ESTUDO DA INTERAÇÃO PROTEÍNA-SURFATANTE PELO MÉTODO DO EQUILÍBRIO DE DIÁLISE

Pedro L. O. Volpe
Instituto de Química - UNICAMP - 13081-970 - Campinas - SP
Eloi A. Silva Filho
Departamento de Química - UFES - 29060-970 - Vitória - ES

Recebido em 23/7/93; cópia revisada em 1/12/93

The widespread application of surfactants in the field of biochemistry particularly in the study of membrane has given impetus to fundamental studies on the nature of the interactions between ionic surfactants and enzyme. In this work we studied the isotherm of interaction between the surfactants sodium dodecyl sulphate (SDS), sodium decyl sulphate (DSS) and cetylpyridinium chloride (CPC) with a globular enzyme, trypsin, by using the equilibrium dialysis method at 298 K in buffer solution, pH 3.5 e pH 7.0. The binding isotherms are discussed in terms of the binding potential concept of Wyman and are used to calculate an apparent Gibbs energy of binding per number of surfactant ions bound.

Keywords: surfactants; enzyme; binding isotherm.

INTRODUÇÃO

Surfatantes são substâncias anfifílicas consistindo de uma cadeia carbônica longa ("cauda") e uma parte polar ("cabeça"), frequentemente iônica. Uma propriedade excepcional dos surfatantes é que numa determinada concentração suas moléculas se arranjam em agregados moleculares organizados conhecidos como micelas[1] e a concentração na qual este fenômeno acontece é chamada concentração micelar crítica (CMC).

Surfatantes são ingredientes importantes em muitos cosméticos, produtos de toilete, preparações farmacêuticas (soluções de gargarejo entre outros), e todos estes materiais entram em contato com as proteínas da membrana.

A interação entre surfatantes e proteínas globulares tem sido estudada extensivamente.[2,3] Sabe-se que surfatantes ligam-se a proteínas globulares em concentrações abaixo da concentração micelar crítica por uma combinação de interações iônicas e hidrofóbicas que formam o complexo proteína-surfatante.

A parte hidrofóbica das moléculas de surfatantes interagem com as regiões hidrofóbicas no interior das proteínas causando a quebra da sua estrutura secundária e terciária produzindo um complexo proteína-surfatante, fato este que confere aos surfatantes propriedades desnaturantes importantes. Os surfatantes iônicos são agentes desnaturantes incomparáveis porque eles desnaturam proteína na concentração da ordem de milimolar em contraste com desnaturantes clássicos como a uréia e cloreto de guanidina, os quais desnaturam na concentração de 6-8 Molar.[4]

A aplicação de surfatantes na bioquímica, principalmente no estudo da solubilização de proteínas intrínsicas das membranas biológicas, tem sido de interesse em estudos físico-químicos sobre a natureza das interações entre surfatante e proteínas. Muitos dos trabalhos nesta área foram estudados por Steinhardt e Reynolds.[5]

TÉCNICA DO EQUILÍBRIO DE DIÁLISE

Um estudo completo das interações entre proteína e um surfatante não pode ser satisfatoriamente feito sem os recursos de uma ampla variedade de técnicas. Um resumo das técnicas físicas[2] e a informação que pode ser obtida é mostrada na tabela 1.

Tabela 1. Técnicas físicas aplicadas ao estudo da interação proteína-surfatante.

Técnica	Informação Obtida
Equilíbrio de Diálise	Isoterma de interação. Variação da energia livre aparente da interação ΔG^{o}_{ap}.
Calorimetria (microcalorimetria, micro-DSC)	Variação da entalpia de interação e desnaturação.
Ultracentrifugação	Coeficiente de sedimentação de complexos, dissociação de subunidades e peso molecular.
Viscosimetria	Volume hidrodinâmico.
Espalhamento de luz estático e dinâmico	Peso molecular, coeficiente de difusão, dimensões.
Espectroscopia UV	Mudança de conformação
Cinética enzimática	Interações em sítios ativos e desnaturação.

