

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Dayanne Pinho Rosa

**ESTUDO COMPARATIVO DAS ALTERAÇÕES INDUZIDAS POR SOLVENTES
ORGÂNICOS SOBRE A ATIVIDADE CATALÍTICA, CONFORMAÇÃO E
TERMODINÂMICA DAS ISOFORMAS BETA- E ALFA-TRIPSINA BOVINAS**

Belo Horizonte

2021

Dayanne Pinho Rosa

**ESTUDO COMPARATIVO DAS ALTERAÇÕES INDUZIDAS POR SOLVENTES
ORGÂNICOS SOBRE A ATIVIDADE CATALÍTICA, CONFORMAÇÃO E
TERMODINÂMICA DAS ISOFORMAS BETA- E ALFA-TRIPSINA BOVINAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães

Belo Horizonte
2021

- 043 Rosa, Dayanne Pinho.
Estudo comparativo das alterações induzidas por solventes orgânicos sobre a Atividade catalítica, conformação e termodinâmica das isoformas beta- e alfa-tripsina bovinas [manuscrito] / Dayanne Pinho Rosa. – 2021.
133 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos. Co-orientadora: Profa. Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.
1. Bioquímica e imunologia. 2. Tripsina. 3. Isoformas de Proteínas. 4. Solventes. 5. Termodinâmica. I. Santos, Alexandre Martins Costa. II. Magalhães, Mariana Torquato Quezado de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE DAYANNE PINHO ROSA. Aos vinte dias do mês de julho de 2021 às 13:30 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Google Meet”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Estudo comparativo das alterações induzidas por solventes orgânicos sobre a atividade catalítica, conformação e termodinâmica das isoformas beta- e alfa-tripsina bovinas", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Alexandre Martins Costa Santos, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Naquele momento a candidata foi considerada **REPROVADA** pela banca avaliadora, pois foram apontados problemas críticos na escrita da tese, sendo considerado satisfatória apresentação e arguição sobre o tema da mesma.

Assim, conforme o Art.52º do Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da UFMG, foi solicitada a doutoranda que no prazo de seis meses enviasse para banca avaliadora novamente a tese com as correções e sugestões na parte escrita feitas para nova avaliação e parecer final.

Desta maneira, no primeiro dia do mês de setembro de 2021 a candidata enviou a tese corrigida, seguindo as orientações e sugestões feitas pela banca anteriormente, e no vigésimo dia de Outubro de 2021 a banca emitiu seu parecer via email individual com os seguintes pareceres:

Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos (Universidade Estadual de Campinas), aprovada; Dra. Maria Lúcia Bianconi (Universidade Federal do Rio de Janeiro), aprovada; Dr. Tiago Antônio da Silva Brandão (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Alexandre Martins Costa Santos - Orientador (Universidade Federal do Espírito Santo), aprovada.

Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA

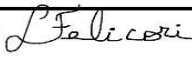
REPROVADA

O resultado final foi comunicado à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a o processo de avaliação da discente e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 21 de Outubro de 2021.


Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos (Universidade Estadual de Campinas) 

Dra. Maria Lúcia Bianconi (Universidade Federal do Rio de Janeiro) 

Dr. Tiago Antônio da Silva Brandão (UFMG) 

Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (UFMG) 

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


 Profª Leda Quercia Vieira
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia



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 26/10/2021 às 10:05

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/296070?tipoArquivo=O>

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde e me sustentar emocionalmente, tendo sido fundamental para que eu pudesse chegar até este momento.

Aos meus pais, pela vida, em especial à minha mãe, Fatima Valéria, por sempre acreditar no meu potencial e me dar apoio para completar essa jornada. À minha irmã, que sempre transmitiu muita calma e tranquilidade, mostrando que a vida não precisa ser vivida com estresse. Aos meus avós, Daiony e Idair, e aos meus tios, que investiram nos meus estudos, sendo fundamentais para que eu pudesse alcançar essa conquista. À minha madrinha, Evanir, que sempre torceu por mim e sempre me apoiou muito também.

Ao meu marido, Marcio Simmer, que foi fundamental como suporte emocional, me apoiando em todos os momentos e não me deixando desistir nos momentos de desânimo.

Ao meu orientador, Alexandre Santos, pelo suporte científico e pela paciência em lidar com os alunos (como eu) nos momentos de crise. À minha co-orientadora, Mariana Torquato, por ter aceitado participar do convênio entre as instituições e por me receber todas as vezes em que estive presencialmente na UFMG.

Aos meus colegas de laboratório, pelo suporte, pela convivência e pelas experiências trocadas. Com eles, a jornada acadêmica tornou-se mais agradável. Agradecimento especial aos colegas Fabiano, Antônio e Evaldo, que me acompanham desde 2015-2016 até os dias atuais e foram amigos que levei para fora do laboratório.

Ao Jamil Silvano, técnico do departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, pelo apoio fundamental na purificação das isoformas e também pelo tempo cedido em passar parte de seus conhecimentos de bancada e por me acolher no laboratório durante a temporada que estive presencialmente na UFMG.

Ao LABIOM, pela disponibilização de parte da infraestrutura para realização dos ensaios de espectroscopia e calorimetria. Ao LNBio (Campinas), por disponibilizar o espectropolarímetro para coleta de dados. E ao Laboratório do Professor Ângelo Denadai (UFJF-GV), por disponibilizar a infraestrutura para realização dos ensaios de espalhamento e de potencial zeta.

À UFMG, pela infraestrutura e por ofertar um curso de excelência acadêmica, com um corpo docente extremamente qualificado. E pela concretização do convênio com a UFES entre os programas de pós-graduação em bioquímica dessas instituições.

À UFES, pela infraestrutura cedida para a realização das pesquisas e pela celebração do convênio com a UFMG para a integração entre os programas de bioquímica dessas duas instituições.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo e pelo financiamento do projeto.

Resumo

A tripsina bovina possui seis isoformas, sendo a α -tripsina e a β -tripsina bem caracterizadas em meio aquoso. Algumas diferenças estão bem estabelecidas como a massa molecular, o número de cadeias peptídicas e o perfil de atividade enzimática. Neste trabalho, as isoformas α - e β -tripsina foram comparadas com relação às suas atividades, estrutura e propriedades termodinâmicas no sistema orgânico-aquoso. Os solventes orgânicos polares testados foram metanol, etanol e n-propanol. A atividade enzimática, as mudanças conformacionais e estruturais, a organização supramolecular e a estabilidade termodinâmica foram avaliadas por diferentes técnicas espectroscópicas (UV, CD e DLS) e calorimétricas. Os resultados comparativos mostraram que as alterações induzidas por cada solvente na estrutura e atividade da mesma isoforma de tripsina ocorrem em diferentes concentrações. A isoforma β -tripsina apresentou atividade amidásica superior na presença dos solventes orgânicos testados, sendo os melhores resultados encontrados no etanol. Não foi encontrada redução do conteúdo das estruturas secundárias estruturadas em ambas as isoformas, mas a isoforma β -tripsina sofreu maior grau de rearranjo. A adição de concentração crescente de solvente orgânico causa redistribuição no arranjo supramolecular de ambas as isoformas, com a formação de aglomerados até 60% (v/v). Já em 80% (v/v) de etanol foram observados comportamentos distintos entre as isoformas: enquanto a β -tripsina forma aglomerados reversíveis, a α -tripsina forma agregados insolúveis. O uso de diferentes concentrações de solventes orgânicos revelou um processo de desnaturação mais cooperativo para β -tripsina e um estado nativo menos estável para α -tripsina. Os estudos termodinâmicos comprovaram as previsões feitas com os resultados espectroscópicos e mostraram que a conformação da β -tripsina foi mais resistente às diferentes concentrações de etanol, porém apresentou diferenças conformacionais mais acentuadas quando comparados os resultados entre meio aquoso e meio aquo-orgânico. Já a α -tripsina apresentou menor estabilidade conformacional, representada por reduções gradativas dos parâmetros termodinâmicos até 60% (v/v).

Palavras-chaves: Tripsina. Isoformas. Solventes Orgânicos. Biomoléculas. físico-química. Termodinâmica.

Abstract

Bovine trypsin has six isoforms, being the α -trypsin and β -trypsin isoforms well characterized in aqueous media. Some differences are well established as the molecular weight, the number of peptide chains and enzyme activity profile. In this work, the α - and β -trypsin isoforms were compared concerning their activities, structure, and thermodynamics properties in the aqueous-organic system. The organic polar solvents tested were methanol, ethanol, and n-propanol. Enzyme activity, conformational change, secondary structure, supramolecular organization, and thermodynamics were evaluated by different spectroscopic (UV, CD, and DLS) and calorimetric techniques. The comparative results showed that the changes induced by each solvent on the structure and activity of the same trypsin isoform occur at different concentrations. The β -trypsin isoform showed superior amidase activity in the presence of the tested organic solvents. Better results for enzyme activity are found in ethanol. No statistically significant losses were found in the content of defined secondary structures for both isoforms, but the β -trypsin isoform suffered more rearrangement. The addition of increasing concentration of organic solvent causes redistribution in the supramolecular arrangement of both isoforms, with the formation of agglomerates in 60% (v/v). In 80% (v/v) of ethanol were observed distinct behavior between the isoforms: the β -trypsin formed reversible agglomerates while the α -trypsin formed insoluble aggregates. The use of different organic solvent concentrations revealed a more cooperative denaturation process for β -trypsin and a less stable native state for α -trypsin. The thermodynamic studies have proved all the predictions done with the spectroscopic data and showed that the β -trypsin conformation was more resistant to the different ethanol concentrations. However, it presented more accentuated conformational differences when compared the results between aqueous and aqueous-organic media. On the other hand, the α -trypsin had lower conformational stability, represented by gradual reductions in thermodynamic parameters up to 60% (v/v).

Keywords: Trypsin. Isoforms. Organic Solvent. Biomolecules. Physical-chemistry. Thermodynamic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Sequência dos 223 resíduos de aminoácidos da tripsina bovina.....	19
Figura 2: Estrutura tridimensional de β -tripsina bovina	21
Figura 3: Representação de formação das isoformas da tripsina bovina	22
Figura 4: Representação gráfica dos resultados obtidos no ensaio de atividade catalítica.....	31
Figura 5: Representação esquemática dos resultados obtidos pela curva de desenovelamento por solvente monitorada por fluorescência	33
Figura 6: Representação do ajuste matemático de Boltzmann	38
Figura 7: Representação esquemática da extração de dados a partir das curvas espectroscópicas.....	39
Figura 8: Representação esquemática do tratamento matemático realizado sobre as curvas espectroscópicas	40
Figura 9: Representação esquemática do tratamento matemático realizado sobre as curvas espectroscópicas	42
Figura 10: Perfil cromatográfico de troca catiônica de tripsina comercial bovina	46
Figura 11: Perfil de SDS-PAGE das isoformas de tripsina bovina	48
Figura 12: Espectrometria de massa do tipo ESI das isoformas β - e α -tripsina	50
Figura 13: Variação de energia livre plotada contra a concentração de etanol.....	53
Figura 14: Atividade amidásica das isoformas α - e β -tripsina em função da concentração de álcoois.....	56
Figura 15: Perfil de desenovelamento por indução química das isoformas β - e α -tripsina plotados em função da concentração de etanol (% v/v)	63
Figura 16: Monitoramento da alteração da porcentagem de estruturas secundárias da isoformas β - e α -tripsina em função da concentração do etanol por CD.....	70
Figura 17: Perfil de organização supramolecular das isoformas em função da concentração de etanol	74
Figura 18: Perfil de potencial zeta das isoformas β -tripsina e α -tripsina em diferentes concentrações de etanol.	77

Figura 19: Perfil comparativo de ΔH , ΔS_{Tm} e CI obtidos em função da concentração de etanol.....	81
Figura 20: Curva de desenovelamento por indução térmica de β -tripsina a 1,0 mg.mL ⁻¹ em tampão glicina a 50,0 mmol.L ⁻¹ , pH 3,0 e CaCl ₂ a 20,0 mmol.L ⁻¹	89
Figura 21: Curva de desenovelamento por indução térmica de β -tripsina em etanol 20% (v/v)	90
Figura 22: Curva de desenovelamento por indução térmica de β -tripsina em etanol 50% (v/v).	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: ΔG^{H_2O} das isoformas β -tripsina e α -tripsina obtidos pela curva de desenovelamento por indução química monitorada em pH 3,0 por fluorescência. ...	54
Tabela 2: Parâmetros obtidos por curvas de atividade amidásica da β -tripsina monitorado por espectroscopia de absorção a 410 nm.....	57
Tabela 3: Parâmetros obtidos por curvas de atividade amidásica da α -tripsina monitorado por espectroscopia de absorção a 410 nm.....	58
Tabela 4: Parâmetros obtidos pela curva de desenovelamento por indução química das isoformas β -tripsina e α -tripsina monitorados em pH 3,0 por fluorescência.	65
Tabela 5: Diferença entre os valores de ΔH obtidos nas diferentes concentrações de etanol.	82
Tabela 6: Diferença entre os valores de ΔS_{T_m} calculados nas diferentes concentrações de etanol	84
Tabela 7: Temperatura média de desenovelamento (T_m) das isoformas em diferentes concentrações de etanol obtidas das curvas de desenovelamento térmico em pH 3,0 monitorado por absorção UV.	87
Tabela 8: Determinação de parâmetros termodinâmicos para β -tripsina a $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em pH 3,0 obtidos por DSC.	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CD – *Circular Dichroism* ou Dicroísmo Circular.

CI - Índice de Cooperatividade.

C_m^{er} - C_m da reação enzimática.

C_m^{conf} - C_m conformacional.

DLS – *Dinamic Light Scattering* ou Espalhamento Dinâmico de Luz.

ESI-MS – Electrospray Ionization Mass Spectrometry ou Espectrometria de Massa por Ionização Eletrospray.

LABIOM-UFES – Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares da Universidade Federal do Espírito Santo.

L-BApNA – N- α -Benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida.

MS - Espectrometria de massa.

m/z - relação massa carga.

nm - Nanômetro .

PDB - Protein Data Bank, banco de dados de estruturas e sequência de proteínas.

p-NA – *p*-nitroanilina.

PTS – “Pre Transition State”.

S.O. – solvente orgânico.

T_m – Temperatura média de desenovelamento.

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo.

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais.

UV – Ultra-Violeta.

ZP – *Zeta Potential* ou Potencial Zeta.

ΔG - Variação de energia livre de Gibbs.

ΔG^{H_2O} – Variação de energia livre de Gibbs sem a influência de solventes.

ΔH_{T_m} - Variação de entalpia no T_m .

ΔS_{T_m} - Variação de entropia no T_m

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	15
1.1 – Enzimas em meios aquo-restritos.....	15
1.2 – Características das serino-proteases.....	17
1.3 – Características estruturais da tripsina bovina.....	17
1.4 – As isoformas de tripsina.....	21
1.5 – Aplicações biotecnológicas das enzimas.....	23
1.6 – Estudos de propriedades macroscópicas dos sistemas.....	24
2 – JUSTIFICATIVA	26
3 – OBJETIVOS	27
3.1 – Objetivos Gerais.....	27
3.2 – Objetivos Específicos.....	27
4 – MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 – Separação cromatográfica das isoformas de tripsina bovina.....	28
4.2 – Preparo de amostras.....	28
4.3 – Determinação da pureza e da identidade das isoformas por ESI-MS.....	29
4.4 – Ensaio de atividade enzimática das isoformas.....	29
4.5 – Determinação da estabilidade termodinâmica e conformacional das isoformas induzida por solventes orgânicos.....	31
4.6 – Determinação da porcentagem de estruturas secundárias.....	33
4.7 – Determinação do tamanho das partículas e avaliação do perfil de agregação.....	34
4.8 – Determinação da estabilidade termodinâmica das isoformas.....	35
4.8.1 – Desenovelamento induzido por temperatura monitorado por espectroscopia na região do ultravioleta (UV)	35
4.8.2 – Desenovelamento das isoformas induzido por temperatura e monitorado por microcalorimetria diferencial de varredura	36
4.9 – Cálculos termodinâmicos.....	37
4.9.1 – Tratamento dos dados obtidos por espectroscopia	37
4.9.2 – Determinação de parâmetros termodinâmicos obtidos pelo DSC.....	43
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 – Purificação das isoformas da tripsina bovina.....	45
5.2 – Confirmação da identidade de β - e α -tripsina por gel de eletroforese SDS-PAGE.....	47
5.3 – Determinação da pureza por Espectrometria de Massa.....	49

5.4 – Avaliação da estabilidade termodinâmica das isoformas β - e α -tripsina utilizando espectroscopia de fluorescência.....	51
5.5 – Efeito dos solventes orgânicos sobre a atividade enzimática das isoformas β - e α -tripsina.....	55
5.6 – Perfil de mudanças conformacionais das isoformas induzidas por etanol....	61
5.7 – Efeito dos solventes sobre a estrutura secundária das isoformas β -tripsina e α -tripsina.....	68
5.8 – Efeito dos solventes orgânicos sobre a organização supramolecular das isoformas β -tripsina e α -tripsina monitorados por DLS.....	72
5.9 – Análise Termodinâmica.....	78
5.9.1 – Análise do parâmetro ΔH obtido por curvas de desenovelamento das isoformas induzido por temperatura na presença de etanol	79
5.9.2 – Análise do parâmetro ΔS_{T_m} extraído das curvas de desenovelamento térmico na presença de etanol.....	83
5.9.3 – Análise do índice de cooperatividade obtido a partir das curvas de desenovelamento térmico em presença de etanol	85
5.9.4 – Análise do T_m obtido em diferentes concentrações de etanol.....	86
5.9.5 – Análise das curvas de desenovelamento da β -tripsina obtidas por microcalorimetria diferencial de varredura (DSC)	88
5.9.6 – Determinação de T_m , ΔH_{cal} , ΔH_{vH} , ΔS_{T_m} e ΔC_p da β -tripsina obtidos por DSC.....	92
5.10 – A otimização do desenho experimental para estudo de biomoléculas com potencial de aplicação industrial	99
6 – CONCLUSÕES	101
7 – PERSPECTIVA.....	102
8 – BIBLIOGRAFIA	103
9 - APÊNDICE.....	115

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Enzimas em meios aquo-restritos

A água é um solvente comumente utilizado para solubilização das biomoléculas, como proteínas. Porém, a utilização deste solvente pode gerar efeitos indesejáveis nas reações sintéticas, como reações secundárias não esperadas. Com o uso de solventes orgânicos, pode-se contornar problemas como o citado anteriormente, bem como obter vantagens adicionais, tais como o aumento no número de substratos sobre os quais tais enzimas seriam capazes de atuar (ex: substratos hidrofóbicos) e o deslocamento do equilíbrio termodinâmico da reação para favorecer a síntese (DOUKYU; OGINO, 2010).

Sabe-se que o uso de solventes orgânicos anidros pode aumentar a eficiência de muitas enzimas (KLIBANOV, 1989), porém o uso de meios aquo-orgânicos pode ser desvantajoso, a depender da proporção de solventes orgânicos adicionada a esses meios (DOUKYU; OGINO, 2010; STEPANKOVA et al., 2013). E essa atividade enzimática em meio aquo-orgânico está relacionada à quantidade de moléculas água intimamente ligadas à proteína, sendo a explicação molecular atribuída à formação de “clusters” ao redor das regiões polares e carregadas da enzima (ZAKS; KLIBANOV, 1988a). A atividade das enzimas, quando em solventes miscíveis que não apresentam limite de solubilidade, aumenta até uma determinada concentração chamada de “ponto ótimo” (WEHTJE; ADLERCREUTZ; MATTIASSON, 1993). Nesta condição, a enzima apresenta atividade máxima e, na maioria dos casos, superior à da enzima na ausência de solvente orgânico. Se a concentração destes solventes for maior do que este ponto, a enzima começa ser inativada (KHMELNITSKY et al., 1991; MOZHAEV et al., 1989; WANG et al., 2016).

Outro ponto importante a se destacar é que a quantidade de água necessária para catálise depende das características de cada enzima. Para algumas enzimas, como as lipases, são necessárias poucas moléculas de água associada a essas biomoléculas para uma elevada atividade (VALIVETY; HALLING; MACRAE, 1992a, 1992b). Já para outras enzimas, um maior número de moléculas de água é necessário para que haja atividade enzimática (ZAKS; KLIBANOV, 1988a). (ZAKS; KLIBANOV, 1988b).

Além disso, há um fator extremamente relevante para a manutenção da atividade das proteínas em qualquer meio onde elas forem solubilizadas: a composição da camada de hidratação. Sabe-se que essa camada influencia diretamente nas propriedades estruturais e dinâmicas dessas biomoléculas (BALL, 2008), sendo que o mínimo nível de hidratação varia de acordo com a proteína e deve levar em conta as diferenças estruturais e termodinâmicas dessas biomoléculas (FOGARTY; POTESIO; KREMER, 2015). E a remoção da água da camada de hidratação da enzima realizada pelos solventes orgânicos polares pode levar à redução (ou até mesmo à perda) da atividade enzimática (GORMAN; DORDICK, 1992). Portanto, a escolha do solvente e o controle do meio de hidratação influenciam diretamente o grau de flexibilidade da enzima.

Há diversas vantagens em utilizar enzimas como biocatalisadores, sendo aplicadas em diferentes segmentos industriais, tais como na síntese de intermediários farmacêuticos e na produção em larga escala de biocombustíveis a partir de fontes renováveis (ILLANES et al., 2012). E isso só é possível devido principalmente à sua alta quimio-, regio- e enantioselectividade, o que permite a uma enzima específica atuar seletivamente sobre determinados substratos. No entanto, como as enzimas são naturalmente produzidas para atuarem em ambientes celulares, que são puramente aquosos, faz com que essas biomoléculas sejam, na maioria dos casos, intolerantes às duras condições do processo industrial (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008; SCHMID et al., 2001). Desta forma, é necessário conhecer como a enzima se comporta no meio aquo-orgânico onde se pretende utilizar.

