UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Estudo das interações entre enzimas e polímeros:

Parte 1: Efeito do poli(etileno glicol) na atividade e na conformação estrutural de enzimas

Parte 2: Adsorção de enzimas sobre superfícies sólidas

SABRINA MONTERO PANCERA

Tese de Doutorado

Profa. Dra. Denise Freitas Siqueira Petri

Orientadora

São Paulo, 20 de Março de 2006

*Aos meus pais, por me darem as
condições e meios para que eu
pudesse alcançar meus objetivos.*

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Denise F. S. Petri por sempre acreditar em mim e me orientar.
- Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr. (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP) por me dar livre acesso ao seu laboratório e me ensinar sobre biotecnologia.
- À Profa. Dra. Rosângela Itri (Instituto de Física –USP) pela grande ajuda nas medidas e análises de SAXS.
- Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) pelas horas na linha de SAXS e por toda excelente infraestrutura que nos proporciona.
- Ao Prof. Dr. Watson Loh (Instituto de Química – Unicamp) e ao Prof. Dr. Luís Henrique da Silva (Departamento de Química – UFV) pela ajuda nas medidas de titulação calorimétrica.
- Às Profas. Dras. Adelaide Faljoni e Shirley Schreier por me darem a liberdade de utilizar os equipamentos para medidas de dicroísmo circular.
- À Profa. Dra. Maria Cecília Salvadori (Instituto de Física –USP) pelo início do meu aprendizado em AFM.
- Ao Prof. Dr. Thomas Schimmel pela oportunidade de trabalhar no *Forschungszentrum Karlsruhe* e na Universidade de Karlsruhe. Por manter as portas sempre abertas.
- Ao Dr. Hartmut Gliemann pelas aulas de AFM, de alemão e pela amizade.
- Aos colegas Prof. Dr. Anatoli Sidorenko, Dr. Stefan Wahlheim, Dr. Mathias Barczewski, Rolland Gröger, Birgit Riedel e Thomas Koch pelos ensinamentos em micro-contact printing e nanotecnologia.
- Aos companheiros de grupo que passaram pelo laboratório por todos estes anos (Caio Augusto, Paulo Eduardo (Massari), Bruna, Juliana, Arlete, Eduardo Reis, Paulo, Alliny, Romeu, Priscila, Edla, Lizandra, Ednardo, André, Caio, Fábio, Allan, Guilherme e Karina) pelos momentos descontraídos.
- Ao Farhat Znaidi pelo amor e compreensão.
- Aos meus pais e irmão pelo apoio.
- À FAPESP, CNPq e DAAD pelo apoio financeiro.
- Ao Instituto de Química - USP e ao *Institut für Nanotechnologie – Forschungszentrum Karlsruhe* pelas instalações.

RESUMO

Este trabalho visou investigar as interações entre enzimas e polímeros em solução e a adsorção das mesmas sobre superfícies sólidas e para isto foi dividido em duas partes distintas. Na primeira parte a influência do poli(etileno glicol) (PEG), polímero considerado inerte e utilizado em muitos processos biotecnológicos, na atividade enzimática e na conformação estrutural de enzimas foi estudada através de medidas de espectrofotometria- UV, calorimetria e espalhamento de raio-X de baixo ângulo (SAXS). Foram escolhidas neste estudo as enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH) e hexoquinase (HK), que são enzimas largamente aplicadas em análises clínicas na determinação de glicose no sangue, e também a enzima álcool desidrogenase (AD), utilizada para determinação de concentração de álcool. Foram obtidos resultados quantitativos, numa faixa de baixa concentração de enzima, que indicam uma forte influência de PEG na atividade das enzimas estudadas. Medidas de calorimetria revelaram que PEG interage não só com a enzima em estudo mas também com a coenzima NADP⁺. Numa faixa de concentração maior, os resultados de SAXS mostraram que PEG exerce também um efeito significativo no processo de agregação das enzimas. Acima de tudo, foi evidenciado neste estudo que PEG não pode ser tratado como um polímero inerte, pois ele interfere na atividade e conformação de enzimas. As enzimas são macromoléculas complexas e PEG interage de forma diferenciada com cada enzima, merecendo atenção especial caso a caso. Na segunda parte do trabalho, o estudo da adsorção de hexoquinase (HK) e creatina fosfoquinase (CPK) sobre lâminas de silício foi realizado através de medidas de ângulo de contato, elipsometria *in situ* e microscopia de força atômica (AFM) em água. A CPK é uma enzima bastante utilizada em kits de determinação de creatina no sangue e no diagnóstico de desordens musculares. Este trabalho revelou que o mecanismo de adsorção de CPK sobre silício depende fortemente do pH. Em pH 4, 7 ou 9 CPK adsorveu mantendo a mesma conformação que tinha em solução. Medidas de espectrofotometria UV-Vis revelaram uma mudança no pH ótimo para atividade enzimática de CPK de 6,8 para 9 após adsorção. A HK imobilizada em esferas de vidro mostrou atividade maior do que HK imobilizada nas placas. A reutilização das esferas e placas recobertas com HK foi testada e observou-se que as atividades das enzimas adsorvidas no substrato esférico foram mantidas. Entretanto, nas placas revestidas a atividade foi perdida. As enzimas imobilizadas sobre esferas puderam ser reutilizadas pelo menos 3 vezes, mantendo a atividade por um período de até 3 semanas.

ABSTRACT

This work aimed to investigate the interactions between enzymes and polymers in solution and also the adsorption behavior of these enzymes on solid surfaces. For that reason it was divided into two parts. In the first part, the influence of poly(ethylene glycol) (PEG), a polymer considered inert and utilized in several biotechnological processes, on the enzymatic activity and structure of the enzymes was studied by means of UV spectrophotometry, calorimetric titration, circular dichroism (CD) and small angle X-ray scattering (SAXS). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) and hexokinase (HK) were chosen because of their large application in clinical analysis for determination of glucose in the blood strain. Alcohol dehydrogenase (AD), which is widely used to determine alcohol concentration in various samples, was also used. Quantitative results, in a low enzyme concentration range, indicated a strong influence of PEG on the enzymes activity. The calorimetric measurements revealed no favorable interactions between enzyme and polymer, but indicated favorable interactions between PEG and co-enzyme NADP⁺. In a higher concentration range, SAXS results showed that PEG also exerts a significant effect on the enzyme aggregation process. This work showed that PEG shall no longer be treated as an inert polymer since it interferes in the enzyme activity and structure. The enzymes are complex macromolecules and PEG interacts differently with each one, deserving special attention in each case. In the second part of the work, the adsorption behavior of creatine phosphokinase (CPK) and hexokinase (HK) onto silicon wafers was studied by means of contact angle measurements, *in situ* ellipsometry and atomic force microscopy (AFM) in water. CPK was chosen due to its large application on the diagnosis of several muscle disorders. This work revealed that the adsorption mechanism of CPK on silicon surfaces is strongly dependent on pH. At pH 4, 6.8 or 9, CPK adsorbed keeping the same conformation as in solution. Spectrophotometric measurements revealed a shift on the optimum pH from 6,8 to 9 upon CPK adsorption. HK adsorbed onto glass beads showed higher activity than HK immobilized on silicon wafers. HK covered glass beads could also be reused three times and for a period of at least three weeks. In the contrary, HK covered silicon wafers could not be reused. For practical purposes, HK covered glass beads showed to be a better “biosensor” than HK covered silicon wafers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Parte 1: Influência de poli(etileno glicol) na atividade enzimática e conformação de enzimas

Figura 1: Curvas de espalhamento de raios-X medidas para G-6-PDH em: (a) (Δ) tampão puro, ($\square$) solução de PEG400 e (b) (O) solução de PEG4000, juntamente com a curva teórica calculada a partir da estrutura dimérica cristalográfica (correspondente à estrutura cristalográfica de 1DPG no banco de dados de proteínas PDB). (página 14)

Figura 2: (a) Função de distribuição de distância $p(r)$ obtidas para G-6-PDH em solução de PEG 400 (linha contínua) ou PEG 4000 (linha interrompida). Intensidades de espalhamento $I(q)$ correspondentes obtidas para G-6-PDH em tampão puro (b) (similar ao PEG400) ou em solução de PEG 4000 (c), juntamente com os dados experimentais. (página 17)

Figura 3: Gráficos de Guinier obtidos para G-6-PDH em ($\square$) tampão puro (ou PEG400) e (O) PEG4000. (página 20)

Figura 4: Representação esquemática do mecanismo de ação catalítica proposto por Cosgrove e colaboradores. (A) estado de transição, (B) produtos da reação. (página 21)

Figura 5: Espectro de dicroísmo circular obtidos para o sistema HK/água (), HK/água/PEG400 (∇), HK/água/PEG 1500 (O) e HK/água/PEG4000 ($\blacktriangle$). (página 26).

Figura 6: Funções de distribuição de distância $p(r)$ para os sistemas HK/água ($\square$), HK/água/PEG 1500 ($\circ$) e HK/água/PEG4000 (----). (página 28)

Figura 7: Intensidades de espalhamento, calculadas com o programa Glatter (linhas contínuas), juntamente com as experimentais obtidas para (a) HK/água, (b) HK/água/PEG 1500 e (c) HK/água/PEG4000. (página 29)

Figura 8: (a) As intensidades de espalhamento e (b) as funções de distribuição de distância $p(r)$ para os sistemas: HK/água ($\blacksquare$), HK/água/glicose ($\circ$), HK/água/PEG400/glicose (∇). (página 31).

Figura 9: Intensidade de espalhamento para os sistemas: (a) HK/água/PEG 1500 ($\bullet$) e HK/água/PEG 1500/glicose ($\circ$) e (b) HK/água/PEG4000 ($\blacksquare$) e HK/água/PEG4000/glicose ($\square$). (página 32).

Figura 10: Curvas de espalhamento de raio-X para álcool desidrogenase (AD) em: água, solução de PEG 400, PEG 4000, e PEG 35000 g.mol⁻¹. (página 33).

Figura 11: Gráficos de Guinier obtidos para AD em água pura ou em solução de PEG de massas molares 400, 4000 e 35000 g.mol⁻¹. (página 34)

Figura 12: Curvas de espalhamento de raio-X para AD em: água logo após preparo da solução e após 16 horas do preparo da solução. (página 35)

Parte 2: Adsorção de enzimas sobre superfícies sólidas

Figura 1: Espectro de absorção de Reagente de Bradford (CCBG) na presença (curva azul) e na ausência de proteína (curva vermelha). (página 57)

Figura 2: Medida de absorbância a 595 nm de soluções de HK ligada ao Reagente de Bradford (CCBG). (página 58)

Figura 3: Cinética de adsorção *in situ* de CPK ($c = 0,005 \text{ g.L}^{-1}$) sobre placa de silício a $22,5 \pm 0,5^\circ \text{ C}$ e pH 6,8. (página 63)

Figura 4. Imagens de topografia dos filmes de CPK e das fronteiras filme-substrato obtidas após remoção do parafilme que cobria metade da placa de silício. Imagens obtidas através de AFM em água (a) após 15 minutos, (b) e (c) após 1 h, (d) após 6 h e (e) após 16 horas de adsorção de CPK sobre silício. Variação da espessura, d , do filme de CPK adsorvido sobre silício a pH 6,8 obtida por AFM medindo-se a altura do filme na fronteira filme-substrato obtida após remoção do parafilme[®] (f). (página 66)

Figura 5. Cinética de adsorção de CPK sobre superfícies de Si a partir de soluções de CPK em pH 6,8 (quadrados), pH 4 (triângulos) ou em pH 9 (círculos). (a) medidas de elipsometria *in situ* e (b) medidas de AFM em água utilizando o método de remoção do filme com a ponta. As linhas são apenas para guiar os olhos. (página 68)

Figura 6. Cinéticas de adsorção medidas para CPK sobre superfície de Si a partir de soluções de (a) pH 4 e (b) pH 9. As linhas mostram a região utilizada para calcular o coeficiente de difusão (D). (página 69)

Figura 7: Imagens de AFM (modo contato intermitente) de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ dos filmes de CPK adsorvida obtida após adsorção de CPK ($c=0,005\text{g/L}$) sobre silício em pH 4 após (a) 15 min, (b) 2h e (c) 16h de adsorção; at pH 6.8 após (d) 15 min, (e) 2h e (f) 16h de adsorção e em pH 9 após (g) 15 min, (h) 2h e (i) 16h de adsorção. Os valores de rms foram calculados para as imagens de zoom de $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$. (página 74)

Figura 8: Formação de NADPH em função do tempo catalisada por CPK livre em pH 4 (triângulo), pH 6,8 (quadrado) e pH 9 (círculo). (página 78)

Figura 9: Quantidade de NADPH formado após duas horas de reação em pH 4, 6,8 e 9 catalisado por CPK livre ou CPK adsorvida em silício a partir de soluções de pH 4, 6,8 ou 9. (página 79)

Figura 10: Esquema das camadas de CPK formadas sobre silício em (a) pH 4, (b) pH 6,8 e (c) pH 9 com a espessura da camada correspondente ao patamar de adsorção (medido através de elipsometria e AFM). (página 82)

Figura 11: Isotermas de adsorção de CPK (em solução aquosa contendo 1 mM NaCl e pH 6,8) sobre silício após 1 hora de adsorção (círculos vazios) ou 16 horas de adsorção (círculos cheios). A linha contínua serve somente para guiar os olhos. (página 83)

Figura 12: (a) Ângulos de contato para superfícies de silício em função da concentração de CPK, após 16 horas de adsorção. Ângulo de avanço (quadrados cheios) ou recesso (quadrados vazios). (b) Ângulos de avanço para superfícies de silício em função do tempo de adsorção de CPK ($c_{CPK} = 0,005 \text{ g.L}^{-1}$) e do pH do meio de adsorção. pH 4: triângulos, pH 6,8: quadrados e pH 9: círculos. (página 85)

Figura 13: Cinética de adsorção *in situ* de HK ($c = 0,005 \text{ g.L}^{-1}$) sobre placa de silício a $22,5 \pm 0,5^\circ \text{ C}$ e pH 6,8 (página 86)

Figura 14: Imagens de AFM (modo de contato intermitente) ($5 \times 5 \text{ } \mu\text{m}^2$) da superfície de silício após adsorção de HK ($c_{HK}=0,005\text{g.L}^{-1}$) em pH 6,8 após (a) 15 minutos, (b) 2h e (c) 16h de adsorção. (página 89)

Figura 15: Cinéticas de adsorção em regime semi-diluído de HK sobre superfície de Si/SiO₂: $c_{HK} = 0,025\text{g.L}^{-1}$ (círculos) e $c_{HK} = 0,05\text{g.L}^{-1}$ (quadrados). (página 90)

Figura 16: Isoterma de adsorção ($23 \pm 2^\circ \text{ C}$) de HK em pH 6,8 sobre superfície de Si/SiO₂ após 3 horas de adsorção. (página 91)

Figura 17: Ângulos de contato de avanço medidos para HK ($c_{HK} = 0,005\text{g.L}^{-1}$ HK em NaCl $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 6,8) adsorvida em silício em função do tempo de adsorção (a linha contínua serve apenas para guiar os olhos). (página 92)

Figura 18: Concentração de HK adsorvida em placas de Si/SiO₂ determinada através do método de Bradford. (página 93)

Figura 19: Formação de NADPH ao longo do tempo, catalisada por HK adsorvida em placas de Si/SiO₂. (página 94)

Figura 20: Concentração de HK adsorvida em esferas de vidro determinada através do método de Bradford. $m^{\text{esferas}} = 0,0216 \text{ g}$ (círculos) e $m^{\text{esferas}} = 0,108 \text{ g}$ (quadrados). (página 96)

Figura 21: Formação de NADPH ao longo do tempo, catalisada por HK adsorvida em esferas de vidro a partir de soluções de HK de diferentes concentrações: (a) $c_{HK\text{inicial}} = 0,25 \text{ g.L}^{-1}$ e (b) $c_{HK\text{inicial}} = 1,0 \text{ g.L}^{-1}$ e utilizando duas quantidades de esferas: $M^{\text{esferas}} = 0,0216 \text{ g}$ (círculos) e $M^{\text{esferas}} = 0,108 \text{ g}$ (quadrados). (página 97)

LISTA DE TABELAS

Parte 1: Influência de poli(etileno glicol) na atividade enzimática e conformação de enzimas

Tabela 1: Concentrações de reagentes utilizados em cada método experimental. (página 5)

Tabela 2: Raios de giração (R_g) calculados por meio do software Crysol, análise de Guinier (equação 9) e a partir da equação 8; dimensão máxima da partícula D_{max} e $I(0)$ calculados a partir da função de $p(r)$ para G-6-PDH em tampão, em solução de PEG400 (20% em massa) e em solução de PEG4000 (20% em massa). (página 18)

Tabela 3: Variações de entalpia de diluição, ΔH_{dil} , e as diferenças entre o ΔH_{dil} medido para o titulante (NADP+ ou G-6-PDH) em solução de PEG e aquele medido em tampão, ΔH_{int} . (página 22)

Tabela 4: Taxa de formação de NADPH devido à atividade de HK, conteúdo de α -hélices na estrutura da HK e raios de giração na ausência e na presença de PEG. (página 25)

Tabela 5: Raio de giração (R_g) calculado utilizando análise de Guinier (equação 9) para AD em água, solução 20% em massa de PEG 400, 4000 ou 35000 g.mol⁻¹. (página 35)

Parte 2: Adsorção de enzimas sobre superfícies sólidas

Tabela 1: Coeficiente de difusão (D) e espessura (d) do filme de CPK no patamar determinado a partir dos dados elipsométricos. Resultados obtidos para a adsorção de CPK sobre silício a partir de soluções de CPK 0,005g.L⁻¹ em NaCl 1mM e pH 4, 6,8 ou 9. (página 70)

Tabela 2: Raio hidrodinâmico (R_h) [Loidl-Stahlhofen e col., 2001] e coeficientes de difusão (D_t) estimados para monômeros de CPK, dímeros ou monômeros abertos, na faixa de pH correspondente. (página 71)

LISTA DE SIGLAS

PEG	poli(etileno glicol)
HK	hexoquinase
G-6-PDH	glicose-6-fosfato desidrogenase
CPK	creatina fosfoquinase
AD	álcool desidrogenase
NADP⁺	β- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
ATP	Adenosina 5'Trifosfato
ADP	Adenosina 5'Difosfato
G-6-P	Glicose-6-fosfato
CCBG	Corante Comassie Blue G-250
Si	Silício
RSA	Modelo de adsorção sequencial aleatória
CSA	Modelo de adsorção sequencial cooperativa
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (www.rcsb.org)
pI	Ponto isoelétrico
rms	Rugosidade expressa em valores de média quadrática
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
CD	Dicroísmo Circular
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> (Microscopia de Força Atômica)

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Absorbância
ϵ	Coefficiente de absorptividade
b	Caminho óptico
c_{HK} ou c_{CPK}	Concentração de HK ou CPK (g. L ⁻¹)
$\Delta H^{dil/int}$	Entalpia de diluição ou de interação (kJ.mol ⁻¹)
λ	Comprimento de onda (nm)
Δ	Diferença de fase entre os componentes paralelo e perpendicular do campo elétrico
ψ	Razão entre as amplitudes dos componentes paralelo e perpendicular do campo elétrico
Γ	Quantidade de material adsorvido (mg.m ⁻²)
θ_a	Ângulo de contato (avanço) (graus)
θ_r	Ângulo de contato (recesso) (graus)
D	Coefficiente de difusão (cm ² .s ⁻¹)
D_t	Coefficiente de difusão calculado (teórico)
dn/dc	Incremento do índice de refração
d	Espessura da camada desconhecida (nm)
I(q)	Intensidade SAXS de uma solução isotrópica de partículas esféricas monodispersas
N_x	Índice de refração complexo do meio x
P(q)	Fator forma da partícula
p(r)	Distribuição de distância
S(q)	Fator de interferência interpartículas
q	Vetor espalhamento
R_g	Raio de giro (Å)
R_h	Raio hidrodinâmico (Å)
Da	Dalton (= g.mol ⁻¹)

SUMÁRIO

Parte 1: Influência de poli(etileno glicol) na atividade enzimática e conformação de enzimas

1.Introdução	1
2. Objetivos	3
3. Materiais	4
4. Métodos	5
4.1. Atividade enzimática – Espectrofotometria UV-visível	5
4.2. Titulação Calorimétrica	7
4.3. Espalhamento de raio-X a baixo ângulo (<i>Small Angle X-ray Scattering - SAXS</i>)	8
4.4. Dicroísmo Circular (<i>Circular dichroism - CD</i>)	11
5. Resultados e Discussão	12
5.1. Influência de PEG na atividade enzimática e conformação de glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH)	12
5.1.1. Influência de PEG na atividade enzimática de G-6-PDH	12
5.1.2. Espalhamento de raio-X a baixo ângulo	13
5.1.3. Medidas de titulação calorimétrica – Interações entre a co-enzima NADP ⁺ e PEG	20
5.2. Influência de PEG na atividade enzimática e conformação de hexoquinase (HK)	23
5.2.1. Influência de PEG na atividade enzimática de HK	23
5.2.2. Dicroísmo Circular	25
5.2.3. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo	27
5.2.3.1. Sistema HK/água/PEG	27
5.2.3.2. A adição de glicose ao sistema HK/água/PEG	31
5.3. Influência de PEG na atividade enzimática e conformação de álcool desidrogenase (AD)	33
6. Conclusões	36
7. Referências Bibliográficas	38

Parte 2: Adsorção de enzimas sobre superfícies sólidas

1.Introdução	45
2. Objetivos	48
3. Materiais	48
4. Métodos	49
4.1. Elipsometria	49
4.2. Ângulo de Contato	53
4.3. Microscopia de força atômica (Atomic force microscopy - AFM)	54
4.4. Método de Bradford	56
4.5. Atividade enzimática – Espectrofotometria UV-visível	59
5. Resultados e Discussão	62
5.1. <u>Adsorção de creatina fosfoquinase (CPK)</u>	62
5.1.1. Cinética de adsorção de CPK sobre silício	62
5.1.2. Efeito do pH na adsorção de CPK sobre silício	68
5.1.3. Efeito do pH na atividade enzimática de CPK livre ou adsorvida sobre silício	78
5.1.4. Isotherma de adsorção de CPK sobre silício	83
5.1.5. Medidas de ângulo de contato	84
5.2. <u>Adsorção de hexoquinase (HK)</u>	86
5.2.1. Cinética e isoterma de adsorção de HK sobre silício	86
5.2.2. Medidas de ângulo de contato	91
5.2.3. Efeito da forma do substrato (plano ou esférico) na atividade de HK imobilizada	92
5.2.3.1. Método de Bradford para determinar a quantidade de HK adsorvida	93
5.2.3.2. Atividade da HK adsorvida sobre placas de Si/SiO ₂	94
5.2.3.3. Atividade de HK sobre esferas de vidro	95
6. Conclusões	99
7. Referências Bibliográficas	103

Considerações gerais sobre as enzimas utilizadas nesta tese

1. Glicose-6-fosfato desidrogenase

Glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH) (EC1.1.1.49) é a primeira enzima no caminho metabólico das pentoses fosfato. O caminho pentose-fosfato começa com a oxidação da glicose-6-fosfato (G-6-P) tendo como produtos a 6-fosfo gliconolactona (um éster cíclico) e NADPH. Esta reação é catalisada por G6PDH [Cosgrove e col., 1998]:

A G-6-PDH possui massa molar média de 240000 g.mol⁻¹ [Rowland e col., 1994]. Estudos sobre o mecanismo de atividade catalítica de G-6-PDH mostraram que o aminoácido His-240 age como uma base subtraindo um próton da hidroxila C1 da G-6-P, enquanto que o aminoácido Asp-177 estabiliza a carga positiva formada no estado de transição da His-240 para que a transferência do próton do C1 ao anel piridínico do NADP⁺ ocorra [Cosgrove e col., 1998].

A estrutura da enzima G-6-PDH pode ser obtida no banco de dados de proteínas sob o código: 1 DPG como mostra a figura A1.

Fig. A1: Estrutura da G-6-PDH obtida a partir do site www.rcsb.org/pdb (1DPG)

2. Hexoquinase

A Hexoquinase (HK) (EC 2.7.1.1), por sua vez, é a enzima chave no metabolismo de carboidratos, catalisando a fosforilação regiosseletiva dos carboidratos, especialmente a conversão da glicose em Glicose-6-fosfato (G-6-P). HK na presença de Mg^{2+} catalisa a transferência de um grupo γ -fosforil do ATP para o grupo hidroxil no carbono 6 de algumas hexoses, principalmente glicose [Albig & Entian, 1988]:

As dimensões da HK (Tipo 1-de levedura de fermento de pão) cristalizada foram determinadas como sendo $a=144,80\text{\AA}$, $b=78,80\text{\AA}$, $c=61,90\text{\AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ (correspondente à estrutura cristalográfica 1HKG no RCSB *Protein Data Bank*), como mostra a figura A2.