Dentre as várias técnicas, o equilíbrio de diálise é simples e oferece a vantagem de fornecer a isoterma de interação e a variação de energia livre aparente de interação, medindo quantitativamente o grau de extensão da interação proteína-surfatante. Esta técnica utiliza membrana de diálise com um tamanho de poro bem menor que a proteína e suas subunidades. Em princípio, um volume da solução de proteína de concentração conhecida é dialisada até o equilíbrio em temperatura constante contra um volume da solução do surfatante no mesmo tampão. Após o equilíbrio de diálise o surfatante livre é analisado. Embora existam métodos mais sofisticados para determinar o surfatante livre no equilíbrio, junto com o complexo proteína-surfatante, o método de equilíbrio de diálise usando celas compartimentalizadas, separadas por membranas de diálise é termodinamicamente correto e livre de qualquer problema elétrico ou mecânico. Entretanto, a passagem do surfatante através da membrana de diálise é um processo len-

to[6] e é crucial ter a certeza de que o sistema atingiu o equilíbrio.

Como a quantidade total de proteína e surfatante no sistema são conhecidos, no equilíbrio, a quantidade de surfatante ligado à proteína ($\bar{\nu}$ = número médio de moléculas de surfatante por molécula de proteína) é determinado a partir da concentração do surfatante livre total usando a seguinte equação;

$$\bar{\nu} = \frac{[S]_{total} - [S]_{livre}}{[Proteína]} \quad (1)$$

Tomando o cuidado para que a concentração de proteínas seja suficientemente baixa em relação à força iônica do tampão, o efeito Donnam pode ser então desprezado.

ISOTERMA DA INTERAÇÃO PROTEÍNA-SURFATANTE

A interpretação teórica de uma isoterma de interação proteína(P)-surfatante(S) é feita considerando que o sistema, consiste de uma série de equilíbrios;

$$\begin{aligned} P + S &= PS \\ PS + S &= PS_2 \\ PS_2 + S &= PS_3 \\ &\vdots \\ PS_{n-1} + S &= PS_n \end{aligned} \quad (2)$$

Mesmo para as proteínas menores, o número total de sítios de interação podem ser grandes, de maneira que uma análise rigorosa para obter todos os sítios de interação não é possível, existindo porém algumas alternativas de aproximação. A mais simples destas aproximações, é descrita pela equação de Scatchard;[7]

$$\bar{\nu}/[S]_{livre} = K(n - \bar{\nu}) \quad (3)$$

onde K é uma constante de interação intrínseca. A equação de Scatchard é baseada na suposição de que os sítios de interação são idênticos e independentes. Um gráfico de $\bar{\nu}/[S]_{livre}$ contra $\bar{\nu}$ deve portanto ser linear para dar o número total **n** de sítios de interação. Para valores muito baixos de $\bar{\nu}$, a aproximação de Scatchard não funciona provavelmente devido a uma cooperatividade entre diferentes sítios de interação específica, demonstrando uma limitação desta equação pois a condição de sítios idênticos e independentes não é a representação real para a interação em diferentes proteínas.

Baseado nos equilíbrios (equação 2) podemos definir $\bar{\nu}$:

$$\bar{\nu} = \frac{\sum_{p=0}^{n} [PS_{\bar{\nu}}]\bar{\nu}}{\sum_{\bar{\nu}=0}^{n} [PS_{\bar{\nu}}]} \quad (4)$$

onde **n** é o número total de sítios de interação e $\bar{\nu}$ é o número de moléculas de surfatante (de 0 até n) ligado a cada proteína. Mesmo considerando um equilíbrio complexo e múltiplo em termos de todas as constantes de interação é inevitavelmente necessário uma outra aproximação, pelo menos mais realista do que a aproximação de Scatchard, desde que a interação de cada molécula do surfatante deve mudar a constante de interação para as moléculas de surfatantes subseqüentes.

