando cromatografia de exclusão molecular em uma coluna Ultra hydrogel Tm 250 da Millipore®

6. CONCLUSÕES

- A metodologia de otimização de purificação e isolamento de isoformas de tripsina mostrou-se satisfatória, pois foi possível purificar quantidades elevadas das isoformas de tripsina com separação completa entre as isoformas β - e α -tripsina e uma resolução satisfatória entre α - e ψ -tripsina.
- As isoformas purificadas tiveram algumas propriedades bioquímicas determinadas (massa molecular, atividade enzimática) com sucesso sendo identificadas e quantificadas precisamente.
- O sistema de cromatografia de bancada (90 x 2,2 Di) montado para purificar isoformas de tripsina mostrou-se robusto, relativamente rápido e econômico, visto que pode ser utilizado até seis vezes sem ser regenerado e reempacotado e pode ser montado facilmente em qualquer laboratório sem o uso de equipamentos sofisticados para seu funcionamento. Além disso o sistema cromatográfico mostrou ser versátil ao purificar com uma resolução satisfatória tripsinas comerciais de marcas e lotes variados.
- O uso de fundamentos de físico-química, química analítica, inorgânica e orgânica, biofísica molecular e bioquímica aplicados para resolver o problema da otimização da purificação das isoformas de tripsina mostrou-se útil. Estes conhecimentos foram muito úteis no planejamento experimental em todo projeto de purificação de proteínas que gastou aproximadamente 40% do tempo ou mais no planejamento experimental.
- A aplicação de teorias de química analítica quantitativa em sistemas de cromatografia de bancada proporcionou o emprego da resolução cromatográfica

como um parâmetro quantitativo e monitorar a eficiência quantitativa dos testes realizados em vez de parâmetros qualitativos comumente usados em pesquisa bioquímica.

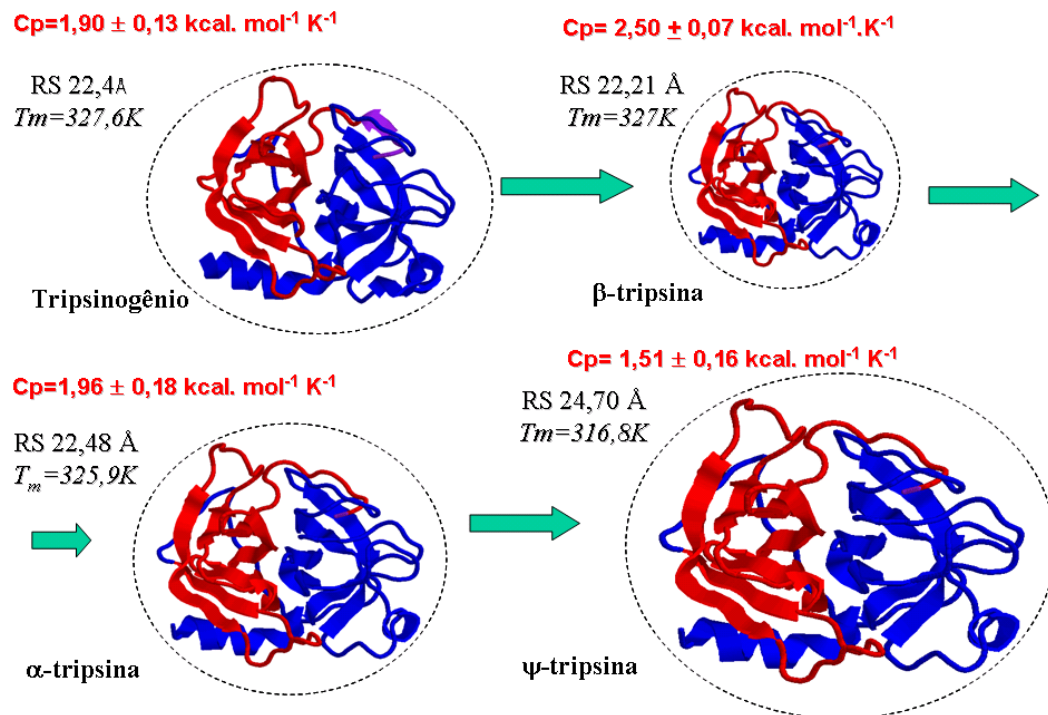
- O uso de uma metodologia de controle de qualidade (determinação de “*shelf life*”, “*half life*”, perfil de transformação das isoformas de tripsina e influência da misturas) para poder monitorar a degradação química, perda de atividade enzimática e conversão de isoformas de tripsina usado nesta tese mostrou ser muito útil, visto que as isoformas de tripsina usadas nos estudos físico-químicos forneceram dados precisos e exatos quando foram mensuradas suas propriedades termodinâmicas.
- A metodologia de purificação das isoformas de tripsina após a otimização mostrou não interferir na atividade nem na estabilidade das enzimas durante o intervalo de purificação, pois as enzimas purificadas apresentaram atividades amidásica e esterásica elevadas e porcentagens superiores a 95% de sítios ativos após a purificação.
- O sistema de purificação em maior escala (130 x 7,4 cm Di) das isoformas de tripsina desenvolvido foi considerado satisfatório desde que produziu altas quantidades elevadas das isoformas de tripsina em um tempo relativamente curto, podendo o mesmo ser ocnstruído facilmente em qualquer laboratório sem o uso de equipamentos sofisticados.
- O tripsinogênio comercial bovino está puro e livre de contaminantes não necessitando ser conduzido nenhum tipo de metodologia de purificação.
- O calorímetro diferencial de varredura mostrou ser uma ferramenta útil e com alta resolução, capaz de detectar pequenas diferenças termodinâmicas com precisão e exatidão elevadas.

