ESTUDO MICROCALORIMÉTRICO DA INTERAÇÃO DE TENSOATIVOS n-ALQUIL-SULFATO DE SÓDIO COM TRIPSINA A 298 K

Eloi A. Silva Filho
Departamento de Química - Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) - 29060-970 - Vitória - ES
Pedro L. O. Volpe
Instituto de Química - Unicamp - CP 6154 - 13083-970 - Campinas - SP

Recebido em 8/4/96; aceito em 24/10/96

MICROCALORIMETRIC STUDY OF SODIUM n-ALKYL SULFATE INTERACTIONS WITH TRYPSIN AT 298 K. systematic study of the interactions of ionic surfactants with protein trypsin in buffer solution pH 3.5, 7.0 and 9.0, ionic strength 10 mM at 298 K was done using the microcalorimetric technique. In this study, anionic surfactant solutions of the sodium n-alkyl sulfates series (C_8, C_{10}, C_{12} and C_{14}) were used. The enthalpy of interaction ($\Delta_{int}H^o$) shows that the interaction of the surfactants C_8, C_{10}, C_{12} and C_{14} with trypsin in the solution pH 3.5 is an endothermic process with the value of $\Delta_{int}H^o$ decreasing linearly with increasing carbon chain length, which is attributed to the unfolding of the polypeptide chain. In the solution pH 7.0, we observed the same trend except for C_{14}. In the solution pH 9.0, from C_{10} the enthapy of interaction didn't change with the increasing of the carbon chain length due to unfolding of the polypeptide. We concluded that when trypsin is folded, the enthalpy of interaction shows a linear relationship with the surfactant's hydrophobicity, in agreement with Traube's rule.

Keywords: surfactants; protein; microcalorimetry.

INTRODUÇÃO

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

Tensoativos iônicos ligam-se a proteínas globulares em concentrações abaixo da concentração micelar crítica (CMC) por uma combinação de interações iônicas e hidrofóbicas formando o chamado complexo proteína-tensoativo. A parte lipofílica da molécula de tensoativo, como por exemplo, dodecil-sulfato de sódio (SDS) interage com as regiões hidrofóbicas no interior das proteínas, causando a quebra da sua estrutura secundária e terciária. Também, a formação de pares iônicos entre moléculas de tensoativos e resíduos de aminoácidos contribuem para este processo. Por este motivo, os tensoativos iônicos possuem propriedades desnaturantes incomparáveis, pois em concentrações da ordem de milimolar desnaturam proteínas enquanto que desnaturantes clássicos[1] como uréia e cloridrato de guanidina necessitam de concentrações da ordem de 6,0 a 8,0 M.

A aplicação de tensoativos na bioquímica, principalmente no estudo da solubilização de proteínas intrínsecas das membranas biológicas, tem sido de interesse em estudos físico-químicos sôbre a natureza das interações entre tensoativos e proteínas pelo fato dos tensoativos iônicos serem ingredientes importantes em muitos cosméticos, produtos de toilete, preparações farmacêuticas (soluções de gargarejo, entre outros), e todos estes materiais entram em contato com as proteínas da membrana[2]. No entanto, os estudos da interação de tensoativos iônicos com proteínas existentes na literatura comprovam que os tensoativos iônicos interagem com proteínas através de forças de interação eletrostática e hidrofóbicas, interações estas que contribuem de forma cooperativa para a quebra da estabilidade estrutural da proteína[3]. No presente trabalho esta complexidade da interação proteína-tensoativo foi estudada utilizando a técnica de titulação microcalorimétrica para obter a entalpia de interação ($\Delta_{int}\mathbf{H^o}$).

PARTE EXPERIMENTAL

Tripsina (pancreas bovino) da Sigma Chemical Co., massa molecular média 23300 $g.mol^{-1}$. Dodecil-sulfato de sódio (SDS, C_{12}) da Sigma Chemical Co., 99% e decil-sulfato de sódio (DSS, C_{10}) da Fluka foram purificados por extração com éter etílico sob refluxo usando um extrator soxhlet, e depois secados a vácuo[4]. Octil-sulfato de sódio (OSS, C_8) e tetradecil-sulfato de sódio (TDSS, C_{14}) foram sintetizados através da reação de sulfonação dos álcoois octanol (da BDH) e tetradecanol (da Fluka) respectivamente, utilizando o procedimento descrito por Livingston et al[5].