Fig. A2: Estrutura da HK obtida a partir do site www.rcsb.org/pdb (1HKG)

As hexoquinases de diferentes espécies diferem na massa molar e distribuição em tecidos e a enzima normalmente existe na forma de uma mistura de isoenzimas que por sua vez também diferem em características cinéticas e massa molar [Cárdenas e col., 1998].

Neste trabalho a HK de levedura, a qual apresenta a forma de três isoenzimas, P_I (ou A), P_{II} (ou B) e glicoquinase, foi usada. Em pH 5,5 a 6,5, a hexoquinase B é um dímero de subunidades idênticas com 104kDa no total [Schulze e col., 1966]. Estes dímeros tendem a dissociar em monômeros conforme a força iônica, temperatura ou pH aumentam [McDonald e col., 1979].

Ambas as enzimas G-6-PDH e HK são muito importante em análises clínicas e processos biotecnológicos pois podem ser utilizadas no desenvolvimento de biosensores como, por exemplo, kits de determinação de glicose no sangue.

3. *Álcool Desidrogenase*

A álcool desidrogenase (AD) da bactéria termoanaeróbia Brockii é composta de 4 subunidades idênticas de 35.000 g.mol⁻¹ com um sítio ativo por cada subunidade como mostra a figura A3.

Fig. A3: Estrutura da AD obtida a partir do site www.rcsb.org/pdb (1YKF).

A AD catalisa a oxidação de 2-propanol a acetona a pH 7.8 (40°C) na presença de NADP⁺. Ela possui alta especificidade para álcoois, cetonas e acetaldeídos. As dimensões da álcool desidrogenase cristalizada foram determinadas como sendo a=b=80,61 Å, c=400,33Å,

$\alpha=\beta = 90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ (correspondente à estrutura cristalográfica 1YKF no RCSB Protein Data Bank). A AD é composta por 55% de aminoácidos hidrofóbicos e de 4 subunidades idênticas de $35.000 \text{ g.mol}^{-1}$ com um sítio ativo por cada subunidade.

4. Creatina fosfoquinase

Uma outra enzima importante na via pentose fosfato é a creatina fosfoquinase (CPK), esta enzima utiliza ATP como fosfo-doador para formar a fosfocreatina a partir de creatina, segundo a equação 3.

fosfocreatina é um importante reservatório de energia nas células de músculo. A CPK imobilizada em substratos seletivos pode ser aplicada em eletrodos de amônia para determinação de creatinina e na diagnose de infartos de miocárdio e desordens musculares [Desjarlais e col., 1980; Madaras e col., 1996; Benkert e col., 2000]. A estrutura da enzima CPK pode ser obtida no banco de dados de proteínas sob o código: 1 CRK como mostra a figura A4.

Fig. A4: Estrutura da CPK obtida a partir do site www.rcsb.org/pdb (1CRK).

***Parte 1: Influência de poli(etileno glicol) na atividade enzimática e conformação de
enzimas***

1. Introdução

Poli(etileno glicol) (PEG) é um polímero sintético não-tóxico, solúvel em água, largamente empregado em processos biotecnológicos em indústrias químicas e biomédicas [Johansson, 1992]. Na presença de sal ou dextrana formam-se sistemas de duas fases aquosas, em que a fase do topo é principalmente composta por PEG e a fase do fundo por solução de sal ou dextrana [Albertsson e col., 1990]. Estes sistemas funcionam muito bem para purificação de proteínas, pois as biomoléculas migram para a fase de PEG [Kula, 1990]. As forças motrizes desta migração parecem ser as interações hidrofóbicas [Huddleston e col., 1994] entre polímero- proteína e o efeito *salting-out*. Entretanto, geralmente a melhor eficiência de partição é alcançada com PEG de baixa massa molar [Forciniti e col., 1991]. Apesar de ser muitas vezes considerado um material inerte [Albertsson, 1958; Malzert e col., 2003], alguns estudos mostram que PEG pode influenciar fortemente a atividade enzimática. A atividade de fosfofrutoquinase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase na presença de PEG é 1,3 e 1,55 vez maior que em água, respectivamente [Grimonprez & Johansson, 1996]. Alguns trabalhos na literatura mostram estudos sobre o efeito de PEG sobre enzimas e atribuem esta influência do PEG na atividade enzimática à hidrofobicidade das proteínas [Lee & Lee, 1981; Furness e col., 1998; Jonsson e col., 2003], atividade da água [Kulkarni e col., 2000; Ninni e col., 1999], exclusão estérica [Bhat & Timasheff, 1992; Arakawa & Timasheff, 1985] e estresse osmótico [Parsegian e col., 1995]. Timasheff (2002) propôs que a presença de PEG favorece a estabilidade de proteínas nativas devido à exclusão estérica (volume excluído) e hidratação preferencial das proteínas. O método de estresse osmótico mede mudanças no número de moléculas de água associadas às macromoléculas isoladas, quando estas sofrem mudanças conformacionais [Parsegian e col., 2000; Patel & Russel, 1989; Atha & Ingham, 1981]. Este método foi aplicado com sucesso para explicar como PEG de

diferentes massas molares, juntamente com a água, afetam a ligação de glicose a hexoquinase (HK). A HK possui uma cavidade onde a glicose se instala e os domínios da HK se fecham sobre a glicose [Bennett & Steitz, 1978]. A HK discrimina água de seus substratos [Bennett & Steitz, 1980]. A atividade da água afeta a abertura e fechamento da hexoquinase durante a catálise. Além disso, a afinidade da glicose pela HK aumenta com o decréscimo da atividade da água [Rand e col., 1993]. Na presença de PEG, este efeito é ainda maior. O número de moléculas de água liberadas quando HK fecha a cavidade aumenta de 50 para 326 por HK, quando a massa molar de PEG aumenta de 300 para 1000 g.mol⁻¹ [Reid & Rand, 1997]. Estes estudos foram realizados na faixa de concentração de HK de 0,0145 g L⁻¹ [Rand e col., 1993] a 0,0384 g L⁻¹ [Reid & Rand, 1997] e trouxeram considerável conhecimento sobre o efeito de PEG no mecanismo de atividade enzimática.

2. Objetivos

O objetivo desta primeira parte do trabalho foi determinar a influência do PEG, polímero considerado inerte e utilizado em muitos processos biotecnológicos sobre a atividade enzimática e conformação estrutural de hexoquinase (HK), glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH) e álcool desidrogenase (AD) através de medidas de espectrofotometria- UV, dicroísmo circular, calorimetria e espalhamento de raio-X de baixo ângulo (SAXS).

3. Materiais

Poli(etileno glicol) (PEG) de massa molar nominal de 400 (PEG 400), 1500 (PEG 1500) e 4000 (PEG 4000) Da foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺, N0505), tampão tris-HCl (tris[hidroximetil]aminometano) de pH 7,5 com 5 mM de MgCl₂, glicose-6-fosfato (G-6-P, G7879), adenosina 5'Trifosfato (ATP, A3377), β -D(+)glicose (G5250), hexoquinase Tipo III de levedura (HK, H5000), glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH, G4134 de levedura ou G8529 de *L.mesenteróides*) e álcool desidrogenase da bactéria termoanaeróbia Brockii (AD, A8435) foram obtidos da Sigma (St. Louis, USA) e utilizados sem purificação prévia.

As amostras foram preparadas em concentrações diferentes de enzima, como mostra a Tabela 1. A razão para esta diferença é a diferença na faixa de sensibilidade de cada método utilizado, como descrito a seguir.

Tabela 1: Concentrações de reagentes utilizados em cada método experimental.

Reagente	Espectrofotometria Atividade G-6-PDH	Espectrofotometria Atividade HK	SAXS	Calorimetria	Dicroísmo Circular
NADP+	6×10^{-10} M	3×10^{-6} M	-	6×10^{-10} M	-
G-6-P	1×10^{-8} M	-	-	-	-
Glicose	-	$5,8 \times 10^{-2}$ M	$5,8 \times 10^{-1}$ M	-	-
ATP	-	$1,7 \times 10^{-3}$ M	-	-	-
HK	-	$5,8 \times 10^{-8}$ M	$1,0 \times 10^{-4}$ M	-	5.8×10^{-8} M
G-6-PDH	7×10^{-15} M	$3,8 \times 10^{-8}$ M	$1,4 \times 10^{-10}$ M	9×10^{-15} M	-
AD	-	-	$2,9 \times 10^{-4}$ M	-	-
PEG400	3×10^{-9} M	$2,9 \times 10^{-3}$ M	5×10^{-7} M	1×10^{-9} M	$2,9 \times 10^{-3}$ M
PEG1500	-	$2,9 \times 10^{-3}$ M	-	-	$2,9 \times 10^{-3}$ M
PEG4000	3×10^{-10} M	$2,9 \times 10^{-3}$ M	5×10^{-8} M	1×10^{-10} M	$2,9 \times 10^{-3}$ M

4. Métodos

4.1. Medidas de atividade enzimática – Espectrofotometria UV-Vis

A atividade enzimática de G-6-PDH ou HK foi medida na presença e ausência de PEG de acordo com o método descrito por Bergmeyer [Bergmeyer, 1984], no qual realiza-se a determinação espectrofotométrica da velocidade de formação de NADPH. Este método está

baseado na redução de NADP⁺ a NADPH, o qual absorve no comprimento de onda (λ) de 340 nm:

A formação de NADPH foi medida em função do tempo utilizando-se um espectrofotômetro Beckmann Coulter DU 640 UV-VIS a 25°C. Uma unidade de G-6-PDH (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução de 1 μmol de NADP⁺ por minuto nas condições de trabalho utilizadas e uma unidade de HK foi considerada como a quantidade de enzima necessária para catalizar a fosforilação de 1 μmol de glicose por minuto nas condições de trabalho utilizadas. As concentrações dos reagentes misturados na cela espectrofotométrica para determinação de atividade de HK ou de G-6-PDH estão apresentadas na Tabela 1. Concentrações de enzima maiores do que as utilizadas na cela espectrofotométrica aumentariam muito a produção de NADPH, o que sobrecarrega o detector. As medidas de espectrofotometria foram realizadas imediatamente após o preparo das amostras e em intervalos de uma hora durante um período total de 5 horas. Foi feita a escolha da concentração de PEG de 20% em massa nas soluções porque esta é a usual em sistemas de duas fases aquosas utilizados nos processos de purificação de proteínas [Kula, 1990].

Utilizando a equação de Beer-Lambert, a quantidade de NADPH (C_{NADPH}) formada por minuto pode ser obtida a partir da parte linear na curva de absorbância (A^{340}) em função do tempo, considerando a absorvidade molar de NADPH [McDonald e col., 1979] como $\epsilon = 6,22 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ e o caminho ótico (b) de 1 cm.

$$A^{340} = \epsilon \cdot b \cdot C_{\text{NADPH}} \quad (3)$$

4.2 Titulação Calorimétrica

Titulações calorimétricas foram realizadas utilizando-se um microcalorímetro modelo 2277 TAM (Thermal Activity Monitor System, Thermometric AB, Järfälla, Suécia) a 298,15 K, a fim de determinar a entalpia de interação entre os diversos componentes. As variações de entalpia associadas à interação entre componentes foram obtidas comparando-se os valores de entalpias de diluição de cada um dos componentes em tampão puro com os valores obtidos para diluição de um componente na presença do outro (equação 4). Por exemplo, a entalpia de interação de NADP⁺ com PEG 400 foi determinada num experimento que consistia numa série de quatro adições consecutivas (5 µL cada) de NADP⁺ concentrado (0,5 mM) à cela calorimétrica inicialmente contendo 3,7 mL de tampão Tris-HCl e 20 µL de PEG 400 20% em massa. Após a quarta adição de titulante, as concentrações utilizadas nos estudos de calorimetria eram similares às utilizadas nas medidas de espectrofotometria (Tabela 1, página 5). As diferenças entre as entalpias de diluição de NADP⁺ em tampão puro ($\Delta H^{\text{dil}}_{\text{tampão}}$) e aquelas obtidas na curva de titulação para soluções de polímeros ($\Delta H^{\text{dil}}_{\text{PEG}}$) foram relacionadas à entalpia de interação (ΔH^{int}) entre NADP⁺ e PEG. Ambas calibrações elétrica e química [Briggner e col. 1991] foram realizadas a fim de confirmar a precisão da metodologia empregada.

Para garantir as condições isotérmicas necessárias a este tipo de medida, as amostras foram acondicionadas no equipamento durante uma hora antes de cada adição de titulante.

$$\Delta H^{\text{int}} = \Delta H^{\text{dil}}_{\text{PEG}} - \Delta H^{\text{dil}}_{\text{tampão}} \quad (4)$$

4.3. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

Experimentos de SAXS foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brazil) à temperatura ambiente de $(22 \pm 1) ^\circ\text{C}$, no comprimento de onda de $\lambda=1,608 \text{ \AA}$. As soluções de enzimas nas concentrações de $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($1,4 \times 10^{-10} \text{ M}$ para G-6-PDH) ou 10 mg.mL^{-1} ($1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ para HK) (Tabela 1, página 5) na ausência e presença de PEG foram seladas em celas de acrílico de 1 mm de espessura, com janelas de mylar perpendiculares ao feixe de raios-X incidente. Não foi possível medir soluções com concentrações menores que $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de proteína, como usadas nas medidas espectrofotométricas, pois a fração volumétrica das partículas era muito baixa para gerar um espalhamento de raios-X que pudesse ser medido (baixa relação sinal/ ruído). Amostras recém preparadas foram medidas duas vezes em um tempo de aquisição de 20 minutos por corrida. Os resultados apresentados representam a média destas medidas. Nenhum dano causado por irradiação foi observado durante a aquisição dos dados. As curvas obtidas foram corrigidas para homogeneidade do detector e correções necessárias foram realizadas para levar em conta o decréscimo na intensidade do feixe de raios-X durante o experimento. O fundo parasita (solução de tampão) foi subtraído, considerando a atenuação da amostra.

Já é bem estabelecido que a intensidade $I(q)$ de SAXS para soluções isotrópicas de partículas esféricas monodispersas de baixa anisometria (razão entre os eixos maior e menor da partícula), é dado por [Hayter & Penfold, 1983; Kotlarchyck & Chen, 1983]:

$$I(q) = k P(q) S(q) \quad (5)$$

onde $k = \gamma \cdot n_p (\Delta\rho)^2 V^2 \quad (6)$

Sendo que γ é um fator relacionado aos efeitos instrumentais, n_p corresponde à densidade numérica de partículas, $\Delta\rho$ é o contraste de densidade eletrônica entre a partícula espalhadora e o meio e V é o volume da partícula espalhadora. $P(q)$ na equação 5 é o fator forma normalizado da partícula ($P(0) = 1$) e $S(q)$ é o fator de interferência interpartículas ($q = 4\pi\sin\theta/\lambda$ é o vetor espalhamento e 2θ é o ângulo de espalhamento). Para valores baixos de densidade numérica de partículas $S(q)$ será ≈ 1 , e portanto $I(q)$ é proporcional a $P(q)$. Alguns trabalhos teóricos foram realizados a fim de calcular $P(q)$ para proteínas de baixa massa molar [Lattman, 1989; Pavlov & Fedorov, 1983]. No presente trabalho, o programa Crysol foi utilizado para calcular $P(q)$ [Svergun e col., 1995]. Este calcula o fator forma para macromoléculas de estrutura molecular conhecida. Pode-se também obter informações a respeito dos objetos espalhadores através da curva experimental e da análise da função de distribuição de distância $p(r)$. A intensidade de espalhamento $I(q)$ é descrita por uma transformada de Fourier de $p(r)$ [Glatter & Kratky, 1982].

$$p(r) = (1/2\pi^2) \int_0^\infty I(q) \cdot qr \cdot \sin(qr) \cdot dq \quad (7)$$

a qual fornece informações sobre a forma da partícula e $p(r) = 0$ para distâncias r maiores que as dimensões máximas da partícula $D_{\max}$. Para objetos isométricos, como esferas, $p(r)$ possui um máximo em torno de $D_{\max}/2$. Para objetos anisotrópicos, $p(r)$ decai linearmente para distâncias de magnitude entre o tamanho da secção transversal do objeto e sua dimensão máxima [Glatter, 1979].

Além disso, a função $p(r)$ também provê o valor do raio de giração, R_g , da partícula através da fórmula [Glatter, 1979]:

$$R_g^2 = \left(\int_0^{D_{\max}} p(r) r^2 dr \right) / \left(2 \int_0^{D_{\max}} p(r) dr \right) \quad (8)$$

Neste trabalho foi utilizado o programa Gnom [Semenyuk & Svergun, 1991] para calcular a $p(r)$ a partir das curvas experimentais de SAXS.

O valor de R_g pode também ser obtido a partir das curvas de espalhamento a baixo q onde a intensidade obedece a lei de Guinier [Guinier & Fournet, 1955]:

$$I(q) = k \exp(-q^2 R_g^2 / 3) \quad (9)$$

onde R_g pode ser diretamente calculado a partir da inclinação da parte linear do gráfico de $\ln [I(q)]$ vs q^2 (gráfico de Guinier).

Apesar de ser possível medir a intensidade em escala absoluta nos experimentos de SAXS [Orthaber e col., 2000], a determinação de γ na equação 6 requer um esforço experimental maior. Entretanto, a escala absoluta não provê nenhuma informação adicional com relação aos parâmetros estruturais de interesse como aqueles extraídos através das funções de $p(r)$ e gráficos de Guinier. Neste contexto, as curvas de SAXS serão apresentadas em função de unidades arbitrárias (u.arb.), sendo o k da equação 6 o fator de normalização na análise dos dados.

A influência da adição de glicose (10 g.L^{-1}) em soluções aquosas de HK contendo ou não PEG (20% em massa) também foi estudada. As medidas com as amostras contendo glicose foram realizadas após 5 horas de interação para se observar possíveis efeitos do PEG na cinética de ligação da glicose à HK.

4.4. Dicroísmo Circular (CD)

Espectros de CD foram obtidos utilizando-se um espectropolarímetro Jobin-Yvon CD 6 a $(25 \pm 1)^\circ \text{C}$. Uma cela de quartzo de 2cm foi utilizada para medir as bandas de absorção características de grupamentos amina, entre 190 e 260 nm. Os dados foram obtidos com velocidade de varredura de $100 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ e uma sensibilidade de 10^{-2} graus. Soluções de HK na ausência e presença de PEG400, 1500 ou 4000 foram preparadas em água deionizada nas concentrações apresentadas na Tabela 1 (página 5). Estes valores de concentração correspondem aos usados nas medidas de atividade enzimática de HK (Tabela 1). O conteúdo de α -hélice foi estimado utilizando-se a equação (10) [Chen e col., 1974]:

$$[\theta]_{220 \text{ nm}} = \frac{-40000}{\left(1 - \frac{k}{n}\right)} \quad (10)$$

onde $[\Phi]_{220 \text{ nm}}$ é a elipicidade molar a 220 nm, k é a constante dependente do comprimento de onda e n é o número de resíduos. Para obter o conteúdo de α -hélices de HK os valores de $k = 2,6$ (<http://dicroprot-pbil.ibcp.fr>) e $n = 457$ [Schulze, 1966] foram considerados.

5. Resultados e Discussão

5.1. Influência de PEG na atividade enzimática e conformação de glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH).

5.1.1. Influência de PEG na atividade enzimática de G-6-PDH

Para estimar a influência de PEG na atividade enzimática, a atividade da G-6-PDH foi medida em três meios distintos: tampão Tris-HCl, solução de PEG400 (20% em massa) em tampão e solução de PEG 4000 (20% em massa) em tampão. A atividade de G-6-PDH em solução de PEG 400 ou PEG 4000 aumentou na faixa de 5% a 20% para ambas massas molares em comparação com a atividade enzimática medida em tampão puro. Este aumento foi encontrado para um grupo de 8 experimentos para cada meio, logo após o preparo da amostra e permaneceu sem alterações durante 5 horas. Geralmente, em processos de partição de enzimas, as atividades são medidas logo após o preparo. Para este sistema foi verificado que após um período de 5 horas não há efeito do tempo sobre a atividade enzimática. Grimonprez & Johansson (1996) observaram que na presença de PEG de massa molar de 3350 Da, as atividades de fosfofrutoquinase e gliceraldeído-3-fosfato aumentaram 30% e 55%, respectivamente. O aumento do comprimento da cadeia de PEG pode levar a um aumento na hidrofobicidade, como sugerido por Forciniti e col. (1991). Seguindo esta idéia, a estrutura e o tipo de sítio ativo de uma determinada enzima pode determinar o aumento ou decréscimo da atividade relativa. No caso da G-6-PDH, a atividade aumenta similarmente na presença de PEG 400 ou PEG 4000, portanto o comprimento da cadeia parece ser um parâmetro inerte, pelo menos durante 5 horas.

5.1.2. Espalhamento de raio-X a baixo ângulo

G-6-PDH é um dímero de subunidades idênticas de 54316 Da com dois sítios ativos por dímero [Rowland e col., 1994]. As dimensões da G-6-PDH cristalizada foram determinados [Cosgrove e col., 1998] como $a = b = 105.71 \text{ \AA}$, $c = 224.31 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$ (correspondente à estrutura cristalográfica de 1DPG no banco de dados de proteínas PDB - www.rcsb.org/pdb). As curvas de espalhamento foram obtidas para G-6-PDH em três sistemas diferentes: tampão puro, solução de PEG400 20% em massa e solução de PEG 4000 20% em massa. As medidas foram realizadas logo após o preparo das amostras e levaram em média de 40 a 60 minutos, considerando as medidas de repetição. Os resultados estão apresentados nas Figuras 1a e 1b.

Figura 1: Curvas de espalhamento de raios-X medidas para G-6-PDH em: (a) (Δ) tampão puro, ($\square$) solução de PEG400 e (b) (O) solução de PEG4000, juntamente com a curva teórica calculada a partir da estrutura dimérica cristalográfica (correspondente à estrutura cristalográfica de 1DPG no banco de dados de proteínas PDB - www.rcsb.org/pdb).

Como se pode ver na figura 1a, as curvas de SAXS para a proteína em tampão puro (triângulo) e na presença de PEG 400 (quadrados) são idênticas, mostrando que, nas condições experimentais empregadas nestas medidas, a enzima possui conformações similares quando dissolvida em tampão puro e em solução de PEG 400. Entretanto, as curvas de SAXS para a enzima em presença de PEG 4000 são bem diferentes (Figura 1b), mostrando um valor de inclinação menor na região de valores pequenos de q . Este fato é a primeira evidência de que o complexo proteína/PEG 4000 possui um valor de R_g menor que nos outros casos estudados. Este ponto será mais explorado abaixo.

As curvas de SAXS para $q > 0,1 \text{ \AA}^{-1}$ apresentam muito ruído, pois este tipo de amostra (proteína em solução aquosa) possui um contraste de densidade eletrônica $\Delta\rho$ muito baixo entre a partícula espalhadora e o solvente. Além disso, estamos lidando com um regime diluído (valores de n_p pequenos) para evitar efeitos de interferência interpartículas nas curvas. Deve-se no entanto lembrar que o objetivo do presente trabalho é estudar as variações conformacionais na estrutura terciária da proteína em função da massa molar do PEG e que estas mudanças se dão na sua maioria na região de valores pequenos de q em SAXS. Leves modificações nos detalhes finos da proteína levariam a flutuações de densidade de pequeno alcance que seriam refletidas em valores altos de q , porém este não é o foco do trabalho.

Mantendo o objetivo de entender o comportamento de G-6-PDH em tampão puro e em solução contendo PEG 400 ou PEG 4000, calculou-se primeiramente a intensidade de espalhamento (função $P(q)$) de G-6-PDH utilizando o programa Crysol [Svergun e col., 1995], levando em conta as dimensões cristalográficas da estrutura dimérica (PDB: 1DPG). As Figuras 1a e 1b mostram o respectivo modelo $P(q)$ (linha contínua) superposto aos dados experimentais. Os dados experimentais e o modelo teórico estão em acordo e o experimento contendo G-6-PDH na presença de PEG 4000, indica que, neste caso, a enzima assume uma conformação próxima à sua estrutura cristalina ($R_g = 37 \text{ \AA}$). A partir do modelo de $P(q)$, o

raio de giração $R_g = 40 \text{ \AA}$ é calculado assumindo-se uma camada de hidratação de $3 \text{ \AA}$ de espessura [Svergun e col., 1995]. Contudo, existe uma diferença clara entre a função de espalhamento gerada a partir da estrutura cristalográfica e as curvas experimentais para G-6-PDH dissolvida em tampão puro ou em solução de PEG 400, na região de baixo q (Figura 1a). Essa diferença foi calculada através da análise de $p(r)$ (Figura 2) e Guinier (Figura 3) como segue abaixo.

