



# TERMODINÂMICA DA TRANSFERÊNCIA DA CADEIA LATERAL DA LISINA DA ÁGUA PARA SOLUÇÕES AQUOSAS DE GLICEROL E DE ETANOL

*Thermodynamic of the transference of the lysine side chain from water to water solutions of glycerol and ethanol*

Natássia Caroline Resende Corrêa<sup>1</sup>, Cleine Chagas da Cunha<sup>1</sup>, Lúbia Cristina Fonseca<sup>1</sup>, Mario da Silva Garrote-Filho<sup>1</sup>, Nilson Penha-Silva<sup>1</sup>, Tales Alexandre Aversi-Ferreira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia

<sup>2</sup>Instituto de Ciências Biológicas (ICB III), Universidade Federal de Goiás

\*Autor para correspondência: [aversiferreira@yahoo.com.br](mailto:aversiferreira@yahoo.com.br)

**Palavras-chave:** *lisina, etanol, glicerol.*

## 1- INTRODUÇÃO

As proteínas são moléculas fundamentais para a homeostase dos seres vivos (NELSON; COX, 2005).

Elas são formadas principalmente por aminoácidos e têm conformações que dependem diretamente das interações destas unidades básicas com o meio solvente no qual estão inseridas.

Uma proteína pode-se apresentar em dois "ensembles", o nativo (N) e o desnaturado (D). Em decorrência de processos naturais ou de um ambiente adverso, uma proteína pode-se desenovelar. No "ensemble" desnaturado existe uma população muito grande de microestados que caracterizam o macroestado desenovelado (U). As condições desnaturantes compreendem alterações na temperatura (FIELDS, 2001), no pH, na osmolaridade (TIMASHEFF, 1998), na concentração de solutos como uréia e etanol (TANFORD, 1970), além de mutações genéticas (BROWN; HONG-BROWN ; WELCH, 1997).

Os estados N e D encontram-se num equilíbrio fundamentado na diferença de energia livre entre eles, prevalecendo o estado que contiver a menor quantidade de energia livre, segundo as leis da termodinâmica (NOZAKI; TANFORD, 1963).

Em uma solução essencialmente aquosa, o estado nativo (N) predomina sobre o desenovelado (U). Isso ocorre porque a hidratação do estado (N) demanda uma menor quantidade de energia livre (TIMASHEFF, 1998).

Para proteger suas proteínas contra situações naturais de estresse, os organismos vivos tiveram que se adaptar evolutivamente a altas concentrações de solutos orgânicos coletivamente designados como osmólitos (SOMERO, 1986). Os osmólitos estabilizam as proteínas através de um efeito denominado de osmofóbico (BOLEN, 2004).

Embora a água pura e os osmólitos favoreçam o estado N de uma proteína, existem várias condições que podem afetar o equilíbrio entre os estados N e D. Dentre elas se encontram as substâncias desnaturantes, também chamadas de caotrópicos, que podem comprometer a atividade biológica de uma proteína (TIMASHEFF, 1992).

A estabilização e desnaturação de proteínas têm grande interesse fisiológico, terapêutico e biotecnológico (BROWN; HONG-BROWN; WELCH, 1997; LEE, 2000). A compreensão da origem da estabilização e da desnaturação de uma proteína exige a análise do comportamento termodinâmico de seus aminoácidos. Esse trabalho teve por objetivo analisar a termodinâmica de transferência da cadeia lateral da lisina da água pura para uma solução aquosa de um agente estabilizante (glicerol a 30 %) e para uma solução aquosa de um agente caotrópico (etanol a 5%) no intervalo térmico de 25 a 50 °C.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

A uma massa variável de glicina ou lisina era adicionada a quantidade de etanol ou glicerol desejada para análise à temperatura de cada experimento. Os tubos eram agitados e incubados durante 30 minutos e, após isso, feita a leitura refratométrica. Os valores do índice de refração ( $n_D$ ) das soluções eram lidos contras as respectivas concentrações do aminoácido (C), com o auxílio do programa Microcal Origin 6.0 (Microcal, Inc.,

Massachusetts, EUA) e, em seguida, ajustados a uma sigmóide. Os pontos intermediários da sigmóide eram usados para determinação de uma reta de regressão. O valor na abscissa do ponto de interseção dessa reta com o maior valor obtido para  $\eta$  na sigmóide foi definido como o limite de solubilidade do aminoácido na água pura ( $C_W$ ) ou na solução aquosa do soluto ( $C_S$ ) (LIU; BOLEN, 1995). A determinação da energia livre de transferência ( $\Delta G_{tr}$ ) da lisina no meio essencialmente aquoso para uma solução aquosa de etanol ou de glicerol foi feita com uso da equação  $\Delta G_{tr} = -RT \ln K_{tr}$ , onde  $R$  é a constante universal dos gases ( $1,987 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura absoluta (dada em Kelvin), e  $K_{tr} = C_S/C_W$  (LIU; BOLEN, 1995). As variações de entalpia ( $\Delta H_{tr}$ ) e entropia ( $\Delta S_{tr}$ ) de transferência foram determinadas a partir da equação  $\ln K_{tr} = -(\Delta H_{tr}/R) 1/T + \Delta S_{tr}/R$ , que corresponde à equação de van't Hoff definida para a transferência do aminoácido da água pura para solução aquosa de glicerol ou de etanol. As variações de energia livre de Gibbs ( $\delta\Delta G_{tr}$ ), de entalpia ( $\delta\Delta H_{tr}$ ) e de entropia ( $\delta\Delta S_{tr}$ ) para a transferência de somente a cadeia lateral da lisina da água pura para soluções aquosas de etanol ou de glicerol, foram obtidas pela subtração dos valores de  $\Delta G_{tr}$ ,  $\Delta H_{tr}$  e  $\Delta S_{tr}$  que nós obtivemos para a lisina daqueles valores reportados para a glicina (FONSECA, 2005), de acordo com descrições da literatura (NOZAKI; TANFORD, 1963; LIU; BOLEN, 1995).