Wyman[8] desenvolveu um procedimento que permite calcular a constante de interação baseado no conceito de um potencial de interação e foi utilizado no estudo de sistemas proteína-surfatante.[2] O potencial de interação $\Pi(P,T, \mu_1, \mu_2...)$ de Wyman está relacionado com a quantidade de surfatante ligado à molécula da proteína ($\bar{\nu}$) e o potencial químico do surfatante (μ), pela equação;

$$\bar{\nu} = (\partial\Pi/\partial\mu)_{P,T} \quad (5)$$

Considerando que o potencial químico do surfatante na concentração [S] é dado por uma expressão da solução ideal $\mu=\mu^o + RT\ln[S]_{livre}$ com o estado padrão μ^o um molar, temos;

$$\Pi = RT\int_0^{\bar{\nu}} \bar{\nu}\, d\ln[S]_{livre} \quad (6)$$

portanto, o potencial de interação de Wyman P corresponde ao produto de RT pela área da curva sob a isoterma de interação, isoterma esta obtida pelo gráfico de $\bar{\nu}$ em função do $\log[S]_{livre}$.

Durante o experimento de equilíbrio de diálise o complexo proteína-surfatante formado se dissocia num meio contendo surfatante livre. Podemos considerar a formação de um complexo PS_n (proteína + cátion ou ânion surfatante) de acordo com o equilíbrio:

$$P + nS_{livre} = PS_n \quad (7)$$

Embora a formação de PS_n envolve n equilíbrios com constante estequiométrica de interação individual devido à natureza cooperativa do processo, numa dada concentração do surfatante livre se nós assumirmos que as concentrações de todas as especies com exceção de P e PS_n são desprezíveis então, a constante estequiométrica de interação total é dada por:

$$K = \frac{[PS_n]}{[P][S]^n_{livre}} \quad (8)$$

das equações (3) e (8) obtemos que:

$$\bar{\nu} = \frac{n[S]^n_{livre}.K}{1 + K[S]^n_{livre}} \quad (9)$$

e diferenciando $\bar{\nu}$ com relação a $\ln[S]^n_{livre}$ e substituindo na equação do potencial de interação Π, equação (6) obtem-se;

$$\Pi = RT\ln(1 + K[S]^n_{livre}) \quad (10)$$

Desde que o potencial de interação Π pode ser obtido pela integração da isoterma é possível calcular $K[S]^n_{livre}$ usando a equação (10). Se entretanto, fizermos a consideração de que para um dado valor de $[S]_{livre}$ a espécie predominante será $PS_{\bar{\nu}}$, isto é, $K[S]^n_{livre} \equiv K_{ap}[S]^{\bar{\nu}}$ então, uma constante de interação aparente pode ser calculada a qual pode ser relacionada com uma variação de energia livre de Gibbs aparente ΔG^o_{ap} para um dado valor de $\bar{\nu}$;

$$\Delta G^o_{ap} = - RT\ln K_{ap} \quad (11)$$

É conveniente definir uma variação de energia livre de Gibbs de interação por ligação de íon surfatante $\Delta G_{\bar{\nu}} = \Delta G^o_{ap}/\bar{\nu}$ e desta maneira é possível utilizar toda a isoterma de interação para determinar a variação de energia livre aparente conforme os sucessivos ions surfatantes interagem.

Neste trabalho, utilizamos o método do equilíbrio de diálise e o tratamento de Wyman para estudar a interação entre a proteína globular tripsina e os surfatantes SDS, DSS e CPC em solução tampão pela análise das isotermas de interação.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e Soluções

As soluções de surfatantes SDS (Sigma 99%), DSS (Fluka 99%), CPC (Sigma 99%) e da proteína Tripsina (United State Biochemical Corporation, controle Nº 22354) foram preparadas utilizando tampão acetato e tampão fosfato. As soluções tampão foram preparadas segundo o procedimento: tampão acetato pH 3,5 e força iônica I = 0,01 M (0,00054 mol de $CH_3COONa.3H_2O$/litro + 0,0094 M de CH_3COOH/litro); tampão fosfato pH 7,0 e força iônica I = 0,01 M (0,0031 mol de K_2HPO_4/litro + 0,0068 mol de KH_2PO_4/litro). Os corantes utilizados foram azul de metileno (Reagen) e Orange II (Polysciences Inc.).