Para contornar esse problemas relacionados ao uso de enzimas em processos industriais envolvendo solventes orgânicos, existem duas soluções possíveis: (I) otimização das condições do processo para o biocatalisador disponível e (II) preparação de biocatalisadores que podem funcionar sob condições ideais do processo (LUETZ; GIVER; LALONDE, 2008). Com os avanços científicos na área de enzimologia em meios não-aquosos, já é possível projetar enzimas para utilização em meios nos quais elas não são naturalmente aptas a atuarem (CARREA; RIVA, 2000), já que foram desenvolvidos muitos métodos complementares capazes de aumentar a estabilidade de enzimas nessas condições, *a priori* adversas. Como exemplos, pode-se citar a imobilização de enzimas em matrizes de suporte

insolúveis, a modificação química de enzimas, a modificação física de enzimas com lipídios ou surfactantes, o aprisionamento de enzimas em micelas reversas e a engenharia molecular de enzimas (DOUKYU; OGINO, 2010).

Diante o exposto, percebe-se que melhorias contínuas e uma melhor compreensão da biocatálise em meios de reação não convencionais podem não apenas aumentar o potencial econômico dos processos enzimáticos existentes, mas também permitir que novas áreas, até então impedidas pela instabilidade intrínseca das enzimas, sejam exploradas. A estabilidade proteica relaciona-se intimamente com as questões contemporâneas da ciência proteica, interações proteína-solvente e enovelamento de proteínas. Portanto, a engenharia e o estudo da estabilidade enzimática apresentam interesse comercial e científico (STEPANKOVA et al., 2013).

1.2 – Características das serino-proteases

As serino-proteases constituem a família das enzimas mais estudadas até os dias atuais, com diversas informações registradas em literatura (BALÓ; BANGA, 1949; FOUCAULT; SEYDOUX; YON, 1974; KEIL, 1971; KRAUT, 1971; MACDONALD et al., 1982; MARES-GUIA; SHAW; COHEN, 1967; SCHROEDER; SHAW, 1968; SHOTTON, 1970), correspondendo a mais de um terço das proteínas proteolíticas já descritas (DI CERA, 2009). Outra característica das serino-proteases é que elas são constituídas por duas superfamílias: a da quimotripsina e a da subtilisina. A tripsina pertence à primeira superfamília e é caracterizada por uma tríade catalítica formada por resíduos de His, Asp e Ser. As interações entre esses resíduos leva a um arranjo tridimensional no sítio catalítico que favorece a elevada reatividade do resíduo de serina durante a catálise (DI CERA, 2009). As serino-proteases apresentam dois domínios similares, provavelmente originados por modificações durante duplicação gênica, e entre esses domínios encontra-se o sítio ativo contendo a tríade catalítica (LESK; FORDHAM, 1996; VOET; VOET, 2011).

1.3 – Características estruturais da tripsina bovina

A sequência primária da tripsina bovina já é bem estabelecida (Walsh. & Neurath., 1964a; Keil, 1971), havendo diferentes maneiras de se representar essa sequência. Sendo assim, para este trabalho foi adotado o sistema de numeração de

Keil (1971), tendo o primeiro resíduo - a Ile – recebido a numeração 7 (Figura 1). Essa contagem toma como referencial a sequência do tripsinogênio, descontado o hexapeptídeo aminoterminal que é liberado após a clivagem dessa região da cadeia para formação da enzima ativa. Porém, a existência de “*gaps*” dificulta a determinação exata da posição de alguns resíduos, levando a um deslocamento de resíduos de aminoácidos de sua posição original.

1º DOMÍNIO	I (07)	V	G	G	Y	T	C (13)	G	A	N
	T	V	P	Y	Q	V	S	L	N	S
	G	Y	H	F	C (31)	G	G	S	L	I
	N	S	Q	W	V	V	S	A	A	H (46)
	C (47)	Y	K	S	G	I	Q	V	R	L
	G	E	D	N	I	N	V	V	E	G
	N	E	Q	F	I	S	A	S	K	S
	I	V	H	P	S	Y	N	S	N	T
	L	N	N	D (90)	I	M	L	I	K	L
	K	S	A	A	S	L	N	S	R	V
A	S	I	S	L (111)						
2º DOMÍNIO						P (112)	T	S	C (115)	A
	S	A	G	T	Q	C (122)	L	I	S	G
	W	G	N	T	K (131)	S (132)	S	G	T	S
	Y	P	D	V	L	K	C (143)	L	K	A
	P	I	L	S	D	S	S	C (154)	K (155)	S (156)
	A	Y	P	G	Q	I	T	S	N	M
	F	C (168)	A	G	Y	L	E	G	G	K (176)
	D (177)	S	C (179)	Q	G	D	S (183)	G	G	P
	V	V	C (189)	S	G	K	L	Q	G	I
	V	S	W	G	S	G	C (203)	A	Q	K
	N	K	P	G	V	Y	T	K	V	C (216)
	N	Y	V	S	W	I	K	Q	T	I
	A	S	N (229)							

Figura 1: Sequência dos 223 resíduos de aminoácidos da tripsina bovina. A numeração teve como referência a sequência do tripsinogênio, considerando a remoção do hexapeptídeo aminoterminal. Os números dentro dos parênteses correspondem à posição do resíduo na sequência primária. Os resíduos em azul correspondem à tríade catalítica. Os resíduos de cisteína que participam das pontes dissulfeto foram destacados em amarelo. Já os resíduos destacados em verde estão envolvidos na clivagem da cadeia para a formação das isoforma α -tripsina (131-132), γ -tripsina (155-156) e ψ -tripsina (176-177) (Fonte: 5ptp.pdb)

As isoformas β - e α -tripsina apresentam conteúdo similar de estruturas secundárias, sendo que a β -tripsina apresenta menor conteúdo de folha- β (FOUCAULT et al., 1974). Além disso, se diferem quanto ao número de cadeias, tendo a β -tripsina uma única cadeia, enquanto a α -tripsina apresenta duas cadeias. Ainda há uma outra isoforma já parcialmente caracterizada: a ψ -tripsina, que apresenta três cadeias. Com relação ao arranjo estrutural (Figura 2), a tripsina bovina apresenta estrutura globular e dois domínios estruturais estabilizados por 6 pontes dissulfeto (Figura 1), sendo o primeiro domínio composto pelos resíduos das posições 1 a 105 e por uma ponte dissulfeto ((Cys (31)- Cys (47)), o segundo domínio composto pelos resíduos das posições 106 a 223 e estabilizado por quatro pontes dissulfeto ((Cys (115)-Cys (216), Cys (122)-Cys (189), Cys (154)-Cys (168) e Cys (179)-Cys (203)), enquanto os dois domínios são assimetricamente unidos por outra ponte dissulfeto ((Cys(13)-Cys(143)) (BODE; CHEN; BARTELS, 1983; BODE; SCHWAGER, 1975; HUBER; BODE, 1978; MIKES et al., 1966; WALSH; NEURATH, 1964). O sítio ativo se encontra entre os dois domínios estruturais.

As moléculas de γ -, α - e ψ -tripsina, até a presente data, não possuem suas estruturas tridimensionais determinadas; assim todos os estudos sobre as isoformas de tripsina bovina se baseiam na estrutura de sua molécula precursora, a β -tripsina (Figura 2). Até o momento, já foram descritas algumas características cinéticas da α - e ψ -tripsina (FOUCAULT et al., 1974; FOUCAULT; SEYDOUX; YON, 1974), bem como dados sobre a caracterização termodinâmica dessas isoformas. Os resultados de análises termodinâmicas obtidos por Santos (2009) sugerem que durante a conversão de β - a ψ -tripsina (passando pela α -tripsina) ocorre uma diminuição gradual da estabilidade termodinâmica destas enzimas, fazendo que se tornem mais flexíveis e mais frouxas e provavelmente tenham um maior volume hidrodinâmico. Já o trabalho de Lacerda (2014) sugeriu que a isoforma γ -tripsina, originada da clivagem de outro ponto da cadeia de β -tripsina, é mais estável do que a α -tripsina devido a um núcleo hidrofóbico mais compacto encontrado na γ -tripsina.

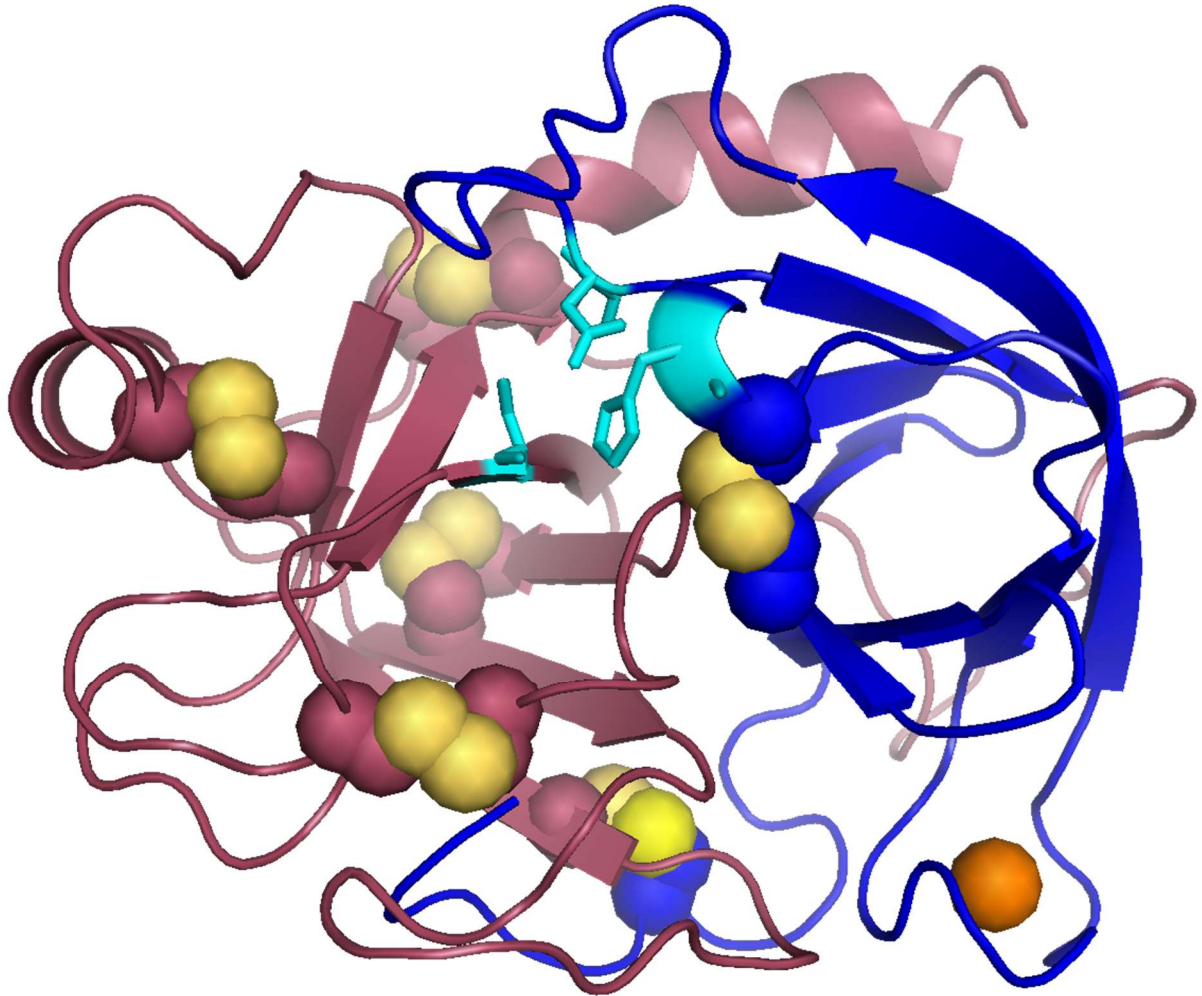


Figura 2: Estrutura tridimensional de β -tripsina bovina, mostrando os dois domínios, sendo o primeiro domínio destacado em cor azul e o segundo domínio em lilás. Os resíduos da tríade catalítica estão na cor azul claro e as pontes dissulfeto estão representadas pelas esferas amarelas. A esfera laranja corresponde ao íon metálico Ca^{2+} no seu sítio de ligação. (Fonte: 5ptp.pdB).

1.4 – As isoformas de tripsina

O primeiro registro da utilização de enzimas ocorreu no século XVIII, após constatações feitas por Spallanzani sobre a degradação acelerada do suco gástrico sobre a carne. Dentre as enzimas proteolíticas, a tripsina foi a primeira a ser descoberta e é a mais bem caracterizada (BOUGATEF, 2013). Ela foi descoberta em 1867 por Kühne, sendo este pesquisador o primeiro a correlacionar a enzima com o processo de catálise de materiais biológicos (COPELAND, 2000). As tripsinas isoladas de diferentes vertebrados apresentam massa molecular variando de 20 a

25 kDa (KEIL, 1971) e atuam realizando a hidrólise de ligações peptídicas envolvendo o grupo carboxílico de aminoácidos dos resíduos de arginina e lisina (KURTOVIC; MARSHALL; SIMPSON, 2006).

A tripsina bovina é formada a partir do seu zimógeno: o tripsinogênio (Figura 3). Este é produzido pelo pâncreas, que, quando estimulado, secreta esta forma inativa no intestino delgado. (BODE; FEHLHAMMER; HUBER, 1976; BODE; SCHWAGER; HUBER, 1978). Sob a ação de enteroquinases presentes na luz intestinal, o tripsinogênio sofre hidrólise na região aminoterminal, entre as posições Lys6 e Ile7, liberando um hexapeptídeo (Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) (DAVIE; NEURATH, 1954) e dando origem à primeira isoforma: a β -tripsina, que possui uma única cadeia polipeptídica formada por 223 resíduos de aminoácidos (KEIL, 1971). Esta isoforma é cerca de duzentas vezes mais ativa que o tripsinogênio (ROBINSON; NEURATH; WALSH, 1973).

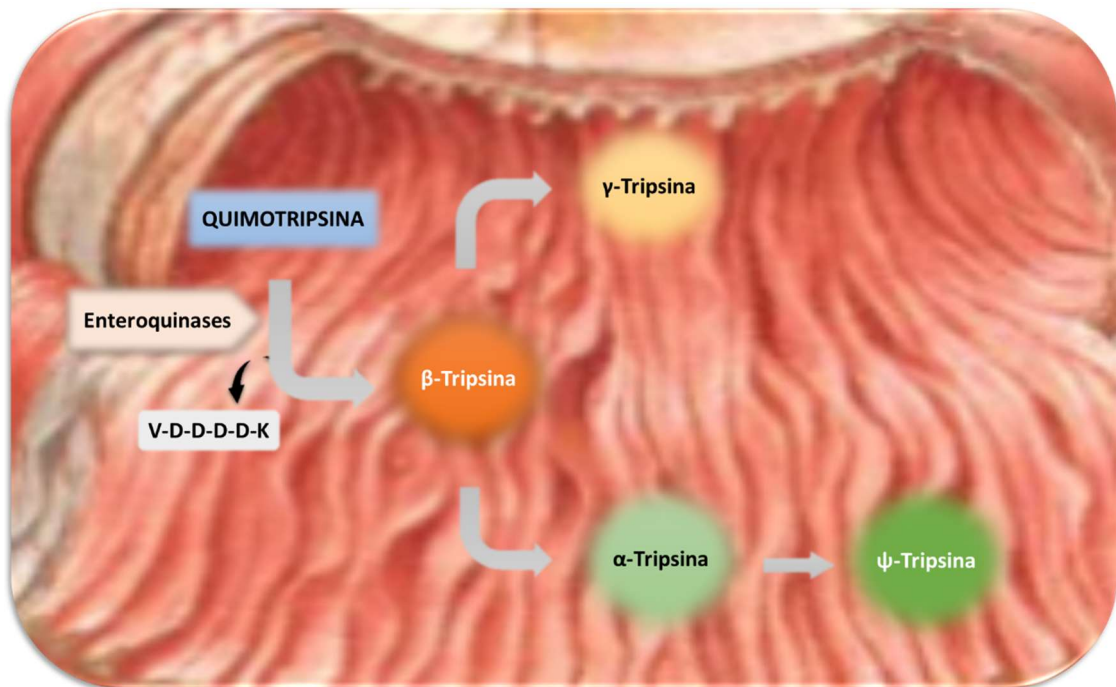


Figura 3: Representação de formação das isoformas da tripsina bovina. A ação de enteroquinases intestinais sobre a quimotripsina, promove a clivagem da porção aminoterminal, com a liberação de um hexapeptídeo (VDDDDK) e a isoforma β -tripsina. Clivagem em diferentes pontos da cadeia desta isoforma levam à formação de outras isoformas, conforme esquema acima.

A partir da hidrólise em diferentes pontos da cadeia polipeptídicas da isoforma β -tripsina, outras isoformas são originadas. Uma delas é a α -tripsina, que é originada diretamente da hidrólise da cadeia da β -tripsina na posição Lys131-Ser132. (Figuras

1 e 3) (SCHROEDER; SHAW, 1968). Com a continuação do processo de hidrólise em outros pontos da cadeia polipeptídica da β -tripsina, tem-se a formação da isoforma Ψ -tripsina a partir da clivagem entre os resíduos Lys176 e Asn177 da cadeia da α -tripsina, originando uma isoforma com três cadeias polipeptídicas interligadas por pontes dissulfeto (Figuras 1 e 3) (SMITH & SHAW, 1969).

A isoforma β -tripsina pode, ainda, sofrer clivagem em outro ponto da cadeia polipeptídica – entre Lys155-Ser156 –, dando origem à isoforma γ -tripsina (Figura 3), apresentando duas cadeias, além de semelhanças estruturais e catalíticas com a isoforma α -tripsina (LACERDA et al., 2014). Porém, essas isoformas apresentam diferenças suficientes nas propriedades físico-químicas para permitir a separação cromatográfica.

Comparando-se as diferenças na atividade enzimática, observa-se na literatura que a β -tripsina apresenta atividade amidásica 40% maior do que a da α -tripsina, porém não há diferença significativa entre a atividade dessas mesmas isoformas frente a substratos esterásicos (FOUCAULT; SEYDOUX; YON, 1974; SANTOS et al., 2008a).

1.5 – Aplicações biotecnológicas das enzimas

As enzimas têm demonstrado valiosa utilidade biotecnológica, pois proporcionam inúmeras vantagens sobre os processos químicos convencionais no que diz respeito à eficiência e sustentabilidade do processo. Desta forma, as enzimas ganharam visibilidade em aplicações industriais desde o século XX. Um dos grupos de enzima muito utilizados nesses processos são as proteases, sendo aplicadas em diferentes processos industriais, como produção de derivados do leite, processamento de couro, composição de detergentes sólidos e líquidos (LI et al., 2013).

Além disso, as enzimas ainda apresentam alta eficiência biocatalítica, seletividade enzima-substrato e causam menos toxicidade ambiental. Portanto, indústria química tem nos biocatalisadores um dos seus principais pilares (KAUL; ASANO, 2012). Como resultado, a projeção para os próximos anos é de que a demanda por enzimas aumente em todos os setores e, portanto, espera-se que a adoção e o uso de enzimas sejam ampliados em todo o mundo. De acordo com o relatório anual da Research and Markets (2021), o mercado global de enzimas foi

avaliado em US\$ 8.636,8 milhões em 2019 e está projetado para atingir US\$ 14.507,6 milhões em 2027 com uma taxa de crescimento anual de 6,5% de 2020 a 2027. As proteases estão entre o maior grupo de enzimas industriais, sendo responsável por 60% da quantidade de enzimas comercializadas no mundo (ABIDI et al., 2011; DADSHAHI et al., 2016). Nesse contexto de aplicações industriais insere-se também a tripsina, que é uma enzima com histórico de aplicação em diversas áreas, como a alimentícia (SHAHIDI; JANAK KAMIL, 2001; STOYTCHIEVA et al., 2013), a farmacêutica (HAZAN, 1960; INNERFIELD; ANGRIST; SCHWARZ, 1953; KLEIN et al., 2006; MANHART et al., 2002; SHERRY; FLETCHER, 1960), a biotecnológica industrial e a bioquímica.

1.6 – Estudos de propriedades macroscópicas dos sistemas

As informações termodinâmicas são valiosas para a compreensão de fenômenos biológicos, porém os resultados de um experimento termodinâmico, por si só, não respondem a dúvidas sobre a ruptura de interações intermoleculares ou sobre o comportamento de desenovelamento. Desta forma, outros dados são necessários para completar esta análise. Isto porque a termodinâmica clássica baseia-se na análise de dados obtidos a partir de sistemas macroscópicos (HAYNIE, 2008). Já os sistemas microscópicos aplicados à área biológica envolvem os microestados das biomoléculas e são estudados em sistemas com números de partículas na ordem de grandeza do número de Avogadro. Porém, o estudo de todos os microestados em uma solução contendo tal quantidade de partículas é tão complexo que se torna inviável, pois é praticamente impossível tratar as equações de movimento individualmente para cada partícula (HAYNIE, 2008).

Neste contexto, surge a termodinâmica estatística, que consegue explicar o comportamento de partículas usando o nível macroscópico, por meio de vinculação entre o comportamento de partículas individuais ou partes de macromoléculas e as grandezas termodinâmicas clássicas, como trabalho, calor e entropia. Procedese a um tratamento estatístico, no qual se tomam médias sobre variáveis microscópicas que não são observáveis, de forma a reduzir as equações matemáticas a equações que envolvam só variáveis macroscópicas. Usando a termodinâmica estatística, pode-se começar a racionalizar, muitas vezes em termos estruturais, como as

mudanças em um sistema se conectam aos resultados de experimentos termodinâmicos.