As funções de distribuição de distância $p(r)$ e as intensidades de espalhamento correspondentes de G-6-PDH em tampão (similar ao PEG 400) estão mostradas nas Figuras 2a e 2b, respectivamente, juntamente com os dados experimentais. O mesmo tratamento de dados foi realizado para G-6-PDH em PEG 4000, como se pode observar nas Figuras 2a e 2c. As intensidades de espalhamento calculadas e os dados de SAXS estão em pleno acordo, demonstrando a consistência no cálculo de $p(r)$. Os valores resultantes de $I(0)$, D_{max} e R_g (eq. 8 e 9 da página 10) obtidas através das funções $p(r)$ estão listados na Tabela 2. Observa-se através destes resultados que a enzima G-6-PDH possui uma conformação mais compacta quando dissolvida em solução de PEG 4000 do que quando em tampão puro ou em solução de PEG 400. Na presença de PEG 4000 os valores de R_g determinados por diferentes métodos são similares àquele da estrutura cristalina.

Figura 2: (a) Função de distribuição de distância $p(r)$ obtida para G-6-PDH em solução de PEG 400 (linha contínua) ou PEG 4000 (linha interrompida). Intensidades de espalhamento $I(q)$ correspondentes obtidas para G-6-PDH em tampão puro (b) (similar ao PEG 400) ou em solução de PEG 4000 (c), juntamente com os dados experimentais.

Tabela 2: Raios de giração (R_g) calculados por meio do software Crysol, análise de Guinier (equação 9) e a partir da equação 8; dimensão máxima da partícula D_{max} e $I(0)$ calculados a partir da função de $p(r)$ para G-6-PDH em tampão, em solução de PEG 400 (20% em massa) e em solução de PEG 4000 (20% em massa).

Solvente	R_g^{Crysol} (Å)	$R_g^{Guinier}$ (Å)	Função $p(r)$		
			$R_g^{equação\ 8}$ (Å)	$I(0)$	D_{max} (Å)
Tampão	-	70	74	0,02386	220
PEG 400	-	70	74	0,02386	220
PEG 4000	40	37	43	0,005575	120

Com respeito ao sistema composto de G-6-PDH em tampão puro e na presença de PEG 400, as dimensões máximas e os raios de giro são praticamente 2 vezes maiores que em PEG 4000 (Tabela 2), evidenciando uma mudança conformacional que gera uma partícula espalhadora mais alongada. O valor de $I(0)$ aumenta de um fator de aproximadamente 4 com relação ao observado para o complexo proteína/PEG 4000 (Tabela 2). Uma estrutura mais aberta da proteína pode ser a causa disto (desnaturada ou parcialmente aberta) ou agregação. Todos estes fenômenos levariam a um aumento no raio de giração e dimensão máxima. Assumindo-se a abertura da proteína, o número de partículas permaneceria o mesmo, porém o volume da partícula espalhadora deveria ser o dobro, desde que o fator instrumental (γ na equação 6, página 8) seja o mesmo para todos os espectros de SAXS obtidos e o contraste de densidade eletrônica da partícula com relação ao ambiente $\Delta\rho$ não seja alterado. Isto é válido para uma proteína que abre em apenas uma direção, aumentando seu D_{max} , o que é compatível com os resultados aqui apresentados. Como discutido na seção 4.3 (páginas 8-10),

se a enzima expandir em três dimensões, $p(r)$ deveria apresentar um padrão simétrico em torno de $D_{max}/2$, o que não se observa na Figura 2a (página 17). Na realidade, as características de $p(r)$ indicam a presença de partículas espalhadoras alongadas na solução.

Fica claro através destes resultados que G-6-PDH dissolvida em solução de PEG 4000 apresenta valores de R_g similares aos observados para a enzima na forma cristalina (forma dimérica) e que na presença de tampão puro ou PEG 400, tanto a dimensão máxima quanto o R_g são duas vezes maiores que os valores obtidos para a forma dimérica (Tabela 2) indicando abertura da proteína ou agregação.

Finalmente, os gráficos de Guinier estão apresentados na Figura 3 na região de q pequeno (as intensidades experimentais são mostradas deslocadas para enfatizar as diferentes inclinações das curvas). Os valores de R_g estão incluídos na Tabela 2 para comparação. G-6-PDH na presença de PEG 4000 apresenta uma região de Guinier com $R_g = 37 \text{ \AA}$ (dentro do limite de Guinier $qR_g < 1$) [Guinier & Fournet, 1955], de acordo com o obtido a partir do modelo da estrutura cristalográfica (PDB: 1DPG) e análise de $p(r)$. Por outro lado, a curva correspondente à de G-6-PDH em tampão (e em PEG 400, dados não mostrados) não exibe uma faixa linear clara dentro do mesmo intervalo. Entretanto, pôde-se estimar o valor de $R_g \cong 70 \text{ \AA}$, o qual coincide com o obtido através da análise de $p(r)$.

Figura 3: Gráficos de Guinier obtidos para G-6-PDH em (□) tampão puro (ou PEG 400) e (○) PEG 4000.

A análise de dados obtidas a partir das curvas de SAXS mostraram que a massa molar do PEG influencia a conformação da proteína G-6-PDH.

5.1.3. Medidas de titulação calorimétrica

O mecanismo catalítico para a atividade enzimática de G-6-PDH na oxidação de glicose-6-fosfato foi proposto por Cosgrove e col. (1998) (Figura 4). O aminoácido His-240 atua como uma base comum, subtraindo um próton do C1-OH. No estado de transição, uma carga positiva é formada no resíduo His-240. Esta carga positiva é estabilizada pelo grupo carboxilato do resíduo Asp-177, formando a chamada díade catalítica. O próximo passo é a transferência do hidrogênio da posição C1 da G-6-P à posição C4 do anel piridínico do NADP⁺, gerando a forma reduzida NADPH. Desta forma, eles mostraram que o aminoácido His-178 é um resíduo importante na ligação do fosfato a G-6-P através de ligação de hidrogênio e interação eletrostática.

Figura 4: Representação esquemática do mecanismo de ação catalítica proposto por Cosgrove e colaboradores (1998). (A) estado de transição, (B) produtos da reação.

A existência de interações específicas entre PEG e a co-enzima NADP⁺ ou a enzima G-6-PDH foi investigada através de medidas de calorimetria. Os experimentos foram realizados a fim de verificar possíveis variações de entalpia devido a estas interações. Para este propósito, as entalpias de diluição de enzima e co-enzima foram determinadas em tampão puro e na presença de PEG 400 ou PEG 4000. Qualquer interação ocorrida levaria a diferentes valores de entalpia de diluição e subtraindo-se o valor obtido da referência para diluições em tampão, a entalpia da interação, ΔH_{int} (eq. 4, página 7), entre PEG e enzima ou co-enzima poderia ser obtida [Silva & Loh, 2000]. Os resultados obtidos para os sistemas estudados estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3: Variações de entalpia de diluição, ΔH_{dil} (kJ/mol), medidas em Tris-HCl (pH 7,5), PEG 400 e PEG 4000 e variações de entalpia devido a interações específicas, ΔH_{int} (kJ/mol), obtidas a partir de titulações calorimétricas. O titulante foi $NADP^+$ ou G-6-PDH, enquanto o titulado foi tris-HCl ou solução de PEG.

Titulante	ΔH_{dil} (kJ/mol) /Tris-Hcl	ΔH_{dil} (kJ/mol) /Solução de PEG 400	ΔH_{int} (kJ/mol) com PEG 400	ΔH_{dil} (kJ/mol) / solução de PEG 4000	ΔH_{int} (kJ/mol) com PEG 4000
NADP+	$-72,6 \pm 0,8$	$-81,9 \pm 0,9$	$-81,9 - (-72,6)$ $= -9,3$	$-99,3 \pm 0,9$	$-99,3 - (-72,6)$ $= -26,7$
G-6-PDH	0	0	0	0	0

Os resultados mostram que a diluição de $NADP^+$ nestes meios sempre apresentou valores exotérmicos e nenhuma dependência do ΔH_{dil} com a concentração de $NADP^+$ foi observada. Os resultados mostram também que as interações entre as soluções de $NADP^+$ e PEG são entalpicamente mais favoráveis que as observadas entre $NADP^+$ e o tampão puro, sugerindo uma razão para o aumento da atividade enzimática em PEG 400 ou PEG 4000 em comparação ao tampão puro por um período de 5 horas. Outra observação importante é que os valores de ΔH_{dil} obtidos para $NADP^+$ dissolvido em solução de PEG 4000 são mais exotérmicos que os encontrados para PEG 400, $-99,3$ kJ/mol e $-81,9$ kJ/mol, respectivamente. As interações exotérmicas entre $NADP^+$ e PEG são provavelmente devido às ligações de hidrogênio formadas entre as unidades $-(CH_2-CH_2-O)-$ de PEG e os grupos hidroxila nas pentoses do $NADP^+$. O número de monômeros de PEG 400 é próximo a 7, ao passo que para PEG 4000 são aproximadamente 89. Na mesma quantidade de polímero, PEG

4000 apresenta mais $-(CH_2-CH_2-O)-$ unidades por cadeia que podem interagir com NADP+ do que o PEG 400 pois as cadeias de PEG 400 são bem pequenas. Portanto, é provavelmente por isso que o valor de ΔH_{dil} encontrado para NADP+ dissolvido em solução de PEG 4000 é o mais exotérmico.

Ao contrário do NADP+, G-6-PDH não apresentou interações com o meio estudado, uma vez que todos os valores de ΔH_{dil} foram zero (Tabela 3). Entretanto, como as quantidades de enzima utilizadas nos experimentos foi bastante pequena, deve-se analisar cautelosamente os resultados. Estes resultados podem explicar as medidas espectrofotométricas que mostraram um aumento de até 20% na atividade enzimática na presença de PEG. Este aumento pode ser causado por interações favoráveis entre NADP+ e PEG, ao menos nesta faixa de concentração.

5.2. Influência de PEG na atividade enzimática e conformação de hexoquinase (HK)

5.2.1. Influência de PEG na atividade enzimática de HK

Para estimar a influência de PEG na atividade enzimática de HK, quatro meios distintos foram considerados: (i) tampão Tris-HCl e soluções de tris-HCl contendo (ii) PEG 400, (iii) PEG 1500 e (iv) PEG 4000. A ação catalítica da HK segue o modelo de Michaelis-Menten. A atividade enzimática de HK foi calculada a partir das inclinações das curvas nos estágios iniciais e expressas em termos de número de mol de NADPH formado por minuto, como mostra a Tabela 4. Comparando as atividades enzimáticas medidas em tampão com as medidas em presença de PEG 400, um aumento de aproximadamente 6% foi observado. Na presença de PEG 1500 ou PEG 4000 a atividade enzimática diminuiu 14% e 7%, respectivamente. Apesar destas mudanças na atividade enzimática estarem próximas à

margem de erro das medidas (5 – 10 %), elas estão de acordo com os resultados encontrados na literatura para medidas de estresse osmótico [Rand e col., 1993], que indicaram que o número de moléculas de água liberadas no momento em que a glicose se liga aumenta de 50 para 326, quando a massa molar de PEG aumenta de 300 para 1000 g.mol⁻¹. Quando a massa molar do PEG é maior que 1000 g.mol⁻¹, as cadeias são excluídas dos maiores compartimentos aquosos ao redor da proteína. Cadeias maiores (M > 1000 g.mol⁻¹) de PEG supostamente desidratam a proteína antes dela se ligar a glicose, reduzindo a atividade da água e diminuindo o número de moléculas de água liberadas durante a ligação da glicose.

Comparando os resultados na Tabela 4 com os resultados obtidos para a glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH) (seção 5.1.1., página 12), um comportamento distinto é observado. A atividade de G-6-PDH aumentava similarmente na presença de PEG 400 ou 4000, portanto o comprimento da cadeia de PEG era um parâmetro inerte no sistema contendo G-6-PDH. Recentemente, estudos espectroscópicos sobre as interações PEG-lisozima mostraram que, independentemente da massa molar, PEG não exerce influência na atividade enzimática [Malzert et al., 2003]. A atividade enzimática está relacionada ao sítio ativo e às conformações de cada enzima, os quais são parâmetros bastante complexos. Portanto, prever o efeito de PEG no comportamento de enzimas de uma forma generalizada é uma tarefa complicada.

Tabela 4: Velocidade de formação de NADPH devido à atividade de HK, conteúdo de α -hélices na estrutura da HK e raio de giração (R_g) da HK na ausência e na presença de PEG.

	$\mu\text{mol NADPH.L}^{-1}$.min^{-1}	Conteúdo de α -hélice (%)	R_g (Å)
Ausência de PEG	15,732	47	32
PEG 400	16,676	32	32
PEG 1500	13,596	37	120
PEG 4000	14,674	35	57

5.2.2. Dicroísmo Circular

Comparando-se os espectros de dicroísmo circular, CD, obtidos para soluções aquosas de HK contendo ou não PEG (Figura 5) observa-se que a estrutura secundária da HK em soluções contendo PEG difere levemente da obtida para a HK em água pura. Glicose não pôde ser adicionada aos sistemas pois a sua atividade ótica interferiria na obtenção do espectro da enzima. O tampão tris-HCl também mostrou interferência nas medidas e teve de ser substituído por água deionizada.

Figura 5: Espectros de dicroísmo circular obtidos para HK em água (□) ou HK em solução aquosa de (▽) PEG 400, (○) PEG 1500 e (▲) PEG 4000.

A estrutura nativa cristalizada de HK proveniente de fungo possui 35% de α -hélices, 28% de folhas- β , 19% de dobras- β e 18% de estrutura randômica [Olmo e col., 2002]. HK pode ser classificada como uma proteína α/β , neste caso as intensidades do espectro de CD relacionadas às α -hélices usualmente predominam sobre aquelas de folhas- β [Fasman, 1996]. O conteúdo de α -hélices presentes na HK em água e em presença de PEG foi estimado utilizando-se a equação (10), página 11, e estão resumidos na Tabela 4, página 25. Após adição de PEG 400, 1500 ou 4000 ao meio observou-se uma diminuição de 32%, 21% e 26%, respectivamente do número de α -hélices com relação àquele observado em água pura. Esta diminuição da quantidade de α -hélices da HK quando PEG é adicionado ao meio pode estar relacionada a uma abertura da enzima, com perda de parte da estrutura secundária e terciária, devido ao efeito de desidratação da HK causado pelo PEG. A estabilidade da proteína é afetada pela presença do PEG. Estes resultados indicam que não existe correlação direta entre as variações na quantidade de α -hélices na HK com o mecanismo de atividade observado na

presença de PEG (Tabela 4, página 25), uma vez que a atividade aumenta em presença de PEG 400 e diminui em presença de PEG 1500 e 4000, apesar do conteúdo de α -hélices ser praticamente o mesmo.

5.2.3. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

5.2.3.1. Sistema HK/água/PEG

A Figura 6 mostra as funções de $p(r)$ obtidas a partir das curvas de SAXS de HK em solução aquosa na ausência e presença de PEG 1500 e PEG 4000. A Figura 7 mostra os ajustes teóricos correspondentes aos dados experimentais. A curva de espalhamento, e a função $p(r)$ do sistema HK/água/PEG 400 são idênticos aos observados para soluções sem PEG e portanto não mostradas. Algumas medidas foram realizadas com PEG de massa molar maior (20000 e 35000 g.mol⁻¹) porém as soluções se tornaram turvas, provavelmente devido à presença de grandes agregados ou denaturação da HK (dados não apresentados).

Figura 6: Funções de distribuição de distância $p(r)$ para os sistemas HK/água ($\square$), HK/água/PEG 1500 ($\circ$) e HK/água/PEG4000 (linha contínua).

A partir da Figura 7a, nota-se claramente que o espalhamento deve-se à contribuição de dois tipos distintos de partículas espalhadoras em solução. Na região de valores pequenos de q (ressaltada por uma linha interrompida na figura), observa-se um aumento acentuado na intensidade, o que está relacionado aos grandes agregados de proteína, portanto o cálculo de $p(r)$ foi realizado excluindo-se esses dados. Os perfis das curvas de SAXS na outra região de q é consistente com o espalhamento do dímero de HK pois a análise de $p(r)$ gerou valores para R_g e D_{max} de 32 Å e 110 Å (Fig. 6), respectivamente. O valor de R_g de 32 Å obtido para HK em água, na ausência e na presença de PEG 400, é consistente com o encontrado na literatura para o dímero de HK [www.rcsb.org (PDB ID = 1HKG)].

Figura 7: Intensidades de espalhamento calculadas com o programa Glatter (linhas contínuas), juntamente com as experimentais obtidas para (a) HK/água, (b) HK/água/PEG 1500 e (c) HK/água/PEG4000.

O padrão de espalhamento de HK em PEG 1500 (Figura 7b) é bem diferente dos outros: ele apresenta maior valor de intensidade na região de q pequeno. Essa característica é a primeira evidência de que HK em soluções de PEG 1500 apresenta estruturas maiores que podem ser atribuídas a um processo de agregação de HK. Isto pode ser confirmado pelos resultados da análise de $p(r)$ que gerou valores de $D_{\max} = 350 \text{ Å}$ e $R_g = 120 \text{ Å}$ (Figura 6). Deve-se notar que estes valores podem estar subestimados pois dimensões maiores não são

acessíveis através deste tipo de medida devido à resolução do set-up adotado. Portanto, aparentemente, abertura da enzima também está ocorrendo sobre a influência de PEG 1500, induzindo ao mesmo tempo a formação de agregados maiores em solução.

Quanto à influência de PEG 4000 na estrutura da HK em solução, as curvas de SAXS correspondentes (Figura 7c) revelaram dímeros de HK, como em água destilada e em PEG 400, e alguns agregados foram evidenciados novamente através do grande valor de inclinação na região de q pequeno. Isto foi confirmado através da análise de $p(r)$ que refletiu o mesmo comportamento da HK dimérica com baixas frequências a grandes distâncias com $D_{\max} = 180\text{\AA}$ e $R_g = 57\text{\AA}$.

Considerando que em solução de HK na concentração de $10,0\text{ g L}^{-1}$ as espécies dominantes são dímeros, pode-se estimar 6×10^{19} dímeros por 1000 cm^3 . O volume de um dímero foi calculado (utilizando $R_g = 32\text{\AA}$) como sendo $137,3 \times 10^{-21}\text{ cm}^3$, portanto $7,3 \times 10^{21}$ dímeros podem ocupar o volume de 1000 cm^3 sem se sobrepor. Estas estimativas mostram que existe espaço livre entre os dímeros na concentração de 10 g.L^{-1} . PEG 400 provavelmente é suficientemente pequeno ($R_g = 4,5\text{ \AA}$) [Arakawa & Timasheff, 1985] para ocupar este espaço livre sem ser excluído, enquanto que PEG 1500 ($R_g = 7,6\text{ \AA}$) e PEG 4000 ($R_g = 24\text{ \AA}$) são muito maiores e poderão ser excluídos da região interpartícula. [Timasheff, 2002].

Ao analisarmos os resultados de forma global (Tabela 4, página 25) pode-se concluir que o efeito de agregação (aumento do R_g da enzima) causado pela adição de PEG 1500 ou PEG 4000 ao sistema é o efeito que apresenta maior impacto na atividade da enzima. Apesar das medidas de CD terem revelado que o PEG provoca uma pequena abertura na enzima (menor conteúdo de α -hélices), o que possivelmente facilitaria a entrada da glicose no sítio ativo e aumentaria a atividade (como observado no caso da adição de PEG 400), ao aumentar-se a massa molar do PEG para 1500 ou 4000 a agregação das enzimas se sobrepõe a este efeito de abertura e acaba causando a diminuição da atividade da enzima.

5.2.3.2. A adição de glicose ao sistema HK/água/PEG

As intensidade de espalhamento obtidas para HK em água na ausência e presença de glicose após 5 horas estão dispostas na Figura 8a e as funções $p(r)$ correspondentes na Figura 8b. Da mesma forma que para o sistema sem glicose (Figuras 6, página 28 e Figura 7, página 29), o cálculo de $p(r)$ foi realizado sem os dados de espalhamento da região interna de q devido à presença de agregados. A função $p(r)$ gerou evidências que quando glicose é adicionada à solução de HK em água, os valores de R_g e D_{max} da HK diminuíram de 32 Å para 30 Å e de 110 Å para 85 Å, respectivamente. Este efeito está de acordo com o fechamento da cavidade da HK durante a ligação da glicose [Parsegian e col. 2000]. As curvas de SAXS obtidas para HK em solução aquosa de PEG 400 na presença de glicose (Figura 8a, triângulos) revelaram que PEG 400 induziu agregação de HK, como evidenciado pela inclinação acentuada na região de q pequeno. Esta observação é interessante pois este efeito não foi observado na ausência de glicose.

Figura 8: (a) As intensidades de espalhamento e (b) as funções de distribuição de distância $p(r)$ para os sistemas: HK/água (■), HK/água/glicose (○), HK/água/PEG400/glicose (▽).

Nas figuras 9a e 9b estão dispostas as curvas de SAXS para os sistemas HK/água/PEG 1500 e HK/água/PEG 4000, respectivamente, na presença e ausência de glicose após cinco horas de interação.

Figura 9: Intensidade de espalhamento para os sistemas: (a) HK/água/PEG 1500 (●) e HK/água/PEG 1500/glicose (○) e (b) HK/água/PEG 4000 (■) e HK/água/PEG 4000/glicose (□).

Na ausência de glicose, o polímero induziu a agregação de HK. Esta agregação é aproximadamente a mesma na presença de glicose e de PEG 1500, porém é fortemente intensificada na presença de PEG 4000 e glicose, como evidenciado pela acentuada inclinação. Apesar da agregação de HK ser evidente, a precipitação não foi observada. Como controle, o sistema PEG/glicose (sem HK) foi preparado nas mesmas concentrações e nenhuma separação de fase foi observada.

5.3. Influência de PEG na atividade enzimática e conformação de álcool desidrogenase (AD)

Curvas de espalhamento foram obtidas para AD na concentração de 10 mg. mL⁻¹ ($2,9 \cdot 10^{-4}$ M) em diferentes sistemas: água pura ou em solução de PEG de massas molares variando de 400 a 35000 g.mol⁻¹. As medidas foram efetuadas logo após o preparo das soluções e levaram em média de 40 a 60 minutos, considerando as medidas de repetição. Os resultados estão apresentados na Figura 10.

Figura 10: Curvas de espalhamento de raio-X para álcool desidrogenase (AD) em: água, solução de PEG 400, PEG 4000, e PEG 35000 g.mol⁻¹

Como se pode notar a partir da Figura 10, as curvas de SAXS para AD em água pura e na presença de PEG 400 são idênticas, mostrando que, nas condições experimentais empregadas, a enzima possui conformação similar quando dissolvida em água ou em solução de PEG 400. As curvas de SAXS em solução de PEG de massa molar mais alta são bem diferentes, apresentando inclinações distintas na região interna de q . Esta é a primeira

evidência de que a enzima em presença de PEG de alta massa molar possui um valor de R_g diferente da enzima em água.

Para analisar melhor estas diferenças conformacionais foi feito o gráfico de Guinier (Figura 11) na região de baixo q (as intensidades experimentais estão destacadas para enfatizar as diferentes inclinações), o que permitiu, através da equação 9 (página 10), o cálculo do raio de giração (R_g) da enzima em cada solução estudada como mostra a Tabela 5.

Figura 11: Gráficos de Guinier obtidos para AD na concentração de 10 mg.mL^{-1} em água pura ou em solução de PEG de massas molares 400, 4000 e 35000 g.mol^{-1} .

Utilizando-se o programa Crysol [Svergun e col., 1995], calculou-se a intensidade SAXS (função $P(q)$) da AD, levando-se em conta a estrutura cristalográfica (1YKF) [www.rcsb.org]. Obteve-se através deste cálculo preliminar o raio de giro teórico da AD como sendo de 32 Å.

Tabela 5: Raio de giração (R_g) calculado utilizando análise de Guinier (equação 9, página 10) para AD em água ou em solução 20% em massa de PEG 400, 4000 ou 35000 g.mol⁻¹.

Meio	R_g^{Guinier} (Å) para AD
água	97
PEG400	91
PEG4000	89
PEG35000	97

A enzima AD apresentou um raio de giração em água muito maior do que aquele calculado a partir dos dados cristalográficos, o que pode indicar um processo de agregação ocorrendo não só nas soluções que contêm PEG mas também em água, tornando difícil a análise comparativa da influência de PEG neste sistema.

Observou-se que num tempo de 16 horas de interação existe um aumento significativo na intensidade de espalhamento se a solução é novamente medida após 16 horas (Figura 12), o que pode indicar que está ocorrendo um processo de agregação em função do tempo.