- As proteínas testadas (tripsinogênio e isoformas da tripsina) apresentaram alta reversibilidade ($\geq 95\%$) para o processo de desnaturação térmica e todas têm este processo dirigido termodinamicamente.
- As curvas de desnaturação térmica originadas para as proteínas estudadas ajustam-se bem a um modelo que assume uma transição reversível em dois estados e as isotermas apresentaram-se simétricas.
- Os parâmetros termodinâmicos determinados para as proteínas em questão foram considerados satisfatórios dentro dos erros experimentais inerentes da metodologia e das condições físico-químicas de cada proteína.
- A concentração de proteínas e o pH possuem uma influência marcante na relação de $\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$, para as proteínas analisadas, sendo mais pronunciada para a isoforma ψ -tripsina.
- A concentração de proteínas e o pH possuem uma influência marcante na relação de $\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$ para as proteínas analisadas, sendo mais pronunciada para a isoforma ψ -tripsina.
- Os parâmetros T_m , $\Delta T_{1/2}$, $\Delta S_{(T_m)}$, $\Delta S_{(298K)}$, ΔC_p e $\Delta G_{(298K)}$ medidos em pH 3,0, sugerem que durante a conversão de β - a ψ -tripsina (passando pela α -tripsina) ocorre uma diminuição gradual da estabilidade termodinâmica destas enzimas, fazendo que se tornem mais flexíveis e mais frouxas e provavelmente tenham um maior volume hidrodinâmico (raio de Stokes).
- A determinação do Raio de Stokes por SEC confirmou a previsão feita pelos parâmetros termodinâmicos para o tripsinogênio e para as isoformas de tripsina de que na conversão da β -tripsina a α -tripsina e a ψ -tripsina ocorre um aumento do raio de Stokes e conseqüentemente o volume hidrodinâmico.

- Os dados obtidos nesta tese para isoformas de tripsina em pH 3,0 sugerem que a conversão das isoformas de tripsina além da isoforma β -tripsina possa ser uma das vias de inativação fisiológica das isoformas de tripsina, fazendo que estas não fiquem ativas no sistema digestivo além do tempo necessário, o que seria prejudicial para o sistema digestivo. Esta sugestão é baseada em dados que mostram que à medida que a β -tripsina é hidrolisada para α -tripsina e esta para ψ -tripsina se processa alguns parâmetros físico-químicos e bioquímicos variam significativamente como:

- Redução após conversão enzimática das isoformas de tripsina dos parâmetros T_m , $\Delta T_{1/2}$, $\Delta S_{(T_m)}$, $\Delta S_{(298K)}$ e ΔC_p e $\Delta G_{(298K)}$;
- Aumento do raio de Stokes (volume hidrodinâmico);
- Diminuição da atividade amidásica;
- Diminuição da estabilidade temporal ou cinética;
- Aumento da propensão a reações irreversíveis (e.g. agregação, deamidação, desnaturação);
- Aumento da susceptibilidade a sofrer proteólise devido ao fato de a proteína estar mais frouxamente arranjada tridimensionalmente.

A análise conjunta destes parâmetros fornece evidências que suportam a hipótese de uma possível via de inativação das enzimas no sistema fisiológico (esquema 1).



- Esquema 1: Representação gráfica das conversões das isoformas de tripsina acompanhadas dos respectivos parâmetros termodinâmicos e dos Raios de Stokes.

7. PERSPECTIVAS

- Determinação de ΔG em meio alcalino para as isoformas de tripsina (β -tripsina, α -tripsina, e ψ -tripsina) por titulação potenciométrica em colaboração com o Professor Dr. Arno Gunter da Universidade Federal de Santa Catarina;
- Determinação da estrutura terciária por cristalografia e difração de raios X das isoformas α - e ψ -tripsina;
- Estudo termodinâmico e enzimático das isoformas α - e ψ -tripsina em solventes orgânicos;
- Pesquisa de bioformulação usando o DSC para uso de isoformas de tripsina em medicamentos em solução.
- Análise comparativa da estrutura secundária de β -, α - e ψ - tripsina em pH 3.0 por dicroísmo circular;
- Análise bioinformática usando dinâmica computacional para observação da transformação em sílico da isoforma β - à ψ - tripsina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AHMAD F., YADAV S. & TANEJAS S. (1992) Determining stability of proteins from guanidine chloride transitions curves. *Biochem. Jour.* 287: 481-485.