No caso deste estudo, a aplicação da teoria da termodinâmica estatística é a forma mais adequada de associar os resultados termodinâmicos com os resultados estruturais e conformacionais. Para este trabalho, utilizou-se como base a teoria ergódica. De acordo com esta teoria, a média de ocorrência de fenômenos de todas as partículas em solução num curto espaço de tempo corresponde à ocorrência do mesmo fenômeno sobre apenas uma única partícula ao longo do tempo. A analogia é baseada no fato de que uma propriedade macroscópica específica de um sistema pode ser calculada a partir de diferentes conjuntos de dados (CUNHA, 2011). A característica fundamental do processo ergódico é que através de uma única observação de uma função membro do processo, podemos caracterizar todas as estatísticas de todo o processo.

Por fim, a partir dos dados na literatura que relatam a influência de solventes orgânicos sobre a estrutura e a atividade das enzimas de forma geral, e conhecendo a importância das serino-proteases em processos biológicos e industriais (BARRETT, 1970; DAVIE; FUJIKAWA; KISIEL, 1991; STOYTCHIEVA et al., 2013), este trabalho foi dedicado a investigar a influência do solvente em diferentes concentrações de solventes orgânicos sobre as principais isoformas da tripsina, sendo um modelo adequado para o estudo do comportamento de serino-proteases em meios aquo-orgânicos.

2 – JUSTIFICATIVA

Para usar enzimas em meios aquo-orgânicos, é necessário ter um conhecimento sobre suas propriedades físico-químicas e estruturais em meios aquosos que permita aumentar o controle e melhorar a previsão dos processos em meios adversos. E esse conhecimento só é possível com a caracterização estrutural, cinética e termodinâmica de cada componente da mistura, que deve ser feita em diferentes concentrações do solvente orgânico de interesse.

Diante disso, o presente projeto de pesquisa objetivou estudar a influência de meios aquo-orgânicos sobre as propriedades físico-químicas, termodinâmicas e estruturais da isoforma β -tripsina em condições ambientes similares às encontradas nos processos industriais, comparando com os resultados da α -tripsina. Estes resultados serão úteis para o entendimento e controle dos meios reacionais na condição enzimática otimizada para o sistema aquo-orgânico.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivos Gerais

Utilizar parâmetros físico-químicos para avaliar comparativamente as possíveis mudanças causadas por solventes orgânicos sobre as propriedades biológicas, estruturais e termodinâmicas da isoforma β -tripsina, comparando-a com a α -tripsina bovina.

3.2 – Objetivos Específicos

- Obter isoformas puras de tripsina bovina;
- Avaliar a atividade biológica das isoformas em meios aquo-orgânicos;
- Realizar os estudos espectroscópicos e estruturais das isoformas em meios aquo-orgânicos;
- Obter e comparar a estabilidade termodinâmica das isoformas em meios aquo-orgânicos por espectroscopia e por calorimetria diferencial de varredura;
- Propor uma base de desenho experimental otimizado para estudar atividade e estrutura de enzimas em solventes orgânicos, com a triagem de pontos representativos para a realização dos ensaios.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Separação cromatográfica das isoformas de tripsina bovina

As isoformas foram obtidas a partir da tripsina comercial (Sigma Tipo I) realizando cromatografia de troca catiônica de bancada em coluna seguindo a metodologia de Santos et al. (2008b), tendo sido essa etapa realizada no Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As dimensões da coluna foram 130,0 x 7,4 cm. A fase estacionária utilizada foi SE-Sephadex C50[®] e a fase móvel usada foi tampão Tris 100 mmol.L⁻¹ pH 7,1 a 4 °C contendo CaCl₂ 20 mmol.L⁻¹ e cloridrato de benzamidina 1 mmol.L⁻¹. O fluxo cromatográfico foi ajustado para 0,25 mL.min⁻¹. A tripsina bovina comercial foi solubilizada em fase móvel utilizando banho de gelo. A quantidade de partida foi de 1 g e a concentração de tripsina aplicada na coluna foi de 10,0 mg.mL⁻¹. O eluente foi monitorado por meio da absorvância da 280 nm e o volume coletado em cada tubo foi de 8 mL. Uma deconvolução matemática foi aplicada sobre o perfil cromatográfico a fim de definir as frações correspondentes a cada isoforma e as respectivas quantidades foram calculadas pela integração da área sob a curva correspondente a cada isoforma. As frações correspondentes a cada isoforma foram concentradas, dialisadas por um fator de 10⁶ em água ajustada para pH 3,0 com HCl e, em seguida, liofilizadas para aumentar a estabilidade a longo prazo.

4.2 – Preparo de amostras

As isoformas liofilizadas foram ressuspensas em água tipo I ajustada com HCl para pH 3,0. Soluções dessas isoformas foram preparadas de 30 a 60 minutos antes da execução de cada ensaio e a concentração das isoformas de tripsina foram determinadas usando a absorvância molar a 280 nm ($\epsilon = 40.000 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (WALSH; WILCOX, 1970). As amostras a serem testadas foram preparadas a partir da solução-estoque em tubos contendo um solvente orgânico P.A. (metanol, etanol ou n-propanol) em diferentes concentrações (5 - 90% v/v) misturado a uma solução tampão. O volume final e a concentração das soluções de isoformas estão descritas junto dos respectivos ensaios. Todas as concentrações usadas nos experimentos não causaram problemas de difusão das moléculas de proteína no meio aquoso e

no aquo-orgânico, portanto todas as concentrações ficaram abaixo do limite de concentração que induz agregação proteica (BITTAR et al., 2003). Quanto ao preparo das soluções contendo solventes orgânicos, o sistema da pipeta foi ambientado com o solvente com a pré-molhagem por 5 vezes, além de ser adotada a técnica de pipetagem reversa (EPPENDORF, (em 08/2021); SAMPAIO, 2014) a fim de minimizar as perdas por evaporação devido à alta pressão de vapor dos solventes orgânicos utilizados.

4.3 – Determinação da pureza e da identidade das isoformas por ESI-MS

A massa molecular média e a pureza das isoformas foram determinadas por espectrometria de massa por ionização por eletronebulização (ESI-MS – Electrospray Ionization Mass Spectrometry). O equipamento utilizado foi o Q-TOF Micro™ (Micromass, UK), que estava equipado com uma fonte do tipo eletrospray operando no modo positivo, com coleta de dados realizada no laboratório de testes da Waters Corporation. Amostras de 50 µL foram tomadas de uma solução aquosa a 1,5 mg.mL⁻¹ foram ressuspendidas em 50 µL de solução aquosa composta por acetonitrila 50 %v/v e ácido fórmico 0,2 % v/v. As condições experimentais foram: Fonte (capilar = 2700 V, cone da amostra = 60 V); TOF (tubo de voo = 2450 V). As aquisições dos espectros foram obtidas na faixa de 500 a 3000 *m/z*. Os espectros foram analisados usando o software Masslynx®.

4.4 – Ensaio de atividade enzimática das isoformas

Este ensaio foi realizado utilizando o substrato sintético cromogênico L-BApNA, conforme descrito por Ascenzi et al. (1981). As amostras (0.04 mg.mL⁻¹) foram pré-incubadas por 10 min a 37°C e, após este período, o substrato L-BApNA (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 15 min a 37°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 37°C contendo CaCl₂ 20 mmol.L⁻¹. A concentração dos álcoois variou de 5% a 90% (v/v), sendo utilizados metanol, etanol e n-propanol. A concentração do produto formado (*p*-NA) foi determinada por leitura de absorção a

410 nm dividido pelo valor de absorvidade molar. O efeito da absorção de p-NA em função da concentração de solvente orgânico foi avaliado. O equipamento utilizado para as leituras foi o espectrofotômetro Nanodrop® 2000 Thermo UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA) disponibilizado pelo Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares da Universidade Federal do Espírito Santo (LABIOM-UFES). O ensaio foi realizado em triplicata e registrado como média \pm DP.

Obtidos os dados, a concentração de p-NA foi plotada em função da concentração do respectivo álcool e as curvas obtidas foram tratadas por ajuste não-linear de Boltzmann. A partir dos dados deste ajuste matemático, foi possível obter os valores de C_m da reação enzimática, que representa a concentração de solvente na qual 50% da média populacional de biomoléculas apresenta atividade máxima; do Índice de Cooperatividade, que é a medida da eficiência de transição entre estados nativo/enovelado e desnaturado/desenovelado num determinado sistema; e da concentração de solvente referente ao início da transição entre estados, que neste trabalho foi representado pela sigla "PTS" (pré-transition state). Esses pontos foram representados de forma esquemática na Figura 4 e a obtenção matemática desses dados está descrita no item 4.9.

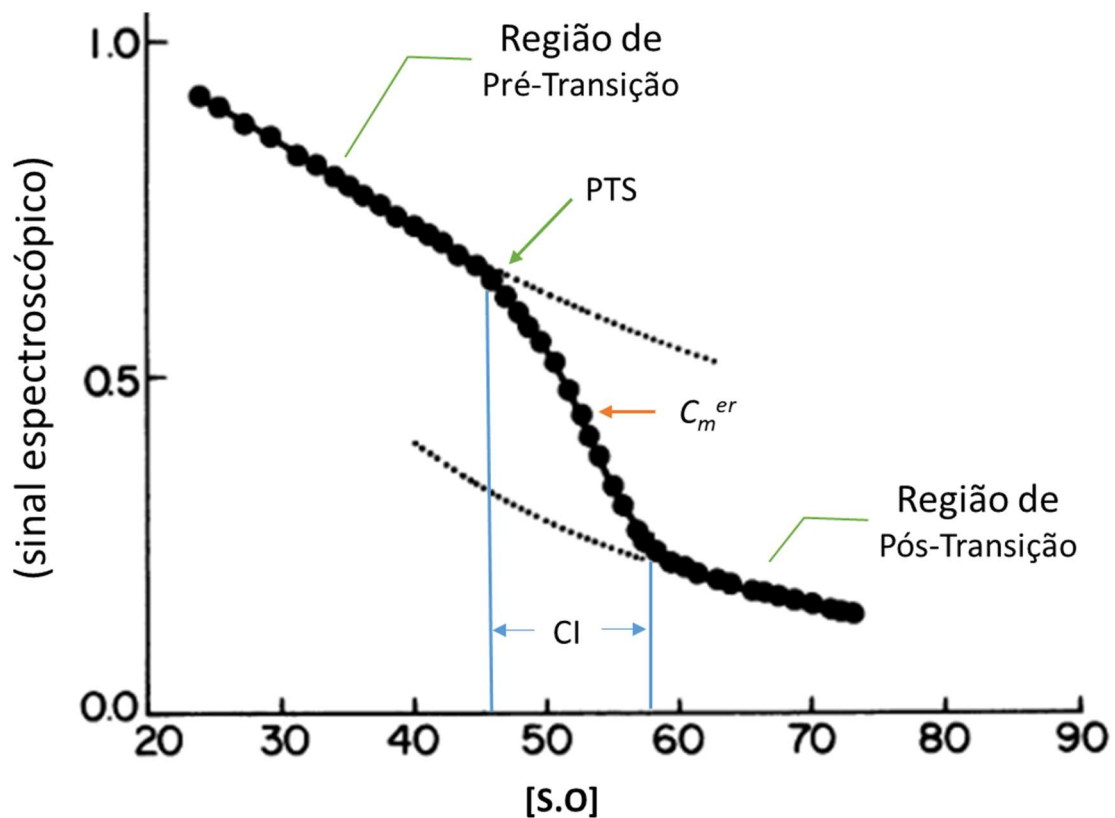


Figura 4: Representação gráfica dos resultados obtidos no ensaio de atividade catalítica. Legenda: PTS é concentração máxima de solvente na pré-transição; C_m^{er} é o C_m da reação enzimática; CI é o índice de cooperatividade. (Adaptado de ZAJICEK; CARTER; GHIRON, 1981).

4.5 – Determinação da estabilidade termodinâmica e conformacional das isoformas induzida por solventes orgânicos

As amostras das isoformas β - e α -tripsina ($0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$), foram analisadas por varredura da emissão de fluorescência. As soluções das isoformas foram preparadas tanto em solução tampão sem solvente quanto numa mistura de tampão com etanol. O tampão utilizado foi Glicina 50 mmol.L^{-1} pH 3,0 a 25°C contendo CaCl_2 20 mmol.L^{-1} e a concentração de etanol variou de 5% a 90% (v/v). O comprimento de onda de excitação foi escolhido a partir do melhor resultado obtido para as varreduras de excitação da tripsina, realizada pelo software do próprio fluorímetro. Por meio desse procedimento analítico, pode-se observar uma pequena diferença de absorção entre 280 nm e 295 nm, porém uma melhor relação sinal/ruído foi

alcançada para emissão quando as moléculas foram excitadas em 280nm. Vale destacar que as isoformas possuem 4 resíduos de triptofano e 10 resíduos de tirosina, sendo ambos excitados em 280 nm. Assim, a amostra foi excitada a 280 nm e a emissão foi coletada na faixa de 310 a 360 nm, com velocidade de varredura de 60 nm.min⁻¹, bandpass de excitação igual a 10 nm e de emissão igual a 1 nm, voltagem da fotomultiplicadora de 400V (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014; MÖLLER; DENICOLA, 2002; YANG et al., 2017). O equipamento utilizado foi o espectrofluorímetro Hitachi F2000, disponibilizado pelo Laboratório de Bioquímica Cardiovascular (CCS/UFES). O ensaio foi realizado em triplicata.

Para a obtenção do comprimento de onda máximo em cada concentração de etanol, utilizou-se análise de segunda derivada sobre os gráficos de intensidade do sinal de fluorescência em função das respectivas varreduras de emissão de fluorescência. Já para a obtenção de demais parâmetros extraídos do ensaio de fluorescência, o comprimento de onda máximo de emissão de cada varredura foi plotado em função da respectiva concentração de etanol e as curvas obtidas foram tratadas por ajuste não-linear de Boltzmann. A partir dos resultados deste ajuste matemático, foi possível obter os valores de C_m^{conf} , que representa a concentração de solvente na qual 50% da média populacional de biomoléculas se encontram no estado enovelado; do índice de cooperatividade (CI) e do valor de PTS. Os pontos obtidos na região de transição foram utilizados para o cálculo de ΔG^{H_2O} , que é um indicador de estabilidade termodinâmica. É importante registrar que o ΔG^{H_2O} foi tomado apenas para realizar controle de qualidade da amostra, sendo utilizado para verificar se o valor calculado está dentro da faixa de referência teórica (BRANDEN; TOOZE, 1999; NAKAI; MODLER, 1996). O PTS é determinado pela concentração de solvente orgânico que marca o início da transição do estado enovelado (F, *fold*ing) para o desenovelado (U, *un*folding). O $\Delta\lambda$ representa a diferença modular entre os comprimentos de onda máximos de emissão dos estados enovelado e desenovelado observados na curva ajustada de Boltzmann. Esses pontos foram representados de forma esquemática na Figura 5 e os cálculos que geraram esses parâmetros foram descritos no item 4.9. Os resultados foram expressos com média \pm DP.

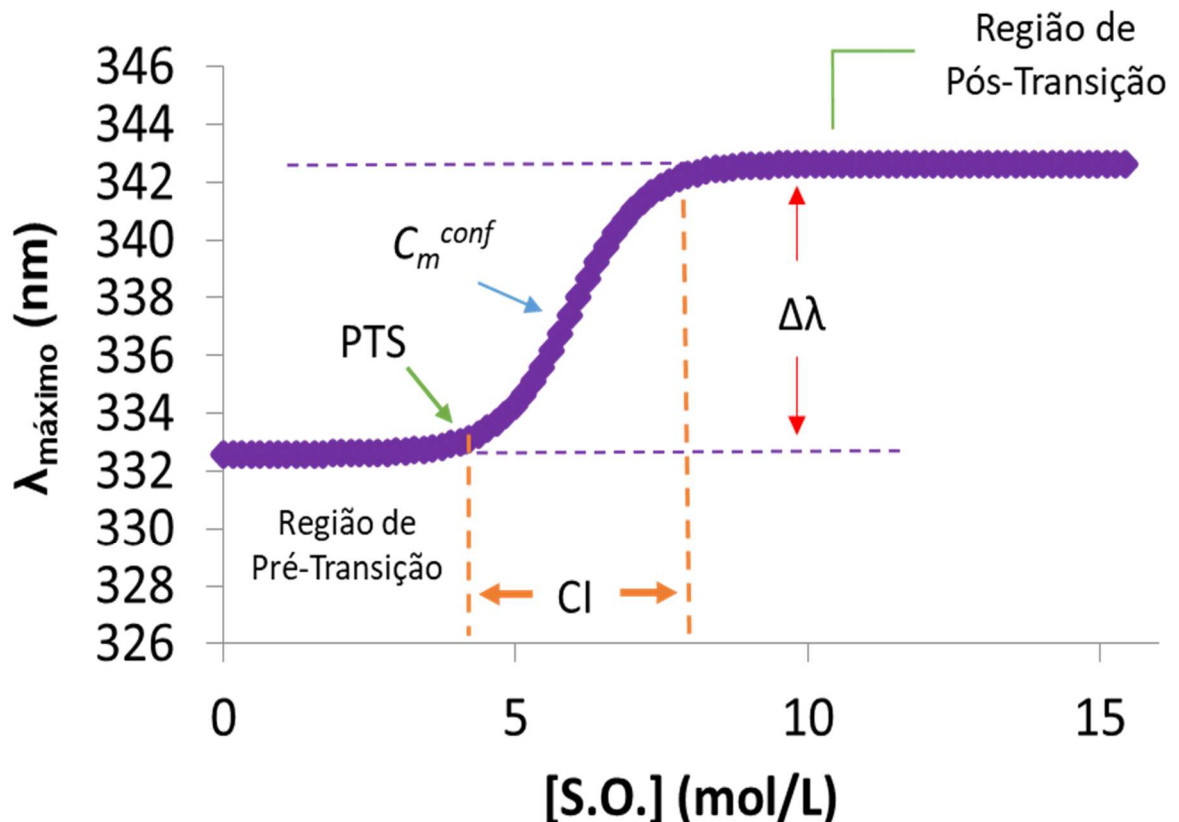


Figura 5: Representação esquemática dos resultados obtidos pela curva de desenovelamento por solvente monitorada por fluorescência. PTS é concentração máxima de solvente orgânico na pré-transição; C_m^{conf} é o C_m conformacional; CI é o índice de cooperatividade; $\Delta\lambda$ é a diferença entre o comprimento de onda entre os estados F e U. (Fonte: o autor)

4.6 – Determinação da porcentagem de estruturas secundárias

As modificações na composição de estruturas secundárias da isoforma β -tripsina, induzida por etanol, foram monitoradas por espectroscopia de dicroísmo circular (CD, *circular dichroism*). Foram preparadas amostras a $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$ contendo diferentes concentrações de etanol. Uma solução de KCl 30 mmol.L^{-1} pH 3,0 foi utilizada como fase aquosa para diluir o etanol e a concentração de etanol variou de 20% a 80% (v/v). A varredura foi feita na faixa de 190 a 260 nm sob atmosfera de nitrogênio a 25°C (298.15 K), com velocidade de varredura de 50 nm.min^{-1} , bandwidth de 1nm, tempo de resposta de 4s e 10 acumulações por amostra (LACERDA et al., 2014; VIANA et al., 2010). O equipamento utilizado foi o

espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco Co., Tokyo, Japan) equipado com um controlador de temperatura de amostras termoelétrico (Sistema Peltier), disponibilizado pelo Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), localizado em Campinas-SP. As intensidades do sinal de CD foram expressas em elipticidade (mdeg). As porcentagens de diferentes estruturas secundária (α -hélice, folha- β e random coil) foram estimadas usando o algoritmo CDSSTR® e banco de dados acessados através do DICHROWEB (WHITMORE; WALLACE, 2008). O conteúdo de estruturas secundárias foi expresso como média \pm DP e as amostras foram analisadas em triplicata. As análises estatísticas foram feitas pelo teste *t* de student com $P < 0,05$. Para fins de comparação, foram utilizados parte dos resultados da α -tripsina contidos na dissertação de mestrado e ainda outros oriundos da publicação (ROSA et al., 2017).

4.7 – Determinação do tamanho das partículas e avaliação do perfil de agregação

As alterações na distribuição do raio hidrodinâmico, que reflete indiretamente o tamanho de partículas presentes nas amostras, foram determinadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS, *dynamic light scattering*) (LACERDA et al., 2014; LI; BARRON, 2014). Já a tendência a agregação concentração-dependente foi monitorada por medida da carga superficial líquida utilizando a técnica de potencial zeta (ZP, *zeta potential*) (CLOGSTON; PATRI, 2011; LACERDA et al., 2014). As soluções de ambas as isoformas foram preparadas numa mistura de tampão com etanol, com concentração deste solvente variando de 20% a 80% (v/v). O tampão utilizado neste ensaio foi Glicina 50 mmol.L⁻¹ pH 3,0 contendo CaCl₂ 20 mmol.L⁻¹. A concentração das isoformas nas amostras foi de 0,5 mg.mL⁻¹. As amostras foram submetidas a um feixe monocromático (4 mW He-Ne laser 633 nm) e a intensidade da luz espalhada foi medida no ângulo de 90°, com temperatura constante de 25°C. Para o ensaio de DLS, foram feitas 10 aquisições por amostra (cada aquisição é a média de 5 leituras), com intervalo de aquisição de 2s. Para a coleta de dados do potencial zeta, foram feitas 5 aquisições por amostra (cada aquisição é a média de 3 leituras), com intervalo de aquisição de 1s. Foram preparadas 3 amostras para cada condição de meio aquoso e aquo-orgânico. O equipamento utilizado foi o Malvern

ZetaSizer® Nano ZS90 acoplado ao software ZetaSizer Nano Software, que registrou a aquisição dos dados e realizou os cálculos de diâmetro das partículas e do potencial zeta. Este equipamento foi disponibilizado pelo Laboratório de Físico-Química de Fluidos Complexos (UFJF-GV). Os resultados foram expressos como média \pm DP.

