



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANTÔNIO VICTOR BAIOCO VASCONCELOS

**ESTUDO DE FORMULAÇÕES ENZIMÁTICAS ENVOLVENDO
β-TRIPSINA BOVINA COM MAIOR ATIVIDADE E ESTABILIDADE
EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS PARA ATUAÇÃO EM
SISTEMAS DE DETERGENTES E SAPONÁCEOS COMERCIAIS**

VITÓRIA

2020

ANTÔNIO VICTOR BAIOCO VASCONCELOS

**ESTUDO DE FORMULAÇÕES ENZIMÁTICAS ENVOLVENDO
β-TRIPSINA BOVINA COM MAIOR ATIVIDADE E
ESTABILIDADE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS
PARA ATUAÇÃO EM SISTEMAS DE DETERGENTES E
SAPONÁCEOS COMERCIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre/Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos.

VITÓRIA

2020

ANTÔNIO VICTOR BAIOCO VASCONCELOS

ESTUDO DE FORMULAÇÕES ENZIMÁTICAS ENVOLVENDO β-TRIPSINA BOVINA COM MAIOR ATIVIDADE E ESTABILIDADE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS PARA ATUAÇÃO EM SISTEMAS DE DETERGENTES E SAPONÁCEOS COMERCIAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 24 de junho de 2020.

Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos

**Universidade Federal do Espírito Santo
(Orientador)**

**Prof. Dr. Lucas Cunha Dias de Rezende
Universidade Federal do Espírito Santo
(Membro interno)**

**Prof. Dr. Lucas Bleicher
Universidade Federal de Minas Gerais
(Membro externo)**

**Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes
Guimarães
Universidade Federal de Minas Gerais
(Membro suplente)**

**VITÓRIA
2020**

AGRADECIMENTOS

A UFES, por proporcionar ensino e pesquisa de qualidade gratuitamente.

Aos meus pais, Antônio e Maria Helena (*in memoriam*), aos quais dedico todas as conquistas da minha vida com a mais profunda admiração e respeito. Ao meu irmão, Herbert, companheiro de vida, obrigado pelos conselhos, risos e incentivos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos, pelas oportunidades de aprendizado oferecidas desde a graduação. O seu incentivo, sua gigante paciência, amizade e compreensão foram fundamentais para a realização desta dissertação e contribuíram enormemente para o meu amadurecimento profissional.

Aos queridos amigos e colegas do Laboratório de Biologia e Bioquímica Molecular, Dayanne, Evaldo, Fabiano, Juliana, Maribel, Marielly, Matheus, Monique e Paulo Arthur, pela companhia, ajuda, aprendizado, apoio na realização deste trabalho, excursões gastronômicas, dicas financeiras e por me aguentarem nestes dois anos.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Lucas Bleicher, Dr. Lucas Cunha Dias de Rezende, por aceitarem avaliar esta dissertação, aperfeiçoando o trabalho com seus conhecimentos e sugestões. E ao suplente: Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães.

A Jamil Silvano de Oliveira, pela purificação da enzima deste trabalho

Aos técnicos e professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do departamento de ciências fisiológicas e LABIOM/UFES, pelo ensino e auxílio para a realização deste trabalho e o convívio nestes anos.

Ao LABIOM/UFES (Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares da Universidade Federal do Espírito Santo), pela utilização dos materiais e equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de realizar o mestrado e pela minha formação acadêmica.

A CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo), pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

A estes e a todos que não foram citados acima, mas que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

VASCONCELOS. A.V.B. **Estudo de formulações enzimáticas envolvendo β -tripsina bovina com maior atividade e estabilidade em função da concentração de íons para atuação em sistemas de detergentes e saponáceos comerciais.** 2020. 65f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES. Espírito Santo. Brasil.

RESUMO

A limpeza doméstica é uma atividade diária em todo o mundo, em que bilhões de pessoas usam detergentes para limpar suas roupas, pratos e assim por diante. As enzimas são adicionadas aos detergentes para obter a "limpeza catalítica", criando assim fragmentos menores dos constituintes da mancha, o que, por sua vez, facilita a ação química de limpeza dos surfactantes. Detergentes domésticos são a aplicação mais importante de enzimas industriais, representando 50% do total de vendas. Muito progresso foi feito nas últimas décadas na elucidação das relações funcionais estruturais das enzimas. Além disso, tem-se um maior conhecimento sobre os mecanismos de limpeza, as técnicas de produção e formulação das enzimas. Neste trabalho experimental, desenvolvemos um estudo físico-químico e das propriedades biológicas da isoforma β -tripsina bovina relacionados a concentração de íons que podem ser usadas na formulação de detergentes. A atividade enzimática desta isoforma demonstrou ser influenciada pela concentração de cátions, porém não foi observada uma mudança significativa para os ânions na faixa de 0 a 20 mmol·L⁻¹. Para a série iônica de cátions, o íon metálico cálcio mostrou-se mais efetivo, porém em concentrações baixas, entre 5 e 10 mmol·L⁻¹, diferentemente do relatado pela literatura para a interação deste íon com a enzima. O monitoramento do efeito do íon Ca²⁺ sobre a conformação da proteína por espectroscopia de fluorescência em meio ácido mostrou que as mudanças conformacionais induzida na estrutura são consideradas pequenos ajustes conformacionais, não induzindo assim o aumento da fração de moléculas desnaturadas. A análise termodinâmica do sistema de enzimas sob a influência de CaCl₂ mostrou que as mudanças provocadas pela adição de CaCl₂ até 20 mmol·L⁻¹ atuam principalmente nos parâmetros termodinâmicos de cooperatividade e capacidade calorífica diminuindo ambos. Além de que a adição de íons cálcio acima da concentração de 10 mmol·L⁻¹ tem um efeito pronunciado na desestabilização protéica. Assim, as concentrações típicas de 20 mmol·L⁻¹ mostram-se desestabilizadoras em ambos os sistemas testado. Portanto, com a determinação dos parâmetros biológicos e físico-químicos em relação à enzima com íons em solução, principalmente os termodinâmicos, poderemos iniciar a segunda fase do projeto da formulação do sistema detergente com a β -tripsina.

Palavras-Chaves: detergentes enzimáticos. Série de Hofmeister. Tripsina. Microcalorimetria.

ABSTRACT

Vasconcelos, A.V.B. **Study of Enzymatic formulations involving bovine β -trypsin with high activity and stability as a function of ions concentration for a use in detergents systems and commercial soaps.** 2020. 65p. Dissertation (Master in Biotechnology). Postgraduation Biotechnology Program, UFES. Espírito Santo. Brazil.

Household cleaning is a daily worldwide activity, which means that billions of people use detergents to clean their clothes, dishes, and so forth. The enzymes are increasingly added to achieve "catalytic cleaning", thereby creating smaller fragments of the stain constituents, which in turn facilitates the chemical cleaning action of surfactants. Household detergents are the most important application of industrial enzymes, representing 50% of total sales. Much progress has been made in the last decades in elucidating the structure function relations of enzymes. In this experimental work, we developed a physicochemical study and the biological properties of the bovine β -trypsin isoform related to the concentration of ions that can be used in the formulation of detergents. The enzyme activity of the β -trypsin isoform shown to be influenced by the concentration of cations, but no significant change was observed for anions in the range from 0 to 20 mmol·L⁻¹. For the ionic series of cations, the metallic calcium ion was more effective, but at low concentration from 5 to 10 mmol·L⁻¹, differently from what has been reported in the literature for the interaction of this ion with the enzyme. The monitoring of the effect of the Ca²⁺ ion on the protein conformation by fluorescence spectroscopy in an acid medium showed that the conformational changes induced in the structure are considered conformational adjustments or small structural adjustments, that not inducing an increase in the fraction of denatured molecules. The thermodynamic analysis of the enzyme system under the influence of the CaCl₂ showed that the changes caused by the addition of calcium chloride up to 20 mmol·L⁻¹ act mainly on the thermodynamic parameters of cooperativity and heat capacity decreasing both. Furthermore, the addition of calcium ions above the concentration of 5 mmol·L⁻¹ has a pronounced effect on protein destabilization. Thus, the typical concentrations of 20 mmol·L⁻¹ were destabilizing in both systems tested. Thus, with the determination of the biological and physical-chemical parameters in relation to the enzyme with ions in solution, and

mainly the thermodynamics, we can start the second phase of the work that is the formulation of the detergent system with β -trypsin isoform.

Keys words: Enzymatic detergents. Hofmeister series. Trypsin. Microcalorimetry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Superposição da estrutura terciária de cinco serino-proteases e seus centros ativos.	17
Figura 2. Diagrama de formação das isoformas de tripsina a partir do tripsinogênio e clivagens pela isoforma β -tripsina.	18
Figura 3. Pontos de clivagem do tripsinogênio e formação das isoformas ativas da tripsina.	19
Figura 4. Estrutura tridimensional de β -tripsina bovina.	20
Figura 5. Pontes dissulfeto na isoforma β -tripsina.	21
Figura 6. Posição dos resíduos aromáticos da β -tripsina.	22
Figura 7. Mecanismo catalítico das serino proteases.	23
Figura 8. Sitio de ligação a cálcio na molécula de β -tripsina (.5ptp).	25
Figura 9. Íons da Série de Hofmeister.	27
Figura 10. Íon e camada de hidratação.	28
Figura 11. Efeito específicos dos íons. Sequência aniônica da série de Hofmeister e seus efeitos sobre sob proteínas.	29
Figura 12. Reação enzimática de catálise do substrato sintético BapNA.	35
Figura 13. Sistema de funcionamento do DSC.	38
Figura 14. Cromatografia de troca catiônica de tripsina comercial bovina.	40
Figura 15. Determinação da pureza e das cadeias da isoforma β -tripsina por Espectrometria de massa (A) e SDS-PAGE 20%.	42
Figura 16. Avaliação da variação do pH e do pK_a' do tampão tris-HCl 50,0 mmol·L ⁻¹ pH 8,0 em função da adição de cloreto de cálcio.	43
Figura 17. Atividade amidásica da isoforma β -tripsina em função de diferentes concentrações de sais (CaCl ₂ , CsCl ₂ , KCl, MgCl ₂ , NaCl e NH ₄ Cl).	45
Figura 18. Atividade amidásica da isoforma β -tripsina em função de diferentes concentrações de ânions de variados sais (NaI, Na ₂ SO ₄ e NaH ₂ PO ₄).	46
Figura 19. Espectroscopia de fluorescência de β -tripsina em função da concentração de CaCl ₂ , MgCl ₂ e NaCl.	49
Figura 20. Compensação entrópica-entálpica do sistema de desnaturação de β -tripsina em meio ácido sob ação de cloreto de cálcio.	52
Figura 21. Panorama termodinâmico da interação dos íons sobre o sistema protéico.	54
Figura 22. Diagrama de propriedades termodinâmicas.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAPNA	N α -Benzoil-DL-Arginina-p-Nitroanilida.
CaCl ₂	Cloreto de cálcio.
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente.
C _p	Capacidade calorífica com à pressão constante.
CsCl ₂	Cloreto de céσιο.
[D]	Fração de moléculas no estado desnaturado.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura (do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i>).
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>).
HCl	Ácido clorídrico.
IC	Índice de cooperatividade.
K	kelvin.
KCl	Cloreto de potássio.
LABIOM/UFES	Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares da Universidade Federal do Espírito Santo.
MALDI-TOF	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz acoplada a detector de tempo de voo (do inglês <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight</i>).
MgCl ₂	Cloreto de magnésio.
[N]	Fração de moléculas no estado nativo.
NaCl	Cloreto de sódio.
NaH ₂ PO ₄	Dihidrogenofosfato de sódio.
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio.
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio.

pK_a	Logaritmo negativo (base 10) da constante de dissociação ácida.
pK_a'	Logaritmo negativo (base 10) constante de dissociação ácida modificada.
$pK_{Ca^{++}}$	Logaritmo negativo (base 10) constante de dissociação ácida para o íon cálcio.
pD	Logaritmo negativo da concentração de 2H (hidrogênio pesado ou deutério).
pH	Logaritmo negativo da concentração de H^+ .
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (do inglês <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>).
TFA	Ácido trifluoroacético.
T_m	Temperatura de fusão (do inglês <i>melting</i>) na qual metade da população de proteína tem sua estrutura desnaturada.
Tris-HCl	Cloridrato de 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol.
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo.
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais.
ΔH	Variação de entalpia entre dois estados.
ΔH_{cal}	É a mudança de entalpia que o sistema consome ou libera para que a transição ocorra.
ΔH_{vH}	Descreve a dependência da constante de equilíbrio (K) em função da temperatura.
ΔS	Variação de entropia entre dois estados.
ΔS_{T_m}	Variação da entropia no T_m .

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. BREVE RESUMO DA HISTÓRIA DO SABÃO	14
1.2. PROTEASES COMO ADITIVOS DE SAPONÁCEOS	15
1.3. CARACTERÍSTICAS DAS SERINO-PROTEASES.....	16
1.4. FORMAÇÃO DAS ISOFORMAS DE TRIPSINA.....	17
1.5. ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERCIÁRIA.....	20
1.6. MECANISMO CATALÍTICO DAS SERINO PROTEASES.....	22
1.7. SITIO DE LIGAÇÃO A CÁLCIO NA MOLÉCULA DE β -TRIPSINA	24
1.8. ÁGUA.....	25
1.9. ÍONS	26
1.10. SÉRIE DE HOFMEISTER.....	26
1.11. EFEITOS ESPECÍFICOS DOS ÍONS	28
1.12. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA.....	30
1.12.1. Hipótese	30
1.12.2. Justificativa	30
2. OBJETIVOS	31
2.1. OBJETIVO GERAL.....	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. PURIFICAÇÃO DA TRIPSINA COMERCIAL	32
3.2. SELEÇÃO E DETERMINAÇÃO DA PUREZA E IDENTIDADE DA ISOFORMA B-TRIPSINA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E SDS PAGE.....	32
3.3. MONITORAMENTO DA VARIAÇÃO DE pK_A E PH EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE $CaCl_2$	33
3.4. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAIS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ISOFORMA B-TRIPSINA	34
3.5. INFLUÊNCIA DOS CÁTIOS SOBRE A ESTABILIDADE CONFORMACIONAL DAS ENZIMAS EM MEIO ÁCIDO MONITORADO POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	36
3.6. VARIAÇÃO DA ESTABILIDADE TERMODINÂMICA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS POR MICROCALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).	37
3.6.1. Cálculo de parâmetros termodinâmicos (temperatura média de desnaturação e variação de entalpia de desnaturação calorimétrica e de Van't Hoff).	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	40

4.1. OBTENÇÃO DAS ISOFORMAS DE TRIPSINA BOVINA.....	40
4.2. CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DAS ISOFORMAS DE TRIPSINA BOVINA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA E SDS PAGE REDUTOR.....	41
4.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FORÇA IÔNICA SOBRE O PH E PK_A' DA SOLUÇÃO TAMPÃO	42
4.4. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CÁTIOS E ÂNIOS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ISOFORMA B-TRIPSINA BOVINA EM PH E TEMPERATURA ÓTIMA DA ENZIMA.	44
4.4.1. Efeito dos cátions sobre a atividade da enzima	44
4.4.2. Efeito dos ânions sobre a atividade da enzima	45
4.5. ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DE FLUORESCÊNCIA DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS SOBRE E ENZIMAS EM MEIO ÁCIDO.	47
4.6. ESTUDO DA ESTABILIDADE TERMODINÂMICA DA ISOFORMA B-TRIPSINA EM PH 3,0 EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS CLORETO DE CÁLCIO MONITORADO POR MICROCALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA.....	49
5. CONCLUSÃO	57
6. REFERÊNCIAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. BREVE RESUMO DA HISTÓRIA DO SABÃO

Originalmente, os humanos primitivos, procuravam águas mais moles em rios para a lavagem de suas vestimentas, pois a remoção de gorduras em água dura era mais difícil (ROBERTSON, 1986). Aproximadamente em 5000 a.C., descobriu-se que as vestimentas feitas de lã eram limpas com mais eficiência, quando elas fossem pisoteadas em lama do rio e lavadas várias as vezes depois para remover a lama, levava a maior parte da lama e sujeira a ela ligada. Em 350 a.C., tornou-se comum o uso de outros ingredientes “detergentes”, como cinzas de madeira e folhas e carbonato de sódio, que davam um poder extra de limpeza, devido a sua maior alcalinidade. Isso resultou no uso de equipamentos para bater as roupas, já que a alta alcalinidade provocava queimaduras na pele.

É conhecido que os sumérios, por volta de 2100 a.C., faziam sabão a partir de azeite de oliva e cinzas de madeira. Antes da fervura, essas duas matérias-primas eram misturadas em uma proporção específica, cuja receita representa o registro mais antigo de uma reação química. No Egito, o detergente mais comum, por volta de 1000 a.C., era uma mistura de gordura animal ou óleo vegetal com carbonato de sódio (ROBERTSON, 1986).

Os romanos não tinham sabão. Eles guardavam as roupas usadas em vasos contendo urina. Posteriormente, os tecidos eram pisoteados em cubas contendo água e lama. Somente no século VII, o uso de sabão tornou-se mais comum. Naquela época, os árabes descobriram que o uso de cal virgem permitia a preparação de sabonetes mais duros. Essa nova tecnologia se espalhou por toda a Europa, principalmente para a região do mediterrâneo, no qual eram colocadas fragrâncias nos sabões produzidos. Porém, estes produtos estavam disponíveis apenas para as classes mais abastardas. Somente no final de 1700, quando foram desenvolvidas novas tecnologias para a fabricação de carbonato de sódio, que o sabão ficou disponível para todas as classes (ROBERTSON, 1986).

O sabão em pó se tornou popular no final do século XIX, por razões de conveniência, já que ele permitia a lavagem e branqueamento em uma etapa. No

início do século XX, têm-se o surgimento dos primeiros componentes sintéticos, principalmente os alquilsulfatos. Essas descobertas permitiram o surgimento dos detergentes, que apresentavam melhores propriedades de limpeza do que os sabões.

Em 1913, a ideia original de usar enzimas foi descrita por Otto Rhöm. Ele patenteou o uso de enzimas pancreáticas em composições de detergentes, para melhorar a capacidade de remoção de manchas. Em 1931 foi lançado o primeiro detergente enzimático comercial, chamado “Burnus” (RÖHM, 1913). Devido às limitações de obtenção da enzima, estes detergentes enzimáticos tiveram vendas tímidas até o final da década de 1950, quando surgiu o primeiro detergente contendo uma protease bacteriana. Em 1988, foi lançado um detergente enzimático que era resistente a ação oxidante dos alvejantes, permitindo a utilização destes dois produtos simultaneamente (ROBERTSON,1986; AASLYNG et al, 1990).

1.2. PROTEASES COMO ADITIVOS DE SAPONÁCEOS

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas e são encontrados em todos os organismos, onde desempenham um papel essencial nos processos metabólicos e fisiológicos. Além de sua importância fisiológica, as proteases são de grande utilidade em aplicações enzimáticas industriais, como saponáceos para a roupa, lava-louças automáticas, aditivos para rações, preparação de alimentos, couro, diagnóstico, terapêutica e indústrias farmacêuticas (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; MAURER, 2004). O principal uso de proteases na indústria de alimentos é o aprimoramento do sabor em produtos lácteos, carnes e peixes. Em diferentes tratamentos médicos, as proteases são usadas como agentes ativos em tratamento da osteoartrite, remoção de tecido morto e cicatrização de feridas (MEKKES et al., 1998).