AL OLBEIDI M.A. & LIGHT A. (1988) Size exclusion high performance liquid chromatography of trypsinogen, the denatured protein, and partially refolded molecules. Further evidence that non native disulfide bonds are dominant in refolding the completely reduced protein. *J. Biol. Chem.* 263: 8642-8645.

ASCENZI P., MENEGATTI E., BORTOLOTTI F., GUARNERI M. & ANTONINI E. (1981) Steady-state and pre-steady-state kinetics of the trypsin-catalysed hydrolysis of alpha-CBZ-L-lysine-p-nitrophenyl ester. *Biochim. Biophys. Acta.* 658: 158-164.

BABA T., KASHIWABARA S., WATANABE K., ITOH H., MICHIKAWA Y., KIMURA K., TAKADA M., FUKAMIZU A. & ARAI, Y. (1989) Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogene based on the deduced primary structure. *J. Biol. Chem.* 264: 11920-11927.

BARRETT D. (1970) Zymogen activation as a sensitive enzyme amplifying assays for a protease with tryptic specificity. *Biochem. J.* 117: 57-59.

BECKTEL W.J. & SCHELLMAN J.A. (1987) Protein stability curves. *Biopolymers* 26: 1859-1877.

BEYNON R.J. & EASTERBY J.S. (1996) Effect of temperature on pH. In Buffer solutions the basic, Oxford England,. IRL PRESS, New York, p.31.

BHARDWAJ N., BHATNAGAR A. & SINGH A.K. (2005) Development and Evaluation of a Single vial Cold Kit for Infection Imaging: Tc-99m Ciprofloxacin. *J. Nucl. Med.* 4: 244-251.

BITTAR E.R., CALDEIRA F.R., SANTOS. A.M.C., GÜNTER A.R., ROGANA E. & SANTORO M.M. (2003) Characterization of β -trypsin at acid pH by Differential Scanning Calorimetry. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36: 1621-1627.

BODE W. & SCHWAGER P. (1975a) The refined crystal structure of bovine beta-trypsin at 1.8. Å of resolution. II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0. *J. Mol. Biol.* 98: 693-717.

BODE W. & SCHWAGER P. (1975b). The single calcium-binding site of crystalline bovine beta- trypsin. *FEBS Lett.* 56: 139-143.

BODE W., FEHLHAMMER H. & HUBER R. (1976) Crystal structure of bovine trypsinogen at 1,8 Å resolution. I. Data collection, application of patterson search techniques and preliminary structural interpretation. *J. Mol. Biol.* 106: 325-335.

BODE W., SCHWAGER. P. & HUBER R. (1978) The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding, The refined crystal structures of the bovine trypsinogen-pancreatic trypsin inhibitor complex and of its ternary complex with Ile-Val at 1,9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 118: 99-112.

BODE W., CHEN Z., BARTELS K., KUTZBACH C., SCHMIDT-KASTNER G & BARTUNIK H. (1983) Refined 2 Å X-ray crystal structure of porcine pancreatic kallikrein A, a specific trypsin-like serine proteinase: Crystallization, structure determination, crystallographic refinement, structure and its comparison with bovine trypsin. *J. Mol. Biol.* 164: 237-282.

BOLLAG D.M., ROZYCKI M.D. & EDELSTEIN S.J. (1996) Protein Methods, second edition, Wiley-Liss press, New York, pp.229-269.

BRANDTS J.F., HU C.Q., LIN L.N. & MOS M.T (1989) A simple model for proteins within interacting domains. Applications to scanning calorimetry data. *Biochemistry.* 28: 8588-8596.

BRUMANO M.H., ROGANA E. & SWAUSGOOD H.E. (2000) Thermodynamics of unfolding of beta-trypsin at pH 2.8. *Arch. Biochem. Biophys.* 382: 57-62.

CHASE JR. T. & SHAW E. (1967) p -Nitrophenyl- p-Guanidinobenzoate HCl: a new active site titrant for trypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29:508-514.

CHIANCONE E., DRAKENBERG T., TELEMAN O. & FORSÉN S. (1985) Dynamic and structural properties of the calcium binding site of bovine serine proteases and their zymogens. A multinuclear nuclear magnetic resonance and stopped-flow study. *J. Mol. Biol.* 185: 201-207.

COOPER A. & JOHNSON C. M. (1994) Differential Scanning Calorimetry, In: C, Jones, B, Mulloy & A, H, Thomas (editors), *Methods in Molecular Biology*, Vol 22: Microscopy, Optical Spectroscopy and Macroscopic Techniques, ch,10, Totowa, N, J: Human Press, 22:125-136.

COOPER A., NUTLEY M.A & WADOOD A. (2001) Differential Scanning Calorimetry, In: Harding, S, E., and Chowdhry, B, Z., (editors), *Protein-Ligand: Interactions: Hydrodynamics and calorimetry*, Oxford University Press INC, New York , pp, 287-317.

CORBETT R.J. & ROCHE R.S. (1984) Use of high-speed size-exclusion chromatography for the study of protein folding and stability. *Biochemistry*. 23: 1888-1894.

DAVIE E.W. & NEURATH H. (1955) Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. *J. Biol. Chem.* 212: 515-529.