4.8 – Determinação da estabilidade termodinâmica das isoformas

A fim de lidar com as terminologias corretas dentro do assunto de termodinâmica, este tópico inicia-se apresentando a distinção entre os conceitos de nativo e enovelado, bem como entre desnaturado e desenovelado. Assim, uma proteína no estado nativo significa que ela possui sua atividade biológica preservada, enquanto uma proteína enovelada possui sua estrutura terciária preservada em grande porcentagem. Seguindo, portanto, essa mesma linha de raciocínio, uma proteína desnaturada é aquela que perdeu sua atividade biológica, enquanto uma proteína desenovelada é aquela que perdeu a sua estrutura terciária. É válido destacar que não necessariamente uma proteína desenovelada perde sua atividade, mas é o processo mais comumente observado já que muitas proteínas que perdem estrutura acabam tendo sua capacidade catalítica afetada. Assim também, não necessariamente uma proteína que perde sua atividade está desenovelada. Feitas essas diferenciações, dá-se então prosseguimento à descrição dos ensaios.

4.8.1 – Desenovelamento induzido por temperatura monitorado por espectroscopia na região do ultravioleta (UV)

As amostras das isoformas β - e α -tripsina, em diferentes concentrações de etanol, bem como e os pontos em 20% e 50% (v/v) de etanol para a α -tripsina, foram submetidas ao ensaio de desenovelamento induzido por temperatura e monitorado por espectroscopia de absorção no UV, a fim de avaliar a variação de absorção entre os estados enovelado (F) e desenovelado (U) (NASSER BRUMANO; ROGANA; SWAISGOOD, 2000). As isoformas foram solubilizadas em tampão glicina 50 mmol.L⁻¹ pH 3,0 a 25°C contendo 20 mmol.L⁻¹ de CaCl₂ misturado a diferentes concentrações de etanol, sendo ajustado para a concentração final de 0,5

mg.mL⁻¹. A aquisição dos dados de absorvância foi feita em 280 nm no espectrofotômetro Evolution™ 300 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA) acoplado ao sistema Peltier, disponibilizado pelo Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM-UFES). O equipamento foi configurado para aquecer a amostra na faixa de temperatura de 15 a 80 °C com taxa de aquecimento de 1 °C/min e aquisição de dados a cada 30s. As curvas obtidas foram analisadas por ajuste não-linear de Boltzmann e, com os resultados fornecidos por este ajuste, foi possível obter alguns parâmetros termodinâmicos, como T_m , ΔH_{vH} e ΔS_{Tm} , de ambas as isoformas em várias concentrações de etanol. Os cálculos para a extração destes parâmetros estão descritos no item 4.9. O ensaio foi realizado em triplicata. Os pontos referentes às concentrações de 0, 40%, 60% e 80% (v/v) para a α -tripsina foram retirados da publicação de ROSA et al., 2017 para comparação com os resultados da β -tripsina.

Após as corridas de desenovelamento térmico monitoradas por ultravioleta, foi verificada a ocorrência de estados precipitados imperceptíveis a olho nú. Para isso, a mesma amostra foi submetida a uma varredura espectral na faixa não absorvante de 400 a 700 nm antes e após a corrida de desenovelamento térmico. As varreduras nessas duas condições foram comparadas entre si para verificar a existência de diferenças entre essas curvas. Caso fosse verificado uma variação positiva da amostra pós-corrída em relação a amostra não submetida ao calor, seria então confirmada a ocorrência dos precipitados anteriormente citados.

4.8.2 – Desenovelamento das isoformas induzido por temperatura e monitorado por microcalorimetria diferencial de varredura

Os parâmetros termodinâmicos também foram obtidos por microcalorimetria diferencial de varredura (DSC, differential scanning calorimetry), utilizando um calorímetro VP-DSC MicroCal® (Northampton, EUA), disponibilizado pelo Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM-UFES). Por meio desse equipamento, foi possível obter as informações termodinâmicas de forma direta. As amostras foram preparadas em meios aquo-orgânicos por meio de ajuste espectrofotométrico a 280 nm, alcançando a concentração final de 1,0 mg.mL⁻¹. Antes de serem aplicadas, essas soluções proteicas foram degaseificadas por aproximadamente 20 min antes da aplicação nas câmaras. Foram aplicados 500 μ L

nas câmaras de amostra e branco, sendo uma com amostra e a outra com o respectivo diluente. As aquisições foram feitas na faixa de temperatura de 20-80 °C (193-253 K) usando uma velocidade de varredura de 60 K·h⁻¹. A célula microcalorimétrica foi submetida a uma pressão na faixa de 22 a 25 psi em ambas as câmaras. As aquisições foram conduzidas dentro de séries a fim de reduzir artefatos devido ao histórico térmico do instrumento.

Os parâmetros termodinâmicos foram calculados usando-se o pacote de análises do software “Origin-DSC” fornecido pela empresa MicroCal® (Inc., Northampton, MA, USA). Este pacote de análise executa a subtração da linha de base, a definição de uma conexão linear para o estado enovelado e desenovelado e o ajuste de curvas do dado processado a modelos pré-definidos. A partir de cada transição, é possível obter os parâmetros T_m e ΔH_{cal} e ΔH_{vH} .

4.9 – Cálculos termodinâmicos

4.9.1 – Tratamento dos dados obtidos por espectroscopia

Os dados experimentais submetidos ao ajuste de regressão não-linear de Boltzmann (Eq. 1) fornecem valiosos dados termodinâmicos, pois dentre os modelos não-lineares disponíveis, o ajuste de Boltzmann foi o que melhor ajustou os dados (R^2 ajustado $\geq 0,99$). Neste trabalho, os parâmetros CI , “valor m ” e C_m foram obtidos a partir do tratamento matemático das curvas de atividade enzimática e de desenovelamento monitorado por fluorescência; e CI , T_m , ΔH_{vH} e ΔS a partir do tratamento matemático das curvas de desenovelamento térmico.

$$y = \frac{y_f - y_u}{1 + e^{(x-x_0)/d_x}} + y_u \quad (1)$$

onde y são os dados experimentais (absorbância no ultravioleta ou comprimento de onda máximo da emissão de fluorescência), y_f corresponde aos valores de absorbância ou de comprimento de onda máximo da fluorescência na fração nativa/enovelada; y_u corresponde aos valores de absorbância ou de comprimento de onda máximo da fluorescência na fração desnaturada/desenovelada, x é o ponto experimental; d_x é um parâmetro gerado

pela inclinação da reta no T_m (ensaio de desenvolvimento térmico) e no C_m (ensaio de atividade e de emissão de fluorescência). O parâmetro x_0 é o ponto médio da região de transição das curvas e corresponde ao T_m (obtido das curvas de desenvolvimento térmico) e ao C_m (obtido das curvas de obtidas por fluorescência). Esses pontos estão representados na Figura 6.

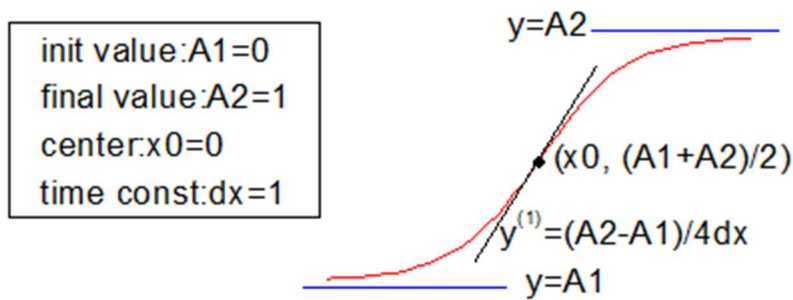


Figura 6: Representação do ajuste matemático de Boltzmann. O valor $A1$ equivale a y_f , $A2$ equivale a y_u , x_0 é o ponto de inflexão e y é qualquer ponto na reta ajustada. (Fonte: Origin®)

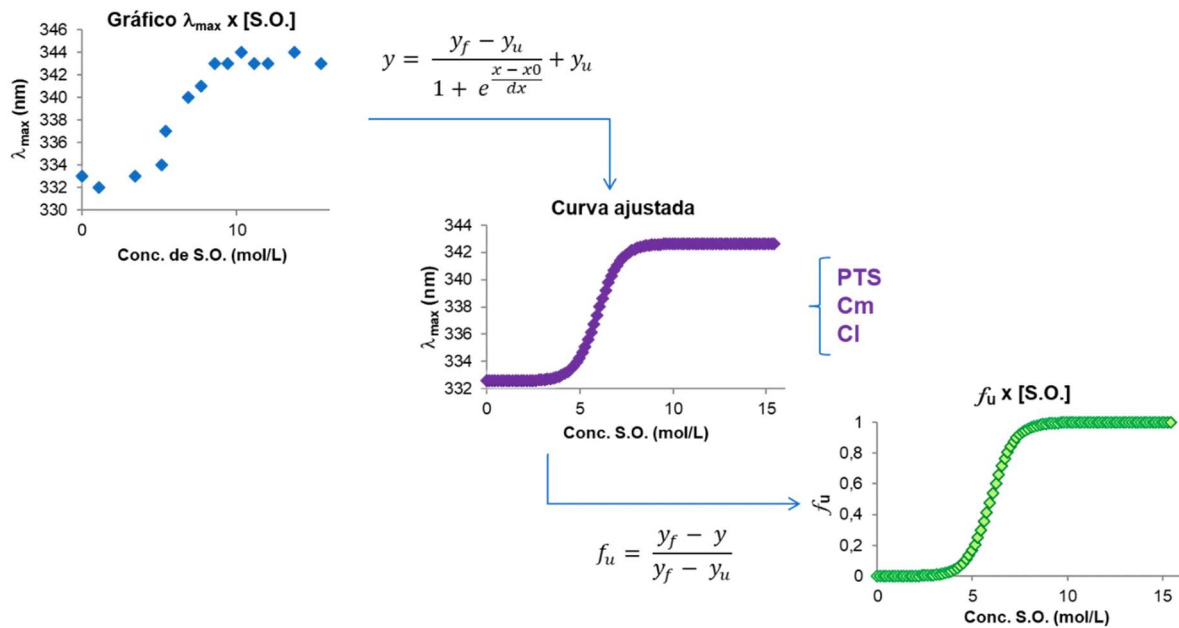


Figura 7: Representação esquemática da extração de dados a partir das curvas espectroscópicas. Nesta figura, está representada a aplicação das equações 1 e 2 sobre a curva dos dados brutos, com a finalidade de obter o gráfico de fração desnaturada f_u . Para realizar esta representação, foi utilizada a concentração de solvente no eixo x, porém nos ensaios de desnovelamento térmico, este eixo é substituído pelo parâmetro “temperatura”, gerando o gráfico “ f_u x temperatura”. (Fonte: o autor)

A curva ajustada obtida do ajuste não-linear de Boltzmann também é utilizada para calcular a fração de proteína desenovelada (f_u), através da equação (2) (AHMAD; YADAV; TANEJA, 1992; PACE; SHIRLEY; THOMSON, 1989). Os gráficos “ f_u x Temperatura” e “ f_u x Concentração de Solvente” são cruciais para a obtenção da maior parte dos dados termodinâmicos apresentados neste trabalho (Figura 7).

$$f_u = \frac{y - y_f}{y_u - y_f} \quad (1)$$

onde f_u corresponde a fração de proteínas desenoveladas, y_f e y_u são os valores de y característicos dos estados enovelado e desenovelado e y é qualquer ponto da curva ajustada.

A partir dos valores de fração desenovelada de ambos os ensaios, obtém-se a constante de equilíbrio (K) e a variação de energia livre (ΔG). Estes dois parâmetros termodinâmicos são calculados de acordo com as equações (3) e (4) (PACE; SHIRLEY; THOMSON, 1989) (Figura 8).

$$K = \frac{f_u}{1 - f_u} \quad (3)$$

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (4)$$

Onde R é a constante universal dos gases ($1,987 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) e T é a temperatura em Kelvin.

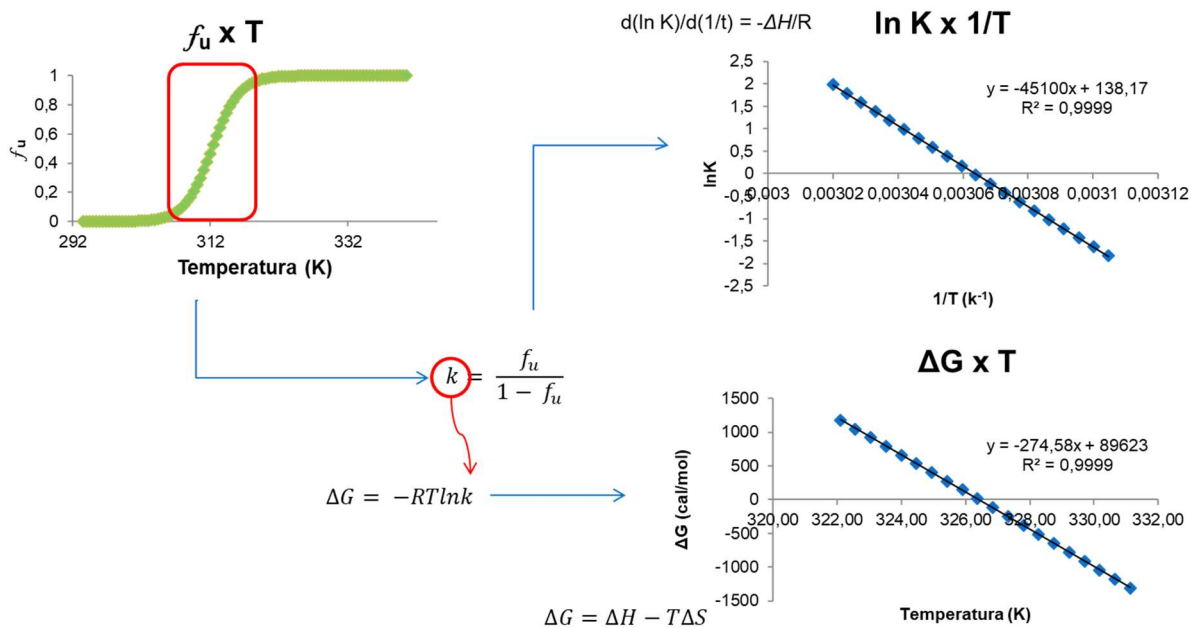


Figura 8: Representação esquemática do tratamento matemático realizado sobre as curvas espectroscópicas. Este esquema representa a aplicação das equações 3 a 9, mostrando o tratamento da curva de fração desnaturada. A partir dela, calcula-se a constante de equilíbrio (K) e, por conseguinte, os parâmetros ΔG , ΔH e ΔS . Para a realização destas etapas, o eixo x deve ser obrigatoriamente o parâmetro “temperatura”. (Fonte: o autor)

Com os dados de ΔG e temperatura, no caso da desenovelamento térmico, obtém-se um gráfico cuja equação da reta fornece o ΔS e ΔH (Eq. 5) (Figura 8).

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (5)$$

No T_m , que é a temperatura de desenovelamento e representa o ponto médio da transição entre os estados enovelado e desenovelado, ou seja, que corresponde à temperatura onde a fração de moléculas enoveladas é a igual a de moléculas desenoveladas, observa-se que o valor de k será 1 (Equação 4) e, conseqüentemente, $\ln K = 0$. Portanto, $\Delta G=0$ no T_m (Equação 5) e, assim, ΔS_{Tm} corresponde à inclinação da reta (a) e ΔH_{Tm} corresponde ao (b) da equação da reta (Eq. 5), conforme representado pela equação 6.

$$\Delta H_{Tm} = T_m \cdot \Delta S_{Tm} \quad (6)$$

O ΔH_{vH} também foi calculado utilizando a equação de van't Hoff (Eq. 7) (Figura 8) e pelas equações (8) e (9) (MERGNY; LACROIX, 2003). O valor obtido pelas quatro equações foi semelhante.

$$-\frac{\Delta H}{R} = \frac{d(\ln k)}{d\left(\frac{1}{T}\right)} \quad (7)$$

$$\Delta H = 4R \cdot T_m^2 \cdot \left(\frac{1}{\Delta T}\right) \quad (8)$$

$$\Delta H = 4R \cdot T_m^2 \cdot \left(\frac{df_u}{dT}\right) \quad (9)$$

Com os dados do desenovelamento químico, é possível plotar um gráfico de ΔG x [desnaturante], fornecendo o ΔG^{H_2O} , que representa a energia livre de desenovelamento na ausência de agentes desnaturantes (SHAW et al., 2009) (Figura 9).

$$\Delta G = \Delta G^{H_2O} - m. [desnaturante] \quad (10)$$

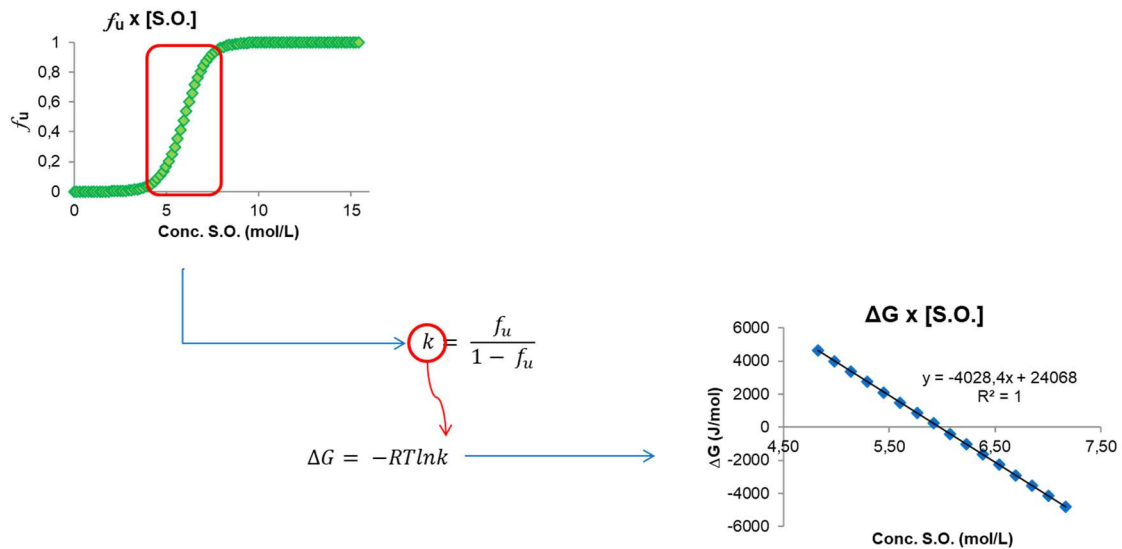


Figura 9: Representação esquemática do tratamento matemático realizado sobre as curvas espectroscópicas. Este esquema representa a aplicação das equações 3, 4 e 10. A equação da reta obtida do gráfico $\Delta G \times [S.O.]$ fornece o parâmetro ΔG^{H_2O} . Para a realização das etapas mostradas nesta figura, o eixo x deve ser obrigatoriamente representado pela concentração de desnaturante. (Fonte: o autor)

Já o índice de cooperatividade está matematicamente relacionado à variação de temperatura (Eq. 11) ou à variação de concentração do solvente (Eq. 12) na faixa de transição do estado nativo ou enovelado para o desnaturado ou desenovelado. A cooperatividade mede a eficiência da transmissão de calor entre as unidades internas de uma biomolécula (no caso de ensaios utilizando variação térmica) ou a facilidade de transição entre estados num determinado sistema (no caso de ensaios envolvendo variação de concentração de solvente à temperatura constante). Portanto, quanto maior o valor deste índice, menor é a faixa de temperatura ou de concentração de solvente orgânico necessária para completar a transição entre os estados $F \rightarrow U$ e $N \rightarrow D$.

$$CI = \frac{1}{\Delta T_{transição}} \quad (11)$$

$$CI = \frac{1}{\Delta C_{transição}} \quad (12)$$

O ΔT foi calculado através do parâmetro d_x e T_m gerados pelo ajuste não-linear da equação 1 no ensaio de desenovelamento térmico, sendo:

$$\Delta T = T_m \pm 2d_x \quad (13)$$

O ΔC foi calculado através do parâmetro d_x e C_m gerados pelo ajuste não-linear da equação 1 nos ensaios de atividade enzimática e fluorescência, sendo:

$$\Delta C = C_m \pm 2d_x \quad (14)$$

Por fim, a expressão $2d_x$ corresponde a metade da largura da base de uma curva gaussiana, ou seja, corresponde a 2σ . Essa curva é característica em transições de estados registradas no DSC após tratamento dos dados brutos e, por analogia, a extensão da área sob essa curva (4σ) é equivalente à região de transição na curva sigmoidal obtida por espectroscopia.

4.9.2 – Determinação de parâmetros termodinâmicos obtidos pelo DSC

O modelo clássico de transição em dois estados foi aplicado para a deconvolução da maioria das curvas experimentais obtidas, cujo ensaio foi descrito no item 4.8. A partir de cada transição, é possível obter os parâmetros T_m e ΔH_{cal} . O T_m é a temperatura de desenovelamento e representa o ponto médio da transição entre os estados enovelado e desenovelado, ou seja, o T_m corresponde à temperatura onde a fração de moléculas enoveladas é a igual a de moléculas desenoveladas. Já ΔH_{cal} é a mudança de calor obtida por meio da deconvolução da curva de “capacidade calorífica x temperatura”, ou seja, é a quantidade de calor que a molécula absorve ou libera para que ocorra uma transição. As equações básicas usadas para a deconvolução dos dados de DSC estão descritas nas referências (PRIVALOV; POTEKHIN, 1986; STURTEVANT, 1987).