As soluções tampão foram preparadas segundo o procedimento: tampão acetato pH 3,5 e força iônica I=0,01 M ($5{,}4x10^{-5}$ mol de $CH_3COONa.3H_2O$/litro + $9{,}4 \times 10^{-4}$ mol de CH_3COOH/litro); tampão fosfato pH 7,0 e força iônica I=0,01 M ($3{,}1 \times 10^{-4}$ mol de K_2HPO_4/litro + $6{,}8 \times 10^{-4}$ mol de KH_2PO_4/litro); o tampão bórax pH 9,0 e I=0,01 M foi preparado diretamente do frasco que continha o mesmo, com sua devida especificação da faixa de variação de pH. No ponto isoelétrico da tripsina pH(I)=4,0 foi utilizado a solução tampão biftalato pH 4,0, força iônica 10 mM. Todos os outros reagentes usados foram de grau analítico e as soluções preparadas em água bidestilada. As concentrações micelares críticas (CMC) a 25°C da série homóloga dos tensoativos n-alquil-sulfato de sódio (C_8, C_{10}, C_{12} e C_{14}) em água e nas soluções tampão pH 3,5; 7,0 e 9,0 foram determinadas pelo método espectrofotométrico tendo como sonda, o corante azul de metileno conforme descrito por Ray e Némethy[6] que resultou nos seguintes valores da CMC: C_8 ($1{,}3x10^{-1}$ mol/L), C_{10} ($3{,}3x10^{-2}$ mol/L), C_{12} ($8{,}2x10^{-3}$ mol/L) e C_{14} ($2{,}1x10^{-3}$ mol/L) em boa concordância com os valores encontrados na literatura[7].

Para a calibração do microcalorímetro foi usado o padrão primário, tris(hidroximetilaminometano), ou THAM, $C_4H_{11}O_3N$, da Riedel-De HäenAG, que foi triturado e recristalizado por sublimação a vácuo em atmosfera de nitrogênio sob temperatura de 140°C durante uma hora[8]. Sua pureza foi determinada por

titulação potenciométrica (potenciômetro digital da Metrohm Herisau E-500) com HCl 0,01 M, mostrando ser 99,9% puro.

As medidas de absorção no ultravioleta-visível foram feitas nos espectrofotômetro, DMS 100 (da Intralab) e Cary 2300 (da Varian), ambos operando no modo feixe duplo e termostatizado a 25°C. Todas as medidas foram feitas utilizando soluções de tripsina em concentrações na faixa de 0,6 mg/mL a 4,0 mg/mL preparadas no tampão pH 3,5; 7,0 e 9,0 com força iônica 10 mM.

Foram feitas medidas de variação da entalpia de interação dos n-alquil-sulfato de sódio com tripsina a 25°C no sistema microcalorimétrico LKB-2277 (***Thermal Activity Monitor***) no seu modo de titulação microcalorimétrica. Antes de iniciarmos as medidas da variação da entalpia, fizemos uma calibração no sistema microcalorimétrico por meio de uma reação de protonação do tris(hidroximetilaminometano) proposta por Wadsö[9] que atualmente é recomendada pela IUPAC passando a ser uma reação padrão em diversos laboratórios que utilizam técnicas microcalorimétricas para verificar a precisão e exatidão do calorímetro[10-12]. A medida da variação da entalpia de protonação do Tris ($\Delta_{prot}H^o$) foi feita utilizando solução de Tris 1,0 mM e solução do titulante HCl 10 mM o qual foi adicionado em alíquotas de 26 mL com o auxílio de uma microbureta. A entalpia de protonação do THAM resultou no valor de -47,43 ± 0,70 kJ.mol^{-1}, sendo concordante com os valores encontrados na literatura, na faixa de (-47,44 ± 0,05 a -47,04 ± 0,06 kJ.mol^{-1})[13,14].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Os dados contidos na tabela 1 mostram o calor observado para cada mol de OSS adicionado na solução de tripsina, sendo que o calor de diluição do OSS na solução tampão e o calor de diluição da tripsina foram descontados. Em todos os dados tabelados de titulação microcalorimétrica tripsina-tensoativo, foram sempre descontados os calores de diluição das soluções. A entalpia de interação tripsina-OSS foi calculada utilizando o gráfico da figura 1, construído com os dados experimentais da tabela 1, onde na abscissa representamos o número de moles do tensoativo OSS e na ordenada o somatório do calor observado ($Q_{obs.}$/mJ). O coeficiente angular da reta da figura 1 corresponde ao valor de ($\Delta_{int}\mathbf{H^o}$), calculada pela equação 1.

