

## Modificação das propriedades catalíticas da quimotripsina utilizando polietilenoimina derivatizada.

Juan Ricardo<sup>1</sup> (PG)\*, José Carlos Gesser<sup>1</sup> (PQ). \*juan@qmc.ufsc.br

<sup>1</sup>Departamento de Química. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. Santa Catarina.

Palavras Chave: Quimotripsina, hiperatividade, inibição, polietilenoimina, derivatização.

### Introdução

Uma das formas de se modificar as propriedades catalíticas de uma enzima está na interação com polímeros. A interação carga-carga entre polímero e enzima é capaz de promover modificações estruturais que podem ativar ou inibir a atividade enzimática. Um polímero muito versátil é a polietilenoimina (PEI) que, por apresentar sítios nucleofílicos, pode ser funcionalizada com grupamentos que contenham diferentes cargas. Nesse trabalho, a PEI foi derivatizada combinatorialmente<sup>1</sup> com grupamentos funcionais contendo tanto cargas positivas como negativas, obtendo-se, assim, polímeros com diferentes cargas líquidas. Esses polímeros foram analisados através da interação com a quimotripsina que possui um *pI* de 8,8, porém, possui diferentes cargas líquidas em diferentes regiões de sua superfície.<sup>2</sup>

### Resultados e Discussão

Para a preparação dos polímeros foi utilizado o método de funcionalização combinatorial, fazendo-se uso de reagentes acetilantes e guanilantes. Para a acetilação e inserção de cargas negativas ao polímero foi usado de 0 a 1 eq. de acetato de  $\alpha$ -bromo-*tert*-butila por unidade monomérica do polímero. Já para a guanilação e inserção de cargas positivas à PEI usou-se de 0 a 1 eq. de praxadina. Dessa forma, foi obtida uma biblioteca contendo 77 polímeros com diferentes combinações estequiométricas para os dois derivatizantes. Do mapeamento cinético da reação de hidrólise de acetato de *p*-nitrofenila (pNPA) pelo sistema enzima-polímero (1:1), Figura 1A, observou-se dois comportamentos distintos: i) hiperatividade no processo de hidrólise de pNPA, com velocidades entre  $3,5$  a  $7,0 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ , a velocidade de hidrólise do pNPA na presença de quimotripsina, a  $35^\circ\text{C}$  e *pH* 7,8, é de  $3,5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ ; e ii) processo inibitório com valores entre  $1,5$  a  $3,5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ . A região onde houve hiperatividade é a que contém uma combinação maior de derivatizantes contendo carga negativa. Enquanto a região de inibição há uma maior quantidade de grupos positivos e combinação de grupos positivos e negativos. A hidrólise do pNPA meramente pelos polímeros funcionalizados foi analisada e foi pouco relevante. A quimotripsina possui até 6 resíduos de triptofanos expostos ao

33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

solvente (fluoróforos)<sup>3</sup>, e uma medida de fluorescência, feita assim que os polímeros foram adicionados ao sistema, revelou que as regiões com maior efeito inibitório sofreram uma supressão maior da fluorescência, o que pode ser observado na Figura 1B. Para a região onde houve hiperatividade a queda foi menor.

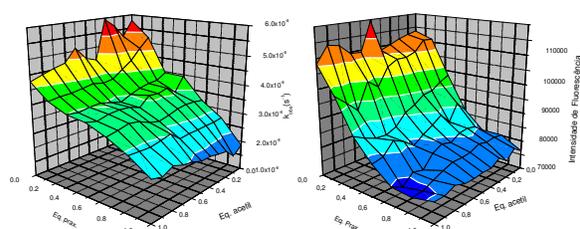


Figura 1. A)  $k_{obs}$  de hidrólise de pNPA pelo sistema polímeros-enzima por eq. de acetil e guanidina. B) Intensidade de Fluorescência pelos eq. de derivatizantes.

Para toda a biblioteca, foi apontado que as supressões eram consistentes com a Equação de Stern-Volmer.<sup>4</sup> As constantes bimoleculares,  $k_q$ , ficaram na faixa de  $10^{15} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para ambas as regiões. Como para água é de  $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , então os processos inibitório e hiperatividade não são controlados por difusão. Na região onde foi maior o efeito inibitório, maiores foram as constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ). Dessa forma, na região onde são maiores as constantes de ligação, maior é a interação dos polímeros com a proteína e, assim, maior é a inibição da enzima.

### Conclusões

Os sistemas polímero-proteína indicaram inibição e hiperatividade dependendo da carga líquida da PEI derivatizada. Os mesmos são consistentes com a Equação de Stern-Volmer e quanto maior a inibição da proteína, maior é a sua interação com os polímeros.

### Agradecimentos

CAPES, CNPq, UFSC e LACBIO.

<sup>1</sup>Hollfelder, F.; Kirby, A. e Tawfik, D. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5866.  
<sup>2</sup>Ragunath, R.; Sandanaraj, B.; Klaikherd, A. e Thayumanavan, S. *Langmuir*. **2006**, *22*, 7695. <sup>3</sup>Spreti, N.; Alfani, F.; Cantarella, M.; D'Amico, F.; Germani, R e Savelli, G. *J. Mol. Catal. B Enzymol.* **1999**, *6*, 99. <sup>4</sup>Boeris, V.; Farruggia, B.; Nerli, B.; Romanini, D. e Picó, G. *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, *41*, 286.