UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Purificação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase por sistemas micelares de duas fases aquosas contendo ligantes de afinidade

André Moreni Lopes

Dissertação para a obtenção do grau
de MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior

São Paulo
2006

André Moreni Lopes

Purificação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase por sistemas micelares de duas fases aquosas contendo ligantes de afinidade

Comissão Julgadora
da
Dissertação para a obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior
Orientador/presidente

Profa. Dra. Cristina Northfleet de Albuquerque
1º. examinador

Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto
2º. examinador

São Paulo, 27 de Março de 2006.

"Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei.
Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento"
Clarice Lispector

"Longe se vai
Sonhando demais
Mas onde se chega assim
Vou descobrir
O que me faz sentir
Eu, caçador de mim"
Milton Nascimento

Ao meu Pai pela lição de amor, dignidade e responsabilidade,
pelo seu esforço...

e à maior e mais brilhante Professora que já tive, minha Mãezinha querida
que me ensinou dentre muitas coisas a *matemática* da vida e outras
faculdades, sobretudo o amor...

a eles, como tudo mais.

A orientação que recebi do Professor Adalberto foi muito importante para a condução do trabalho, assim como a liberdade que ele deu para o desenvolvimento das etapas do projeto. Além disso, a confiança e credibilidade depositadas foram importantes para o meu crescimento científico. Desta forma, agradeço a atenção dada desde quando eu era apenas um aluno de graduação realizando meus estágios no Laboratório.

Também agradeço ao Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos no qual desenvolvi boa parte das tentativas de síntese do composto estudado, em especial à Andréia, Vanderson, Graça, Salomão, Sibila, Fávero e Marcos. Agradeço também à Prof^a Cristina Northfleet de Albuquerque pela orientação que recebi na parte da interpretação do composto obtido nas tentativas de síntese.

Finalmente, agradeço o apoio financeiro proporcionado pela FAPESP.

Agradecimentos

É nesta parte que o texto costuma desenrolar mais fácil e com menos formalidade. Quem dera o trabalho todo fosse escrito assim.

Valeu Carlotinha, pelo apoio e pela paciência. Graças à sua assistência na parte prática e por todo o embasamento teórico pude finalizar este trabalho. A Prof^a Carlota, além de ter participado de alguns dos ensaios, sugeriu muitas das idéias aqui estudadas. Obrigado amiga, suas opiniões e críticas, muito mais críticas do que qualquer outra coisa, foram importantes para enriquecer nosso trabalho. Cadê aquele sorrizinho???

Minha querida Tatiane precisaria de uma página de agradecimentos. Obrigado meu amor, você cuidou, zelou e me apoiou nesse ínterim da Pós.

Cyntia, companheira de Pré, Ginásio, Colegial, Cursinho, Graduação, Pós, ufaaa... não acaba mais, será que a gente ainda vai trabalhar no mesmo departamento, será que a gente vai casar??? Obrigado por me conduzir até aqui.

Aos meus grandes amigos: Diogo, Marião, Paulinha, Maria, Lucão, Naka, Deine, Petit, sem eles nada disso seria possível. Obrigado por estarem por perto mesmo estando tão longe, eu amo vocês.

Agradeço pela amizade sincera dos meninos lá da república, ao Samirrr e ao Jabuti, que foram grandes companheiros. Pessoal é final de mês, vamos acertar a conta!!!

Ao pessoal do *Lab*, de uma forma geral, em especial para Pérola, Helen, Ângela, Luís, Ângelo, Ester, Marina, Priscila, Irene e Ricardo; aos Professores Michele e T. Cris. Luís: valeu pelas aulinhas básicas de Termodinâmica! Ao *Lab* do Professor João Carlos, Japônes e Raquel: obrigado pela amizade!

Agradeço calorosamente também: meus amigos Cubanos, Jorgito, Rolando y Anita. Queridos: *muchas gracias por esta amistad, muchas gracias por los momentos mui agradables que pasé con ustedes en Cuba.*

Agradeço à Secretaria da Pós, em especial ao Jorge, Elaine e Majô, sempre muito simpáticos, com exceção do Jorge claro! Obrigado pela prestação e eficiência recebida. Ao Jorge, que contribuiu para a revisão deste material.