Figura 12: Curvas de espalhamento de raio-X para AD em: água logo após preparo da solução e após 16 horas do preparo da solução.

Os programas Gnom e Crysol não puderam ser utilizados nestes sistemas em que as amostras se mostraram compostas por diferentes unidades espalhadoras. O mesmo processo de agregação foi observado com outra enzima testada: a lipase (resultados não apresentados).

Testou-se também a influência da co-enzima NADP^+ nestes sistemas e observou-se que não há alterações nas curvas de espalhamento das enzimas na ausência ou presença de NADP^+ .

6. Conclusões

PEG é comumente tratado na literatura como um polímero inerte para aplicações biotecnológicas. Neste trabalho evidenciou-se o oposto, resultados quantitativos em duas faixas de concentração distintas revelaram um efeito significativo de PEG na atividade enzimática e na conformação de três enzimas: G-6-PDH, HK e AD.

Na faixa de maior concentração de G-6-PDH ($1,4 \times 10^{-10}\text{M}$), mudanças conformacionais da G-6-PDH foram evidenciadas por SAXS. Na presença de PEG 4000 observou-se uma conformação mais compacta da proteína, enquanto que na presença de PEG 400 uma conformação mais expandida foi encontrada, similar à conformação da enzima no tampão puro (nenhuma alteração na conformação da enzima foi observada durante um período de 5 horas). Por outro lado, numa concentração mais baixa de G-6-PDH ($7 \times 10^{-15}\text{M}$), observou-se por espectrofotometria e medidas calorimétricas que PEG aumenta a atividade enzimática, independentemente da massa molar, devido a interações favoráveis entre a co-enzima NADP^+ e PEG e não devido a interações entre G-6-PDH e PEG. Este resultado é muito importante pois NADP^+ é responsável pela produção de ATP em muitos processos biológicos. As medidas de calorimetria também evidenciaram que a diluição de NADP^+ nos meios contendo PEG sempre apresentou valores exotérmicos e nenhuma dependência do

ΔH_{dil} com a concentração de NADP⁺. A presença da co-enzima NADP⁺ nos sistemas estudados não apresentou influência nas curvas de espalhamento de raios-X obtidas para G-6-PDH e AD.

Para a enzima HK foi observado através de medidas de SAXS na faixa de maior concentração ($1,0 \times 10^{-4}$ M) que a HK apresenta uma conformação mais compacta quando dissolvida em água ou em solução de PEG 400 do que em PEG de maior massa molar (1500 ou 4000). Este aumento no raio de giração da HK em presença de PEG de alta massa molar pode ser causado por uma estrutura protéica mais aberta ou por agregação. Num período de tempo de 16 horas para o sistema PEG/HK não houve alteração na curva de espalhamento de raio-X em função do tempo. Numa concentração mais baixa de HK ($5,8 \times 10^{-8}$ M), observou-se por dicroísmo circular que a presença de PEG no meio provoca uma diminuição da porcentagem de α -hélices da enzima, o que pode estar relacionado a uma abertura da enzima e perda de parte da estrutura secundária e terciária. Medidas espectrofotométricas mostraram um aumento de aproximadamente 6% da atividade enzimática na presença de PEG 400. Porém, na presença de PEG 1500 ou PEG 4000, a atividade enzimática diminuiu 14% e 7%, respectivamente. O efeito de agregação da HK em presença de PEG 1500 e 4000 deve ser responsável por esta perda de atividade.

A enzima AD apresentou valores de raio de giro em água e em solução de PEG muito maiores do que aquele calculado a partir dos dados cristalográficos, o que indica que existe um processo de agregação ocorrendo não só nas soluções que contém PEG mas também em água, tornando difícil a análise comparativa da influência de PEG neste sistema. Após 16 horas a solução de AD em PEG foi novamente medida e um novo aumento na intensidade de espalhamento foi observado, indicando que o processo de agregação observado evolui com o tempo.

Referências Bibliográficas

ALBERTSSON, PA; Partition of proteins in liquid polymer-polymer 2-phase systems, *Nature*, vol. 182 (4637), p.709-711, 1958.

ALBERTSSON, PA; JOHANSSON, G; TJERNELD, F. In: Separation Process in Biotechnology. Nova York: Marcel Dekker, 1990.

ALBIG, W e ENTIAN, KD; Structure of yeast glucokinase, a strongly diverged specific aldohexose-phosphorylating isoenzyme, *Gene*, vol. 73 (1), p. 141-152, 1988.

ARAKAWA, T; TIMASHEFF, SN; Mechanism of poly(ethylene glycol) interaction with proteins, *Biochemistry*, vol. 24 (24), p. 6756-6762, 1985.

ATHA, DH e INGHAM, KC; Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols – analysis in terms of excluded volume, *J. Biol. Chem*, vol. 256 (23), p. 2108-2117, 1981.

BENNETT, WS e STEITZ, TA; Glucose-induced conformational change in yeast hexokinase, *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 75 (10), p. 4848-4852, 1978.

BENNETT, WS e STEITZ, TA; Structure of a complex between yeast hexokinase-A and glucose. 2. Detailed comparisons of conformation and active site configuration with the native hexokinase-B monomer and dimer, *J. Mol. Biol.*, vol. 140 (2), p. 211-230, 1980.

BERGMAYER, HU; In: Methods of Enzymatic Analysis, Vol 2, p. 222-223, 3rd. Ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1984.

BHAT, R; TIMASHEFF, SN; Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols, *Protein Science*, vol. 1 (9), p. 1133-1143, 1992.

BRIGGNER, LE; WADSÖ, I; Test and calibration processes for microcalorimeters, with special reference to heat-conduction instruments used with aqueous systems, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, vol. 22 (2), p. 101-118, 1991.

CÁRDENAS, M L; CORNISH-BOWDEN, A e URETA, T, Evolution and regulatory role of the hexokinase, *Biochem. et Biophys. Acta – Molecular cell research*, vol. 1401 (3), p. 242-264, 1998.

CHEN, Y-H; CHEN, JT; CHAU, KH; Determination of helix and beta-form of proteins in aqueous-solution by circular-dichroism, *Biochemistry*, vol. 13 (16), p. 3350-3359, 1974.

COSGROVE, MS; NAYLOR, C; PALUDAN, S; ADAMS, MJ e LEVY, HR; On the mechanism of the reaction catalyzed by glucose 6-phosphate dehydrogenase, *Biochemistry*, vol. 37 (9), p. 2759-2767, 1998

FASMAN, GD; In: Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules, New York: Plenum Press, 1996.

FORCINITI, D; HALL, CK e KULA, MR; Protein partitioning at the isoelectric point – influence of polymer molecular weight and concentration and protein size, *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 38 (9), p. 986-994, 1991.

FURNESS, EL; ROSS, A; DAVIS, TP; KING, GC, A hydrophobic interaction site for lysozyme binding to polyethylene glycol and model contact lens polymers, *Biomaterials*, vol. 19 (15), p. 1361-1369, 1998.

GLATTER, O; e KRATKY, O; In: Small Angle X-Ray Scattering, London: Academic Press, 1982.

GLATTER, O; Interpretation of real-space information from small-angle scattering experiments, *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 12, p. 166-175, 1979.

GRIMONPREZ, B; JOHANSSON, G; Liquid-liquid partitioning of some enzymes, especially phosphofructokinase, from *Saccharomyces cerevisiae* at sub-zero temperature, *J. Chromatogr. B- Biomedical Applications*, vol. 680 (1-2), p.55-63, 1996.

GUINIER, A; FOURNET, G; In: Small Angle Scattering of X-Rays, New York: Wiley & Sons, 1955.

HAO, XIAOFENG; Enzymatic substrate chip, its manufacture and application. Patente chinesa nº CN 1459635, 2003.

HAYTER, JB; PENFOLD, J; Self-consistent structural and dynamic study of concentrated micelle solutions, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, vol. I (77), p. 1851-1863, 1981.

HAYTER, JB; PENFOLD, J; Determination of micelle structure and charge by neutron small-angle scattering, *Colloid Polymer Sci.*, vol. 261 (12), p. 1022-1030, 1983.

<http://dicroprot-pbil.ibcp.fr>

HUDDLESTON, JG; WANG R; FLANAGAN, JA; O'BRIEN, S e LYDDIATT, A.; Variation of protein partition coefficients with volume ratio in poly(ethylene glycol)-salt aqueous 2-phase systems, *J. Chromatogr. A*, vol. 668 (1), p. 3-11, 1994.

JOHANSSON, G. In: Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications. Nova York: Plenum Press, 1992.

JONSSON, M; SKEPO, M; TJERNELD, F e LINSE, P., Effect of spatially distributed hydrophobic surface residues on protein-polymer association, *J. Phys. Chem B*, vol. 107 (23), p. 5511-5518, 2003.

KOTLARCHYK, M; CHEN, SH; Analysis of small-angle neutron-scattering spectra from polydisperse interacting colloids, *J. Chem. Phys.*, vol. 79 (5), p. 2461-2469, 1983.

KULA, MR; Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. *Bioseparation*, vol. 1 (3-4), p. 181- 189, 1990.

KULKARNI, AM; CHATTERJEE, AP; SCHWEIZER, KS e ZUKOSKI, CF; Effects of polyethylene glycol on protein interactions, *J. Chem. Phys.*, vol. 113 (21), p. 9863-9873, 2000.

LATTMAN, EE; Rapid calculation of the solution scattering profile from a macromolecule of known structure, *Proteins-structure function and genetics*, Vol. 5 (2), p. 149-155, 1989.

LEE, JC; LEE, LLY; Preferential solvent interactions between proteins and polyethylene glycols, *J Biological Chem*, vol. 256 (2), p.625-631, 1981.

MALZERT, A; BOURY, F; RENARD, D; ROBERT, P; LAVENANT, L; BENOÎT, JP e PROUST, JE; Spectroscopic studies on poly(ethylene glycol)-lysozyme interactions, *Int J Pharm.*, vol. 260 (2), p.175-186, 2003.

McDONALD, RC; ENGELMAN, DM; STEITZ, TA, Small angle X-ray scattering of dimeric yeast hexokinase in solution, *J. Biol. Chem.*, vol. 254 (8), p. 2942-2943, 1979.

NINNI, L; CAMARGO, MS; MEIRELLES, AJA; Water activity in poly(ethylene glycol) aqueous solutions, *Thermochimica Acta*, vol. 328 (1-2), p. 169-176, 1999.

OLMO, R; BLANCO, MD; TEIJÓN, C; Socorro, JM; TEIJÓN, J.M; *J. Inorganic Biochem.*, vol. 89, p. 107-114, 2002.

ORTHABER, D; BERGMANN, A; GLATTER, O; SAXS experiments on absolute scale with Kratky systems using water as a secondary standard, *Journal of applied crystallography*, vol.33 (2), p. 218-225, 2000.

PARSEGIAN, VA; RAND, RP; RAU, DC; *Methods in Enzymology*, vol. 259, p. 43-94, 1995.

PARSEGIAN, VA; RAND, RP e RAU, DC; Osmotic stress, crowding, preferential hydration, and binding: A comparison of perspectives, *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 97 (8), p. 3987-3992, 2000.

PATEL, PD e RUSSEL, WB; An experimental study of aqueous suspensions containing dissolved polymer. A phase-separation, *J. Colloid Interface Sci*, vol. 131 (1), p. 192-200, 1989.

PAVLOV, MY; FEDOROV, BA; Improved technique for calculating x-ray scattering intensity of bio-polymers in solution – evaluation of the form, volume, and surface of a particle, *Biopolymers*, vol. 22 (6), p.1507-1522, 1983.

RAND, RP; FULLER, NL; BUTKO, P; FRANCIS, G e NICHOLLS, P; Measured change in protein solvation with substrate binding and turnover, *Biochemistry*, vol. 32 (23), p. 5925-5929, 1993.

REID, C; RAND, RP; Probing protein hydration and conformational states in solution, *Biophys. J.*, vol. 72 (3), p.1022-1030, 1997.

ROWLAND, P.; BASAK, AK; GOVER, S; LEVY, HR e ADAMS, MJ; The 3-dimensional structure of glucose-6-phosphate-dehydrogenase from leuconostoc-mesenteroides refined at 2.0-angstrom resolution, *Structure*, vol. 2 (11), p. 1073-1087, 1994.

SCHULZE, I; GAZITH, J e GOODING, R; *Methods in Enzymology*, vol. 9, p.376, 1966

SEMENYUK, AV; SVERGUN, DI; GNOM - A Program package for small-angle scattering data-processing, *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 24 (5), p. 537-540, 1991.

da SILVA, LHM; LOH, W; Calorimetric investigation of the formation of aqueous two-phase systems in ternary mixtures of water, poly(ethylene oxide) and electrolytes (or dextran), *J. Phys. Chem. B*, vol. 104 (43), p. 10069- 10073, 2000.

SVERGUN, D; BARBERATO, C; KOCH, MHJ; CRY SOL - A program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 28 (6), p. 768-773, 1995.

TIMASHEFF, SN; Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration, *Biochemistry*, vol. 41 (46), p. 13473 -13482, 2002.

www.rcsb.org/pdb (Protein Data Bank), PDB ID: HK = 1HKG, G-6-PDH = 1DPG, AD = 1YKF.

Parte 2: Adsorção de enzimas sobre superfícies sólidas

1. Introdução

A imobilização seletiva de enzimas é muito importante no desenvolvimento de biossensores [Eggins, 1997], kits imunológicos [Montgomery e col., 1990] e colunas cromatográficas [Chibata e col., 1978]. Questões como a velocidade de adsorção, as forças motrizes responsáveis pela imobilização e as mudanças conformacionais têm sido extensivamente exploradas na literatura (breve resumo dos trabalhos mais relevantes segue abaixo) . Em geral, processos de adsorção são usualmente descritos termodinamicamente em termos das isotermas de Langmuir [Langmuir, 1918]. O modelo de Langmuir se baseia em quatro condições: (i) a adsorção não excede uma monocamada, (ii) todos os sítios de adsorção são equivalentes e a superfície do substrato é uniforme (perfeitamente plana em escala microscópica), (iii) uma molécula do adsorbato pode interagir somente com um sítio de adsorção e (iv) as moléculas adsorvidas não interagem entre si. Entretanto moléculas grandes e complexas como as de proteínas muitas vezes apresentam processos de adsorção que não são completamente descritos pelo modelo de Langmuir. Lundström (1985) aplicou modelos de Langmuir modificados para descrever processos de adsorção de proteínas sobre superfícies sólidas, propondo um modelo dinâmico que se baseia no fato de que uma molécula pode mudar sua conformação após adsorção. No trabalho de Lundström foram investigadas as cinéticas de troca entre moléculas adsorvidas e moléculas livres em solução, o tempo necessário para que esta troca ocorresse e as possíveis conformações adotadas pelas moléculas de proteína adsorvida. Ambos os modelos de Langmuir e de Lundström explicam satisfatoriamente processos de adsorção reversível, mas falham no caso de adsorção irreversível. Uma das contribuições mais importantes no estudo da cinética de adsorção protéica é o modelo de adsorção seqüencial aleatória (“random sequential adsorption” - RSA) [Feder & Giaver,

1980; Schaaf & Talbot, 1989] no qual as biomoléculas são consideradas como partículas rígidas que quando adsorvidas não podem se sobrepor, nem desorver ou difundir. Este modelo descreve bem processos de adsorção nos quais o grau de cobertura não ultrapassa 55% (“jamming limit”) porém falha ao desfavorecer a inclusão de informações moleculares detalhadas a respeito das proteínas. O modelo RSA sofreu algumas alterações com o passar do tempo e foi estendido para considerar outros fatores importantes como as mudanças conformacionais e orientações induzidas pela superfície e pelo transporte difusivo [Bartelt & Privman, 1991, Senger e col., 1992]. Neste caso é considerado que a força motriz da adsorção é o ganho entrópico proveniente da liberação de moléculas de água de hidratação e da quebra da estrutura terciária e/ou secundária da proteína durante a adsorção. Baseando-se no modelo RSA, foi formulado o modelo de adsorção sequencial cooperativa (“Cooperative Sequential Adsorption” - CSA), a fim de explicar a adsorção de biomoléculas que apresentam cooperativismo, formando multicamadas [Evans, 1993]. O modelo CSA prevê que a adsorção de moléculas próximas a sítios já preenchidos é favorecida, levando à aglomeração de moléculas de adsorbato ou formação de multicamada. Neste modelo as partículas adsorvem irreversivelmente, sendo que a primeira camada é a mais fortemente adsorvida e a probabilidade de que uma nova partícula adsorva sobre outra já adsorvida pode ser determinada levando-se em conta dois parâmetros: a área de sobreposição e o rolamento da partícula adsorvente sobre as partículas já adsorvidas [Van Tassel & Viot, 1997]. A evolução dos modelos que descrevem a adsorção protéica tem ocorrido por meio da inserção de maiores detalhes da estrutura protéica, levando em conta a carga superficial da proteína [Roth & Lenhoff, 1995] e as regiões (“patches”) carregadas das proteínas [Asthagiri & Lenhoff, 1997].

Levando em conta os modelos expostos pelos autores supra citados para adsorção irreversível, formação de multicamadas, cooperativismo e mudanças conformacionais das partículas adsorvidas, Coen e col. (2001) propuseram, baseados em resultados experimentais, um modelo para a adsorção de biomoléculas que segue o modelo CSA incluindo os efeitos de desnaturação de proteínas devido à adsorção. Este modelo prevê que a adsorção ocorre em no mínimo duas etapas: 1) adsorção de moléculas protéicas desnaturadas, formando uma primeira monocamada fortemente adsorvida e 2) adsorção de moléculas protéicas na forma nativa, que adsorvem sobre as primeiras moléculas denaturadas adsorvidas mesmo antes de se completar o recobrimento do substrato. Uma primeira monocamada de biomoléculas ativas é formada e a adsorção segue com a formação de múltiplas camadas e agregação.

Devido à natureza complexa das biomoléculas, o desenvolvimento de um mecanismo geral para descrever a adsorção das mesmas sobre substratos sólidos não é uma tarefa trivial e nenhum dos modelos aqui citados foi capaz de explicar todos os resultados experimentais encontrados na literatura. As pesquisas nesta área ainda seguem inovando e muitos trabalhos encontrados na literatura usam técnicas *ex situ* e/ou *in situ* no estudo do processo de adsorção protéica [Kim e col., 2001; Ortega-Vinuesa e col., 1998; Green e col., 1997; Almeida e col., 2004]. Uma das desvantagens das técnicas *ex situ* é a necessidade da secagem da amostra após adsorção, o que pode influenciar as características da camada adsorvida na superfície em estudo. As técnicas de microscopia de força atômica (AFM) [Kim e col., 2001; Vansteenkiste e col., 2000; Johnson e col., 2000; Zlatanova e col., 2000] e elipsometria [Kull e col., 1997; Kurrat e col., 1998; Arwin, 2001] são técnicas *in situ* freqüentemente utilizadas no estudo da adsorção protéica.

2. Objetivos

O objetivo desta segunda parte do trabalho foi estudar o comportamento de adsorção das enzimas creatina fosfoquinase (CPK) e hexoquinase (HK) sobre substratos hidrofílicos (lâminas de silício) em diferentes condições de pH, através de elipsometria (*in situ* e *ex situ*), AFM em água e medidas de ângulo de contato.

3. Materiais

As enzimas creatina fosfoquinase (CPK, C3755) e hexoquinase (HK, H5000) foram adquiridas da Sigma (St. Louis, EUA). Para os experimentos de adsorção sobre substratos planos (ou esféricos no caso da HK), os substratos foram imersos em soluções aquosas de CPK ou HK preparadas na faixa de concentração de 0,0025 a 1 g.L⁻¹ de enzima, contendo de 0,001 M de NaCl e pH ajustado em 4, 6,8 ou 9 através da adição de HCl ou NaOH. O tempo de adsorção foi variado num período de até 16 horas.

Os substratos planos hidrofílicos utilizados foram lâminas de silício (Si) (1 cm x 1 cm, recobertas com uma camada de SiO₂ nativo) adquiridas da CrysTec (Berlin, Alemanha) e previamente limpas com mistura oxidativa contendo H₂O, NH₃ e H₂O₂ (adquiridos da Nuclear – São Paulo, sem purificação prévia) na proporção de 1 : 1 :5 em volume, a 75°C por 20 minutos. Após limpas as lâminas são retiradas da mistura, lavadas com água destilada, secas com jatos de nitrogênio e imersas em solução de enzima.

Os substratos esféricos hidrofílicos utilizados foram esferas de vidro (Suprind, SP) de diâmetro médio de (500 ± 100) µm depois de peneiradas.

Os reagentes necessários para medir atividade da CPK e da HK: Creatina fosfato (P-6502), β-Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato (NADP+, N0505), Adenosina 5'Difosfato (ADP, A-2754), Adenosina 5'Trifosfato (ATP, A3377), β-D(+)glicose (G5250),

glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH, G4134) e o tampão tris-HCl pH 7.5 com MgCl_2 (5mM), foram adquiridos da Sigma e utilizados sem purificação prévia (St. Louis, EUA).

4. Métodos

4.1. Elipsometria

A elipsometria é um método óptico não destrutivo, com resolução na faixa de ângstrons, utilizada na determinação das propriedades ópticas (índice de refração) e espessura de filmes finos.

A caracterização das superfícies dos substratos planos e o acompanhamento *in situ* da cinética de adsorção das enzimas CPK e HK foram realizados num elipsômetro DRE – ELX02 (Ratzeburg, Alemanha), equipado com um laser He-Ne ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$), com ângulo de incidência ajustado em $70,0^\circ$ (ângulo próximo ao ângulo de Brewster para as superfícies refletoras de silício - Azzam & Bashara, 1979) cobrindo uma área de aproximadamente 3 mm^2 . As medidas elipsométricas *in situ* foram realizadas em uma cela de poli (tetra fluoroetileno) com janelas de quartzo montadas com inclinação de 70° , especialmente confeccionada para este tipo de experimento.

A elipsometria consiste em medir a mudança do estado de polarização de uma onda eletromagnética monocromática após a reflexão, a partir de uma superfície isotrópica refletora (neste trabalho a superfície isotrópica refletora, homogênea e lisa é o silício). As mudanças de fase (Δ) e de amplitude (ψ) da radiação após a reflexão são medidas com relação à radiação incidente [para uma revisão completa sobre a técnica vide Azzam & Bashara, 1979 e Tompkins, 1993]. Elipsometria é uma técnica indireta e as informações de espessura (d) e índice de refração (n) do filme em estudo (filme de polímero ou enzima por

exemplo) são obtidas através das relações de Drude e Fresnel, cálculos iterativos usando matrizes de Jones [Azzam & Bashara, 1979; Tompkins, 1993] e da equação fundamental da elipsometria:

$$e^{i\Delta} \tan \Psi = R_p/R_s = f(n, d, \lambda, \phi) \quad (1)$$

onde R_p e R_s são os coeficientes de reflexão total de Fresnel para as componentes paralela e perpendicular da onda, respectivamente. Eles variam em função do ângulo de incidência, ϕ , do comprimento de onda da radiação, λ , dos índices de refração, n , e da espessura, d , de cada camada.

Modelos ópticos, ou seja, representações matemáticas idealizadas de uma dada amostra que permitam calcular as propriedades de interesse, também são necessários para se calcular as propriedades n e d da amostra a partir dos dados ópticos (Ψ e Δ) medidos na elipsometria. Normalmente têm-se disponíveis informações suficientes sobre o histórico da amostra para construir seu modelo óptico ideal. A maioria dos modelos ópticos utiliza substratos lisos semi-infinitos com uma ou mais camadas laminares aderentes de espessura uniforme na superfície. Assume-se que todas as interfaces são bem definidas, e que todas as camadas são compostas por materiais opticamente isotrópicos [para uma revisão sobre os modelos ópticos mais comumente utilizados vide Arwin, 2001].