As proteases na forma de tripsina e quimotripsina foram introduzidas pela primeira vez como ingrediente ativo em detergentes para a roupa para degradação de manchas protéicas em 1913 pelo químico alemão Otto Roëhm (HERBOTS et al., 2008). O primeiro detergente comercial contendo proteases bacterianas foi produzido por Gebrüder Schnyder em 1959. Em 1985, aproximadamente 70% dos

detergentes para roupas pesados da Europa continham enzimas. Nos últimos 50 anos, as proteases e outras enzimas dos detergentes para a roupa deixaram de ser pequenos aditivos para os principais ingredientes. A seleção e avaliação de proteases a serem usadas em detergentes é baseada em parâmetros físico-químicos e de mercado importantes definidos pelos fabricantes de detergentes para a roupa. Uma protease detergente precisa ter desempenho eficiente de lavagem com amplo pH alcalino e em uma ampla faixa de temperaturas (de baixas temperaturas para fibras sintéticas a altas temperaturas para algodão). Os principais fornecedores de enzimas e fabricantes de detergentes estão buscando ativamente o desenvolvimento de novas atividades enzimáticas que atendam às necessidades dos consumidores por melhores propriedades de limpeza, cuidados com o tecido e antimicrobianos.

1.3. CARACTERÍSTICAS DAS SERINO-PROTEASES

As serino-proteases constituem a família das enzimas mais estudadas até os dias atuais, sendo amplamente pesquisada por mais de 60 anos. Os membros mais bem caracterizados são a quimotripsina, tripsina e elastase (VOET; VOET, 2011), que fazem parte da superfamília das quimotripsinas (Figura 1). Estas pertencem à família S1, caracterizada por um sistema de tríade catalítica formada por resíduos de aspartato, histidina e serina. Estes resíduos trabalham juntos para controlar a nucleofilicidade do resíduo de serina durante a catálise (KUMAR; VENKATESU, 2012). As serino-proteases apresentam dois domínios similares, provavelmente originados por modificações durante duplicação gênica, e entre esses domínios encontra-se o sítio ativo contendo a tríade catalítica (LESK; FORDHAM, 1996; VOET; VOET, 2011).

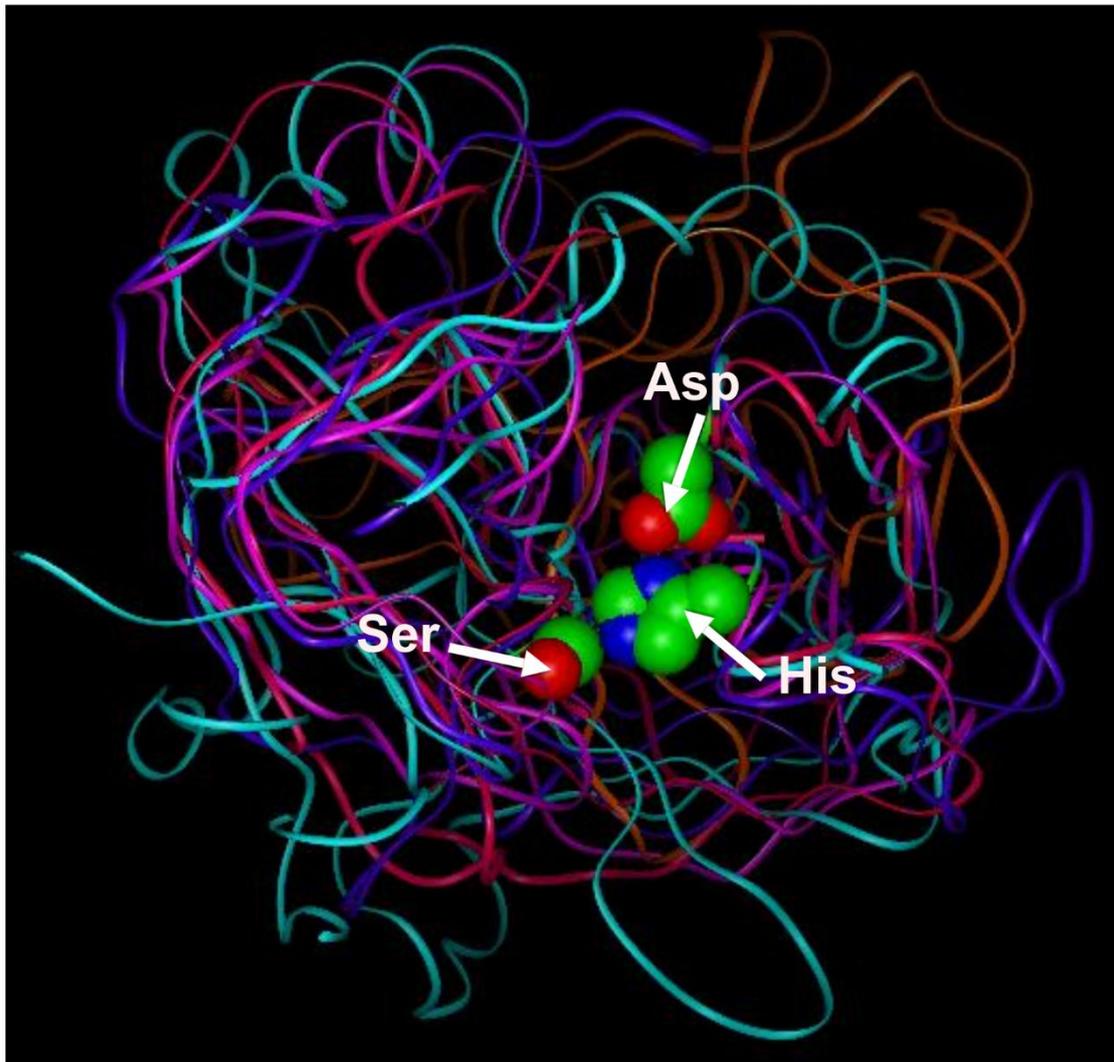


Figura 1. Superposição da estrutura terciária de cinco serino-proteases e seus centros ativos. Estruturas de protozoário (*Plasmodium falciparum*, magenta), arcaeon (*Pyrococcus furiosus*, ciano), fungo (*Neurospora crassa*, púrpura) e planta (*Arabidopsis thaliana*, rosa fúcsia). As proteases foram sobrepostas com a estrutura de raio-x humano (1SGI, *Homo sapiens*, laranja). Os resíduos da tríade catalítica (His, Asp, Ser). Adaptado de Laskar e colaboradores, 2012.

1.4. FORMAÇÃO DAS ISOFORMAS DE TRIPSINA

A tripsina foi isolada de diversos vertebrados e invertebrados, como porcos, ovelhas, bois, cachorro, homem, entre outros (SIMPSON; HAARD, 1984). De acordo com (KEIL, 1971), as tripsinas são uma família de enzimas de peso molecular variando de 20 a 25 kDa que catalisam preferencialmente a hidrólise de ésteres e ligações peptídicas envolvendo o grupo carboxílico de aminoácidos básicos e na qual um resíduo de histidina e um de serina participam da catálise. A tripsina bovina é uma

enzima proteolítica ativa, obtida pela clivagem do tripsinogênio (seu zimogênio), que tem atividade proteolítica restrita (Figura 2). O tripsinogênio é produzido pelo pâncreas e secretado no intestino, onde sofre a ação de enteropetidases (enzimas presentes na mucosa do duodeno), formando a beta-tripsina (β -tripsina), que apresenta atividade proteolítica e auto-ativador (BODE, Wolfram; FEHLHAMMER; HUBER, 1976; BODE, Wolfram; SCHWAGER; HUBER, 1978). A clivagem da ligação peptídica do tripsinogênio ocorre entre os resíduos de aminoácidos Lys6 e Ile7 do lado carboxílico da cadeia (contagem feita na sequência do tripsinogênio). Com isso, ocorre a saída do hexa-peptídeo N-terminal “Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys” (DAVIE; NEURATH, 1955).

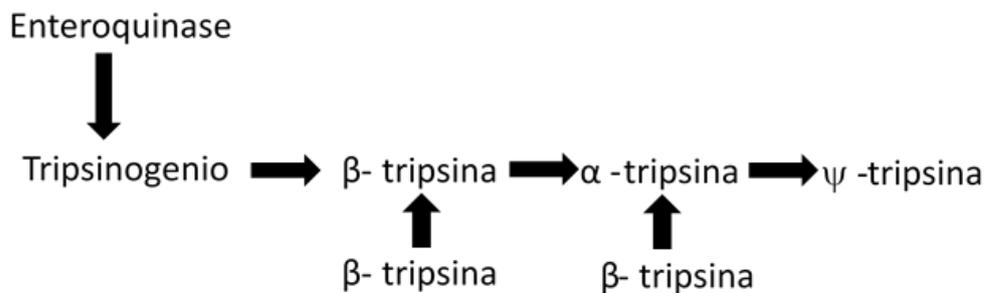


Figura 2. Diagrama de formação das isoformas de tripsina a partir do tripsinogênio e clivagens pela isoforma β -tripsina.

O grupo alfa-amino (α -amino) da Ile7 forma uma ponte salina com o resíduo Asp194 (PERKINS; WÜTHRICH, 1980), levando a alterações estruturais na β -tripsina recém-formada. Essa nova conformação torna a β -tripsina duzentas vezes mais ativa que o tripsinogênio (ROBINSON; NEURATH; WALSH, 1973).

O processo de autólise continua com a clivagem da ligação entre os resíduos Lys131 e Ser132 na β -tripsina, gerando uma outra forma ativa conhecida como α -tripsina (Figura 3) (SCHROEDER; SHAW, 1968).

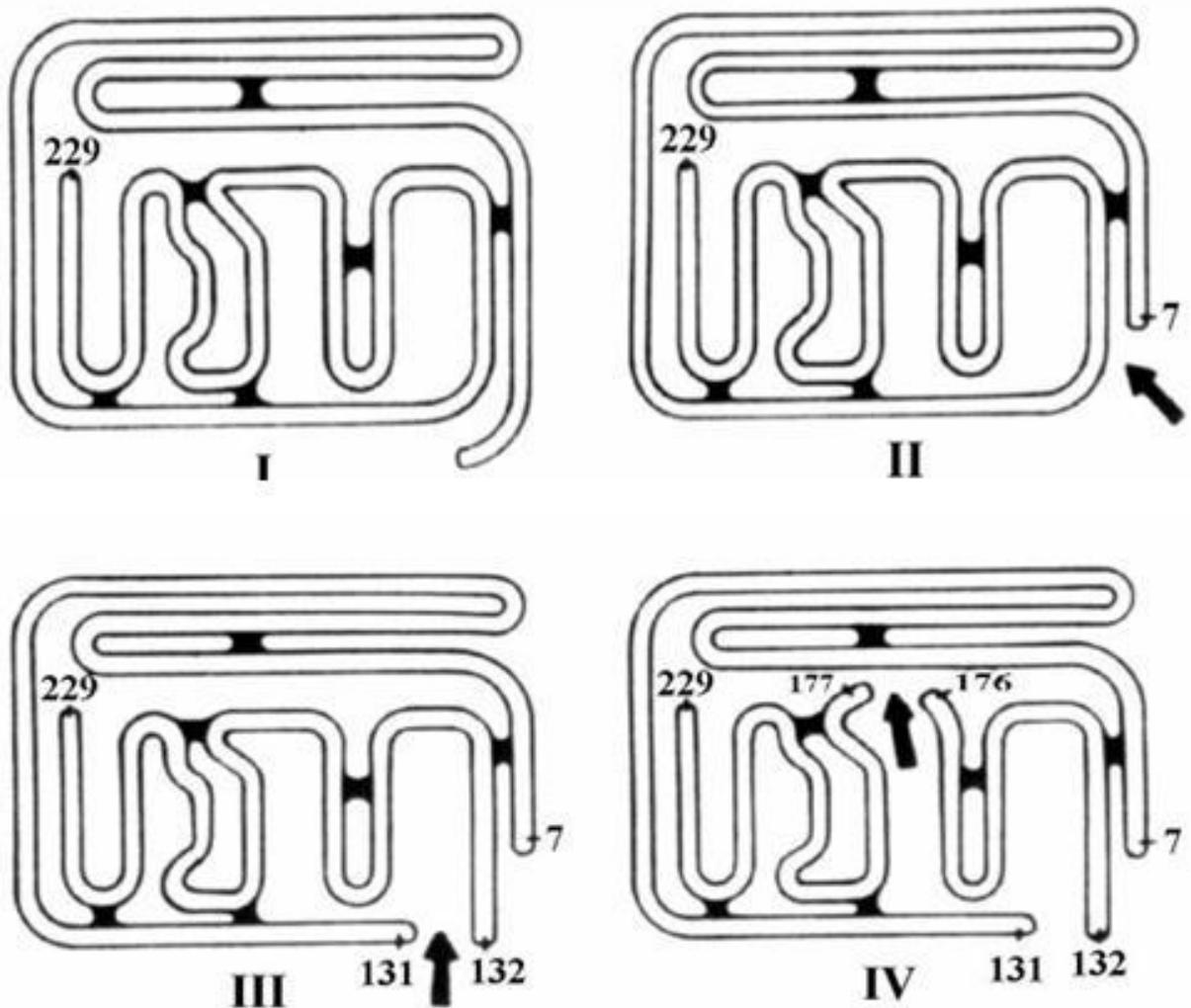


Figura 3. Pontos de clivagem do tripsinogênio e formação das isoformas ativas da tripsina. As setas mostram os pontos de clivagem. I- tripsinogênio, II- β -tripsina, III- α -tripsina, IV- Ψ -tripsina. Fonte: Keil (1971).

A α -tripsina formada apresenta estrutura terciária similar da isoforma β -tripsina, porém apresenta menor quantidade de folha beta (FOUCAULT; SEYDOUX; YON, 1974). A α -tripsina, quando comparada à isoforma β , possui menor atividade para substratos amidásicos, mas nenhuma diferença significativa é encontrada quando se utiliza substratos do tipo éster (FOUCAULT et al., 1975).

1.5. ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERCIÁRIA

Quanto à estrutura tridimensional, através de trabalhos realizados com métodos cristalográficos, mostrou que a β -tripsina apresenta um arranjo globular com dois domínios estruturalmente semelhantes. Sua estrutura secundária é predominante de folhas beta e poucas hélices. O primeiro domínio é formado pela sequência compreendida entre o 1º e o 105º resíduo de aminoácido, e o segundo domínio é formado pela sequência de aminoácidos entre as posições 106 a 223. Esses domínios, possuem forma de beta barril e estão unidos assimetricamente e entre eles está o sítio ativo (Figura 4) (BODE, W.; SCHWAGER, 1975; BODE, Wolfram et al., 1983; BODE, Wolfram; SCHWAGER; HUBER, 1978).



Figura 4. Estrutura tridimensional de β -tripsina bovina. O primeiro domínio está realçado em cor azul (1-105) e o segundo domínio realçado em cor vermelha (106-223). O resíduo de aminoácido N-terminal está representado em cor laranja e o C-terminal em cor verde. Os resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica estão representados em modo de bastão: Ser (amarelo), His (lilás) e Asp (verde).

O tripsinogênio e as isoformas de tripsina (β , α e psi [ψ]) são constituídos, respectivamente, por uma, duas e três cadeias polipeptídicas. Estas cadeias estão

interligadas por seis pontes dissulfeto (figura 5). Uma ponte dissulfeto (13-143) interliga os dois domínios, outra ponte dissulfeto (31-47)) estabiliza o primeiro domínio e as outras quatro pontes estão no segundo domínio (MIKEŠ et al., 1966; WALSH; NEURATH, 1964).

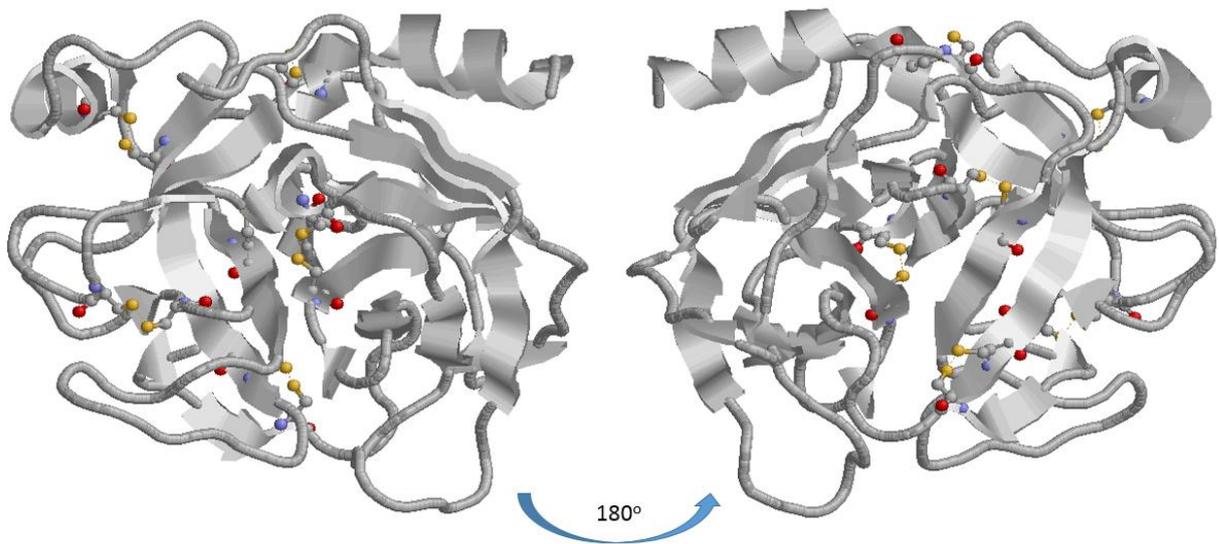


Figura 5. Pontes dissulfeto na isoforma β -tripsina (.5ptp). Em amarelos estão representados os átomos de enxofre; em azul, estão representados os atos de nitrogênio e em vermelho estão representados os átomos de oxigênio.

Além disso, as isoformas de tripsina possuem dez resíduos de tirosina, 3 resíduos de fenilalanina e 4 de triptofano, que facilitam sua dosagem e monitoramento de enovelamento/desenovelamento utilizando técnicas espectroscópicas que excitam estes resíduos (Figura 6).

As moléculas de α - e ψ -tripsina, até a presente data, não possuem suas estruturas tridimensionais determinadas; assim todos os estudos sobre as isoformas de tripsina bovina se baseiam na estrutura de sua molécula precursora, a β -tripsina. Embora algumas características cinéticas da α - e ψ -tripsina já tenham sido descritas (FOUCAULT et al., 1975; FOUCAULT; SEYDOUX; YON, 1974), pouco se sabe da sua caracterização termodinâmica.