DAVIE E.W., FUJIKAW A.K & KISIEL. W. (1991) The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. *Biochemistry* 30: 10363-10370.

DIAS C.L.F. (1986) Estudo cinético da autólise de β -tripsina bovina e o efeito de íons cálcio e temperatura. Tese de doutorado, Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG de Belo Horizonte-Brasil.

DILL K.A., OZKAN S.B., SHELL M.S. & WEIKL TR (2008) The protein folding problem. *Annu Rev Biophys.* 37:289-316.

EISENBERG D. & CROTHERS D. (1979) Energy and the First Law of Thermodynamics. In: PHYSICAL CHEMISTRY, with Applications to the Life Sciences, The benjamim Cummingd Publishing Company, INC, ch2. London, Amsterdan, Sidiney: 46-47.

ERLANGER B.F., KOKOWSKY N. & COHEN W. (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 271-278.

EVERSE J. & STOLZENBACH F.E. (1971) Liophilization: in *Methods. Enzymol.* 22: 33-39.

EYL A. & INAGAMI. T. (1970) Modification of carboxyl groups in the active site of trypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38: 149-155.

FOUCAULT G., KELLERSHOHN N., SEYDOUX F., YON J., PARQUET C. & ARRIO B. (1974a) Comparative study of some conformational properties of β -, α - and ψ - bovine trypsins. *Biochemie.* 56:1343-1350.

FOUCAULT G., SEYDOUX F. & YON J. (1974b) Comparative kinetic properties of α , β and ψ forms of trypsin. *Eur. J. Biochem.* 47: 295-302.

FREIRE E., MURPHY. K.P., SANCHEZ-RUIZ J.M., GALISTEO M.L & PRIVALOV P.L. (1992) The molecular basis of cooperativity in protein folding. Thermodynamic dissection of interdomain interactions in phosphoglycerate kinase. *Biochemistry*. 31:250-256.

GOETZ H., KUSCHEL M., WULFF T., SAUBER C., MILLER C., FISHER S. & WOODWARD C. (2004) Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 60: 281-293.

GRASSO D., LA ROSA C., MILARD D. & FASONE S. (1995) The effects of scan rate and protein concentration on DSC thermograms of bovine superoxide dismutase. *Thermochim. Acta*. 265: 163-175.

GRINBERG V.Y., BUROVA T.V., HAERTLÉ T. & TOLSTOGUZOV V. B. (2000) Interpretation of DSC data on protein denaturation complicated by kinetic and irreversible effects. *J. Biotechnol.* 79: 269-280.

GUNTHER A.R., SANTORO M.M. & ROGANA E., (1997), pH titration of native and unfolded β -trypsin: evaluation of the $\Delta\Delta G$ titration and the carboxyl pK values. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30: 1281-1286.

HARRIS D.C. (2001) Separações analíticas, Em: Análise Química Quantitativa, quinta edição, LTC press, Rio de Janeiro, pp,551-576.

HAYNIE D.T. (2001-a) Appendix B, In *Biological thermodynamics*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Australia, pp,335-337.

HAYNIE D.T. (2001-b) Gibbs free energy-applications, In *Biological thermodynamics*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Australia, pp, 119-178.

HAYNIE D.T. (2001-c), Statistical Thermodynamics, In *Biological thermodynamics*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Australia, pp,185-220.

HEMMINGER W. & SAGE S.M. (2000) Handbook of calorimetry, ch,1, Physikalisch-Technisch Bundesanstalt, Bundesallee 100, D-38116 Braunschweig, Germany.

HILSER V.J. (2001) Modeling the native state ensemble in protein structure, stability and folding. K. Murphy (ed) , Human press, Totow, NJ, *Methods. Mol. Biol.* 168: 93-116.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH); *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

JACKSON W. & BRANDTS J. (1970) Thermodynamics of protein denaturation. A calorimetric study of the reversible denaturation of chymotrypsinogen and conclusions regarding the accuracy of the two-state approximation. *Biochemistry* 9: 2294-2301.

KEIL B. (1971) Trypsin. In: Boyer, P.D. (editor). *The Enzymes*, 3rd ed., Academic Press, New York and London, vol.3, ch8: 257.

LAURENT T.C. & KILLANDER J. (1964). Theory of gel filtration + its Experimental verification. *J. Chromatogr.* 14: 303-317.

LEHARNE S. A. & CHOWDRY B.Z (1998) Thermodynamic background to differential scanning calorimetry, In *Biocalorimetry: Applications in the Biological Sciences*, John Wiley, Chichester, UK, 157–182.

LESK A.M. (2001) Evolution in selected proteins families, In: *Introduction to Protein Architecture*, Oxford University Press, Oxford, ch,6, pp, 204-216.

LESK A.M. & FORDMAN. W.D. (1996) Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. *J. Mol. Biol.* 258: 501-537.

MCDONALD M.R. & KUNITZ M. (1942). The effect of calcium and other ions on the autocatalytic formation of trypsin from trypsinogen. *J. Gen. Physiol.* 25:53-73.

MARTINS N.F. (1999) Purificação, caracterização e determinação da estabilidade termodinâmica de tripsinogênio e formas ativas de tripsina. Tese Doutorado, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG.