Métodos

As medidas experimentais utilizando o método do equilíbrio de diálise foram feitas numa cela de diálise,[9] constituída de dois compartimentos idênticos e construída de acrílico de dimensões 6 cm x 6 cm e diâmetro interno 4 cm, figura 1. Uma membrana de acetato de celulose (Viskase Inc.), espessura de 30 μm, retenção de massa molecular ("cut-off") da ordem de 8000 separa os dois compartimentos.

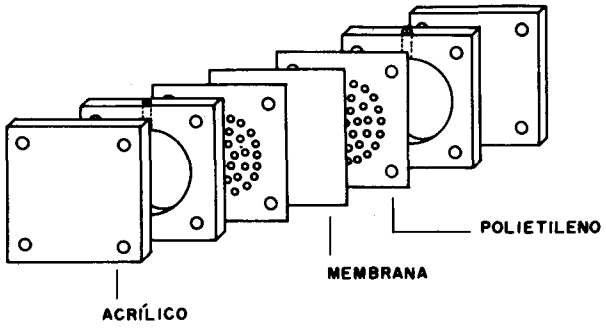

Figura 1

As experiências de equilíbrio de diálise foram feitas segundo o procedimento: adicionou-se primeiramente 6,5 cm^3 da solução tampão de proteína em um dos compartimentos da cela e no outro compartimento um volume igual da solução tampão de surfatante.

Cada experimento de diálise foi sempre feito utilizando 8 celas, cada cela contendo diferentes concentrações da solução de surfatante.

As celas de diálise foram colocadas num banho termostatizado a 25°C por um período de 24 horas. Os experimentos foram sempre feitos em triplicata e o número de moléculas de surfatante por molécula de proteína "$\bar{v}$", foi reprodutível para cada sistema numa concentração de surfatante livre. Após a diálise, a concentração de surfatante livre SDS e DSS foi determinada utilizando o método de separação de fases e extração do par iônico surfatante-corante, conforme descrito por Hayashi.[10] Para a determinação da concentração do surfatante livre CPC foi usada leitura direta da absorbância em 258 nm.

O método do equilíbrio de diálise exige que a concentração do surfatante antes da diálise esteja bem abaixo da CMC. As isotermas de interação da proteína tripsina com os surfatantes SDS, DSS e CPC foram feitas muito abaixo da CMC de cada surfatante. Desta maneira a atividade termodinâmica do surfatante foi determinada pela concentração das moléculas de surfatantes livres e não associadas, não havendo contribuição de micelas. Se houvessem micelas, as moléculas de proteínas poderiam se associar devido a interação eletrostática entre a proteína e a superfície micelar e este fato causaria a precipitação da proteína.

Utilizamos portanto soluções tamponadas de SDS e DSS na faixa de 1,0 x 10^{-4} a 1,0 x 10^{-5} Molar e CPC na faixa de 5,0 x 10^{-4} a 5,0 x 10^{-5} Molar. Em todas os experimentos de diálise a concentração da solução de tripsina foi 2,5 x 10^{-5} M.

Para garantir que as soluções dos surfatantes fossem preparadas abaixo da CMC nos tampões acetato e fosfato, foi necessário determinar a CMC para o SDS, DSS e CPC utilizando um método espectrofotométrico tendo um corante como sonda, conforme o procedimento descrito por Garcia.[11] Os valores obtidos para a CMC dos surfatantes a 25°C nos tampões acetato e fosfato estão contidos na tabela 2.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A interação proteína-surfatante é um processo cooperativo, isto é, quando uma molécula do surfatante interage com um sítio ativo da proteína (regiões hidrofóbicas e ionizadas), favorece diferentes interações subsequentes. Os surfatantes podem interagir com proteínas através de tres modos distintos[14]: i) interação com sítios ligantes específicos da proteína nativa; ii) interação cooperativa com a proteína sem grandes mudanças conformacionais; iii) interação cooperativa com desnaturação da proteína. Este último tipo de interação é comum entre surfatantes e proteínas globulares, onde geralmente com baixas concentrações do surfatante a estrutura nativa da proteína é modificada, passando a ter uma conformação estendida com os seus resíduos hidrofóbicos desprotegidos e interagindo com a molécula de surfatante.[14] Em geral, os três modos de intera-