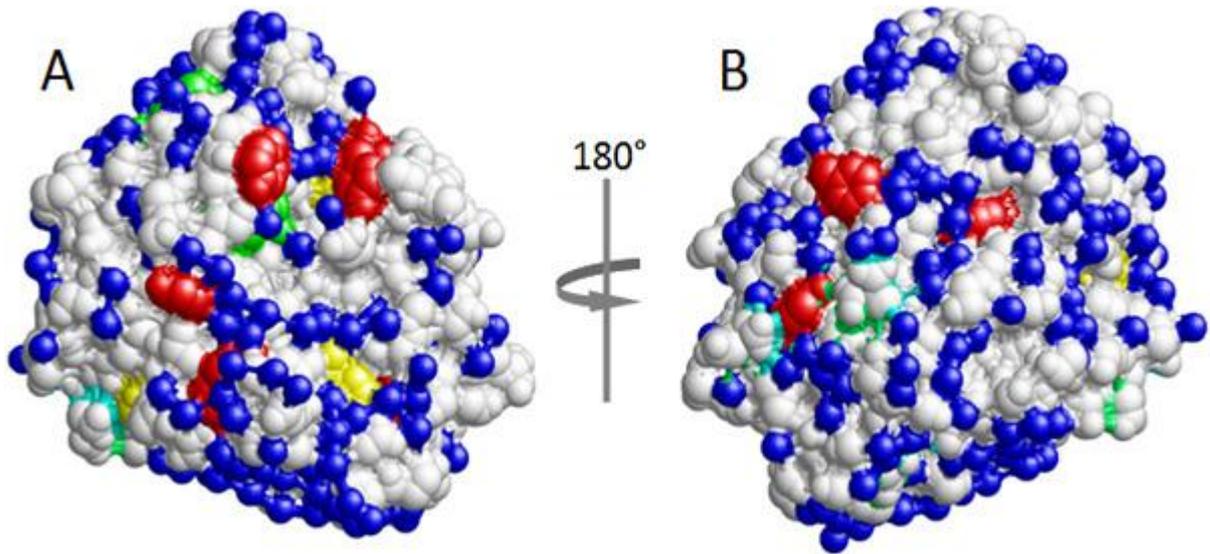


Figura 6. Posição dos resíduos aromáticos da β -tripsina (5ptp.pdB): Com 3 fenilalaninas (verde), 4 triptofanos (amarelo), 10 tirosinas (vermelho) e água (azul) As Imagens estão em spacefill e foram geradas pelo programa Rasmol®. (a) mostra um face da molécula e (b) outra face após giro na vertical de 180° .

1.6. MECANISMO CATALÍTICO DAS SERINO PROTEASES.

Estas enzimas empregam a catálise ácido-básica geral e a catálise covalente para a sua ação, onde o mecanismo catalítico inicia-se na tríade catalítica característica, His⁵⁷ - Asp¹⁰² - Ser¹⁹⁵ (segundo a numeração do tripsinogênio), que está localizada no sítio ativo da enzima (Figura 7).

Na etapa (1) a serino-protease se liga a um substrato formando um complexo de Michaelis, a Ser¹⁹⁵, na etapa que determina a velocidade de reação, faz um ataque nucleofílico no grupo carbonila suscetível de hidrólise do peptídeo, formando um complexo conhecido como intermediário tetraédrico (catálise covalente). O anel imidazólico da His⁵⁷ recebe o próton que foi liberado, formando assim um íon imidazólico. Esse processo é ajudado pelo efeito polarizador do íon carboxilato não solvatado do Asp¹⁰², que está ligado por ligação de hidrogênio à His⁵⁷.

Na etapa (2) o intermediário tetraédrico decompõe-se para um intermediário acil-enzima sob a força da doação do próton do N3 da His⁵⁷ (catálise ácida geral). O

grupo de saída amino ($R'NH_2$, a nova porção N-terminal da cadeia polipeptídica clivada) é liberado da enzima e substituído por água do solvente.

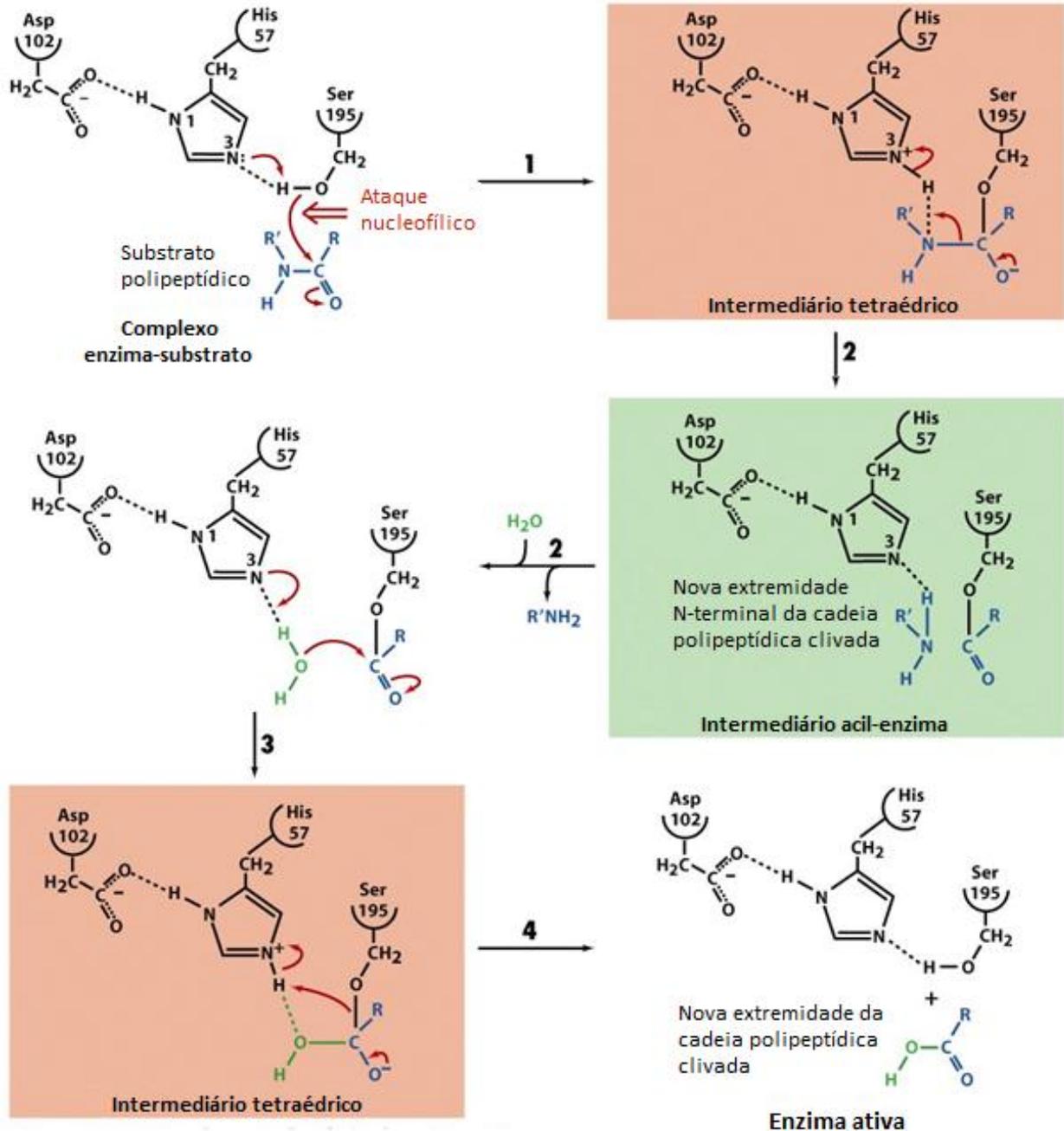


Figura 7. Mecanismo catalítico das serino proteases. Adaptado de Voet e Voet, 2011.

Na etapa (3 e 4) o intermediário acil-enzima (que, na ausência de enzima, seria um composto estável) é desacilado rapidamente pelo que, essencialmente, é o inverso das etapas anteriores, liberando o produto carboxilato (a nova porção C-terminal da

cadeia polipeptídica clivada) e regenerando a enzima ativa. Nesse processo, a água é o nucleófilo atacante e a Ser¹⁹⁵ é o grupo de saída (VOET; VOET, 2011).

Especificamente, a tripsina, que é uma serino protease, é um modelo interessante para estudos termodinâmicos porque as propriedades básicas de algumas isoformas como estrutura tridimensional, atividade enzimática e alguns dados sobre estabilidade térmica já são conhecidas.

1.7. SITIO DE LIGAÇÃO A CÁLCIO NA MOLÉCULA DE β -TRIPSINA

A tempos é sabido que os íons cálcio aceleram a conversão do tripsinogênio em tripsina, impedem a formação de proteínas inertes durante a ativação e protegem a tripsina contra a autólise (DIAS, 1986).

Já foi demonstrado que o tripsinogênio possui dois locais de ligação diferentes para os íons cálcio, enquanto a tripsina possui apenas um (ABITA; LAZDUNSKI, 1969; DELAAGE; LAZDUNSKI, 1967). O local de ligação de cálcio de baixa afinidade ($pK_{Ca} = 1,8$ [31]) é encontrado apenas no zimogênio e foi atribuído aos dois resíduos de ácido aspartico 13 e 14 vizinhos da importante ligação Lys-1 S-Ileu-16, que é dividida durante a ativação (ABITA; LAZDUNSKI, 1969; RADHAKRISHNAN; WALSH; NEURATH, 1969). O segundo local, com uma afecção muito maior para cálcio ($pK_{Ca} = 3,4$ (ABITA; LAZDUNSKI, 1969; DELAAGE; LAZDUNSKI, 1967) e íons relacionados, é comum tanto ao tripsinogênio quanto à tripsina e, presumivelmente, também é compartilhado pelas quimotripsinas (ABITA; LAZDUNSKI, 1969). Para determinar cristalograficamente esse sitio, Stroud, Kay e Dickerson, 1971, tentaram, sem sucesso, difundir íons de neodímio em cristais de tripsina. Em uma outra publicação, Stroud, Kay e Dickerson, 1974 não puderam apresentar nenhuma evidência para o local de ligação ao cálcio. Durante o curso do refinamento cristalográfico restrito da estrutura cristalina da β -tripsina bovina inibida por benzamidina, foi detectado apenas um único local na molécula de tripsina que, segundo todos os critérios disponíveis, é ocupado por um íon de cálcio fortemente ligado conforme a figura 8.

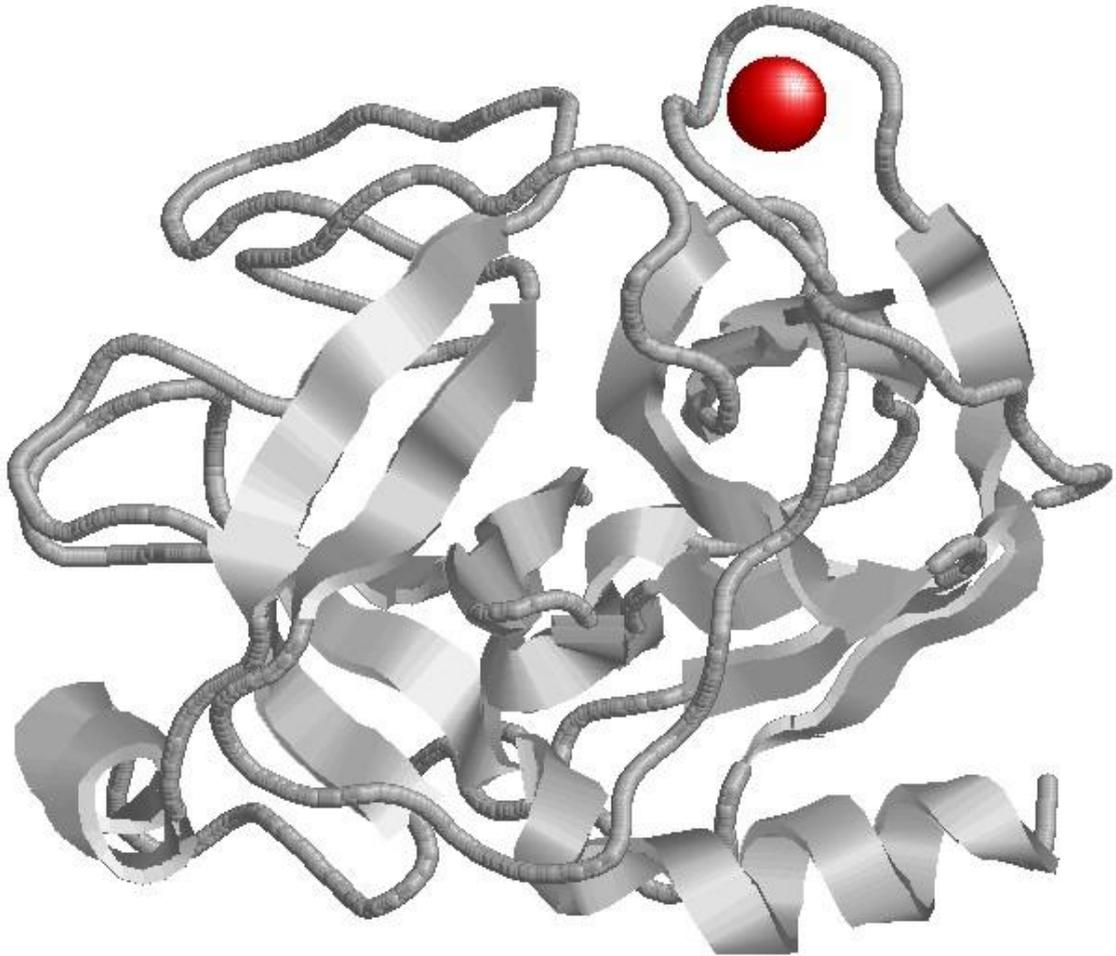


Figura 8. Sitio de ligação a cálcio na molécula de β -tripsina (.5ptp).

1.8. ÁGUA

A molécula da água tem uma estrutura química simples, composta por dois átomos de hidrogênio ligados covalentemente a um átomo de oxigênio. Cada átomo de hidrogênio compartilha um par de elétrons com o átomo de oxigênio (LEHNINGER; DAVID; COX, 2011). Este compartilhamento é desigual o que resulta em uma distribuição assimétrica dos elétrons sobre a estrutura da água dotando esta molécula de um forte caráter dipolar. A ligação de hidrogênio é reconhecida como a principal força intermolecular determinante dos padrões espaciais e dinâmicos da água, contudo a natureza da água pode depender também da competição entre forças de van der Waals e ligações de hidrogênio (LIN et al., 2009). Por ser um forte dipolo e possuir alta constante dielétrica (78.5 a 25 °C), a água é um excelente

solvente para íons (MURRAY; DAVIS, 2014). De fato, quanto maior a constante dielétrica de um solvente maior será seu poder de solvatação. A alta constante dielétrica da água blindo o potencial coulômbico dos íons evitando a agregação e cristalização de íons de cargas opostas. Da mesma maneira, a água é um eficiente solvente para polieletrólitos, como proteínas e ácidos nucléicos, também pela blindagem das cargas presentes nas estruturas de tais biomoléculas (BALL, 2008).

1.9. ÍONS

Íons são ubíquos na natureza e possuem papel importante em diversos sistemas e processos (por exemplo: químico, bioquímico, fisiológico, tecnológico, entre outros). Em condições normais, íons isolados não são encontrados como entidades livres, eles tendem a agregar-se formando sais iônicos eletroneutros (ou, em casos especiais, líquidos iônicos) devido à natureza e à grande magnitude das interações eletrostáticas. Entretanto, a situação é diferente em solventes polares, principalmente a água, que são capazes de dissolver os íons, isto é, de estabilizá-los como entidades dissociadas, pelo menos até certa concentração correspondente à saturação. Esta estabilização tem a sua origem nas interações eletrostáticas entre os íons isolados e os dipolos da água, ou seja, nas forças de solvatação específicas (HÜNEMBERG; REIF, 2011). Caso o solvente seja a água, o processo de solvatação é denominado de hidratação e refere-se a uma camada de moléculas de água ligadas fortemente que circunda cada molécula ou íon dissolvido. Esta camada de hidratação é o resultado das forças intermoleculares entre o soluto e o solvente (REICHARDT; VELTON, 2011). Os ânions são mais hidratados do que os cátions para o mesmo raio iônico. Os átomos de hidrogênio da água se aproximam do ânion de modo mais eficiente do que os átomos de oxigênio, hidratando assim melhor o ânion (COLLINS, 1997).

1.10. SÉRIE DE HOFMEISTER

Em 1888, Franz Hofmeister descobriu que diferentes sais tinham efeitos diferentes sobre a solubilidade de conjuntos de proteínas encontrados na clara de ovo da galinha (HOFMEISTER, 1888). Esse efeito foi considerado consistente para vários

conjuntos de proteínas e uma ordem de classificação mostrando o efeito de diferentes ânions e cátions na solubilidade protéica foi desenvolvida. Os íons que causam *salting out* (precipitação) foram denominados cosmotrópicos (estabilizantes de interações da água com as macromoléculas) (COLLINS; WASHABAUGH, 1985). Os íons que causam *salting in* foram denominados caotrópicos (quebradores de estrutura de água). Uma série para ânions e cátions e seu efeito nas proteínas é mostrado abaixo.

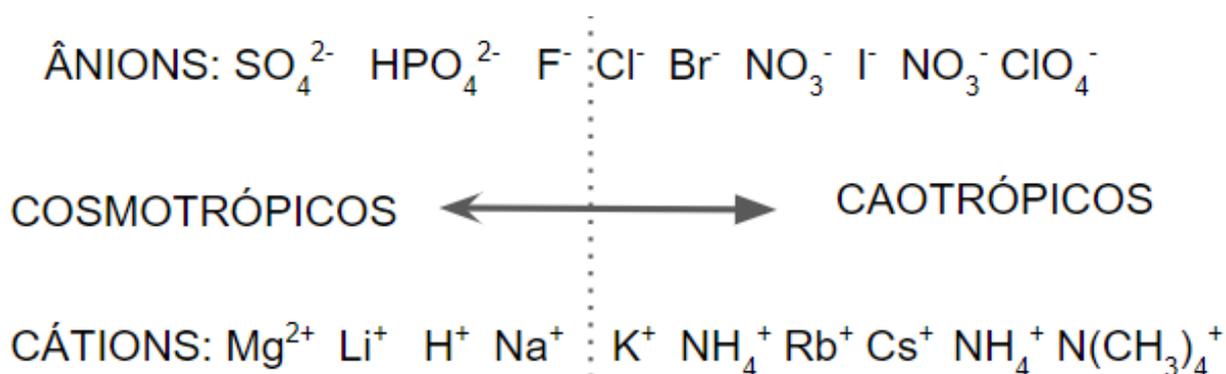


Figura 9. Íons da Série de Hofmeister. Os íons podem ser classificados como cosmotrópico ou caotrópico, de acordo com sua capacidade de hidratação. Adaptado de: Yang (2009).

Os ânions à esquerda do cloreto têm uma densidade de carga mais alta e diminuem a solubilidade da proteína (COLLINS, 1997; ZHANG; CREMER, 2006, 2010). Os ânions à direita do cloreto têm uma densidade de carga mais baixa e aumentam a solubilidade da proteína.