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de  $\delta\Delta H_{tr}$  foram de 0,339 e de -0,485  $\text{kcal.mol}^{-1}$  para etanol a 5% e glicerol a 30%, respectivamente, mostrando que o caráter endotérmico da transferência para a solução de etanol está de acordo com o efeito potencializador da temperatura sobre a desnaturação protéica por etanol (TANFORD, 1970), enquanto o caráter exotérmico da transferência para glicerol a 30% é compatível com a ação protetora que esse soluto apresenta contra a desnaturação pelo calor (TIMASHEFF, 1998).

Os valores de  $\delta\Delta G_{tr}$  foram sempre negativos em ambos os solventes, mas a energia livre liberada aumentou com o aumento da temperatura em etanol a 5%, o que concorda com uma ação sinérgica desestabilizante entre o etanol e a temperatura. Já em glicerol, a liberação de energia livre diminuiu com o aumento da temperatura, o que significa que a presença de glicerol desfavorece a exposição total das cadeias laterais de lisina de uma proteína, comprovado também com outros osmólitos (LIU; BOLEN, 1995; QU; BOLEN; BOLEN, 1998).

A transferência do grupo butilamônio da água pura para etanol a 5% e glicerol a 30% foi associada a variações de entropia ( $\delta\Delta S_{tr}$ ) de 1,212 e -1,363  $\text{cal/K.mol}$  de butilamônio. A variação positiva de entropia envolvida na transferência do grupo butilamônio da água para etanol, juntamente com a diminuição da energia livre de transferência neste solvente são fatores compatíveis com a desnaturação de uma proteína pelo etanol. Em relação ao glicerol a 30%, a exposição de lisina é entropicamente desfavorecida. Isso poderia representar uma das causas da repulsão do glicerol pela superfície da proteína, além daquelas realizadas pelos grupos apolares do interior das proteínas globulares, fatores estabilizantes dessas moléculas.

### 4- CONCLUSÃO

A transferência da cadeia lateral da lisina da água pura para uma solução aquosa de etanol a 5% ocorre com liberação de uma quantidade de energia livre que aumenta com o aumento da temperatura entre 25 e 50 °C, com consumo de calor e elevação da entropia. A transferência da cadeia lateral da lisina da água pura para uma solução aquosa de glicerol a 30% ocorre com liberação de uma quantidade de energia livre que diminui com o aumento da temperatura entre 25 e 50 °C, com liberação de calor e diminuição de entropia.

### 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOLEN, D. W. Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization. *Methods*. v. 34, n. 3, p. 312-322, Nov. 2004.

BROWN, C. R.; HONG-BROWN, L. Q.; WELCH, W. J. Correcting temperature-sensitive protein folding defects. *The Journal of Clinical Investigation*. v. 99, n. 6, p. 1432-1444, Mar. 1997.

FIELDS, P. A. Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. v. 129, n. 2-3, p. 417-431, June 2001.

FONSECA, L. C. Termodinâmica da transferência de glicina da água pura para uma mistura água-etanol. 2005. 38 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2005.

LEE, J. C. Biopharmaceutical formulation. *Current Opinion in Biotechnology*, London, vol. 11, n. 1, p. 81-84, Feb. 2000.

LIU, Y.; BOLEN, D. W. The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Biochemistry*. v. 34, n. 39, p. 12884-12891, 1995.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4<sup>th</sup> ed. New York: Worth, 2005. 1200 p.

NOZAKI, Y.; TANFORD, C. The solubility of amino acids and related compounds in aqueous urea solutions. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 238, n. 12, p. 4074-4081, Dec. 1963.

QU, Y.; BOLEN, C. L.; BOLEN, D. W. Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 95, n. 16, p. 9268-9273, Aug. 1998.

SOMERO, G. N. Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function. *The American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, Washington, DC, v. 251, s/n., p. 197-213, Aug. 1986.

TANFORD, C. Protein denaturation. Part C. Theoretical models of the mechanism of denaturation. In: ANFINSEN, C. B.; EDSALL, JR, J. T.; RICHARDS, F. M. *Advances in Protein Chemistry*. New York: Academic Press, 1970. p. 1-95.

TIMASHEFF, S. N. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. *Advances in Protein Chemistry*. v. 51, s/n., p. 355-432, 1998.

TIMASHEFF, S. N. Solvent effects on protein stability. *Current Opinion in Structural Biology*. v. 2, n. 1, p. 35-39, Feb. 1992.