$$\Sigma Q_{obs} = n.\Delta_{int}H^o \quad (1)$$

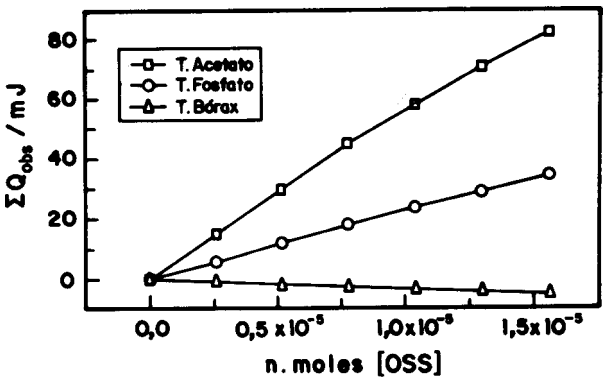

Figura 1. *Titulação microcalorimétrica do OSS com a tripsina nos pH's 3,5; 7,0 e 9,0 a 298 K.*

Os valores de ($\Delta_{int}\mathbf{H^o}$) são valores aparentes e se referem ao calor por mol total de detergente adicionado e não ao calor por mol de detergente efetivamente ligado à proteína. Isto deve-se ao fato de que o método da titulação microcalorimétrica não permite corrigir os valores de $\Delta_{int}\mathbf{H^o}$ para a fração de tensoativo livre.

A interação tripsina-tensoativo quando estudada pelo método do equilíbrio de diálise consiste num processo lento de difusão do tensoativo através de uma membrana de diálise e conseqüente interação deste tensoativo, inicialmente em baixíssimas concentrações, com a molécula da proteína. Nestas condições, interações cooperativas de natureza iônica e hidrofóbica ocorrem lentamente com a proteína e são monitoradas até atingir o equilíbrio permitindo desta maneira a construção das isotermas de interação[2].

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

O valor da variação da entalpia de interação $\Delta_{int}\mathbf{H^o}$ dos demais tensoativos com a tripsina foram obtidos segundo o mesmo procedimento descrito para o tensoativo OSS e estão contidos na tabela 2.

Podemos observar na tabela 2 que o valor de $\Delta_{int}\mathbf{H^o}$ para a série homóloga dos n-alquil-sulfato de sódio no pH 3,5 diminui com o aumento da cadeia carbônica do tensoativo. Esta diminuição no valor de $\Delta_{int}\mathbf{H^o}$ pode ser melhor observado no gráfico (figura 2).

Na figura 2, observamos que a variação da entalpia de interação tripsina-tensoativo (série homóloga dos n-alquil-sulfato de sódio) no pH 3,5 diminuiu linearmente com o aumento da cadeia carbônica do tensoativo. Esta diminuição de $\Delta_{int}\mathbf{H^o}$ com o aumento da lipofilia provavelmente deve-se a interação cooperativa, prevalecendo nestas condições o efeito hidrofóbico na desnaturação da tripsina. Este comportamento é concordante com o observado nas isotermas de interação[2].

Tabela. 1. Resultados da titulação microcalorimétrica tripsina-OSS em pH 3,5; 7,0 e 9,0 a 298 K.