Neste trabalho o modelo adotado foi composto por uma camada de espessura infinita de silício, coberta por uma camada de SiO_2 , cuja espessura foi determinada (previamente à adsorção) em ar e em meio aquoso considerando-se os índices de refração fixos Si: $n=3,858-0,018i$ e SiO_2 : $n=1,462$ [Palik, 1985]. Quando a espessura da camada é muito fina ($\approx 1\text{nm}$), como no caso do SiO_2 nativo, e o contraste óptico não é suficiente para que d e n sejam obtidos independentemente um do outro, então se usa o índice de refração fixo a partir de

dados da literatura ou do fabricante, e determina-se a espessura do filme. A espessura média de SiO₂ nativo para 50 amostras foi de (1,9 ± 0,2) nm. A adsorção a partir da solução de enzima foi monitorada *in situ* imergindo-se a placa de silício (simples ou funcionalizada), já caracterizada, em uma solução de enzima na cela líquida e medindo-se as variações de ψ e Δ ao longo do tempo. As medidas foram feitas numa sala com ar condicionado a uma temperatura de (23 ± 2)° C. A quantidade de material adsorvido Γ (mg.m⁻²) é obtido a partir da equação 2 [Motschmann e col., 1991]:

$$\Gamma = \frac{d_{enzima} (n_{enzima} - n_0)}{dn/dc} = d_{enzima} c_{enzima} \quad (2)$$

onde n_0 é o índice de refração da solução medido por um refratômetro Abbe, dn/dc é o incremento do índice de refração determinado por um refratômetro diferencial e c_{enzima} é concentração média dentro da camada. Nos sistemas utilizados neste estudo, n_0 foi medido para cada enzima e concentração e dn/dc foi considerado igual a 0,16 mL.g⁻¹ [Ortega-Vinuesa e col., 1998]. O baixo valor de espessura dos filmes de enzima (d_{enzima}) e a pequena diferença entre os índices de refração do substrato, enzima e solução impediram a determinação independente de d_{enzima} e índice de refração composto da camada de enzima adsorvida (n_{enzima}). Portanto, n_{enzima} foi mantido constante a 1,5 e d_{enzima} foi calculada. Este valor de n_{enzima} assumido está numa faixa razoável (entre 1,40 e 1,60) e o produto $n_{enzima} \cdot d_{enzima}$ deve ser um valor constante e independente do modelo adotado [Fujimoto & Petri, 2001; Motschmann e col., 1991].

Considerando-se que a adsorção é controlada pela difusão de cadeias livres da solução para a superfície, aplicando-se as condições limites para a concentração ($c(x = 0, t) = 0$) e

$c(x, t = 0) = c_0$) e a segunda lei de Fick, o perfil de concentração pode ser descrito em função do coeficiente de difusão D . De acordo com a primeira lei de Fick o fluxo em direção à superfície é determinado pela derivada do perfil de concentração em $x = 0$. Integrando-se o fluxo em função do tempo chega-se à equação (3). Este modelo foi descrito em detalhes por Motschmann e col. (1991) para a adsorção de copolímeros bloco poliestireno-óxido de polietileno sobre placas de silício.

$$\Gamma(t) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} c_0 \sqrt{Dt} \quad (3)$$

onde $\Gamma(t)$ é a quantidade de material adsorvido medido em função do tempo t e c_0 é a concentração inicial da solução.

Para comparação com o coeficiente de difusão obtido por elipsometria, foi calculado o coeficiente de difusão teórico (D_t), considerando-se a difusão de moléculas isoladas de enzima. Para o cálculo de D_t utilizou-se o valor do raio hidrodinâmico de cada enzima em solução (R_h), obtido na literatura, e a relação de Stokes-Einstein:

$$R_h = kT/(6\pi\eta D_t) \quad (4)$$

onde k é a constante de Boltzmann, η é a viscosidade do solvente, assumida como 1mPa.s para as soluções aquosas de enzima e T a temperatura.

4.2. Ângulo de Contato

As medidas de ângulo de contato foram realizadas à temperatura de $(23 \pm 2)^\circ \text{C}$ pelo método da gota sêssil num equipamento construído no laboratório, composto por uma câmera digital Casio QV-10, conectada a um computador. O ângulo de contato medido é o ângulo formado entre a superfície em estudo e a gota de água sobre ela depositada. O balanço das forças na linha de contato entre o líquido, o sólido e o vapor do líquido gera o ângulo de contato (θ_c). Young [Garbassi e col., 1998] descreveu o equilíbrio entre as tensões superficiais sólido/gás (γ_{sg}), sólido/líquido (γ_{sl}) e líquido/gás (γ_{lg}) como sendo:

$$\gamma_{sg} = \gamma_{sl} + \gamma_{lg} \cos \theta_c \quad (5)$$

Se $0 < \theta_c < 90^\circ$ (ocorre quando $\gamma_{sl} < \gamma_{sg}$) o líquido “molha” a superfície, ou seja, há uma grande interação entre a superfície e a gota do líquido que tende a sofrer um maior espalhamento. Se $\theta_c > 90^\circ$ o líquido não “molha” a superfície.

Os ângulos de contato foram monitorados antes e depois da adsorção da enzima. Ângulos de avanço (θ_a) e recesso (θ_r) foram obtidos através do aumento (4 μl) ou diminuição (2 μl) do volume da gota numa cela de quartzo fechada, saturada com vapor de água. Para verificar possíveis efeitos de acomodação das moléculas na superfície quando em contato com a gota e sua interferência no ângulo de contato foram medidos ângulos de contato de avanço para a mesma gota em intervalos de tempo de 10 minutos durante uma hora. A histerese ($\Delta\theta = \theta_a - \theta_r$) dos ângulos de contato foi calculada a fim de se obter informações com respeito à rugosidade e heterogeneidade química das amostras. As imagens digitalizadas das gotas foram analisadas pelo software Corel Draw[®] 8.0, o qual permitiu a correta medição do ângulo de contato diretamente da imagem digital.

4.3. Microscopia de força atômica (“Atomic Force Microscopy” - AFM)

Os microscópios de varredura por sonda (“Scanning Probe Microscopes”) são uma família de microscópios em que uma sonda varre a superfície de uma amostra registrando ponto a ponto algum tipo de interação entre a sonda e a amostra e conforme o tipo desta interação a microscopia recebe um nome diferente. A microscopia de força atômica (AFM) é uma forma de microscopia de varredura por sonda em que as forças de atração ou repulsão entre uma superfície e a sonda que varre a superfície são medidas. A sonda é normalmente constituída de uma ponta piramidal ($\sim 500 \text{ \AA}$ de diâmetro), que está localizada na extremidade livre de um cantiléver (~ 100 a $200 \text{ }\mu\text{m}$ de comprimento). O conjunto cantiléver-ponta utilizado neste trabalho é composto de nitreto de silício, em forma de barras e com constante de força de 0.6 Nm^{-1} (CSC 12 obtidos da NT-MDT, Russia). Os sistemas de varredura dos microscópios deste tipo devem ser capazes de realizar deslocamentos com alta precisão e para isso utiliza-se um tubo de material piezoelétrico, ou seja, um material capaz de alterar sua dimensão quando lhe é aplicado um potencial elétrico e que apresenta um potencial elétrico quando comprimido mecanicamente. Cada tipo de cerâmica apresenta um coeficiente de expansão que permite o cálculo da distorção física (após calibração) devido à aplicação de um potencial por este motivo o material piezoelétrico gera a movimentação necessária para a obtenção de imagens tridimensionais (x, y e z) e também pode ser utilizado para transladar a amostra até o cantiléver ou vice e versa. A varredura pode ser realizada com o movimento da sonda sobre a amostra ou da amostra sob a sonda. De acordo com o número de pontos varridos geram-se imagens de diferentes resoluções (512×512 pontos ou 256×256 ou 128×128). O raio da ponta utilizado, juntamente com o tamanho de pixel da imagem, determina a resolução lateral de uma imagem. Neste trabalho todas as imagens foram geradas em resolução de 512×512 pontos e a ponta utilizada possuía dimensão de aproximadamente 50 nm . Forças atrativas ou repulsivas entre ponta e amostra fazem com que a ponta, e por

consequência o cantiléver, sejam repelidos ou atraídos pela superfície da amostra. No sistema óptico de detecção utilizado, onde a deflexão de um feixe de laser e um fotodiodo determinam o movimento da sonda, o laser (de comprimento de onda de 650 nm e potência de 5 mW) incide sobre a extremidade do cantiléver, reflete em direção a um espelho e em seguida é novamente refletido ao centro do fotodiodo de quatro quadrantes. Conforme a varredura ocorre, a interação ponta-amostra provoca uma mudança no ângulo de reflexão do feixe de laser, o que será detectada pelo fotodiodo. Com os dados armazenados da deflexão do cantiléver nos eixos x, y e z, o computador é capaz de formar a imagem topográfica de amostra utilizando um software apropriado. Para a aquisição de dados utilizou-se o sistema de realimentação (“feed-back”) eletrônico no modo conhecido como força constante (ou sinal constante) onde a piezo que movimenta a amostra (ou a ponta) para cima e para baixo responde a mudanças detectadas na força e altera a separação ponta-amostra restaurando esta distância a um valor pré-determinado (setpoint). Este modo de operação normalmente permite a obtenção de uma imagem topográfica bastante fidedigna à topografia real da amostra. Para maiores detalhes quanto ao funcionamento e teoria da técnica de AFM vide Herrmann e col., 1997 e Vansteenkiste e col., 2000.

Medidas de AFM no ar e na água permitiram no trabalho aqui apresentado analisar a homogeneidade dos substratos e a uniformidade dos filmes, assim como as características topográficas e a espessura dos filmes de enzima adsorvida. Esta fase do trabalho foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. T. Schimmel (Univ. Karlsruhe, Alemanha) como parte de um projeto de doutorado “sanduíche” financiado pelo CNPq e DAAD.

As medidas de AFM foram realizadas em um AFM Multimode Nanoscope III (Digital Instruments) no modo de contato intermitente no ar ou na água utilizando-se uma celda de líquidos. O equipamento estava localizado em uma sala com temperatura controlada a $(25 \pm$

2)°C. No modo de operação de contato intermitente o cantiléver oscila em sua frequência de ressonância por meio de um elemento piezoelétrico e se posiciona acima da superfície de modo a tocá-la levemente por uma fração de período de sua oscilação. Durante a varredura, a oscilação do cantiléver é mantida constante graças ao sistema de realimentação. Deste modo as forças laterais são dramaticamente reduzidas ao longo da varredura. Este modo é especialmente indicado para amostras moles e frágeis como neste caso, onde temos enzimas adsorvidas.

Antes de iniciar a medida é feita a seleção da frequência de oscilação ótima (250 kHz no ar e 30 kHz na água para o cantiléver utilizado) através de um recurso do software (função “*Auto Tune*”) e a força aplicada sobre a amostra é automaticamente estabelecida e mantida no mais baixo nível possível. Quando a ponta passa sobre uma protuberância da amostra, o cantiléver tem menos espaço para oscilar e conseqüentemente a amplitude de oscilação diminui. Da mesma forma, quando o cantiléver passa por uma depressão da amostra, este tem mais espaço para oscilar e a amplitude aumenta até alcançar um máximo (que geralmente corresponde ao valor máximo de oscilação livre no ar). A amplitude de oscilação da ponta é medida por meio do detector. O sistema digital de realimentação ajusta a separação ponta-amostra de forma a manter constantes a amplitude e a força na amostra.

A espessura da camada de enzima adsorvida foi obtida por AFM em água através da remoção de parte do material adsorvido com a ponta do AFM [Gesang e col., 1995] e medindo-se a diferença de altura entre o filme e o substrato.

4.4. Isotermas de adsorção de hexoquinase - Método de Bradford

Para determinar e comparar a quantidade de hexoquinase adsorvida sobre placas de Si/SiO₂ e sobre micro-esferas de vidro, utilizou-se o método de Bradford [Bradford, 1976]. O

reagente de Bradford (Corante Comassie Blue G-250, CCBG) se liga a resíduos específicos da proteína como a arginina, o triptofano, a histidina e a fenilalanina. A quantidade de enzima adsorvida nas placas de Si/SiO₂ ou nas micro-esferas de vidro foi obtida imergindo-se os substratos por 3 horas em solução de HK ($c_{HK\text{inicial}} = 0,025 \text{ g.L}^{-1}$ a 1 g.L^{-1}). Após este período de interação, tomou-se uma alíquota de 20 μL do sobrenadante de cada solução e adicionou-se 1 mL de CCBG. O CCBG puro em solução é estável na forma catiônica (cor vermelha) e possui dois máximos de absorbância como se pode observar na Figura 1. O CCBG se liga aos resíduos da proteína na forma aniônica (cor azul) que possui um máximo de absorbância a 595 nm (Figura 1), permitindo assim a quantificação da proteína em solução através da determinação da absorbância a 595 nm das soluções de proteína ligada ao reagente de Bradford e da interpolação em uma curva de calibração (Figura 2). Todas as medidas espectrofotométricas foram feitas em um equipamento Beckmann DU640.

Figura 1: Espectro de absorção de Reagente de Bradford (CCBG) na presença (curva azul) e na ausência de proteína (curva vermelha).

Figura 2: Medida de absorbância a 595 nm de soluções de HK ligada ao Reagente de Bradford (CCBG).

Sabendo-se a quantidade inicial de proteína em solução antes da adsorção ($c_{HK_{inicial}}$) e determinando-se a quantidade de enzima livre no sobrenadante ($c_{HK_{livre}}$) após adsorção, pôde-se determinar a quantidade de proteína que foi adsorvida ($c_{HK_{ads}}$) em cada superfície testada através da seguinte fórmula:

$$c_{HK_{ads}} = c_{HK_{inicial}} - c_{HK_{livre}} \quad (6)$$

$$\Gamma = c_{HK_{ads}} \cdot V / \text{Área do substrato} \quad (7)$$

Sendo que V é o volume de solução utilizado (2 mL) e a área do substrato no caso das placas de silício foi de 1 cm².

No caso das esferas, calculou-se o número de esferas necessárias para se ter uma área superficial igual à das placas. Considerando-se o raio médio das esferas como sendo $2,5 \cdot 10^{-2}$

cm, determinou-se a área média de 1 esfera como sendo $\sim 78,5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$. Para se obter a área de 1 cm^2 de esferas (igual à das placas) calculou-se o montante de ~ 124 esferas. Devido ao pequeno tamanho das esferas, não foi possível separar estas 124 esferas uma a uma e para atingir esta quantidade necessária calculou-se a massa correspondente a 124 esferas para se poder separar a quantidade de esferas desejada utilizando-se a massa. Utilizando-se o raio da esfera acima citado, obteve-se um volume para uma esfera de vidro de $6,55 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^3$. No caso de 124 esferas o volume seria de $8,1 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3$. Considerando a densidade do vidro como $2,6 \text{ g.cm}^{-3}$ [Handbook of Chemistry and Physics 64th edição (CRC Press 1984)], a massa de 0,0216 g de esferas foi utilizada para se aproximar do valor ~ 124 esferas desejado. Dois tipos de experimento foram realizados, um em que se utilizou essa massa de esferas calculada e outro em que se utilizou uma massa 5 vezes maior de esferas ($m = 0,108 \text{ g}$) a fim de melhorar a sensibilidade do método.

Parte da enzima presente em solução também se adsorve nas paredes do recipiente utilizado (eppendorf de polipropileno no caso das esferas e frascos de vidro no caso das placas) e para corrigir os valores obtidos foram também medidas soluções acondicionadas por 3 horas em recipientes sem substrato.

4.5. Atividade enzimática – Espectrofotometria UV-visível

As atividades enzimáticas de moléculas de CPK e HK livres em solução e imobilizadas foram determinadas através de espectrofotometria utilizando-se um espectrofotômetro Beckmann Coulter DU 640 UV-VIS a 25°C . O método de Bergmeyer foi utilizado [Bergmeyer, 1984], como descrito nas páginas 5 e 6. Para medir a atividade de CPK, a reação catalítica de CPK (eq. 8) foi acoplada a reação de HK (eq. 9) e G-6-PDH (eq. 10) [Albig e

col., 1988], monitorando-se a redução de NADP⁺ a NADPH, que absorve em 340 nm, em função do tempo [Cárdenas e col., 1998].

As concentrações de cada reagente na cela espectrofotométrica foram as seguintes: 0,6 10⁻³ mol.L⁻¹ NaCl, 0,03 mol.L⁻¹ creatina fosfato, 0,0021 mol.L⁻¹ ADP, 0,046 mol.L⁻¹ D-glucose, 0,011 x 10⁻⁶ mol.L⁻¹ HK, 0,00182 g.L⁻¹ G-6-PDH e 0,0038 10⁻³ mol.L⁻¹ NADP⁺. O pH da mistura de reagentes foi ajustado para 4, 6,8 ou 9 através da adição de solução de HCl, 1 x 10⁻³ mol.L⁻¹ ou NaOH, respectivamente. Para comparar a atividade das enzimas adsorvidas em substratos planos com as mesmas livres em solução em pH 4, 6,8 ou 9, os experimentos de atividade enzimática das enzimas em solução foram realizados utilizando concentrações de enzima correspondentes à quantidade adsorvida nas placas em cada pH. A massa de enzima adsorvida numa área de 1 cm² foi calculada dividindo-se a quantidade de enzima adsorvida (valor do patamar de adsorção obtido nas medidas de elipsometria) por 10⁴. Considerando-se um volume total de 658 µL. Os substratos após imersos por 6 horas em solução de enzima (c = 0,005 g.L⁻¹) a pH 4, pH 6,8 ou pH 9 eram limpos com jatos de água destilada e incubados na mistura de reagentes acima em pH 4, 6,8 ou 9. Após 2 horas de contato da superfície contendo CPK ou HK adsorvida em pH 4, 6,8 ou 9 e com os reagentes a absorbância do sobrenadante foi medido em 340nm para determinar a quantidade de NADPH formado em cada sistema.

Para monitorar o efeito da forma do substrato na atividade de HK, a atividade de HK adsorvida em placas de silício ou em esferas de vidro foi medida e comparada, porém fixando-se o pH de adsorção e de atividade em 7,5. As placas ou as esferas contendo HK adsorvida foram adicionadas à mistura de reagentes necessários para se medir a taxa de formação de NADPH como descrito acima (equações 9 e 10) e o pH foi mantido em 7,5 em todos os casos. A concentração dos reagentes utilizados foi de: 600µL de tris-HCl (50×10^{-3} mol.L⁻¹, pH 7,5 contendo MgCl₂ 5mmol.L⁻¹), 50 µL de solução de glicose 1 mol.L⁻¹, 15 µL de solução de G6PDH 0,12 g.L⁻¹, 15 µL de solução de ATP 0,1 mol.L⁻¹ e 5 µL de solução de NADP⁺ 0,5 mmol.L⁻¹. Após 15, 30, 60 minutos e 24 horas de contato da superfície contendo HK adsorvida e os reagentes, a absorbância do sobrenadante foi medido em 340nm para verificar a quantidade de NADPH formado em cada sistema. Então a superfície foi lavada com água destilada e nova mistura de reagentes foi adicionada, monitorando assim o tempo em que a enzima se mantém ativa depois de imobilizada e a viabilidade de reutilização do “biossensor”.

5. Resultados e Discussão

5.1. Adsorção de creatina fosfoquinase (CPK)

5.1.1. Cinética de adsorção de CPK sobre silício:

A cinética de adsorção medida através de elipsometria para CPK em regime diluído ($c_{\text{CPK}} = 0,005 \text{ g.L}^{-1}$ em solução aquosa contendo 1mM de NaCl) sobre superfície de silício em pH 6,8 está apresentada na Figura 3. A curva de cinética pode ser dividida em três regiões: (i) um período de mais de 4 horas que apresenta um aumento da quantidade de material adsorvido (Γ) em função da raiz quadrada do tempo, (ii) um patamar de adsorção que permanece por um período de mais 4 horas adicionais e (iii) um período onde a quantidade de enzima adsorvida aumenta continuamente com o tempo.

Os substratos de silício ($\theta_a = 5^\circ$) são substratos bem hidrofílicos e a CPK mostrou adsorver irreversivelmente sobre estes substratos. Experimentos de dessorção foram realizados por elipsometria, trocando a solução de CPK, após 16 horas de adsorção, por solvente puro. Após 48 horas em contato com solvente puro, um decréscimo de 5 % em Γ foi observado. Isto pode ser atribuído a algumas moléculas de CPK que provavelmente não estavam fortemente ligadas à superfície e foram retiradas da superfície pelo solvente. Esta dessorção observada é baixa o suficiente para considerar a adsorção de CPK sobre os substratos estudados como irreversível, como sugerido por Wojciechowski & Brash (1990) para estes casos.

Figura 3: Cinética de adsorção *in situ* de CPK ($c = 0,005 \text{ g.L}^{-1}$) sobre placa de silício a $22,5 \pm 0,5^\circ \text{ C}$ e pH 6,8.

A análise das três regiões na figura 3 pode ser realizada da seguinte maneira:

Estágio (i): Nos estágios iniciais a adsorção é controlada pela difusão de macromoléculas livres a partir da solução para o substrato. Considerando este transporte de massa como uma difusão de Fick, o coeficiente de difusão $D \sim (8 \pm 1) \times 10^{-7} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ foi obtido a partir da inclinação da parte linear inicial da curva de $(\Gamma/t^{0.5})$ (região indicada pela linha contínua na Figura 3) e da equação (3) (página 52). O coeficiente de difusão (D) e o raio hidrodinâmico (R_h) da CPK podem ser inter-relacionados através da relação de Stokes-Einstein, equação (4) página 52. Considerando a viscosidade do solvente como 1 mPa.s e aplicando o valor de D determinado pela equação (3), o R_h encontrado foi de aproximadamente 3 nm . Este valor está de acordo com o R_h calculado através do programa Crysol [Svergun e col., 1995], utilizando dados do banco de dados de proteínas (pdb) [www.rcsb.org]. Este resultado indica que os estágios iniciais de adsorção são governados por um processo puramente difusivo de moléculas individuais de CPK. Após aproximadamente 50 minutos de adsorção, o substrato se torna uma superfície heterogênea composta de SiO^- e CPK. Este “novo” substrato é mais atrativo para as próximas moléculas de CPK do que o SiO^- inicial [Haynes & Norde, 1995].

Este efeito pode ser correlacionado com o aumento na taxa de adsorção (inclinação) observada no estágio anterior ao patamar na Figura 3.

Estágio (ii): No segundo estágio, a formação de uma monocamada pode ser evidenciada através da formação do patamar de $(2,5 \pm 0,5) \text{ mg.m}^{-2}$. Considerando-se a área dos substratos de $1,0 \text{ cm}^2$ e a massa adsorvida de $2,5 \times 10^{-7} \text{ g}$, pode-se estimar se este valor corresponde a uma monocamada de CPK através do cálculo seguinte: assumindo-se que a CPK adsorvida possui forma esférica e raio de giro de $2,2 \text{ nm}$ [www.rcsb.org], a área ocupada por uma molécula de CPK adsorvida será de $61 \times 10^{-18} \text{ m}^2$. Portanto a área de $1,0 \text{ cm}^2$ poderia ser ocupada por $1,6 \times 10^{12}$ moléculas de CPK. O volume de uma molécula de CPK pode ser calculado como $45 \times 10^{-27} \text{ m}^3$, e portanto, o volume ocupado por $1,6 \times 10^{12}$ moléculas de CPK será de $7,1 \times 10^{-8} \text{ cm}^3$. Considerando a densidade de CPK como $1,37 \text{ g.cm}^{-3}$ [Ortega-Vinuesa e col., 1998], a massa adsorvida correspondente deve ser de aproximadamente $1,07 \times 10^{-7} \text{ g}$, que é da mesma ordem de grandeza que os valores experimentais obtidos.

O patamar observado pode estar relacionado ao processo de relaxação e acomodação das moléculas de CPK adsorvidas. Estas conformações relaxadas das moléculas de CPK adsorvidas permitiram a adsorção adicional de CPK ao longo do tempo, dando origem à terceira etapa do processo. O modelo de adsorção proposto por Coen e col. (2001) explica a adsorção irreversível de algumas proteínas sobre superfícies de silício e pode também ser aplicado para os resultados com CPK aqui apresentados. Neste modelo, o processo de adsorção também foi dividido em múltiplas etapas. Na primeira etapa, uma camada de moléculas protéicas denaturadas começa a se formar logo após o contato da solução com a superfície do substrato. Devido à forte interação entre substrato e proteína, esta primeira camada tem espessura igual à cerca de um terço do valor do diâmetro da molécula livre em solução. A primeira camada, fortemente adsorvida sobre a superfície do substrato, contém

somente moléculas desnaturadas e biologicamente inativas. Antes de se completar o recobrimento da superfície do substrato, novas moléculas começam a se adsorver por entre e sobre a camada de proteínas denaturadas até formar uma monocamada mista de proteína denaturada e proteína em sua forma nativa. O patamar observado (Figura 3) pode corresponder à formação desta monocamada.

Estágio (iii): Para tempos maiores que 8 horas de adsorção de CPK (Figuras 3 (iii)), a quantidade de CPK adsorvida aumenta com o tempo. Um sistema de multicamadas, assim como processos de agregação podem ocorrer nesta fase. Após a formação de monocamada, o substrato para as moléculas de CPK que chegam à superfície, não é mais o silício. O substrato passa a ser um filme formado por moléculas de CPK já adsorvidas. Através do efeito de cooperativismo, as moléculas de CPK subseqüentes irão adsorver sobre as moléculas já adsorvidas. Este terceiro estágio observado na cinética de adsorção de CPK sobre silício em regime diluído indica formação de multicamada ou agregação, como descreve o modelo CSA para adsorção irreversível de proteínas. Este modelo prevê que a adsorção de moléculas próximas a sítios já preenchidos é favorecida, levando à aglomeração de moléculas de adsorbato ou formação de multicamada. A formação destas multicamadas se dá devido ao efeito de cooperativismo entre as moléculas de proteína [Evans, 1993].