Outro parâmetro importante é a entalpia de van't Hoff que é relacionada com a forma do pico (Gaussianas de desenovelamento) por meio da seguinte expressão:

$$\Delta H_{vH} = \Delta C p_{max} \cdot \left(\frac{4RT_m^2}{\Delta H_{cal}} \right) \quad (15)$$

Onde o ΔH_{cal} é a variação da entalpia calorimétrica, Cp_{max} é o máximo da função capacidade calorífica, R é a constante dos gases e T_m é a temperatura média da curva de desenovelamento. Para obter o valor da entalpia de van't Hoff, a função de ajuste “não dois estados” (“non two state”) do programa de análise Origin DSC® foi usada.

A entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}) é a área total integrada sob a curva do termograma. Após a correção apropriada da linha de base, ela representa a energia total absorvida ou liberada pela amostra passando por uma transição. Esta absorção/liberação depende da quantidade de amostra presente no volume aplicado nas células do DSC, e em princípio é uma medida não modelo-dependente para determinação da entalpia absoluta envolvida no processo de transição de estados.

Por outro lado, a entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}) é uma estimativa da entalpia da transição baseada sobre um modelo assumido para aquele processo analisado. Para a obtenção deste parâmetro, usa-se a área sob a curva de Cp em qualquer temperatura, dividida pela área total do termograma, como uma medida da extensão da fração de moléculas desnaturadas que ocorrem naquela temperatura. Como o tratamento de van't Hoff (ΔH_{vH}) se baseia apenas nas razões das áreas sob a curva experimental, ela não requer nenhuma informação sobre concentração ou pureza da amostra. A comparação da entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}) e da entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}) pode fornecer informações importantes sobre os mecanismos de alguns processos e molecularidade de alguns eventos (LEHARNE; CHOWDHRY, 1998).

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Purificação das isoformas da tripsina bovina

A tripsina bovina comercial foi submetida à cromatografia de troca catiônica de bancada, conforme metodologia de Santos et al. (2008b) (Figura 10). Uma deconvolução matemática foi aplicada sobre as bandas cromatográficas para determinação das frações correspondentes a cada isoforma utilizando o software Origin®. E como pode ser observado na Figura 10, a resolução cromatográfica, apesar de ter sido baixa ($r = 1,02$), foi considerada satisfatória devido à facilidade de obtenção da isoforma (uma única etapa cromatográfica) e à quantidade obtida. Assim, essa condição padronizada permitiu obter aproximadamente 460 mg da isoforma β -tripsina e 241 mg da isoforma α -tripsina.

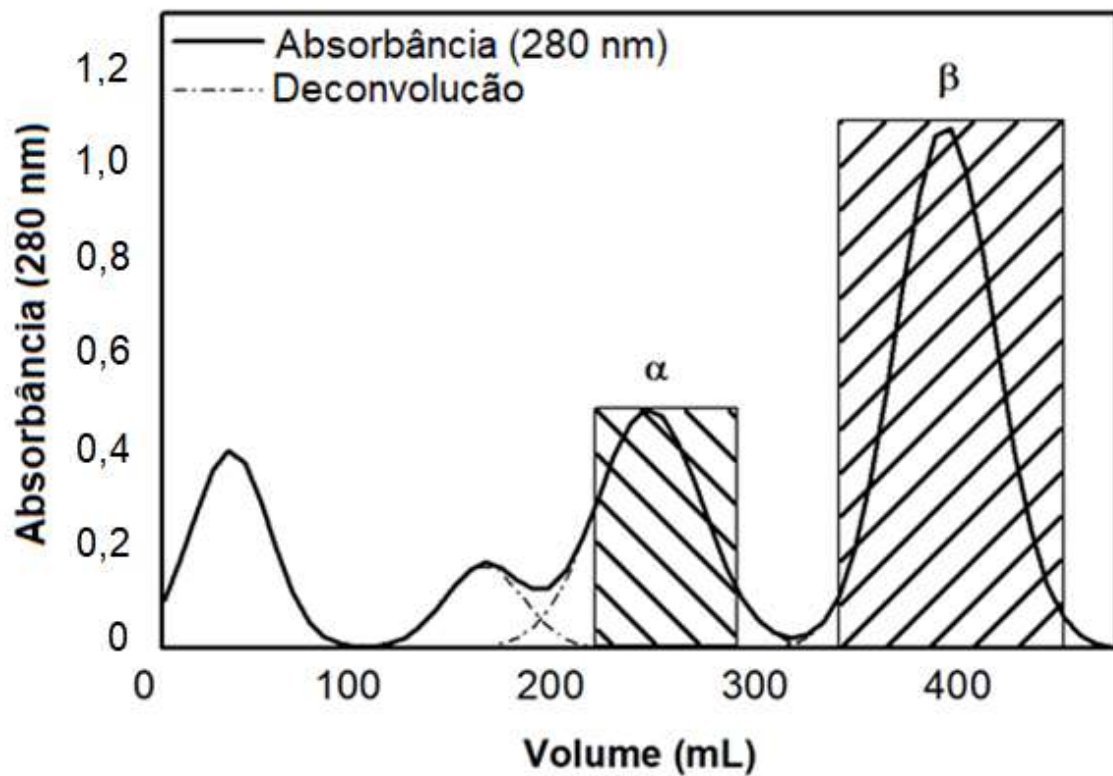


Figura 10: Perfil cromatográfico de troca catiônica de tripsina comercial bovina. A fase estacionária utilizada foi SE-Sephadex C50[®]. A fase móvel usada foi tampão Tris 100 mmol.L⁻¹ pH 7,1 a 4 °C contendo CaCl₂ 20 mmol.L⁻¹ e benzamidina 1 mmol.L⁻¹. O fluxo cromatográfico foi ajustado para 0,25 mL.min⁻¹. Detecção (-) das frações coletadas feita a 280 nm e (---) corresponde à deconvolução matemática do perfil. As áreas demarcadas correspondem às isoformas β-tripsina e α-tripsina.

De acordo com SANTOS (2009), na cromatografia realizada em pH 7,1 a 4°C as bandas cromatográficas eluídas exibem uma forma gaussiana bem definida e simétrica, mostrando que o sistema cromatográfico não está sobrecarregado de proteínas, que não existe arraste de proteínas durante o percurso da coluna e que a difusão longitudinal está minimizada. Um perfil cromatográfico semelhante foi encontrado neste trabalho (Figura 10) ao se utilizar as mesmas condições do autor anteriormente citado.

A análise do perfil deconvoluído na Figura 10 indicou que a separação entre as isoformas β , α e ψ não foi completa, apresentando uma área de mistura entre as isoformas. Para que não fosse realizada uma recromatografia, optou-se por utilizar os tubos contidos nas áreas retangulares hachuradas (Figura 10) que continham as isoformas α - e β -tripsina em alto grau de pureza, mesmo levando esta conduta a um menor rendimento cromatográfico.

Outro ponto relevante a se destacar é que, mantidas as condições cromatográficas e, levando em conta que o sistema cromatográfico em questão é aberto, a eluição das isoformas ocorre sempre em torno de um tempo de retenção médio com variação insignificante. E isto é confirmado por diferentes trabalhos que mostram que as isoformas apresentam a mesma sequência de eluição, sendo as isoformas γ , ψ , α , e β as últimas a serem eluídas (LACERDA et al., 2014; SANTOS et al., 2008b; SCHROEDER; SHAW, 1968). Portanto, é possível caracterizar as isoformas de tripsina bovina por meio das frações correspondentes a cada banda cromatográfica, sem a obrigatoriedade de se realizar ensaios adicionais para caracterizar cada fração eluída. Ainda assim, para tornar a caracterização mais detalhada, optou-se por realizar outros ensaios conforme descrito a seguir.

5.2 – Confirmação da identidade de β - e α -tripsina por gel de eletroforese SDS-PAGE

A fim de identificar as isoformas pelo número de cadeias que as compõem, as frações purificadas na cromatografia de troca catiônica foram analisadas utilizando gel de SDS-PAGE em condições redutoras (Figura 11).

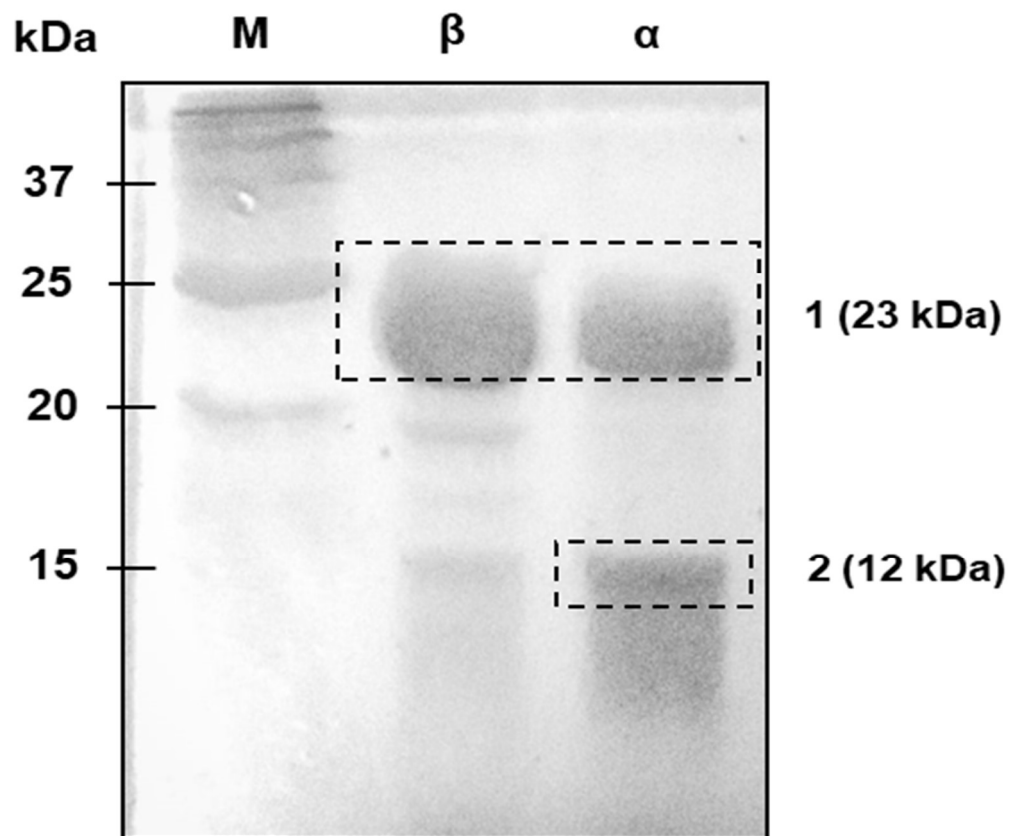


Figura 11: Perfil de SDS-PAGE das isoformas de tripsina bovina. Canaletas da esquerda para a direita: marcador de massa molecular (M), β -tripsina (β), α -tripsina (α). As regiões 1 e 2 nos retângulos são bandas de massas correspondente às cadeias das isoformas.

As isoformas β - e α -tripsina possuem números de cadeia já determinados e relatados na literatura ($\beta = 1$, $\alpha = 2$) (SANTOS et al., 2008a, 2008b; SMITH & SHAW, 1969). A análise do gel resultou na presença de uma banda principal para β -tripsina, duas para α -tripsina (Figura 11). A massa molecular das regiões 1 e 2 foram aproximadamente de 23 kDa e 12 kDa, respectivamente. As diferentes regiões de massa dentro da mesma canaleta demonstram que o uso do gel redutor foi capaz de separar as cadeias polipeptídicas unidas por pontes dissulfeto nas isoformas.

As bandas de baixa intensidade abaixo de 23 kDa (Figura 11) na amostra de β -tripsina são devidas à ocorrência de autólise desta isoforma durante o preparo da amostra, resultando em fragmentos menores. Para todas as isoformas, a banda da região 1 é atribuída à proteína de 223 resíduos de aminoácidos completa e não reduzida, consistente com a massa teórica e experimental para as isoformas já caracterizadas (23 kDa) (SANTOS et al., 2008b). As massas moleculares da cadeia de cada isoforma já caracterizada foram obtidas *in silico* no ProtParam através da sequência de cada cadeia já conhecida (GASTEIGER et al., 2005), utilizando como molde o 5ptp obtido no *Protein Data Bank*. A banda da região 2 da α -tripsina pode ser atribuída à média das cadeias (cadeia A da α -tripsina 13 kDa e cadeia B da α -tripsina 10 kDa) que tiveram suas pontes dissulfeto reduzidas.

5.3 – Determinação da pureza por Espectrometria de Massa

A pureza e a massa molecular média das frações de β -tripsina e de α -tripsina selecionadas nos retângulos hachurados (Figura 10) foram determinadas por espectrometria de massa eletrospray e o resultado obtido (Figura 12) refere-se aos padrões de distribuição dos picos iônicos das isoformas purificadas de β e α -tripsina. Como pode ser observado na Figura 12, existe apenas uma distribuição Gaussiana com picos únicos para os perfis de α -tripsina e de β -tripsina (ambos de 9+ a 19+). Este resultado mostra que as isoformas estão livres de contaminantes e que essas isoformas predominam nas respectivas frações, podendo conter resquícios da isoforma anteriormente eluída.

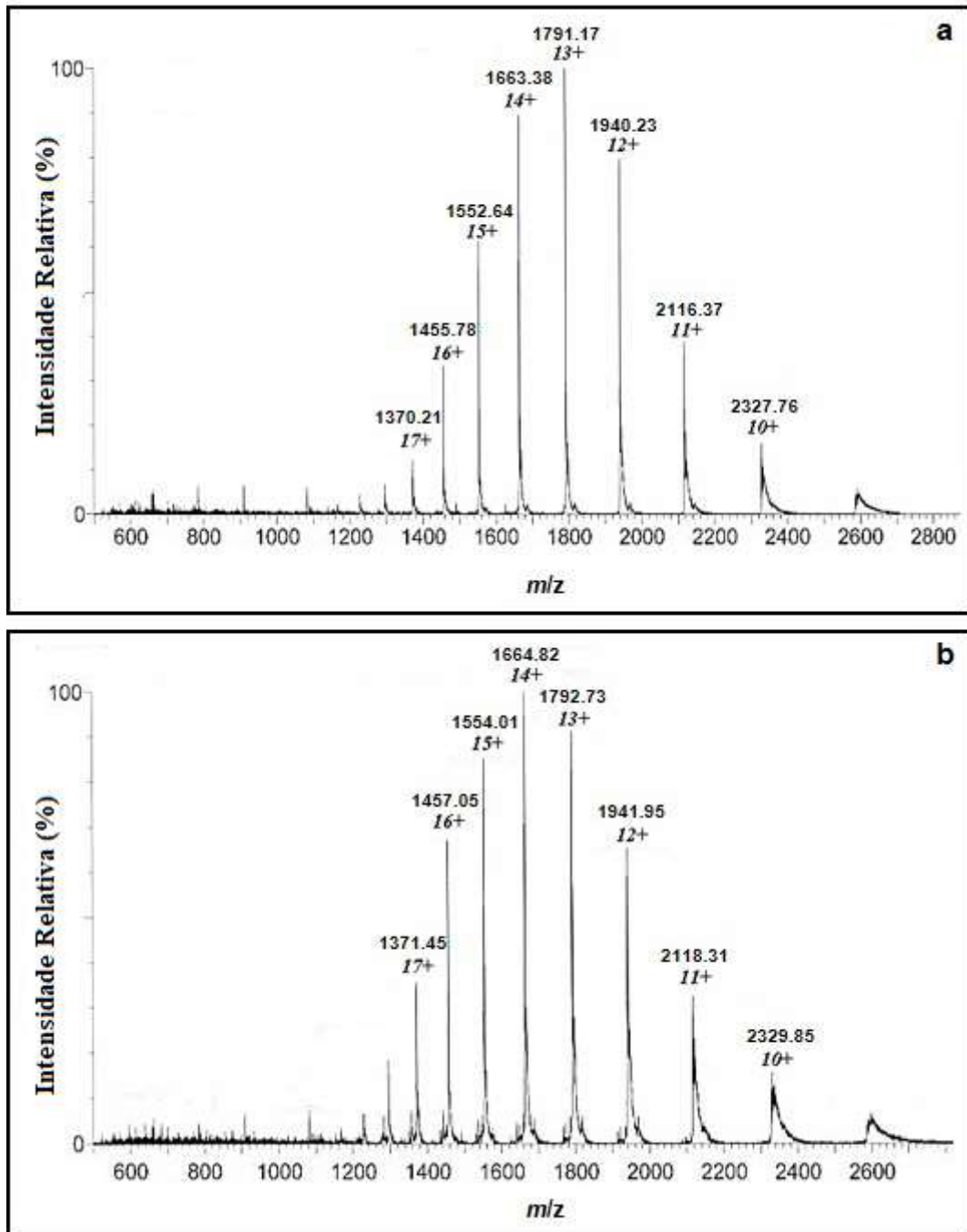


Figura 12: Espectrometria de massa do tipo ESI das isoformas β - e α -tripsina. (a) β -tripsina e (b) α -tripsina. A análise do espectrograma forneceu massa molecular média de (a) $23.272,58 \pm 1,00$ Da e de (b) $23.293,24 \pm 1,00$ Da.

Os valores das massas moleculares foram calculados utilizando o software MassLynx[®]. Os resultados obtidos foram $M(\beta) = 23.272,58 \pm 1,00$ Da; $M(\alpha) = 23.293,24 \pm 1,00$ Da. A diferença entre as massas destas isoformas [$M(\beta) - M(\alpha)$] corresponde à adição de uma molécula de água para a formação da α -tripsina. O valor de massa molecular encontrado está de acordo com o esperado para caracterizar as isoformas (ASHTON et al., 1994; SANTOS et al., 2008b) e, aliado aos perfis de eluição da cromatografia, pode-se afirmar que as frações delimitadas pelas áreas hachuradas da Figura 10 são compostas preponderantemente pelas isoformas β - e α -tripsina.

5.4 – Avaliação da estabilidade termodinâmica das isoformas β - e α -tripsina utilizando espectroscopia de fluorescência

A técnica de fluorescência é comumente utilizada em estudos estruturais de biomoléculas e de estabilidade de proteínas. E a respeito do estudo de estabilidade de proteínas, sabe-se que os resíduos de triptofano e de tirosina geralmente são excitadas em aproximadamente 280 nm ou em comprimentos de ondas maiores (LAKOWICZ, 2006), porém os resíduos de triptofano são mais sensíveis ao seu microambiente químico. Outro ponto importante é que a coleta de dados referentes à emissão de fluorescência fornece diversas informações, sendo possível monitorar as populações de moléculas no estado enovelado e desenovelado. Portanto, a determinação da estabilidade termodinâmica dessas biomoléculas é uma etapa importante, que deve ser executada antes de se iniciar os estudos propriamente ditos de caracterização de biomoléculas. Com esse tipo de informação, é possível prever se a proteína em estudo já se apresenta instável, o que poderia interferir na interpretação dos resultados obtidos nos estudos conformacionais.

Um dos parâmetros termodinâmico que podem ser usados para realizar essa avaliação é a variação de energia livre de desenovelamento (ΔG^{H_2O}), sendo um parâmetro confiável usado para verificar a estabilidade da proteína dentro de uma faixa de estabilidade já conhecida (SANTORO; BOLEN, 1992). Valores maiores do que zero indicam que o processo de desnaturação não é favorável e, quanto maior o seu valor, mais estável é o estado nativo de uma proteína. Utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência, foi possível acessar alguns parâmetros termodinâmicos que refletiram a estabilidade conformacional das isoformas β - e α -

tripsina após o processo de purificação. É importante destacar que, ao estimar o ΔG^{H_2O} , não houve a intenção de determinar o valor exato deste parâmetro para cada isoforma, mas apenas realizar uma verificação indireta da estabilidade conformacional das isoformas, sendo consideradas estáveis quando apresentam valores entre 5 – 17 kcal.mol⁻¹ (BRANDEN; TOOZE, 1999; NAKAI; MODLER, 1996). Para a obtenção deste parâmetro, foram utilizados os dados brutos da região de transição da Figura 15 para obter os pontos registrados na Figura 13, e o resultado é mostrado na Tabela 1.

A alteração da conformação da estrutura das isoformas, que ocorre com o uso de solventes orgânicos em diferentes concentrações, foi monitorada indiretamente através do movimento dos resíduos de aminoácidos aromáticos (ANTOSIEWICZ; SHUGAR, 2016; BURSTEIN; ABORNEV; RESHETNYAK, 2001; EFTINK, 1994; LAKOWICZ, 2006) pela técnica de fluorescência. Foi monitorado o resíduo de aminoácido Trp (4 unidades/isoforma), pois eles apresenta fluorescência intrínseca e rendimento quântico suficiente para providenciar um bom sinal de fluorescência durante o processo de desenovelamento (ANTOSIEWICZ; SHUGAR, 2016; CHEN, 1967; EFTINK, 1994; LAKOWICZ, 2006; RESHETNYAK; BURSTEIN, 2001). Apesar de os resíduos tirosina e triptofano serem excitados em 280 nm e de ambos apresentarem rendimento quânticos similares ($\Phi_Y = 0,14$ e $\Phi_W = 0,13$), a emissão de fluorescência é dominada pelo resíduo de triptofano devido ao seu maior coeficiente de extinção molar (HELLMANN; SCHNEIDER, 2019).