MARTINS. N.F. & SANTORO M.M. (1999) Partially folded intermediates during trypsinogen denaturation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32: 673-682.

MARTINS N.F., FERREIRA. E., TORRES. K. C. L. & SANTORO. M. M. (2003) The denaturation of α , β and ψ bovine trypsin at pH 3,0: evidence of intermediates. *Protein. Peptide. Lett.* 10: 73-81.

MAROUX S., ROVERY M. & DESNUELLE P (1966) Hydrolysis by bovine trypsin of some aromatic bonds in high molecular weight peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* 122:147-150.

MAROUX S., ROVERY M. & DESNUELLE P. (1967) An autolyzed and still active form of bovine trypsin. *Biochim. Biophys. Acta.* 140: 377-380.

MIKES O., HOLEYSOVSKY V., TOMÁSEK V. & SORM, F. (1966). Covalent structure of bovine trypsinogen. The position of the remaining amides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24: 346-352.

PACE C.N., SHIRLEY B. A. & THOMSON J. A. (1990) Measuring the Conformational Stability of a Protein, In: E, D, Creighton (Editor), Protein Structure, IRL Press, Oxford University Press, Oxford New York, Tokyo, pp, 311-329.

PEREIRA M.T., SILVA-ALVES J.M., MARTINS-JOSE A., LOPES J.C., & SANTORO M.M. (2005) Thermodynamic evaluation and modeling of proton and water exchange associated with benzamidine and berenil binding to beta-trypsin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38: 1593-1601.

PERKINS S.J & Wuthrich K. (1980) Conformation transition from trypsinogen to trypsin, ¹H nuclear magnetic resonance at 360MHz and ring current calculation. *J. Mol. Biol.* 138: 43-65.

PRIVALOV P.L & KHECHINASHVILI N.N. (1974) A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: A calorimetric study. *J. Mol. Biol.* 86: 665–684.

PRIVALOV P.L. & POTEKHIN. S.A. (1986) Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Methods. Enzymol* 131: 4-51.

PRIVALOV P. L. (1989) Thermodynamic problems of protein structure. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18: 47-69.

PRIVALOV P.L. (1990) Cold denaturation of proteins. *Crit. Rev. Biochem Mol. Biol.* 25: 281-305.

PRIVALOV P.L. (1997) Thermodynamics of protein folding. *J. Chem. Thermodyn.* 29: 447-474.

PRIVALOV P.L & DRAGAN A.I. (2007) Microcalorimetry of biological macromolecules. *Biophys. Chem.* 126: 16-24.

PROLYSIS: <http://delphy.phis.univ-tours.fr/Prolysis>.

RELKIN P. (1994) Differential Scanning calorimetry: a useful tool for studying protein denaturation. *Thermochim. Acta.* 246: 371-386.

ROBINSON N.C., NEURATH H & WALSH. K.A. (1973) The relation of the α -amino group of trypsin to enzyme function and zymogen activation, *Biochemistry* 12: 420-426.

SANTOS A.M.C., OLIVEIRA. J.S., BITTAR E.R., SILVA A.L., MARES-GUIA M.L & SANTORO M, M (2008) Improved purification process of β -and α -trypsin isoforms by ion-exchange chromatography. *Braz. Arch. Biol. Tech.* 51:711-721.

SANTOS A.M.C., SANTANA M.A. , GOMIDE F.T.F., MIRANDA A.A.C. , OLIBEIRA J.S., VILAS BOAS F.A.S. , VASCONCELOS A.B, BEMQUERER M.P. SANTORO, M.M (2009). Physical-chemical characterization and stability study of α -trypsin at pH 3.0 by differential scanning calorimetry. *InterJour Biol Macro* 42:278–284.

SCHROEDER D.D. & SHAW E. (1968) Chromatography of trypsin and its derivatives. Characterization of a new active form of bovine trypsin. *J. Biol. Chem.* 243: 2943-2949.

SHAW A. (1987) Guideline for Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologics, Food and Drug Administration, DHHS, Fishers Lane, Rockville MD.

SPOLAR R.S. & RECORD J.R M. T. (1994) Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science.* 263: 777-784.

SKOOG D.A. (1980) Principles of Instrumental Analysis, Third Edition. Saunders College Publishing, New York, pp.727-731.

SMITH R.L & SHAW E. (1969) Pseudotrypsin. A modified bovine trypsin produced by limited autodigestion. *J. Biol. Chem.* 244: 4704-4712.

STURTEVANT J.M (1987) Biochemical applications of differential scanning calorimetry. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 38: 463-488.

TAMURA A. & PRIVALOV. P.L. (1997) The entropy cost of protein association. *J. Mol. Biol.* 273: 1048-1060.

TEIXEIRA A.E. (1977). Purificação e caracterização de uma nova forma ativa de tripsina bovina. Dissertação de mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG. Brasil. 1977.

TISHCHENKO V.M. & GORODKOV B.G. (1979) Calorimetric investigation of thermal denaturing of β -trypsin. *Biofizika* 24: 334-335.

