

O USO DE MEDIDAS DE TENSÃO SUPERFICIAL NO ESTUDO DE INTERAÇÕES DE PROTEÍNAS COM AGENTES SUPERFÍCIE ATIVOS

Gaspar M. Gonzalez*, Eduardo Humeres**

Departamento de Química
Faculdade de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade do Chile
Tupper 2069, Santiago, Chile

(Recebido em 03/10/79)

Neste trabalho estudamos o efeito da albumina de soro de bovino (ASB) no diagrama de tensão superficial *vs.* \log da concentração para a lisolecitina. Observou-se que o processo de associação que ocorre em geral, origina uma mudança na concentração micelar crítica do lipídio em direção a concentrações mais altas. Os resultados, quando se relacionam com uma isoterma de união, conduzem a valores para os números de sítios de união e para a constante de associação que são muito próximos àqueles descritos para sistemas similares.

As interações entre a albumina de soro de bovino e agentes de superfície ativos aniônicos ou catiônicos tem sido extensivamente estudados¹⁻⁴. A maioria dos estudos tratam de esclarecer o processo de desnaturização por detergentes em proteínas globulares, ou de entender a natureza das interações entre lipídios e proteínas em alguns sistemas estruturais biológicos. Porém, apesar das implicações com outros campos, a natureza das interações entre macromoléculas globulares e moléculas anfipáticas em solução é um tópico de interesse em si mesmo.

O alcançar o equilíbrio de absorção no caso das proteínas é, em geral, um processo relativamente lento, devido (a) ao baixo coeficiente de difusão dos polímeros e (b) ao fato que ao chegar à interfase acontecem, invariavelmente, rearranjos configuracionais. Os lipídios e as simples moléculas heteropolares, por outro lado, são mais superfícies ativas por que elas conduzem a valores de equilíbrio de tensão superficial mais baixos e são absorvidas mais rapidamente na interfase água-ar. Para uma solução 0,05% de ASB, por exemplo, uma pressão superficial de equilíbrio de 19,5 Nm^{-1} é alcançada depois de sete horas⁵. Para um lipídeo como a lisolecitina, para uma concentração similar ($1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$), é obtida uma pressão superficial quase instantânea⁶ de 30 Nm^{-1} .

Então, parece possível que, em soluções contendo lipídeos e proteínas, um processo de associação que acontece no interior pode resultar num decréscimo da concentração de equilíbrio do lipídeo e, portanto, em uma tensão superficial de equilíbrio superior para a solução. Nestas circunstâncias, seria possível utilizar medidas de tensão superficial para estudar a união de moléculas superfícies ativas simples com proteínas ou outras macromoléculas. Nós aplicamos este método tensiométrico para estudar as interações entre a ASB e lisolecitina.

Alguns resultados preliminares são descritos neste trabalho.

Albumina de soro de bovino foi obtida da Sigma Chemical Co. e foi uma amostra cristalizada e liofilizada. A lisolecitina foi, também, obtida da mesma fonte (grau 1 de lecitina de ovo). O tampão Tris era de grau cristalino, aproximadamente 99,9%. Água tridestilada foi usada em todas as experiências.

As soluções de lisolecitina - ASB, foram preparadas em 0,05 M de tampão Tris, pH 8,0 e a tensão superficial foi medida em função da concentração, utilizando um tensiômetro modificado Du Nouy e uma placa de mica de Willhelmy, como foi descrito anteriormente⁶.

A temperatura foi mantida a $25 \pm 0,5^\circ \text{C}$ fazendo-se circular água por um termostato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra os resultados obtidos de tensões superficiais de soluções de lisolecitina a concentrações de zero; $0,64 \times 10^{-5}$; $0,77 \times 10^{-5}$; $1,0 \times 10^{-5}$ e $1,39 \times 10^{-5} \text{ M}$ de ASB. O valor do CMC obtido na ausência de proteína foi de $1,82 \times 10^{-5} \text{ M}$, que concorda com o valor de $1,95 \times 10^{-5} \text{ M}$ obtido por Robinson & Saunders⁷, ao utilizarem método similar. A adição de ASB promove uma mudança do CMC da solução lipídea em direção a concentrações mais

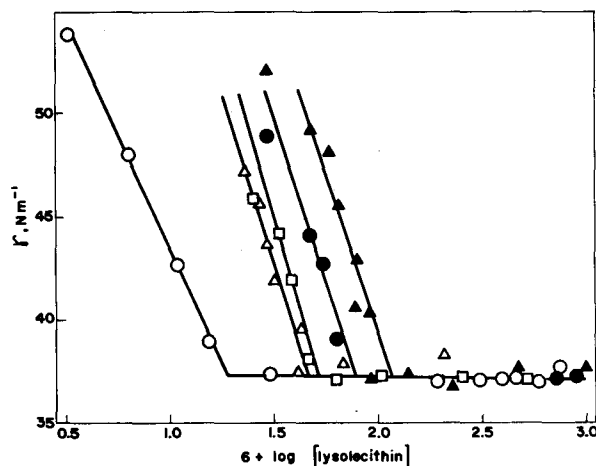


Fig. 1 - Tensão superficial de soluções de lisolecitina a diferentes concentrações de albumina de soro de bovino. Tensão superficial em Nm^{-1}

○ sem ASB; △ $0,64 \times 10^{-5} \text{ M}$; □ $0,77 \times 10^{-5} \text{ M}$; ● $1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$; ▲ $1,39 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Todas as medições foram feitas em tampão Tris 0,05M pH8, a 25°C .

elevadas. A inclinação das curvas de $-\log C$ abaixo da concentração micelar crítica não muda pela adição de proteína. Esta observação apoia a idéia que somente a "lisolecitina livre" determina a tensão nesta faixa de concentrações.