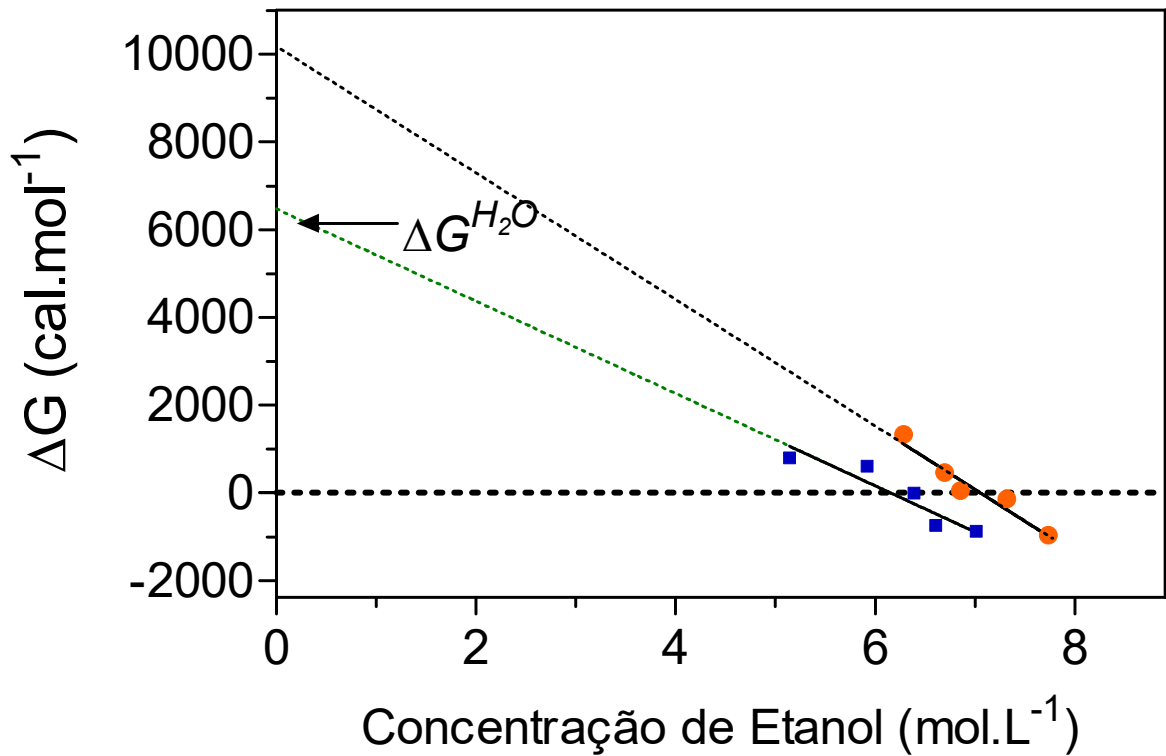


Figura 13: Variação de energia livre plotada contra a concentração de etanol. A linha pontilhada refere-se à extrapolação linear para determinação da energia livre. ΔG^{H_2O} é a medida da variação de energia livre de desenovelamento desconsiderando a interferência do solvente sobre a proteína. Legenda: (■) β -tripsina; (●) α -tripsina. Os pontos coloridos correspondem ao ΔG calculado a partir do dado bruto (neste caso, a partir do comprimento de onda máximo da região de transição que serviu de base para o cálculo da fração desnaturada, conforme descrito no item 4.9.1).

O primeiro destes parâmetros termodinâmicos a ser avaliado foi o ΔG^{H_2O} (Figura 13 e Tabela 1). Usando as equações clássicas de deconvolução matemática para construção da curva de estabilidade (SHAW et al., 2009), foi realizada uma extrapolação linear dos pontos obtidos na região de transição para obtenção deste resultado. Os resultados do método de extrapolação linear (SANTORO; BOLEN, 1992; SHAW et al., 2009) dos dados da curva de desenovelamento químico estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1: ΔG^{H_2O} das isoformas β -tripsina e α -tripsina obtidos pela curva de desenovelamento por indução química monitorada em pH 3,0 por fluorescência.

	β -tripsina	α -tripsina
ΔG^{H_2O} (kcal.mol ⁻¹) ^a	6,05 ± 0,50	10,31 ± 0,20

^a Este parâmetro corresponde à variação de energia livre de desenovelamento e reflete a estabilidade conformacional de biomoléculas.

O valor obtido neste trabalho para ΔG^{H_2O} (Tabela 1) se encontra dentro de uma faixa de valores de referência para proteínas globulares nativas tanto de valores teóricos (5 – 17 kcal.mol⁻¹) (BRANDEN; TOOZE, 1999; NAKAI; MODLER, 1996) quanto de experimentais obtidos anteriormente por nosso grupo (BITTAR et al., 2003; SANTOS et al., 2008a). Esse resultado indica que ambas as populações de isoformas foram isoladas na forma nativa e sugere que as características estruturais permaneceram estáveis após o processo de purificação. Isto significa que qualquer alteração que tenha ocorrido durante todo o processo não foi suficiente para causar desestabilização na conformação das isoformas. Cabe aqui salientar que os valores de ΔG^{H_2O} não são fixos e exatos para proteínas, já que mudanças conformacionais podem ocorrer ao longo do prazo de estocagem dessas biomoléculas, ocasionando variações nos valores nominais deste parâmetro. Para a utilização deste parâmetro para fins de controle de qualidade, o importante é que os valores deste parâmetro se apresentem dentro da faixa estimada para proteínas globulares estáveis (BRANDEN; TOOZE, 1999; NAKAI; MODLER, 1996). Com base nesses resultados, foi dado prosseguimento aos estudos enzimáticos, estruturais e conformacionais das isoformas β - e α -tripsina com a garantia de que os resultados

observados futuramente não tinham influência de alguma desnaturação prévia ocasionada pelo processo de purificação.

5.5 – Efeito dos solventes orgânicos sobre a atividade enzimática das isoformas β - e α -tripsina

A fim de se conhecer melhor o efeito dos solventes orgânicos sobre atividade enzimática de β -tripsina e compará-la à da α -tripsina, foram realizados testes de atividade em função das concentrações de solventes orgânicos. Além disso, esse ensaio também teve como objetivo definir o solvente a ser usado para o estudo conformacional das isoformas. A Figura 14 mostra o efeito de diferentes concentrações de soluções aquosas de metanol, etanol e n-propanol (10 a 90% v/v) sobre a atividade amidásica das isoformas. A avaliação da influência da absorção de *p*-NA em função do tipo e da concentração de solvente orgânico mostrou-se insignificante frente ao efeito desnaturante do solvente orgânico sobre as isoformas (COSTELA et al., 1997; GORAI, 2010; PATEL; GORAI; MALIK, 2011), sendo assim desconsiderado esse efeito para fins de comparação relativa. Em geral, as curvas de atividade em função da concentração de solvente orgânico mostraram uma forma sigmoideal, que é característico de uma transição entre os estados nativo e desnaturado. Os dados brutos da Figura 14 foram ajustados no modelo de Boltzmann (linha tracejada ---) por meio do programa Origin®, que utilizou a equação 2.

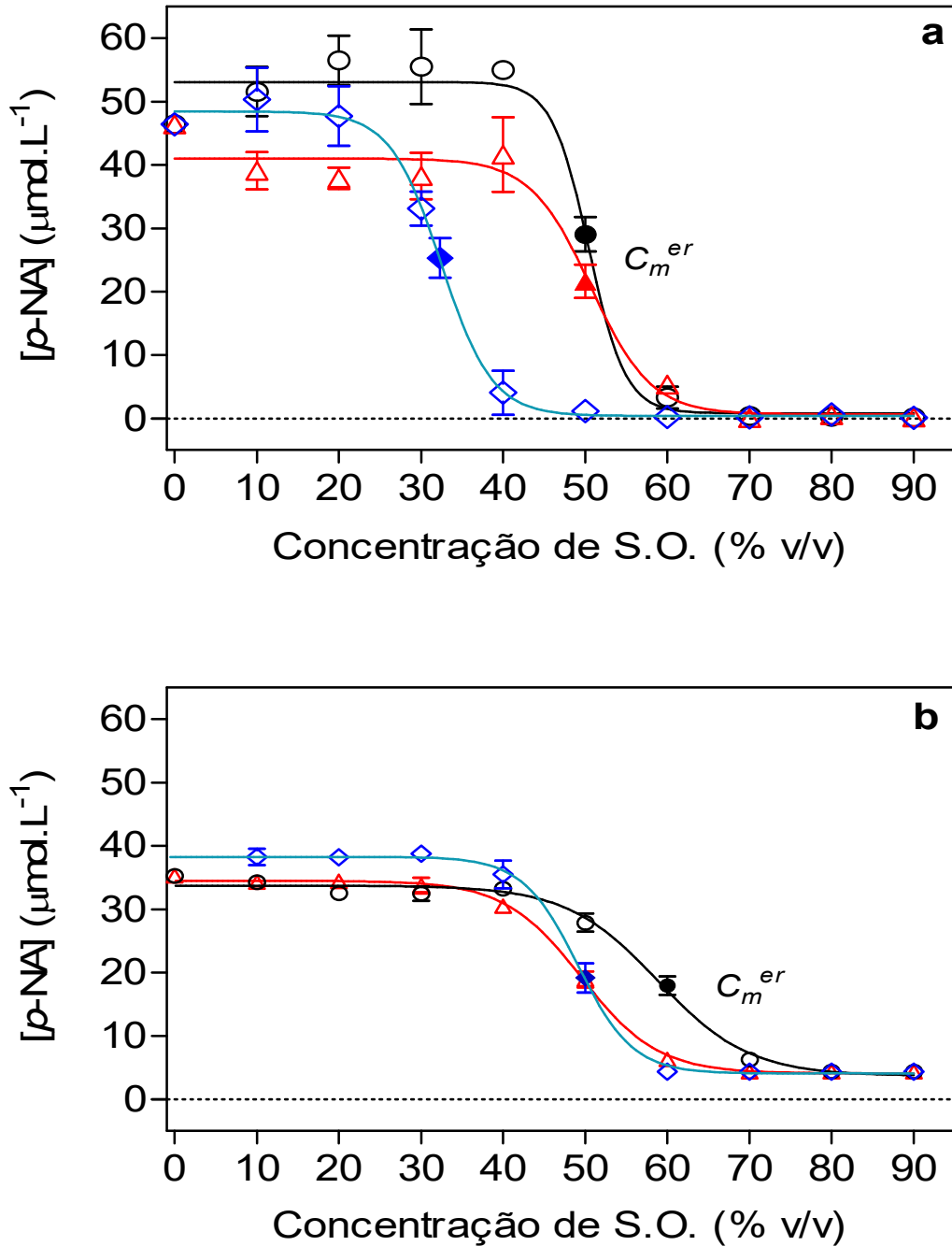


Figura 14: Atividade amidásica das isoformas α - e β -tripsina em função da concentração de álcoois. Temperatura de 37° C, tampão tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 8,0 com 20 mmol.L⁻¹ de CaCl₂ utilizando BA ρ NA como substrato. (a) Isoforma β -tripsina. (b) Isoforma α -tripsina. Legenda: (Δ) Metanol, (O) Etanol, (\diamond) n-propanol, em porcentagem (v/v). Os símbolos fechados representam o C_m da reação enzimática. Os valores são expressos como média (n=3) \pm desvio padrão. R^2 para $\beta_{met} = 0,97$; $\beta_{et} = 0,98$; $\beta_{prop} = 0,99$. Valores de $R^2 = 0,99$ para a α -tripsina nos três solventes testados.

Como pode ser visto na Figura 14, a β -tripsina possui atividade amidásica superior a da α -tripsina em todos os solventes testados, sendo esse mesmo perfil relatado em literatura para o meio aquoso (FOUCAULT; SEYDOUX; YON, 1974). Para aplicação de enzimas como catalisadores em meios aquo-orgânicos, o ideal é que a enzima mantenha sua atividade máxima na maior concentração possível de solvente orgânico. De acordo com Mozhaev et al. (1989), muitas enzimas preservam sua atividade inalterada até uma determinada concentração de solvente orgânico, que ele denomina como “concentração crítica”, e os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com o proposto por ele. A concentração crítica de Mozhaev, neste trabalho, é tratada como PTS. Neste trabalho é possível observar que há uma concentração crítica de solvente orgânico (PTS), cujo valor é diferente em cada solvente (Tabela 2 e Tabela 3). Cabe ressaltar que o maior valor de PTS (Tabela 2 e 3) e região mais extensa de pré-transição (Figura 14) foram encontrados em etanol e, desta forma, a análise isolada do parâmetro PTS indica que dentre os solventes testados o etanol é o melhor para se trabalhar com as isoformas.

Tabela 2: Parâmetros obtidos por curvas de atividade amidásica da β -tripsina monitorado por espectroscopia de absorção a 410 nm.

	Metanol	Etanol	n-Propanol
C_m^{er} (% v/v) ^a	50,5 ± 0,8	51,0 ± 0,7	32,0 ± 0,4
CI (% v/v) ⁻¹ ^b	0,028 ± 0,003	0,050 ± 0,004	0,040 ± 0,003
PTS (% v/v) ^c	33 ± 1	40 ± 1	18 ± 1
y_{PTS} (mmol.L ⁻¹) ^d	41,0 ± 1,0	53,1 ± 1,2	48,4 ± 0,9
y_{Cm} (mmol.L ⁻¹) ^e	21	29	25

^a C_m da reação enzimática: é a concentração de solvente orgânico na qual 50% da média populacional de biomoléculas apresenta atividade.

^b Índice de cooperatividade: corresponde a eficiência da transição entre os estados nativo e desnaturado.

^c Corresponde à maior concentração de solvente orgânico que a enzima tolera sem prejuízo à sua atividade.

^d Corresponde ao valor encontrado no eixo y a região de pré-transição da curva de atividade.

^e Corresponde ao valor encontrado no eixo y para o parâmetro C_m^{er} .

Tabela 3: Parâmetros obtidos por curvas de atividade amidásica da α -tripsina monitorado por espectroscopia de absorção a 410 nm.

	Metanol	Etanol	n-Propanol
C_m^{er} (% v/v) ^a	49,5 ± 0,2	59,5 ± 0,5	48,1 ± 0,3
CI (% v/v) ⁻¹ ^b	0,025 ± 0,003	0,025 ± 0,002	0,033 ± 0,004
PTS (% v/v) ^c	33 ± 1	44 ± 1	38 ± 1
y_{PTS} (mmol.L ⁻¹) ^d	34,5 ± 0,2	33,0 ± 0,6	38,3 ± 0,3
y_{C_m} (mmol.L ⁻¹) ^e	19	18	19

^a C_m da reação enzimática: é a concentração de solvente orgânico na qual 50% da média populacional de biomoléculas apresenta atividade.

^b Índice de cooperatividade: corresponde a eficiência da transição entre os estados nativo e desnaturado.

^c Corresponde à maior concentração de solvente orgânico que a enzima tolera sem prejuízo à sua atividade.

^d Corresponde ao valor encontrado no eixo y a região de pré-transição da curva de atividade.

^e Corresponde ao valor encontrado no eixo y para o parâmetro C_m^{er} .

Ainda de acordo com este mesmo trabalho de Mozhaev, a partir desta concentração crítica, uma pequena variação na quantidade de solvente orgânico já é capaz de causar queda abrupta da atividade e inativação enzimática. Essa análise pode ser feita tanto de forma qualitativa, por meio da observação da região de transição da Figura 14, quanto quantitativa, por meio da análise do parâmetro CI registrado na Tabela 2.

Analisando-se primeiramente os resultados obtidos para a transição da β -tripsina, observou-se: (I) uma redução menos cooperativa da atividade da isoforma em metanol, o que pode ser verificado pelo maior região de transição na Figura 14a e pelo menor valor de CI registrado na Tabela 2; (II) uma redução de atividade mais cooperativa em etanol e n-propanol, evidenciado por uma região de transição mais estreita e por maiores valores de CI. Comparando-se apenas as curvas da Figura 14b entre si, observa-se que a transição da α -tripsina foi menos cooperativa em metanol e etanol. E por fim, ao se comparar os resultados entre as isoformas, observa-se, por meio da menor inclinação da região de transição, que a α -tripsina

apresentou transições menos cooperativas em todos os solventes se comparado às curvas da β -tripsina. Pode-se observar na Tabela 2 que a redução da atividade está relacionada à cooperatividade de transição entre estados observada na Figura 14: quanto menor o valor do índice de cooperatividade, maior é a chance de o processo de desnaturação ocorrer com a formação de intermediários indistinguíveis entre si (HAYNIE, 2008). Este parâmetro, por si só, não permite escolher o solvente mais adequado para a atividade das isoformas, servindo apenas como um suporte para a avaliação conjunta de todos os fatores a serem avaliados neste tipo de ensaio.

Outro parâmetro que auxilia na avaliação da atividade das isoformas em solventes orgânicos é o C_m^{er} . Quanto maior o valor deste parâmetro, maior é a resistência das isoformas à desnaturação. Os maiores valores de C_m^{er} para ambas as isoformas foi visto em etanol (Tabela 2 e Tabela 3). Em metanol, o valor de C_m^{er} foi igual para as duas isoformas, enquanto em n-propanol a α -tripsina apresenta maior C_m^{er} que a β -tripsina. O n-propanol foi considerado o solvente que mais interferiu negativamente para a atividade amidásica de ambas as isoformas, pois neste meio elas apresentaram baixos valores de PTS e os menores valores de C_m^{er} (Tabela 2 e Tabela 3). Os menores valores de C_m^{er} , observados via de regra na β -tripsina, indicaram que a interação entre esta isoforma e o solvente supostamente causou um maior grau de desnaturação, se comparado à α -tripsina (ROSA et al., 2021). Desta forma, tomando como base unicamente o parâmetro C_m^{er} , o solvente escolhido seria o etanol para a α -tripsina e o metanol ou o etanol para a isoforma β -tripsina.

Outros parâmetros também foram levados em conta na avaliação da atividade amidásica sob a influência de solventes orgânicos. Trata-se da concentração máxima de produto formado pela atividade das isoformas (y_{PTS}) e da concentração de produto formado no ponto correspondente ao C_m^{er} (y_{Cm}), registrados nas Tabela 2 e Tabela 3. Comparando os resultados de concentração de produto obtido, observou-se que a atividade da isoforma β -tripsina em etanol foi aproximadamente 60% maior do que a da α -tripsina. Já em metanol, a atividade da β -tripsina foi de 10 a 20% maior que a da α -tripsina. E em n-propanol, a atividade da β -tripsina foi cerca de 30 a 40% maior do que a da α -tripsina. As maiores diferenças entre as atividades das isoformas foram encontradas nos solventes metanol e n-propanol e correspondem à atividade máxima, observada na região de pré-transição. A

atividade amidásica da isoforma β -tripsina é conhecidamente superior a da α -tripsina em meio aquoso (BITTAR et al., 2003; KEIL, 1971; NASSER BRUMANO; ROGANA; SWAISGOOD, 2000; SANTOS et al., 2008a). Este perfil se manteve também nos solventes orgânicos testados.

Algumas teorias podem justificar os resultados vistos acima. Na maioria dos parâmetros avaliados, observou-se que o pior resultado foi visto em n-propanol. Uma das explicações para esse resultado seria a forma de interação solvente-enzima. A primeira forma seria a interação direta da cadeia carbônica do n-propanol com o núcleo hidrofóbico da enzima em estudo (MATSUBARA et al., 2006) já em baixas concentrações. Ainda pode ocorrer uma interação indireta entre o n-propanol e a tripsina por meio de uma reorganização espacial das moléculas de água, o que também ocasionaria a exposição do core hidrofóbico (MOMENI et al., 2018).

Além das hipóteses de interação direta e indireta entre solvente e enzima, outras teorias podem também justificar os resultados obtidos. Uma delas é que a atividade é afetada pela mudança das propriedades gerais do meio causada por solventes orgânicos (BUTTLER, 1979; KHMELNITSKY et al., 1988). Dentre essas propriedades, a alteração da constante dielétrica explica muitas das alterações vistas neste trabalho. Há uma correlação entre o tamanho da cadeia carbônica de monoálcoois e a constante dielétrica: quanto maior o tamanho da cadeia, menor é o valor desta constante. Desta forma, quanto maior a constante dielétrica, maior é a interação soluto-solvente e menos é a interação soluto-soluto, ou seja, quanto menor o valor dessa constante, maior a facilidade de interação entre os resíduos de aminoácidos, aumentando a rigidez da enzima e a interação proteína-proteína. Portanto, a redução da constante dielétrica pode afetar o grau de hidratação da enzima. Apesar de a redução desta constante ser um dos fatores-chave para a alteração das interações enzima-solvente, ele não é o único, já que não foi encontrada uma correlação linear entre a diminuição da atividade e o aumento da cadeia carbônica.

Uma outra explicação que pode ser associada à anterior é que os solventes orgânicos são capazes de causar disruptura na camada de água que circunda as moléculas biológicas, causando mudanças no seu perfil de atividade (KHMELNITSKY et al., 1988; KLIBANOV, 1989; LAANE et al., 1987). É relatado em literatura a ocorrência de microdomínios compostos de água e solventes orgânicos

em soluções contendo esses grupos de moléculas (FAIZULLIN et al., 2017). Isso pode dificultar a hidratação da enzima devido à quantidade reduzida de moléculas de água disponíveis para compor a camada de hidratação (FAIZULLIN et al., 2017). Além disso, os solventes orgânicos polares são capazes de removerem a água da camada de hidratação, acarretando na redução (ou até mesmo perda) da atividade catalítica por desnaturação (GORMAN; DORDICK, 1992). Portanto, a escolha do solvente e o controle do meio de hidratação influenciam diretamente o grau de flexibilidade da enzima.

Finalizando a discussão do tópico em questão, tem-se que a análise conjunta dos parâmetros PTS, C_m^{er} e y_{PTS} , apresentados nas Tabela 2 e Tabela 3 sugere que, dentre os solventes testados, o etanol é o mais adequado para a utilização das isoformas β -tripsina e α -tripsina como catalisador. Isto porque neste solvente as isoformas toleram maiores concentrações antes de começarem desnaturar (maior PTS), com tendência a uma atividade similar ou até mesmo superior a do meio aquoso (y_{PTS}). Além disso, é no etanol que as isoformas apresentam os maiores valores de concentração média de desnaturação (elevado C_m^{er}) e o solvente no qual as isoformas conseguem transitar entre estados com maior cooperatividade. Já os parâmetros CI e y_{cm} foram usados para mostrar as diferenças de atividade entre as isoformas na presença de álcoois, sendo que a β -tripsina apresentou um processo de perda de atividade mais cooperativa (maior CI) e uma maior eficiência catalítica na presença do etanol (maior y_{cm}).

5.6 – Perfil de mudanças conformacionais das isoformas induzidas por etanol

Conforme já abordado no item 5.4, as proteínas são geralmente excitadas em aproximadamente 280 nm ou em comprimentos de ondas maiores (LAKOWICZ, 2006), já que tanto tirosina quanto triptofano são excitados em 280 nm (DEMCHENKO, 1986a), sendo a emissão de fluorescência em proteínas dominada pelo resíduo de triptofano devido ao seu maior coeficiente de extinção molar (HELLMANN; SCHNEIDER, 2019). E os dados dessa emissão deram origem a parâmetros que também permitiram avaliar as mudanças conformacionais induzidas pelos solventes orgânicos (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014; MÖLLER; DENICOLA, 2002; YANG et al., 2017).

O comprimento de onda máximo de emissão do triptofano é bastante sensível ao seu ambiente local, variando de aproximadamente 308 nm (azurina) a aproximadamente 355 nm (por exemplo, glucagon), tendo grande correlação com o grau de exposição do cromóforo ao solvente (VIVIAN; CALLIS, 2001). De acordo com Lakowicz (2006), o espectro de emissão do resíduo de triptofano é fortemente dependente da polaridade no seu entorno, sendo essa emissão sensível às ligações de hidrogênio do grupo imino. Desta forma, no caso de proteínas que apresentam resíduos de triptofano, as mudanças referentes ao deslocamento batocrômico são atribuídas principalmente à interação do grupo imino com o solvente polar. Portanto, conforme os resíduos de triptofano realizam ligações de hidrogênio ou se tornam expostos ao solvente polar (ex: água e etanol), a emissão é deslocada para comprimentos de onda maiores.

Portanto, os dados brutos de fluorescência podem fornecer diversas informações. Além da estabilidade conformacional pós-purificação apresentada anteriormente, é possível avaliar as mudanças conformacionais induzidas por meios aquo-orgânicos. Para obter os parâmetros que permitam realizar essa avaliação, são necessários ajustes matemáticos sobre os dados apresentados na Figura 15, que foram retirados de curvas de varredura de emissão de fluorescência (APÊNDICE B). E o primeiro tratamento matemático utilizado sobre esses dados foi o ajuste não-linear de Boltzmann, sendo esse ajuste aplicado sobre os dados de comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência. O resultado deste ajuste forneceu as curvas de desenovelamento por adição de solvente, representado na Figura 15. O gráfico apresentou um modelo sigmoidal típico de um processo de dois estados (SANTORO; BOLEN, 1988) monitorado por técnicas espectroscópicas (PRIVALOV, 1979). O valor do ponto médio da curva de transição, que corresponde ao C_m conformacional, está registrado na Tabela 4.

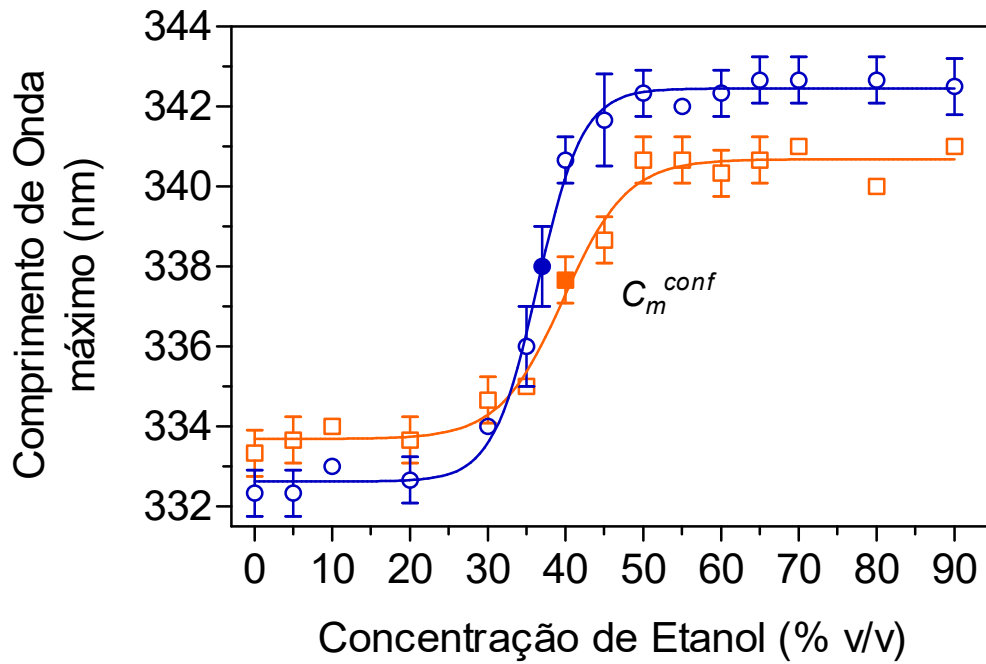


Figura 15: Perfil de desenvolvimento por indução química das isoformas β - e α -tripsina plotados em função da concentração de etanol (% v/v). Curvas obtidas pela emissão intrínseca do resíduo de triptofano monitorado por espectroscopia de fluorescência. Os símbolos fechados representam o C_m , que é a concentração na qual 50% da população de biomoléculas se encontram no estado enovelado. Legenda: (\circ) β -tripsina, (\square) α -tripsina. O ajuste para β -tripsina foi $R^2 = 0,98$ e para a α -tripsina foi $R^2 = 0,97$.

O primeiro ponto a ser destacado é que as modificações conformacionais das isoformas induzidas pelo etanol ocorrem com diferentes amplitudes, conforme pode ser visto na Figura 15. E isto é evidenciado pela diferença entre os platôs de emissão dos estados enovelado e desenovelado (λ_{\max}), que se deslocam em direção à região do vermelho. Esse deslocamento para a região vermelha do espectro indica o desenovelamento da estrutura proteica (ELSHEREEF et al., 2006; GUINN; BLANCH; CLARK, 1991; MOZHAEV et al., 1989), sendo que o aumento do comprimento de onda ocorre por exposição de resíduos de aminoácidos aromáticos com ambientes polares (MOZHAEV et al., 1989).

Ainda de acordo com a literatura, o comprimento de onda máximo de emissão é atribuído à localização do resíduo dentro da proteína, sendo que o resíduo é considerado parcialmente exposto ao solvente quando a emissão máxima ocorre na região de 340 nm e é considerado como enterrado porém interagindo com o ambiente polar da vizinhança quando a emissão máxima ocorre entre 315 e 330 nm (BURSTEIN; VEDENKINA; IVKOVA, 1973; EFTINK, 2002; VIVIAN; CALLIS, 2001), sendo que a exposição parcial de resíduos é atribuída a uma emissão máxima intermediária (EFTINK, 2002). A exposição total dos resíduos, que é indicada pela emissão máxima na região de 350 nm, não é observada nas isoformas da tripsina bovina devido à manutenção das pontes dissulfeto após o desenovelamento induzido pelo etanol, pois este solvente não é capaz de causar a ruptura dessas ligações. Portanto, os resultados apresentados na Figura 15 estão de acordo com a literatura e confirmaram que o solvente induziu o desenovelamento das isoformas. Apesar de o triptofano ser uma sonda local, a mudança que ocorre em seu ambiente químico, induzida por mudanças nas propriedades físico-químicas da solução, tem sido usada durante anos por vários pesquisadores da área de estabilidade para observar as populações nos estados enovelado e desenovelado de proteínas (BEECHEM; BRAND, 1985; CHEN; BARKLEY, 1998; DEMCHENKO, 1986a, 1986b; EFTINK, 1994; ELSHEREEF et al., 2006; HELLMANN; SCHNEIDER, 2019; LONGWORTH, 1983; MAKSIMOV et al., 2020; MOZHAEV et al., 1989; ROSS; SZABO; HOGUE, 1997; SINDREWICZ et al., 2019; VIVIAN; CALLIS, 2001).

Tabela 4: Parâmetros obtidos pela curva de desenovelamento por indução química das isoformas β -tripsina e α -tripsina monitorados em pH 3,0 por fluorescência.

	β -tripsina	α -tripsina
C_m^{conf} (% v/v) ^a	35,0 \pm 0,9	39,2 \pm 2,0
PTS (% v/v) ^b	24 \pm 1	25 \pm 1
CI (M ⁻¹) ^c	0,44 \pm 0,02	0,39 \pm 0,02
$\Delta\lambda$ (nm) ^d	9,5 \pm 0,6	6,3 \pm 0,6

^a C_m conformacional: é a concentração de solvente orgânico na qual 50% da média populacional de proteínas se encontram no estado enovelado.

^b PTS: Concentração de solvente orgânico correspondente ao ponto de início da transição.

^c Índice de Cooperatividade: medida da eficiência da transição conformacional entre os estados enovelado e desenovelado.

^d Corresponde à variação do comprimento de onda entre os estados enovelado e desenovelado. Reflete o grau de mudança conformacional em biomoléculas, representado pelas mudanças de ambiente químico nos resíduos de aminoácidos aromáticos.

Outros parâmetros também foram obtidos de ajustes matemáticos realizados sobre as curvas da Figura 15 e estão registrados na Tabela 4. Os valores de C_m obtidos por este ensaio serão considerados como C_m^{conf} e serão utilizados como pontos experimentais em ensaios posteriores. Este ponto foi escolhido para análise por ser considerado a concentração de solvente orgânico a partir da qual o processo de desenovelamento se torna favorável. Já o parâmetro PTS fornece a concentração máxima de solvente orgânico que a enzima suporta sem sofrer alterações estruturais e será útil na avaliação do grau de interferência do solvente sobre a conformação das isoformas. Com este parâmetro, será possível estimar qual isoformas tolera maior concentração de solvente mantendo sua atividade máxima.

Os valores iguais de PTS (Tabela 4) para as isoformas mostram que ambas toleram a mesma concentração máxima de etanol sem sofrer mudanças perceptíveis no estado enovelado nativo. Quanto ao C_m^{conf} (Tabela 4), observa-se que os valores foram semelhantes entre as isoformas avaliadas, sendo que a β -tripsina apresentou o menor valor. Analisando os resultados para estes dois parâmetros, a conformação da isoforma β -tripsina aparenta ser mais sensível à presença de etanol. Também é válido ressaltar que, de acordo com o resultado de $\Delta\lambda$ (Tabela 4), o grau de

alteração conformacional foi maior em β -tripsina, o que pode confirmar que esta isoforma apresenta uma conformação enovelada mais compacta do que a α -tripsina. Além disso, a proximidade entre as regiões de pré-transição das isoformas, vistas na Figura 15, indica que a conformação do estado enovelado das isoformas β - e α -tripsina é similar, sendo essa similaridade também encontrada por Santos et al. (2008a) para as isoformas em meio aquoso tamponado. Outro ponto a se destacar é que a conformação do estado desenovelado das isoformas é semelhante, mas não igual, o que pode ser notado pela não-sobreposição das regiões de pós-transição (Figura 15).

Outro parâmetro utilizado que é muito útil na avaliação das alterações conformacionais é o CI. Este é calculado através da emissão da fluorescência e foi utilizado neste trabalho para avaliar a cooperatividade da transição entre os estados enovelado e desenovelado induzida pelo etanol. Esse parâmetro está diretamente relacionado ao grau de inclinação da região de transição da Figura 15. Quanto maior este valor, menor é a faixa de concentração de solvente necessária para completar a transição do estado enovelado para o desenovelado. E, de acordo com Haynie (2008), processo de desenovelamento cooperativos podem representar: (a) a existência de apenas duas populações, nos casos de processos altamente cooperativos, ou (b) a existência de estados intermediários de enovelamento distinguíveis entre si.

Comparando as curvas apresentadas na Figura 15, observa-se que a transição da β -tripsina começa em menor concentração de etanol e ocorre de maneira mais cooperativa, pois apresentou a maior inclinação na região de transição. Já a isoforma α -tripsina parece tolerar maior concentração de solvente até iniciar a transição para o estado desenovelado e este processo é menos cooperativo (menor inclinação), ou seja, se completa numa menor faixa de concentração de etanol. Essa tendência também é observada pelos resultados de CI indicados na Tabela 4: o processo de transição entre estados é mais cooperativo na β -tripsina. Esse perfil também foi visto por Santos et al. (2008a) para as isoformas em meio aquoso tamponado. Os resultados deste trabalho demonstram que este perfil se mantém em meio aquo-orgânico.

O CI é um parâmetro que, por si só, não define o melhor solvente, mas pode ser usado para explicar as diferenças encontradas para o C_m^{conf} das isoformas, pois

a α -tripsina apresentou maior C_m^{conf} do que a β -tripsina, e isso pode ser justificado pela maior cooperatividade apresentada pela β -tripsina. Vale ressaltar que uma transição menos cooperativa resulta em uma faixa maior de concentração de solvente orgânico para completar a transição $F \rightarrow U$. Como o menor valor de CI é reflexo de uma região de transição menos inclinada (Figura 15), o valor de C_m^{conf} acaba sofrendo interferência dessa diferença de inclinação da reta, fazendo com que a α -tripsina apresente maior valor para este parâmetro (ROSA et al., 2021). Portanto, a avaliação em conjunto dos parâmetros termodinâmicos obtidos pela espectroscopia de fluorescência apontou que a isoforma β -tripsina é mais sensível, do ponto vista conformacional, à adição de etanol ao meio aquo-orgânico.

Com relação à instabilidade conformacional gerada pelo etanol, os resultados sugerem que o solvente interagiu com as isoformas de duas maneiras: indireta e direta. No modo indireto, as moléculas de etanol interagem com as moléculas de água na camada de solvatação, causando uma perturbação desta camada, o que leva à redução no número de ligações de hidrogênio entre a água da camada de solvatação e a enzima. No modo direto, as moléculas de etanol interagem diretamente com os resíduos na superfície da proteína através de ligações de hidrogênio, no entanto essas interações são mais fracas devido à menor polaridade do etanol se comparado à água (ALONSO; DILL, 1991; ARAKAWA, 2018; ENGLAND; HARAN, 2011; NEMETHY; PEER; SCHERAGA, 1981; SCHELLMAN, 2003; SCHIFFER; DÖTSCH, 1996; YU et al., 2016). Para ambas as isoformas, o uso de meios contendo mais de 40% (v/v) de etanol aumenta a propensão da ocorrência de processo de desenovelamento das mesmas.

Um outro ponto muito relevante está relacionado à diferença dos valores de C_m e PTS dos ensaios de atividade e conformacional. Essa diferença sugere que o processo de desnaturação e de desenovelamento ocorrem de maneira sequencial em ambas as isoformas, sendo a estrutura afetada em concentrações inferiores àquelas que induzem modificações no sítio catalítico, o que pode estar fortemente associado à formação de estados intermediários. Porém, mais dados são necessários para confirmação da formação destes estados, como a conservação do conteúdo de estruturas secundárias e a procura por assinaturas de modificações irreversíveis.

5.7 – Efeito dos solventes sobre a estrutura secundária das isoformas β -tripsina e α -tripsina

A técnica de Dicroísmo Circular (CD) foi usada para monitorar modificações na porcentagem de estruturas secundárias e para encontrar possíveis assinaturas de agregação proteica (BENJWAL, 2006; JOSHI et al., 2014; SIMON et al., 2001) nos meios contendo solventes orgânicos. Via de regra, a agregação de proteínas envolve principalmente as folhas- β (WANG, 2005).

Para este ensaio, foram escolhidas concentrações de etanol que representam diferentes regiões das Figuras 14 e 15, conforme o descrito a seguir: (a) região de pré-transição (20% (v/v) para ambas as isoformas); (b) o C_m^{conf} obtido das curvas de fluorescência (35% (v/v) para β -tripsina e 40% (v/v) para α -tripsina); (c) o C_m^{er} obtido das curvas de atividade amidásica (50% (v/v) para β -tripsina e 60% (v/v) da α -tripsina); e (d) região correspondente à pós-transição (80% (v/v)). A fim de facilitar a discussão, as concentrações de solventes orgânicos foram divididas em faixas, sendo: baixa concentração (0 a 30% (v/v)), média concentração (30 a 60% (v/v)), e alta concentração (acima de 60% (v/v)). Cabe destacar que a escolha de pontos representativos de cada região a partir de ensaios preliminares permite ao avaliador economizar tempo na realização de estudos que envolvam a avaliação de diversos parâmetros. E a redução na quantidade de pontos experimentais só foi possível porque o ajuste dos pontos experimentais aos modelos matemáticos empregados apresenta elevado coeficiente de determinação ($R^2 > 0,99$).

Os resultados obtidos para a β -tripsina foram registrados na Figura 16a e no APÊNDICE Pa, sendo comparados com os resultados de α -tripsina na Figura 16b e APÊNDICE Pb, publicado por (ROSA et al., 2017). Comparando-se esses dois resultados, é possível notar que baixas concentrações de etanol não causam modificações no conteúdo de estruturas secundárias, o que é compatível com os resultados de conformação e atividade praticamente inalterados na região de pré-transição (Figura 14 e 15). Ou seja: até as concentrações definidas pelo parâmetro PTS, as isoformas não tiveram modificações perceptíveis de enovelamento e de atividade.

Já nas concentrações correspondentes aos C_m^{er} e C_m^{conf} , observa-se que o conteúdo de α -hélice aumenta e, ao mesmo tempo, ocorre a redução do conteúdo

de folha- β . A redução na porcentagem de regiões desordenadas (“*random coil*”) só ocorre em concentrações acima de 50% (v/v) de etanol. As alterações no teor das estruturas secundárias foram mais acentuadas para a isoformas β -tripsina, bem como também apresentou maior grau de mudanças conformacionais no ensaio de fluorescência. E essa diferença vista entre as isoformas condiz com os diferentes graus de cooperatividade do processo de desenovelamento. Os resultados de fluorescência e atividade indicaram que a isoforma β -tripsina apresenta transição mais cooperativa na presença de álcoois.

O aumento no conteúdo de α -hélice é uma condição vista em várias proteínas dissolvidas em álcoois (ALEXANDRESCU; NG; DOBSON, 1994; BUCK; RADFORD; DOBSON, 1993; DYSON et al., 1992a, 1992b; FAN; BRACKEN; BAUM, 1993; KAMATARI et al., 1996; KIPPEN; SANCHO; FERSHT, 1994; NELSON; KALLENBACH, 1986, 1989; RUSS LEHRMAN; TULS; LUND, 1990). De acordo com Griebenow & Klibanov (1996), o conteúdo de α -hélice aumenta por causa da redução da fração de proteínas dissolvidas. Além disso, o aumento na formação de α -hélice está relacionado com a formação de estados compactos (KONY; HÜNENBERGER; VAN GUNSTEREN, 2007).

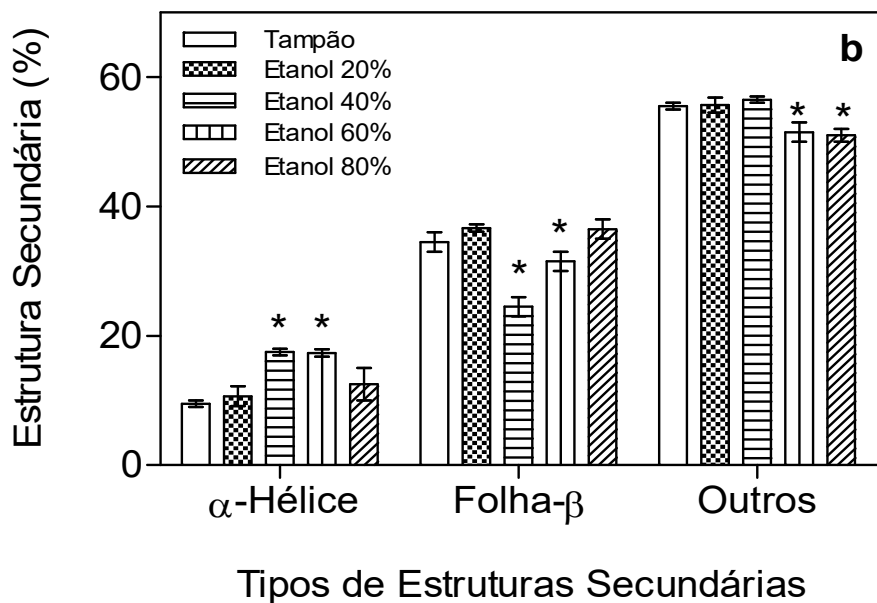
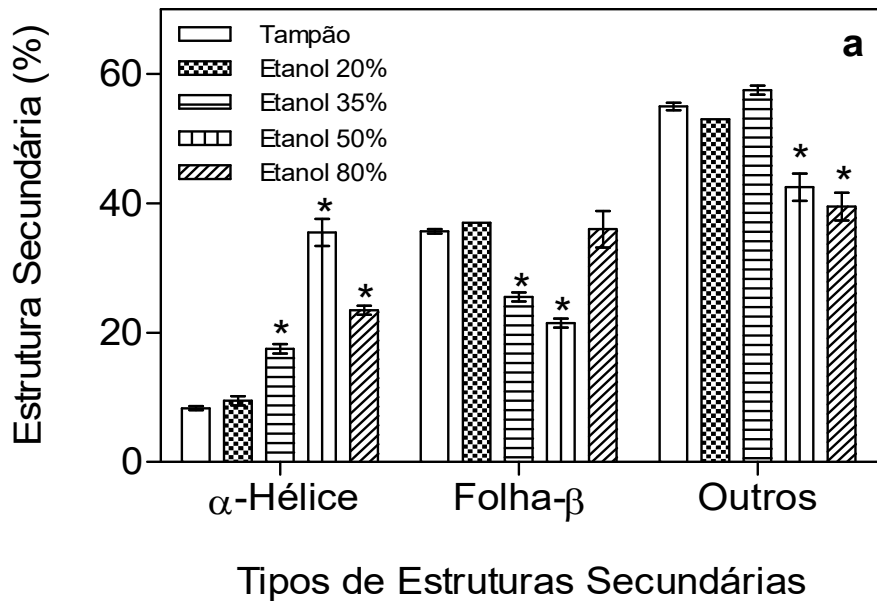


Figura 16: Monitoramento da alteração da porcentagem de estruturas secundárias da isoformas β - e α -tripsina em função da concentração do etanol por CD. (a) isoforma β -tripsina. (b) isoforma α -tripsina. Os dados da figura (b) são parte da dissertação de mestrado e parte dos resultados publicados por ROSA et al., 2017. As concentrações de solventes utilizadas correspondem: à região de pré-transição, ao C_m estrutural, ao C_m da reação enzimática e à região de pós-transição. As comparações estatísticas foram feitas tomando o meio tampão como referencial. Os símbolos gráficos denotam o nível de significância fornecido pelo teste t de *student* quando comparado com o grupo controle. Os resultados que diferiram significativamente do controle ($P < 0,05$) foram sinalizados com asterisco.