A elipsometria é uma técnica adequada para o estudo da adsorção de biomoléculas sobre superfícies sólidas, possibilitando a obtenção de informações sobre a cinética de adsorção *in situ* e a quantidade de material adsorvido. A microscopia de força atômica pode servir como complemento perfeito para a elipsometria fornecendo informações sobre as características topográficas e morfológicas do filme de proteína adsorvido. Por este motivo medidas de AFM em água (Figura 4) foram realizadas a fim de confirmar o modelo proposto e revelar as mudanças na topografia e homogeneidade do filme de CPK ao longo do processo

de adsorção. Para acompanhar o crescimento do filme de CPK sobre silício ao longo do tempo, através de medidas de AFM, parte do silício foi coberto com parafilme[®] antes da adsorção da CPK. A amostra foi então colocada na solução de enzima pelo tempo desejado. Após este tempo a amostra foi retirada da solução de enzima e lavada com água destilada. O parafilme[®] foi então removido para a medida da altura do degrau formado na fronteira entre o filme de CPK formado e o substrato livre. Este método possibilita a obtenção da espessura do filme de CPK formado e ao mesmo tempo uma imagem topográfica do filme em contraste com o substrato puro (Figura 4).

Figura 4. Imagens de topografia dos filmes de CPK e das fronteiras filme-substrato obtidas após remoção do parafilme que cobria metade da placa de silício. Imagens obtidas através de AFM em água (a) após 15 minutos, (b) e (c) após 1 h, (d) após 6 h e (e) após 16 horas de adsorção de CPK sobre silício. Variação da espessura, d, do filme de CPK adsorvido sobre silício a pH 6,8 obtida por AFM medindo-se a altura do filme na fronteira filme-substrato obtida após remoção do parafilme[®] (f).

Após 15 minutos de adsorção de enzima nenhuma fronteira entre o substrato e o local exposto à solução de enzima pode ser vista (Figura 4a). A espessura não pôde ser medida pois ainda não existia um filme sobre a superfície. Este resultado está em concordância com o primeiro estágio proposto anteriormente (Figura 3 (i)), o qual é atribuído à difusão das moléculas isoladas de enzima. As moléculas difundem livremente na solução e as primeiras moléculas começam a chegar na superfície do silício porém a primeira camada protéica ainda não está formada. Após 1 hora de adsorção, a primeira camada de proteína já está se formando sobre a superfície de silício (Figura 4c) e uma fronteira já pode ser observada (Figura 4b). Uma espessura de $(0,8 \pm 0,2)$ nm foi medida (Figura 4f), o que pode corresponder a uma fina camada composta pelas primeiras moléculas de CPK adsorvidas e denaturadas sobre a superfície, assim como previsto pelo modelo de Coen e col. (2001). A espessura desta camada inicial (Figura 4f) e o filme observado nas imagens de AFM (Figura 4b e 4c) indicam a formação desta primeira camada de proteína. Após 6 horas de adsorção (Figura 4d), um filme homogêneo é observado. Este tempo de adsorção se encaixa no segundo estágio proposto (Figura 3 (ii)), onde um patamar de $(2,5 \pm 0,5)$ mg.m⁻² foi observado a partir dos dados elipsométricos. Através das medidas de AFM, um filme homogêneo (Figura 4d) de espessura de $(3,0 \pm 0,5)$ nm (Figura 4f) é obtido, corroborando com os resultados de elipsometria e indicando a formação de uma monocamada de CPK. Nenhuma mudança substancial na rugosidade do filme de CPK pode ser observada comparando-se as Figuras 4c e 4d. Para tempos de adsorção maiores que 8 horas, a quantidade de material adsorvido aumenta (estágio (iii) na Figura 3) e grandes agregados são observados sobre o filme (Figura 4e). A rugosidade das partes homogêneas do filme (sem agregados) aumenta para $(0,4 \pm 0,1)$ nm. A espessura do filme abaixo dos agregados também aumenta para $(4,4 \pm 0,5)$ nm. Este resultado mostra que não somente um processo de agregação está ocorrendo mas também a formação de multicamadas de proteína.

5.1.2. Efeito do pH na adsorção de CPK sobre silício

A adsorção de CPK (regime diluído: $c_{\text{CPK}} = 0,005 \text{ g.L}^{-1}$) em silício a pH 4, 6,8 e 9 foi estudada através de medidas de elipsometria *in situ* e AFM em água. A espessura (d) dos filmes de CPK em função do tempo foi determinada por elipsometria (Figura 5a) e por AFM através da remoção de parte do filme com a ponta e medida da altura do degrau formado entre o substrato e o filme (Figura 5b). Em pH 6,8 (quadrados) e pH 4 (triângulos) os valores de espessura obtidos através de ambos métodos estão em pleno acordo. Em pH 9 (círculos), os valores de espessura obtidos por AFM são um pouco menores que os determinados por elipsometria. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Gesang e col. (1995), que observaram uma grande concordância entre valores obtidos por AFM e elipsometria para filmes contínuos na faixa de espessura de 1 a 10 nm.

Figura 5. Cinética de adsorção de CPK sobre superfícies de Si a partir de soluções de CPK em pH 6,8 (quadrados), pH 4 (triângulos) ou em pH 9 (círculos). (a) medidas de elipsometria *in situ* e (b) medidas de AFM em água utilizando o método de remoção do filme com a ponta. As linhas são apenas para guiar os olhos.

Independentemente do pH, a espessura da camada de CPK adsorvida no patamar de adsorção indica a formação de monocamada. Os coeficientes de difusão aparentes D foram calculados a partir das curvas de $\Gamma/\text{tempo}^{0.5}$ (pH 6,8: Figura 3, página 63; pH 4 e 9: Figura 6).

Figura 6. Cinéticas de adsorção medidas para CPK sobre superfície de Si a partir de soluções de (a) pH 4 e (b) pH 9. As linhas mostram a região utilizada para calcular o coeficiente de difusão (D).

Os valores de espessura encontrados por elipsometria para os filmes de CPK formados no patamar, nas diferentes condições de pH, assim como os valores experimentais de D calculados estão mostrados na tabela 1 a seguir. Para melhor compreender o comportamento de adsorção de CPK sobre silício em função do pH deve-se primeiramente descrever a influência do pH na conformação de CPK em solução. Liang e col. (2003) estudaram a abertura de CPK induzida por ácido e descreveram essa abertura como um processo de três fases. Acima de pH 7 a CPK está em solução na forma de dímeros compostos por duas unidades idênticas (monômeros com 43 kDa cada). Quando o pH sofre um decréscimo, os dímeros de CPK começam a separar em monômeros. Entre pH 6,7 e 5,0, uma mistura de dímeros e monômeros parcialmente abertos (intermediários, que possuem uma grande área superficial hidrofóbica exposta) está presente em solução. Se o pH for

abaixado mais ainda de 5 para 3, uma mistura de intermediários e monômeros abertos será observada e a pH 3,0 os monômeros estarão quase que totalmente abertos. Coeficientes de difusão teóricos (D_t) apresentados na tabela 2 abaixo foram estimados considerando-se a difusão de dímeros de CPK, monômeros ou monômeros abertos considerando o raio hidrodinâmico correspondente, R_h , de dímeros de CPK, monômeros ou monômeros abertos encontrados na literatura [Kuznetsova e col., 2002] e utilizando a equação 4 (página 52). A comparação entre o D (experimental) e D_t mostra que o D e D_t estão na mesma ordem de magnitude, indicando que as dimensões das entidades difusoras são similares às esperadas no pH correspondente.

Tabela 1: Coeficiente de difusão (D) e espessura (d) do filme de CPK no patamar determinado a partir dos dados elipsométricos. Resultados obtidos para a adsorção de CPK sobre silício a partir de soluções de CPK $0,005\text{g.L}^{-1}$ em NaCl 1mM e pH 4, 6,8 ou 9.

pH	d (nm)	D ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$)
4	$(0,8 \pm 0,1)$	$1,2 \times 10^{-7}$
6,8	$(2,4 \pm 0,1)$	$8,0 \times 10^{-7}$
9	$(4,5 \pm 0,1)$	$2,7 \times 10^{-7}$

Tabela 2: Raio hidrodinâmico (R_h) [Kuznetsova e col., 2002] e coeficientes de difusão (D_t) estimados para monômeros de CPK, dímeros ou monômeros abertos, na faixa de pH correspondente.

	Faixa de pH	R_h	D_t (cm ² .s ⁻¹)
Monômero completamente aberto	< 3	6,1 nm	$3,3 \times 10^{-7}$
Monômero	~ 7	2,8 nm	$7,2 \times 10^{-7}$
Dímero	> 7	3,5 nm	$5,7 \times 10^{-7}$

A consistência dos valores de D_t observados (Tabela 2) e os dados experimentais a diferentes pHs (Tabela 1) suportam fortemente o modelo de Liang para CPK em solução. Agora que o efeito do pH na conformação da CPK em solução está bem descrito e em concordância com os dados experimentais, o próximo passo será correlacionar a conformação da CPK em solução com as espessuras dos filmes de CPK adsorvida em cada pH.

Em pH 4 uma mistura de intermediários de CPK e monômeros abertos de CPK com R_h de 6,1 nm deve estar presente em solução. Entretanto, os monômeros se espalham sobre a superfície após adsorção, levando a uma monocamada de espessura média de $(0,8 \pm 0,1$ nm). Um ganho entrópico devido às mudanças conformacionais sofridas durante a adsorção e também à formação de ligações de hidrogênio entre os grupamentos polares da CPK e os grupamentos Si-OH da superfície provavelmente levam ao processo de adsorção irreversível (dessorção não foi observada). Se a enzima está aberta, espera-se que ela se ligue ao substrato através de múltiplos pontos. A adsorção da enzima iria então requerer uma energia de ativação muito grande para dessorver.

Em pH 6,8, uma mistura de dímeros de CPK e intermediários com R_h médio de 2,8 nm podem estar presentes na solução. A partir da cinética de adsorção de CPK em silício a

pH 6,8 (Figura 3, página 63) pode-se sugerir que nos momentos iniciais dímeros e intermediários irão difundir em solução em direção aos sítios livres da superfície do substrato. Após cinco horas de adsorção, o valor do patamar de $2,4 \pm 0,1$ nm (Tabela 1, página 70) corresponde a uma monocamada de intermediários (monômeros parcialmente fechados) e dímeros adsorvidos em uma conformação similar àquela obtida em solução. Interações eletrostáticas entre os grupos SiO^- na superfície e os “patches” de resíduos de CPK positivamente carregados podem ocorrer. Para tempos de adsorção mais longos, o substrato não é mais o silício, ele é composto por uma camada de CPK. O aumento contínuo de espessura (d) com o tempo indica formação de multicamada com moléculas de CPK adsorvendo sobre a primeira camada de CPK.

Em pH 9, a enzima mantém a sua estrutura nativa em solução com R_h de 3,5 nm (Tabela 2, página 71). Os valores de espessura obtidos por AFM e elipsometria variaram de 3,7 a 4,4 nm (Figura 5, página 68), indicando que provavelmente os dímeros mantêm sua estrutura nativa após adsorção, formando uma monocamada. De maneira similar ao observado em pH 6,8, ambos superfície e CPK estão negativamente carregados, entretanto interações eletrostáticas entre os “patches” de resíduos positivamente carregados de CPK e as cargas negativas da superfície devem contribuir ao processo de adsorção. Efeitos similares já foram relatados por outros autores [Kayitmazer e col., 2003].

Imagens de AFM das superfícies de silício após adsorção de CPK a partir de soluções em pH 4 estão mostradas na Figura 7a-c a seguir. Durante o transporte, manipulação, armazenamento ou polimento das placas de silício, as mesmas sofrem alguns arranhões ($0,5 \pm 0,2$ nm de profundidade), os quais podem ser observados no silício puro e até as primeiras 2 horas de adsorção (Figuras 7a e 7b), indicando que após este período de tempo o silício não estava completamente coberto por enzima. Após 16 horas (Figura 7c) os arranhões não podem mais ser detectados e a superfície parece estar completamente coberta por CPK. Os

valores de rugosidade média (rms) aumentam consideravelmente após 16 horas de adsorção, apesar dos valores médios de espessura (d) não mudarem (Figura 5, página 68). O processo de adsorção em pH 6,8 é mais rápido que em pH 4 pois os arranhões no silício, que podem ainda ser vistos após 15 minutos de adsorção de CPK (Figura 7d), após 2 horas (Figura 7e) não podem mais ser detectados. As características morfológicas do filme de CPK e os valores de rms não sofreram alterações significantes em até 16 horas de adsorção de CPK (Figura 7f). Alguns agregados ($1,3 \pm 0,7$ nm de altura) apareceram sobre a superfície, o que é consistente com o aumento contínuo de d observado nos dados elipsométricos (Figura 5, página 68). A Figura 7g mostra a imagem de topografia obtida por AFM em água da superfície após 15 minutos de adsorção de CPK em pH 9. Nenhum arranhão pode ser visto na superfície, indicando que após este período de tempo um filme já foi formado cobrindo o silício. Para tempos de adsorção mais longos, os filmes são mais planos e não apresentam sinal de agregação (Fig. 7h e 7i).

Figura 7: Imagens de AFM (modo contato intermitente) de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ dos filmes de CPK adsorvida obtida após adsorção de CPK ($c=0,005\text{g/L}$) sobre silício em pH 4 após (a) 15 min, (b) 2h e (c) 16h de adsorção; at pH 6.8 após (d) 15 min, (e) 2h e (f) 16h de adsorção e em pH 9 após (g) 15 min, (h) 2h e (i) 16h de adsorção. Os valores de rms foram calculados para as imagens de zoom de $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$.

Nos momentos iniciais, quando a cobertura superficial está incompleta (Figuras 7a, 7d e 7g) deve-se analisar cautelosamente os valores de espessura na Figura 5a (página 68) pois eles podem apresentar até 50% de erro. Estes erros provem do modelo elipsométrico que assume uma camada homogênea de CPK, porém como evidenciado por AFM a superfície não está completamente coberta por CPK. Para estimar estes desvios nos valores de espessura devido ao falso índice de refração, os valores de espessura foram calculados variando-se os valores de índice de refração começando com 1,34 (próximo ao valor do meio) até 1,50 (proteína pura). O valor médio de espessura mostrou um desvio de 50% com relação aos valores limitantes, conforme descrito na literatura [Tompkins, 1993]. Por outro lado, é muito difícil determinar o valor exato de buracos (“voids”) na camada adsorvida em função do tempo. Portanto, todos os cálculos foram realizados considerando o índice de refração para a camada de proteína adsorvida como sendo $n = 1,50$. Não se deve porém esquecer que para os estágios iniciais de adsorção os valores de espessura podem apresentar até 50% de desvio. Por este motivo, especialmente no caso de camadas heterogêneas ou rugosas, a técnica de AFM é um complemento perfeito para a elipsometria. Conforme a cobertura da superfície aumenta, a camada adsorvida se torna mais homogênea, com desvios de espessura de no máximo 10% causados principalmente por erros sistemáticos devido à ótica e aos motores de passo do elipsômetro.

O mecanismo de adsorção de CPK sobre silício depende fortemente do pH (Figuras 5 e 6), pois o pH do meio controla a densidade de carga no substrato e no adsorbato. O ponto isoelétrico da CPK [www.rcsb.org/pdb (pdbID = 2CRK)] e do SiO₂ [Loidl-Stahlhofen e col., 2001] são 6,5 e 6,8, respectivamente. Nos primeiros estágios da adsorção, em pH 6,8 e 9 repulsão eletrostática entre os “patches” negativamente carregados da CPK e os grupos SiO⁻ na superfície podem causar um atraso na adsorção das primeiras moléculas de CPK. Após um pequeno período de adsorção, o substrato se torna uma superfície heterogênea composta de

SiO⁻ e CPK. Este “novo” substrato é mais atrativo para as próximas moléculas de CPK do que o SiO⁻ inicial. Este efeito pode ser correlacionado com o aumento na taxa de adsorção (inclinações) observada no estágio anterior ao patamar na Figuras 3 (página 63). Em pH 4, o substrato está repleto de silanóis e os grupos carboxila e amina das moléculas de CPK estão protonados. As interações eletrostáticas não existirão neste caso e o comportamento observado é o mesmo do esperado para macromoléculas sem carga. A taxa inicial de adsorção é atribuída à difusão de proteínas do meio para o substrato (Figura 6a, página 69), assumindo-se que todas as biomoléculas que chegam na superfície do substrato são imediatamente adsorvidas. A taxa de adsorção diminui após aproximadamente 10 minutos. O substrato não é mais uma superfície homogênea, ele é composto por sítios livres e sítios ocupados por moléculas de CPK já adsorvidas. As biomoléculas a chegar na superfície em seguida poderão adsorver nas anteriores já adsorvidas, devido ao efeito de cooperativismo. Depois disso elas poderão difundir para sítios livres no substrato, sofrendo mudanças conformacionais [Lyklema & Norde, 1996] e tornando este estágio de adsorção mais lento que o primeiro.

Portanto, em pH 6,8 e 9, onde a adsorção de CPK sobre silício é dirigida por interações eletrostáticas, a superfície não induz mudanças conformacionais nas moléculas de CPK. Entretanto, em pH 4, em que a adsorção é controlada principalmente por ligações de hidrogênio, os substratos parecem induzir mudanças conformacionais nas moléculas de CPK. Pode-se imaginar algumas possíveis razões para este comportamento: (i) estabilização da enzima devido à dupla camada elétrica do substrato em pH 6,8 ou 9, (ii) a natureza da interação entre substrato e adsorbato ou (iii) fracas forças de hidratação em pH 4. As explicações (i) e (ii) foram exploradas por Quiquampoix (1987) para o mecanismo de adsorção de β -D-glicosidase sobre partículas minerais, e os resultados foram contrários ao observado para CPK sobre silício. Para valores de pH abaixo do ponto isoelétrico (pI) da β -

D-glicosidase, a adsorção foi dirigida através de interações eletrostáticas que levaram a mudanças conformacionais. Próximo ao pI a adsorção foi dirigida por ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, efeito hidrofóbico, as quais foram muito fracas para modificar a conformação da enzima. Em pH acima do pI, nenhuma adsorção ocorreu. CPK e β -D-glicosidase apresentaram comportamentos de adsorção opostos. Parece ser bastante difícil propor um modelo universal para descrever a adsorção de proteínas devido à natureza complexa com teores de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos variáveis das proteínas. Do ponto de vista experimental não é nada trivial separar as cargas enterradas daquelas na superfície de uma proteína. Além disso, quando duas superfícies hidrofílicas são colocadas em contato, forças repulsivas de até 1 nm de alcance podem ser medidas em eletrólitos aquosos entre superfícies minerais [Leikin et al, 1993 e Marcelja et al., 1997]. Devido à correlação com a baixa energia de molhabilidade destes sólidos pela água, as forças repulsivas foram atribuídas à energia necessária para remover uma água de hidratação da superfície. Estas forças chamadas forças de hidratação se estendem até mais de duas camadas de água. De fato estas forças não se dão somente devido às camadas estruturadas de água mas também devido ao efeito osmótico, que pode ser expresso em termos das mudanças no número de moléculas de água associadas com as macromoléculas isoladas sofrendo mudanças conformacionais. Por exemplo, como discutido na parte 1 deste trabalho, a atividade da água afeta tanto o equilíbrio da glicose quanto a abertura da HK de forma que a afinidade da HK pela glicose aumenta com o decréscimo da atividade da água [Rand et al., 1993]. Em pH 6,8 e 9 a contribuição de fortes forças de hidratação associada à interação eletrostática pode levar à adsorção de moléculas de CPK mais fechadas. Em pH 4 forças de hidratação mais fracas podem favorecer a liberação de moléculas de água durante a adsorção de CPK, levando a uma denaturação pronunciada.

5.1.3. Efeito do pH na atividade enzimática de CPK livre ou adsorvida sobre silício

O efeito do pH na atividade enzimática de CPK livre

O efeito do pH na atividade enzimática de CPK em solução ($c_{\text{CPK}} = 0,005 \text{ g.L}^{-1}$), expresso em termos de formação de NADPH em função do tempo está apresentado na Figura 8. A maior atividade foi observada em pH 6,8, seguida pela obtida em pH 9 e pH 4. Esta tendência segue os resultados de fluorescência relatados na literatura para CPK [Liang e col., 2003], que indicaram que para $\text{pH} \geq 7$ a estrutura nativa da CPK é mantida, enquanto que abertura da CPK foi observada em condições ácidas.

Figura 8: Formação de NADPH em função do tempo catalisada por CPK livre em pH 4 (linha azul), pH 6,8 (linha preta) e pH 9 (linha vermelha).

Efeito do pH inicial (pH durante a adsorção) na atividade enzimática de CPK adsorvida em função do pH do meio de medida

A atividade enzimática relacionada à formação de NADPH após duas horas de reação foi determinada para amostras de CPK adsorvida (após 6 horas de adsorção) a partir de

soluções de diferentes pHs e comparadas com as atividades obtidas para a CPK livre em solução de diferentes pHs e os resultados estão apresentados na Figura 9. Como esperado, após adsorção a atividade enzimática é reduzida devido às mudanças conformacionais, que causam ganho entrópico, necessário ao processo de adsorção [Lyklema & Norde, 1996; Chibata e col., 1978].

Quando a CPK foi adsorvida em pH 4, e a atividade enzimática foi medida em pH 4, 6,8 e 9, o valor máximo foi observado a pH 6,8 e o mínimo a pH 4, seguindo a tendência observada para CPK livre. Entretanto, comportamentos diferentes foram observados para CPK imobilizada em pH 6,8 e 9. A atividade máxima foi observada a pH 9, enquanto que medidas em pH 6,8 e 4 geraram valores de atividade baixos. Portanto, estes resultados mostram que a CPK pode adsorver em sílicio tanto em pH 6,8 ou 9, porém a condição ótima para se determinar a atividade enzimática é em solução de pH 9.

Figura 9: Quantidade de NADPH formado após duas horas de reação em pH 4, 6,8 e 9 catalisado por CPK livre ou CPK adsorvida em sílicio a partir de soluções de pH 4, 6,8 ou 9.

Experimentos de controle de atividade enzimática foram realizados com superfícies recobertas com CPK (a partir de diferentes condições de pH), nos quais as amostras foram secas após adsorção. Este tipo de experimento controle é importante para verificar o efeito da secagem na camada de CPK adsorvida e a ocorrência de mudanças estruturais indesejáveis [De Cupere e col., 1993; Dupont-Gillain e col., 2004]. As atividades obtidas para superfícies secas recobertas por CPK foram comparáveis com as obtidas para superfícies “molhadas”, o que indica que o processo de secagem não levou a nenhuma mudança estrutural substancial.

A hipótese previamente proposta de que em pH 6,8 e 9 as contribuições de fortes forças de hidratação associadas à interação eletrostática podem levar à adsorção de moléculas de CPK mais fechadas ao passo que em pH 4 forças de hidratação mais fracas podem favorecer a liberação de moléculas de água durante a adsorção de CPK, levando a uma denaturação pronunciada, pode ser relacionada à atividade enzimática observada para a CPK adsorvida. Entretanto, deve-se lembrar que ao aumentar-se o pH do meio não só a CPK e o substrato se tornam mais negativos mas também a hexoquinase (HK) e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH), ambas enzimas envolvidas na formação de NADPH (eq. 8-10, página 60), sendo que cada reação poderá ser afetada pela variação de pH.

Comparando-se as quantidades de NADPH geradas nos experimentos controle utilizando CPK livre em pH 4 com os resultados obtidos com CPK adsorvida em pH 4, 6,8 e 9, pode-se notar que a CPK adsorvida em pH 4 apresenta a atividade mais baixa, 15% do NADPH formado no experimento controle. Por outro lado, a CPK adsorvida em pH 6,8 e 9 catalisou a formação de 60% e 53% do NADPH em comparação com o controle. Independentemente do pH no qual CPK foi adsorvida, a quantidade de NADPH produzido em pH 6,8 foi aproximadamente 10% da produzida com o controle em pH 6,8. Em pH 9, as quantidades de NADPH formado na presença de CPK adsorvida em pH 4, 6,8 e 9 corresponderam a 18%, 51% e 44% daquelas obtidas com CPK livre em pH 9. Considerando

estas comparações e as quantidades absolutas de NADPH formado com os desvios padrão correspondente (Figura 9, página 79) pode-se concluir que para aplicações práticas, como por exemplo no desenvolvimento de biossensores, CPK deve ser adsorvida em pH 6,8 ou 9, porém a atividade deveria ser medida em pH 9. Procedimentos padrões para a determinação de atividade de CPK em solução recomendam realizar as reações (eq. 8 a 10, pg. 60) em pH 7,4 (provavelmente devido à estabilidade da enzima HK (eq. 9) ser afetada em condições alcalinas). Entretanto, os resultados aqui apresentados indicaram um deslocamento do pH ótimo de atividade para CPK imobilizada para pH 9. Efeito semelhante foi recentemente relatado para fosfatase ácida e alcalina encapsuladas em matrizes de sílica-gel [Frenkel-Mullerad & Avnir, 2005].