V_{total} (mL)	N.moles 10^{-6} de OSS	[OSS] 10^{-3} mol.L^{-1}	Q_{obs}/mJ pH 3,5	Q_{obs}/mJ pH 7,0	Q_{obs}/mJ pH 9,0
2,000	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
2,026	2,6	1,30	14,90	5,74	0,91
2,052	5,2	2,53	29,87	12,00	2,07
2,078	7,8	3,75	44,64	17,88	2,90
2,104	10,4	4,94	57,90	23,62	3,73
2,130	13,0	6,10	70,84	28,77	4,56
2,156	15,6	7,24	82,53	34,29	5,22

Tabela 2. Valores da variação da entalpia de interação tripsina-tensoativo em pH 3,5; 7,0 e 9,0 a 298 K.

SISTEMA	$\Delta_{int}\mathbf{H^o}$ kJ.mol^{-1}	[TENSOATIVO] mol.L^{-1}
Tripsina/OSS		
pH 3,5	5,30 0,11	
pH 7,0	2,21 0,03	$1,3x10^{-3}$ a $7,3x10^{-3}$
pH 9,0	- 0,34 0,01	
Tripsina/DSS		
pH 3,5	2,50 0,11	
pH 7,0	- 4,24 0,20	$1,3x10^{-4}$ a $9,4x10^{-4}$
pH 9,0	2,46 0,10	
Tripsina/SDS		
pH 3,5	2,23 0,11	
pH 7,0	- 8,65 0,10	$6,4x10^{-5}$ a $5,2x10^{-4}$
pH 9,0	2,97 0,01	
Tripsina/TDSS		
pH 3,5	1,18 0,20	
pH 7,0	0,90 0,02	$1,3x10^{-4}$ a $7,3x10^{-4}$
pH 9,0	2,36 0,20	

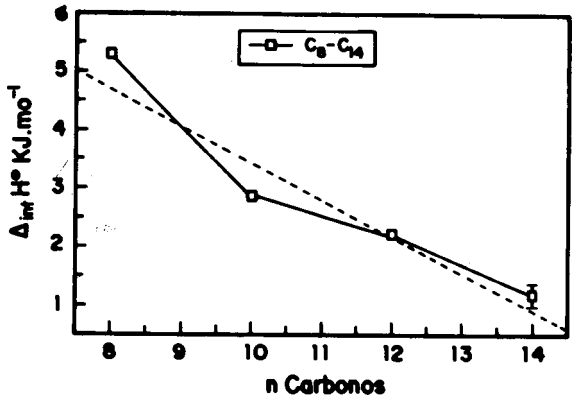

Figura 2. *Variação da entalpia de interação da série homóloga dos n-alquil-sulfato de sódio com tripsina no pH 3,5 a 298 K.*

A relação linear observada entre a entalpia de interação $\Delta_{int}\mathbf{H^o}$ versus número de carbonos da cadeia alquílica é concordante com o comportamento conhecido como regra de Traube[15]. Embora o valor de $\Delta_{int}\mathbf{H^o}$ seja pequeno e endotérmico, com o aumento da cadeia carbônica do tensoativo o processo tende a tornar-se exotérmico, significando que o processo de desnaturação deva ser entropicamente dirigido.

Utilizando técnicas microcalorimétricas e espectroscópicas, Housaindokht et alli[16] estudaram recentemente a interação da proteína globular insulina com n-alquil-sulfato de sódio e concluíram que a entalpia de desnaturação contribui com cêrca de 85% no valor da entalpia de interação. Estes autores mostraram também, que numa primeira aproximação, a entalpia de interação medida poderá ser expressa em termos da contribuição da entalpia de interação com sítios catiônicos, $\Delta_{cat}\mathbf{H^o}$, de interação hidrofóbica do tensoativo $\Delta_{hid}\mathbf{H^o}$e da entalpia de desnaturação da proteína $\Delta_{d}\mathbf{H^o}$, ou seja;

$$\Delta_{int}H^o = \Delta_{cat}H^o + \Delta_{hid}H^o + \Delta_{d}H^o \qquad (2)$$

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

Uma revisão da literatura confirma que há uma ampla variação de valores de $\Delta_{d}\mathbf{H^o}$ para a Tripsina. Os valores obtidos dependem dos métodos usados e da precisão das condições experimentais. Valores desde 30 até 280 kJ.mol^{-1} têm sido publicados[16-19].