Tabela 2. CMC das soluções de surfatantes a 298 K.

solução de surfatante em tampão	CMC em tampão moles. l^{-1}	CMC em água moles. l^{-1}	
SDS			(12)
pH 3,5	7,8 x 10^{-3}	8,2 x 10^{-3}	
pH 7,0	8,0 x 10^{-3}		
DSS			(13)
pH 3,5	2,8 x 10^{-2}	3,3 x 10^{-2}	
pH 7,0	2,9 x 10^{-2}		
CPC			(13)
pH 3,5	8,3 x 10^{-4}	9,0 x 10^{-4}	
pH 7,0			

ção proteína-surfatante são interpretados pelos modelos propostos por Scatchard e Wyman.

As isotermas de interação dos surfatantes SDS, DSS e CPC com a tripsina em duas soluções tampão pH 3,5 e pH 7,0 ambas com força iônica 10 mM são mostradas nas figuras (2), (3) e (4) respectivamente. O efeito da cooperatividade na interação proteína-surfatante pode ser observado pelos valores de $\bar{\nu}$ em função da concentração do surfatante livre. Os modos cooperativos de interação requerem maior concentração de surfatante na forma monomérica que aquela necessária para a interação com sítios específicos na proteína nativa. As isotermas das figuras (2), (3) e (4) mostram cooperatividade diferentes para cada surfatante, indicando um aumento da afinidade do sítio ligante da proteína em relação ao aumento da concentração do surfatante livre em diferentes pH's. Para valores de $\bar{\nu}$ maiores que 40, 3 e 10 respectivamente do SDS, DSS e CPC, ocorre a precipitação da proteína. Verificamos que a isoterma de interação tripsina/SDS apresentou um valor muito alto para $\bar{\nu}$ em comparação com DSS e CPC, indicando uma maior cooperatividade com o aumento da concentração do surfatante livre. Este comportamento para o SDS foi também confirmado por Sarmiento e colaboradores[15] que estudaram a interação de n-Alquil sulfatos com insulina em solução aquosa. A figura (2), mostra que independentemente do pH do meio, a isoterma de interação tripsina/SDS apresenta comportamento semelhante, o mesmo não acontecendo para os sufatantes DSS e CPC, figuras (3) e (4) respectivamente, onde ocorre um deslocamento da isoterma de interação, sendo $\bar{\nu}$ maior para o pH 3,5.

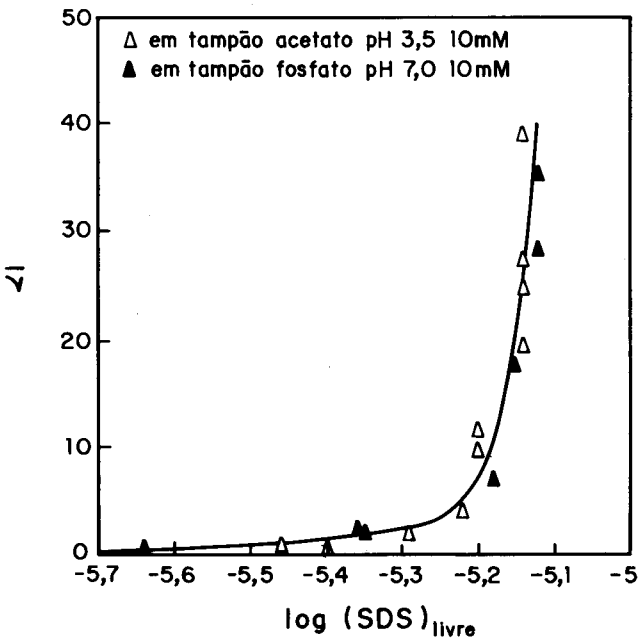

Figura 2

Observamos que o modo cooperativo da interação para o surfatante catiônico CPC em pH 3,5 e 7,0 ocorre em concentração mais próxima da sua CMC devido à sua alta hidrofobicidade, enquanto que o correspondente processo para os surfatantes aniônicos SDS e DSS ocorre muito abaixo da CMC.