Como os cátions e ânions possuem constantes *salting* diferentes, as diversas combinações que eles podem realizar formando sais são diferidas pela sua tendência em promover *salting out*. Isso tem sido atribuído às diferenças de: estrutura, tamanho, densidade de carga, hidratação, e polarizabilidade do íon, bem como à polarizabilidade do solvente. O efeito da adição de sais em soluções de não-eletrólitos é muito complexo devido aos diferentes tipos de interações intermoleculares envolvendo os íons, o solvente e as moléculas do soluto (LO NOSTRO; NINHAM, 2012).

De modo geral, os cosmotrópicos possuem a capacidade de estruturar as moléculas de água e estabilizar proteínas, enquanto que, os caotrópicos desestruturaram as moléculas de água e desestabilizam proteínas (ZHANG; CREMER, 2006). Os íons

cosmotrópicos possuem interação mais forte com moléculas de água do que as moléculas de água entre si (figura 10), já os caotrópicos no contrário, interagem com a água mais fracamente do que as moléculas de água entre si (LO NOSTRO et al., 2006).

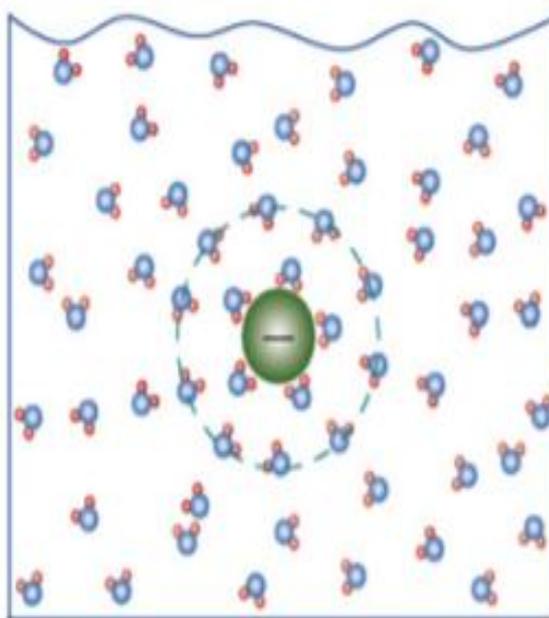


Figura 10. Íon e camada de hidratação. Representação esquemática da estruturação das moléculas de água ao redor de um ânion cosmotrópico. Adaptado de Zhang e Cremer (2006).

A sequência dos íons de Hofmeister apresentada na Figura 9 representa a influência dos íons na água. Porém, esta sequência não é fixa e depende do sistema em estudo, alguns íons podem mudar a sua posição na série ou até mesmo invertê-la, ou seja, um dado íon pode interagir com apenas moléculas de água ou com uma macromolécula podendo apresentar um comportamento caotrópico ou cosmotrópico a depender do sistema (KUNZ, 2010; LYKLEMA, 2009).

1.11. EFEITOS ESPECÍFICOS DOS ÍONS

Efeitos específicos induzidos por íons em diversas condições são conhecidos como os efeitos de Hofmeister (Figura 11). Os efeitos dos íons dessa série são observados em várias situações como na estabilidade de proteínas (TADEO et al., 2009), interações proteína-proteína, cristalização de proteínas (COLLINS, 2006)

atividade enzimática (NISHIMURA et al., 1999), estruturação e desnaturação de macromoléculas biológicas (ZHANG; CREMER, 2006).

Série de Hofmeister

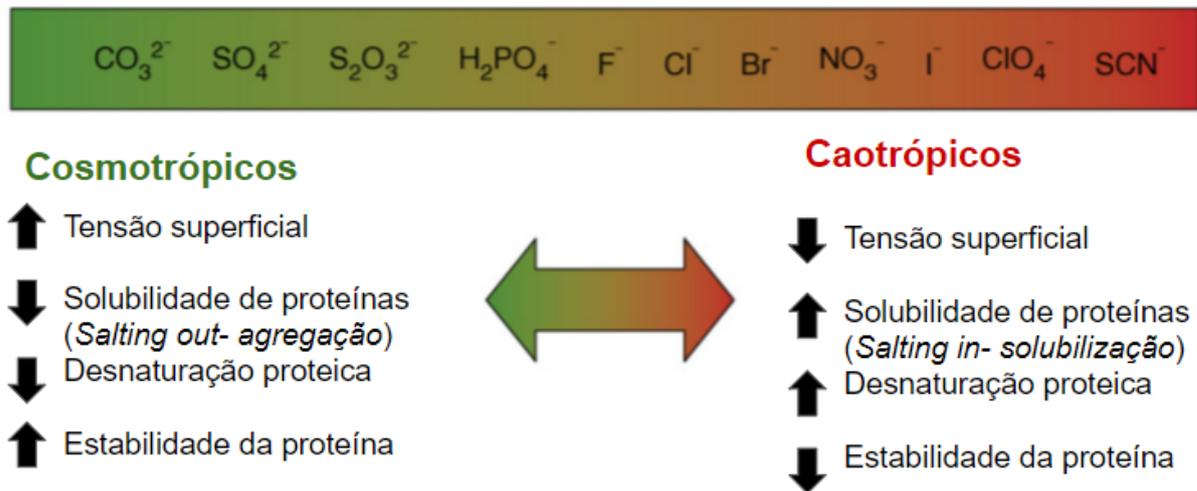


Figura 11. Efeito específicos dos íons. Sequência aniônica da série de Hofmeister e seus efeitos sobre proteínas. Adaptado de Zhang e Cremer (2006).

Os efeitos específicos dos íons são dependentes da concentração do sal. Geralmente, em baixas concentrações de sal ($<0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) quase não se observa especificidade iônica, pois as interações eletrostáticas são dominantes. Contudo, em concentrações intermediárias ($0,1$ até $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), os efeitos específicos são mais pronunciados e observados, pois nessa situação as interações eletrostáticas são blindadas significativamente (KUNZ, 2010). Os efeitos dos íons sobre a camada de solvatação são muitas vezes explicados pela teoria clássica de forças eletrostáticas. Contudo, os efeitos específicos dos íons não conseguem ser bem explicados apenas pelas teorias clássicas baseadas nas forças eletrostáticas. O tamanho dos íons e a estrutura da água devem ser considerados também, pois os íons afetam a estrutura e a dinâmica da água, principalmente, nas suas camadas de hidratação (XIE et al., 2014).

1.12. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

1.12.1. Hipótese

Se a enzima aumenta sua atividade em função da concentração de íons cálcio até $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, segundo a clássica literatura, então a adição deste e de outros íons de características químicas e físicas semelhantes devem aumentar também a estabilidade termodinâmica e cinética da mesma.

1.12.2. Justificativa

O desempenho de uma boa protease detergente é definido por vários parâmetros, como degradação da mancha protéica, e principalmente a compatibilidade com outros componentes dos detergentes como surfactantes não-iônicos e aniônicos, sais, agentes complexantes, perfumes e outras enzimas, estabilidade na presença de agentes oxidantes como alvejante e prazo de validade em formulações detergentes. Assim, nosso projeto visa investigar as propriedades físico-químicas da enzima β -tripsina e função da concentração de sais contidos na água de torneira e os íons adicionados na formulação inicial.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinação dos parâmetros físico-químicos da isoforma β -tripsina em função da concentração de sais adicionados e presentes em formulações de saponáceos e detergentes.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificação e caracterização da isoforma β -tripsina;
- Determinação da atividade enzimática da enzima em função da concentração de diferentes sais em meio básico;
- Determinação da estabilidade conformacional da enzima β -tripsina em função da concentração de diferentes sais em meio ácido;
- Determinação da estabilidade termodinâmica da isoforma β -tripsina em função da concentração iônica em meio ácido por microcalorimetria diferencial de varredura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PURIFICAÇÃO DA TRIPSINA COMERCIAL

Para a obtenção da isoforma β -tripsina, foi realizada a purificação de tripsina comercial bovina (Sigma Tipo I). A isoforma foi isolada por cromatografia de troca catiônica de bancada com eluição do tipo isocrática, tendo como base as metodologias de Teixeira (1977) e Santos e colaboradores (2008a). Esta etapa foi realizada em colaboração com o Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas na UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais).

Como etapa final do processo de purificação, foi realizada uma diálise para retirar os sais provenientes da solução tamponante e principalmente os íons metálicos Ca^{2+} utilizados na cromatografia. As amostras foram dialisadas contra solução de ácido clorídrico (HCl) pH 3,0 em um volume de 10^6 vezes o volume total das amostras. As amostras logo depois da diálise foram liofilizadas e armazenadas a 4°C.

3.2. SELEÇÃO E DETERMINAÇÃO DA PUREZA E IDENTIDADE DA ISOFORMA β -TRIPSINA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E SDS PAGE

A Isoforma β -tripsina foi selecionada baseando-se no tempo de retenção e sua pureza foi determinada através utilização de espectrometria de massa usando a técnica *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight* (MALDI-TOF) na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, conforme a metodologia descrita por Rosa et al. (2017). A solução de matriz foi preparada com 100 mg de ácido sinapínico diluídos em 15 mL de uma solução de acetonitrila 40% v/v adicionada de 0,1% v/v de uma solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA). As amostras de β -tripsina ($0,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) foram dissolvidas em matriz, na proporção de 1:3 (v/v) amostra:matriz, e em seguida aplicadas em triplicata ($0,5 \text{ }\mu\text{L/poço}$) sobre uma placa MTP Anchorchip 384x600. A massa molecular foi obtida utilizando o equipamento AutoFlex III Maldi-ToF (Bruker™) em modo linear positivo. Foi utilizado kit de calibração da Bruker™ Protein Calibration Standard II e os dados gerados foram analisados no programa Flex Analysis® (Bruker™).

Além da espectrometria de massas, foi realizada uma eletroforese em gel de 20% de poliacrilamida (SDS-PAGE) em presença de um agente redutor (2-mercaptoetanol), como descrito por Laemmli (1970). Como controle positivos foram adicionados no SDS-PAGE as isoformas α e γ -tripsina. A concentração da β -tripsina foi ajustada espectrofotometricamente para $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e aplicou-se $100 \text{ }\mu\text{L}$ em cada canaleta. A amostra foi submetida à eletroforese com uma corrente de 100 V por aproximadamente 1 hora. A coloração do gel foi realizada por meio da técnica de *Coomassie Brilliant Blue R250* (SEDMAN; GROSSBERG, 1977).

3.3. MONITORAMENTO DA VARIAÇÃO DE pK_a E pH EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CaCl_2

A influência da adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) sobre o pH de um sistema tampão cloridrato de 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (tris-HCl) $50,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8,0 foi monitorada através de medidor de pH de bancada. O ensaio foi realizado através da adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) $2,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (adição de 1 mL do sal entre cada leitura de pH) em béquer contendo 500 mL de tampão tris-HCl $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8,0 sob agitação. A medida que o sal foi adicionado, foram esperados 5 minutos e o valor do pH foi registrado. O ensaio foi realizado à temperatura de 25°C e em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

O pH é obtido através da equação (1):

$$pH = -\log[H^+] \cdot \gamma \quad (1)$$

Onde γ é a atividade química da íon.

Além da medida experimental foi realizado cálculo teórico da mudança do pK_a do tampão em função da adição de íons na faixa de concentração de 0 a $1000 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, assim utilizou-se a equação de Debye-Hückel (2) para obter o valor da constante de dissociação ácida modificada (pK_a') em cada adição de sal ao béquer sob agitação.

$$pK'_a = pK_a + (2z_a - 1) \cdot \left[\frac{A\sqrt{I}}{(1 + \sqrt{I})} - 0.1 \cdot I \right] \quad (2)$$

Onde: pK'_a é a constante de dissociação ácida, Z_a é o valor da carga elétrica do ácido conjugado, I é o valor da força iônica e A é uma constante dependente de temperatura (em 25°C, $A=0,5114$) (BEYNON, R. J.; EASTERBY, 1996).

Para o cálculo de I , é utilizado a equação de força iônica (3):

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n (C_i \cdot Z_i^2) \quad (3)$$

Onde: I é a força iônica, C_i é a concentração dos íons e Z_i é a carga correspondente ao íon (BEYNON, R. J.; EASTERBY, 1996).

3.4. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAIS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ISOFORMA β -TRIPSINA

A atividade amidásica da isoforma β -tripsina foi medida utilizando a metodologia descrita por (ASCENZI et al., 1981; ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961) usando o substrato sintético cromogênico N_α -Benzoil-D,L-Arginina-p-Nitroanilida (BApNA). A catálise deste substrato gera o produto p-nitroanilina com leitura em 410 nm. Este substrato foi preparado como solução estoque a 90 mmol·L⁻¹ em DMSO (Dimetilsulfóxido). A reação da enzima com substrato sintético e demonstrada abaixo na Figura 12.

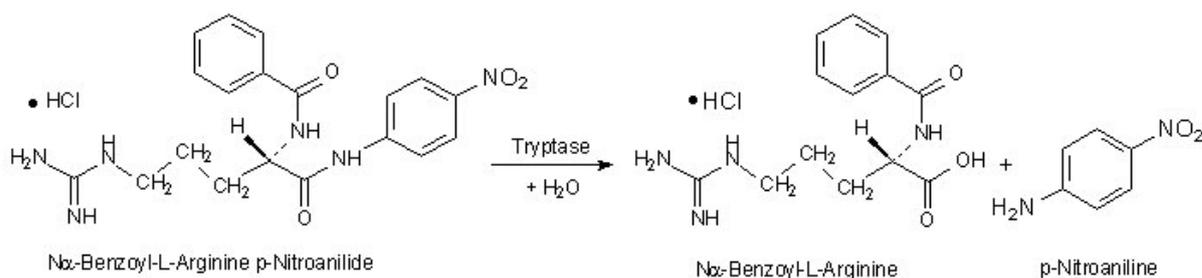


Figura 12. Reação enzimática de catálise do substrato sintético BapNA

Os ensaios foram realizados em pH 8,0 utilizando duas séries de sais: uma série com variação do cátion ligado ao íon cloreto (cloreto de cálcio, cloreto de sódio [NaCl], cloreto de magnésio [MgCl₂], cloreto de céσιο [CsCl₂], cloreto de potássio [KCl] e cloreto de amônio [NH₄Cl]) e outra série com variação do ânion ligado ao íon sódio (dihidrogenofosfato de sódio [NaH₂PO₄], sulfato de sódio [Na₂SO₄] e iodeto de sódio [NaI]). A concentração de cátion ou ânion, no sistema reacional, variou entre 0 e 1000 mmol·L⁻¹. Com estas mudanças, o meio reacional foi constituído assim:

- a) alíquota de 12,0 μL da enzima (solução estoque a 1,0 mg·mL⁻¹);
- b) adição de 283,0 μL de solução contendo o tampão tris-HCl 50,0 mmol·L⁻¹ pH 8,0 com adição de um dos nove sais descritos acima com concentração entre 0 e 1000 mmol·L⁻¹ em relação ao ânion ou cátion variante;
- c) incubação a 37 °C por 10 minutos;
- d) adição de 1,0 μL do substrato BApNA;
- e) incubação a 37 °C por 15 minutos;
- f) adição de 75,0 μL de solução aquosa de ácido acético 60% (v/v) ao sistema;
- g) alíquota de 2,0 μL do sistema “f”;
- h) mensuração da absorbância do produto a 410 nm.

A absorbância do produto da reação descrita acima foi medida no espectrofotômetro NanoDrop[®] 2000 (Thermo Fisher Scientific™) no Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares da Universidade Federal do Espírito Santo (LABIOM/UFES) e os dados foram expressos como média (n=3) \pm desvio padrão. Todas as

determinações de concentração de proteína usada neste trabalho foram feitas por espectrofotometria utilizando o coeficiente de extinção molar da β -tripsina que é de $40,000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (WALSH; WILCOX, 1970).

3.5. INFLUÊNCIA DOS CÁTIOS SOBRE A ESTABILIDADE CONFORMACIONAL DAS ENZIMAS EM MEIO ÁCIDO MONITORADO POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.

Para obter informações sobre a conformação estrutural da enzima nos sistemas salinos que apresentaram melhor desempenho de atividade amidásica (item 4.4) utilizou-se a técnica de espectroscopia de fluorescência para monitorar o deslocamento dos aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) durante o desenovelamento ou enovelamento de proteínas como indicador de mudança conformacional (LAKOWICZ, 2006). Esta técnica é muito sensível a mudança de ambiente dos resíduos aromáticos e como a tripsina possui 4 resíduos de triptofano, 10 de tirosina e e 3 de fenilalanina e os mesmos encontram-se enterrados na estrutura da enzima esta técnica é muito viável para a detecção de mudança conformacional na tripsina. Esta medida realizada em meio ácido desconsidera o efeito de ligação dos íons ao sítio de ligação, pois em meios ácidos os resíduos do sítio de ligação a íons positivos estão protonados, assim a verificação da influência dos íons é sobre o sistema, proteínas, íons e água.

Os ensaios foram realizados segundo o protocolo descrito por Rosa et al. (2017), com alterações. Os testes foram realizados em pH 3,0 com os 3 sais que apresentaram a melhor atividade amidásica no item 3.4 em concentração variando entre 0 e $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. O meio reacional foi constituído como se segue:

- Alíquota de $20,0 \mu\text{L}$ da enzima (solução estoque $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$);
- Adição de $80,0 \mu\text{L}$ ao sistema “a” de solução contendo glicina $50,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 3,0 mais o sal (cloreto de cálcio, cloreto de magnésio e cloreto de sódio) em concentração de $0,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $5,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $10,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $20,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

- Adição de 2,0 μL do sistema “b” em poço de placa de placa de microvolume take3™ (BioTek Instruments®).

As amostras foram analisadas pelo leitor de multidetecção em microplacas Synergy™ H1 (BioTek Instruments®) no LABIOM/UFES. A excitação da amostra foi realizada em 293 nm e a coleta da varredura foi feita na faixa de 320 a 370 nm, com velocidade de varredura em modo normal, 10 medidas por ponto e intervalo de aquisição dos dados igual a 1 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.6. VARIAÇÃO DA ESTABILIDADE TERMODINÂMICA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS POR MICROCALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).

O Calorímetro diferencial de varredura (DSC, do inglês *differential scanning calorimetry*) (Figura 13) possui duas câmaras adiabáticas, ou seja, suas câmaras são isoladas de qualquer fonte de troca de calor, possuindo duas células (Referência e Amostra) com volume de 500 μL cada. Este equipamento registra a diferença de temperatura entre as duas células e o resultado é um gráfico de capacidade calorífica em função da temperatura (Figura 13).

O estudo microcalorimétrico da desnaturação térmica da isoforma β -tripsina em pH 3,0 sob a influência da adição de sais foi realizado com base na metodologia descrita por Freire e outros (1992) e Privalov e Potekhin (1986). Todos os ensaios microcalorimétricos foram realizados no equipamento VP-DSC Microcalorimeter Microcal® (Malvern Panalytical™), localizado no LABIOM/UFES. Os dados foram analisados no programa Origin DSC®.