VINCENT J.P. & LAZDUNSKI M. (1976) Pre-existence of the active site in zymogens, the interaction of trypsinogen with the basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz). *FEBS Lett.* 63:240-244.

WALSH K.A. & NEURATH H. (1964a). Trypsinogen and chymotrypsinogen as homologous proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 52: 884-889.

WALSH K.A., KAUFFMAN D.L., KUMAR K.S. & NEURATH, H. (1964b). On the Structure and Function of Bovine trypsinogen and trypsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 51:301-308.

WALSH K.A. & WILCOX P.E. (1971) Serine protease. *Method. Enzymol.* 19: 31-41.

WITAKER. J.R. (1963) Determination of molecular weights of proteins by Gel filtration on sephadex. *Anal. Chem.* 35: 1950-1953.

9. APÊNDICES

Apêndice 1: Calibrações realizadas no calorímetro de varredura diferencial (DSC)

Calibração primária do eixo das abscissas: A fim de poder definir a exatidão das medidas do parâmetro T_m foi necessário fazer a aferição do calorímetro diferencial de varredura. Para este propósito foram utilizados dois padrões de lipídeos fornecidos pelo fabricante do calorímetro (Microcal®) para a aferição do eixo de temperaturas com valores de T_m conhecidos (lípedeo-1 com T_m de 28,1 °C e lípedeo-2 com dois valores de T_m um a 73,8 °C e outro a 75,9 °C). As câmaras do DSC foram preenchidas com água tipo I e os padrões foram imersos nela. Os padrões foram submetidos a uma corrida no DSC em uma faixa de temperatura de 10 a 90 °C a uma velocidade de varredura de 60 K.h⁻¹. Os resultados deste experimento são mostrados na Figura-47.

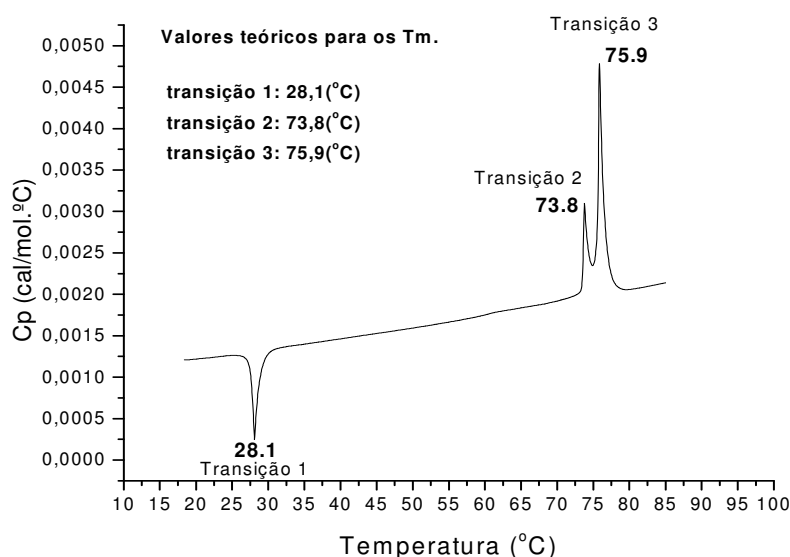


Figura 47: Calibração do eixo das abscissas do DSC com lípedes-padrões.

Como pode ser observado na Figura-47 os valores experimentais estão de acordo com os valores teóricos, sendo o calorímetro capaz de registrar uma diferença significativa de $\pm 0,1$ °C. Assim relativo ao teste do parâmetro da exatidão no eixo “x” o aparelho está em perfeito funcionamento e apto a poder realizar medidas com alta exatidão.

Calibração primária do eixo das ordenadas: A fim de poder verificar a exatidão dos registros de energia (calor) que é expressa no eixo y foram utilizados diversos pulsos elétricos em faixas variadas que simulam o sinal calorimétrico e permitiu-se o equipamento registrar estes valores para efeito de comparação.

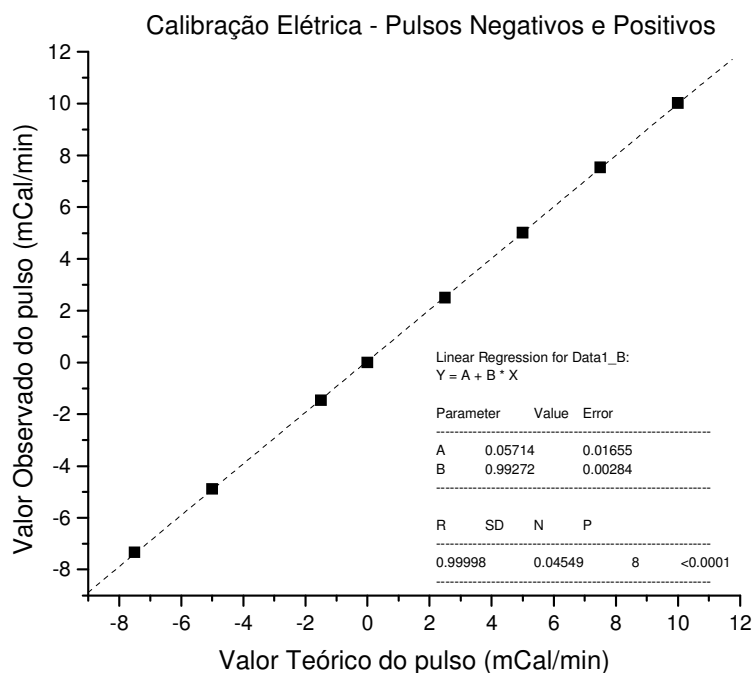


Figura 48: Calibração elétrica externa do calorímetro diferencial de varredura, usando pulsos de: -7,5, -5, -1,5, 0, 2,5, 5, 7,5, 10 mcal/mim, para aferir o eixo Y.