Sem grandes palavras para agradecer, aos meus pais e ao meu irmão, os quais dedico este trabalho, além de tudo aquilo que conquistei. Obrigado! Mãe, findo com a frase que marcou essa etapa: *“Sempre há várias versões e imaginações de como seriam as histórias dos grandes homens...”*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas – SMDFA	07
1.2. Adição de Sais ao SMDFA	17
1.3. Enzimas	23
1.4. Enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase – G6PD	27
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Materiais	32
3.2. Determinação da Concentração de G6PD	32
3.3. Determinação da Concentração de <i>Cibacron Blue</i> e de <i>Procion Red</i>	33
3.4. Determinação da Concentração Total de Proteínas	34
3.5. Determinação da Condutância Elétrica das Fases do SMDFA	
Contendo Sais	34
3.6. Teste de Cromatografia em Camada Delgada	35
3.7. Efeito dos Tensoativos Não-Iônicos Triton X-114 e C ₁₀ E ₄ na	
Atividade da G6PD	35
3.8. Efeito do Triton X-114 no Padrão de Absorção UV da	
Coenzima NADP ⁺ /NADPH	36
3.9. Preparação do SMDFA	36
3.10. Construção das Curvas Binodais	38
3.11. Construção da Curva Binodal para o Sistema	
Triton X-114/(NH ₄) ₂ SO ₄	39
3.12. Síntese do Tensoativo de Afinidade TX-114- <i>Blue</i>	40
3.13. Espectrometria de Absorção na Região do Infravermelho (IV)	42
3.14. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN- ¹ H)	43
3.15. Rompimento e Preparação do Homogeneizado Celular de	
<i>S. cerevisiae</i>	43

3.16. Estudos Cinéticos (K_M e V_{MAX}) e Termodinâmicos (E_a , ΔG , ΔH e ΔS)	44
3.17. Metodologia de Análise dos Resultados	45
3.18. Teoria de Partição de Proteínas Hidrofílicas Baseada em Interações por Volume de Exclusão – Cálculo Teórico do Coeficiente de Partição	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1. Influência do Efeito dos Tensoativos Triton X-114 e $C_{10}E_4$ na Estabilidade da G6PD	51
4.1.1. Avaliação do Efeito do Tensoativo Não-Iônico Triton X-114 na Estabilidade da G6PD	51
4.1.2. Avaliação do Efeito do Tensoativo Não-Iônico $C_{10}E_4$ na Estabilidade da G6PD	53
4.2. Curva Binodal para o Sistema $C_{10}E_4$ /Tampão	54
4.3. Partição da G6PD no Sistema $C_{10}E_4$ /Tampão	56
4.4. Curva Binodal para o Sistema Triton X-114/Tampão	60
4.5. Partição da G6PD no Sistema Triton X-114/Tampão	62
4.6. Estudo da Partição na Ausência e Presença de G6PD em Sistemas $C_{10}E_4$ e Triton X-114 em Tampão Contendo Corantes Tipo Triazina como Ligantes de Afinidade Livres em Solução	65
4.6.1. Partição dos Ligantes <i>Cibacron Blue</i> e <i>Procion Red</i> no Sistema $C_{10}E_4$ /Tampão	65
4.6.2. Partição da Enzima G6PD no Sistema $C_{10}E_4$ /Tampão na Presença dos Ligantes de Afinidade <i>Cibacron Blue</i> e <i>Procion Red</i>	66
4.6.3. Partição dos Ligantes <i>Cibacron Blue</i> e <i>Procion Red</i> no Sistema Triton X-114/Tampão	73
4.6.4. Partição da Enzima G6PD no Sistema Triton X-114/Tampão na Presença dos Ligantes de Afinidade <i>Cibacron Blue</i> e <i>Procion Red</i>	74
4.7. Síntese do Tensoativo de Afinidade TX-114- <i>Blue</i>	77
4.7.1. Identificação do Composto Obtido na Quarta, Quinta e Sexta Tentativas de Síntese	83
4.7.2. Ensaios de Partição da G6PD em Sistema Contendo os Compostos Obtidos na Segunda, Quarta e Quinta Tentativas de Síntese	87
4.8. Estudo da Partição da G6PD em Sistema Triton X-114 Contendo Sais	92
4.8.1. Curva Binodal Obtida para o Sistema TX-114/ $(NH_4)_2SO_4$	92

4.8.2. Estudos com o Sistema TX-114/(NH ₄) ₂ SO ₄	93
4.8.3. Estudos com o Sistema TX-114/Na ₂ SO ₄	100
4.9. Estudo da partição da G6PD proveniente do homogeneizado de <i>S. cerevisiae</i>	102
4.10. Estudos dos Parâmetros Cinéticos (K _M e V _{MAX}) e Termodinâmicos (Ea, ΔG, ΔH e ΔS) antes e após a Purificação por SMDFA	106
5. CONCLUSÕES	113
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
7. APÊNDICES	128
Apêndice A	128
Apêndice B	129
Apêndice C	130
Apêndice D	131
Apêndice E	132
Apêndice F	133
Apêndice G	134
Apêndice H	134
Apêndice I	135