



Universidade de São Paulo
Instituto de Química



*Interação entre a enzima enolase e
superfícies sólidas*

Arlete Tavares Almeida

Tese de doutorado

Profa. Dra. Denise Freitas Siqueira Petri

Orientadora

São Paulo - SP

2004

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Almeida, Arlete Tavares
A447i Interação entre a enzima enolase e superfícies sólidas / Arlete
Tavares Almeida. -- São Paulo, 2004.
140p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Petri, Denise Freitas Siqueira

I. Adsorção : Físico-química I. T. II Petri, Denise
Freitas Siqueira, orientador.

541.3453 CDD

“Interação entre a enzima enolase e superfícies sólidas”

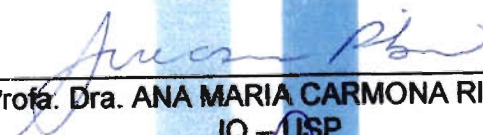
ARLETE TAVARES ALMEIDA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química - Área: Físico-Química.

Aprovado(a) por:



Profa. Dra. DENISE FREITAS SIQUEIRA PETRI
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)



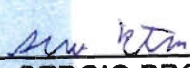
Profa. Dra. ANA MARIA CARMONA RIBEIRO
IQ - USP



Prof. Dr. ROBERTO MANUEL TORRESI
IQ - USP



Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS NART
IQSC - USP



Prof. Dr. SERGIO BROCHSZTAIN
UMC

SÃO PAULO
10 DE DEZEMBRO 2004

*Ao Eduardo, pelo seu constante
apoio incondicional, amor,
amizade, companheirismo e,
sobretudo, paciência.*

Agradecimentos

- ☺ À Profa. Dra. Denise F.S. Petri com quem tive o prazer de trabalhar.
- ☺ À Profa. Dra. Maria Cecília Salvadori pelo início do meu aprendizado em AFM
- ☺ Ao Prof. Dr. Thommas Schimmel pela oportunidade de estagiar nas instalações do Forchungszentrum Karlsruhe (Alemanha). Aos colegas deste mesmo grupo, Hartmut Gliemman, Stephan Wangheim e Mathias Müller, pelas dicas em AFM, sem as quais teria deixado de obter boa parte das imagens aqui apresentadas.
- ☺ Aos professores Dr. Michael Bruns (Forchungszentrum Karlsruhe, Alemanha) e Dr. Paul Rouxhet (Université Catolique, Bélgica) pelas análises em XPS.
- ☺ Ao Prof. Dr. Yoshio Kawano (IQ/USP) pelas análises de PAS.
- ☺ À Prof. Dra. Olga Zazuco Higa (IPEN/CNEN-SP) pelas irradiações das sluções poliméricas e imagens de MEV.
- ☺ À Prof. Dra. Rosângela Itri (Instituto de Física/USP), Sabrina Montero Pancera (Instituto de Química/USP) e Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS - Campinas, SP) pelas análises de SAXS.
- ☺ Aos meus pais pela total dedicação e apoio recebidos ao longo da minha vida.
- ☺ Aos amigos e companheiros do grupo (Alliny, Lizandra, Paulo, Romeu, Karina, Eduardo e Priscila) que de alguma forma me ajudaram durante a elaboração do trabalho.
- ☺ To my dear friends Vassilis Kapaklis, Christian Morra and Josep Maria Anglada for their encouragement and all the funny moments during my journey in Europe.
- ☺ À FAPESP pelo apoio financeiro e ao IQ/USP pelas instalações.

Índice

1	<i>Introdução</i>	1
2	<i>Considerações gerais</i>	5
2.1 -	Enolase	6
2.2 -	Modelos de adsorção protéica - Revisão da literatura	9
3	<i>Materiais e métodos</i>	17
3.1 -	Materiais	18
3.2 -	Métodos	18
3.2.1	Preparação dos substratos	19
3.2.2	Adsorção da enolase – determinação de Γ	21
3.2.2.1	Elipsometria in situ	21
3.2.2.2	Espectrofotometria UV-visível	24
3.2.3	Ângulo de contato	26
3.2.4	Microscopia de força atômica	27
3.2.5	Espectroscopia de fotoelétrons com fonte de raios-X (XPS)	29
3.2.6	Espectroscopia fotoacústica no infravermelho (PAS)	29
3.2.7	Espalhamento de raio-X a baixo ângulo (<i>Small Angle X-ray Scattering</i> - SAXS)	30
3.2.8	Medida da atividade da enolase adsorvida:	32
4	<i>Resultados e Discussão</i>	33
4.1 -	Substratos Planos	34
4.1.1	Cinética de adsorção - Elipsometria	34
4.1.1.1	Influência da força iônica	36
4.1.1.2	Influência da concentração	42
4.1.2	Isotermas de adsorção - Elipsometria	45
4.1.2.1	Influência da hidrofiliicidade da superfície do substrato	45
4.1.2.2	Influência do pH	47
4.1.3	Microscopia de força atômica (AFM)	49
4.1.3.1	AFM contato intermitente in situ	49
4.1.3.2	AFM contato intermitente em ar	56
4.1.4	Medidas de ângulo de contato	60