Como podem ser observados na figura-48, os pulsos elétricos fornecidos tiveram um registro exato no aparelho, pois com pode ser ver no inserto na figura-48 o valor do coeficiente de correlação da reta o R tem um valor de 0,99998, ou seja, os valores experimentais são similares ou quase iguais aos teóricos. Assim, relativo ao teste do parâmetro da exatidão no eixo “Y” o calorímetro diferencial de varredura está em perfeito funcionamento.

Teste de precisão do DSC: A fim de poder determinar a precisão das medidas referente à reprodução dos resultados e à necessidade de repetições foram conduzidas separadamente sete medidas calorimétricas em dias diferentes. As condições experimentais foram as seguintes: tripsina comercial bovina Sigma[®] a 0,04 mmol.L⁻¹ ,

solução tampão de glicina a $50,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ pH 3,0, mais CaCl_2 a 20 mmol.L^{-1} . Os experimentos no DSC foram conduzidos em uma faixa de temperatura de 20 a $75 \text{ }^\circ\text{C}$ a uma velocidade de varredura de 60 K.h^{-1} . Os resultados destes testes podem ser visto na figura -49.

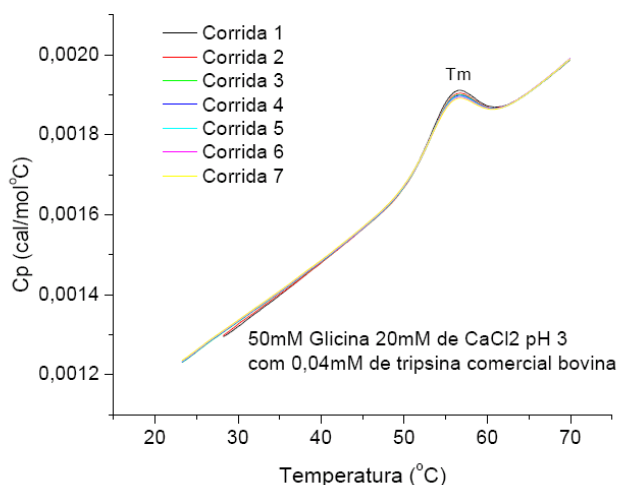


Figura 49: Teste de precisão do DSC com uso de tripsina comercial bovina

Como pode ser visto na figura 49 a precisão do microcalorímetro é considerada elevada, pois como pode ser visto em todas as curvas de desnaturação térmica da tripsina no DSC elas são altamente similares em todo perfil, apresentando os mesmos valores de T_m e as mesmas capacidades caloríficas. A única diferença notável nas curvas endotérmicas é relativo a uma pequena diferença nos ΔH_{cal} (parâmetro dependente de concentração da amostra), porém esta diferença é relativa a pequenos erros experimentais oriundos de determinação de concentração de proteínas e quantidade de amostra injetada no aparelho, porém não comprometem o resultado de precisão elevada do aparelho. Vale ressaltar que os experimentos foram conduzidos no mínimo em triplicata a fim de poder permitir a avaliação do desvio padrão dos testes realizados.

Apêndice 2: Comparação dos dados de Bittar e cols., (2003) com os obtidos nesta tese no período de 2005 a 2008, para isoforma β -tripsina.

A comparação dos dados de Bittar e cols., (2003) com os obtidos nesta tese no período de 2005-2008 foi feita para poder validar a utilização dos parâmetros termodinâmicos da isoforma β -tripsina como comparação com as propriedades termodinâmicas pesquisadas neste trabalho para as isoformas α -, e ψ -tripsina.

A partir da análise da capacidade calorífica obtida para isoforma β -tripsina foram escolhidas condições experimentais aleatórias para serem repetidas e gerar pontos de comparação dos valores obtidos em 2003 com os obtidos em no período de 2005 a 2008. Os resultados estão dispostos nas Tabelas-22 e 23.