No tampão fosfato pH 7,0, observamos para os três primeiros membros da série homóloga dos tensoativos n-alquil-sulfato de sódio, a mesma tendência que em pH 3,5, isto é, a variação da entalpia de interação tripsina-tensoativo diminui linearmente com o aumento da cadeia carbônica do tensoativo, sendo que nestas condições $\Delta_{int}\mathbf{H^o}$ tende para valores mais exotérmicos, figura 3. Este comportamento nos faz crer que $\Delta_{int}\mathbf{H^o}$ deve-se predominantemente as interações de natureza hidrofóbica, pois neste pH a carga líquida da tripsina tem o mesmo sinal do tensoativo, dependendo apenas do caráter hidrofóbico deste. Entretanto, no pH 7,0 o TDSS mostrou uma quebra na tendência à linearidade com um valor de $\Delta_{int}\mathbf{H^o}$ da mesma ordem de grandeza que no pH 3,5, isto é, ♠ 1 kJ.mol^{-1}. Não temos uma explicação para este comportamento, podendo apenas especular em termos de precipitação conforme observado também nos experimentos de equilíbrio de diálise[2].

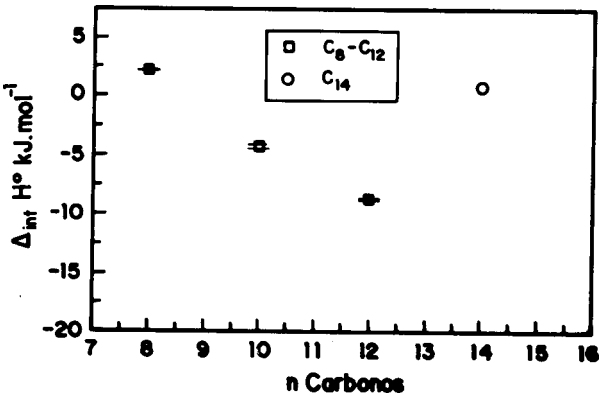

Figura 3. *Variação da entalpia de interação da série homóloga dos n-alquil-sulfato de sódio com tripsina no pH 7,0 a 298 K.*

No tampão bórax pH 9,0 não observamos a tendência de linearidade de $D_{int}\mathbf{H^o}$ com a hidrofobicidade do tensoativo, figura 4 ,sendo o comportamento não linear muito comum nesses casos. Nestas condições o tensoativo OSS apresentou $D_{int}\mathbf{H^o}$ próximo de zero e os tensoativos DSS, SDS e TDSS apresentaram praticamente o mesmo valor para $D_{int}\mathbf{H^o}$, sendo a interação neste pH insensível ao aumento da lipofilia do tensoativo, certamente devido a tripsina encontrar-se desnaturada nestas condições.

Sendo a tripsina uma enzima globular de baixo peso molecular e muito hidrofóbica, (hidrofobicidade média de 680 kJmol^{-1} na escala de Bigelow[20]) as suas características estruturais permitem interações hidrofóbicas com as cadeias alquílicas dos tensoativos.

Nos valores de entalpia de interação $D_{int}\mathbf{H^o}$ estão contidas contribuições devido a: interação do grupo polar do tensoativo com os resíduos dos amino ácidos catiônicos; interações hidrofóbicas das cadeias n-alquil e desenovelamento da estrutura terciária da tripsina.