O comportamento da atividade de CPK imobilizada em silício sob diferentes condições de pH pode ser correlacionado com as características das camadas de CPK adsorvidas. Em meio ácido (pH ~ 4), CPK em solução apresenta estruturas de folhas- β intermoleculares, como evidenciado por medidas de espectroscopia no infravermelho (IR), número de estruturas α -hélice reduzido, como observado por medidas de dicroísmo circular e monômeros [Raimbault e col., 1995]. A partir de dados elipsométricos e imagens de AFM um filme bem fino (~0,8 nm) foi observado. De acordo com os valores de D (Tabela 1), em pH 4 monômeros de CPK presentes em solução difundem até o substrato e adsorvem, formando a biocamada (Figura 10a). Forças de hidratação fracas facilitam ligações de hidrogênio entre CPK e o silício causando denaturação durante a adsorção e, portanto, baixa atividade enzimática.

Na faixa de pH de 5 a 7, a mistura de dímeros (estrutura nativa da CPK) e intermediários presentes na solução pode adsorver no silício (Figura 10b), sendo que a porcentagem de dímeros ativos adsorvidos é suficientemente grande para gerar uma quantidade considerável de NADPH. Em pH 9 os filmes de CPK sobre silício apresentam

espessura correspondente a uma monocamada de dímeros ($\sim 4,5$ nm), que é a estrutura nativa da CPK, e a maior atividade (Figura 10c). Hornemann e col. (2000) propuseram que a cooperatividade enzimática entre monômeros e dímeros estáveis aumentam as propriedades catalíticas. Além disso, em condições alcalinas as contribuições das forças de hidratação associadas às interações eletrostáticas podem enfraquecer a denaturação da CPK durante a adsorção em silício.

Figura 10: Esquema das camadas de CPK formadas sobre silício em (a) pH 4, (b) pH 6,8 e (c) pH 9 com a espessura da camada correspondente ao patamar de adsorção (medido através de elipsometria e AFM).

5.1.4. Isoterma de adsorção de CPK sobre silício:

A isoterma de adsorção obtida para CPK sobre placas de silício revelaram um aumento contínuo de Γ em função da concentração de CPK no meio, como mostra a Figura 11. Os valores de Γ na Figura 11 correspondem à uma hora (círculos vazios) e 16 horas de adsorção (círculos cheios) sobre silício. O equilíbrio não foi alcançado devido à formação de agregados em solução evidenciados por medidas de espalhamento de luz para solução aquosa de CPK de concentração $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ (contendo 1 mmol.L^{-1} de NaCl) em pH 6,8. O raio hidrodinâmico obtido para CPK nestes condições foi de $(46 \pm 9) \text{ nm}$, indicando agregação de CPK em solução.

Figura 11: Isotermas de adsorção de CPK (em solução aquosa contendo 1 mM NaCl e pH 6,8) sobre silício após 1 hora de adsorção (círculos vazios) ou 16 horas de adsorção (círculos cheios). A linha contínua serve somente para guiar os olhos.

5.1.5. Medidas de ângulo de contato

A Figura 12 mostra os ângulos de contato medidos para gotas de água sobre as superfícies de silício cobertas por CPK em função (a) da concentração de CPK no meio e (b) do tempo de adsorção de CPK e do pH do meio durante a adsorção ($c_{\text{CPK}} = 0,005 \text{ g.L}^{-1}$). É interessante notar que o substrato de silício se torna mais hidrofóbico após a adsorção de CPK em todos os casos, até mesmo quando a CPK adsorve a partir de soluções bastante diluídas (Figura 12a), mostrando que as superfícies estão sendo cobertas por moléculas de CPK, formando uma superfície de características distintas das dos substratos puros. Este aumento de hidrofobicidade também sugere que ao adsorver as moléculas de CPK orientam seus resíduos hidrofílicos para o substrato e expõe seus resíduos hidrofóbicos para o ar. Este fenômeno foi também observado e relatado por Almeida e col. (2002). A histerese nos ângulos de contato ($\Delta\theta$) para placas de silício antes da adsorção de CPK era de 1° e 3° , respectivamente. Após a adsorção de CPK a histerese $\Delta\theta$ aumentou para $30^\circ \pm 3^\circ$ para toda a faixa de concentração estudada (Figura 12a). Os altos valores de histerese podem ser explicados com base na heterogeneidade química e na rugosidade da superfície devido a presença de agregados nas amostras de CPK mais concentrada.

O pH de adsorção parece não influir na hidrofobicidade na superfície de CPK formada sobre silício (Figura 12b). Após a formação da monocamada de proteína (~ após 3 horas de adsorção), o ângulo de contato permanece constante, independentemente do pH e do tempo de adsorção (Figura 12b).

Figura 12: (a) Ângulos de contato para superfícies de silício em função da concentração de CPK, após 16 horas de adsorção. Ângulo de avanço (quadrados cheios) ou recesso (quadrados vazios). (b) Ângulos de avanço para superfícies de silício em função do tempo de adsorção de CPK ($c_{\text{CPK}} = 0,005 \text{ g.L}^{-1}$) e do pH do meio de adsorção. pH 4: triângulos, pH 6,8: quadrados e pH 9: círculos.

5.2. Adsorção de hexoquinase (HK)

5.2.1. Cinética e isoterma de adsorção de HK sobre silício:

A cinética de adsorção medida através de elipsometria para HK em regime diluído ($c_{HK} = 0,005 \text{ g.L}^{-1}$) em solução aquosa contendo 1mM de NaCl) sobre superfície de silício em pH 6,8 está apresentada na Figura 13.

Figura 13: Cinética de adsorção *in situ* de HK ($c = 0,005 \text{ g.L}^{-1}$) sobre placa de silício a $22,5 \pm 0,5^\circ \text{ C}$ e pH 6,8.

De modo geral, a HK apresentou comportamento semelhante ao da CPK (descrito na seção 5.1.1., página 62-68) nos estágios iniciais de adsorção. O processo de adsorção da HK sobre Si/SiO₂ apresenta mais de uma etapa, assim como o da CPK (Figura 3, página 63). Porém a terceira etapa presente no caso da CPK (estágio (iii) relacionado à agregação e formação de multicamadas) não foi observado para a HK na faixa de tempo estudado.

A análise das duas regiões na Figura 13 pode ser realizada da mesma maneira como para a enzima CPK:

Estágio (i): Aumento da quantidade de material adsorvido em função do tempo. No início todos os sítios de adsorção do substrato estão livres. As moléculas de HK podem difundir livremente até adsorver sobre o substrato rico em sítios livres. Considerando que no estágio inicial a adsorção é controlada pela difusão de macromoléculas livres a partir da solução para o substrato, o coeficiente de difusão $D \sim (5,5 \pm 0,5) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ foi obtido a partir da inclinação da parte linear inicial da curva de $(\Gamma/t^{0.5})$ (região indicada pela linha contínua na Figura 13) e da equação (3) (página 52). Relacionando o coeficiente de difusão (D) e o raio hidrodinâmico (R_h) da HK através da relação de Stokes-Einstein, (equação (4) página 52), obteve-se um $R_h = 2,1 \text{ nm}$ (considerando a viscosidade do solvente como $1 \text{ mPa} \cdot \text{s}$). Este resultado indica que os momentos iniciais de adsorção são governados por um processo puramente difusivo de moléculas individuais de HK.

A interação entre as superfícies de silício e a HK em pH 6,8 ocorre provavelmente por meio de ligações hidrogênio e por interações de natureza eletrostática. O pI da HK está em torno de 5,0 [www.rcsb.org, PDBID = 1HKG] e do SiO_2 [Loidl-Stahlhofen e col., 2001] é 6,8. Neste primeiro estágio da adsorção, em pH 6,8, a repulsão eletrostática entre os “patches” negativamente carregados da HK e os grupos SiO^- na superfície podem causar um atraso na adsorção das primeiras moléculas de HK pois este pH está muito acima do valor do ponto isoelétrico da enzima e a força iônica utilizada ($\text{NaCl } 10^{-3} \text{ M}$) não é suficiente para blindar estas cargas que geram repulsões eletrostáticas entre os segmentos carregados da HK e a superfície de silício também parcialmente carregada (negativamente).

Após um certo período de adsorção (aproximadamente 50 minutos), o substrato se torna uma superfície heterogênea composta de SiO^- e HK. Este “novo” substrato é mais atrativo para as próximas moléculas de HK do que o SiO^- inicial [Haynes & Norde, 1995]. Este efeito pode ser correlacionado com o aumento na velocidade de adsorção (inclinações) observada no estágio anterior ao patamar na Figura 13. O mesmo efeito foi observado para a

enzima CPK (Figura 3 página 63). Na superfície as moléculas de enzima podem adsorver primeiramente sobre moléculas já adsorvidas e depois se rearranjar de forma a chegar até o substrato, dando lugar às próximas moléculas de HK que chegam (Coen e col., 2001). Este comportamento se mantém até a formação da primeira monocamada de proteínas (estágio ii), onde no caso da HK, o sistema entra em equilíbrio.

Estágio (ii): Após aproximadamente 2 horas e 30 minutos de adsorção a formação de uma monocamada pode ser evidenciada através da formação do patamar de $(3,3 \pm 0,5) \text{ mg.m}^{-2}$. Considerando-se a área dos substratos de $1,0 \text{ cm}^2$ e a massa adsorvida de $3,3 \times 10^{-7} \text{ g}$, pode-se estimar se este valor corresponde a uma monocamada de HK. Assumindo-se que a HK adsorvida possui forma esférica e raio de giro de 3,2 nm (página 25), a área ocupada por uma molécula de HK adsorvida será de $1,37 \times 10^{-16} \text{ m}^2$. Portanto a área de $1,0 \text{ cm}^2$ poderia ser ocupada por $0,73 \times 10^{12}$ moléculas de HK. O volume de uma molécula de HK pode ser calculado como $1,5 \times 10^{-25} \text{ m}^3$, e portanto, o volume ocupado por $0,73 \times 10^{12}$ moléculas de HK será de $1,09 \times 10^{-7} \text{ cm}^3$. Considerando a densidade de HK como $1,37 \text{ g.cm}^{-3}$ [Ortega-Vinuesa e col., 1998], a massa adsorvida correspondente deve ser de aproximadamente $1,5 \times 10^{-7} \text{ g}$, que é da mesma ordem de grandeza que os valores experimentais obtidos.

A adsorção da HK é um processo irreversível visto que após a lavagem e secagem das superfícies não houve variação significativa da quantidade de material adsorvido.

Para confirmar a ausência de agregados na superfície, medidas de AFM foram realizadas em água. As imagens de AFM (topografia) em água obtidas para superfícies de silício cobertas com HK ($c_{\text{HK}} = 0,005 \text{ g.L}^{-1}$ em pH 6,8) estão apresentadas na Figura 14. As imagens de AFM mostram que um filme homogêneo é formado. A rugosidade da superfície não apresenta grandes alterações em até 16 horas de adsorção (rms, Figura 14). Os riscos ($0,5 \pm 0,2 \text{ nm}$ de profundidade) presentes na superfície de silício devido ao manuseio e transporte

das placas permanecem visíveis mesmo após 16 horas de adsorção, confirmando que o filme formado não apresenta valor de espessura muito maior do que o de uma monocamada de enzima.

Figura 14: Imagens de AFM (modo de contato intermitente) ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) da superfície de silício após adsorção de HK ($c_{\text{HK}}=0,005\text{g.L}^{-1}$) em pH 6,8 após (a) 15 minutos, (b) 2h e (c) 16h de adsorção.

A influência do pH não foi testada neste sistema pois é sabido [Kumar e col., 2004] que a enzima HK denatura em meio ácido e básico, perdendo atividade. Kumar e col. (2004) estudaram o efeito do pH na estabilidade e estrutura da HK, utilizando calorimetria, dicroísmo circular e medidas de fluorescência. Eles sugeriram que a HK denaturada através da ação de base é mais aberta do que a HK aberta por ação de ácido (abaixo de pH 3). Em altos valores de pH os domínios da estrutura dimérica da HK se separam e abrem num processo de dois estágios, sem passar por conformações intermediárias. Nenhuma mudança nas propriedades espectroscópicas da HK em pH 4,0 foi observada, indicando que a proteína manteve sua forma dimérica (forma nativa). Porém Viola & Cleland (1978) descreveram uma protonação cooperativa, em pH 4, de no mínimo cinco resíduos de ácido carboxílico no sítio ativo da HK. A protonação destes resíduos ácidos gera a perda de atividade abaixo de pH 7 e elimina as forças repulsivas entre os domínios da HK, levando à união dos mesmos. Este fechamento da HK leva a uma conformação fechada contendo uma cavidade vazia entre os

domínios formada graças ao efeito hidrofóbico [Gerstein e col. (1994); Bennett & Steitz (1978)]. Para fins práticos, a enzima adsorvida deve manter a atividade e por isto o pH das soluções de HK utilizadas neste trabalho foi mantido em 6,8.

Aumentando-se a concentração de HK no meio e passando para um regime semi-diluído ($0,025 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ em solução de pH 6,8 e $[\text{NaCL}] = 1\text{mM}$), as cinéticas de adsorção sobre Si mudam a velocidade inicial de adsorção porém a forma da curva é sempre mantida (comparando-se com a curva de cinética para o regime diluído na Figura 13, página 86) , como apresentado na Figura 15.

Figura 15: Cinéticas de adsorção em regime semi-diluído de HK sobre superfície de Si/SiO₂: $c_{HK} = 0,025 \text{ g.L}^{-1}$ (círculos) e $c_{HK} = 0,05 \text{ g.L}^{-1}$ (quadrados).

Em todas as curvas (Figuras 13 e 15) é atingido o patamar de equilíbrio e apesar da diferença na concentração inicial de proteína em solução, a quantidade de material adsorvido no patamar de equilíbrio é muito próximo para todas curvas de adsorção sobre silício ($\Gamma \sim 3 \text{ mg.m}^{-2}$). Isso pode ser devido à formação apenas de uma monocamada de HK ($R_g = 3,2 \text{ nm}$ -

dímero) independentemente da concentração de HK no meio. Entretanto, o patamar de equilíbrio é atingido mais rapidamente nas soluções mais concentradas.

A isoterma de adsorção (23 ± 2 °C) de HK sobre Si/SiO₂ em pH 6,8 está apresentada na Figura 16. A isoterma é de alta afinidade, com patamar de adsorção próximo a $3,0 \text{ mg.m}^{-2}$.

Figura 16: Isoterma de adsorção (23 ± 2 °C) de HK em pH 6,8 sobre superfície de Si/SiO₂ após 3 horas de adsorção.

5.2.2. Medidas de ângulo de contato

Os ângulos de contato (avanço) medidos para superfícies cobertas com HK estão apresentados na Figura 17. Após adsorção de HK ($c_{\text{HK}} = 0,005 \text{ g.L}^{-1}$) a superfície se torna mais hidrofóbica do que o silício puro, porém ainda continua bastante hidrofílica. Segundo Steitz e col. (1981), a HK possui 457 resíduos dentre os quais aproximadamente 60% são de caráter ácido. Este caráter ácido da HK pode ser responsável por esta hidroflicidade acentuada das superfícies recobertas. Os valores de ângulo de contato de avanço aumentam conforme a quantidade de material adsorvido aumenta (maior tempo de adsorção) até atingir um patamar a aproximadamente 40° , que pode estar relacionado ao patamar de adsorção,

quando a monocamada de HK está formada e o silício está completamente recoberto (Figuras 13, página 86 e Figura 14, página 89). Os ângulos de contato de recesso não estão apresentados pois a diferença entre avanço e recesso foi muito pequena (2 ± 1)°. Esta diferença tão pequena indica que a superfície de HK é homogênea e de baixa rugosidade, o que corrobora com os resultados obtidos por AFM (Figura 14). Em um experimento controle a gota de água usada para medir o ângulo de contato foi deixada por 1 hora sobre a placa a fim de se observar algum efeito de reorientação das moléculas ao longo do tempo porém nenhuma mudança no ângulo de contato foi observada.

Figura 17: Ângulos de contato de avanço medidos para HK ($c_{HK} = 0,005 \text{ g.L}^{-1}$ HK em NaCl $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 6,8) adsorvida em silício em função do tempo de adsorção (a linha contínua serve apenas para guiar os olhos).

5.2.3. Efeito da forma do substrato (plano/esférico) na atividade da HK imobilizada

Com o objetivo de se avaliar a influência da forma geométrica do substrato no processo de adsorção da HK, o método de Bradford foi utilizado no monitoramento e comparação da quantidade de enzima adsorvida em placas de silício ou em esferas de vidro.

5.2.3.1. Método de Bradford para determinar a quantidade de HK adsorvida sobre as placas de Si/SiO₂.

Através do teste de Bradford determinou-se a quantidade de HK adsorvida nas placas. Os resultados de adsorção estão apresentados na Figura 18.

Figura 18: Concentração de HK adsorvida em placas de Si/SiO₂ determinada através do método de Bradford.

Observa-se que a quantidade de material adsorvido parece aumentar com a concentração de HK na solução até atingir um patamar de 0,03 g.L⁻¹ de proteína adsorvida. Para converter estas unidades obtidas pelo método de Bradford (g.L⁻¹) em quantidade adsorvida por área de substrato, Γ , utilizou-se as equações 6 e 7 (página 58), sendo que o volume utilizado foi de 2 mL, e a área de Si de 1cm x 1cm.

Considerando que no método de Bradford mede-se também a quantidade de enzima que adsorve nas laterais da placa, no patamar ($c_{HK\text{livre}} = 1 \text{ g.L}^{-1}$) teremos uma quantidade de HK adsorvida de 600 mg.m⁻² que é muito maior do que a obtida por elipsometria (~ 3 mg.m⁻²). Esta discrepância pode estar relacionada com o método indireto de Bradford de medida da quantidade de material adsorvido.

5.2.3.2. Atividade da HK adsorvida sobre placas de Si/SiO₂

A atividade da HK adsorvida nas placas a partir de soluções em regime semi-diluído, depois de lavadas com água destilada e colocadas em contato com os reagentes necessários, foi medida em pH 7,5 (tampão tris-HCl). A formação de NADPH a 340nm foi monitorada ao longo do tempo como mostra a Figura 19.

Figura 19: Formação de NADPH ao longo do tempo, catalisada por HK adsorvida em placas de Si/SiO₂.

Nota-se que a velocidade de produção de NADPH é idêntica para todas as amostras nos primeiros minutos. Porém, após 20 minutos de interação das placas com os reagentes observa-se que as placas que foram recobertas a partir de soluções mais diluídas de HK apresentaram maior produção de NADPH. Isso pode ser devido a menor densidade de moléculas de HK adsorvidas nessas placas. Nesses casos as moléculas de HK adsorvidas estão mais livres para se rearranjar na superfície a fim de acomodar melhor os substratos (glicose e ATP) e co-fatores que necessitam se aproximar/ligar a ela. Nos casos em que partiu-se de soluções mais concentradas de HK o filme enzimático está mais empacotado,

deixando as enzimas com uma mobilidade menor, o que pode causar a queda na atividade. Para as amostras de HK adsorvida a partir de solução 0,8 g.L⁻¹ e 1 g.L⁻¹ de HK, a quantidade de NADPH produzido ainda continua a aumentar após 24 horas de interação. Após estas 24 horas, todas as placas foram retiradas da mistura de reagentes, lavadas em água destilada e colocadas em contato com nova solução de reagentes porém não observou-se formação de NADPH, a enzima não estava mais ativa. Isso significa que a placa de Si/HK pode ser utilizada apenas uma vez, o que para o desenvolvimento de um biosensor não é um resultado muito satisfatório. Foram então testados substratos esféricos (esferas de vidro) para verificar qual a influência da forma do substrato na imobilização da enzima, na atividade da enzima imobilizada e na reutilização das superfícies revestidas de enzima.

5.2.3.3. Adsorção de HK sobre esferas de vidro

Foram utilizadas esferas de vidro de diâmetro $d \sim (500 \pm 100) \mu\text{m}$. As esferas foram colocadas em “eppendorfs” que continham soluções de HK de concentrações 0,1 g.L⁻¹; 0,25 g.L⁻¹; 0,6 g.L⁻¹ e 1 g.L⁻¹ e mediu-se a quantidade de material adsorvido através do teste de Bradford. A curva padrão utilizada para os cálculos de c_{HKads} (equação 6 página 58) foi a da figura 2 (página 58) e os resultados obtidos estão apresentados na figura 20.

Figura 20: Concentração de HK adsorvida em esferas de vidro determinada através do método de Bradford. $m^{\text{esferas}} = 0,0216 \text{ g}$ (círculos) e $m^{\text{esferas}} = 0,108 \text{ g}$ (quadrados).

Utilizando-se a equação 7 (página 58) e a $c_{HK\text{ads}}$ média de $0,03 \text{ g.L}^{-1}$ obteve-se para a área superficial de 1 cm^2 ($m_{\text{esferas}} = 0,0216\text{g}$) o valor de $600 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ de HK adsorvida. Curiosamente para a área de 5 cm^2 ($m_{\text{esferas}} = 0,108\text{g}$, $c_{HK\text{ads}}$ média de $0,09 \text{ g.L}^{-1}$) obteve-se $360 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ de HK adsorvida. Portanto, a quantidade de HK adsorvida não varia linearmente com a área do substrato.

Quando se utiliza uma quantidade de esferas ($m = 0,0216\text{g}$) cuja área de adsorção é similar à área da placa de Si, nota-se que a quantidade de material adsorvido também é similar à obtida para as placas (através do método de Bradford, vide seção 5.2.3.1.), o que indica que a forma do substrato não influi na quantidade de enzimas adsorvidas. Este tipo de estudo comparativo da imobilização e atividade de enzimas imobilizadas sobre substratos planos e esféricos não é muito comum na literatura [Chibata e col., 1978] .

A atividade da HK imobilizada nas esferas de vidro a partir de solução de HK 0,25 g.L⁻¹ e 1 g.L⁻¹ foi medida ao longo do tempo e os resultados estão apresentados nas figuras 21a e 21b, respectivamente.

Figura 21: Formação de NADPH ao longo do tempo, catalisada por HK adsorvida em esferas de vidro a partir de soluções de HK de diferentes concentrações: (a) $c_{HK\text{inicial}} = 0,25$ g.L⁻¹ e (b) $c_{HK\text{inicial}} = 1,0$ g.L⁻¹ e utilizando duas quantidades de esferas: $M^{\text{esferas}} = 0,0216$ g (círculos) e $M^{\text{esferas}} = 0,108$ g (quadrados).

Apesar da quantidade de material adsorvido nas esferas ser similar ao adsorvido nas placas de Si (quando se tem a mesma área superficial), vemos que a enzima imobilizada nas esferas de vidro (Figura 21) possui uma atividade muito mais elevada do que a enzima imobilizada nas placas (Figura 19). A produção de NADPH continua crescendo após 24 horas de interação entre as esferas e os reagentes. Para tempos curtos (até 60 minutos), é interessante notar que mesmo nos casos onde se tem uma maior quantidade de HK imobilizada (massa de esferas = 0,108g), os valores de concentração de NADPH formado são muito próximos aos valores de uma quantidade menor de enzimas adsorvidas (massa de

esferas = 0,0216g). Para tempos longos (1440 minutos), a quantidade de HK inicial parece ter influência na concentração de NADPH formado.

Após as 24 horas de interação das esferas revestidas de HK com os substratos e co-fatores, as mesmas foram retiradas do frasco em que estavam, lavadas em água destilada e recolocadas em um frasco contendo soluções novas de substrato e co-fatores. Após 60 minutos de interação das esferas com as novas soluções, observou-se que as atividades das enzimas foram mantidas obtendo-se um valor de $[\text{NADPH}]_{\text{formado}} \sim 0,008 \text{ mol.L}^{-1}$ para todos os casos estudados. Essa $[\text{NADPH}]_{\text{formado}}$ é próxima à concentração obtida com as soluções anteriores, o que pode indicar que as enzimas imobilizadas nas esferas de vidro se mantêm ativas e podem ser reutilizadas. As esferas foram então novamente lavadas e acondicionadas em água por um período de 3 semanas e então foram novamente colocadas em contato com a mistura de reagentes e co-fatores necessários e observou-se que a enzima imobilizada ainda permanecia ativa. Estes resultados preliminares se mostraram bastante satisfatórios para o futuro desenvolvimento de um biosensor capaz de detectar glicose/ATP em amostras diversas. Em comparação com as placas de Si, que só puderam ser utilizadas uma única vez, pode-se dizer que provavelmente o substrato esférico proporciona uma superfície de adsorção que permite maior mobilidade das enzimas adsorvidas, o que gera essa capacidade de reutilização das esferas revestidas. Porém deve-se também levar em conta a alta rugosidade das esferas de vidro, um fator interferente neste estudo.