4.1.5	Medidas de XPS	63
4.1.6	Modelos de adsorção	68
4.2	- Substratos esféricos	73
4.2.1	Caracterização das esferas de vidro modificadas com TMCS por espectroscopia fotoacústica no infravermelho	73
4.2.2	Cinética de adsorção – leitura da absorbância em $\lambda = 280\text{nm}$	76
4.2.3	Cinética de adsorção – método de Bradford ($\lambda = 595\text{ nm}$)	78
4.2.4	Isotermas de adsorção	83
4.2.5	Influência da forma do substrato no processo de adsorção da enolase	85
5	<i>Medida da atividade da enolase adsorvida</i>	89
5.1	- Atividade da enolase adsorvida em substratos esféricos	94
5.2	- Atividade da enolase adsorvida em substratos planos	96
6	<i>Conclusões</i>	99
7	<i>Referências bibliográficas</i>	102
	<i>Apêndices</i>	107

Lista de abreviações mais usadas

2-PGA	<i>2-Fosfoglicerato</i>
AFM	<i>Microscopia de força atômica</i>
APS	<i>Aminopropilsilano</i>
CCBG	<i>Corante Comassie Blue G-250</i>
CSA	<i>Modelo de adsorção seqüencial cooperativa</i>
PAS	<i>Espectroscopia fotoacústica no infravermelho</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEP	<i>Fosfoenolpiruvato</i>
pI	<i>Ponto isoelétrico</i>
PS	<i>Poli(estireno)</i>
rms	<i>Rugosidade expressa em valores de média quadrática</i>
RSA	<i>Modelo de adsorção seqüencial aleatória</i>
SAXS	<i>Espalhamento de raios-X a baixo ângulo</i>
TMCS	<i>Trimetilclorosilano</i>
XPS	<i>Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X</i>

Lista de símbolos mais usados

a	<i>Coefficiente de absorptividade</i>
b	<i>Caminho óptico</i>
c_{ads}	<i>Concentração de enolase adsorvida</i>
c_{enolase}	<i>Concentração de enolase livre em solução</i>
λ	<i>Comprimento de onda</i>
Θ	<i>Grau de cobertura</i>
Δ	<i>Diferença de fase entre os componentes paralelo e perpendicular do campo elétrico</i>
Ψ	<i>Razão entre as amplitudes dos componentes paralelo e perpendicular do campo elétrico</i>
Γ	<i>Quantidade de material adsorvido</i>
θ_A	<i>Ângulo de contato (avanço)</i>
θ_R	<i>Ângulo de contato (recesso)</i>
D	<i>Coefficiente de difusão</i>
dn/dc	<i>Incremento do índice de refração</i>
d_x	<i>Espessura da camada desconhecida</i>
I(q)	<i>Intensidade SAXS de uma solução isotrópica de partículas esféricas monodispersas</i>
N_x	<i>Índice de refração complexo do meio x</i>
N_x	<i>Índice de refração do meio x</i>
P(q)	<i>Fator forma da partícula</i>
p(r)	<i>Distribuição de distância</i>
q	<i>Vetor espalhamento</i>
R_g	<i>Raio de giro</i>
R_h	<i>Raio hidrodinâmico</i>

Resumo

Neste trabalho, foram comparadas as cinéticas de adsorção da enolase (2-fosfo-D-glicerato hidrolase) sobre substratos hidrofílicos (placas de silício não modificadas ou silanizadas com aminopropilsilano (APS)) com aquelas sobre substratos hidrofóbicos (placas de silício silanizadas com trimetilclorosilano (TMCS) ou recobertas com filme de PS (poliestireno)). O efeito da forma do substrato (plano x esférico) sobre a cinética de adsorção também foi estudado. Os substratos esféricos foram esferas de vidro não modificadas (caráter hidrofílico) e silanizadas com TMCS (caráter hidrofóbico). As curvas de cinética de adsorção em substratos planos obtidas por elipsometria *in situ* mostraram que o processo ocorre em três etapas: (1) difusão das moléculas para a interface sólido/líquido, (2) formação de uma monocamada adsorvida e (3) adsorção de outras moléculas sobre a monocamada e formação de multicamadas. As isotermas mostraram que a enolase não possui adesão preferencial em substratos hidrofílicos ou hidrofóbicos. A etapa (1) pode ser descrita pelo modelo de adsorção seqüencial aleatória, enquanto que as etapas (2) e (3) podem ser descritas pelo modelo de adsorção seqüencial cooperativa. Não foi observada influência da força iônica. Contudo, imagens da topografia das superfícies recobertas por enolase obtidas por microscopia de força atômica (*in situ* e no ar) mostraram que os agregados de moléculas adsorvidas podem se apresentar na forma esférica (força iônica alta) ou como fibrilas (força iônica baixa). Medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) de uma solução de enolase (6 g/L NaCl 0,001 mol/L) mostraram que as moléculas possuem raio de giro de 29 Å. Portanto, a agregação é induzida pelas propriedades da superfície da monocamada e pela força iônica do meio. Medidas de ângulo de contato mostraram que substratos inicialmente

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