Em contraste com a entalpia de interação $D_{int}\mathbf{H^o}$, os valores de DG_{υ}^o obtidos nos experimentos de equilíbrio de diálise[2], mostra pequena dependência do comprimento da cadeia alquílica e pH. Ambas observações sugerem que a cabeça polar do

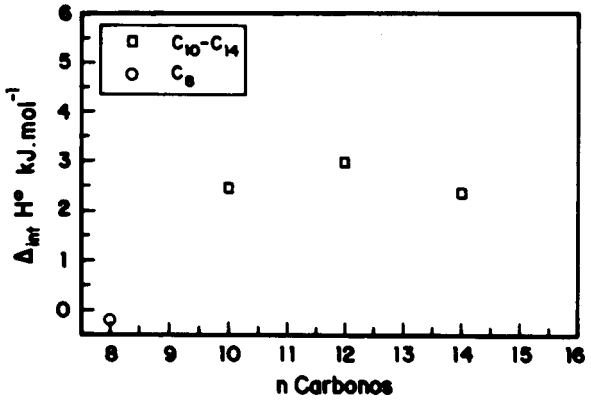

Figura 4. *Variação da entalpia de interação da série homóloga dos n-alquil-sulfato de sódio com tripsina no pH 9,0 a 298 K.*

tensoativo exerce também um papel importante na interação tensoativo-tripsina. Os resíduos de amino ácidos carregados localizados na superfície da enzima nativa são acessíveis ao tensoativo, mas as interações iônicas não são marcadamente afetadas pelo estado de desenovelamento da estrutura terciária.

Com base nos resultados de $D_{int}\mathbf{H^o}$ obtidos neste trabalho, concluimos que a interação tensoativo-tripsina é predominantemente hidrofóbica. Os dados obtidos nos experimentos de equilíbrio de diálise[2] mostram que os valores de DG_u^o de interação tensoativo-tripsina são consideravelmente maiores do que $D_{int}\mathbf{H^o}$ sugerindo que a maior contribuição termodinâmica da interação vem do têrmo entrópico.

Parece provável, portanto, que nos pHs 3,5 e 7,0, o complexo tensoativo-tripsina possa ser do tipo micelar, no qual a molécula hidrofóbica da tripsina forma uma parte integral de uma estrutura micelar simples.

REFERÊNCIAS

1. Jones, M. N.; *Biochemical Thermodynamics*, Elsevier Sci. Publishers, 2nd edn., 1988, p. 221.
2. Volpe, P. L.; Silva Filho, E. A.; *Quím. Nova* **1994**, *17*, 199.
3. Jones, M. N.; MacFariane, A. J. B.; Paz Andrade, M. I.; Sarmiento, F.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1994**, *90*, 2511.
4. Hayashi, S.; Ikeda, S.; *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 744.
5. Livingston JR, J. R.; Drogin, R.; Kelly, R. J., *I & EC Product Research and Development* **1965**, *4*, 28.
6. Ray, A.; Némethy, G.; *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 804.
7. Fendler, J. H.; *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*, Academic Press: New York, London, 1975, p.20.
8. Koch, W. F.; Bigg, D. L.; Dieh, H.; *Talanta* **1975**, *22*, 637.
9. Wadsö, I.; *Acta Chem. Scand.* **1968**, *22*, 927.
10. Heringlon, E. F. G.; *Pure & Appl. Chem.* **1974**, *40*, 392.
11. Poore, V. M.; Beezer, A. E.; *Thermochim. Acta* **1983**, *63*, 83.
12. Grenthe, I.; Ots, H.; Ginstrup, O.; *Acta Chem. Scand.* **1970**, *24*, 1067.
13. Hill, J. O.; Öjelund, G.; Wadsö, I.; *J. Chem. Thermodyn.* **1969**, *1*, 111.
14. Öjelund, G.; Wadsö, I.; *Acta Chem. Scand.* **1968**, *22*, 2691.
15. Shinoda, K.; Nakagawa, T.; Tamamushi, B.; Isemura, T.;*Colloidal Surfactants*, Academic Press, New York, 2ª ed., 1969.
16. Housaindokht, M. R.; Jonwa, M. N.; Newall, J. F.; Prieto, G.; Sarmiento, F.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1993**, *89*, 1963.
17. Anson, M. L.; Mirsky, A. E.; *J. Gen. Physiol.* **1933**, *17*, 393.
18. Lazdunski, M.; *Biochim. Biophys. Acta* **1965**, *105*, 541.
19. Sarmiento, F.; Prieto, G.; Jones, M. N.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1992**, *88*, 1003.
20. Bigelow, C. C.; *J. Theoret. Biol*. **1967**, *16*, 187.