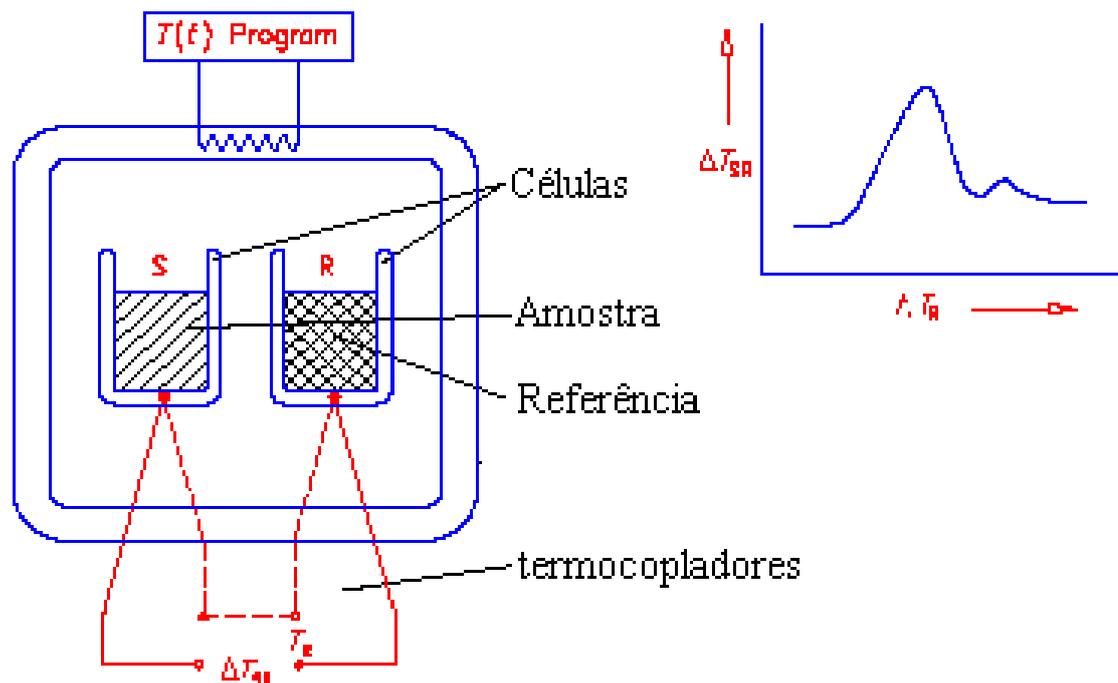


Figura 13. Sistema de funcionamento do DSC. Fonte: Hemminger e Sarge (1998).

A metodologia para aplicação da amostra está descrita abaixo:

- dissolução da β -tripsina em solução tampão contendo glicina $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 3,0 com adição de cloreto de cálcio (0, 2,0, 5,0, 10,0, 20,0, e $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), tendo a concentração final da enzima de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.
- desgaseificação da solução protéica e do tampão da célula de referência durante 30 minutos;
- aplicação de $500 \mu\text{L}$ do sistema "a" na célula de amostra;
- aplicação de $500 \mu\text{L}$ do branco na célula de referência;
- aplicação de 20,0 psi de pressão em ambas as câmaras.

As corridas foram realizadas no intervalo de temperatura de 20 a 70°C , a uma velocidade de varredura de $60^\circ\text{C}/\text{h}$.

Foram produzidas linhas de base para cada variação de concentração de cálcio no tampão, para subtração no processamento de dados, seguindo os mesmos parâmetros apresentados para a corrida da amostra. Na célula de amostra foi

adicionado o mesmo tampão utilizado para solubilizar a proteína. Foram coletadas 5 linhas de base por tampão. A linha utilizada para subtração é a média das 5 corridas. Para cada ensaio foram realizadas 3 corridas e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

3.6.1. Cálculo de parâmetros termodinâmicos (temperatura média de desnaturação e variação de entalpia de desnaturação calorimétrica e de Van't Hoff).

Para a obtenção dos parâmetros termodinâmicos, usou-se o software Origin-DSC® (Malvern Panalytical™). Este software realiza a subtração da linha de base, realização de uma conexão linear entre o estado nativo e desnaturado e ajuste de curvas com modelos predeterminados dos dados processados. O modelo clássico de transição em dois estados foi utilizado para a deconvolução das curvas. Cada transição ajustada no modelo dois estados fornece os parâmetros T_m e ΔH_{cal} . T_m é o ponto médio da curva de transição, em que 50% das moléculas da proteína se apresentam desnaturadas. ΔH_{cal} é a mudança de calor que o sistema consome ou libera para que a transição ocorra. As usadas para deconvoluir os dados de DSC estão descritas nas referências Sturtevant, (1987) e Privalov, (1986).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. OBTENÇÃO DAS ISOFORMAS DE TRIPSINA BOVINA

Para obter a isoforma de interesse do estudo, foi realizada uma cromatografia de troca catiônica de bancada com eluição do tipo isocrática, tendo como base a metodologia de Santos e colaboradores, (2008) e Teixeira (1977). O perfil obtido (Figura 14) foi similar aos encontrados por Santos e colaboradores (2008a), Schroeder e Shaw (1968) e Smith e Shaw (1969). $\epsilon+\xi+\gamma$

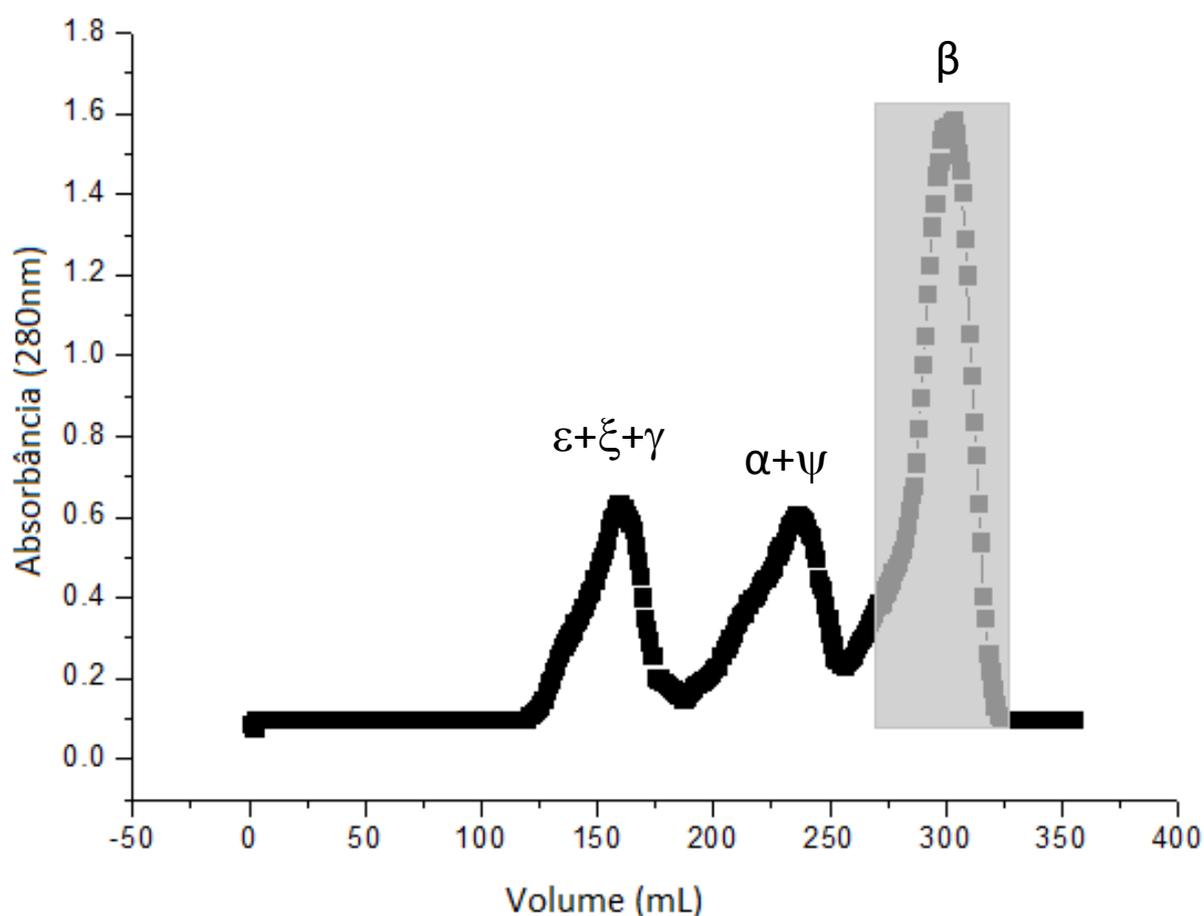


Figura 14. Cromatografia de troca catiônica de tripsina comercial bovina. Condições cromatográficas: Fluxo de $19,5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ sobre a fase estacionária SE-Sephadex C50, usando uma fase móvel de $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Tris-HCl; pH 7,1 a 4°C ; $20,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de cloreto de cálcio e $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Benzamidina. Foram coletados 7,0 mL por tubo e os mesmos foram detectados a 280 nm. A linha contínua (–) mostra a detecção a 280 nm. A área em cinza indica a região que contém a isoforma β -tripsina.

Apesar da baixa resolução entre as isoformas de tripsina, o método adotado garantiu um alto rendimento para a isoforma β -tripsina, pois a partir de 1 grama de tripsina comercial foram obtidas 438 mg de β -tripsina pura. Para garantir o isolamento apenas da isoforma β -tripsina, utilizou-se apenas os tubos coletados na área retangular cinza do cromatograma (**Figura 14**), mesmo esta opção levando a um menor rendimento cromatográfico.

4.2. CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DAS ISOFORMAS DE TRIPSINA BOVINA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA E SDS PAGE REDUTOR.

A fim de confirmar a identidade, em função da massa molecular, e a pureza das isoformas de tripsina, as frações foram submetidas à espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF-MS. A pureza da isoforma β -tripsina coletada da região acinzentada foi avaliada por espectrometria de massa e o resultado obtido a 1 Da de resolução da molécula contida no retângulo hachurado foi de 23.294 Da (Fig-10A). Este valor de massa molecular está dentro do erro aceitável e condizentes com o trabalho prévio de Lacerda e colaboradores (2014) e Santos e colaboradores (2008b), confirmando a identidade da isoforma por sua massa molecular.

Além da espectrometria de massa, foi realizado SDS-PAGE (Figura 15) para observação da constituição molecular de cadeias na isoforma β -tripsina.

Como pode ser observado na Figura 155, a isoforma β -tripsina apresenta uma massa molecular de 23 kDa em apenas 1 (uma) banda com alta intensidade. Este resultado era esperado, visto que a β -tripsina, originada da quebra enzimática do tripsinogênio, possui apenas uma cadeia protéica (DAVIE; NEURATH, 1955). Desta forma, o perfil cromatográfico, a pureza, massa molecular e a confirmação de cadeias confirmam a identidade de isoforma β -tripsina.

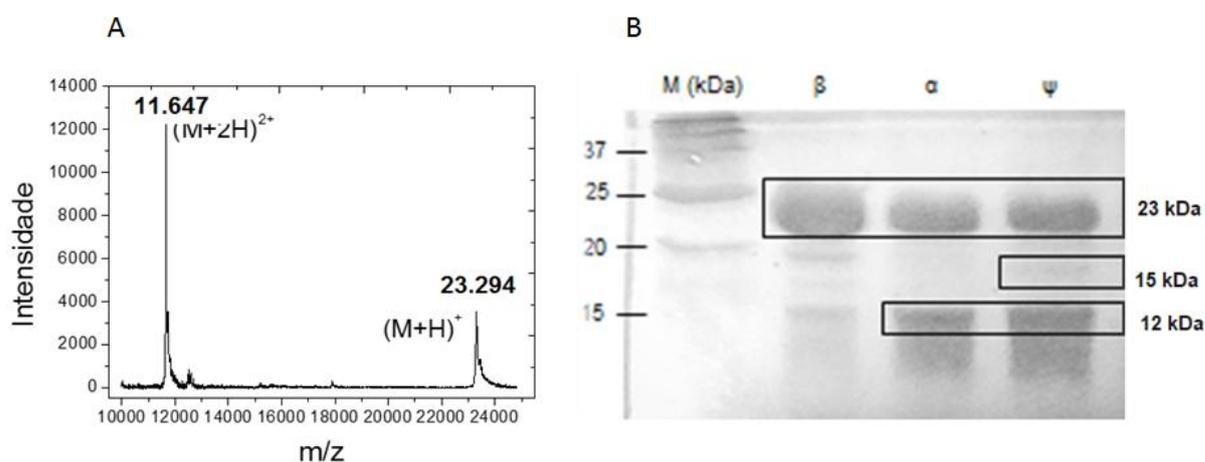


Figura 15. Determinação da pureza e das cadeias da isoforma β -tripsina por Espectrometria de massa (A) e SDS-PAGE 20% (B) a região número 1 tem massa aproximada de 23 kDa; A região número 2 tem massa aproximada de 15 kDa; e a região número 3 possui massa aproximada de 12 kDa.

4.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FORÇA IÔNICA SOBRE O pH E pK_a' DA SOLUÇÃO TAMPÃO

Estes experimentos foram realizados para certificar que o efeito da adição de sais sobre as propriedades físico-químicas e biológicas da enzima estariam relacionados tanto a interação dos íons com a superfície da proteína e com seu sítio de ligação a íons metálicos quanto com a interação entre íons e a camada de solvatação, descartando a possibilidade de os resultados deste trabalho serem provenientes da influência da modificação do pH e pK_a' do sistema tamponante em função da variação da força iônica (BEYNON; EASTERBY, 1996). Para este experimento em especial, o cloreto de cálcio foi usado como indutor de alteração na força iônica, pois este possui uma vasta literatura conhecida sobre o efeito deste sal sobre as propriedades químicas e biológicas desta enzima (BEYNON; EASTERBY, 1996; RECORD et al., 1998).

Como pode ser observado na Figura 16, a adição de 0,1 até 1,0 mol·L⁻¹ de CaCl₂ causou uma variação pouco significativa, tanto no pH quanto no pK_a' do tampão, pois nesta faixa de concentração iônica a variação máxima foi de 2,5% para o pH e de 3,4% para o pK_a' . Ou seja, a variação de pH entre a menor e a maior concentração de CaCl₂ (0,1 e 1,0 mol·L⁻¹) não ultrapassa 0,2 unidades de pH, estando os extremos de pH em 7,8 e 8,0. Esta pequena variação do pH é resultante

da insignificante variação do pK_a' e, desta maneira, podemos sugerir que a adição de concentrações crescentes de sal não causou alteração das propriedades tamponantes relacionadas a equação de Henderson-Hasselbalch. Portanto, o sistema contendo íon mantém a mesma faixa de pK_a' observada antes da adição dos íons. Vale ressaltar que a presença do íon no sistema pode causar a exclusão ou perturbação desta camada. Para valores de adição de cloreto de cálcio entre 0 a $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, consideramos que não houve mudança significativa tanto no pH quanto no pK_a . Portanto, considera-se que a adição de até $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de cloreto de cálcio a um tampão base de tris-HCL $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8,0, não causa variações significativas em relação ao pH e pK_a e assim as mudanças biológicas e estruturais serão relacionadas à interação dos íons com o sistema protéico e com a camada de solvatação.

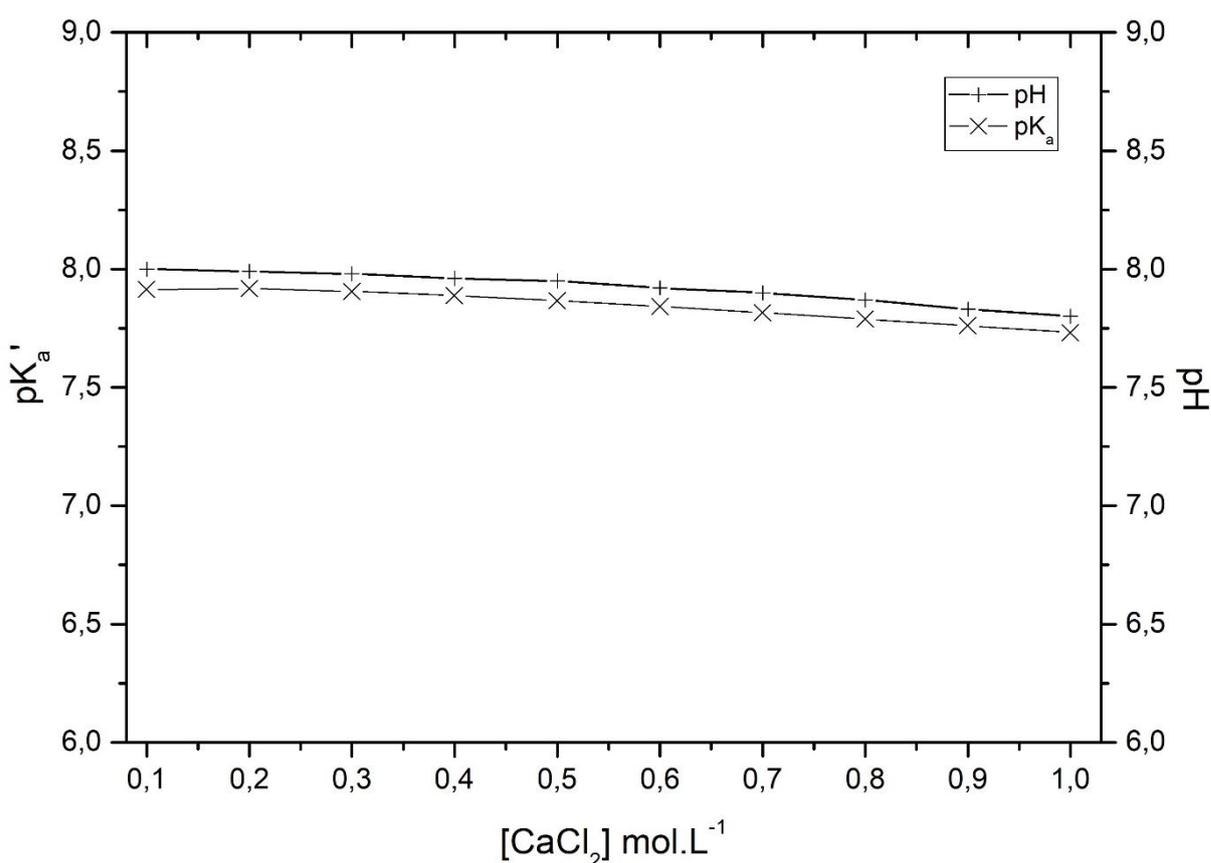


Figura 16. Avaliação da variação do pH e do pK_a' do tampão tris-HCl $50,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8,0 em função da adição de cloreto de cálcio. Os valores são expressos como média ($n=3$) e \pm desvio padrão. O pH foi medido experimentalmente através da utilização de pHmetro, já o pK_a' foi calculado através da equação de Debye-Hückel (2).

4.4. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CÁTIONS E ÂNIONS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ISOFORMA β -TRIPSINA BOVINA EM pH E TEMPERATURA ÓTIMA DA ENZIMA.

4.4.1. Efeito dos cátions sobre a atividade da enzima

O efeito do cátion cálcio sobre a atividade enzimática das isoformas de tripsina já é bem relatado (ABBOTT et al., 1975; BODE, W.; SCHWAGER, 1975; CHIANCONE et al., 1985; LACERDA et al., 2014), porém, para os demais íons de interesse deste estudo, as informações são pouco exploradas. Assim, foram realizados ensaios de atividade enzimática em função da concentração de vários pares iônicos da série de Hofmeister (HOFMEISTER, 1888). Na Figura 17 podem ser observadas cinco fases distribuídas da seguinte forma: fase I (0 a 5 mmol·L⁻¹), fase II (5 a 10 mmol·L⁻¹), fase III (10 a 20 mmol·L⁻¹), fase IV (20 a 100 mmol·L⁻¹) e fase V (100 a 1000 mmol·L⁻¹). Estas fases foram agrupadas em quatro comportamentos distintos: (i) uma taxa de crescimento elevada na fase I; (ii) uma velocidade de crescimento mais baixa nas fases II e III; (iii) manutenção do grau de a atividade biológica na fase IV; (iv) uma brusca queda na atividade da enzima na fase V. Apenas o íon KCl não apresenta o mesmo comportamento das fases.

Nas fases I e II, ocorre a formação específica de complexos enzima-cátion. Os cátions interagem com grupos carboxílicos livres (na faixa de pH analisada) estabilizando a estrutura terciária da enzima. Esse efeito de aumento de estabilização acarreta em um aumento gradual da atividade enzimática até 10 mmol·L⁻¹, que é estatisticamente igual 20 mmol·L⁻¹. Após 20 mmol·L⁻¹ esse efeito estabilizador atinge o seu máximo e entra na fase IV. Nesta fase, quando o sítio de ligação a cálcio está completamente ocupado, as interações entre enzima e metal são caotrópicas e o resultado é a desestabilização da proteína causada pelo excesso de ambos os íons Ca²⁺ e Cl⁻ em solução. Ocorre então uma desestruturação da proteína que progride à medida que a concentração de sal aumenta, resultando na diminuição da atividade amidásica. Efeitos semelhantes foram encontrados no trabalho de Bye e Falconer (2013) para a enzima lisozima. Na fase V, a queda observada na atividade reflete a agregação das proteínas pelo efeito de *salting out* (ARAKAWA; TIMASHEFF, 1984; BALDWIN, 1996).

Uma das sugestões que explicam o efeito do cálcio sobre a atividade da tripsina em meio alcalino é encontrada nos trabalhos de Lazdunski e Delaage (1965) e Nord e Bier (1953), em que os autores defendem que ocorre uma mudança conformacional provocada pela ligação o íon de cálcio com o sítio ativo de ligação a cálcio da enzima, tornando a proteína menos sensível à autólise, gerando uma molécula mais estável e compacta (BODE; SCHWAGER, 1975; CHIANCONE et al., 1985).

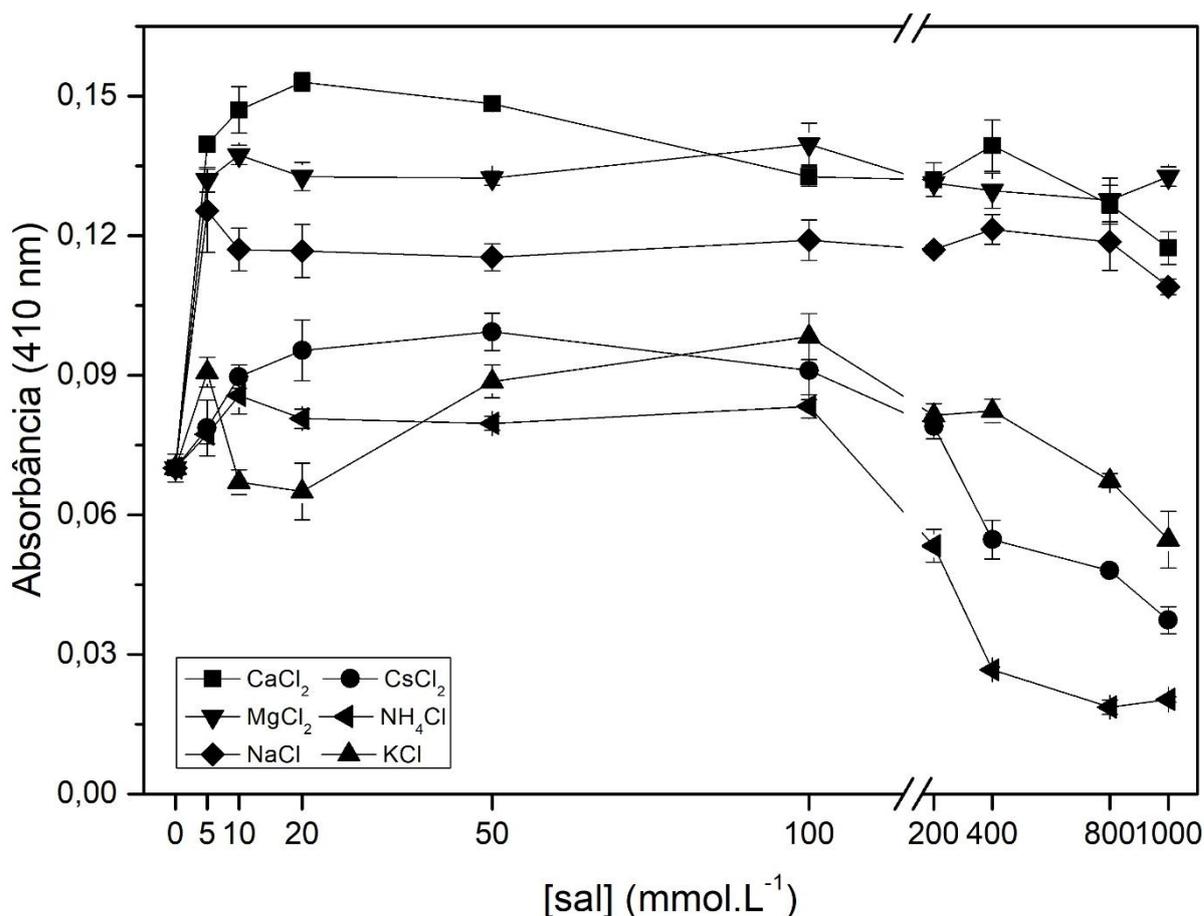


Figura 17. Atividade amidásica da isoforma β -tripsina em função de diferentes concentrações de sais (CaCl_2 , CsCl_2 , KCl , MgCl_2 , NaCl e NH_4Cl). Condições: tampão tris-HCl $50,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8,0, usando como substrato o BApNA. O cromóforo foi detectado a 410 nm. Os resultados estão expressos como média ($n=3$) \pm desvio padrão.

Como pode ser visto na Figura 17, o efeito estabilizante e desestabilizante dos sais é determinado pela concentração e pelo tipo de íon. Assim, césio, amônio e potássio parecem desestabilizar a tripsina, não se mostrando bons candidatos para estabilização da formulação enzimática.

4.4.2. Efeito dos ânions sobre a atividade da enzima

Na Figura 18, realizou-se o monitoramento da atividade enzimática em resposta ao aumento da concentração de ânions para os sais NaH_2PO_4 , NaI e Na_2SO_4 .

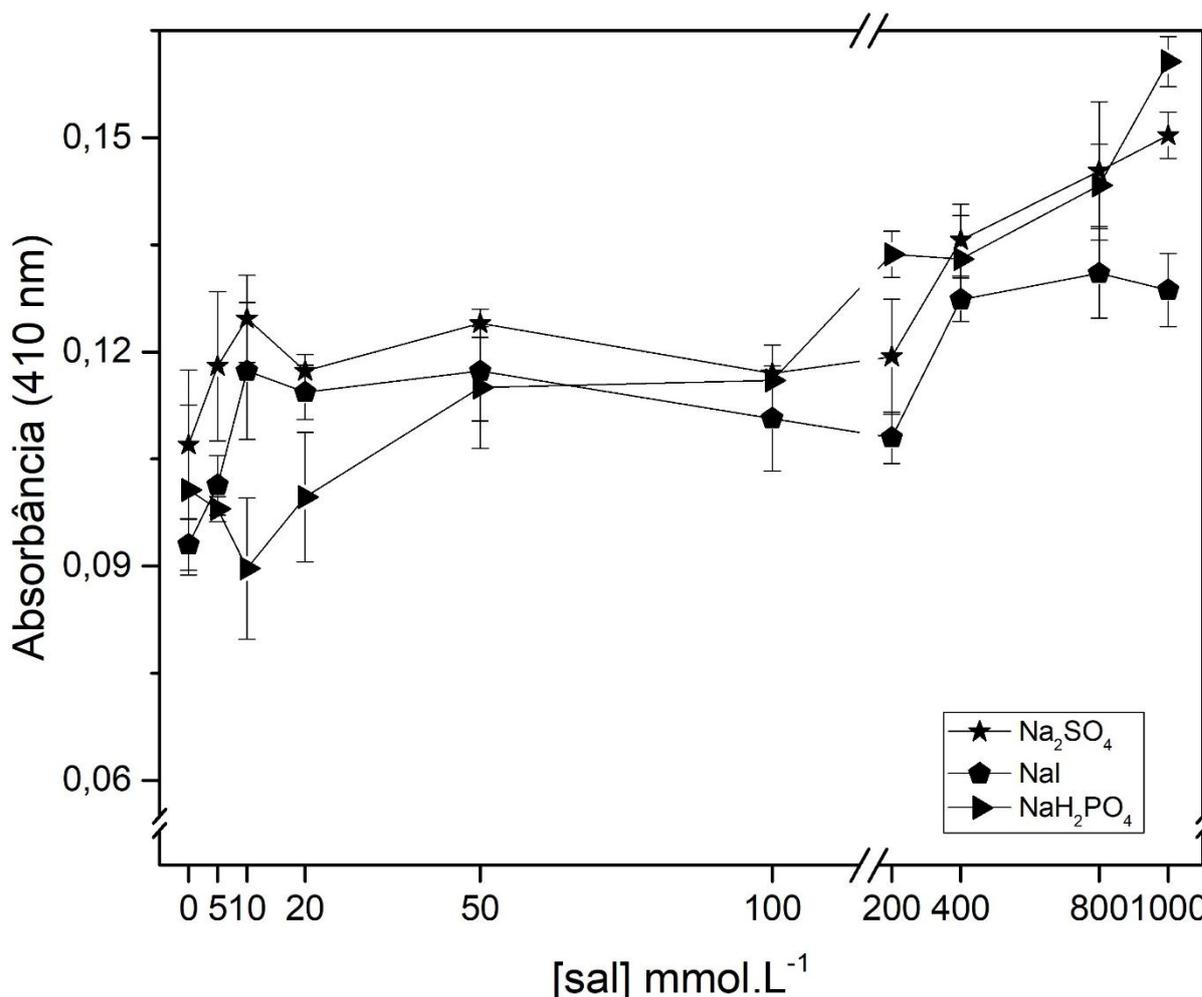


Figura 18. Atividade amidásica da isoforma β -tripsina em função de diferentes concentrações de ânions de variados sais (NaI , Na_2SO_4 e NaH_2PO_4). Condições: tampão tris-HCl $50,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8,0, usando como substrato o BApNA. O cromóforo foi detectado a 410 nm . Os resultados estão expressos como média ($n=3$) \pm desvio padrão.

Como pode ser visto na Figura 18, existem três regiões de mudanças de atividade. Porém, as diferenças de atividade entre as regiões 0 a 10, 10 a 100 e 100 a $1000 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ não foram estatisticamente significativas dentro de suas faixas e foram muito menores em comparação à série catiônica (Figura 17). Como a tripsina não possui sítio de ligação para ânions, não ocorre a interação dos ânions com os grupos carboxílicos livres, mas diretamente com a proteína e com a camada de solvatação. Como pode ser notado na figura 18, a atividade da enzima só apresenta

um aumento significativo a partir de $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Porém, esta concentração de íons é inviável para fins de desenvolvimento de detergentes.

Segundo a resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) a água doce destinada ao consumo humano possui valores máximos para a presença de cloreto ($7,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$); manganês ($1,8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), sulfatos ($2,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e amônia ($0,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), não apresentando limites para os outros íons presentes nesta dissertação (BRASIL, 2005). Essas concentrações estão na região de maior atividade amidásica nos experimentos (5 a $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) ou abaixo dela. Assim, os íons nas concentrações testadas e em relação às encontradas no destino final, não irão afetar significativamente a atividade da enzima.

4.5. ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DE FLUORESCÊNCIA DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS SOBRE E ENZIMAS EM MEIO ÁCIDO.

A análise de proteínas por espectroscopia de fluorescência é útil na investigação conformacional (estrutural), pois sua informação é relacionada às mudanças globais que uma molécula sofre quando submetida a condições físico-químicas diferentes. Assim, quando uma proteína em meio aquoso tem seu equilíbrio deslocado do sentido nativo (*N*) para o desnaturado (*D*), esta mudança pode ser monitorada por uma diminuição no comprimento de onda e na intensidade de emissão (LAKOWICZ, 2006).

A fim de entender o efeito dos íons sobre a estrutura protéica os ensaios foram realizados em pH 3,0, deste modo o sítio de ligação a cálcio das proteínas, que tem $pK_{aCa^{++}}$ de 3,2 (BODE, W.; SCHWAGER, 1975), está totalmente protonado, logo todas mudanças espectroscópicas observadas foram relacionadas ao sistema (proteína + água + íons) (ABITA; LAZDUNSKI, 1969; DELAAGE; LAZDUNSKI, 1967). Assim, como pode ser observado na Figura 19, de modo geral todos os íons selecionados provocam mudanças no sistema protéico e estas mudanças são íon específicas, ou seja, não dependem somente de concentração dos íons.

Como pode ser observado na figura 19, a comparação do efeito dos íons sobre a estrutura da enzima demonstra que, na faixa de 0 a 20 mmol·L⁻¹, os perfis de NaCl e CaCl₂ são similares e maiores que os efeitos do MgCl₂ sobre a enzima. Outro ponto a se destacar na Figura 19 é que as variações de comprimento de onda de emissão entre as concentrações testadas são pequenas, da ordem de no máximo 2 nm. Esta variação no comprimento de onda está relacionada a pequenos movimentos de ajuste conformacional provocados pela interação dos íons com a proteína, e não a um deslocamento de equilíbrio no sentido de aumento da população de moléculas no estado desnaturado. Para que o movimento conformacional resulte em mudanças espectroscópicas na isoforma β-tripsina, é necessário uma variação da ordem de 7 a 10 nm de acordo com os resultados obtidos por (ROSA et al., 2017) e expressos na Figura 19 quando se desnatura a β-tripsina utilizando etanol. Uma possível explicação para o pequeno efeito do Cloreto de Cálcio na β-tripsina pode ser visualizada no experimento realizado por Buono e colaboradores (1994). Este estudo revelou que em pD 5,0 a enzima inibida não apresentava nenhuma modificação conformacional significativa perceptível por Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), tanto na presença quanto na ausência de cálcio, sugerindo então que o efeito de inibir a autólise poderia ser originado de fatores eletrostáticos. Baseado neste artigo, pode-se especular que em pH 3,0 as modificações conformacionais sejam maiores do que as observadas em pD 5,0, porém ainda pequenas em relação às promovidas em pH 8,0. Podemos assim supor que o efeito do CaCl₂ seria devido a variação na força iônica da solução e a ligação ao sítio de cálcio quando o mesmo está desprotonado.

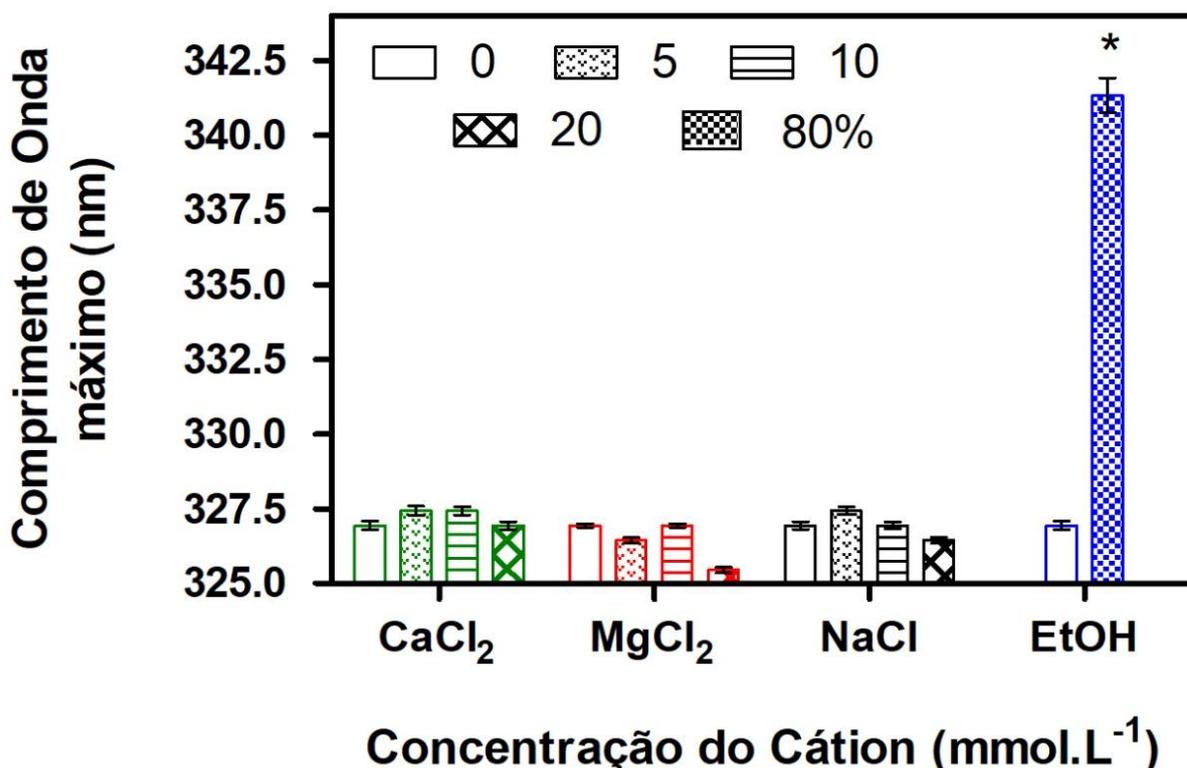


Figura 19. Espectroscopia de fluorescência de β -tripsina em função da concentração de CaCl_2 , MgCl_2 e NaCl . O espectro de emissão de fluorescência intrínseca de triptofano foi medida pela excitação em 280 nm de β -tripsina $0.01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em tampão glicina $80 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 3. Os resultados estão expressos como média ($n=3$) \pm desvio padrão.

Assim, como a mudança nos estados conformacionais é muito pequena e como nossos dados sobre informação conformacional foram obtidos indiretamente, eles não nos forneceram a visão completa do sistema. Portanto, eles são apenas uma face da moeda, ou seja, a informação estrutural, porém, para o entendimento completo do sistema, é necessária a informação do comportamento termodinâmico da proteína sobre a ação dos íons.

4.6. ESTUDO DA ESTABILIDADE TERMODINÂMICA DA ISOFORMA β -TRIPSINA EM pH 3,0 EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS CLORETO DE CÁLCIO MONITORADO POR MICROCALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA.

A estabilidade termodinâmica de uma molécula em um sistema pode ser medida através de calorimetria diferencial de varredura (DSC). Os resultados obtidos através desta técnica são a expressão mais aproximadas das mudanças impostas ao

componente polimérico em determinadas condições físico-químicas. Este equipamento foi usado no intuito de captar as diminutas (microcalorimétricas) mudanças energéticas conformacionais que a adição dos íons cálcio e cloreto provocam à enzima β -tripsina.

Com base nas informações contidas na tabela 1, pode-se observar que a variação de T_m da β -tripsina é de 0,51 K entre 0 e 10 mmol·L⁻¹ de CaCl₂ e de 0,83 K entre 20 e 50 mmol·L⁻¹. Este resultado demonstra que na faixa de concentração de 20 a 50 mmol·L⁻¹, o cloreto de cálcio tem uma influência desestabilizadora maior sobre o T_m do que a faixa de concentração anterior. Uma possível explicação para este resultado está relacionada à teoria da série de Hofmeister (Figura 9) para mecanismos de estabilização de proteínas, pois os íons Ca²⁺ e Cl⁻ são caotrópicos e, desta forma, tendem a desestabilizar a proteína diretamente e ainda desestabilizar a camada de solvatação protéica, mudando suas interações intermoleculares na proteína, que se tornam mais fracas (HRIBAR et al., 2002).

Tabela 1. Parâmetros termodinâmicos da β -tripsina em função da concentração de CaCl₂, em pH 3,0.

CaCl ₂ (mmol·L ⁻¹)	T_m ¹ (K)	ΔH_{vH} ² (kcal·mol ⁻¹ UC)	ΔH_{cal} ³ (kcal·mol ⁻¹)	ΔS_{Tm} ⁴ (kcal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	IC ⁵ (K ⁻¹)
0	327.67 ± 0.1	68,90	99.22 ± 0.13	0.302 ± 0.01	1,45
5	327.47 ± 0.1	82,95	99.11 ± 0.11	0.302 ± 0.01	1,21
10	327.16 ± 0.1	83,64	98.69 ± 0.12	0.301 ± 0.01	1,20
20	326.77 ± 0.1	86,62	97.88 ± 0.23	0.299 ± 0.01	1,15
50	325.94 ± 0.1	76,05	95.82 ± 0.22	0.293 ± 0.01	1,31

¹Temperatura em que 50% das moléculas estão no estado desnaturado.

²Descreve a dependência da constante de equilíbrio (K) em função da temperatura.

³É a mudança de entalpia que o sistema consome ou libera para que a transição ocorra.

⁴Variação da entropia no T_m .

⁵Índice de cooperatividade.

Além do efeito direto de desestabilização sobre a molécula, os íons também deslocam o equilíbrio químico para o sentido do aumento da população de moléculas no estado desnaturado. Este efeito pode ser notado quando se observa na tabela 1 a diminuição progressiva do ΔH_{cal} relacionado à quantidade de energia necessária para desnaturar a proteína. Estes valores ΔH_{cal} são relacionados ao

número de moléculas capazes de sofrerem uma mudança conformacional do estado nativo para o estado desnaturado da proteína. Assim, quanto menor o valor de ΔH_{cal} , menor a fração de moléculas no estado nativo. A diferença de valores de ΔH_{cal} entre 0 e 50 mmol·L⁻¹ de CaCl₂ é pequena, porém significativa. A associação desta variação com a termodinâmica populacional do sistema nos permite diferenciar as modificações ocorridas na fluorescência (modificações conformacionais) e na atividade da enzima (modificações na atividade biológica) na presença de sais.

Durante as mudanças conformacionais induzidas pela adição dos sais o ajuste da estrutura da água na concha de solvatação ocasiona compensações entrópico-entálpicas, e estas podem ser usadas como indicativo de qual seria o tipo de contribuição que favorece a mudança no sistema induzido pelos sais (LIU; YANG; GUO, 2000). Assim, como pode ser visto na Figura 20, a adição de íons cloreto e cálcio à enzima em meio ácido não ocasiona uma compensação entrópico-entálpica, pois ambas seguiram uma mesma tendência. Deste modo, nossos resultados se encaixam em um modelo de comportamento termodinâmico, onde capacidade calorífica e o índice de cooperatividade são os fatores efetivos da desestabilização da proteína (IKEGAMI, 1981). Analisando nossos resultados de ΔH_{vH} (descreve a dependência da constante de equilíbrio [K] em função da temperatura) e IC (índice de cooperatividade) sob este panorama termodinâmico, os mesmos sugerem que os íons cloreto e cálcio interagem com as unidades cooperativas do sistema protéico, diminuindo o índice de cooperatividade e aumentando o ΔH_{vH} durante desnaturação protéica até o valor de 20 mmol·L⁻¹ como pode ser observado na Tabela 1. Este resultado indica a ocorrência de modificações energéticas conformacionais nos domínios estruturais que acarretam na diminuição da interação entre os resíduos de aminoácidos e na interação entre os dois domínios, tornando a estrutura mais frouxa quando ela ainda está no estado nativo.

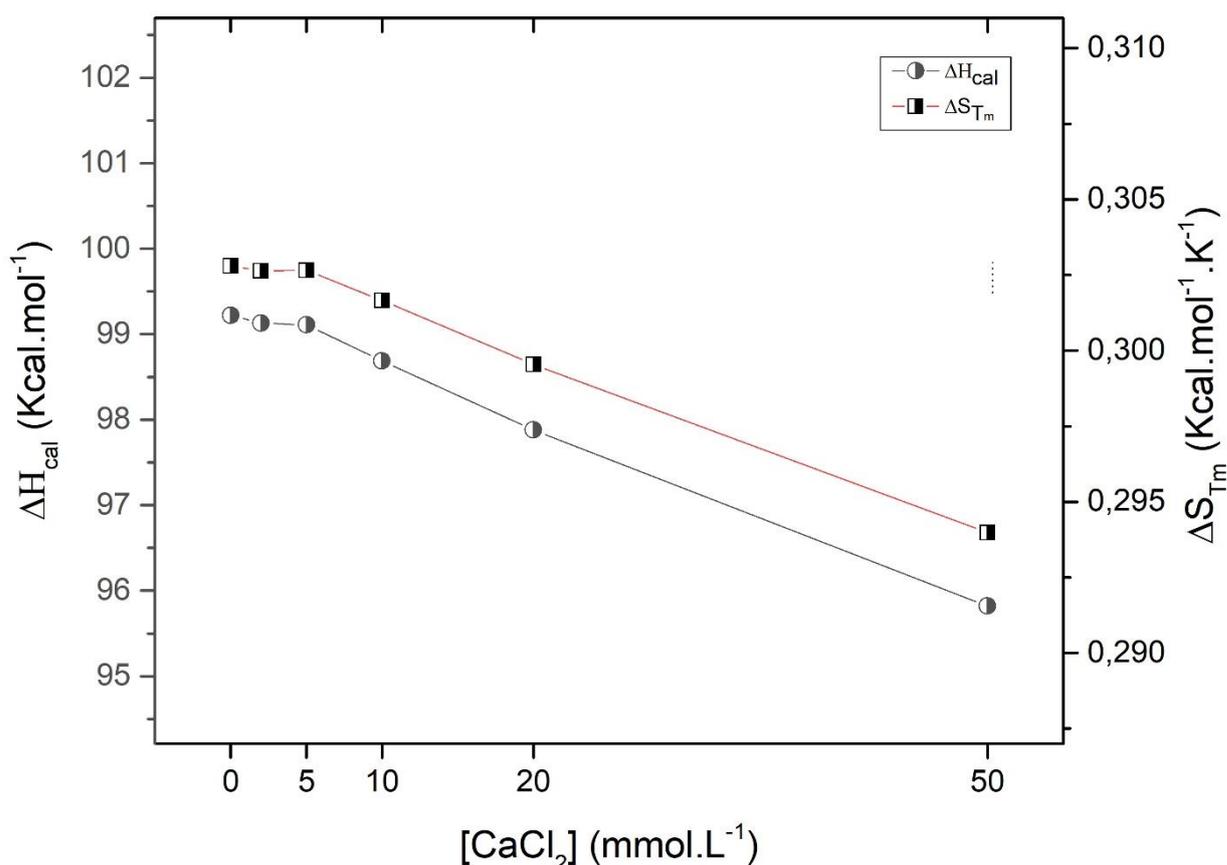


Figura 20. Compensação entrópica-entálpica do sistema de desnaturação de β -tripsina em meio ácido sob ação de cloreto de cálcio. Variação de ΔS_{T_m} e ΔH_{cal} de β -tripsina em tampão 50,0 mmol.L⁻¹ Glicina pH 3,0 em função da concentração de Cloreto de Cálcio.

As análises de nossos resultados demonstraram ainda que a população de moléculas desnaturadas apresentou características semelhantes em relação a capacidade calorífica (C_p) para todas as concentrações de sais testadas. Assim, assume-se que o fator preponderante para a diminuição do ΔH_{cal} e ΔS_{T_m} (variação da entropia no T_m), com consequente diminuição de T_m das proteínas, está na capacidade calorífica e este parâmetro está relacionado à dinâmica de movimentação da camada de solvente na superfície da proteína. Desta maneira, sob o ponto de vista termodinâmico, os íons cloreto e cálcio adicionados ao meio ácido atuam diretamente na proteína ou na concha de solvatação, interferindo na exposição de resíduos hidrofóbicos na superfície da proteína nativa (LOLADZE; ERMOLENKO; MAKHATADZE, 2001) e assim na variação da capacidade calorífica durante a desnaturação térmica. Com isto, T_m , ΔH_{cal} e ΔS_{T_m} têm seus valores nominais diminutivos sincronicamente até 20 mmol.L⁻¹.

Apesar de não ter obrigação de explicar, os fenômenos biológicos e os resultados espectroscópicos, os resultados termodinâmicos nos fornecem uma visão sobre o sistema energético completo, sugerindo e permitindo fazer previsões termodinâmicas acerca das mudanças estruturais e biológicas induzidas pelos íons. Estas previsões podem ser confirmadas usando termodinâmica estatística associados a nossos resultados e assim um panorama termodinâmico pode ser visto na figura 21. Sob o ponto de vista da termodinâmica estatística, levando em conta o princípio ergódico, que salienta que “o comportamento médio de curta duração de uma grande coleção de identidades idênticas, presume-se que as partículas sejam idênticas ao comportamento médio de longa duração de uma partícula única sob determinadas condições”. Portanto, a análise da figura 21 demonstra que a interação dos íons sobre um sistema “X” atua por dois mecanismos: afrouxando a estrutura, aumentando seu raio e na mudança da dinâmica das moléculas de água na camada de solvatação, ficando está com menor espessura e com menor velocidade na superfície da proteína (reação 8 da figura 21). Porém, estas mudanças (reação 8 da figura 21) não são suficientes a ponto de a enzima perder atividade biológica. Os estados desnaturados com a influência do sal (sistema “Y”) ou sem (sistema “W”) possuem propriedades termodinâmicas semelhantes, assim podemos chegar às seguintes conclusões acerca do sistema termodinâmico:

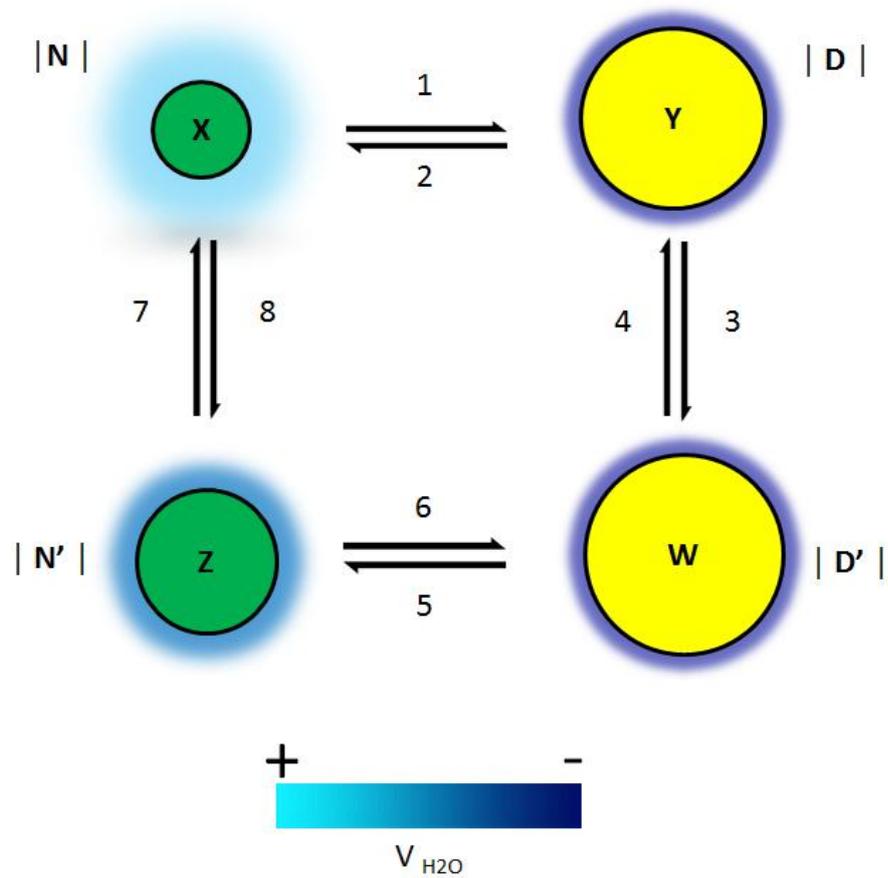


Figura 21. Panorama termodinâmico da interação dos íons sobre o sistema protéico. Onde **D** é a fração (Y) de proteínas desnaturada; **D'** é fração (W) de proteínas no estado desnaturado com adição de $CaCl_2$; **N** é a fração (X) de proteínas no estado nativo; **N'** é a fração (Z) de proteínas no estado nativo com adição de $CaCl_2$. As áreas sombreadas em cor azul em volta das circunferências são uma representação da semiquantitativa do raio da camada de solvatação. O gradiente V_{H_2O} é a velocidade das moléculas de H_2O na superfície da proteína.

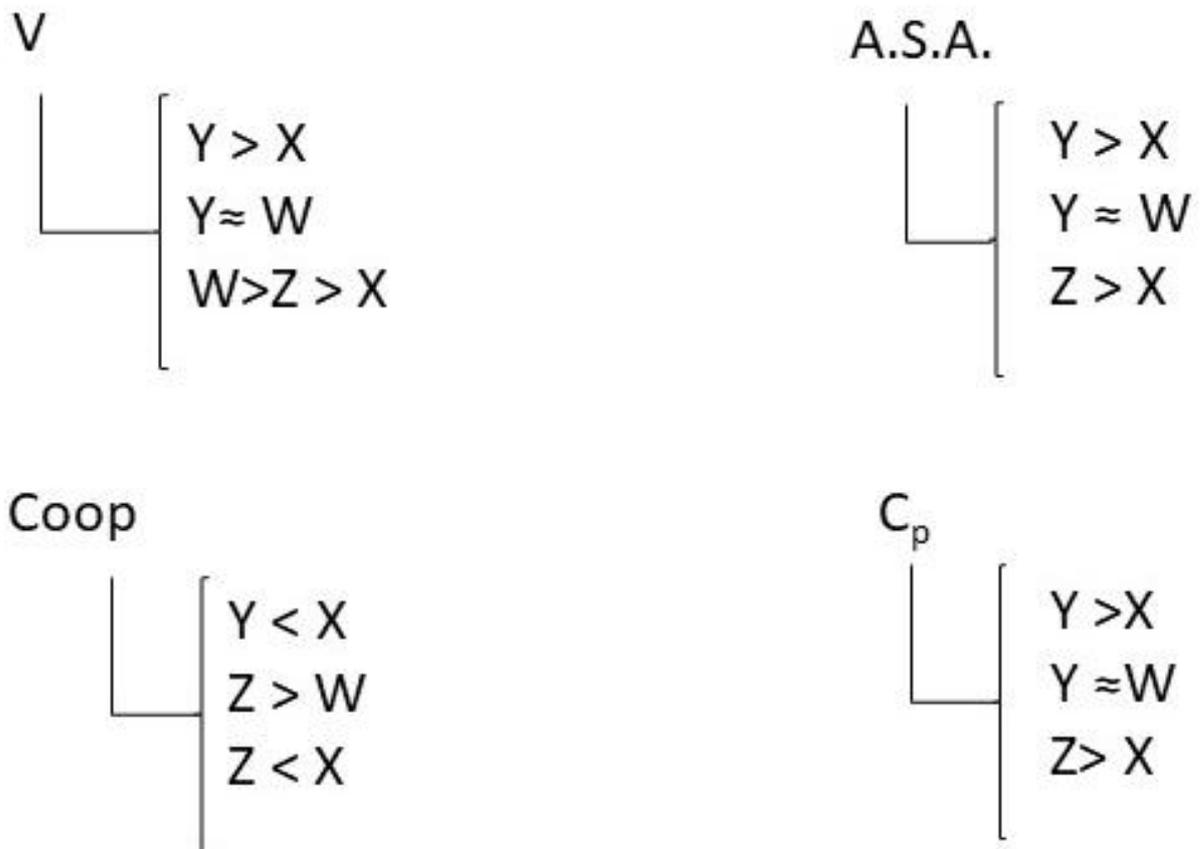


Figura 22. Diagrama de propriedades termodinâmicas comparando quatro populações termodinâmicas extraídas da figura 21 e dos dados calorimétricos. **V** é volume hidrodinâmico ou raio da proteína hidratada; **ASA** é a medida da exposição de resíduos hidrofóbicos na superfície da proteína; **Coop** é índice de cooperatividade durante a desnaturação térmica; **C_p** é a capacidade calorífica da molécula em determinado estado; **X** é um sistema protéico constituído por uma população de proteínas no estado nativo; **Y** é um sistema protéico constituído por uma população de proteínas no estado desnaturado com influência de sais e **W** é um sistema protéico constituído por uma população de proteínas no estado desnaturado sem influência de sais e **Z** é um sistema protéico constituído por uma população de proteína no estado nativo com influência de sais.

Assim, a partir destas análises e das equações abaixo, podemos sugerir que a principal mudança ocorrida sob a ação dos sais no sistema, sob o ponto de vista termodinâmico, é a diminuição da variação da capacidade calorífica e este efeito pode ser notado na reação 6 da figura 21.

Da figura 21 e dos dados termodinâmicos podemos dizer que:

$$\Delta H = \int_{t_1}^t C_p x \Delta T \therefore C_p = \frac{\Delta H_{cal}}{\Delta T} \therefore \frac{\Delta H_{cal}}{T_f - T_i} \quad (4)$$

Onde T_f é a temperatura final de transição térmica e T_i a temperatura inicial da transição.

Da figura 21 e dos dados termodinâmicos podemos dizer que:

$$\Delta T_{(6)} > \Delta T_{(1)} \therefore \Delta C_p = \frac{\Delta H_{cal}}{\Delta T} \therefore \frac{\Delta H_{cal}}{T_f - T_i} \quad (5)$$

Onde (6) e (1) são reações indicadas pelas setas na figura 16.

Como o C_{pD} do |Y| e |W| são similares, então o C_{pN} do |Z| é menor do que o C_{pN} do |X|.

5. CONCLUSÃO

O estudo da influência dos sais na atividade de uma enzima que atuam em sistemas detergentes é de alta importância, pois a escolha do meio primário de estabilização da mesma, quer seja em meio líquido ou sólido, depende de vários parâmetros físico-químicos. Além disto, poucos são os estudos que se destinam a investigar a interação entre os parâmetros biológicos, conformacionais e energéticos de uma molécula, quer seja pela dificuldade de obtenção ou mesmo pela dificuldade de manipulação matemática dos dados. Nossos resultados são a primeira fase para o entendimento da dinâmica da enzima β -tripsina atuando em um sistema detergente na fase líquida, onde a enzima pode encontrar na água de torneira uma quantidade de íons que podem estabilizar ou desestabilizar a mesma. Ainda, o projeto leva em consideração a inclusão de íons na formulação para garantir a que a autólise não ocorra durante o tempo de armazenamento. Os resultados deste projeto foram importantes tanto para a análise da formulação de detergentes como para pesquisa na área básica de físico-química de tripsina.

Em relação a atividade biológica, ficou demonstrado que as concentrações tradicionalmente usadas (BIER; NORD, 1951; BUONO et al., 1994; GORINI, 1951; NORD; BIER, 1953) de $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de CaCl_2 são maiores que a necessidade real *in vitro* que a enzima necessita para que o sítio de ligação a cálcio esteja preenchido e assim a enzima fique mais estável e resistente à autólise em meio alcalino. Portanto, uma concentração de $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pode ser usada para alcançar os resultados biológicos semelhantes ao que se encontra em $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Em relação a investigação do efeito do íon metálico cálcio sob a conformação global da enzima, foi demonstrado por espectroscopia de fluorescência que os cátions e ânions testados na faixa de 0 a $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ não interferem significativamente na conformação global da proteína, quando o sítio de ligação a cálcio está protonado. Assim, a adição de sais até a concentração de $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ provoca pequenas alterações conformacionais ou ajustes na estrutura que não induzem deslocamento de equilíbrio para um aumento da fração de estados desnaturados.

Sob o ponto de vista termodinâmico, fomos capazes de corroborar os resultados obtidos pela atividade biológica testada neste projeto e confirmar que concentrações maiores que $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ alteram significativamente o sistema. Além disso, nossos resultados foram suficientes para criar um panorama termodinâmico onde as funções IC e C_p foram demonstradas ser os principais fatores influenciados pela adição de íons.

Para fins práticos na determinação da formulação de um detergente usando β -tripsina em meio líquido, o nosso trabalho através dos resultados biológicos, químicos e físicos foram capazes de determinar as concentrações destes sais que a enzima suporta sem afetar sua atividade. Os resultados conformacionais e termodinâmicos nos deram suporte para desenvolvimento de formulações líquidas mais estáveis que possam manter a enzima ativa por anos. Estas previsões podem ser feitas, pois as concentrações destes sais na água de torneira são muito menores que a testada neste projeto.

6. REFERÊNCIAS

ABBOTT, Floyd et al. Location of the Calcium Ion Binding Site in Bovine α -Trypsin and β -Trypsin using Lanthanide Ion Probes. **Biochemistry**, v. 14, n. 22, p. 4935–4943, 1975.

ABITA, J. P.; LAZDUNSKI, M. On the structural and functional role of carboxylates in chymotrypsinogen A a comparison with chymotrypsin, trypsinogen and trypsin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 35, n. 5, p. 707–712, 1969.

ARAKAWA, Tsutomu; TIMASHEFF, Serge N. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. **Biochemistry**, v. 23, n. 25, p. 5912–5923, 1984.

ASCENZI, P. et al. Steady-state and pre-steady-state kinetics of the trypsin-catalysed hydrolysis of α -CBZ-l-lysine-p-nitrophenyl ester. **BBA - Enzymology**, v. 658, n. 1, p. 158–164, 1981.

BALDWIN, Robert L. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. **Biophysical journal**, v. 71, n. 4, p. 2056–2063, 1 out. 1996.

BALL, Philip. Water as an Active Constituent in Cell Biology. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 1, p. 74–108, 2008.

BEYNON, R. J.; EASTERBY, J. S. **Buffer solutions**. [S.I.]: IRL Press at Oxford University Press, 1996.

BIER, M.; NORD, F. F. On the mechanism of enzyme action. XLVI. The effect of certain ions on crystalline trypsin and reinvestigation of its isoelectric point. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 33, n. 2, p. 320–332, 1 set. 1951.

BODE, W.; SCHWAGER, P. The single calcium-binding site of crystalline bovine β -trypsin. **FEBS Letters**, v. 56, n. 1, p. 139–143, 1975.

BODE, Wolfram et al. Refined 2 Å X-ray crystal structure of porcine pancreatic kallikrein A, a specific trypsin-like serine proteinase. Crystallization, structure determination, crystallographic refinement, structure and its comparison with bovine trypsin. **Journal of Molecular Biology**, v. 164, n. 2, p. 237–282, 1983.

BODE, Wolfram; FEHLHAMMER, Heinz; HUBER, Robert. Crystal structure of bovine trypsinogen at 1.8 Å resolution. I. Data collection, application of Patterson search techniques and preliminary structural interpretation. **Journal of Molecular Biology**, v. 106, n. 2, p. 325–335, 1976.

BODE, Wolfram; SCHWAGER, Peter; HUBER, Robert. The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. The refined crystal structures of the bovine trypsinogen-pancreatic trypsin inhibitor complex and of its ternary complex with Ile-Val at 1.9 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 118, n. 1, p. 99–112, 1978.

BUONO, R. A. et al. Infrared spectroscopic studies of calcium binding to inhibited β -trypsins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular**, v. 1204, n. 1, p. 124–128, 1994.

BYE, Jordan W.; FALCONER, Robert J. Thermal stability of lysozyme as a function of ion concentration: A reappraisal of the relationship between the Hofmeister series and protein stability. **Protein Science**, v. 22, n. 11, p. 1563–1570, 2013.

CHIANCONE, Emilia et al. Dynamic and structural properties of the calcium binding site of bovine serine proteases and their zymogens. A multinuclear nuclear magnetic resonance and stopped-flow study. **Journal of Molecular Biology**, v. 185, n. 1, p. 201–207, 1985.

COLLINS, K.D. Ion hydration: Implications for cellular function, polyelectrolytes, and protein crystallization. **Biophysical Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 271–281, 2006.

COLLINS, K D. Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. **Biophysical Journal**, v. 72, n. 1, p. 65–76, 1997.

COLLINS, Kim D.; WASHABAUGH, Michael W. The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 18, n. 4, p. 323–422, 1985.

DAVIE, Earl W; NEURATH, Hans. IDENTIFICATION OF A PEPTIDE RELEASED DURING AUTOCATALYTIC ACTIVATION OF TRYPSINOGEN*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 212, n. 2, p. 515–530, 1955.

DELAAGE, M.; LAZDUNSKI, M. The binding of Ca²⁺ to trypsinogen and its relation to the mechanism of activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 28, n. 3, p. 390–394, 1967.

ERLANGER, Bernard F; KOKOWSKY, Nicholas; COHEN, William. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, n. 2, p. 271–278, 1961.

FOUCAULT, G. et al. Comparative study of some conformational properties of α , β and ψ bovine trypsins. **Biochimie**, v. 56, n. 10, p. 1343–1350, 1975.

FOUCAULT, Georges; SEYDOUX, François; YON, Jeannine. Comparative Kinetic Properties of α , β and Ψ Forms of Trypsin. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 295–302, 1 set. 1974. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03693.x>>. Acesso em: 16 maio 2020.

FREIRE, Ernesto et al. The molecular basis of cooperativity in protein folding. Thermodynamic dissection of interdomain interactions in phosphoglycerate kinase. **Biochemistry**, v. 31, n. 1, p. 250–256, 14 jan. 1992. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bi00116a034>>. Acesso em: 16 maio 2020.

GORINI, L. Calcium role in trypsin-serum albumin system. **Biochimica et biophysica acta**, v. 7, n. 2, p. 318, 1951.

GUPTA, R.; BEG, Q.; LORENZ, P. **Bacterial alkaline proteases: Molecular**

approaches and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology. [S.l: s.n.], 2002

HEMMINGER, W; SARGE, S M. Chapter 1 - Definitions, Nomenclature, Terms and Literature. In: BROWN, Michael E B T - Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry (Org.). . **Princ. Pract.** [S.l.]: Elsevier Science B.V., 1998. v. 1. p. 1–73. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1573437498800046>>. Acesso em: 21 maio 2020.

HERBOTS, Ivan et al. Enzymes, 4. Non-food Application. **Ullmann's Encycl. Ind. Chem.** Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008. . Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.m09_m03>. Acesso em: 7 jun. 2020.

HOFMEISTER, Franz. Zur lehre von der wirkung der salze. **Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 25, n. 1, p. 1–30, 1 ago. 1888.

HRIBAR, Barbara et al. How ions affect the structure of water. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 41, p. 12302–12311, 2002.

HÜNEMBERG, P.; REIF, M. **Single-ion Solvation: Experimental and Theoretical Approaches to Elusive Thermodynamic Quantities.** Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2011.

IKEGAMI, Akira. Statistical thermodynamics of proteins and protein denaturation. **Adv. Chem. Phys**, v. 46, p. 363–413, 1981.

KEIL, B. P. Trypsin. In: BOYER, P. D. (Org.). . **Enzym.** 3rd. ed. New York: Academic Press, 1971. p. 249–275.

KUMAR, Awanish; VENKATESU, Pannuru. **Overview of the stability of α -chymotrypsin in different solvent media.** **Chemical Reviews.** [S.l.]: American Chemical Society. , 11 jul. 2012

KUNZ, Werner. Specific ion effects in colloidal and biological systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, n. 1, p. 34–39, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029409001083>>. Acesso em: 21 maio 2020.

LACERDA, Caroline Dutra et al. Gamma trypsin: Purification and physicochemical characterization of a novel bovine trypsin isoform. **International journal of biological macromolecules**, v. 70, p. 179–186, 1 set. 2014.

LAEMMLI, U K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/227680a0>>. Acesso em: 21 maio 2020.

LAKOWICZ, J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy: Springer Science. **New York**, p. 158–204, 2006.

LAZDUNSKI, Michel; DELAAGE, Michel. On the morphology of porcine and bovine

trypsins. Study of reversible denaturations. **Biochimica et biophysica acta**, v. 105, p. 541–561, 1965.

LEHNINGER, A.L; DAVID, N.L; COX, M.M. **Lehninger: Principios de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

LESK, Arthur M.; FORDHAM, William D. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. **Journal of Molecular Biology**, v. 258, n. 3, p. 501–537, 1996.

LIN, I-Chun et al. Importance of van der Waals Interactions in Liquid Water. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 4, p. 1127–1131, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jp806376e>>. Acesso em: 15 maio 2020.

LIU, Lei; YANG, Chao; GUO, Qing-Xiang. A study on the enthalpy–entropy compensation in protein unfolding. **Biophysical chemistry**, v. 84, n. 3, p. 239–251, 2000.

LO NOSTRO, Pierandrea et al. Hofmeister effects in supramolecular and biological systems. **Biophysical Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 208–213, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301462206001190>>. Acesso em: 21 maio 2020.

LO NOSTRO, Pierandrea; NINHAM, Barry W. Hofmeister Phenomena: An Update on Ion Specificity in Biology. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 4, p. 2286–2322, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/cr200271j>>. Acesso em: 21 maio 2020.

LOLADZE, Vakhtang V; ERMOLENKO, Dmitri N; MAKHATADZE, George I. Heat capacity changes upon burial of polar and nonpolar groups in proteins. **Protein Science**, v. 10, n. 7, p. 1343–1352, 2001.

LYKLEMA, Johannes. Simple Hofmeister series. **Chemical Physics Letters**, v. 467, n. 4, p. 217–222, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009261408015078>>.

MAURER, Karl Heinz. **Detergent proteases. Current Opinion in Biotechnology**. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166904000849>>. Acesso em: 7 jun. 2020. , ago. 2004

MEKKES, Jan R. et al. Efficient debridement of necrotic wounds using proteolytic enzymes derived from Antarctic krill: a double-blind, placebo-controlled study in a standardized animal wound model. **Wound Repair and Regeneration**, v. 6, n. 1, p. 50–57, 1998. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1524-475X.1998.60108.x>>. Acesso em: 7 jun. 2020.

MIKEŠ, O. et al. Covalent structure of bovine trypsinogen. The position of the remaining amides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 24, n. 3, p. 346–352, 1966.

MURRAY, Robert K; DAVIS, Joe C. **Harper's Illustrated Biochemistry 30th Edition**. [S.l.]: McGraw-Hill Education, 2014. v. 30. Disponível em:

<<http://www.mhprofessional.com/product.php?cat=39&isbn=0071625917>>. Acesso em: 7 jun. 2020.

NISHIMURA, Jonathan S et al. The Stimulatory Effects of Hofmeister Ions on the Activities of Neuronal Nitric-oxide Synthase: APPARENT SUBSTRATE INHIBITION BY L-ARGININE IS OVERCOME IN THE PRESENCE OF PROTEIN-DESTABILIZING AGENTS . **Journal of Biological Chemistry** , 10.1074/jbc.274.9.5399, v. 274, n. 9, p. 5399–5406, 1999. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/274/9/5399.abstract>>. Acesso em: 21 maio 2020.

NORD, F. F.; BIER, M. On the mechanism of enzyme action. LV. A study of the interaction between calcium and trypsin. **BBA - Biochimica et Biophysica Acta**, v. 12, n. 1–2, p. 56–67, 1953. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13115413>>. Acesso em: 3 mar. 2020.

PERKINS, Stephen J.; WÜTHRICH, Kurt. Conformational transition from trypsinogen to trypsin. 1H nuclear magnetic resonance at 360 MHz and ring current calculations. **Journal of Molecular Biology**, v. 138, n. 1, p. 43–64, 25 mar. 1980. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283680800040>>. Acesso em: 7 jun. 2020.

PRIVALOV, Peter L.; POTEKHIN, Sergey A. [2]Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. **Methods in Enzymology**, v. 131, n. C, p. 4–51, 1986.

RADHAKRISHNAN, T M; WALSH, Kenneth A; NEURATH, Hans. Promotion of activation of bovine trypsinogen by specific modification of aspartyl residues. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4020–4027, 1969.

RECORD JR, M Thomas et al. Analysis of effects of salts and uncharged solutes on protein and nucleic acid equilibria and processes: a practical guide to recognizing and interpreting polyelectrolyte effects, Hofmeister effects, and osmotic effects of salts. **Advances in protein chemistry**, v. 51, p. 281, 1998.

REICHARDT, C.; VELTON, T. **Solvents and solvent effects in organic chemistry**. 4th. ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, 2011.

ROBINSON, Neal C.; NEURATH, Hans; WALSH, Kenneth A. The Relation of the α -Amino Group of Trypsin to Enzyme Function and Zymogen Activation. **Biochemistry**, v. 12, n. 3, p. 420–426, 1973.

ROSA, Dayanne Pinho et al. Determination of structural and thermodynamic parameters of bovine α -trypsin isoform in aqueous-organic media. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 408–416, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017300144>>. Acesso em: 21 maio 2020.

SANTOS, A. M. C.; OLIVEIRA, Jamil Silvano de; et al. Improved purification process of β - and α -trypsin isoforms by ion-exchange chromatography. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 4, ago. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132008000400009&lng=en&tling=en>. Acesso em: 3 jun. 2020.

SANTOS, A. M.C.; SANTANA, M. A.; et al. Physical-chemical characterization and stability study of α -trypsin at pH 3.0 by differential scanning calorimetry. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 3, p. 278–284, 2008.

SCHROEDER, Duane D; SHAW, Elliott. Chromatography of Trypsin and Its Derivatives: CHARACTERIZATION OF A NEW ACTIVE FORM OF BOVINE TRYPSIN . **Journal of Biological Chemistry** , v. 243, n. 11, p. 2943–2949, 10 jun. 1968. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/243/11/2943.abstract>>. Acesso em: 7 jun. 2020.

SEDMAN, J. James; GROSSBERG, Sidney E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. **Analytical Biochemistry**, v. 79, n. 1–2, p. 544–552, 1 maio 1977.

SIMPSON, B. K.; HAARD, N. F. Purification and characterization of trypsin from the Greenland cod (*Gadus ogac*). 1. Kinetic and thermodynamic characteristics. **Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 62, n. 9, p. 894–900, 1 set. 1984. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/o84-114>>. Acesso em: 7 jun. 2020.

SMITH, R L; SHAW, E. Pseudotrypsin. A modified bovine trypsin produced by limited autodigestion. **The Journal of biological chemistry**, v. 244, n. 17, p. 4704, 1969.

STROUD, R. M.; KAY, L. M.; DICKERSON, R/ E. Cold Sprins Harbor Sumv. &ant. **Biol**, v. 36, p. 125–140, 1971.

STROUD, Robert M; KAY, Lois M; DICKERSON, Richard E. The structure of bovine trypsin: electron density maps of the inhibited enzyme at 5 Å and at 2· 7 Å resolution. **Journal of molecular biology**, v. 83, n. 2, p. 185–208, 1974.

TADEO, Xavier et al. Protein stabilization and the hofmeister effect: The role of hydrophobic solvation. **Biophysical Journal**, v. 97, n. 9, p. 2595–2603, 4 nov. 2009.

TEIXEIRA, A. E. **Purificação e caracterização de uma nova forma ativa de tripsina**. . Belo Horizonte: [s.n.], 1977.

VOET, Donald; VOET, Judith G. **Biochemistry**. 4th. ed. ed. New York: John Wiley and Sons Inc., 2011.

WALSH, K A; NEURATH, H. TRYPSINOGEN AND CHYMOTRYPSINOGEN AS HOMOLOGOUS PROTEINS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 52, n. 4, p. 884–889, out. 1964. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14224394>>.

WALSH, K A; WILCOX, P E B T - Methods in Enzymology. [3] Serine proteases. **Proteolytic Enzym**. [S.l.]: Academic Press, 1970. v. 19. p. 31–41. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687970190057>>.

XIE, WenJun et al. On the molecular mechanism of ion specific Hofmeister series. **Science China Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 36–47, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11426-013-5019-1>>.

YANG, Zhen. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. **Journal of biotechnology**, v. 144, n. 1, p. 12–22, 2009.

ZHANG, Yanjie; CREMER, Paul S. **Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series**. **Current Opinion in Chemical Biology**. [S.l.]: Elsevier Current Trends. , 1 dez. 2006

ZHANG, Yanjie; CREMER, Paul S. Chemistry of Hofmeister anions and osmolytes. **Annual review of physical chemistry**, v. 61, p. 63–83, 2010.