Se assumimos que existem N sítios de união do lipídio com moléculas de proteína com uma constante de dissociação K , considerada igual para cada sítio, então a isoterma de união pode ser descrita na forma⁷:

$$\frac{\bar{\nu}}{L} = K(n - \bar{\nu}) \quad (1)$$

onde $\bar{\nu}$ representa a razão entre o número de moléculas de lipídios unidas e a concentração de proteínas; e L , a concentração de "lisolecitina livre". O número de moléculas de lipídios unidas pode ser calculado da Figura 1, assumindo que abaixo do CMC, para um valor particular da tensão superficial, a concentração de equilíbrio da lisolecitina corresponde ao valor extrapolado relativo ao gráfico de γ vs. $\log C$ na ausência de ASB. Na Figura 2, mostramos o gráfico de $\bar{\nu}/L$ vs. $\bar{\nu}$ conforme a equação (1).

Os valores obtidos da Figura 2, são: $n = 3$ e $K = 0,54 \times 10^5$. Estes valores estão próximos aos resultados obtidos para as interações ácidos-graxos e ASB, p. ex., valores de 2 a 7 para n e valores da mesma ordem de magnitude para K tem sido publicados⁵. Os valores também concordam com os obtidos pelo uso de técnicas muito mais lentas e entediadas de equilíbrio de diálise, utilizadas com sistemas similares⁹.

Em resumo, podemos concluir que, sob certas circunstâncias, é possível estudar as interações entre macromoléculas e lipídios medindo as mudanças de tensão superficial.

Os valores presentes obtidos para o sistema lisolecitina - ASB, estão muito próximos àqueles obtidos com a utilização de outras técnicas experimentais. O método tem a vantagem de ser mais rápido e simples que a maioria das abordagens experimentais atuais para este problema. Ademais, permite estudos numa faixa de concentração de agentes superfície ativos onde a maior parte dos métodos analíticos não são aplicáveis.

Endereços atuais:

* *School of Chemistry, Univ. of Bristol, Cantok's Close, B58 1TS, V. K.*

** *Depto. Química, Univ. Federal de Sta. Catarina, Florianópolis, Sta. Catarina, Brasil.*

¹S. Kaneshina, M. Tanaka, T. Kondo, T. Mizuno, K. Aoki. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **46**, 2735-2738 (1973).

²M. N. Jones, H. A. Skinner, E. Tipping, A. Wilkinson, *Biochem. J.*, **135**, 231-236 (1973).

³M. N. Jones, H. A. Skinner, E. Tipping. *Biochem. J.*, **147**, 229-234 (1975).

⁴Y. Nozaki, J. A. Reynolds, C. Tanford. *J. Biol. Chem.*, **249**, 4452-4459 (1974).

⁵J. Steinhardt, J. A. Reynolds. *Multiple Equilibria in Proteins*, Academic Press, New York (1969).

⁶M. G. Gonzalez, F. MacRitchie, *F. Colloid Interface Sci.*, **32**, 55-61 (1970).

⁷N. Robinson, L. Saunders, *J. Pharm. Pharmacol.*, **10**, 755-761 (1958).

⁸C. Tanford. *Physical Chemistry of Macromolecules*, Wiley, New York (1963).

⁹M. C. Gonzalez, E. Humerez. *Arch. XI Reunion Soc. Biol.*, Santiago, Chile, p. 16 (1971).

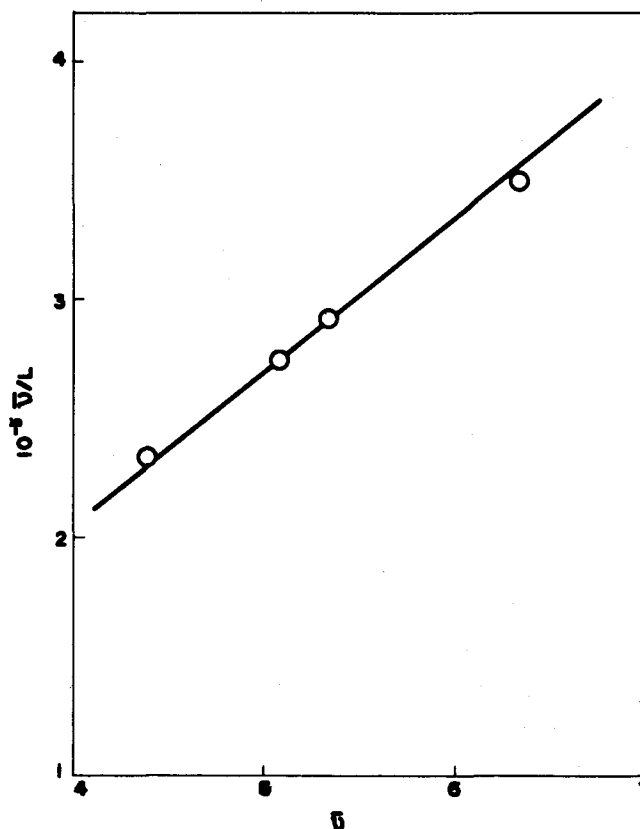


Fig. 2 - União da lisolecitina a albumina de soro bovino. $\bar{\nu}$, número de moléculas de lisolecitina unida por molécula de proteína; L , concentração de equilíbrio de lisolecitina.