A solubilidade da tripsina na solução tampão pH 3,5 e 7,0 é um balanço crítico entre a sua carga e sua hidrofobicidade. O efeito da carga na sua solubilidade é demonstrado no caso da sua precipitação em pH 4,0 (ponto isoelétrico). Da mesma

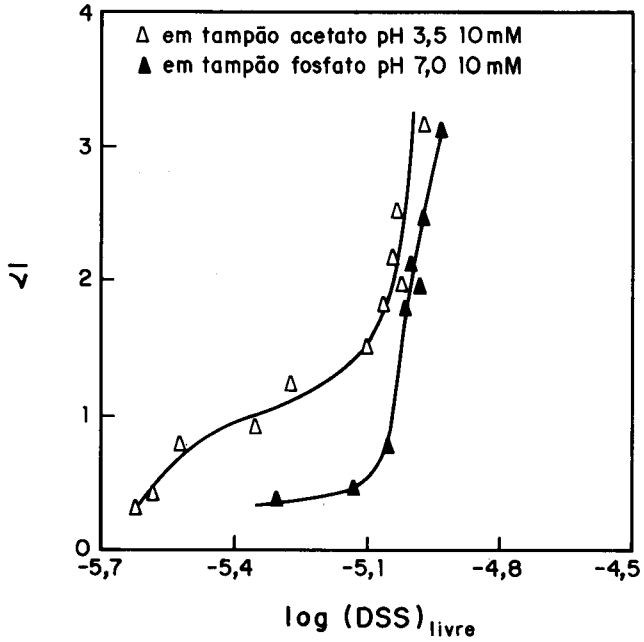

Figura 3

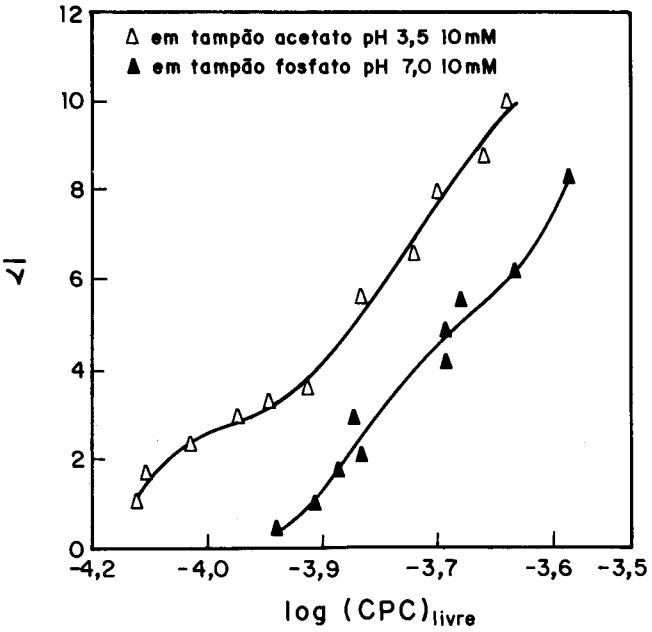

Figura 4

maneira, a interação de um surfatante com uma proteína globular é determinada pela densidade de carga da parte polar e da sua hidrofobicidade.

Estudos estruturais[16] mostram qua a molécula da tripsina tem resíduos ionizáveis, como resíduos de amino ácidos básicos (13 lisina, 2 arginina e 1 histidina) e resíduos ácidos (5 ácido aspártico e 3 ácido glutâmico). No pH 3,5 lisina e arginina estão ionizadas, pois os valores pK destes aminoácidos estão na faixa de 10,3 a 10,6 e de 12,7 a 13,3[17] respectivamente, significando que a molécula de tripsina neste pH possui 15 cargas positivas. Por outro lado, em pH 7,0 os resíduos ionizados são 5 ácido aspártico e 3 ácido glutâmico

Tabela 3. Valores da variação da energia livre de interação $\Delta G_{\bar{v}}$ a 298 K.