Tabela 21: Dados de Bittar para a isoforma β -tripsina obtidos no período de 1999 a 2003

pH	Aditivos	T_m (K)	ΔH_{cal} (cal/mol)	T_m^* (°C)	ΔH_{cal} (cal/mol)	ΔH_{HV} (cal/mol)	ΔH_{cal} / ΔH_{HV}	Revers, %
3,00	-----	327,0	101000	326,9	99400	102000	0,97	94,0
3,20	Sorbitol 1,00M	334,99	103000	335,0	100000	110000	0,91	99,0
3,00	Gnd HCl 1,00 M	313,45	71100	313,4	70000	72400	0,96	97,0
3,00	Gnd HCl 0,70 M	321,15	82400	321,1	80600	84800	0,95	99,0
2,90	-----	327,18	96600	327,2	92200	101000	0,92	97,0
2,80	-----	325,53	94900	325,5	93600	95000	0,99	98,4
2,70	-----	325,01	92000	325,0	90400	94100	0,96	98,3
2,50	-----	324,03	88950	324,0	88100	91900	0,96	100,0

Tabela 22 Dados repetidos neste trabalho experimental para comparação aos dados de Bittar, (2003) foram os seguintes dispostos abaixo.

pH	Aditivos	T_m (K)	ΔH_{cal} (cal/mol)	T_m^* (°C)	ΔH_{cal} (cal/mol)	ΔH_{HV} (cal/mol)	ΔH_{cal} / ΔH_{HV}	Revers, %
3,00	-----	327,1	101000	326,9	99380	102020	0,97	99,0
3,20	Sorbitol 1,00M	335,1	104000	335,3	100200	109000	0,93	98,0
3,00	Gnd HCl 1,00 M	313,35	71075	313,3	69000	72000	0,96	98,0
3,00	Gnd HCl 0,70 M	321,0	82600	320,9	80405	84950	0,95	99,0
2,90	-----	327,35	96900	327,3	92500	101385	0,91	98,0
2,80	-----	325,38	95000	325,7	93900	95300	0,98	99,0
2,70	-----	325,12	92500	325,1	90600	94000	0,96	99,0
2,50	-----	324,20	89000	324,1	88300	91750	0,96	100,0

Na Figura-50 e no teste *t* de *student* realizado para uma condição específica, pode-se ver que os dados obtidos por este trabalho experimental são equivalentes aos resultados obtidos por Bittar e cols., em 2003. O valor do coeficiente de correlação de $R= 0,9998$ obtido para comparação entre a mesma amostra experimentada em épocas deferentes é considerado satisfatório, podendo assim os valores obtidos no artigo de Bittar e cols., (2003) serem usados para comparação das propriedades termodinâmicas das isoformas de tripsina.

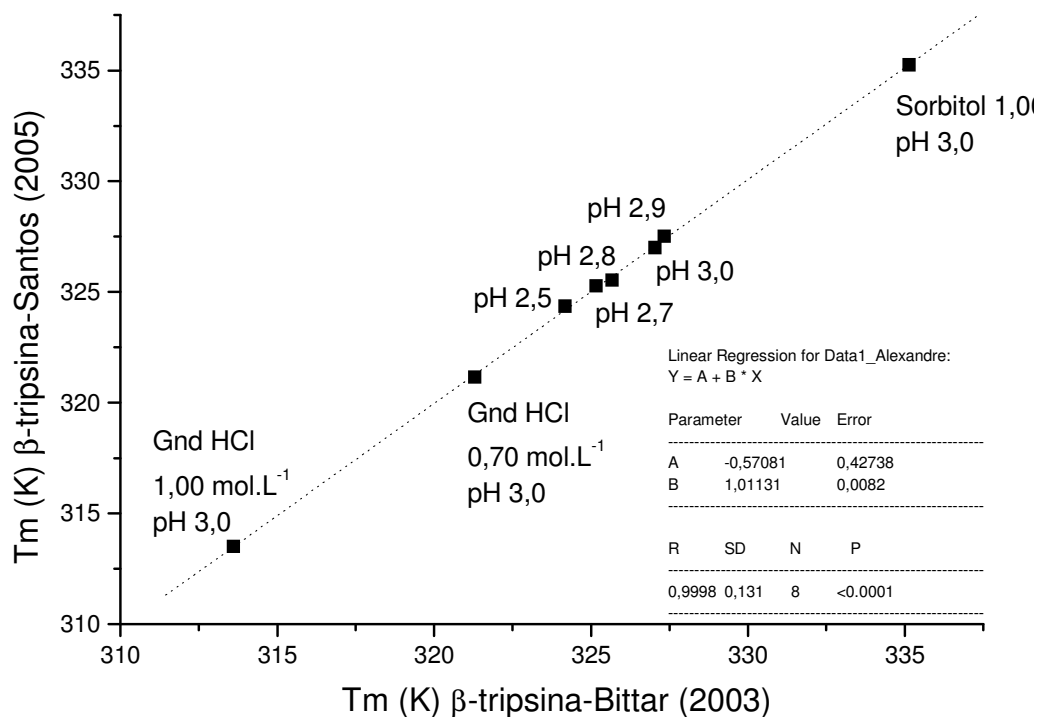


Figura 50: Correlação entre parâmetro T_m para a isoforma beta-tripsina em épocas diferentes. Gnd HCl (cloreto de guanidínio).

Para o pH 3,0 foi realizado o teste t-student:

Dados	Média (T_m)	Variância	N

-			
A	54,0	1E-4	3
B	54,1	1E-4	3

t = 2,44949

p = 0,07048

Ao nível de 0,05 de confiança pode ser dizer que as duas medias **não são** significativamente diferentes.

10. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA