



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

IVIS MELIXA MUÑOZ FRANCO

**UTILIZAÇÃO DE BETA-CICLODEXTRINA PARA AUMENTO DA
ESTABILIDADE CINÉTICA E TERMODINÂMICA DA BETA-TRIPSINA**

VITÓRIA

2023

IVIS MELIXA MUÑOZ FRANCO

**UTILIZAÇÃO DE BETA-CICLODEXTRINA PARA AUMENTO DA
ESTABILIDADE CINÉTICA E TERMODINÂMICA DA BETA-TRIPSINA**

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.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos.

VITÓRIA

2023

IVIS MELIXA MUÑOZ FRANCO

UTILIZAÇÃO DE BETA-CICLODEXTRINA PARA AUMENTO DA ESTABILIDADE CINÉTICA E TERMODINÂMICA DA BETA-TRIPSINA

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 16 de fevereiro de 2023.

Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos
Universidade Federal do Espírito Santo
(Orientador)

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães
Universidade Federal do Espírito Santo
(Membro interno)

Prof. Dr. Kádima Nayara Teixeira
Universidade Federal do Paraná
(Membro externo)

Prof. Dr. Maria Aparecida Cicilini
Universidade Federal do Espírito Santo
(Membro suplente)

Prof. Dr. Rita Gomes Wanderley Pires
Universidade Federal de Minas Gerais
(Membro suplente)

VITÓRIA

2023

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

F825u Franco, Ivis Melixa Muñoz, 1996-
Utilização de beta-ciclodextrina para aumento da estabilidade cinética e termodinâmica da beta-tripsina / Ivis Melixa Muñoz Franco. - 2023.
76 f. : il.

Orientador: Alexandre Martins Costa Santos.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Termodinâmica. 2. Cinética enzimática. 3. Estabilidade estrutural. 4. Ciclodextrinas. 5. Calorimetria. I. Santos, Alexandre Martins Costa. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Ata da 211ª sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, da discente IVIS MELIXA MUÑOZ FRANCO, realizada às 14:00h do dia dezesseis de fevereiro do ano dois mil e vinte e três (16/02/2023), no auditório do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Dissertação intitulada “AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA E FÍSICO QUÍMICA DO COMPLEXO SUPRAMOLECULAR DA ENZIMA BETA-TRIPSINA E BETA-CICLODEXTRINA”. A sessão pública foi realizada em formato híbrido, de modo presencial no auditório da biotecnologia e por videoconferência (<https://meet.iit.si/pgbiotecnologiaufes>). O presidente da Banca, Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos (orientador), apresentou os demais membros da comissão examinadora constituída pelos Doutores: Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), examinador interno; Profª. Drª. Kádima Nayara Teixeira, Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, examinadora externa, e passou a palavra para a aluna que apresentou a sua proposta de dissertação. Terminada a apresentação, a banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a mestranda APROVADA na defesa de Mestrado. Eu, Alexandre Martins Costa Santos, que presidi a Banca de defesa, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Vitória, 16 de fevereiro de 2023.

Alexandre Martins Costa Santos - orientador
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo

Marco Cesar Cunegundes Guimarães - examinador interno
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo

Profª Drª Kádima Nayara Teixeira - examinadora externa
Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná



Campus Universitário Maruípe – Av. Maruípe, 1468 – Maruípe, Vitória – ES | 29047-185 |
Tel. e Fax: (27) 3335-9501 | <http://www.biotecnologia.ufes.br/> | pgbiotecnologia@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
ALEXANDRE MARTINS COSTA SANTOS - SIAPE 1698543
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 27/02/2023 às 10:58

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/657754?tipoArquivo=O>



Documento assinado digitalmente
KADIMA NAYARA TEIXEIRA
Data: 27/02/2023 14:21:55-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
MARCO CESAR CUNEGUNDES GUIMARAES - SIAPE 2622289
Departamento de Morfologia - DM/CCS
Em 27/02/2023 às 17:09

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/658271?tipoArquivo=O>

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho a fonte da minha força, a luz do meu caminho, o meu céu na terra, o meu pilar fundamental, a pessoa que me motiva sempre, Idalia Franco Polanco, a melhor mãe do mundo”

AGRADECIMENTOS

Após dois anos de trabalho, é tempo de agradecer a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, estiveram presentes durante este período. Parece simples, mas não é, pois há muito a agradecer em poucas linhas.

Vou começar por agradecer a Deus, por me conceder o dom da vida, me amparar nos momentos difíceis e me dar força interior para superar as dificuldades, além disso por diariamente me abençoar com oportunidades e pessoas, que somam em minha vida.

A toda minha família a qual são minha fonte de motivação, especialmente a meus pais, José Humberto Muñoz e Idalia Franco Polanco por proporcionarem a mim e aos meus irmãos a melhor educação possível. Por transmitir valores que, sem dúvida, nos tornaram pessoas melhores. Sem o seu esforço e sacrifício por tantos anos teria sido impossível para mim ter chegado até aqui. Dedico esta conquista a vocês, queridos pais, como mais uma meta alcançada.

Aos meus irmãos Sobeyda, Mirsa, Yasmin e Orlin, que caminham comigo nessa vida além de ser minha inspiração para sempre continuar atrás dos meus objetivos, por acreditarem em mim, por todo amor, apoio e por me auxiliarem sempre, amo vocês mais que tudo nesse mundo.

Aos meus sobrinhos Danny, Hillary e Aliette por me darem a maior felicidade que existe, vocês são o melhor regalo de Deus na minha vida.

As minhas amigas Joselin Michelle, Montzerrath Anariba, Karla Patricia, Aura Marcela e Yadira Pacheco, muito obrigada pela amizade de tantos anos e também pelo apoio que brindaram quando precisei ao longo deste processo, cada palavra de encorajamento foi de muita ajuda nos momentos de dificuldade.

Ao meu orientador Professor Dr. Alexandre Martins Costa Santos, agradeço o apoio, às valiosas contribuições, além da liberdade e confiança dispensada a mim para o desenvolvimento deste projeto e contribuição para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo de profissional a ser seguido, durante esses anos que compartilhamos, aprendi muitas coisas com você, perseverança, um trabalho bem feito e o esforço contínuo para melhorar sempre dão frutos. Obrigada por sua ajuda

inestimável, pelos ensinamentos, discussões, conselhos, oportunidades e paciência que permitiram a execução deste trabalho. Que Deus conceda a você inúmeras conquistas!

Ao meu anjo na terra, Antônio Victor Baioco Vasconcelos, menino sem você nada disso seria possível. Muito obrigada pelo seu apoio, conselhos, por me ajudar em tudo que precisei durante esses anos, por me dar a mão, me acompanhar, auxiliar, acreditar em mim, pelo conhecimento transmitido, por toda a paciência sempre, pela disposição e auxílio, também pelas inúmeras conversas e risadas enfim todos os momentos. Sou muito grata a Deus por me permitir conhecê-lo. Você é uma fonte de sabedoria e conhecimento!

A Universidade Federal do Espírito Santo e ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia por ter confiado em mim todo este tempo e também pela oportunidade de completar os meus estudos.

A todos os membros do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LBAA) e ao Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas (LBBMP), em especial meus colegas Dayanne, Monique, Maribel, Fabiano, Aurelio, Daniel e Ana Clara muito obrigada pela oportunidade de trabalhar junto a vocês.

Aos membros da Banca examinadora, Prof.Dra. Kádima Nayara Teixeira, Prof.Dr Marcos Cesar Cunegundes Guimarães e as professoras suplente Prof. Rita Gomes Wanderley Pires, Maria Aparecida Cicilini, pela aceitação de avaliar esta dissertação, melhorando o trabalho com suas sugestões e conhecimentos, muito obrigada.

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, e todos os técnicos pelo ensino e auxílio para a realização dos experimentos, também pela amizade.

À Organização de Estados Americanos (OEA) por me selecionar para fazer o mestrado, muito obrigada pela oportunidade.

À CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

Aos que diretamente e indiretamente contribuíram para que mais essa etapa concretiza-se, em minha vida por todo sentimento bom e energia, obrigada!

FRANCO. I.M.M. **Utilização de beta-ciclodextrina para aumento da estabilidade cinética e termodinâmica da beta-tripsina.** 2023. 73f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES. Espírito Santo. Brasil.

RESUMO

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos que possuem o exterior polar e uma cavidade interna apolar. Elas são conhecidas por apresentarem a capacidade de promover estabilidade, aumentar solubilidade, carrear e encapsular substâncias como enzimas. Por tanto, este trabalho teve como intuito investigar se a adição de uma das ciclodextrinas, a beta-ciclodextrina, em um sistema contendo beta-tripsina provoca aumento na estabilidade enzimática, estrutural e termodinâmica da enzima. Para isto, foram realizados ensaios de atividade enzimática, espectrofotometria de varredura de ultravioleta, espectroscopia de varredura de fluorescência e microcalorimetria. O sistema beta-tripsina:beta-ciclodextrina 1:30 (massa/massa) com tempo de 10 minutos de interação apresentou a melhor relação de custo benefício (atividade enzimática por valor). Este sistema também apresentou os melhores resultados de armazenamento (3 horas, em 4°C ou 25°C). A espectrofotometria de varredura de ultravioleta não foi sensível para detectar alterações globais entre as proporções 1:30 e 1:0. Na espectroscopia de varredura de fluorescência a amostra 1:30 apresentou um comprimento de onda máximo 28 nm menor em relação às outras amostras, indicando que a presença de beta-ciclodextrina promoveu um aumento na estabilidade estrutural da enzima e no ensaio no microcalorímetro, foi observado um aumento de 2 K na temperatura em que 50% das moléculas estão desnaturadas, além de aumento nos parâmetros de variação na entropia, variação de entalpia calorimétrica e na variação de entalpia de Van't Hoff da amostra 1:30 em comparação a amostra 1:0, indicando que a presença da beta-ciclodextrina no sistema proteico promove o aumento do número de moléculas de beta-tripsina que estão no estado nativo, tornando o sistema mais estável termodinamicamente. Além disto, os índices de cooperatividade e a relação variação da entalpia calorimétrica sobre a variação da entalpia de Van't Hoff não foram alteradas. Portanto, os parâmetros estruturais, termodinâmicos e enzimáticos do sistema protéico foram melhorados devido a adição de beta-ciclodextrina na proporção 1:30, indicando que a beta-ciclodextrina aumentou a estabilidade da beta-tripsina.

Palavras-Chaves: Atividade amidásica. Beta-ciclodextrina. Beta-tripsina. Calorimetria. Estabilidade. Espectroscopia. Termodinâmica.

FRANCO. I.M.M. **Use of beta-cyclodextrin to increase the kinetic and thermodynamic stability of beta-trypsin.** 2023. 73p. Dissertation (Master in Biotechnology). Postgradution Biotechnology Program, UFES. Espírito Santo. Brazil.

ABSTRACT

Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides that have a polar exterior and a nonpolar interior cavity. They are known to have the ability to promote stability, increase solubility, carry and encapsulate substances such as enzymes. Therefore, this work aimed to investigate whether the addition of one of the cyclodextrins, beta-cyclodextrin, in a system containing beta-trypsin causes an increase in the enzymatic, structural and thermodynamic stability of the enzyme. For this, enzymatic activity assays, ultraviolet scanning spectrophotometry, fluorescence scanning spectroscopy and microcalorimetry were carried out. The beta-trypsin:beta-cyclodextrin 1:30 (mass/mass) system with a 10-minute interaction time showed the best cost-benefit ratio (enzymatic activity per value). This system also showed the best storage results (3 hours at 4°C or 25°C). Ultraviolet scanning spectrophotometry was not sensitive to detect global changes between 1:30 and 1:0 ratios. In the fluorescence scanning spectroscopy, the 1:30 sample showed a maximum wavelength 28 nm shorter than the other samples, indicating that the presence of beta-cyclodextrin promoted an increase in the structural stability of the enzyme and in the microcalorimeter test, it was observed an increase of 2 K in the temperature at which 50% of the molecules are denatured, in addition to an increase in the parameters of entropy variation, calorimetric enthalpy variation and in the Van't Hoff enthalpy variation of sample 1:30 compared to sample 1:0, indicating that the presence of beta-cyclodextrin in the protein system promotes an increase in the number of beta-trypsin molecules that are in the native state, making the system thermodynamically more stable. Furthermore, the cooperativity indices and the ratio of calorimetric enthalpy changes to the Van't Hoff enthalpy changes were not altered. Therefore, the structural, thermodynamic and enzymatic parameters of the protein system were improved due to the addition of beta-cyclodextrin in a 1:30 ratio, indicating that beta-cyclodextrin increased the stability of beta-trypsin.

Keywords: Amylase activity. Beta-cyclodextrin. Beta-trypsin. Calorimetry. Stability. Spectroscopy. Thermodynamics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura de ciclodextrinas nativas e tamanho de suas cavidades.	21
Figura 2. ilustração de um complexo de inclusão.....	22
Figura 3. Tipos de complexos de inclusão que se formam entre CDs e moléculas hóspedes.....	23
Figura 4. Modelo esquemático demonstrando a interação da deslorelina com Hidroxipropil- β -ciclodextrina	24
Figura 5. Estrutura em esqueleto carbônico da insulina SerB9Asp, com os resíduos aromáticos destacados.	25
Figura 6. Estrutura tridimensional da β -tripsina.....	30
Figura 7. Tríade catalítica da quimotripsina.....	31
Figura 8. Reação enzimática de catálise do substrato sintético BapNA.....	36
Figura 9. Esquema de funcionamento do DSC.	42
Figura 10. Concentração relativa de <i>p</i> -nitroanilina em diferentes tempos de interação entre a β -tripsina e o meio reacional em temperatura de 25°C..	45
Figura 11. Concentração relativa de <i>p</i> -nitroanilina em função da variação de concentração de β -CD adicionada ao sistema proteína-tampão.....	48
Figura 12. Resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes na superfície da β -tripsina.....	49
Figura 13. Concentração relativa de <i>p</i> -nitroanilina em função da variação de temperatura de incubação (4 e 25°C) e pela adição de benzamidina.	50
Figura 14. Concentração relativa de <i>p</i> -nitroanilina em função da variação em função da adição do inibidor benzamidina e intervalo de incubação (0 min, 10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h 144 h e 240 hs) a 25°C, usando como tampão tris-HCl 50 mmol.L ⁻¹ , pH 8,0 mais β -CD na proporção 1:30 (m/m), e como substrato BApNA.	54
Figura 15. Concentração relativa de <i>p</i> -nitroanilina em função da variação de temperatura de incubação (37, 50 e 70°C) e pela adição de benzamidina..	56
Figura 16. Espectro de varredura do ultravioleta da β -tripsina em meio ácido sob ação da β -ciclodextrina.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BApNA	N α -Benzoil-DL-Arginina-p-Nitroanilida.
CD	Ciclodextrina.
α -CD	Alfa-tripsina
β -CD	Beta-ciclodextrina.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura (do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i>).
HCl	Ácido clorídrico.
IC	Índice de cooperatividade.
K	kelvin.
LABIOM/UFES	Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares da Universidade Federal do Espírito Santo.
pH	Logaritmo negativo da concentração de H ⁺ .
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.
ΔH	Variação de entalpia entre dois estados.
ΔH_{cal}	Descreve 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_{Tm}	Variação de entropia entre dois estados no T_m .

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. HISTÓRIA DA CICLODEXTRINA	19
1.2. CICLODEXTRINAS	20
1.3. COMPLEXOS DE INCLUSÃO	21
1.4. INTERAÇÃO DAS CDS COM PROTEÍNAS	23
1.5. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS CDS NATIVAS.	26
1.6. APLICAÇÕES DAS CICLODEXTRINAS	27
1.7. B-TRIPSINA.....	29
1.8. MECANISMO DE AÇÃO DA B-TRIPSINA	31
2. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA	33
2.1. HIPÓTESE	33
2.2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. OBJETIVO GERAL.....	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. MATÉRIAS.....	35
4.2. OBTENÇÃO DA ISOFORMA B-TRIPSINA	35
4.3. EFEITO DA VARIAÇÃO DO TEMPO E DO PH REACIONAL NA ATIVIDADE AMIDÁSICA DE TRIPSINA.	35
4.4. EFEITO DA ADIÇÃO DE B-CICLODEXTRINA NA ATIVIDADE AMIDÁSICA DA B-TRIPSINA	36
4.5. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA B-TRIPSINA VARIANDO O TEMPO E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	37
4.6. INIBIÇÃO DA B-TRIPSINA PELA BENZAMIDINA	38
4.7. EFEITO DA ADIÇÃO DE BENZAMIDINA NA ATIVIDADE AMIDÁSICA DA B-TRIPSINA EM UM SISTEMA CONTENDO B-CICLODEXTRINA COM INCUBAÇÃO EM TEMPERATURAS ELEVADAS.	39
4.8. USO DO ESPECTRO DE UV PARA VISUALIZAÇÃO DE ALTERAÇÕES CONFORMACIONAIS GLOBAIS PROVOCADAS PELA B-CICLODEXTRINA NA B-TRIPSINA	40
4.9. INFLUÊNCIA DA LIOFILIZAÇÃO NA INTERAÇÃO ENTRE B-CICLODEXTRINA E B-TRIPSINA .	40
4.10. INFLUÊNCIA DA B-CICLODEXTRINA SOBRE A ESTABILIDADE CONFORMACIONAL DA ENZIMA EM MEIO ÁCIDO MONITORADO PELA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	41

4.11. VARIAÇÃO DA ESTABILIDADE TERMODINÂMICA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE B-CICLODEXTRINA POR MICROCALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
5.1. ANÁLISE DO MELHOR TEMPO DE INTERAÇÃO ENTRE A B-TRIPSINA E O SISTEMA TAMPÃO	44
5.2. ATIVIDADE AMIDÁSICA DA B-TRIPSINA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE B-CICLODEXTRINA	47
5.3. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA B-TRIPSINA VARIANDO O E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	49
5.4. UTILIZAÇÃO DA BENZAMIDINA DURANTE OS ENSAIOS TERMODINÂMICOS.....	52
5.5. EFEITO DA ADIÇÃO DE BENZAMIDINA NA ATIVIDADE AMIDÁSICA DA B-TRIPSINA EM UM SISTEMA CONTENDO B-CICLODEXTRINA COM INCUBAÇÃO EM TEMPERATURAS ELEVADAS .	55
5.6. ESPECTRO DE VARREDURA UV-VISÍVEL DA B-TRIPSINA	58
5.7. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DA INTERAÇÃO DE B-CD COM A B-TRIPSINA EM PH 3,0.....	60
5.8. ANÁLISE TERMODINÂMICA	62
6. CONCLUSÃO	66
7. REFERÊNCIAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRIA DA CICLODEXTRINA

O primeiro trabalho sobre o isolamento de um produto conhecido como ciclodextrina (CD) foi feito na França em 1891 pelo farmacêutico e químico Antoine Villiers (VILLIERS, 1981). Ele realizou uma pesquisa do *Bacillus amylobacter* em vários carboidratos, em particular na fécula de batata. No estudo, o autor observou que o *B. amylobacter* incubado por vários dias em água com fécula de batata resultava principalmente na formação de ciclodextrina (CRINI, 2014). Ao estudar as propriedades físicas das CDs, Villiers observou que tais cristais não eram digeridos por *Bacillus sp.* e que também eram resistentes à ação de água e ácidos, ou seja, difíceis de hidrolisar. Em uma segunda publicação, Villiers descreveu a composição química de seus novos carboidratos cristalinos como um múltiplo de fórmula $[(C_6H_{10}O_5)_2+3H_2O]$, propondo o nome "celulosina" devido à sua semelhança com a celulose, e obteve dois tipos diferentes a partir de "celulosinas" cristalizadas, que provavelmente correspondem às que mais tarde foram chamadas de alfa-ciclodextrina (α -CD) e beta-ciclodextrina (β -CD) (GONZÁLEZ, 2017).

Os próximos avanços em relação às CDs foram feitos por Franz Schardinger entre 1903 e 1911 (SCHARDINGER, 1903, 1905, 1909, 1911)(BREWSTER; LOFTSSON, 2007). Dentre as contribuições de Schardinger para o estudo das CDs estão: foi o primeiro a isolar o bacilo (*Bacillus macerans*) produtor de enzimas responsável pela transformação do amido em CD; publicou a primeira descrição detalhada para a preparação e isolamento das CDs; e nomeação da dextrina cristalina α e dextrina cristalina β (DEPINTO; CAMPBELL, 1964; SCHARDINGER, 1911). Por conta dos resultados obtidos por este pesquisador, as CDs também são conhecidas como dextrinas de Schardinger, cicloamilose ou cicloglucanos (FRENCH, 1957).

A década de 1970 foi marcada por dois grandes eventos: Em primeiro lugar, diversas empresas começaram a produzir e a comercializar a CD. Em segundo lugar, os primeiros estudos concluíram que a β -CD administrada oralmente é uma substância inofensiva. Como resultado, ocorreram grandes avanços nesta época. Em meados dos anos de 1970, aplicações farmacêuticas e alimentares começaram a aparecer e

rapidamente ganharam espaço, especialmente no Japão (HAMADA; NAMBU; NAGAI, 1975; UEKAMA; OTAGIRI, 1987). O primeiro simpósio internacional sobre a CD foi organizado por Szejtli em Budapeste no ano de 1981. Nesta década, muitos catalisadores baseados na CD foram construídos para a química biomimética e outros processos de interesse, como enzimas artificiais (BRESLOW, 1979; BRESLOW; DONG, 1998). O número de publicações começou a aumentar exponencialmente, assim como as patentes. Em meados de 1980, as CD eram produzidas em larga escala e comercializadas a um preço razoável, entre 10 e 15 dólares por quilo (GONZÁLEZ, 2017; SZEJTLI, 1982). Atualmente, a CD continua a oferecer novos horizontes para a ciência e industrialmente, em que a cada ano, 2000 novas publicações são dedicadas a CD (MORIN-CRINI et al., 2021).

1.2. CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos compostos por 6, 7 ou 8 unidades de D-glicose ligadas através de ligações glicosídicas α -1-4, chamados alfa (α -CD), a beta (β -CD) e a gama (γ -CD), respectivamente (Figura 1). De todas elas, a β -CD é a mais acessível e de menor preço, além de ser a mais utilizada. Nas ciclodextrinas, grupos hidroxilas primários e secundários estão orientados para o exterior do anel formado pelas unidades de glicose, conferindo-lhe um exterior bastante hidrofílico e uma cavidade interna hidrofóbica. Tal cavidade permite a formação de complexos de inclusão entre as ciclodextrinas e moléculas que apresentem dimensões compatíveis com esta cavidade interna (IRIE; UEKAMA, 1997; LOFTSSON; MASSON, 2001; MCCORMACK; GREGORIADIS, 1998). Elas são obtidas a partir de processos biotecnológicos envolvendo a degradação enzimática do amido de milho.

Desde a década de 1970 as CDs foram reconhecidas como excipientes para uso farmacêutico (SZEJTLI, 1998b). Sua estrutura molecular externa é hidrofílica e relativamente lipofílica na cavidade interna e de acordo com estas características são capazes de formar complexos de inclusão por meio de ligações não covalentes que estabilizam uma grande variedade de moléculas em meios líquidos e sólidos, principalmente a β -ciclodextrina, em cuja cavidade interna pode incluir uma parte ou a molécula inteira (SZEJTLI, 1998a). Estes complexos são caracterizados pela penetração parcial ou total de moléculas na cavidade das ciclodextrinas (CDs). A

formação dos complexos pode ter o propósito de aumentar a solubilidade, a estabilidade, a taxa de absorção ou reduzir a toxicidade do fármaco neles associado (PÉREZ, 2015).

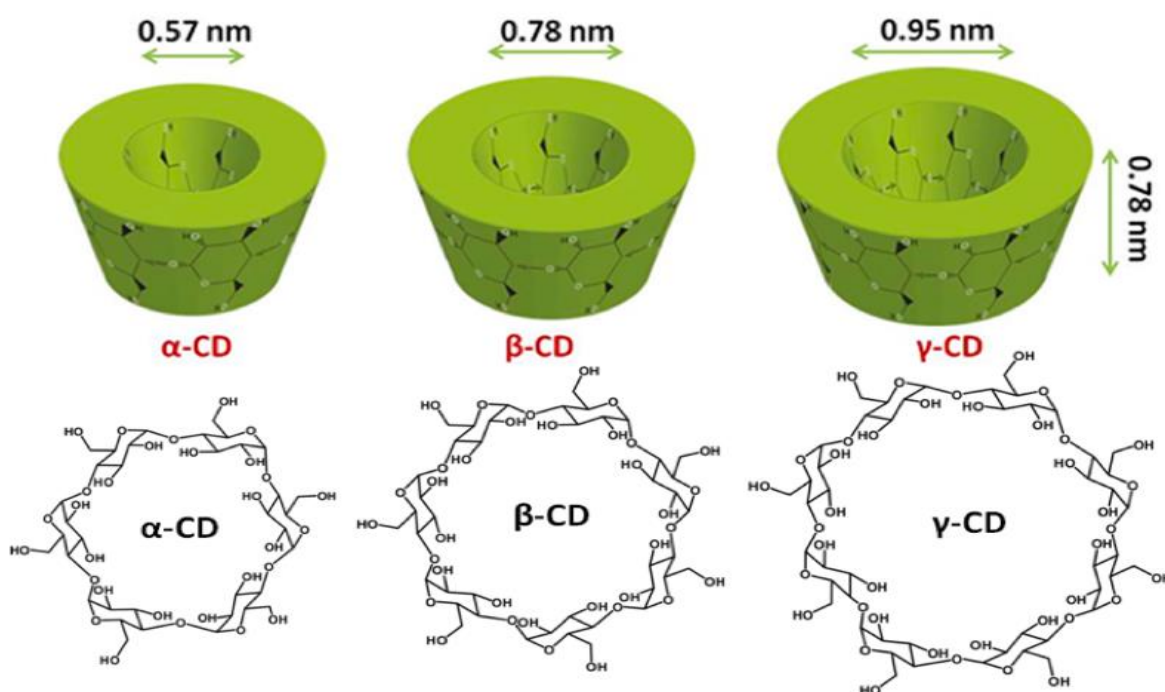


Figura 1. Estrutura de ciclodextrinas nativas e tamanho de suas cavidades. Adaptado de REY (2017).

1.3. COMPLEXOS DE INCLUSÃO

O termo "*einschlussverbindurg*" (composto de inclusão) foi introduzido por Schlenk em 1950. Ele também é conhecido na literatura por outros nomes, como aduto, clatrato, composto molecular ou complexo (SZEJTLI, 1998a). Complexos de inclusão (Figura 2) são sistemas que possuem a estrutura de um clatrato, ou seja, uma molécula que contém um segundo tipo de molécula. O composto hóspede localiza-se na cavidade hospedeira sem alterar significativamente sua estrutura, sendo capaz de formar compostos cristalinos a partir de moléculas em qualquer estado da matéria (SZEJTLI, 2004).

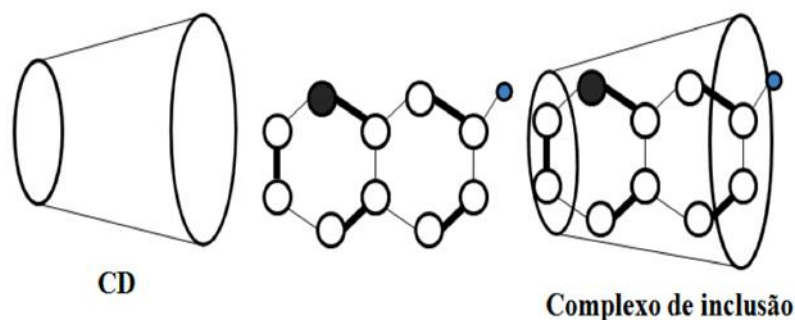


Figura 2. ilustração de um complexo de inclusão. (BLANCO, 2012).

Em meios aquosos, a cavidade da CD é ocupada por moléculas de água. Por ser apolar, ocorre uma interação desfavorável, de modo que é fácil que essas moléculas de água sejam substituídas por moléculas “convidadas” menos polares, o que dá origem ao complexo de inclusão (SZEJTLI, 2004). A grande importância das CDs reside na sua capacidade de formar seletivamente complexos de inclusão com outras moléculas, íons e até mesmo radicais, tal união modifica as propriedades das moléculas hospedeiras e “convidadas” (DODZIUK, 2006).

Os complexos de inclusão são formados quando a molécula "convidada" é parcial ou totalmente incluída na "cavidade hospedeira" (Figura 3). Devido à cavidade hidrofóbica, as CDs apresentam um ambiente adequado para interação. Devido à cavidade hidrofóbica, as CDs apresentam um ambiente adequado para interação. A estrutura externa das CDs é polar, o que permite a união com água por meio de ligações de hidrogênio. A formação dos complexos de inclusão é determinada pelas características das moléculas hóspede, como a polaridade, o tamanho, e a geometria, e devem ser adequadas às características hidrofóbicas e ao tamanho da cavidade da CD. A Figura 3 representa o equilíbrio dinâmico para complexos fármacos-CD com estequiometria 1:1, 1:2, 2:1 e 2:2. A formação de complexos é possível com toda a molécula hospedeira ou parte dela. Devido a esta característica, as CDs formam complexos de inclusão com uma grande variedade de compostos hidrofóbicos e alteram as propriedades físico-químicas e biológicas das moléculas “convidadas”. Essas mudanças podem melhorar o potencial terapêutico das drogas, diminuindo sua quebra antes de entrar nos tecidos e alterando a maneira como entram no tecido (GIDWANI; VYAS, 2015).

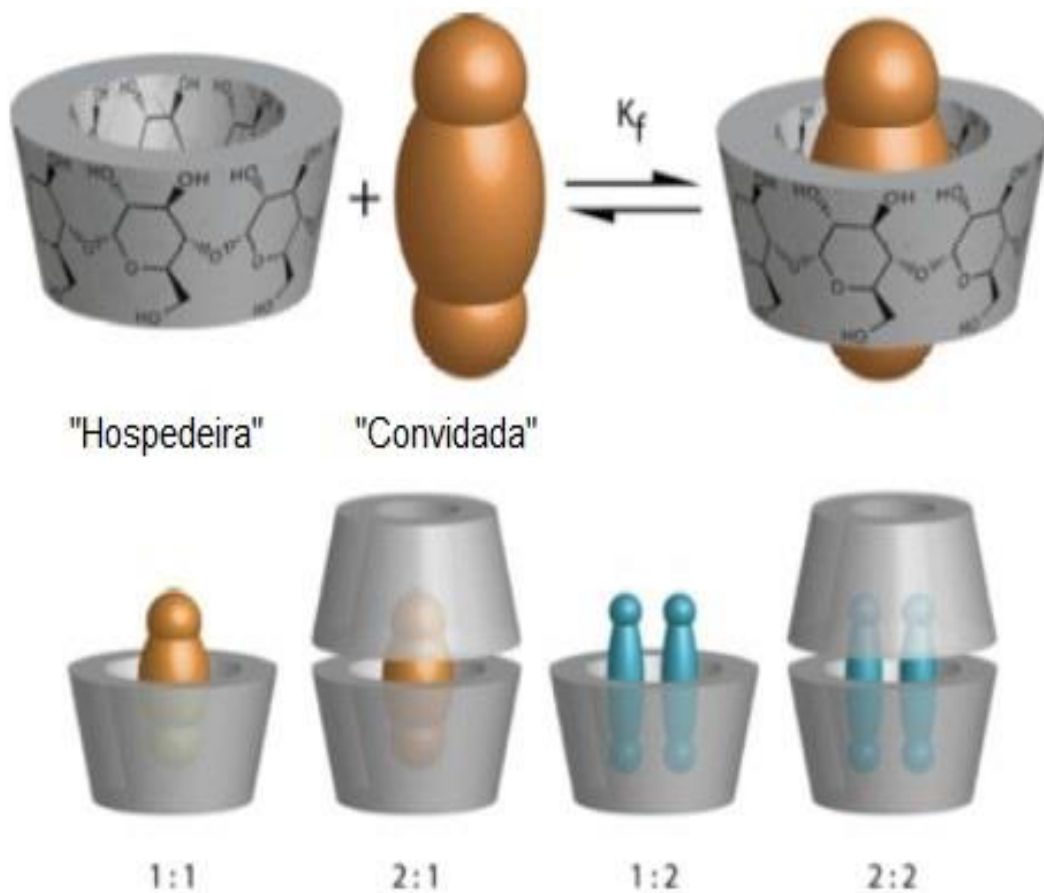


Figura 3. Tipos de complexos de inclusão que se formam entre CDs e moléculas hóspedes. Adaptado de BALSALOBRE (2016).

1.4. INTERAÇÃO DAS CDS COM PROTEÍNAS

Diferente das moléculas de tamanhos reduzidos, onde ocorre a inclusão desta na CD, em estruturas maiores ocorre a inclusão de apenas uma parte da substância (Figura 4) (AACHMANN et al., 2003; KOUSHIK; BANDI; KOMPELLA, 2001; UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998).

A capacidade das ciclodextrinas de sequestrar porções hidrofóbicas nas superfícies das proteínas as torna valiosas em duas áreas. Primeiro, como sistema de entrega de drogas. Segundo, pela estabilização de proteínas contra agregação, desnaturação térmica e degradação. Assim, ciclodextrinas aumentam o tempo de meia-vida de proteínas terapêuticas, como o hormônio do crescimento e insulina, inibem ou diminuem a agregação de proteínas, atuam como análogas a chaperonas,

aumentando o redobramento de proteínas a partir de estados desnaturados (AKIYOSHI; SASAKI; SUNAMOTO, 1999; BANGA; MITRA, 1993; HAGENLOCHER; PEARLMAN, 1989; OTZEN et al., 2002).

As ciclodextrinas podem não somente reconhecer tamanho e forma, mas também a quiralidade de aminoácidos. Entretanto, as moléculas de muitos peptídeos e proteínas são tão hidrofílicas e volumosas para serem incluídas na cavidade da ciclodextrina e as restrições topológicas do esqueleto peptídico podem reduzir a formação de complexos de inclusão, portando sua interação com as CDs podem ser apenas locais, ou seja, as cadeias laterais aromáticas hidrofóbicas acessíveis podem formar complexos de inclusão com CDs (COOPER, 1992). Esta interação afeta possivelmente a estrutura tridimensional global de peptídeos e proteínas ou pode inibir sua associação intermolecular, alterando suas propriedades químicas e biológicas. Em vias gerais, as interações entre CDs e proteínas ocorrem em cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos que possuam uma área de superfície exposta que possibilite a interação entre os resíduos de aminoácidos e oligossacarídeo, e que apresentem uma superfície acessível à água (LOVATT; COOPER; CAMILLERI, 1996). Na Figura 4 é apresentada uma representação da interação entre a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) e a deslorelina, um análogo sintético da gonadorrelina, utilizada na medicina veterinária para indução da ovulação em éguas. As cadeias laterais dos aminoácidos tirosina e triptofano são encapsulados pela cavidade hidrofóbica da HP β CD (KOUSHIK; BANDI; KOMPELLA, 2001).

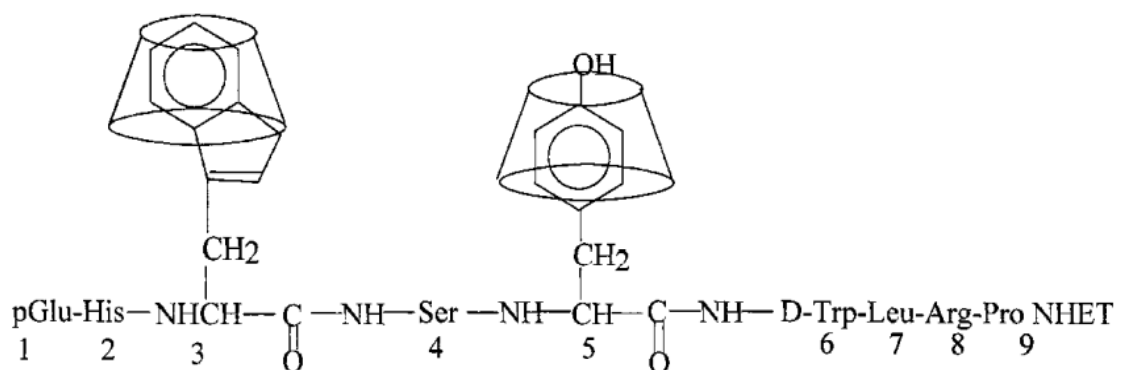


Figura 4. Modelo esquemático demonstrando a interação da deslorelina com Hidroxipropil- β -ciclodextrina (KOUSHIK; BANDI; KOMPELLA, 2001).

Aachmann e colaboradores (2003) publicaram um trabalho sobre a interação entre a insulina SerB9Asp, que possui 7 aminoácidos aromáticos (4 tirosinas e 3 fenilalaninas) e β -CD (Figura 5). Eles observaram que 4 destas cadeias laterais (verde) apresentaram interação com β -CD enquanto 3 cadeias laterais (vermelho) não apresentaram interação. Os que interagiram com a β -CD apresentavam uma superfície acessível ao solvente muito maior do que os que não interagiram.

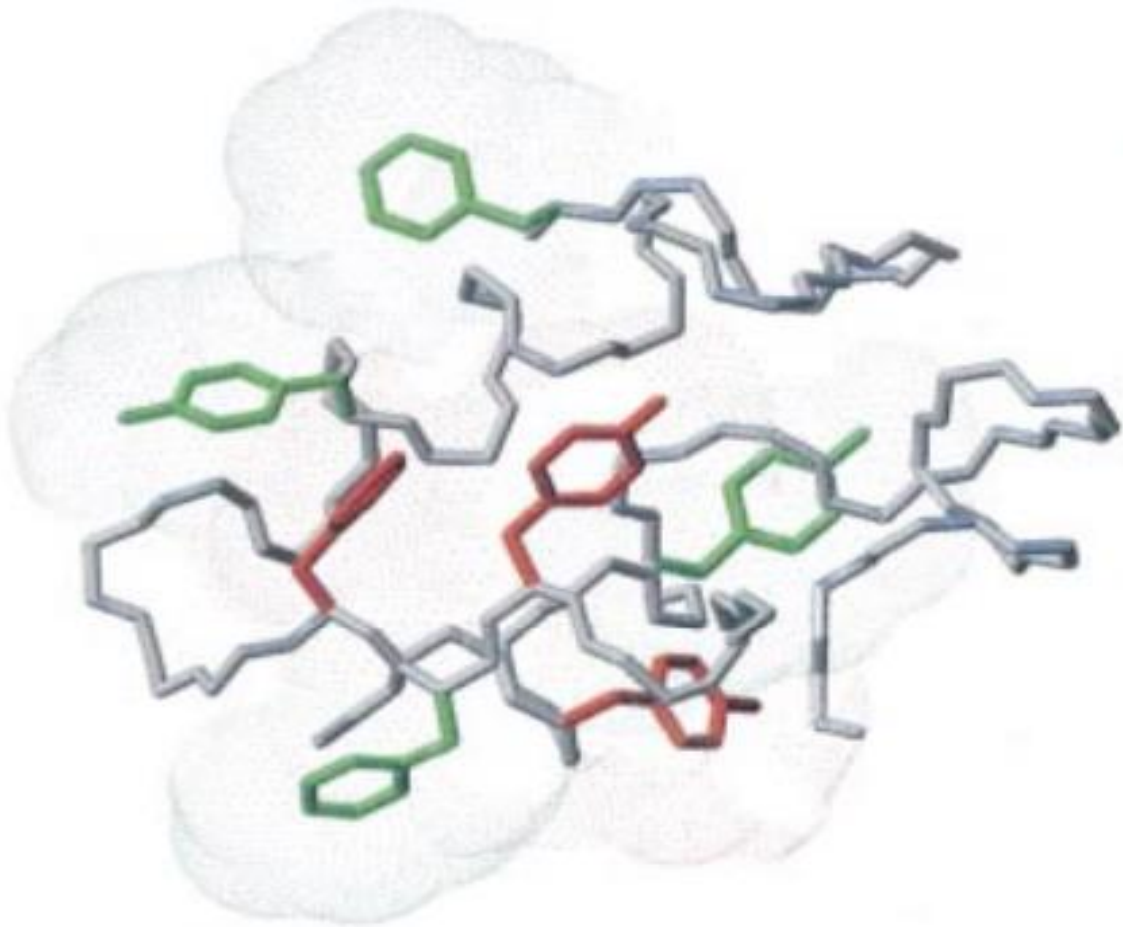


Figura 5. Estrutura em esqueleto carbônico da insulina SerB9Asp, com os resíduos aromáticos destacados. Os resíduos que não apresentaram interação com a β -ciclodextrina foram coloridos de vermelho, já os que apresentaram foram coloridos de verde. A parte da área acessível ao solvente correspondente aos resíduos é mostrada em cinza. Adaptado de (AACHMANN et al., 2003).

1.5. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS CDS NATIVAS.

As principais propriedades físico-químicas das CDs são mostradas na tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas das principais Ciclodextrinas. Adaptado de Balsalobre (2016).

Propriedades	α-CD	β-CD	γ-CD
N-glucopiranoses	6	7	8
Peso molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade em água a 25°C (% p/v)	14.5	1.85	23.2
ΔH (kJ/mol)	32.1	34.7	32.3
ΔS (J/K.mol)	57.7	48.9	61.4
Tensão superficial (mN/m ²)	71	71	71
Faixa de fusão Ta (°C)	255-260	255-265	240-245
Diâmetro externo (Å)	14.6	15.4	17.5
Diâmetro da cavidade (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Altura (Å)	7.9	7.9	7.9
Volume da Cavidade (Å ³)	174	262	427

As ciclodextrinas são muito solúveis em solventes apolares como dimetilsulfóxido (DMSO) ou N,N-dimetilformamida (DMF), porém, em água e outros solventes polares sua solubilidade é menor. β -CD é a mais insolúvel das três, pois forma um cinturão de ligações de hidrogênio que lhe confere grande estabilidade. α -CD forma apenas quatro das seis ligações de hidrogênio possíveis, porque a tensão do anel distorce as unidades de glicose. Por seu lado, o γ -CD é o menos estressado dos três, o que confere maior flexibilidade e solubilidade (PÉREZ, 2015).

A partir das CDs naturais foram sintetizados outros tipos de CDs denominados derivados ou modificados, que são obtidos por acilações, esterificação ou eterificação da hidroxila dos carbonos primários e secundários das CDs naturais. Devido à sua capacidade de se ligar especificamente por ligação covalente ou não covalente a outros CDs, esses açúcares cíclicos podem ser usados como blocos de construção para complexos supramoleculares. Sua capacidade de formar complexos de inclusão

com moléculas orgânicas convidadas oferece a possibilidade de desenvolver filamentos supramoleculares (PÉREZ, 2015).

As interações moleculares podem ser avaliadas utilizando-se diferentes técnicas, que se baseiam em alterações físico-químicas da molécula incluída. Em solução aquosa, um dos métodos mais comumente empregados no estudo de complexação é o diagrama de solubilidade de fases e a espectroscopia de UV-Visível. Outros métodos de análise também são utilizados para a caracterização dos complexos de inclusão com CDs como a espectroscopia de infravermelho (IV), e análises térmicas como a calorimetria diferencial de varredura (DSC) (ROLIM et al., 2010).

1.6. APLICAÇÕES DAS CICLODEXTRINAS

As aplicações das CDs são muito diversas, principalmente na indústria farmacêutica, indústria alimentícia, indústria química, farmacologia, síntese orgânica e fotofísica, catálise, biotecnologia, agricultura, medicina, indústria têxtil, meio ambiente, cosmética e higiene (RADU et al., 2015). Há grande interesse em controlar a capacidade das ciclodextrinas de formar complexos, pois este é o ponto chave para sua aplicação em campos tão diversos como os mencionados acima.

Uma das aplicações mais estudadas foca-se na sua utilização como agentes encapsulantes. As CDs podem aumentar a solubilidade e atuar como carreadores de drogas e prevenir a quebra de moléculas instáveis (PÉREZ, 2015). Do ponto de vista do modelo, as reações catalisadas por CD são de grande importância, pois são cineticamente semelhantes em muitos aspectos às reações enzimáticas. Por esta razão, os CDs podem servir como modelos de certas enzimas porque:

- Suas solubilidades em água são relativamente altas;
- Os compostos hospedeiros disponíveis são versáteis;
- Suas estruturas moleculares são bem definidas;
- Grupos hidroxila, atuando como catalisadores, são encontrados regularmente nos anéis de CD.

Além disso, a complexação de CDs com medicamentos, inseticidas, tintas, etc., são extremamente úteis, pois varia o comportamento físico-químico e bioquímico dessas substâncias, o que, por exemplo, permite a solubilização de determinados medicamentos, facilitando a injeção. Outra aplicação das ciclodextrinas está em seu uso em ressonância magnética nuclear para aumentar a intensidade de certos sinais para vários compostos. As CDs também são usadas para separação de compostos em colunas cromatográficas, pois podem incorporar substratos especificamente (PÉREZ, 2015).

Na indústria farmacêutica, as CDs e seus derivados têm sido utilizadas para a complexação de medicamentos, bem como para outros aditivos auxiliares, a fim de melhorar suas propriedades físico-químicas ou aumentar sua biodisponibilidade (FRÖMMING; SZEJTLI, 2013). Na indústria química, as CDs são usados como catalisadores para melhorar a seletividade de certas reações, bem como para a separação e purificação de produtos industriais (BLANCO, 2012). As CDs são usadas na indústria alimentícia para aumentar a estabilidade de componentes dos alimentos que são susceptíveis à ação da luz, da temperatura e da oxidação, além de diminuir a velocidade de perda dos compostos voláteis presentes. Com isso há um aumento da estabilidade dos flavorizantes, das vitaminas, das gorduras e de outros componentes do alimento, resultando em aumento da vida útil do produto pós-processamento, conhecido também como “tempo de prateleira”(BALSALOBRE, 2016). As CDs também são utilizadas na indústria de cosméticos e de produtos de limpeza, encapsulando fragrâncias, promovendo a estabilidade físico-química e reduzindo a velocidade da oxidação dos compostos (BLANCO, 2012).

Uma aplicação importante da ciclodextrina é como catalisadora de numerosas reações de oxidação, descarboxilação e eliminação. Outra importante atividade catalítica reside no fato de que as ciclodextrinas são capazes de modificar a fotorreatividade de determinadas moléculas, devido a sua incorporação em meios organizados (micelas). No entanto, estas modificações são imprevisíveis. Em alguns casos, protegem as moléculas complexadas diminuindo a sua fotossensibilidade, tendo-se como exemplo os alcaloides emetina e cefalina. Com outros compostos, as ciclodextrinas catalisam reações fotoquímicas, tais como dimerização e isomerização,

tendo-se como exemplo o caso do cis-trans estilbeno e a isomerização cis-trans do azobenzeno (DRUNKLER; FETT; LUIZ, 1999).

Na química analítica as CDs têm encontrado aplicações em diversos campos, tanto em técnicas espectroscópicas como cromatográficas. A formação de complexos de inclusão com CDs origina aumento na seletividade e sensibilidade do método analítico empregado. Em HPLC, a β -CD tem sido utilizada para melhorar a resolução e reprodutibilidade. Em colunas de cromatografia com gás, CDs são utilizadas na fase estacionária, para facilitar as análises rápidas e de rotina, no que diz respeito a separação de enantiômeros (DRUNKLER; FETT; LUIZ, 1999).

Na despoluição ambiental, as CDs são utilizadas para evitar o efeito de substâncias tóxicas contidas no ambiente por meio da formação de complexos não tóxicos, como poluentes em água, podendo remover até 58% de compostos indesejáveis (BLANCO, 2012).

1.7. β -TRIPSINA

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, subtilisina, granzima, tripsina e elastase.

A tripsina (Figura 6) foi descoberta em 1876 pelo fisiologista alemão Wilhelm Kühne enquanto estudava o mecanismo da digestão. É uma enzima peptidase, que quebra ligações de proteínas por hidrólise para formar peptídeos ou aminoácidos de menor tamanho (OLSEN; ONG; MANN, 2004).

Nos seres humanos, a tripsina é produzida no pâncreas e secretada no duodeno (parte do intestino), onde é essencial para a digestão, chamada de tripsinogênio (zimogênio). Como foi mencionado anteriormente, a enzima é produzida pelo pâncreas na forma de tripsinogênio (enzima inativa) e depois é ativada no duodeno graças à enteropeptidase, que a converte em β -tripsina (enzima ativa) por meio de um corte proteolítico (OLSEN; ONG; MANN, 2004). Sua molécula (β -tripsina) consiste em uma única cadeia polipeptídica, formada por dois domínios de estruturas similares,

unidos de forma assimétrica, cujas interfaces estão inseridas nos resíduos de aminoácidos catalíticos (LESK; FORDHAM, 1996; VOET; VOET, 2011).

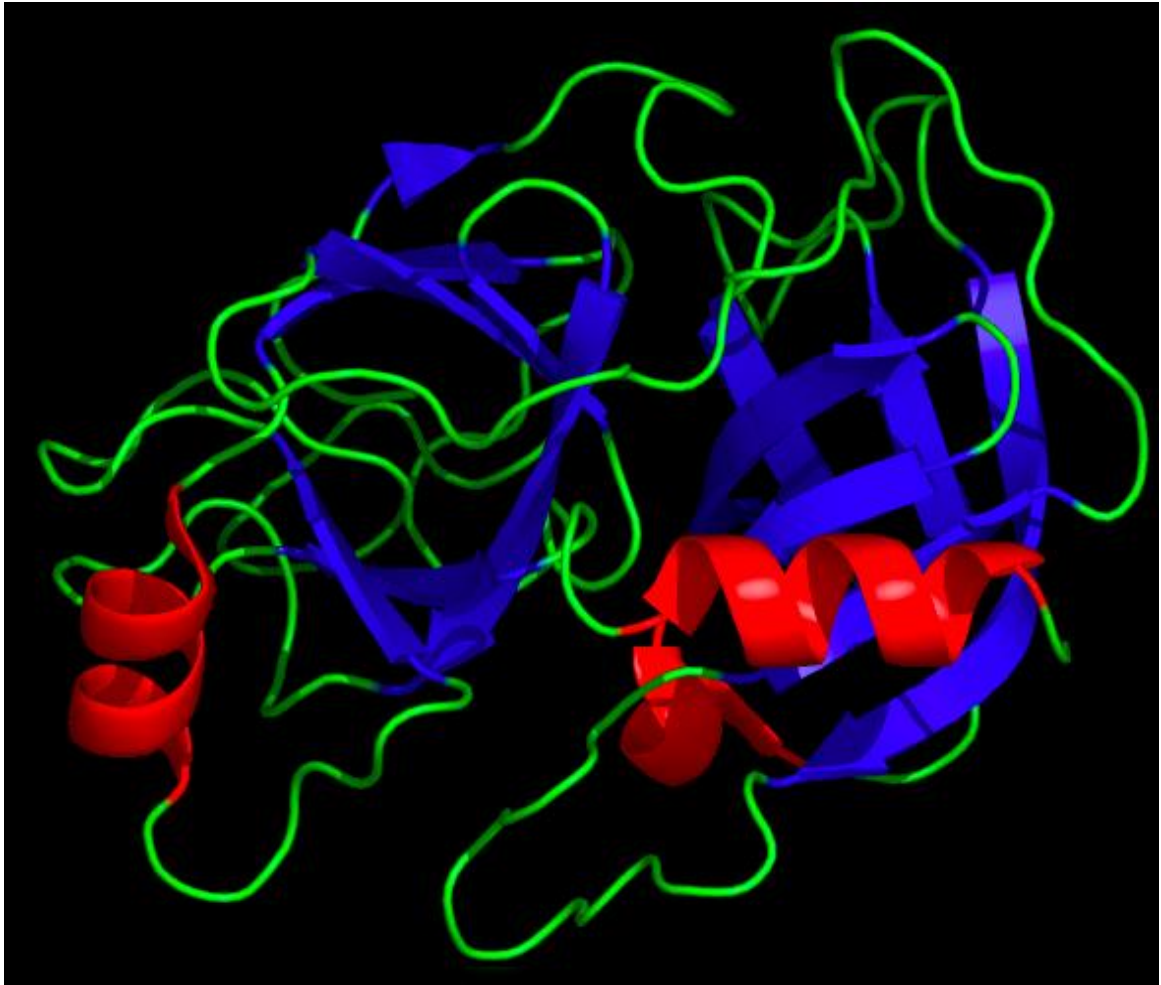


Figura 6. Estrutura tridimensional da β -tripsina. Imagens em “ribbons” geradas no Rasmol[®] a partir da estrutura da β -tripsina bovina (5ptp.pdb).

A tripsina é uma enzima específica, pois liga o peptídeo nas posições carboxilas terminais onde há Arginina (Arg) ou Lisina (Lys), ambos aminoácidos com grupos R carregados positivamente, fragmentando o peptídeo inicial. Além disso é um modelo interessante para o estudo de modelos de interação, já que as propriedades básicas de algumas isoformas já são conhecidas como: estrutura tridimensional, atividade enzimática e alguns dados sobre estabilidade térmica (LACERDA et al., 2014). Os detalhes estruturais dessa classe de proteínas foram observados por diversas técnicas experimentais como difração de Raio-X, difração de nêutrons e RMN de proteínas. A característica mais comum destas enzimas é a tríade catalítica (Figura 7. Tríade catalítica da quimotripsina. Fonte: (LIMA, 2016)) constituída pelos resíduos de

serina (Ser195), histidina (His57) e ácido aspártico (Asp102) (LESK; FORDHAM, 1996; VOET; VOET, 2011). As enzimas desta classe possuem especificidade em relação ao resíduo do substrato onde ocorre a clivagem, localizado na posição P1. Os resíduos do substrato recebem uma numeração P1, P2, ..., Pn no sentido N-terminal, e P1', P2', ..., Pn' no sentido C-terminal do substrato, sendo que a clivagem do substrato ocorre entre as posições P1 e P1'. A quimotripsina possui especificidade para resíduos com cadeias laterais aromáticas, a elastase para pequenas cadeias laterais apolares e a tripsina para aos aminoácidos lisina ou arginina (LESK; FORDHAM, 1996).

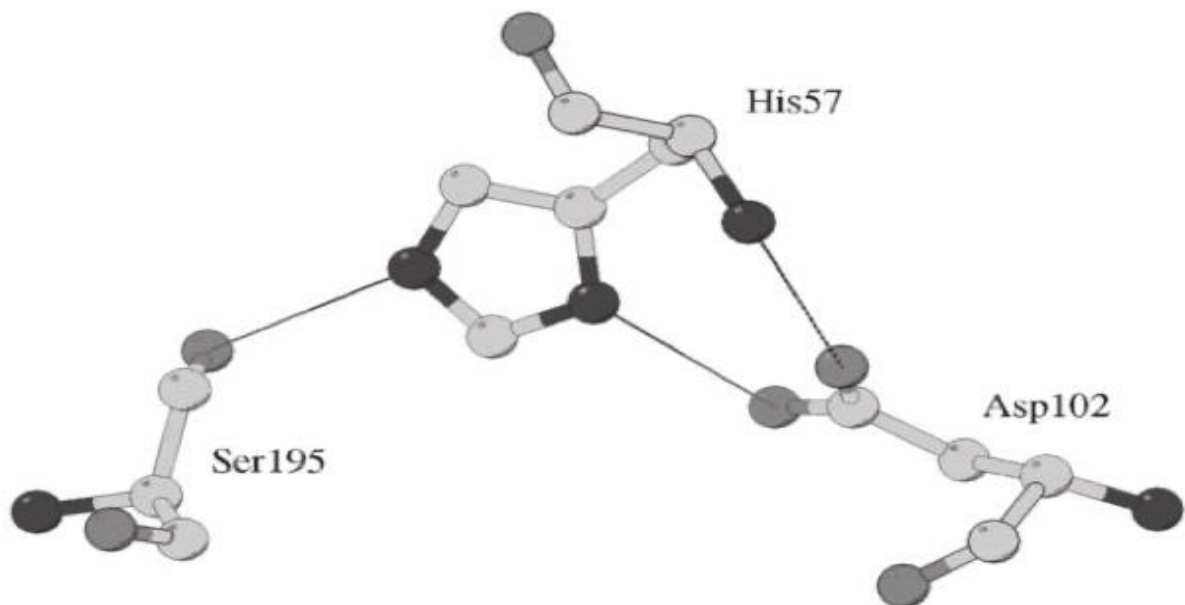


Figura 7. Tríade catalítica da quimotripsina. Fonte: (LIMA, 2016)

Essas proteínas participam de diversas atividades fisiológicas podendo ser inespecíficas como na degradação de proteínas na digestão (cujos representantes mais comuns são tripsina, quimotripsina e elastase), ou mais específicas como nos casos na cascata de coagulação sanguínea, apoptose, reprodução e reposta imune (FORTES, 2013).

1.8. MECANISMO DE AÇÃO DA β -TRIPSINA

As hidrólises de ligações peptídicas são termodinamicamente favoráveis, entretanto, essas reações de hidrólise são extremamente lentas. Tipicamente, na ausência de um

catalisador e em pH neutro, a reação tem um tempo de vida médio entre 10 e 1.000 anos. Em processos biológicos, com a presença de proteases, essa reação ocorre em milissegundos. Essa dificuldade com relação à parte cinética da quebra da ligação peptídica é devida à natureza química dessa ligação, em que a ligação C–N tem um caráter parcial de dupla ligação, não permitindo que a molécula rotacione nesse eixo da ligação e favorecendo uma estrutura plana. Os demais átomos que compõem a região da ligação peptídica, como C, N, O e H formam então uma estrutura plana, resultando na estabilização da ligação peptídica por ressonância. Outra característica importante é que o átomo de carbono do grupo carboxila é menos eletrofílico e menos suscetível ao ataque nucleofílico quando comparado ao mesmo grupo em compostos de ésteres carboxilatos, por exemplo. Por conseguinte, para a quebra da ligação peptídica, a enzima funciona como facilitador nesse processo reacional (ROBINSON; NEURATH; WALSH, 1973). As proteases executam a reação de maneira muito eficiente. As taxas de hidrólise peptídica por proteases de serina são na ordem de 10^{10} vezes maiores do que as reações não catalisadas. Este mecanismo catalítico não é exclusivo da hidrólise de peptídeos: proteases de serina também catalisam a hidrólise de outros compostos como acilas, amidas, ésteres e tioésteres (LIMA, 2016).

2. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

2.1. HIPÓTESE

Se a β -ciclodextrina atua estabilizando e modificando o comportamento físico-químico de diversas moléculas, como descrito na literatura, então a adição de β -ciclodextrina em um sistema contendo a proteína β -tripsina resultará no aumento da estabilidade cinética e termodinâmicas da enzima.

2.2. JUSTIFICATIVA

Os benefícios da ciclodextrinas na modulação do comportamento físico-químico de diversas moléculas é largamente descrito na literatura científica. Suas características em promover estabilidade, ser um carreador de fármacos, aumentar a solubilidade de substâncias de interesse e de ser um agente encapsulador são conhecidas e estão presentes no nosso dia-a-dia. Por outro lado, a β -tripsina é uma enzima estudada a mais de 50 anos, onde se conhece sua estrutura, suas características de atividade enzimática, seus inibidores, substâncias que promovam sua estabilidade ou sua desnaturação além de suas características termodinâmicas. Além disso, a β -tripsina e as enzimas de sua classe, as serino proteases, possuem grande utilização biotecnológica no campo industrial, clínica, biotecnológica, alimentar e ambiental. Com isto, tem-se um grande interesse em buscar formas de aumentar sua estabilidade e seu uso em novas condições de trabalho em que hoje é impossibilitado por falta de *performance* ou incompatibilidade com o meio reacional. Desta forma, os estudos dos parâmetros cinéticos, estruturais e termodinâmicos da β -tripsina em contato com β -ciclodextrina podem fornecer parâmetros importantes para o entendimento desta interação além de possibilitar possíveis novas aplicações em reações de biocatálise.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar os parâmetros físico-químicos da interação de β -tripsina em função da concentração de β -ciclodextrina.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade enzimática da enzima em função da concentração de beta-ciclodextrina;
- Determinar a estabilidade conformacional da enzima beta-tripsina em função da adição de beta-ciclodextrina;
- Determinar a estabilidade termodinâmica do complexo beta-tripsina:beta-ciclodextrina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATÉRIAS

A enzima tripsina de pâncreas bovino (tipo I) (lote:8003), o cloridrato de benzamida (lote: MKBD6501VC97), o cloridrato de 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (tris-HCl), e $N\alpha$ -Benzoil-D,L-Arginina-p-Nitroanilida (BApNA) (loteMVPD5402VC248), e a β -ciclodextrina (lote: SLBB6097VC225) são provenientes da Sigma Aldrich. A glicina (lote: 164602C24), o dimetilsulfóxido (DMSO) (lote: 164983) e o ácido acético glacial (lote: 163892C21) foram adquiridos da Synth.

4.2. OBTENÇÃO DA ISOFORMA β -TRIPSINA

A isoforma β -tripsina foi purificada e isolada a partir da tripsina de pâncreas bovino (tipo I) seguindo a metodologia do trabalho de (ROSA et al., 2017).

4.3. EFEITO DA VARIAÇÃO DO TEMPO E DO pH REACIONAL NA ATIVIDADE AMIDÁSICA DE TRIPSINA.

Para obter informações sobre a melhor condição de pH e tempo de interação da β -tripsina, realizou-se um experimento da atividade amidásica em função de pH e do intervalo de interação do tampão com a enzima. A atividade amidásica da enzima foi medida utilizando a metodologia descrita por (ASCENZI et al., 1981; ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961; LACERDA et al., 2014) usando o substrato sintético cromogênico $N\alpha$ -Benzoil-D,L-Arginina-p-Nitroanilida (BApNA). A catálise deste substrato gera o produto *p*-nitroanilina com absorção em 410 nm. Este substrato foi preparado como solução estoque a 90 mmol·L⁻¹ em DMSO e diluído no tampão específico para cada reação. A reação da enzima com substrato sintético é demonstrada abaixo na Figura 8.

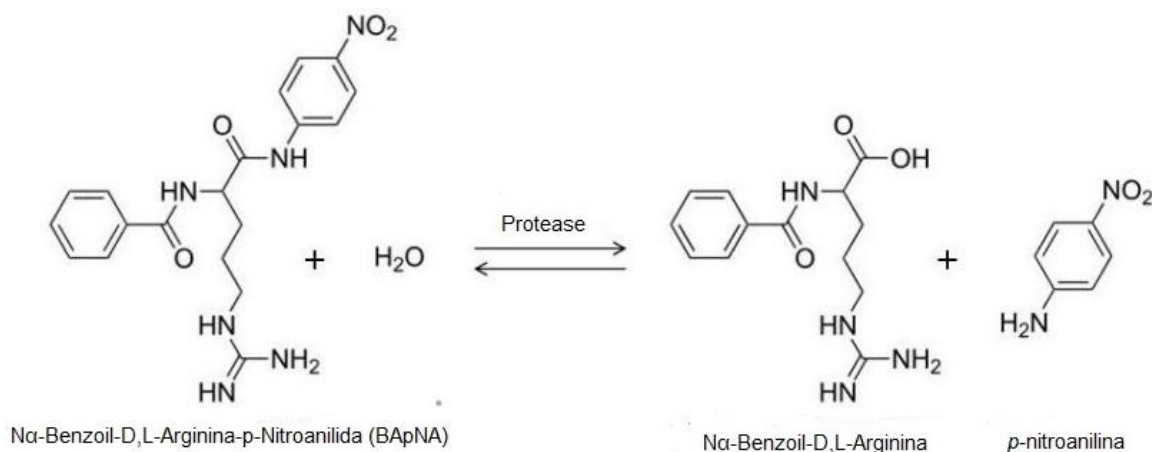


Figura 8. Reação enzimática de catálise do substrato sintético BApNA. Adaptado de Fait (2011).

As amostras contendo β -tripsina (concentração final de $0,04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram pré-incubadas a 25°C por 10, 15, 20 ou 30 minutos e, após este período, o substrato BApNA (solução estoque a $90 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ preparada em DMSO) foi adicionado, alcançando a concentração final de $0,9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. A reação com o substrato ocorreu por 10 minutos a 25°C , sendo paralisada por adição de ácido acético 60% v/v numa fração correspondente a 25% do volume total da reação. Neste ensaio, foram utilizados os tampões Tris $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8,0 a 25°C e glicina $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 3,0 a 25°C . A absorbância da p-nitroanilina a 410 nm foi medida no espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific™) localizado no Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares da Universidade Federal do Espírito Santo (LABIOM/UFES) e os resultados foram expressos como média ($n=3$) \pm um desvio padrão. Todas as determinações de concentração de BApNA usada neste trabalho foram feitas por espectrofotometria utilizando os coeficientes de extinção molar que são de $40000/8000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectivamente (WALSH; WILCOX, 1970).

4.4. EFEITO DA ADIÇÃO DE β -CICLODEXTRINA NA ATIVIDADE AMIDÁSICA DA β -TRIPSINA

A fim de saber se a adição do oligossacarídeo β -ciclodextrina provocou mudanças na performance da β -tripsina foi realizado um novo experimento de atividade amidásica, como apresentado no item 4.3, porém com algumas alterações: a adição de β -ciclodextrina, com proporção β -tripsina: β -CD variando entre 1:0 e 1:60 (m/m). Estes

valores foram descritos na metodologia de (DENADAI et al., 2006). A reação enzimática ocorreu apenas em pH 8,0.

As amostras contendo β -tripsina (concentração final de 0,04 mg.mL⁻¹) mais β -CD variando na proporção β -tripsina: β -CD 1:0, 1:2, 1:10, 1:30 ou 1:60 (m/m) foram pré-incubadas a 25°C por 10 minutos e, após este período, o substrato BA ρ NA (solução estoque a 90 mmol.L⁻¹ preparada em DMSO) foi adicionado, alcançando a concentração final de 0,9 mmol.L⁻¹. A reação com o substrato ocorreu por 10 minutos a 25°C, sendo paralisada por adição de ácido acético 60% v/v numa fração correspondente a 25% do volume total da reação. Neste ensaio, foi utilizado o tampão Tris 50 mmol.L⁻¹ pH 8,0 a 25°C. A absorbância da *p*-nitroanilina foi medida a 410 nm no espectrofotômetro NanoDrop[®] 2000 localizado no LABIOM/UFES, e a concentração foi calculada dividindo o valor da absorção/epsilon molar da *p*-nitroanilina. O software Origin Pro 8[®] foi usado para análise dos dados brutos e os resultados foram expressos como média (n=3) \pm um desvio padrão.

4.5. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA β -TRIPSINA VARIANDO O TEMPO E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO

A fim de entender como a adição do oligossacarídeo β -ciclodextrina altera a performance da β -tripsina durante um período de até 6 horas em temperatura ambiente (25°C) ou refrigerada (4°C) foi realizado um novo experimento de atividade amidásica, como apresentado no item 4.3, porém com algumas alterações: a adição de β -ciclodextrina, com proporção β -tripsina: β -CD de 1:0 e 1:30 (m/m), tempo de pré-incubação de 1, 2, 3 ou 6 horas e temperatura de pré-incubação de 4 ou 25°C.

As amostras contendo β -tripsina (concentração final de 0,04 mg.mL⁻¹) mais β -CD variando na proporção β -tripsina: β -CD 1:0 ou 1:30 (m/m) foram pré-incubadas a 4°C ou 25°C por 1, 2, 3 ou 6 horas e, após este período, o substrato BA ρ NA (solução estoque a 90 mmol.L⁻¹ preparada em DMSO) foi adicionado, alcançando a concentração final de 0,9 mmol.L⁻¹. A reação com o substrato ocorreu por 10 minutos a 25°C, sendo paralisada por adição de ácido acético 60% v/v numa fração correspondente a 25% do volume total da reação. Neste ensaio, foi utilizado o tampão Tris 50 mmol.L⁻¹ pH 8,0 a 25°C. A absorbância da *p*-nitroanilina foi medida a 410 nm

no espectrofotômetro NanoDrop® 2000 localizado no LABIOM/UFES, e a concentração foi calculada dividindo o valor da absorção/epsilon molar da *p*-nitroanilina. O software Origin Pro 8® foi usado para análise dos dados brutos e os resultados foram expressos como média (n=3) ± um desvio padrão.

4.6. INIBIÇÃO DA β -TRIPSINA PELA BENZAMIDINA

A utilização de benzamidina durante os ensaios termodinâmicos permite a observação de resultados que expressem fielmente o que está acontecendo, ou seja, que os resultados obtidos pela movimentação/desnaturação da enzima não seja atrapalhado pela autólise que ela sofreria em pH 8,0, por isto optamos por utilizar a benzamidina, que é um inibidor reversível da β -tripsina, para que esta enzima não possua atividade enzimática e nem sofra autólise, fazendo com que as mudanças observadas não sejam provocadas por fatores provenientes da enzima.

A fim de saber por quanto tempo a enzima permanece ativa com a presença de β -ciclodextrina foi realizado outro experimento de atividade amidásica, como apresentado no item 4.3, com a adição ou não do inibidor reversível cloridrato de benzamidina na concentração de 1,0 mmol·mL⁻¹ e tempo de incubação pré adição do substrato amidásico variando de 1 minuto até 240 horas. As amostras contendo β -tripsina (concentração final de 0,04 mg·mL⁻¹) mais β -CD na proporção β -tripsina: β -CD 1:30 (m/m) e cloridrato de benzamidina 0,0 ou 1,0 mmol·mL⁻¹ foram pré-incubadas a 25°C pelo tempo de 1 minuto até 240 horas e, após este período, o substrato BA_pNA (solução estoque a 90 mmol·L⁻¹ preparada em DMSO) foi adicionado, alcançando a concentração final de 0,9 mmol·L⁻¹. A reação com o substrato ocorreu por 10 minutos a 25°C, sendo paralisada por adição de ácido acético 60% v/v numa fração correspondente a 25% do volume total da reação. Neste ensaio, foi utilizado o tampão Tris 50 mmol·L⁻¹ pH 8,0 a 25°C. A absorbância da *p*-nitroanilina foi medida a 410 nm no espectrofotômetro NanoDrop® 2000 localizado no LABIOM/UFES, e a concentração foi calculada dividindo o valor da absorção/epsilon molar da *p*-nitroanilina. O software Origin Pro 8® foi usado para análise dos dados brutos e os resultados foram expressos como média (n=3) ± um desvio padrão.

4.7. EFEITO DA ADIÇÃO DE BENZAMIDINA NA ATIVIDADE AMIDÁSICA DA β -TRIPSINA EM UM SISTEMA CONTENDO β -CICLODEXTRINA COM INCUBAÇÃO EM TEMPERATURAS ELEVADAS.

Para que os experimentos espectroscópicos da interação de β -tripsina e β -CD fossem realizados em pH 8,0, foi necessário realizar este experimento com a enzima sendo inibida reversivelmente por cloridrato de benzamidina. Para isso foi testado o sistema β -tripsina: β -CD:benzamidina em temperaturas diferentes para observação da conservação ou não inibição durante o tempo de experimento.

Assim, foi realizado outro experimento de atividade amidásica, como apresentado no item 3.1, com as seguintes alterações: Adição ou não do inibidor reversível cloridrato de benzamidina na concentração de $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ e temperatura de incubação pré e pós adição do substrato amidásico variando entre 37, 50 e 70°C .

Com estas mudanças, temos o seguinte meio reacional:

As amostras contendo β -tripsina (concentração final de $0,04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) mais β -CD na proporção β -tripsina: β -CD 1:30 (m/m) e cloridrato de benzamidina $0,0$ ou $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram pré-incubadas a 25°C pelo tempo de 10 minutos e, após este período, o substrato BA p NA (solução estoque a $90 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ preparada em DMSO) foi adicionado, alcançando a concentração final de $0,9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. A reação com o substrato ocorreu por 10 minutos a 25°C , sendo paralisada por adição de ácido acético 60% v/v numa fração correspondente a 25% do volume total da reação. Neste ensaio, foi utilizado o tampão Tris $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8,0 a 25°C . A absorbância da *p*-nitroanilina foi medida a 410 nm no espectrofotômetro NanoDrop[®] 2000 localizado no LABIOM/UFES, e a concentração foi calculada dividindo o valor da absorção/epsilon molar da *p*-nitroanilina. O software Origin Pro 8[®] foi usado para análise dos dados brutos e os resultados foram expressos como média ($n=3$) \pm um desvio padrão.

4.8. USO DO ESPECTRO DE UV PARA VISUALIZAÇÃO DE ALTERAÇÕES CONFORMACIONAIS GLOBAIS PROVOCADAS PELA β -CICLODEXTRINA NA β -TRIPSINA

A fim de verificar se ocorrem mudanças conformacionais globais no perfil do espectro de UV da tripsina devido a adição de β -ciclodextrina, realizou-se um experimento de varredura do espectro de absorção de UV da tripsina. Para realização deste experimento foi utilizado um espectrofotômetro (Shimadzu™ UV-1800) localizado no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LBAA) na UFE.

Para a aquisição de dados foram utilizados os seguintes parâmetros do equipamento:

- Varredura de 253 a 400 nm;
- Resolução de 1 nm;
- Passo de 1 nm;
- Velocidade de varredura de 600 nm/minuto.

O sistema analisado foi composto por β -tripsina $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, com tampão glicina $50 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ pH 3,0 a 25°C com adição ou não de β -ciclodextrina $30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. O tempo de incubação entre o tampão e a enzima antes da realização da leitura foi de 20 minutos. O software Origin Pro 8® foi usado para análise dos dados brutos. Os resultados foram expressos como média ($n=3$) \pm um desvio padrão.

4.9. INFLUÊNCIA DA LIOFILIZAÇÃO NA INTERAÇÃO ENTRE β -CICLODEXTRINA E β -TRIPSINA

A fim de avaliar se o sistema β -tripsina: β -CD liofilizado apresentaria mudanças na estabilidade em relação ao sistema líquido, realizou-se a liofilização de soluções de tripsina com ou sem adição de β -ciclodextrina. A β -tripsina foi diluída em solução tampão contendo glicina $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 3,0 a 25°C com adição de β -ciclodextrina (0 ou $30,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), tendo o volume final do sistema de 1,0 mL e a concentração final da enzima de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, em seguida foi realizada o armazenamento em temperatura de 4°C durante 72 horas e -78°C por 24 horas. As amostras foram

liofilizadas no liofilizador Liotop L101 por 24 horas e armazenadas em temperatura de 4°C durante 72 horas.

No momento de utilização experimental, o sistema “e” foi ressuspenso com 1 ml de tampão glicina 50 mmol·L⁻¹ pH 3,0 a 25°C.

4.10. INFLUÊNCIA DA β -CICLODEXTRINA SOBRE A ESTABILIDADE CONFORMACIONAL DA ENZIMA EM MEIO ÁCIDO MONITORADO PELA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A espectroscopia de fluorescência foi usada para a investigação do ambiente estrutural da β -tripsina em presença de β -CD. A interação da β -CD com as cadeias laterais dos aminoácidos apolares, provocam mudanças conformacionais nos aminoácidos aromáticos, que são observadas pelo espectrômetro de fluorescência. Através da variação do comprimento de onda de emissão máximo é possível verificar se os aminoácidos aromáticos estão mais ou menos expostos ao solvente, indicando assim se a conformação adquirida é mais ou menos estável (GAO et al., 2006). A intensidade de fluorescência foi medida usando o espectrofluorímetro Hitachi™ F-2000 (Hitachi Ltd.) ligado a um banho térmico e uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm. O equipamento está localizado no laboratório de Bioquímica Cardiovascular na UFES. O sistema foi composto por β -tripsina 0,2 mg·mL⁻¹, com tampão glicina 50 mmol·mL⁻¹ pH 3,0 a 25°C com adição ou não de β -ciclodextrina na proporção β -tripsina: β -CD 1:30 (m/m). Foram utilizadas também amostras liofilizadas com ou sem adição de β -ciclodextrina como descrito no item 4.9. As amostras foram excitadas em 279 nm e a coleta da varredura foi feita na faixa de 220 a 500 nm, com intervalo de 1 nm. O fotomultiplicador foi ajustado para 400V e a velocidade de varredura foi de 600 nm·min⁻¹. O software Origin Pro 8® foi usado para análise dos dados brutos. Os resultados foram expressos como média (n=3) \pm um desvio padrão.

4.11. VARIAÇÃO DA ESTABILIDADE TERMODINÂMICA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE β -CICLODEXTRINA POR MICROCALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

O estudo microcalorimétrico da desnaturação térmica β -tripsina em pH 3,0 sob a influência da adição de β -ciclodextrina foi realizado seguindo a metodologia descrita por (FREIRE et al., 1992; PRIVALOV; POTEKHIN, 1986). Na Figura 10 está esquematizado o calorímetro diferencial de varredura (DSC). Ele possui duas câmaras adiabáticas, ou seja, suas câmaras que são isoladas de qualquer fonte de troca de calor, possuindo duas células (Referência e Amostra) com volume de 500 μL cada. Adiciona-se a mesma quantidade de calor e este equipamento registra a diferença de temperatura entre as duas células fornecendo como resultado um gráfico de capacidade calorífica em função da temperatura (gráfico mostrado à direita). Após a corrida, realiza-se a subtração da amostra pela linha de base, ajusta-se a concentração de proteína e realiza-se a análise matemática com o modelo de transição em dois estados.

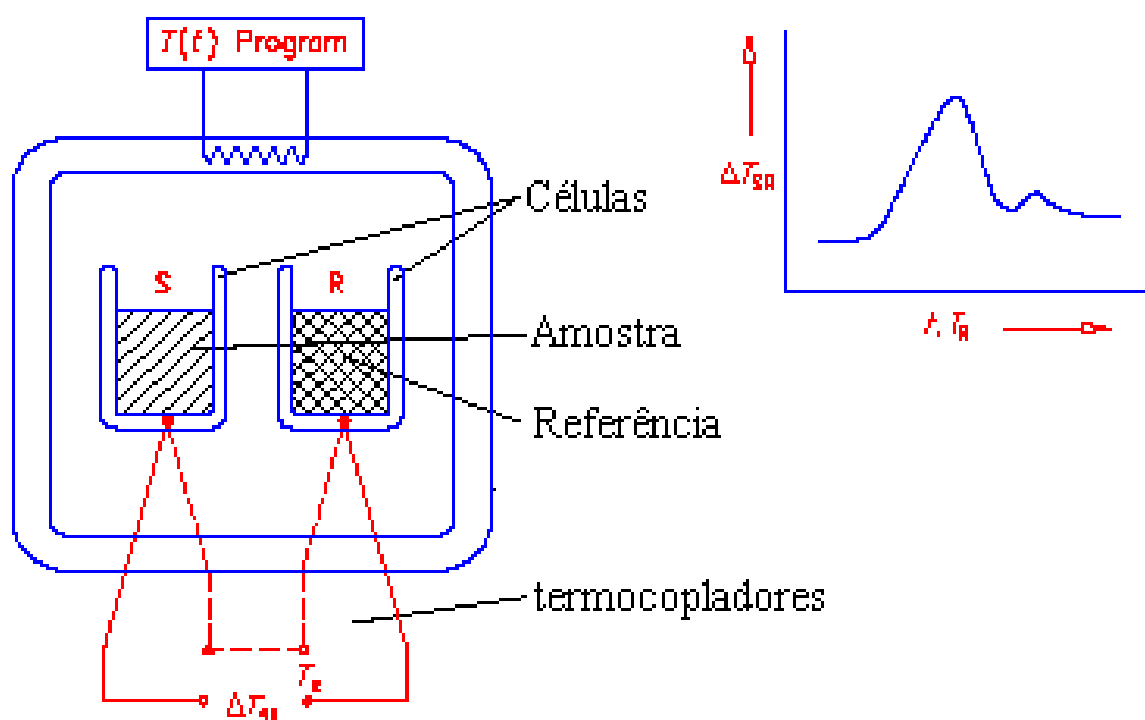


Figura 9. Esquema de funcionamento do DSC. Adaptado de (HEMMINGER; SARGE, 1998)

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[®].

A β -tripsina foi dissolvida em solução tampão contendo glicina $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 3,0 a 25°C com adição de β -ciclodextrina, na proporção β -tripsina: β -CD 1:0 ou 1:30 (m/m), tendo a concentração final da enzima de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A solução proteica e o tampão da célula de referência foram desgaseificadas durante 30 minutos. Aplicou-se $500 \mu\text{L}$ da solução proteica na célula de amostra e $500 \mu\text{L}$ do branco na célula de referência. Em ambas as câmaras foram aplicadas $20,0 \text{ psi}$ de pressão. As corridas foram realizadas no intervalo de temperatura de 20 a 85°C , a uma velocidade de varredura de $60^\circ\text{C}/\text{h}$.

Foram produzidas linhas de base para as duas variações de concentração de β -ciclodextrina 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 β -tripsina. 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 e \pm um desvio padrão.

Para a obtenção dos parâmetros termodinâmicos, usou-se o software Origin-DSC® (Malvern Panalytical™). Ele subtrai a linha de base, fazendo uma conexão linear entre o estado nativo e desnaturado e ajuste de curvas com modelos predeterminados dos dados processados. Para a deconvolução das curvas, foi utilizado o modelo clássico de transição em dois estados. 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 desnaturada. 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 (PRIVALOV; POTEKHIN, 1986; STURTEVANT, 1987).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. ANÁLISE DO MELHOR TEMPO DE INTERAÇÃO ENTRE A β -TRIPSINA E O SISTEMA TAMPÃO

Com o intuito de descobrir qual é a melhor condição de pH e tempo que seja seguro para se monitorar a interação entre a β -tripsina e o meio reacional sem que a atividade da enzima começa a decair por autólise, foi realizado um teste enzimático com variação de tempo de 10 até 30 minutos, utilizando dois valores de pH diferentes, pH 3,0 e pH 8,0 (ASCENZI et al., 1981; ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961; FOUCAULT; SEYDOUX; YON, 1974; LACERDA et al., 2014).

Estes valores de pH foram escolhidos devido em pH 8,0 a enzima apresentar a maior atividade enzimática e em pH 3,0 a atividade é reduzida (FOUCAULT; SEYDOUX; YON, 1974; LACERDA et al., 2014). Este experimento foi importante para garantir que os resultados estruturais e termodinâmicos a serem tratados nos experimento posteriores, sejam a resposta de uma molécula e não de partes dela (LACERDA et al., 2014), e que a variação da atividade em função da adição de β -CD seja monitorada para uma concentração constante de proteínas. Para a realização da atividade amidásica, foi usado como substrato sintético cromogênico BA ρ NA, seguindo o método já padronizado por (ROSA et al., 2017).

Na Figura 10, os resultados obtidos pela absorção em 410nm, indicam indiretamente a atividade enzimática da β -tripsina que catalisa a produção do cromóforo *p*-nitroanilina, que será “lido” em 410nm. Os resultados enzimáticos dos diferentes experimentos deste trabalho foram representados pela divisão da absorção de *p*-nitroanilina pelo seu Epsom molar, obtendo a concentração do produto da atividade e relativizando ao maior valor de cada experimento, fornecendo, assim, a concentração de *p*-nitroanilina relativa. Os resultados foram expressos em média (n=3) e \pm um desvio padrão.

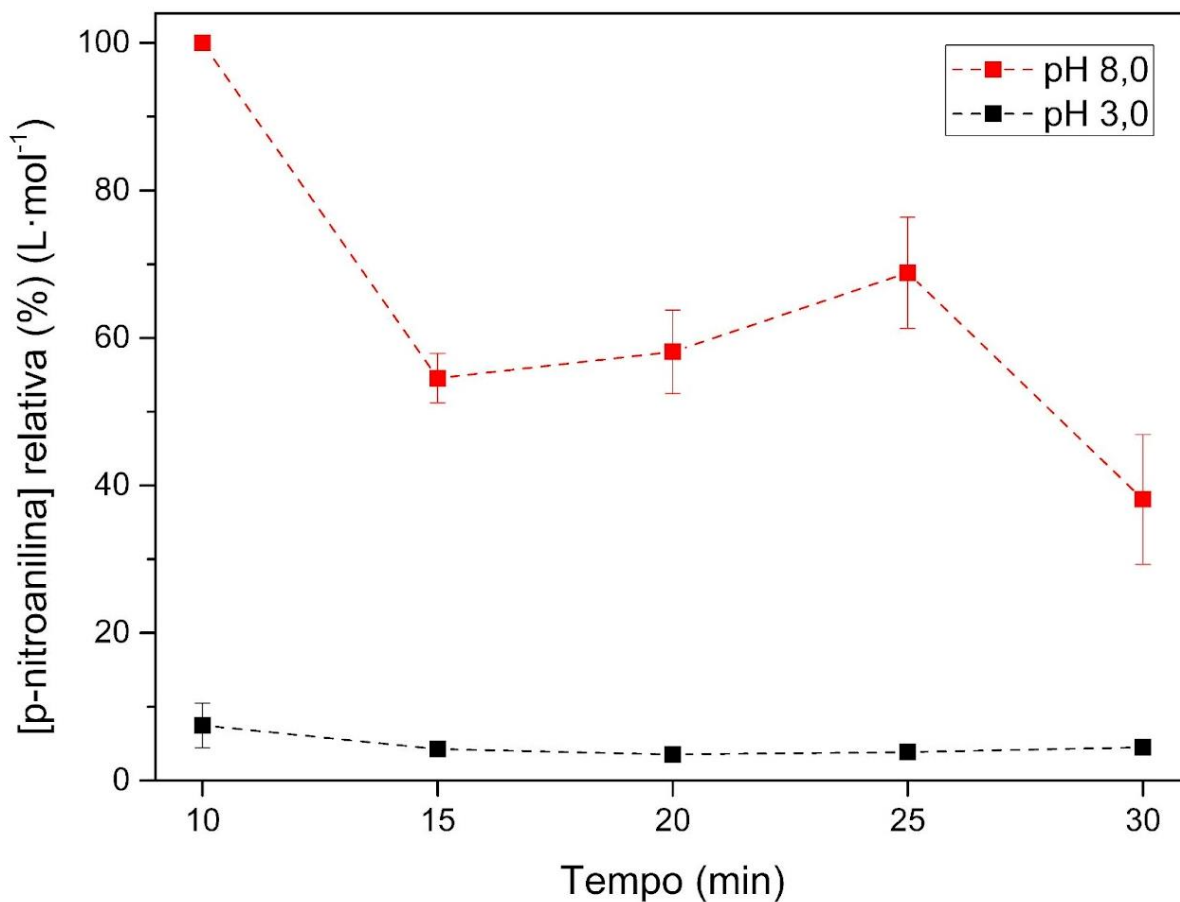


Figura 10. Concentração relativa de *p*-nitroanilina em diferentes tempos de interação entre a β -tripsina e o meio reacional em temperatura de 25°C. Os valores no eixo Y representam a concentração relativa de *p*-nitroanilina encontrada em cada amostra e os valores no eixo X representam o tempo de interação entre a proteína e tampão antes da adição do substrato BApNA. Usou-se como tampão tris-HCl 50 mmol.L⁻¹, pH 8,0, e glicina 50 mmol.L⁻¹, pH 3,0. O cromóforo foi detectado a 410 nm. Os resultados estão expressos como média (n=3) \pm um desvio padrão.

Como pode ser visto na Figura 10, o sistema apresentou produção residual de *p*-nitroanilina em todos os tempos de incubação testados, indicando que neste pH o consumo de BApNA foi mínimo. Já no sistema em pH 8,0, o maior valor, 100%, foi encontrado em 10 minutos, com uma queda de aproximadamente de 45% em 15 minutos, permanecendo constante até 25 minutos e em 30 minutos a concentração de *p*-nitroanilina obtida foi de 37% em relação ao obtido em 10 minutos.

O perfil de atividade amidásica da isoforma β -tripsina testada segue o perfil típico das diversas isoformas de tripsina (BEN KHALED et al., 2011; ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961; LACERDA et al., 2014; OUTZEN et al., 1996; SANTOS, Alexandre Martins Costa, 2009) em que no meio ácido a atividade enzimática apresentada é residual, mas na faixa de pH 7,5-8,5 apresenta sua melhor performance. Nestes experimentos citados as diversas isoformas de β -tripsina estudadas apresentam sua melhor atividade próximo ao pH 8,0, tendo um decréscimo à medida em que o pH do meio é acidificado, como pode ser observado na Figura 10.

Em pH 3,0 houve pouca atividade da β -tripsina, pois neste ambiente as cadeias laterais dos aminoácidos participantes da tríade catalítica (His⁵⁷, pKa da cadeia lateral a 25°C: 6,04 e Asp¹⁰², pKa da cadeia lateral a 25°C: 3,90, segundo a numeração do tripsinogênio) estão protonadas, não permitindo que ocorra a formação do complexo conhecido como intermediário tetraédrico, formado pelos aminoácidos Ser¹⁹⁵, Asp¹⁰², His⁵⁷, além do substrato, fazendo com que a catálise do substrato não ocorra, ou seja muito prejudicada (VOET; VOET, 2013). Já em pH 8,0, como a β -tripsina está ativa a catálise diminuirá com o passar do tempo de interação da enzima com o meio reacional, pois a enzima estará catalisando ela mesmo enquanto o teste ocorrer, até consumi-la toda. Então, optamos por utilizar nos próximos experimentos o pH 8,0 e o tempo de interação da enzima com o meio reacional de 10 minutos. Em relação ao tempo de incubação testado, o melhor resultado foi encontrado em 10 minutos no pH 8,0, foi acordado que nossos próximos experimentos serão realizados neste tempo e pH.

5.2. ATIVIDADE AMIDÁSICA DA β -TRIPSINA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE β -CICLODEXTRINA

A fim de observar a influência da β -CD na atividade amidásica da β -tripsina, foi realizado um novo experimento de atividade amidásica variando a concentração de β -CD adicionada ao sistema. Para isto utilizamos como referência o trabalho de (DENADAI et al., 2006) com algumas modificações nas proporções. Para a realização deste experimento, adicionamos β -CD variando de 0 a 30 vezes a massa de tripsina adicionada ao sistema. O tempo de interação entre a proteína e o tampão antes da adição do substrato BApNa foi de 10 minutos, considerado o melhor valor encontrado no experimento anterior. Na Figura 11, os resultados foram expressos pela concentração de *p*-nitroanilina produzida relativa ao maior valor obtido. Os resultados foram expressos em média ($n=3$) e \pm um desvio padrão.

Na Figura 11 pode ser observado a concentração relativa da *p*-nitroanilina produzida em relação ao maior valor máximo encontrado. Os resultados obtidos mostram que, à medida que houve o aumento da concentração de β -CD no sistema, a produção de *p*-nitroanilina também cresceu, indicando um aumento na atividade amidásica da enzima, sendo que nas concentrações 1:30 e 1:60 (m/m) ocorreram as maiores atividades amidásicas.

Uma possível sugestão que explica o aumento da atividade enzimática com aumento da concentração de β -CD pode ser devido a presença de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas (alanina, glicina, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, triptofano, tirosina e valina) na superfície da β -tripsina (Figura 12). A cavidade hidrofóbica da β -CD interage localmente com estes aminoácidos, formando complexos de inclusão entre as cadeias laterais e a β -CD. Esta interação afeta a estrutura tridimensional da proteína, promovendo uma maior estabilidade para a β -tripsina e conseqüentemente um aumento na atividade amidásica (HORSKÝ; PITHA, 1994; IRIE; UEKAMA, 1999), além de interações específicas, que são as interações entre β -CD com os resíduos Hidrofóbicos, deve se levar em conta a função da β -CD como osmólito homotrópico, ou seja, que estabiliza as proteínas aumentando a tensão superficial da camada de solvatação. Tendo em conta que a diferença entre 1:30 e 1:60 é relativamente baixa em comparação ao gasto em dobro da β -CD, escolhemos utilizar a concentração de 1:30 nos próximos ensaios.

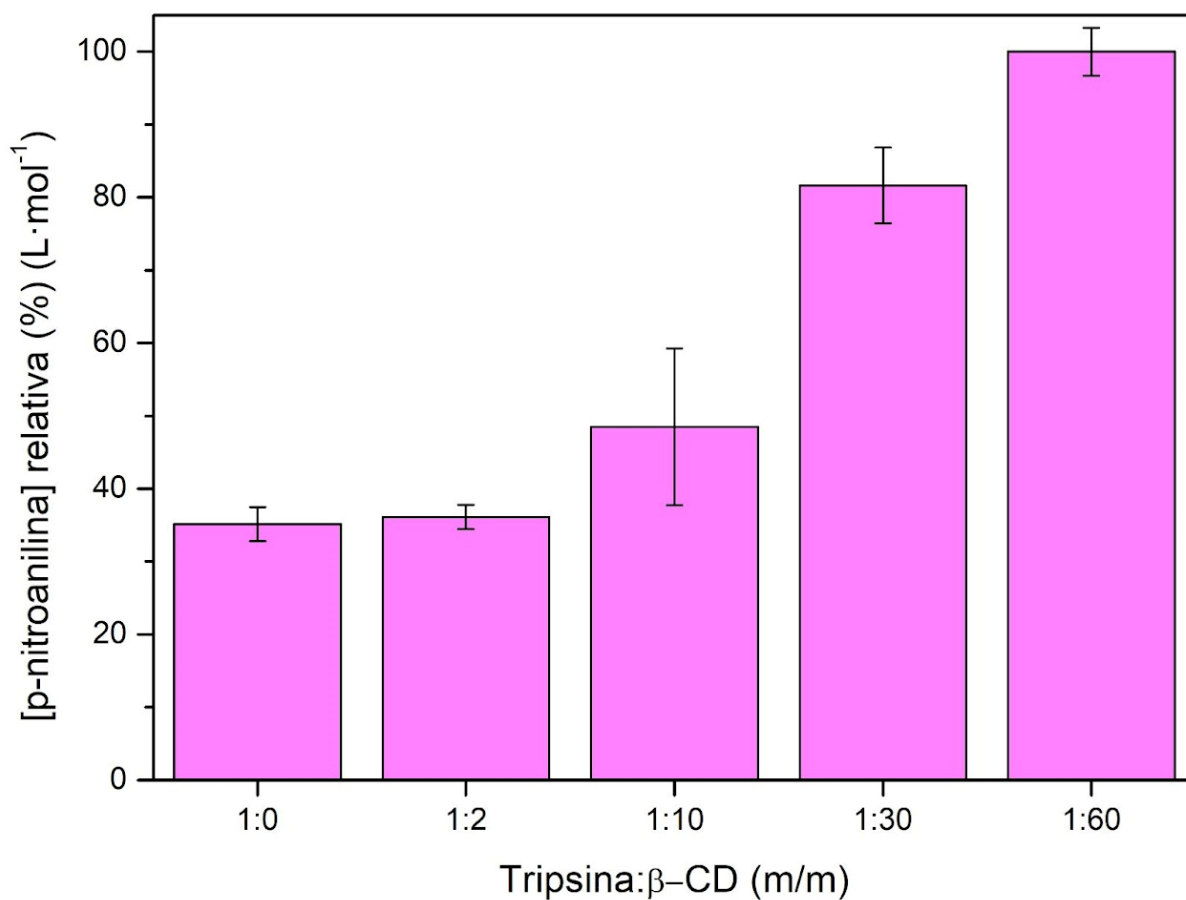


Figura 11. Concentração relativa de *p*-nitroanilina em função da variação de concentração de β-CD adicionada ao sistema proteína-tampão. Usou-se como tampão tris-HCl 50 mmol.L⁻¹, pH 8,0, usando como substrato BApNA. O cromóforo foi detectado a 410 nm. Os valores no eixo Y representam a concentração relativa de *p*-nitroanilina encontrada em cada amostra. Os resultados estão expressos como média (n=3) ± um desvio padrão.

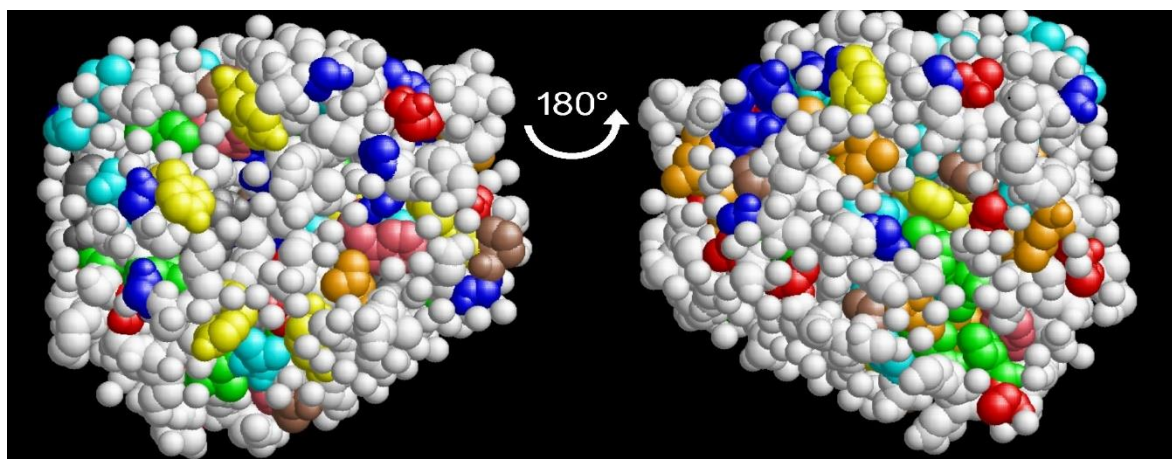


Figura 12. Resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes na superfície da β -tripsina. A alanina está representada em vermelho, a glicina em azul escuro, a isoleucina em verde, a leucina em laranja, a fenilalanina em cinza, a prolina em marrom, a tirosina em amarelo, o triptofano em rosa e a valina em ciano. Imagens em “spacefill” geradas no Rasmol[®] a partir da estrutura da β -tripsina bovina (5ptp.pdb).

5.3. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA β -TRIPSINA VARIANDO O E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO

A fim de entender se a adição de β -CD à β -tripsina fornecerá uma melhora duradoura na atividade da enzima, foi realizado o próximo teste (Figura 13) em que incubamos a β -tripsina junto com a β -CD na proporção de 1:30 (m/m), sendo uma das melhores concentrações encontradas nos experimentos 5.2, durante um período de até 6 horas em temperatura ambiente (25°C) ou refrigerada (4°C). Este teste teve como finalidade entender se a interação de β -CD com a β -tripsina em pH 8,0 provocaram ganhos duradouros na estabilidade da enzima em relação ao sistema sem o carboidrato. Os resultados foram expressos pela concentração de *p*-nitroanilina produzida relativa ao maior valor obtido, sistema sem adição de β -CD incubado à 4°C.

Na Figura 13 temos a concentração relativa da *p*-nitroanilina em função do tempo e temperatura de interação. Os tempos de interação testados foram de 1; 2; 3 e 6 horas, nossos resultados estão representados em azul claro para as amostras armazenadas em temperatura de 4°C e em vermelho para as amostras armazenadas em 25°C, a coluna sem hachura demonstram a atividade para ausência de β -CD e a coluna hachurada a atividade amidásica para o sistema β -tripsina: β -CD 1:30 (m/m).

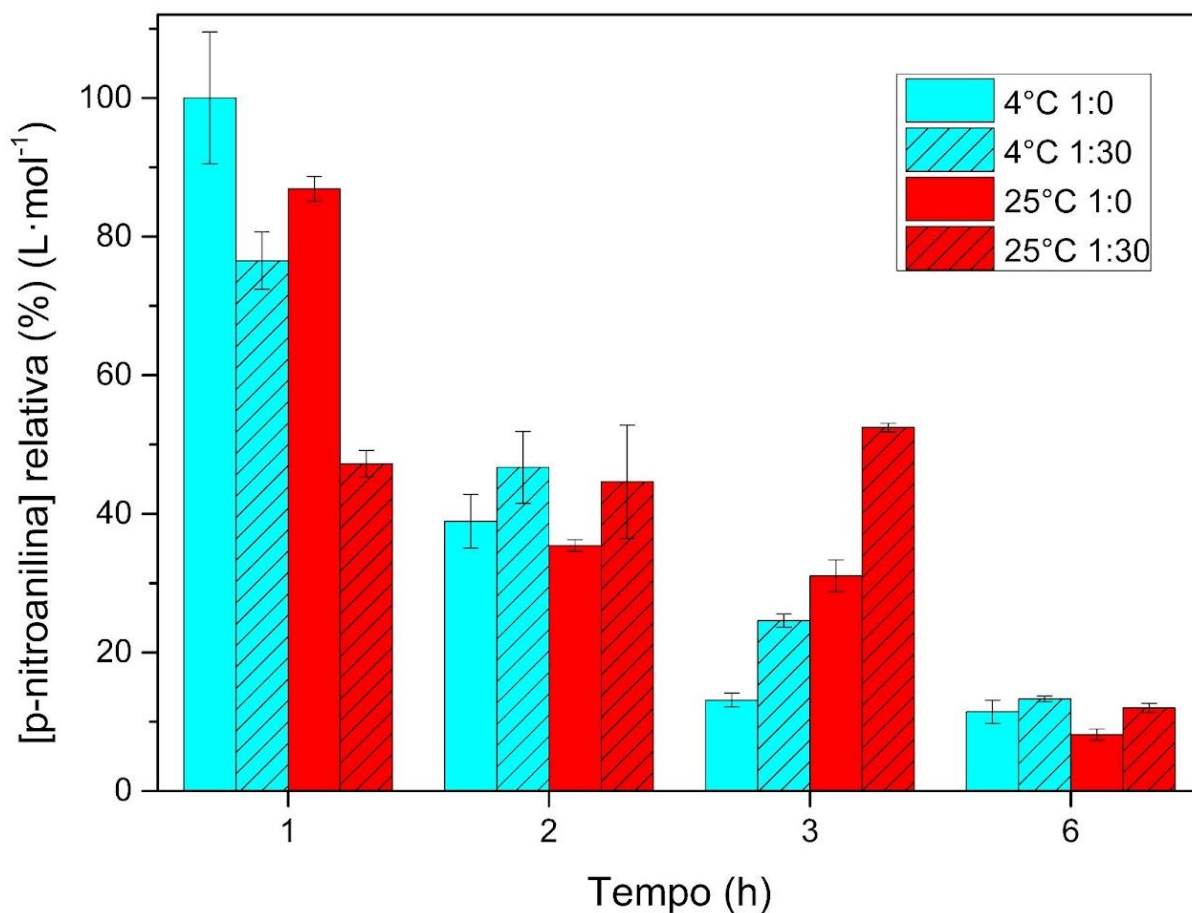


Figura 13. Concentração relativa de *p*-nitroanilina em função da variação de temperatura de incubação (4 e 25°C) e pela adição de benzamidina. As barras em azul representam as amostras que foram incubadas a 4°C, as barras em vermelho as amostras que foram incubadas a 25°C, as barras lisas representam as amostras sem β -CD e as barras rachuradas as amostras contendo β -CD na proporção β -tripsina: β -CD 1:30 (m/m). Usou-se como tampão tris-HCl 50 mmol.L⁻¹, pH 8,0, usando como substrato BA_pNA. O cromóforo foi detectado a 410 nm. Os valores no eixo Y representam a concentração relativa de *p*-nitroanilina encontrada em cada amostra. Os resultados estão expressos como média (n=3) \pm um desvio padrão.

Comparando as duas temperaturas analisadas, temos que em uma hora de incubação as duas diferentes amostras incubadas a 4°C apresentaram atividade enzimática superiores aos seus pares armazenados em 25°C, tendo a amostra sem β -CD armazenada em 25°C apresentando uma produção de *p*-nitroanilina aproximadamente 12% menor em relação à amostra sem β -CD armazenada em 4°C. Já as amostras contendo β -CD na proporção 1:30 (m/m) armazenadas em 4°C apresentaram uma produção de *p*-nitroanilina aproximadamente 60% maior em relação a mesma amostra armazenada em 25°C. Este padrão foi alterado já com duas horas de incubação, onde as diferentes amostras apresentaram uma concentração de produto estatisticamente iguais. Com três horas de incubação, as amostras armazenadas em temperatura ambiente (25°C), apresentaram uma maior atividade enzimática em relação aos seus pares armazenados em refrigeração (4°C), onde a amostras contendo β -CD e incubada a 25°C teve um ganho de 100% na produção de *p*-nitroanilina em relação a mesma amostra incubada a 4°C. Valores próximos foram encontrados quando se compara as amostras incubadas durante três horas sem a presença de β -ciclodextrina, onde houve um aumento de 129% da atividade enzimática devido ao aumento da temperatura de incubação. Por último, nas amostras que foram incubadas durante seis horas tivemos, novamente, uma redução na diferença de produção de *p*-nitroanilina entres as amostras de mesma temperatura de armazenamento. Houve um aumento de 11% na produção de *p*-nitroanilina nas amostras incubadas com β -CD 1:30 (m/m) devido a redução da temperatura de incubação. Já nas amostras armazenadas sem β -CD, este aumento foi de 40%, também devido a redução da temperatura de incubação.

Em relação ao tempo de incubação, com uma hora de incubação é possível notar que as amostras sem a adição de β -CD apresentaram as maiores produções de *p*-nitroanilina, sendo que a amostra armazenada sob refrigeração apresentou o maior resultado em todo o experimento. Com duas horas de armazenamento houve uma grande redução nas atividades enzimáticas, em comparação com os resultados obtidos com uma hora de incubação, das amostras sem β -CD (60% para as amostras armazenada em 4°C e 25°C) e para a amostra com β -CD 1:30 armazenada em 4°C (39%). Já a amostra com β -CD armazenada em 25°C o valor permaneceu constante. Com três horas de incubação, a única amostra que permaneceu com a atividade enzimática constante, quando comparada com os resultados obtidos com 2 horas de

incubação, foi a amostra com β -CD 1:30 armazenada em temperatura ambiente (25°C), as demais apresentaram redução de: 63%, para a amostra sem β -CD armazenada em 4°C; 47%, para amostra com β -CD armazenada em 4°C e 12% para a amostra sem β -CD armazenada em temperatura ambiente. Com seis horas de armazenamento, a única amostra não teve redução na produção de *p*-nitroanilina, quando comparada com os resultados obtidos com 3 horas de incubação, foi a amostra sem β -CD armazenada sob refrigeração (4°C), as demais apresentaram redução de: 46%, para amostra com β -CD 1:30 armazenada em 4°C; 72% para a amostra sem β -CD armazenada em temperatura ambiente (25°C) e 77%, para a amostra com β -CD 1:30 armazenada em 25°C.

Como as amostras estão em pH 8,0, é esperado, com o aumento do tempo de armazenamento, que a β -tripsina sofra autólise reduzindo a quantidade de enzima ativa e, conseqüentemente, a produção de *p*-nitroanilina deveria ser menor. Assim, a manutenção da atividade da enzima em presença da β -ciclodextrina por 3 horas em 25°C e a menor perda em 4°C, demonstra que houve a interação da β -tripsina com o carboidrato. Além disto, a maior produção de *p*-nitroanilina na amostra incubada por 3 horas contendo β -CD armazenada em 25°C em relação a de 4°C pode ser explicada pela agitação das moléculas serem maior em temperatura mais alta, possibilitando uma melhor interação entre a β -CD com a β -tripsina, proporcionando uma melhor estabilidade da enzima e levando, assim, ao aumento da atividade enzimática. Portanto, estes resultados nos indicam que a presença da β -CD melhora a estabilidade da β -tripsina por períodos de até três horas e em pH 8,0.

5.4. UTILIZAÇÃO DA BENZAMIDINA DURANTE OS ENSAIOS TERMODINÂMICOS

A benzamidina é um inibidor reversível da tripsina, quando ocorre a interação, a enzima diminui sua atividade enzimática e o processo de autólise. Assim, quando utilizamos a benzamidina, evitamos que a enzima sofra autólise e se desnature, permitindo com que as análises estruturais e termodinâmicas, em pH 8,0, sejam possíveis e que as mudanças conformacionais observadas sejam provocadas apenas pela β -ciclodextrina e não pela autólise ou desnaturação da β -tripsina em pH 8,0. Os resultados apresentados na Figura 14 foram expressos pela concentração de *p*-

nitroanilina relativa ao maior valor obtido. Os resultados foram expressos em média ($n=3$) e \pm um desvio padrão.

Os resultados apresentados na Figura 14 foram expressos pela concentração de *p*-nitroanilina relativa ao maior valor obtido, sendo expressos em média ($n=3$) e \pm um desvio padrão.

Os resultados da Figura 14 mostram que na ausência de benzamidina, a atividade amidásica da β -tripsina decresce a partir de 2 horas, o que é provocada pela autólise da mesma, sendo que em 1 hora a atividade já reduziu em 40%. A queda na produção de *p*-nitroanilina neste tempo pode ter ocorrido devido a oscilação de comportamento de área do experimento. Porém o valor encontrado com 1 hora de incubação não interfere no resultado deste experimento, já que ao desconsiderarmos este tempo, a produção de *p*-nitroanilina permanece estável desde do início do experimento até 2 horas de incubação.

Em pH 8,0, o grupo amida apresenta-se protonado e liga-se com a tríade catalítica da β -tripsina. Como este inibidor apresenta alta afinidade com esta enzima (KRIEGER; KAY; STROUD, 1974), a tríade catalítica permanecerá ocupada durante todo o experimento. Assim, a utilização da benzamidina ocasiona na produção residual de *p*-nitroanilina durante todo o experimento de 240 horas, indicando que a benzamidina continuará atuando sobre a proteína durante este tempo, sendo assim a sua utilização é segura para impedir a autólise da enzima.

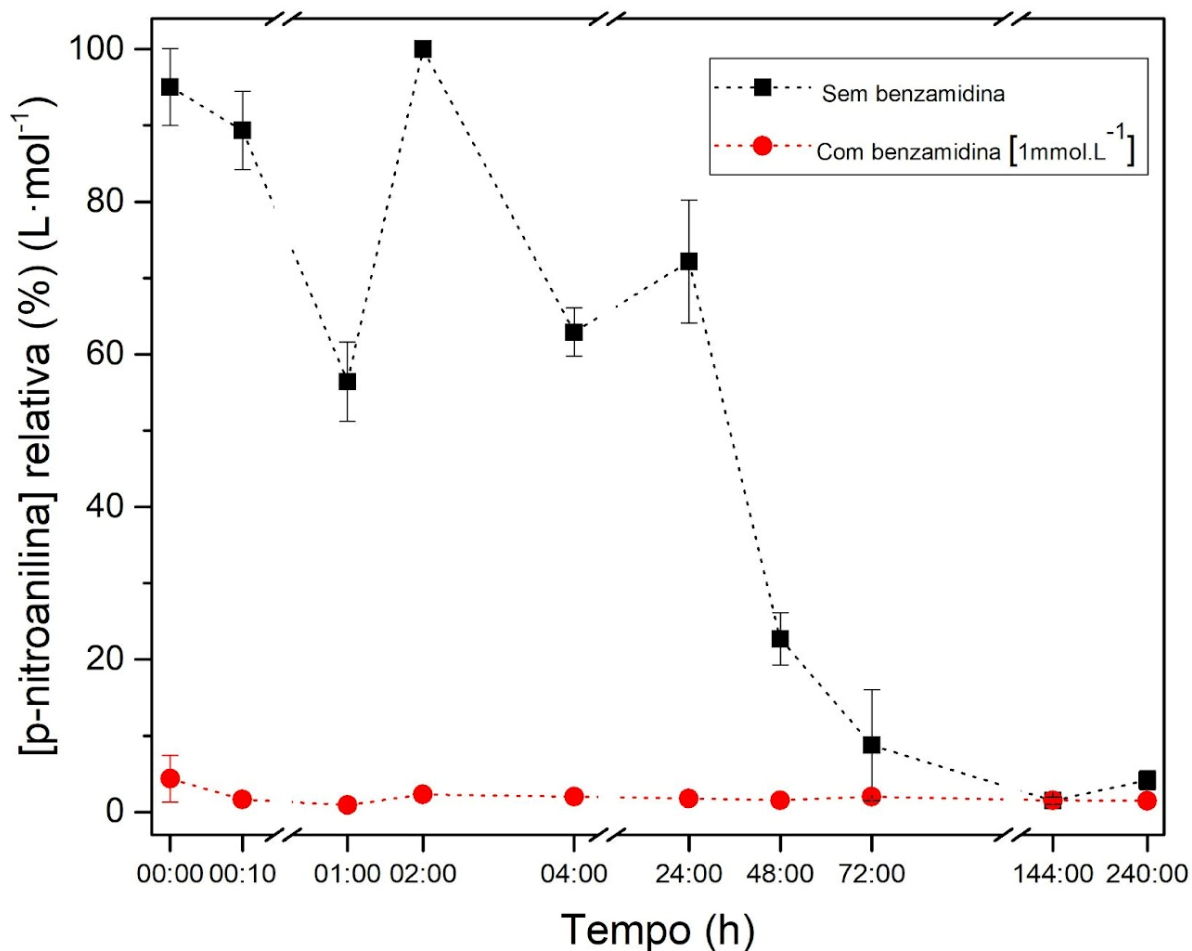


Figura 14. Concentração relativa de *p*-nitroanilina em função da variação em função da adição do inibidor benzamidina e intervalo de incubação (0 min, 10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h 144 h e 240 hs) a 25°C, usando como tampão tris-HCl 50 mmol.L⁻¹, pH 8,0 mais β -CD na proporção 1:30 (m/m), e como substrato BA ρ NA. Os círculos em vermelho indicam os resultados contendo benzamidina na concentração de 1 mmol.L⁻¹, já os quadrados pretos indicam resultados obtidos sem a adição da benzamidina. O cromóforo foi detectado a 410 nm. Os resultados estão expressos como média (n=3) \pm um desvio padrão.

A melhor maneira para realizar os estudos estruturais e termodinâmicos seria utilizar o valor de pH em que a enzima apresenta a maior atividade enzimática, para as isoformas da β -tripsina seria em pH 8,0, pois a enzima estaria com sua melhor conformação estrutural. Assim, normalmente os estudos estruturais e termodinâmicos para as diferentes isoforma da β -enzima tripsina ocorrem em pH 3,0 (BITTAR et al., 2003; LACERDA et al., 2014; ROSA et al., 2017; SANTOS, A. M.C. et al., 2008), onde o risco de autólise não ocorre, mas sim ligeiras mudanças conformacionais provocadas pela desprotonação dos aminoácidos. Ao utilizarmos a benzamidina, conseguimos realizar estes experimentos em pH 8,0, possibilitando a visualização de mudanças conformacionais locais ou globais provocados pela β -CD que ocorreriam no pH de atividade da enzima e eliminando a possibilidade de que estas mudanças ocorreram pela degradação da enzima. Portanto, a utilização deste inibidor nos experimentos futuros é benéfica para a realização deste trabalho.

5.5. EFEITO DA ADIÇÃO DE BENZAMIDINA NA ATIVIDADE AMIDÁSICA DA β -TRIPSINA EM UM SISTEMA CONTENDO β -CICLODEXTRINA COM INCUBAÇÃO EM TEMPERATURAS ELEVADAS

Para realizar os experimentos termodinâmicos no DSC, é necessário atingir temperaturas elevadas, de até 90°C, porém é preciso saber se a benzamidina ainda continua inibindo a β -tripsina nestas condições quando os experimentos fossem realizados em pH 8, para descobrir isso, foi realizado um experimento de atividade amidásica utilizando diferentes temperaturas de incubação. As temperaturas utilizadas durante a realização dos experimentos foram 37, 50 ou 70°C com um tempo de interação de 10 minutos, a reação de atividade amidásica foi realizada na mesma temperatura de incubação (Figura 15). Os resultados foram expressos pela concentração de *p*-nitroanilina produzida relativa ao maior valor obtido, sistema sem adição de benzamidina incubado à 37°C.

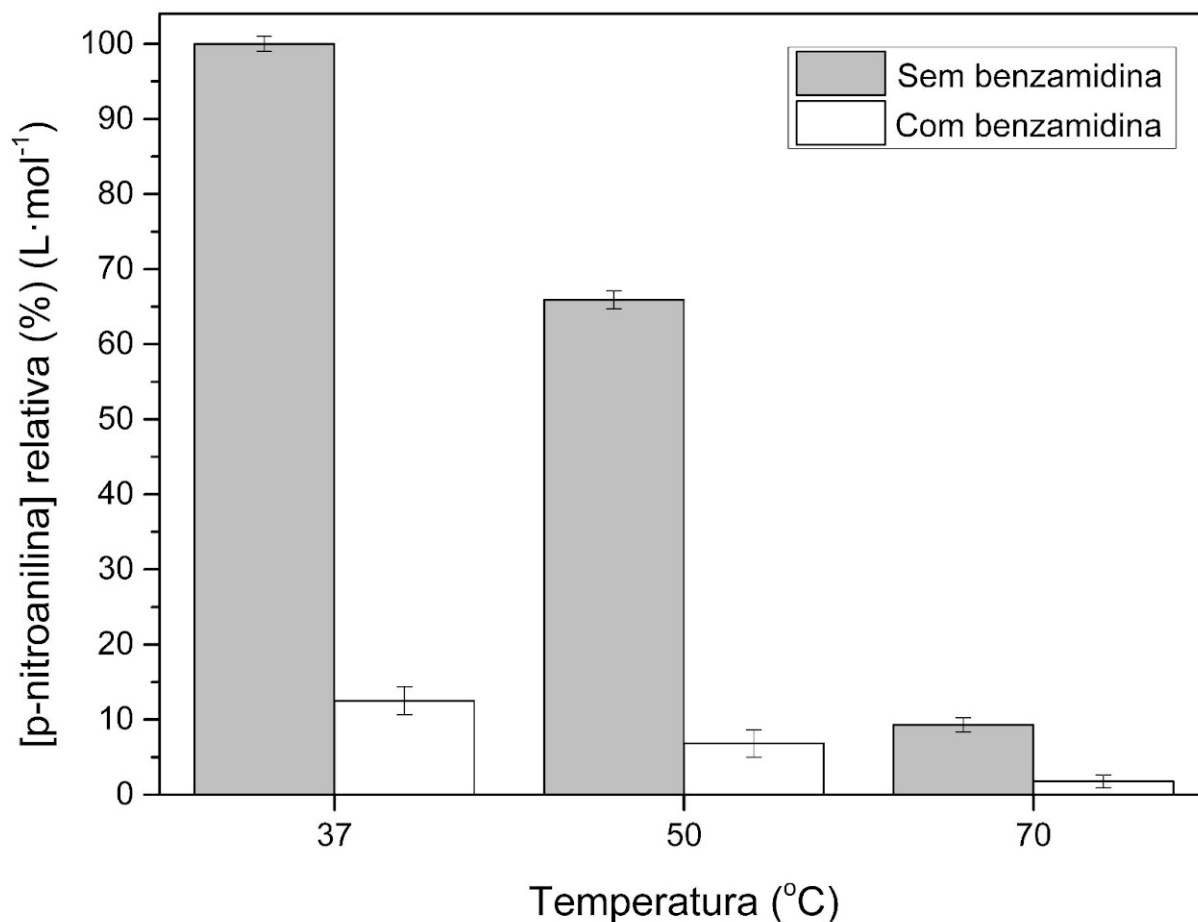


Figura 15. Concentração relativa de *p*-nitroanilina em função da variação de temperatura de incubação (37, 50 e 70°C) e pela adição de benzamida. As barras em cinzas representam os valores encontrados nas amostras com ausência de benzamida, já as barras brancas representam os valores encontrados nas amostras contendo benzamida. Usou-se como tampão tris-HCl 50 mmol.L⁻¹, pH 8,0, usando como substrato BA_pNA. O cromóforo foi detectado a 410 nm. Os valores no eixo Y representam a concentração relativa de *p*-nitroanilina encontrada em cada amostra. Os resultados estão expressos como média (n=3) ± um desvio padrão.

Na Figura 15 podemos observar a concentração relativa da *p*-nitroanilina produzida em relação ao valor máximo encontrado pela temperatura de incubação em 37, 50 e 70°C, nas barras coloridas de cinza temos os resultados obtidos pela atividade amidásica da β -tripsina sem a utilização de benzamidina, e nas barras em branco os valores obtidos com a utilização de benzamidina 1 mmol·L⁻¹ no sistema de incubação. O sistema sem benzamidina/enzima apresentou a maior produção de *p*-nitroanilina em 37°C, ocorrendo a diminuição da atividade amidásica com o aumento da temperatura do experimento, sendo que em 70°C o valor obtido foi apenas 10% do máximo. Ao utilizar benzamidina em 37°C, a produção de *p*-nitroanilina foi aproximadamente 88% menor se comparado ao sistema sem a utilização de benzamidina. À medida que a temperatura aumentou, a atividade enzimática diminuiu, apresentando em 70°C uma produção residual do produto. Podemos notar que a utilização de benzamidina ajuda a manter valores residuais em todas as temperaturas testadas, indicando que a benzamidina se mantém ligada/desligada a tripsina durante todo o experimento. Isto indica que a utilização de benzamidina é uma boa opção para impedir que a enzima provoque autólise durante os ensaios termodinâmicos.

Segundo o trabalho publicado por (ROSA et al., 2017), a T_m da β -tripsina, uma das isoformas encontrada na tripsina comercial, é de 56,5°C, ou seja, nesta temperatura 50% das moléculas de β -tripsina estão na sua forma ativa e os outro 50% das moléculas estão desnaturadas. Assim foram realizados experimentos utilizando três temperaturas que representam três situações diferentes: A primeira temperatura 37°C, representa a temperatura usual em que a atividade amidásica da β -tripsina é testada (ASCENZI et al., 1981), além disto a enzima está na fase pré T_m . A segunda temperatura 50°C, representa a temperatura próxima ao T_m da β -tripsina e a terceira temperatura 70°C, representa a fase em que mais de 50% das moléculas de β -tripsina já estão desnaturadas. Assim, conseguimos verificar que a benzamidina irá se manter ligada à β -tripsina durante os futuros testes termodinâmicos, em que as temperaturas são necessárias, impedindo que a enzima sofra autólise, e garantido que as mudanças conformacionais observadas não sejam provocadas pela autólise da β -tripsina.

5.6. ESPECTRO DE VARREDURA UV-VISÍVEL DA β -TRIPSINA

Como visto anteriormente nos itens 5.4 e 5.5, a benzamidina promoveu inibição enzimática da β -tripsina em temperaturas elevadas (até 70°C) e por um longo período (até 240 horas), permitindo que a análise estrutural seja realizada em pH 8,0, o que inicialmente não seria possível, pois a enzima realiza autólise neste pH. Porém para a realização dos seguintes experimentos, optamos por realizar em pH 3,0, pois a quantidade de benzamidina a ser utilizada nestes experimentos seria muito grande, inviabilizando continuar a utilização em pH 8,0.

Para descobrir se houve mudanças nas propriedades estruturais globais da β -tripsina com a adição de β -CD, optamos por realizar a técnica de espectroscopia absorção no modo varredura no UV (Figura 16), para este experimento foi necessário realizar o próximo teste fazendo a preparação de uma solução de β -tripsina em tampão glicina pH 3,0 contendo ou não adição de β -CD. A metodologia utilizada foi adaptada de Lacerda e colaboradores (2014).

Os resíduos aromáticos presentes na β -tripsina (3 resíduos de fenilalanina, 4 resíduos de triptofano e 10 resíduos de tirosina) encontram-se internalizados quando a enzima se encontra no estado nativo. Assim, uma das formas de se monitorar a desnaturação de uma proteína em meio polar, monitorada indiretamente pela exposição dos resíduos aromáticos externalizados, é pela diminuição da absorção destes resíduos aromáticos, na região entre 260 e 310 nm (SCHMID, 2001). Então, mudanças conformacionais na estrutura da tripsina durante o processo de liofilização provocaram uma desestabilização estrutural que foi observada pela redução na absorção do espectro de UV.

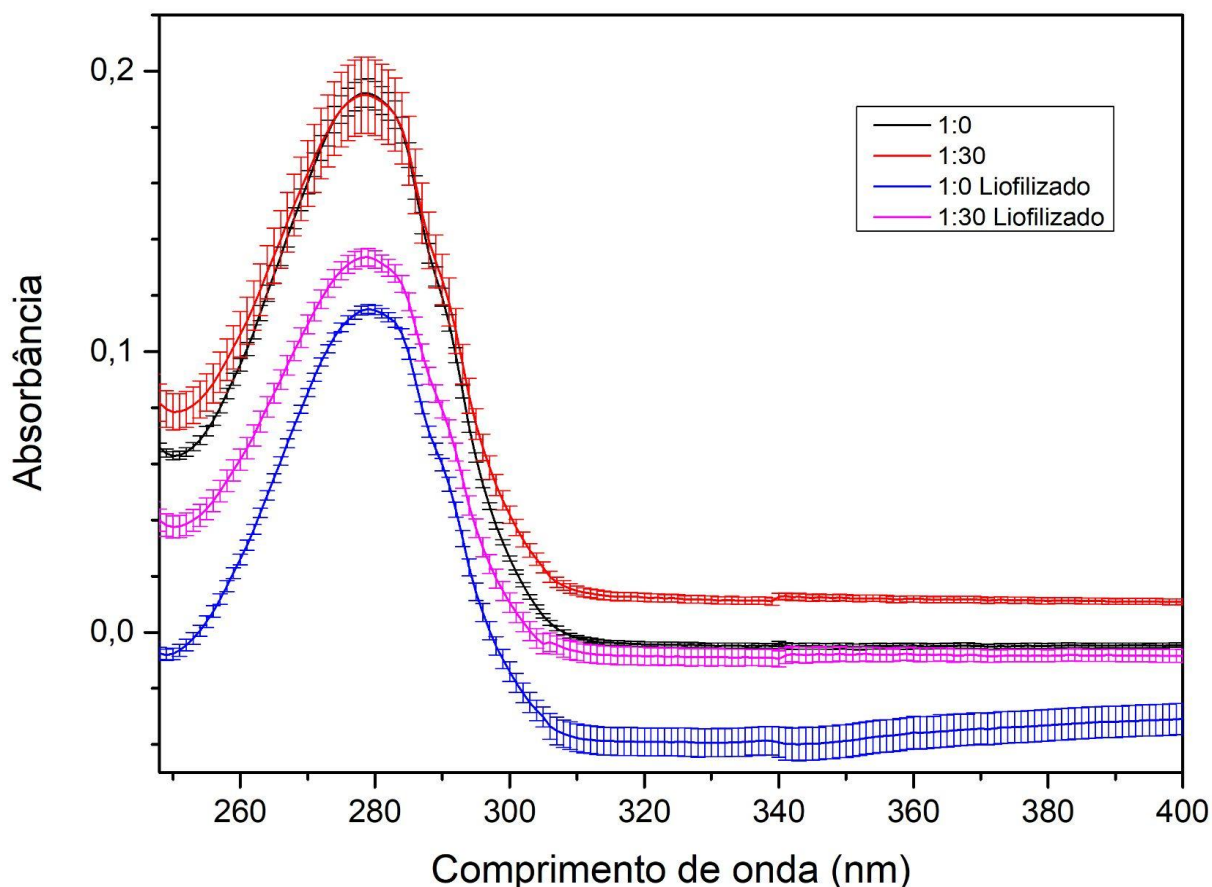


Figura 16. Espectro de varredura do ultravioleta da β -tripsina em meio ácido sob ação da β -ciclodextrina. Os resultados estão expressos como média ($n=3$) \pm um desvio padrão. Usou-se como tampão glicina 50 mmol.L^{-1} , pH 3,0. A linha em preto representa as amostras sem β -CD, a linha em vermelho representa as amostras com proporção β -tripsina: β -CD 1:30 (m/m), a linha em azul representa as amostras previamente liofilizadas sem β -CD e a linha em magenta representam as amostras previamente liofilizadas com proporção β -tripsina: β -CD 1:30 (m/m). Os resultados estão expressos como média ($n=3$) \pm um desvio padrão.

Na Figura 16 temos a absorvência das amostras da β -tripsina em função do comprimento de onda na faixa e 250 até 400 nm. O comprimento de onda de absorção máxima de proteínas é 280 nm, devido a absorção características dos aminoácidos aromáticos: triptofano, tirosina e fenilalanina. Olhando nesse comprimento de 280 nm, podemos observar dois grupos distintos, no grupo I é formado pelas amostras nas proporções de β -tripsina: β -CD 1:0 e 1:30 (m/m) sem liofilizar, que são as que apresentaram as maiores absorções, no grupo II temos amostras nas proporções de β -tripsina: β -CD 1:0 e 1:30 (m/m) ambas liofilizadas, apresentando uma diminuição de aproximadamente 40% menor em 280 nm.

Como a adição de β -CD resultou em aumento na atividade enzimática da β -tripsina, era esperado que fosse refletido em mudanças no espectro de varredura de UV. Entretanto, este experimento não mostrou mudanças na absorção na região entre 270 e 295 nm, sugerindo que as mudanças conformacionais na enzima foram sutis ou que o método utilizado não foi sensível o bastante para detectá-las, sendo necessário a utilização de técnicas mais sensíveis, como a espectroscopia de fluorescência, para detectar estas mudanças estruturais que promovam o aumento da atividade enzimática. Porém houve uma mudança no perfil de absorção a partir de 300 nm, em que a adição de β -CD resultou em aumento de absorção, indicando que o sistema espalhou mais luz, devido a interação do sistema β -tripsina: β -CD, tornando esta amostra com tamanho maior do que a amostra sem β -CD.

5.7. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DA INTERAÇÃO DE β -CD COM A β -TRIPSINA EM PH 3,0

A análise de proteínas por espectroscopia de fluorescência é útil na investigação estrutural, pois sua informação é relacionada às mudanças globais que uma molécula sofre quando é submetida a condições físico-químicas diferentes, a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, além disso é usada pois é muito mais sensível (LAKOWICZ, 2006). Por isso foi utilizada a técnica de espectroscopia de fluorescência para acompanhar o deslocamento máximo de emissão dos aminoácidos aromáticos para verificar os efeitos da adição de β -CD na estrutura da β -tripsina. Nosso experimento foi preparado em uma solução de β -tripsina em tampão glicina pH 3,0, contendo ou não a adição de β -CD (tabela 2).

Tabela 1. Espectroscopia de fluorescência de β -tripsina em função da adição de β -CD.

Tripsina:β-BCD (m/m)	Comprimento de onda máximo (nm)
1:0	334 \pm 1
1:0*	334 \pm 0
1:30	306 \pm 0
1:30*	334 \pm 0

*Amostras ressuspendidas após liofilização e armazenagem por 15 dias.

Como pode ser visto na tabela 2, a comparação dos efeitos da β -CD sobre a estrutura da β -tripsina demonstra que a amostra 1:30 sem liofilização apresentou uma redução em 28 nm do comprimento de onda máximo em relação às outras condições. Os outros perfis apresentaram comprimento de onda máximo iguais.

Quando uma proteína em meio aquoso tem seu equilíbrio para uma região mais estável, esta mudança pode ser monitorada por uma diminuição no comprimento de onda máximo de fluorescência (LAKOWICZ, 2006). Para que o movimento conformacional relativo resulte em mudanças espectroscópicas na enzima β -tripsina, é necessária uma variação da ordem de 7 a 10 nm de acordo com os resultados obtidos por Rosa e colaboradores, 2017. Um ponto importante a se citar sobre este experimento, é que a coleta de dados referentes à emissão de fluorescência fornece diversas informações globais sobre a molécula, sendo possível monitorar as populações de moléculas no estado enovelado e desenovelado. Mas o que se está medindo, de fato, é a alteração conformacional dos resíduos de triptofano e tirosina presentes na enzima. Além disso, vale destacar que a β -tripsina possui 4 resíduos de triptofano e 10 resíduos de tirosina, sendo ambos excitados em 280 nm.

A Tabela 2 indica a variação de comprimento de onda máximo encontrado pelas diferentes amostras utilizadas: sem β -CD e 1:30 e amostras sem β -CD e 1:30 que foram liofilizadas. Como pode ser observado na tabela 2 para amostras que não sofreram o processo de liofilização, a adição de β -CD promoveu uma redução do comprimento de onda máximo de 28 nm. Esta redução pode ser explicada pelo encapsulamento dos resíduos aromáticos presentes na superfície pela β -CD,

protegendo estes aminoácidos do contato com a água superficial e reduzindo a absorção pelo equipamento. Isto nos indica que esta adição promoveu uma maior estabilidade na proteína em relação a não adição de β -CD. Porém estes mesmos resultados não foram encontrados quando analisamos as amostras que sofreram a reiofilização. Ambas amostras apresentaram um comprimento de onda máximo idêntico, de 334 nm, isso nos mostra que um possível stress provocado durante o processo de liofilização do sistema de proteína: β -CD, provocada pela retirada de toda a água da amostra e a β -CD não foi capaz de substituir as interações da água com as proteínas, resultando em processos irreversíveis. Assim, uma nova etapa para obtenção de nosso composto sólido não apresenta as vantagens obtidas pela adição de β -CD num sistema β -tripsina:tampão.

5.8. ANÁLISE TERMODINÂMICA

De acordo com Ahmad (AHMAD, 2004), a estabilidade termodinâmica de uma proteína está diretamente relacionada à estabilidade conformacional da proteína nativa, para descobrir se a β -CD mudará os parâmetros termodinâmicos da β -tripsina foi preciso fazer algumas análises termodinâmicas utilizando o microcalorímetro para obter estes dados.

Para avaliar o processo de desnaturação térmica foi obtido uma curva endotérmica, o qual seus parâmetros serão utilizados para obter os dados termodinâmicos. Para todas as transições foi observada uma reversibilidade de >95%. Na tabela 3 temos os parâmetros termodinâmicos da β -tripsina em função da concentração de β -CD. Foram obtidos os valores para o T_m , que é a temperatura em que 50% das moléculas estão no estado desnaturado; a variação de entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}), que relaciona a variação da constante de equilíbrio (K_{eq}) de uma reação química com a variação de temperatura (T) dada a variação da entalpia padrão para o processo; a variação de entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}), que é a mudança de entalpia que o sistema consome ou libera para que a transição ocorra; a variação de entropia no T_m (ΔS_{Tm}), e o índice de cooperatividade (IC), que é a distância entre as bordas do pico a meia altura. Para este experimento, foram utilizadas apenas as amostras que não foram liofilizadas, já que a liofilização do sistema β -tripsina: β -CD não apresentou ganho na estabilidade da enzima, como visto no tópico 5.7.

Tabela 2. Parâmetros termodinâmicos da β -tripsina em função da proporção β -tripsina: β -ciclodextrina (m/m), em pH 3,0.

Trip:β-BCD (m/m)	T_m¹ (K)	ΔH_{vH}² (kcal·mol ⁻¹ UC)	ΔH_{cal}³ (kcal·mol ⁻¹)	$\Delta H_{cal} / \Delta S_{Tm}$	ΔS_{Tm}⁴ (kcal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	IC⁵ (mol·kcal ⁻¹)
1:0	331,5 ± 0,8	99,5 ± 4,94	94,1 ± 1,0	0,948	0,28 ± 0,01	0,64 ± 0,01
1:30	333,5 ± 0,4	103,5 ± 0,90	102,2 ± 1,2	0,947	0,39 ± 0,01	0,65 ± 0,01

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

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

³Variação de entalpia quando uma molécula desnatura.

⁴Variação da entropia no T_m .

⁵Índice de cooperatividade.

Podemos notar que a adição de β -CD, na proporção β -tripsina: β -CD 1:30 (m/m), aumenta o T_m da enzima em 2 K, possuindo uma influência estabilizadora maior do que a solução sem β -CD. O efeito direto da estabilização da β -CD pode ser observado pelo deslocamento do equilíbrio nativo e desnaturado para o sentido do aumento das moléculas no estado nativo e este parâmetro não é dependente de quantidade de proteínas.

A ΔH_{cal} , que se refere a quantidade de calor que a molécula absorve ou libera para que ocorra uma transição, é um parâmetro dependente da quantidade de proteínas que estão enoveladas e desenoveladas (ROSA, 2021). Assim, podemos notar na Tabela 3, a interação de β -CD com o sistema β -tripsina:água requer um aumento de $8,1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, em relação ao sistema sem β -CD, para provocar a desnaturação enzimática. Portanto, a adição da β -CD ao sistema aumenta a população de moléculas no estado nativo, e desta maneira a energia para desnaturar o sistema é maior. Uma possível explicação para este aumento é o aumento da tensão superficial da água na β -tripsina.

A entalpia de Van't Hoff (ΔH_{vH}) é uma estimativa da entalpia da transição que se baseia em um modelo que é obtido a partir da área sob a curva de C_p a uma determinada temperatura, dividida pela área total do termograma, como uma medida da extensão da fração de moléculas desnaturadas naquela temperatura. Como se baseia apenas nas razões das áreas sob a curva experimental, não requer informações sobre concentração ou pureza da amostra. A comparação entre a entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}) e a entalpia de Van't Hoff (ΔH_{vH}) pode fornecer informações sobre os mecanismos de alguns processos e a molecularidade de eventos. A relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ nos indicam a natureza do processo de transição entre os estados nativo e desnaturado (PRIVALOV, 2012). A correlação entre as duas variações de entalpia fornece informações importantes sobre o número de estados povoados durante um processo de desenvolvimento. Valores igual a 1 indicam uma transição em dois estados, valores igual a 0,5 indicam uma transição não-dois-estados e quando se obtém valores maiores do que 1,0, tem se a indicação de desacoplamento de subunidades ou de domínios (BITTAR et al., 2003). Nossos resultados desta correlação deram 0,95 para o sistema sem β -CD e 0,99 para o

sistema com β -CD. Este parâmetro nos indica que a proteína apresentou um comportamento em dois estados nos dois sistemas utilizados.

O ΔS_{T_m} também é uma propriedade afetada pela quantidade de moléculas presentes no meio em sua forma enovelada, sendo esse parâmetro calculado a partir do ΔH e do T_m obtidos experimentalmente. Com relação aos valores obtidos na tabela 3, observou-se que, assim como no ΔH , os valores encontrados aumentaram quando se adicionou a β -CD em 39%. O aumento do ΔS_{T_m} demonstra que as mudanças induzidas pela β -CD no sistema deslocam o equilíbrio termodinâmico em direção ao estado enovelado. Cabe aqui ressaltar que o valor de ΔS_{T_m} é relacionado ao sistema e não a cadeia proteica.

A determinação do índice de cooperatividade (IC) baseia-se na seguinte relação: “o grau de cooperatividade da desnaturação é inversamente proporcional à largura à meia altura na curva de desnaturação de uma molécula” (RELKIN, 1994). Portanto, processos físico-químicos muito cooperativos completam-se em uma faixa estreita de temperatura. Com base nos resultados disponíveis na tabela 3, a adição de β -CD não resultou em variação significativa no IC, ou seja, os valores encontrados para cooperatividade indicam que a β -CD não alterou significativamente a cooperatividade de desnaturação da β -tripsina.

Assim, a análise dos parâmetros termodinâmicos apresentados na tabela 3 sugerem que a β -CD possui um efeito estabilizador na β -tripsina. Estes resultados estão de acordo com os dados encontrados nos experimentos de atividade enzimática e de espectroscopia de fluorescência.

6. CONCLUSÃO

Nossos experimentos em relação a atividade amidásica indicaram que uma proporção de β -tripsina: β -CD 1:60 (m/m) teve a melhor atividade amidásica, porém a concentração 1:30 (m/m) apresentou atividade similar e com redução no custo, sendo esta concentração a utilizada nos próximos experimentos. Em relação ao armazenamento do sistema em temperaturas de 4°C e 25°C, a presença de β -CD na concentração 1:30 (m/m) tornou o sistema protéico mais estável por períodos de até três horas. A benzamidina inibiu a atividade enzimática por período de até 240 horas e nas temperaturas testadas (37°C, 50°C e 70°C), possibilitando as análises estruturais e termodinâmicas em pH 8,0.

Em relação à investigação do efeito da β -CD na conformação da β -tripsina, vimos que a adição de β -CD no sistema protéico sem prévia liofilização reduziu o comprimento de onda máximo em 28 nm em relação às outras amostras, indicando o aumento da estabilidade conformacional da enzima. Vimos também que o experimento de espectroscopia de ultravioleta não foi sensível o suficiente para captar as sutis alterações conformacionais que ocorreram na molécula, porém, este experimento foi apto para observar o aumento do volume da enzima quando em contato com a β -CD.

Os parâmetros termodinâmicos mostraram que a isoforma β -tripsina é mais estável em presença de β -CD, sendo observado o deslocamento do equilíbrio Nativo e Desnaturado para o sentido para o aumento das moléculas no estado nativo. Os parâmetros de T_m , ΔH_{cal} , ΔH_{vH} , $\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$ e ΔS_{Tm} obtidos estão de acordo com os experimentos de atividade enzimática e de espectroscopia de fluorescência, mostrando que a interação da β -CD com o sistema β -tripsina:água resulta em uma enzima mais estável. Apesar das análises termodinâmicas não considerarem fatores cinéticos, ou seja, não avaliarem a variável tempo, estes parâmetros podem ser usados para seleção de condições e formulações otimizadas para ensaios cinéticos poupando tempo e verba para este tipo de pesquisa.

Para fins práticos, na determinação da formulação usando β -tripsina e β -CD em meio líquido, o nosso trabalho através dos resultados biológicos, químicos e físicos foram capazes de determinar as melhorias provocadas pelo uso deste novo sistema. Os resultados conformacionais e termodinâmicos nos deram suporte para

desenvolvimento de formulações líquidas mais estáveis que possam manter a enzima ativa por mais tempo.

7. REFERÊNCIAS

AACHMANN, F. L. et al. Structural background of cyclodextrin-protein interactions. **Protein Engineering**, v. 16, n. 12, p. 905–912, 2003.

AHMAD, F. On the estimation of stability parameters from heat-induced conformational transition curves of proteins. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 1, n. 2, p. 99–105, 2004.

AKIYOSHI, K.; SASAKI, Y.; SUNAMOTO, J. Molecular Chaperone-Like Activity of Hydrogel Nanoparticles of Hydrophobized Pullulan: Thermal Stabilization with Refolding of Carbonic Anhydrase B. **Bioconjugate Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 321–324, 1999.

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.

BALSALOBRE, J. A. P. **Aplicación de ciclodextrinas en distintos sectores industriales: biotecnología enzimática, industria alimentaria y descontaminación de aguas**. 2016. Tese (Doctorado en Nutrición). Escuela internacional de doctorado, Universidad Católica de Murcia, Murcia, 2016

BANGA, A.; MITRA, R. Minimization of Shaking-induced Formation of Insoluble Aggregates of Insulin by Cyclodextrins. **Journal of Drug Targeting**, v. 1, n. 4, p. 341–345, 1993.

BEN KHALED, H. et al. Purification and Characterization of Three Trypsin Isoforms from Viscera of Sardinelle (*Sardinella Aurita*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 123–133, 2011.

BITTAR, E. R. et al. Characterization of β -trypsin at acid pH by differential scanning calorimetry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 36, n. 12, p. 1621-1627, 2003.

BLANCO, Kate. **Ciclodextrinas e suas aplicações**. Disponível em: <<http://www1.rc.unesp.br/ib/ceis/mundoleveduras/2012/Ciclodextrinas.pdf>>. Acesso

em 12 de janeiro de 2023.

BRESLOW, R. Biomimetic chemistry in oriented systems. **Israel Journal of Chemistry**, v. 18, n. 3-4, p. 187–191, 1979.

BRESLOW, R.; DONG, S. D. Biomimetic reactions catalyzed by cyclodextrins and their derivatives. **Chemical reviews**, v. 98, n. 5, p. 1997–2012, 1998.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. **Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 59, n. 7, p. 645-666, 2007.

COOPER, Alan. Effect of cyclodextrins on the thermal stability of globular proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 23, p. 9208–9209, 1992.

CRINI, G. Review: A history of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 21, p. 10940–10975, 2014.

DENADAI, A. M. L. et al. A supramolecular complex between proteinases and beta-cyclodextrin that preserves enzymatic activity: physicochemical characterization. **BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy**, v. 20, n. 5, p. 283–291, 2006.

DEPINTO, J. A.; CAMPBELL, L. L. FORMATION AND DEGRADATION OF CYCLIC DEXTRINS BY INTRACELLULAR ENZYMES OF BACILLUS MACERANS. **Science (New York, N.Y.)**, v. 146, n. 3647, p. 1064–1066, 1964.

DODZIUK, H. **Cyclodextrins and their complexes** : chemistry, analytical methods, applications. Wiley-VCH, 2006.

DRUNKLER, D.; FETT, R.; LUIZ, M. Polímeros de ciclodextrina: características, formação de complexos de inclusão e aplicações industriais. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 17, n. 1, p. 21–32, 1999.

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

FAIT, M. **Obtención semipreparativa de surfactantes biocompatibles catalizada**

por fitopeptidasas: Evaluación de sus propiedades antimicrobianas y biodegradabilidad. Facultad de ciencias exactas. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires. 2011.

FORTES, K. P. **Purificação e caracterização parcial de uma serino-protease tipo tripsina isolada do intestino de larvas de *Lutzomyia longipalpis*.** Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

FOUCAULT, G.; SEYDOUX, F.; YON, J. Comparative Kinetic Properties of α , β and Ψ Forms of Trypsin. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 295–302, 1974

FREIRE, E. 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, 1992.

FRENCH, D. Preparation of Schardinger dextrans. **Methods in Enzymology**, v. 3, n. C, p. 17–20, 1957.

FRÖMMING, K. H.; SZEJTLI, J. **Cyclodextrins in Pharmacy**. [S.l.]: Springer Netherlands, 2013

GAO, H. et al. Interactions of some modified mono- and bis- β -cyclodextrins with bovine serum albumin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 131–137, 2006.

GIDWANI, B.; VYAS, A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. **BioMed Research International**. v.2015, p. 1-15, 2015.

GONZÁLEZ, F. S. **ciclodextrinas: hospedadores moleculares para el mundo contemporáneo**. Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas y naturales de Granada. Granada. 2017.

HAGENLOCHER, M.; PEARLMAN, R. Use of a substituted cyclodextrin for stabilization of solutions of recombinant human growth hormone. **Pharm. Res**, v. 6, p. S30, 1989.

HAMADA, Y.; NAMBU, N.; NAGAI, T. Interactions of α - and β -cyclodextrin with several

non-steroidal antiinflammatory drugs in aqueous solution. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, n. 6, p. 1205–1211, 1975.

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.** v. 1. p. 1–73, 1998.

HORSKÝ, J.; PITHA, J. Inclusion complexes of proteins: Interaction of cyclodextrins with peptides containing aromatic amino acids studied by competitive spectrophotometry. **Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry**, v. 18, n. 3, p. 291–300, 1994.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Cyclodextrins in peptide and protein delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, n. 1, p. 101–123, 1999.

_____. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. [S.I.]: John Wiley & Sons, Ltd. 1997.

KOUSHIK, K. N.; BANDI, N.; KOMPELLA, U. B. Interaction of [D-Trp6, Des-Gly10] LHRH Ethylamide and Hydroxy Propyl Beta-Cyclodextrin (HPbetaCD): Thermodynamics of Interaction and Protection from Degradation by Alpha-Chymotrypsin. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 6, n. 4, p. 595–606, 2001.

KRIEGER, M.; KAY, L. M.; STROUD, R. M. Structure and specific binding of trypsin: Comparison of inhibited derivatives and a model for substrate binding. **Journal of Molecular Biology**, v. 83, n. 2, p. 209–230, 1974.

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

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

LESK, A. M.; FORDHAM, W. 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.

LIMA, M. C. P. **Mecanismo de Ação da Enzima Protease de Serina NS2B-NS3 do Vírus da Dengue**. Tese (Doutorado em Química). Pós Graduação em Química. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and LOVATT, M.; COOPER, A.; CAMILLERI, P. Energetics of Cyclodextrin-Induced Dissociation of Insulin. **European Biophysics Journal : EBJ**, v. 24, n. 5, p. 354–357, 1996.

MCCORMACK, B.; GREGORIADIS, G. Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162, n. 1–2, p. 59–69, 1998.

MORIN-CRINI, N. et al. 130 years of cyclodextrin discovery for health, food, agriculture, and the industry: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, p. 2581–2617, 2021.

OLSEN, J. V.; ONG, S. E.; MANN, M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 3, n. 6, p. 608–614, 2004.

OTZEN, D. E. et al. Structural Basis for Cyclodextrins' Suppression of Human Growth Hormone Aggregation. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 11, n. 7, p. 1779–1787, 2002.

OUTZEN, H. et al. Temperature and PH Sensitivity of Trypsins from Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) in Comparison with Bovine and Porcine Trypsin. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 115, n. 1, p. 33–45, 1996.

PÉREZ, M. A. C. **Síntesis y caracterización de b-tiociclodextrina**. Trabajo de fin de grado (Grado en Química). Facultad de química. UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA, Santiago de Compostela, 2015.

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

PRIVALOV, P. L. **Microcalorimetry of macromolecules**: The physical basis of biological structures. v. 16, 2012.

RADU, C. D. et al. Comparative Study of a Drug Release from a Textile to Skin. **Journal of Pharmaceutics & Drug Delivery Research**, v. 04, n. 02, 2015.

RELKIN, P. Differential scanning calorimetry: A useful tool for studying protein denaturation. **Thermochimica Acta**, v. 246, n. 2, p. 371–386, 1994.

REY, A. M. P. **Utilidad de las ciclodextrinas y derivados en el campo farmacéutico**. Trabajo de fin de grado (Grado en Farmacia). Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla, Sevilla, 2017.

ROBINSON, N. 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.

ROLIM, P. J. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 31, n. 2, p. 117–124, 2010.

ROSA, D. P. 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.

ROSA, D. P. **Estudo comparativo das alterações induzidas por solventes orgânicos sobre a atividade catalítica, conformação e termodinâmica das isoformas beta- e alfa-tripsina bovinas**. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia). Instituto de ciências biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021

SANTOS, A. M. C. 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.

SANTOS, A. M. C. **Purificação e caracterização bioquímica do tripsinogênio, alfa e psi tripsina bovina e análise termodinâmica em meio ácido por calorimetria diferencial de varredura.** Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia). Instituto de ciências biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

SCHARDINGER, F. Bacillus macerans, ein Aceton bildender Rottebacillus. **Zbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt II**, v. 14, p. 772–781, 1905.

_____. Bildung kristallisierter Polysaccharide (Dextrine) aus Stärkekleister durch. **Zentralbl Bakteriol Parasitenk**, v. Abt. II 29, p. 188–197, 1911.

_____. Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch: sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nährlösungen, darunter kristallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Stärke. **Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs-und Genußmittel, sowie der Gebrauchsgegenstände**, v. 6, p. 865–880, 1903.

_____. Ueber die bildung kristallisierter fehlingsche lösung nicht reduzierender körper (polysaccharide) aus stärke durch mikrobielle tätigkeit. **Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde**, v. 22, p. 98–103, 1909.

SCHMID, Franz-Xaver. Biological macromolecules: UV-visible spectrophotometry. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2001.

STURTEVANT, J M. Biochemical Applications of Differential Scanning Calorimetry. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 463–488, 1987.

SZEJTLI, J. Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes. **Akad. Kiado, Budapest, Hungary**, v. 34, 1 jan. 1982.

_____. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1743–1753, 1998a.

_____. **Past, present, and future of cyclodextrin research***. **Pure Appl. Chem.** [S.l: s.n.], 2004.

_____. The Use of Cyclodextrins in Biotechnological Operations. **New Trends in Cyclodextrins and Derivatives**, p. 597–625, 1998b.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 2045–2076, jul. 1998.

UEKAMA, K.; OTAGIRI, M. Cyclodextrins in drug carrier systems. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 3, n. 1, p. 1–40, 1987.

VILLIERS, A. Sur la transformation de la fécule en dextrine par le ferment butyrique. **Compte Rendus des Séances de l'Académie des Sciences (France) Février**, v. CXII, p. 435–437, 1981.

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

_____. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

WALSH, K. A.; WILCOX, P. E. B. T. Methods in Enzymology. [3] Serine proteases. **Proteolytic Enzym**. [S.l.]: Academic Press, v. 19. p. 31–41, 1970.