Proteína/Surfatante	$\bar{v}$	$-\Delta G_{\bar{v}}$ / kJ. mol^{-1}
Tripsina/SDS		
pH 3,5	0,3 - 40,0	3,4 - 9,8
pH 7,0	0,3 - 40,0	2,3 - 10,7
Tripsina/DSS		
pH 3,5	0,5 - 3,0	3,2 - 5,0
pH 7,0	0,5 - 3,0	2,7 - 3,0
Tripsina/CPC		
pH 3,5	0,2 - 10,0	0,1 - 1,3
pH 7,0	0,4 - 8,5	0,1 - 1,0

pois os valores de pK destes aminoácidos estão na faixa de 3,0 a 4,7 e de 2,7 a 4,7 respectivamente.

Portanto o valor da carga líquida da tripsina em tampão acetato pH 3,5 é + 15 e em tampão fosfato pH 7,0 é - 8. Em pH 3,5 predomina na tripsina uma carga líquida positiva e a figura (3) mostra uma maior interação do surfatante aniônico DSS com a tripsina em pH baixo, provavelmente devido à interação eletrostática entre o ânion DS^- e a superfície da proteína. No caso da interação do surfatante catiônico CPC com a tripsina em pH 3,5 e 7,0, observa-se que mesmo em pH baixo, o favorecimento de uma maior interação dos cations CP^+ com a tripsina deve-se provavelmente a grande hidrofobicidade do CPC. Para o surfatante aniônico SDS, não observamos diferença na isoterma de interação com a tripsina tanto em pH 3,5 quanto em pH 7,0 figura (2). Em adição à neutralização das cargas positivas da tripsina, a interação do íon SD^- devido ao tamanho da sua cadeia de hidrocarboneto introduz grande hidrofobicidade à superfície da tripsina.

As isotermas de interação mostram uma significante mudança na forma com o comprimento da cadeia carbônica do surfatante. Para o SDS figura (2) há uma quebra na isoterma a $\bar{v} \cong 5$ enquanto para o DSS ocorre um patamar a $\bar{v} \cong 1$ (pH $\cong$ 3.5) e $\bar{v} \cong 0,5$ (pH = 7,0). É possível que a quebra na isoterma do SDS corresponde à interação iônica específica inicial de cerca de 5 ions surfatantes DS^- nos sítios catiônicos da lisina, muitos dos quais estão localizados próximos à superfície da proteína. Estudos cristalográficos do sistema lisozima-SDS feitos por Yonath e colaboradores[18] mostraram que o SDS interagiu em tres localizações diferentes da proteína mas com um aspecto comum o qual é provavelmente característico da interação do SDS: a cadeia carbônica faz interações hidrofóbicas enquanto a parte polar SO_4^{2-} interage com aminoácidos carregados.

A região inicial da isoterma de interação do SDS presumivelmente representa a saturação de quase todos os sítios de interação catiônicos. O DSS por ser menos hidrofóbico que o SDS apresenta um menor valor de $\bar{v}$ na região inicial da isoterma.

O aumento de $\bar{v}$ nas isotermas do SDS e DSS pH = 3,5 figuras (2) e (3) comparativamente ao aumento do comprimento da cadeia do ion surfatante demonstra o papel relativo das interações iônicas e hidrofóbicas. Para as interações específicas ocorrer é claramente necessário ter ambos o grupo polar e a cadeia carbônica para fazer a interação hidrofóbica com a proteína. Em pH = 7,0 a isoterma de interação do DSS figura (3) é deslocada para valores mais altos de concentração de surfatante livre indicando que as interações iônicas específicas não são tão evidentes.

A região inicial horizontal de uma isoterma obtida com o tratamento de Wyman é em geral atribuída à interação hidrofóbica.[19] Este comportamento reforça o observado para o surfatante DSS, o qual também apresenta uma isoterma com região inicial com baixa inclinação sendo a hidrofobicidade do DSS menor que a do SDS por apenas uma diferença de dois carbonos. Em contraste com as interações iônicas específicas do SDS e DSS, o surfatante catiônico CPC fornece uma isoterma característica de uma interação cooperativa não específica, predominando certamente a contribuição hidrofóbica devido ao tamanho da sua cadeia carbônica. No caso do CPC, a isoterma apresenta uma elevação maior dos valores de $\bar{v}$, concordando com o fato de que a elevação de $\bar{v}$ está relacionada com a interação hidrofóbica, pois dos tres surfatantes estudados o CPC apresenta uma cadeia carbônica maior.