5. Conclusões

Adsorção de CPK sobre lamínas de silício:

O mecanismo de adsorção de CPK sobre silício depende fortemente do pH, pois o pH do meio controla a densidade de carga no substrato e no adsorbato.

Em pH 4, os monômeros de CPK presentes em solução adsorvem na superfície do silício formando um filme bem fino (~ 0.8 nm). Aumentando-se o pH para 6,8, a camada adsorvida é composta por uma mistura de dímeros de CPK (estrutura nativa) e intermediários (monômeros parcialmente abertos), aumentando a espessura do filme (~ 2.4 nm). A camada formada mantém uma conformação similar àquela obtida em solução. A cinética de adsorção neste pH foi dividida em três estágios, baseando-se no modelo CSA modificado proposto por Coen e col. (2001). No primeiro estágio as moléculas de CPK difundem livremente até chegar na superfície do silício e adsorver. A repulsão eletrostática entre os “patches” negativamente carregados da CPK e os grupos SiO^- na superfície podem causar um atraso na adsorção das primeiras moléculas de CPK. Após um pequeno período de adsorção, o substrato se torna uma superfície heterogênea composta de SiO^- e CPK. As próximas moléculas de enzima poderão então adsorver primeiramente sobre moléculas já adsorvidas e depois se rearranjar de forma a chegar até o substrato, dando lugar às próximas moléculas que chegam. Este comportamento se mantém até a formação da primeira monocamada de proteínas (estágio ii), onde um patamar de adsorção é observado. O patamar observado pode estar relacionado ao processo de relaxação e acomodação das moléculas de CPK adsorvidas. Estas conformações relaxadas das moléculas de CPK adsorvidas permitiram a adsorção adicional de CPK ao longo do tempo, dando origem à terceira etapa do processo. Após a formação de monocamada, o substrato para as moléculas de CPK que chegam à superfície, não é mais o silício. O substrato passa a ser um filme formado por moléculas de CPK já

adsorvidas. Através do efeito de cooperativismo, as moléculas de CPK subseqüentes irão adsorver sobre as moléculas já adsorvidas. Este terceiro estágio observado na cinética de adsorção de CPK sobre silício em regime diluído indica formação de multicamada ou agregação, como descreve o modelo CSA para adsorção irreversível de proteínas. Medidas de AFM em água confirmaram este modelo proposto.

Em pH 9, dímeros de CPK formam uma monocamada com a maior espessura observada (~ 4.0 nm). A natureza das forças de interação entre CPK e Si associadas às forças de hidratação parecem controlar a adsorção de CPK e sua denaturação.

O valor de pH ótimo para medida da atividade enzimática de CPK livre ou adsorvida foi determinado através de medidas de espectrofotometria utilizando-se reações acopladas com as enzimas HK e G-6-PDH. A maior atividade de CPK livre foi observada em pH 6,8 porém quando adsorvida a pH 6,8 ou 9, a CPK apresentou um pH ótimo de atividade em 9. Este comportamento pode ser relacionado ao efeito do pH na conformação de CPK adsorvida, como proposto acima.

A isoterma de adsorção obtida para CPK sobre placas de silício revelaram um aumento contínuo de Γ em função da concentração de CPK no meio. O equilíbrio não foi alcançado devido à formação de agregados em solução evidenciados por medidas de espalhamento de luz. As medidas de ângulo de contato mostraram que o substrato de silício se torna mais hidrofóbico (70°) após a adsorção de CPK em todos os casos, até mesmo quando a CPK adsorve a partir de soluções bastante diluídas e o pH de adsorção também parece não influir na hidrofobicidade da superfície de CPK formada sobre silício.

Adsorção de HK sobre lâminas de silício:

A influência do pH na adsorção de HK não foi testada pois é sabido [Kumar e col., 2004] que a enzima HK denatura tanto em meio ácido quanto básico. Para fins práticos, a enzima adsorvida deve manter a forma nativa a fim de manter a atividade e por isto o pH das soluções de HK utilizadas neste trabalho foi mantido em 6,8. A interação entre as superfícies de silício e a HK em pH 6,8 ocorre provavelmente por meio de ligações hidrogênio e por interações de natureza eletrostática. O pI da HK está em torno de 5,0 e do SiO₂ é 6,8. De modo geral, a HK apresentou comportamento semelhante ao da CPK nos estágios iniciais de adsorção. O processo de adsorção da HK sobre Si/SiO₂ apresenta mais de uma etapa, assim como o da CPK, porém a terceira etapa (estágio (iii) descrito para CPK), relacionada à agregação e formação de multicamadas, não foi observada para a HK na faixa de tempo estudado. Ambos os processos de adsorção das enzimas estudadas são irreversíveis, visto que após lavagem e secagem das superfícies não houve variação significativa da quantidade de material adsorvido. O modelo RSA pode ser melhor aplicado para explicar as cinéticas de adsorção da HK, tendo em vista que para a HK o efeito do cooperativismo e agregação não foi observado. Medidas de AFM em água confirmaram a ausência de agregados sobre a superfície de HK. A isoterma de adsorção de HK sobre as placas de silício proporcionou novamente forte evidência de formação de apenas monocamada, pois apesar da diferença na concentração inicial de proteína na solução, a quantidade de material adsorvido no patamar de equilíbrio é muito próximo para as todas as concentrações testadas ($\Gamma \approx 3 \text{ mg.m}^{-2}$). A partir das cinéticas de adsorção de soluções mais concentradas de proteína observou-se que o patamar de equilíbrio é atingido num tempo muito menor nas soluções mais concentradas. Através do teste de Bradford determinou-se a quantidade de HK adsorvida nas placas e observou-se que a concentração de material adsorvido (c_{HKads}) atinge um patamar de 0,03 g/L

de proteína adsorvida (600 mg.m^{-2}) em toda a faixa de concentração inicial de HK testada. Quando utiliza-se uma quantidade de esferas ($m = 0,0216\text{g}$) cuja área de adsorção é similar à área da placa de Si, nota-se que a quantidade de material adsorvido também é similar à obtida para as placas (600 mg.m^{-2}) pelo método de Bradford, o que indica que a forma do substrato não influi muito na quantidade de enzimas adsorvidas. Apesar da quantidade de material adsorvido nas esferas parecer ser similar ao adsorvido nas placas de Si, vemos que a enzima imobilizada nas esferas de vidro possui uma atividade muito mais elevada do que a enzima imobilizada nas placas. A enzima imobilizada nas placas de Si não se manteve ativa após lavagem das placas e reacondicionamento com nova solução de substrato, e a enzima imobilizada nas esferas de vidro se manteve ativa por 3 semanas, portanto as esferas revestidas podem ser reutilizadas e as placas revestidas não podem.

Este trabalho proporcionou a criação de dispositivos para uso em análises clínicas, através do estudo das melhores condições de imobilização de CPK e HK. As placas de silício ou esferas de vidro são materiais baratos e de fácil acesso que se mostraram muito eficientes para adsorver as enzimas CPK e HK de uma forma em que a atividade enzimática se mantém, proporcionando a viabilidade de uso destes sistemas.

Referências Bibliográficas

ALBIG, W; ENTIAN, KD; Structure of yeast glucokinase, a strongly diverged specific aldohexose-phosphorylating isoenzyme. *Gene*, vol. 73 (1), p. 141-152, 1988.

ALMEIDA, AT; GLIEMANN, H; SCHIMMEL, T; PETRI, DFS; The adsorption kinetics of enolase studied by means of in situ ellipsometry and wet AFM. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 2004.

ARWIN, H; Is ellipsometry suitable for sensor applications? *Sensors and Actuators A – Physical*, vol. 92 (1-3), p. 53-51, 2001.

ASTHAGIRI, D; LENHOFF, AM; Influence of structural details in modeling electrostatically driven protein adsorption. *Langmuir*, vol.13 (25), p.6761-6768, 1997

AZZAM, RMA; BASHARA, NM; Ellipsometry and Polarized Light. Amsterdam: North Holland Publication, 1979.

BARTELT, MC; PRIVMAN, V. Kinetics of irreversible monolayer and multilayer adsorption. *Internat. J. Modern Phys. B*, vol.5 (18), p. 2883-2907, 1991.

BENNETT, WS Jr.; STEITZ, TA; Glucose-induced conformational change in yeast hexokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 75 (10), p.4848-4852, 1978.

BENKERT, A; SCHELLER, F; SCHÖSSLER, W; HENTSCHEL, C; MICHEEL, B; BEHRSING, O; SCHARTE, G; STÖCKLEIN, W; WARSINKE, A; Development of a Creatinine ELISA and an Amperometric Antibody-Based Creatinine Sensor with a Detection Limit in the Nanomolar Range. *Anal.Chem.*, vol. 72 (5), p. 916-921, 2000.

BERGMEYER, HU; In: Methods of Enzymatic Analysis, vol. 2, p. 222-223, 3rd. Ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1984.

BRADFORD, M; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, vol. 72, p. 248-254, 1976.

CÁRDENAS, ML; CORNISH-BOWDEN, A; URETA, T; Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1401 (3), p. 242-264, 1998.

CHIBATA, I; TOSA, T; SATO, T; MORI, T; In: Immobilized Enzymes. New York, Wiley & Sons, 1978.

COEN, MC; LEHMANN, R; GRÖNING, P; BIELMANN, M; GALLI, C; SCHLAPBACH, L; Adsorption and bioactivity of protein A on silicon surfaces studied by AFM and XPS. *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 233 (2), p. 180-189, 2001.

DESJARLAIS, F; MORIN, L G; DAIGNEAULT, R; In search of optimum conditions for the measurement of creatine kinase activity: a critical review of nineteen formulations. *Clin.Biochem.*, vol. 13 (3), p. 116-121, 1980

EGGINS, B; In: Biosensors an Introduction. New York: Wiley & Sons, 1997.

DUPONT-GILLAIN, CC; NYSTEN, B; ROUXHET, PG; Collagen adsorption on poly(methyl methacrylate): net-like structure formation upon drying. *Polym. Int.*, vol. 48, p. 271-276, 1999.

EVANS, JW; Random cooperative sequential adsorption. *Rev. Mod. Phys.*, vol. 65 (4), p. 1281-1329, 1993.

FEDER, J; GIAVER, I; Adsorption of ferritin. *J.Colloid Interface Sci.*, vol. 78 (1), p. 144-154, 1980.

FUJIMOTO, J; PETRI, DFS; Adsorption behavior of carboxymethylcellulose on amino-terminated surfaces. *Langmuir*, vol. 17 (1), p. 56-60, 2001.

GARBASSI, F; MORRA, M; OCCHIELLO, E; In: Polymer Surfaces: from physics to technology, John Wiley & Sons, 1998.

GERSTEIN, M; LESK, AM; CHOTHIA, C; Structural Mechanisms for Domain Movements in Proteins. *Biochemistry*, vol. 33 (22), p. 6739-6749, 1994.

GESANG, T; FANTER, D; HÖPER R; POSSART, W; HENNEMANN, O-D, Comparative film thickness determination by atomic force microscopy and ellipsometry for ultrathin polymer films. *Surface and Interface Analysis*, vol. 23 (12), p. 797-808, 1995.

GREEN, RJ; DAVIES, J; DAVIES, MC; ROBERTS, CJ; TENDLER, SJB; Surface plasmon resonance for real time *in situ* analysis of protein adsorption to polymer surfaces. *Biomaterials*, vol. 18 (5), p. 405-413, 1997.

Handbook of Chemistry and physics 64th edition (CRC Press 1984)

HAO, XIAOFENG; Enzymatic substrate chip, its manufacture and application. Patente chinesa n° CN 1459635, 2003.

HAYNES, CA; NORDE, W; Structures and stabilities of adsorbed proteins. *J.Colloid Interface Sci.*; vol. 169 (2), p. 313-328, 1995.

HERMANN, PSP; MATTOSO, LHC; SILVA, MAP; BERNARDES FILHO, R; COLNAGO, LA; FROMMER, JE; Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. *Polímeros: Ciência e tecnologia*, São Carlos: n. 4, p. 51-61, 1997.

HORNEMANN, T; RUTISHAUSER, D; WALLIMANN, T; Why is creatine kinase a dimer? Evidence for cooperativity between the two subunits. *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1480 (1-2), p.365-373, 2000.

JOHNSON, CA; YUAN, Y; LENHOFF, AM; Adsorbed layers of ferritin at solid and fluid interfaces studied by atomic force microscopy. *J. Colloid Interf. Sci.*, vol. 223 (2), p. 261-272, 2000.

KAYITMAZER, AB; SEYREK, E; DUBIN, PL; STAGGEMEIER, BA; Influence of Chain Stiffness on the Interaction of Polyelectrolytes with Oppositely Charged Micelles and Proteins. *J. Phys. Chem B*, 107 (32), 8158 - 8165, 2003.

KIM, K; KIM, C; BYUN, Y; Preparation of a dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol Langmuir-Blodgett monolayer that suppresses protein adsorption. *Langmuir*, vol. 17 (6), p. 5066-5070, 2001.

KULL, T; NYLANDER, T; TIBERG, F; WAHLGREN, NM; Effect of surface properties and added electrolyte on the structure of beta-casein layers adsorbed at the solid/aqueous interface. *Langmuir*, vol.13 (19), p.5141-5147, 1997.

KUMAR, DP; TIWARI, A; BHAT, R; Effect of pH on the stability and structure of yeast hexokinase A: acidic amino acid residues in the cleft region are critical for the opening and the closing of the structure. *J. Biol. Chem.*, vol. 279 (31), p. 32093-32099, 2004.

KURRAT, R; WALIVAARA, B; MARTI, A; TEXTOR, M; TENGVALL, O; RAMSDEN, JJ; SPENCER, ND. Plasma protein adsorption on titanium: comparative in situ studies using optical waveguide lightmode spectroscopy and ellipsometry. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, vol. 11 (4), p. 187-201, 1998.

KUZNETSOVA, IM; STEPANENKO, OV; TUROVEROV, KK; ZHU, L; ZHOU, J-M, FINK, AL, UVERSKY, VN; Unraveling multistate unfolding of rabbit muscle creatine kinase. *Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol.1596 (1), p.138-155, 2002.

LANGMUIR, I.; The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Amer. Chem. Soc.*, vol. 40 (7), p. 1361-1403, 1918.

LEIKIN, S., PARSESIAN, V. A., RAU, D.C., RAND, R.P. Hydration forces. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, vol. 44, p.369-395, 1993.

LIANG, Y; DU, F; SANGIER, S; ZHOU, B-R; XIA, Y; VAN DORSSELAER, A; MAECHLING, C; KILHOFFER, M-C; HAIECH, J., Unfolding of rabbit muscle creatine kinase induced by acid. A study using electrospray ionization mass spectrometry, isothermal titration calorimetry, and fluorescence spectroscopy. *J. Biological Chem.*, vol. 278 (32), p. 30098-30105, 2003.

LOIDL-STÄHLHOFEN, A; SCHMITT, J; NÖLLER, J; HARTMANN, T; BRODOWSKY, H; SCHMITT, W; KELDENICH, J; Solid-supported biomolecules on modified silica surfaces - a tool for fast physicochemical characterization and high-throughput screening. *Adv. Mater.*, vol.13 (23), p. 1829-1834, 2001.

LUNDSTRÖM, I; ELWING, H. Simple kinetic models for protein exchange reactions on solid surfaces. *J. Colloid Interf. Sci.*, vol. 136 (1), p. 68-84, 1990.

LUNDSTRÖM, I; Models of protein adsorption on solid surfaces. *Prog. Colloid & Polymer Sci*, vol. 70, p. 76-82, 1985.

LYKLEMA, J; NORDE, W; Interfacial behavior of biomacromolecules. *Prog. Colloid & Polymer Sci.*, vol.101, p.9-17, 1996.

MADARAS, MB; BUCK, R P; Miniaturized Biosensors Employing Electropolymerized Permselective Films and Their Use for Creatinine Assays in Human Serum. *Anal.Chem.*, vol. 68 (21), p. 3832-3839, 1996.

MARCELJA, S., ISRAELACHVILI, J.N., WENNERSTRÖM, H. *Nature*, vol. 385 (6618), p. 689-690, 1997.

MONTGOMERY, R; CONWAY, T; SPECTOR, A; In: Biochemistry: A case-oriented approach. 5^a Ed., The C.V. Mosby Company, 1990.

MOTSCHMANN, H; STAMM, M; TOPRAKCIOGLU, C; Adsorption kinetics of block copolymers from a good solvent – A2 – stage process. *Macromolecules*, vol. 24 (12), p. 3681-3688, 1991.

ORTEGA-VINUESA, JL; TENGVALL, P; LUNDSTRÖM, I; Aggregation of HAS, IgG and fibrinogen on methylated silicon surfaces. *J. Colloid. Interf. Sci.*, vol. 207 (2), 228-239, 1998.

PALIK, ED, Handbook of Optical Constants of solids, Academic Press, Inc., New York, 1985.

QUIQUAMPOIX, H; A stepwise approach to the understanding of extracellular enzyme activity in soil. I. Effect of electrostatic interactions on the conformation of a β -D-glucosidase adsorbed on different mineral surfaces. *Biochimie*, vol. 69 (6-7), p. 753-763, 1987.

RAIMBAULT, C; COUTHOM, F; VIL, C; BUCHET, R; Effects of pH and KCl on the conformations of creatine kinase from rabbit muscle. Infrared, circular dichroic, and fluorescence studies. *Eur.J. Biochem*, vol. 234 (2), p. 570-578, 1995.

RAND, RP; FULLER, NL; BUTKO, P; FRANCIS, G e NICHOLLS, P; Measured change in protein solvation with substrate binding and turnover, *Biochemistry*, vol. 32 (23), p. 5925-5929, 1993.

ROTH, CM; LENHOFF, AM; Eletrostatic and van der Waals contributions to protein adsorption – comparison of theory and experiment. *Langmuir*, vol. 11 (9), p. 3500-3509, 1995.

SCHAAF, P; TALBOT, J; Surface exclusion effects in adsorption processes. *J. Chem. Phys.*, vol. 91 (7), p. 4401-4409, 1989.

SENGER, B; SCHAAF, P; VOEGEL, JC; JOHNER, A; SCHMITT, A; TALBOT, J; Influence of bulk diffusion on the adsorption of hard spheres on a flat surface. *J. Chem. Phys.*, vol. 97 (5), p. 3813-3820, 1992.

STEITZ, TA; SHOHAM, M; BENNETT, WS; Structural dynamics of yeast hexokinase during catalysis. *Philos.Trans.R.Soc.London*; vol. 293 (1063), p.43-52, 1981.

SVERGUN, D; BARBERATO, C; KOCH, MHJ; CRY SOL - A program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 28 (6), p. 768-773, 1995.

TALBOT, J; TARJUS, G; VAN TASSEL, PR; VIOT, P; From car parking to protein adsorption: an overview of sequential adsorption processes. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engineer. Aspects*, vol. 165 (1-3), p.287-324, 2000.

TOMPKINS, HG; In: A user's guide to ellipsometry. Academic Press Inc., 1993.

VAN TASSEL, PR; VIOT, P; An exactly solvable continuum model of multilayer irreversible adsorption. *Europhys. Lett.*, vol. 40 (3), p.293-298, 1997.

VANTEENKISTE, SO; CORNEILLIE, SI; SCHACHT, EH; CHEN X; DAVIES, MC; MOENS, M; VAN VAECK, L. Direct measurement of protein adhesion at biomaterial surfaces by scanning force microscopy. *Lagmuir*, vol. 16 (7), p. 3330-3336, 2000.

VIOLA, ER e CLELAND, WW; Use of pH studies to elucidate the chemical mechanism of yeast hexokinase. *Biochemistry*, vol. 17 (20), p. 4111-4117, 1978.

WOJCIECHOWSKI, PW; BRASH, JL; A computer simulation for the study of macromolecular adsorption with special applications to single-component protein adsorption. *J Colloid Interf Sci*, vol. 140 (1), p. 239-252, 1990.

www.rcsb.org/pdb (pdbID = 2CRK ou 1 HKG)

YUAN, Y; OBERHOLZER, MR; LENHOFF, AM. Size does matter: electrostatically determined surface coverage trends in protein and colloid adsorption. *Colloids and Surf. A: Physicochem. Engineer. Aspects*, vol. 165 (1-3), p. 125-141, 2000.

ZLATANOVA, J; LINDSAY, SM; LEUBA, SH. Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope. *Prog. Biophys & molec. Biology*, vol. 74 (1-2), p. 37-61, 2000.

CURRICULUM VITAE

NOME: Sabrina Montero Pancera

LOCAL E DATA DE NASCIMENTO: São Paulo (SP) aos 21 de Junho de 1979

EDUCAÇÃO

1986 a 1993 – Primeiro Grau – Colégio Agostiniano São José

1994 a 1996 – Segundo Grau – Colégio Agostiniano Mendel

1997 a 2001 – Bacharel em Química com atribuições Biotecnológicas – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, SP.

1998 a 2001 – Iniciação Científica - Instituto de Química - USP, no laboratório da Prof. Dra. Denise F. S. Petri, com o estudo da “Partição da hexoquinase em sistemas de duas fases aquosas”. Bolsista do CNPq – PIBIC de 10/1998 a 07/2000. De 08/2000 a 07/2001 bolsista FAPESP (Processo 00/04265-9) no projeto “Estudo das interações entre enzimas e polímeros”.

2003 a 2005 – Doutorado sanduíche em Físico-Química - Institut für Angewandte Physik and Center for Functional Nanostructures (CFN) Universität Karlsruhe / Institut für Nanotechnologie (INT) Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, como bolsista DAAD/CNPq (Processo: 290004/03-9). Projeto: “Formação de Biofilmes sobre Substratos Quimicamente Modificados em Escala Nanométrica Estudada por Microscopia de Varredura por Sonda.”

2001 a 2006 – Doutoranda em Físico-Química - Instituto de Química da Universidade de São Paulo, como bolsista FAPESP (Processo 01/08068-6). Tema: “Estudo das interações entre enzimas e polímeros”.

OCUPAÇÃO

Bolsista: FAPESP (Processo 01/08068-6).

Tema: “Estudo das interações entre enzimas e polímeros”.

PUBLICAÇÕES

- (1) Pancera, S. M.; Gliemman, H.; Schimmel, T.; Petri, D.F.S., “Effect of pH on the Adsorption and Activity of Creatine Phosphokinase”. *Journal of Physical Chemistry B* (2006), 110, 2674-2680.
- (2) Pancera, S. M.; Petri, D.F.S.; Gliemman, H.; Schimmel, T., “Adsorption behavior of creatine phosphokinase onto silicon wafers: Comparison between ellipsometric and atomic force microscopy data”. *Microscopy and Microanalysis* (2005), 11, supp.3, 56-59.
- (3) Pancera, S.M., Itri, R., Petri, D.F.S. “Small-angle X-ray scattering on solutions of carboxymethyl cellulose and bovine serum albumin”. *Macromolecular Bioscience* (2005), 5 (4), 331-336
- (4) Pancera, S.M., Itri, R., Petri, D.F.S. “The effect of poly(ethylene glycol) on the activity, structural conformation and stability of yeast hexokinase”. *Progress in Colloid and Polymer Science IX* 313 (2004), 178 ISBN 3.540_21247-7
- (5) Pancera, S. M., Salvadori, M. C., Petri, D.F.S. “Interaction between bovine serum albumin and carboxymethyl cellulose” *Acta Microscopica 12-supplement A* (2003), 103-106. ISSN 0798-4545
- (6) Pancera, S. M.; Petri, D.F.S.; Gliemman, H.; Schimmel, T., “Adsorption behavior of creatine phosphokinase onto solid substrates”. *Langmuir*, 18 (9) (2002), 3517-3523
- (7) Pancera, S. M. e Petri, D. F.S. “Formation of enzymatic biofilms on polymer films and on silicon wafers”. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 374 (2002), 611-616
- (8) Pancera, S. M.; Petri, D. F. S.; da Silva, L. H.M.; Loh, W.; Itri, R. e Pessoa Jr., A. “The effect of poly(ethylene glycol) on the activity and structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase in solution”. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces* 26 (2002), 291-300

PATENTE:

- (1) Kit para análises clínicas utilizando enzimas imobilizadas. Depósito realizado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, São Paulo, Brasil, no dia 20/03/2006. Número de depósito: 0.600.304-4