A tabela 3 contém os valores da variação da energia livre de interação proteína-surfatante obtidos pela integração da área sob a isoterma (equações 10 e 11), os dados são consistentes com o requesito de que $\Delta G_{\bar{v}} \rightarrow 0$ quando $\bar{v} \rightarrow 0$.

Observamos que $\Delta G_{\bar{v}}$ para os surfatantes aniônicos torna-se mais negativo com o aumento do comprimento da cadeia carbônica. Embora o CPC tenha 16 carbonos na cadeia carbônica, a variação de energia livre de interação com a tripsina é pequena mesmo tendo um número maior de moléculas interagindo com uma molécula de proteína, provavelmente devido a baixa densidade de carga e o impedimento estérico da parte polar do íon piridínio.

Para os tres surfatantes estudados $\Delta G_{\bar{v}}$ torna-se mais negativo com o aumento de $\bar{v}$. A variação em $\Delta G_{\bar{v}}$ com o aumento de $\bar{v}$ implica que após a interação inicial aos sítios da proteína, as interações subsequentes são mais fracas.

Dos resultados obtidos concluímos que a interação dos surfatantes aniônicos SDS e DSS com a tripsina é uma interação iônica específica seguida de uma interação hidrofóbica não específica. Para os surfatantes aniônicos a interação inicial ocorre nos sítios catiônicos da superfície da proteína especificamente nos resíduos lisina, arginina e histidina. No caso do surfatante catiônico CPC predomina a interação hidrofóbica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Profa. Dra. Suzana P. Nunes (IQ-Unicamp) pelas valiosas sugestões na montagem da cela de diálise.

REFERÊNCIAS

1. Fendler, Janos H.; Membrane Mimetic Chemistry; John Wiley & Sons, New York, 1982.
2. Jones, M. N.; Biochemical Thermodynamics, Elsevier, 2 ed., Elsevier, New York, 1988.
3. Jones, M. N.; Brass, A.; Food Polymers, Gels and Colloids, ed. E. Dickinson, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991, p.65-80.

4. Moosavi, A. A.; Razeghifard, M. R.; *Thermochimica Acta*, (1991), **188**, 183.
5. Steinhardt, J.; Reynolds, J. A.; Multiple Equilibrium in Proteins, Academic Press, New York, 1969.
6. Christian, S. D.; Smith, G. A.; Tucker, E. E.; *Langmuir*, (1985), **1**, 564.
7. Scatchard, G.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, (1949), **51**, 660.
8. Wyman, J.; *J. Mol. Biol.*, (1965), **11**, 631.
9. Nunes, S. P; Membranas Assimétricas de Acetato de Celulose para Osmossedimentação e Ultrafiltração, Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas, 1983.
10. Hayashi, K.; *Anal. Biochem.*, (1975), **67**, 503.
11. Garcia, M. E. D.; Sanz-Medel, A.; *Talanta*, (1986), **33**, 255.
12. Hans-Jürgen Hinz; Thermodynamics Data for Biochemistry and Biotechnology, Springer-Verlag, Berlim, (1986).
13. Fendler, Janos H.; Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems; Academic Press, New York, (1975).
14. Nozaki, Y.; Reynolds, J. A.; Tanford C.; *J. Biol. Chem.*, (1974), **249**, 4452.
15. Sarmiento, F.; Prieto, G.; Jones, M. N.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, (1992), **88**, 1003.
16. Vestling, M. M.; Murphy, C. M.; Fenselau, C.; *Anal. Chem.*, (1990), 2391.
17. Stryer, L.; Biochemistry, W. H. Freeman and Company, New York, 1988.
18. Yonath, A. P.; Honig, B. S.; Traub, W.; *Biochemistry*, (1977), **16**, 1418.
19. Jones, M. N.; Biological Interface, Elsevier, Amsterdan, 1975, p.101.

Publicação financiada pela FAPESP