Como visto anteriormente na discussão relacionada à atividade das isoformas, a mudança da constante dielétrica do meio causada pela adição de solvente orgânico é um dos fatores que explicam as alterações observadas na atividade. Porém, de acordo com Hong et al. (1999), a mudança na constante dielétrica não é capaz de explicar as mudanças no conteúdo de α -hélice. Ainda de acordo com este autor, essas mudanças estariam relacionadas a mecanismos moleculares induzidos pelos solventes, porém estes mecanismos ainda permanecem desconhecidos.

Os resultados obtidos não demonstraram assinatura significativa de agregação proteica (BENJWAL, 2006; JOSHI et al., 2014; LI; OGUNNAIKE; ROBERTS, 2010; MICSONAI et al., 2015; WANG, 2005) quando se compara o sistema puramente aquoso com o aquo-orgânico. De acordo com Szabó et al. (1999) e Wang (2005), o processo de agregação envolve dois passos: o primeiro seria a transição de α -hélice e regiões desordenadas para estruturas do tipo folha- β ; o segundo é agregação das folhas- β . E, como pode-se observar na Figura 16, a avaliação isolada dos resultados do CD não permite diferenciar a tendência de agregação entre as isoformas na presença de etanol, já que não foi observado aumento no conteúdo de folha- β com a adição de diferentes concentrações de etanol. Porém, a análise das curvas brutas (APÊNDICE P) mostrou sinais de agregação em 80% (v/v), como o aumento na magnitude do sinal em 225 nm e um perfil característico de formação de folhas- β intermoleculares (ANDREWS; ROBERTS, 2007; DONG et al., 1998; LI; OGUNNAIKE; ROBERTS, 2010).

Na concentração de etanol correspondente à região de pós-transição, as estruturas de α -hélice e folha- β permanecem nas isoformas, em proporções semelhantes às do meio puramente aquoso. Isto sugere que a perda de atividade não ocorre devido à perda de estruturas secundárias, mas sim devido a mudanças na estrutura terciária (FAIZULLIN et al., 2017), conforme discutido anteriormente nos resultados de fluorescência. Uma associação de fatores pode justificar a retenção das estruturas secundárias mesmo em elevadas concentrações de etanol (região de pós-transição): (I) A adição de altas concentrações de solventes orgânicos poderia levar à redução da flexibilidade das isoformas (DE DIEGO et al., 2004; ROSA et al., 2017); (II) A formação de estados parcialmente enovelados, que são estados intermediários entre os estados nativo e desnaturado e se caracterizam pela

retenção de grande parte do conteúdo de estruturas secundárias com perda da estrutura enovelada nativa (BARNETT et al., 2015; FINK, 1995, 1998; KHURANA et al., 2001; ROSA et al., 2017); (III) A presença de pontes dissulfeto, que não se rompem em presença de etanol, facilitaria a manutenção da estrutura secundária mesmo após a perda da estrutura nativa. Assim, no caso específico das isoformas de tripsina, as pontes dissulfeto são um dos fatores responsáveis pela manutenção das estruturas secundárias definidas. Isto explicaria a formação dos estados parcialmente enovelados nas isoformas (ROSA et al., 2021).

A avaliação geral da porcentagem de estruturas secundárias (Figura 16) mostrou a retenção dessas estruturas em ambas as isoformas quando o etanol é adicionado ao meio, o que está de acordo com Fink, (1995) e com Mares-Guia & Figueiredo (1972). Os resultados também estão de acordo com o visto por Khurana et al. (2001) e por Barnett et al. (2015), cujas conclusões foram que o desenovelamento de proteínas na ausência de agregação resulta em modificações mínimas na estrutura secundária com alterações significativas na estrutura terciária. Ainda, o trabalho de Kony, Hünenberger e Van Gunsteren (2007) associa a combinação entre conservação de estrutura secundária e grandes alterações na estrutura terciária com a formação de estados compactos. Portanto, pode-se dizer pelos resultados deste ensaio que há a formação de estados intermediários em ambas as isoformas na presença de etanol, porém as isoformas aparentam ter diferentes subestados. Além disso, não foram encontradas assinaturas de agregação até 60% (v/v) de etanol (DONG et al., 1998; LI; OGUNNAIKE; ROBERTS, 2010; WANG, 2005), conforme visto nos resultados da Figura 16, porém a tendência a formação de agregados foi observado em 80% (v/v) de etanol, conforme as curvas do dado bruto exibido no APÊNDICE P. Sendo assim, um dos objetivos do ensaio de DLS foi verificar a ocorrência de rearranjos moleculares, tais como a agregação.

5.8 – Efeito dos solventes orgânicos sobre a organização supramolecular das isoformas β -tripsina e α -tripsina monitorados por DLS

A adição de solventes orgânicos a meios aquosos contendo proteínas pode levar a alteração do perfil de organização das partículas, como a formação de aglomerados e de agregados. A fim de entender o processo de organização supramolecular em sistemas aquo-orgânicos, as isoformas de tripsina foram

submetidas ao ensaio de DLS (BEY et al., 2016). Neste trabalho, considerou-se a agregação de proteínas como um processo de interações fortes e irreversíveis com predominância de interações hidrofóbicas e aglomeração como um processo de uma fraca interação que leva a autoassociação reversível entre partículas de proteínas (ARAKAWA et al., 2001; ARZENŠEK; KUZMAN; PODGORNIK, 2012; CROMWELL; HILARIO; JACOBSON, 2006). Outro ponto a se ressaltar é que um aumento na concentração de solvente orgânico pode induzir a formação de estados compactos, organizados como agregados ou aglomerados dependendo da especificidade da interação, bem como do tipo e da concentração do solvente (FINK, 1995, 1998). As concentrações adotadas neste ensaio foram as mesmas utilizadas no CD.

A distribuição e o arranjo da população de moléculas em sistema aquoso foram comparados com o de moléculas em sistemas aquo-orgânicos através da avaliação do tamanho de partículas (Figura 17). Apesar de o histograma “Intensidade x Raio Hidrodinâmico” apresentar a formação de populações com 3 tamanhos e intensidades diferentes (dados não mostrados), optou-se por analisar somente as populações que apresentaram o tamanho inferior a 100 nm em todos os sistemas estudados. Acima desse valor, considerou-se que essas populações estavam agregadas, não havendo, portanto, diferenças a serem estudadas quanto ao perfil de arranjo supramolecular. No sistema aquoso, a isoforma α -tripsina apresentou maior raio hidrodinâmico do que a β -tripsina (2,8 nm e 2,0 nm, respectivamente), tendo o tamanho da partícula aumentado com o aumento da concentração de etanol, especialmente no C_m^{conf} e no C_m^{er} . As isoformas apresentaram o mesmo tamanho de partícula no C_m^{conf} (aproximadamente 27,8 nm) e na concentração correspondente ao C_m^{er} , o tamanho de partícula apresentado pela β -tripsina foi 14% menor que o da α -tripsina (26,7 nm e 30,5 nm, respectivamente).

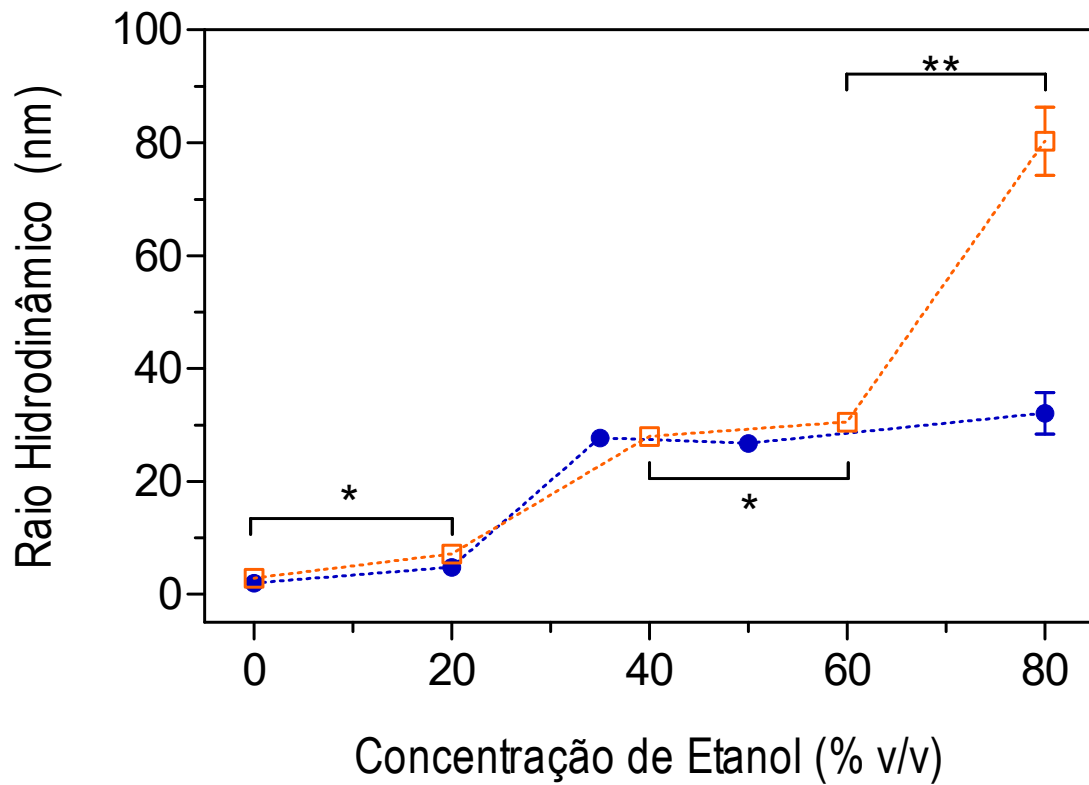


Figura 17: Perfil de organização supramolecular das isoformas em função da concentração de etanol. O arranjo foi monitorado por meio do valor do raio hidrodinâmico. As concentrações de etanol utilizadas referem-se à região de pré-transição, aos C_m^{conf} e C_m^{er} e à região de pós-transição descritas no tópico 5.7. Legenda: (●) β -tripsina; (□) α -tripsina. Os símbolos gráficos denotam o nível de significância fornecido pelo teste t de *student*. Os resultados que diferiram significativamente foram sinalizados com asterisco (* $P < 0,1$).

A organização supramolecular, monitorada pelo tamanho de partículas, revelou que as menores concentrações testadas (20% (v/v)) já induziram a formação de pequenos aglomerados de proteínas autoassociadas, com 4,8 nm (β -tripsina) e 7,2 nm (α -tripsina). Esses aglomerados alcançaram valores variando entre 25 a 30 nm na concentração de etanol referente aos C_m 's, conforme descrito anteriormente. Desta forma, os resultados indicaram ocorrência de reorganização das unidades de biomoléculas, deixando assim menos unidades acessíveis ao substrato, o que é condizente com os resultados vistos no ensaio de atividade amidásica (ROSA et al., 2021).

Em 80% (v/v) de solvente orgânico, que representa a região de pós-transição, foram encontradas diferenças consideráveis entre os perfis no rearranjo das isoformas (Figura 17). A isoforma β -tripsina mostrou um aumento de quase 30x no raio hidrodinâmico quando comparado com o meio puramente aquoso. Já a isoforma α -tripsina apresentou um aumento de 16x na comparação com o meio puramente aquoso. Portanto, nesta concentração de solvente, as unidades de β -tripsina formaram aglomerados de menor tamanho do que o observado para a α -tripsina. E esta diferença pode estar associada com o perfil de interação entre enzimas: as unidades de β -tripsina rearranjam em aglomerados reversíveis, enquanto as unidades de α -tripsina parecem rearranjar em agregados.

Para outras proteínas testadas em condições similares a deste trabalho (ex: força iônica e pH), os intermediários de proteínas se rearranjam em aglomerados multiméricos solúveis ou em agregados e apresentam elevado conteúdo de estruturas secundárias definidas, uma condição conhecida como “agregação de intermediários parcialmente enovelados” (FINK, 1998; ROSA et al., 2017). Como foram mantidos constante os parâmetros “concentração de proteína”, “pH”, “temperatura” e “força iônica”, os resultados permitem afirmar que há uma concentração limite de solvente orgânico para cada isoforma se organizar em multímeros de proteínas nativas. Acima deste limite, a formação de agregados sem atividade amidásica se torna predominante em solução. Para aplicações industriais, a ocorrência de agregação não é interessante porque torna impossível a reutilização destas biomoléculas.

Além do tamanho de partículas, também foram coletados dados relacionados à carga líquida superficial das isoformas pela medida do potencial zeta. Esses dados

complementam as análises de rearranjo supramolecular, pois há uma correlação entre a redução da carga superficial e o aumento da formação de agregados e aglomerados. Um dos pontos a se destacar é a diferença na variação de potencial zeta das isoformas em meio aquoso. As isoformas β -tripsina e α -tripsina apresentam diferenças quanto à carga líquida superficial, sendo atribuídas ao surgimento de mudanças estruturais após a clivagem na cadeia única da β -tripsina para originar a α -tripsina, que apresenta então duas cadeias (SCHROEDER; SHAW, 1968; SMITH & SHAW, 1969; WALSH; NEURATH, 1964). Portanto, assim como as clivagens levam a pequenas mudanças estruturais, elas também ocasionam redução da carga líquida. Sendo assim, a isoforma α -tripsina apresenta menor carga superficial do que a β -tripsina e, desta forma, a variação de ZP será menor na α -tripsina. Essa diferença de carga também é suportada pelo perfil de eluição das isoformas na cromatografia de troca catiônica, pois a última isoforma eluída é a β -tripsina, indicando que esta teria maior carga superficial do que as demais isoformas.

De acordo com a Figura 18, as diferenças de carga superficial entre as isoformas somente foram observadas em concentrações de etanol inferiores a 40% (v/v). Além disso, considerando-se os desvios das medidas feitas para a isoforma α -tripsina, observou-se que os valores de ZP permaneceram constantes ao longo das diferentes concentrações de solventes orgânicos, com valores oscilando entre +3 e +4 mV. Já para a isoforma β -tripsina, os valores de ZP diminuíram de +10 mV para +3 mV conforme a concentração de etanol aumenta, sendo os valores reduzidos de ZP similares entre as isoformas a partir de 40% (v/v) de etanol. Este resultado está de acordo com o aumento de partículas visto no DLS para as mesmas concentrações de solvente. De acordo com THOLSTRUP SEJERSEN et al. (2007) e MORRISON & ROSS, (2002), o valor do ZP e a estabilidade da partícula guardam relação direta, corroborando os resultados observados neste trabalho tanto para o ZP quanto para o DLS: a tendência à aglomeração e a agregação com a adição de solvente orgânico.

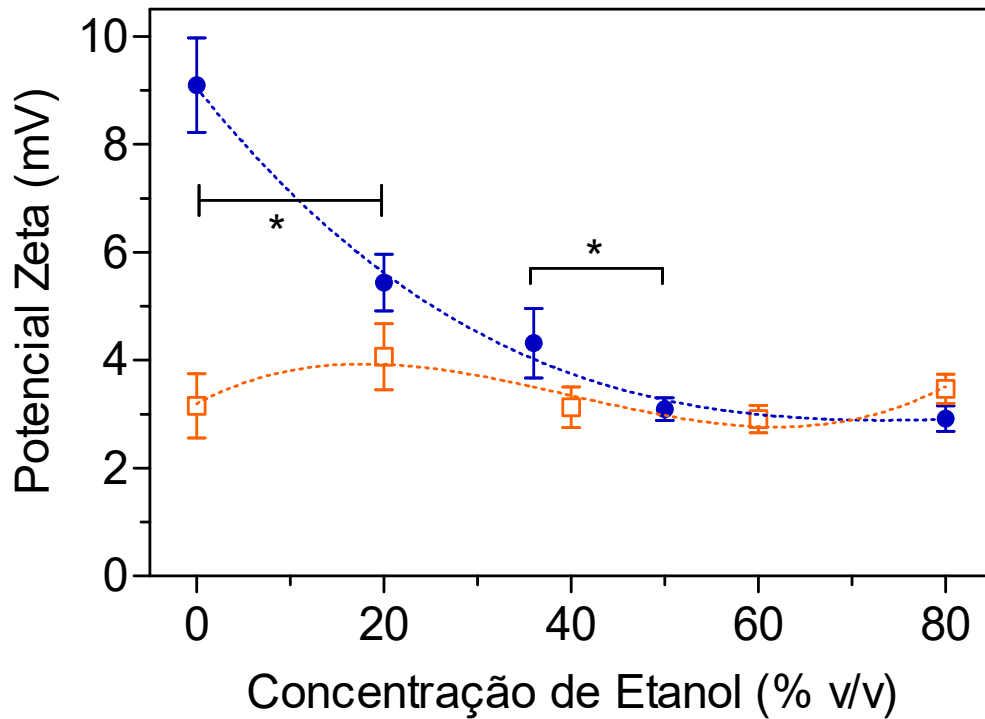


Figura 18: Perfil de potencial zeta das isoformas β -tripsina e α -tripsina em diferentes concentrações de etanol. Verificação da mudança de cargas na superfície da enzima conforme o aumento da concentração do solvente orgânico. Legenda: (●) β -tripsina; (□) α -tripsina. Os símbolos gráficos denotam o nível de significância fornecido pelo teste *t* de *student*. Os resultados que diferiram significativamente foram sinalizados com asterisco (* $P < 0,05$).

A análise conjunta dos dados de DLS e ZP revela que as alterações induzidas pelo etanol podem ser a consequência de dois eventos. O primeiro deles é a substituição da camada de solvatação, inicialmente composta apenas por água, e que passa a ser composta predominantemente por solvente orgânico. O segundo é a redução da constante dielétrica do meio aquo-orgânico causado pela adição do solvente orgânico com constante dielétrica inferior à da água (ROSA et al., 2017).

Outro ponto a se observar é a relação entre o ponto isoelétrico da tripsina bovina e o rearranjo supramolecular. O pI da tripsina bovina é 10,5 (CUNNINGHAM, 1954). Como este ensaio foi realizado em pH 3,0, a carga líquida da proteína não estava neutralizada e a população de moléculas de tripsina estava predominantemente protonada. Sendo assim, descarta-se o efeito da neutralização de cargas de proteínas como uma explicação para o processo de agregação ou aglomeração observados para as isoformas de tripsina em meios aquo-orgânicos. Cabe ressaltar que a ocorrência de agregação e aglomeração pode ser explicada pelo aumento de interações entre resíduos hidrofóbicos mais expostos, facilitadas pela redução da constante dielétrica do meio. E a exposição dos resíduos hidrofóbicos vistos nos resultados da fluorescência podem apoiar essa teoria, reforçando a ideia de que a α -tripsina agregue em 80% (v/v) de etanol, enquanto que nesta mesma condição a isoforma β -tripsina mantém o perfil de aglomeração. Desta forma, conclui-se pela análise conjunta dos resultados de fluorescência e DLS que as isoformas apresentam comportamentos supramoleculares distintos apenas em 80% (v/v) de etanol, enquanto os resultados de ZP sugeriram a ocorrência de multimerização.

5.9 – Análise Termodinâmica

A estabilidade termodinâmica de uma proteína está diretamente relacionada à estabilidade conformacional da proteína nativa (AHMAD; YADAV; TANEJA, 1992; PACE; SHIRLEY; THOMSON, 1989). Somente com os resultados estruturais, não é possível responder a todas as questões acerca das alterações sofridas pelas proteínas. Por isso se faz importante analisar as bases energéticas a fim de obter informações completas sobre o sistema inteiro, o que inclui as interações intramoleculares (entre os resíduos) e intermoleculares (entre a proteína e o solvente). E para fins de tornar mais clara a discussão, o termo “sistema” foi utilizado

para se referir às isoformas em solução, ou seja, às mudanças ocorridas tanto nas isoformas quanto nos meios líquidos que as solvatam. Para as medidas que estão relacionadas exclusivamente às modificações ocorridas nas isoformas, a descrição dos parâmetros foi acompanhada do termo “da cadeia”, em referência às cadeias proteicas das isoformas. Também é importante deixar claro que as informações estrutural e energética são complementares e não podem ser deduzidas uma da outra (PRIVALOV, 2012). Desta forma, os parâmetros termodinâmicos foram usados para complementar os resultados espectroscópicos das isoformas em meio aquo-orgânico.

O perfil das curvas de desenovelamento térmico da isoforma β -tripsina em diferentes concentrações de etanol mostrou uma curva sigmoideal (apêndice C a N), que é típico de um processo de desenovelamento entre dois estados monitorado por técnicas espectroscópicas (PRIVALOV, 1979). Ainda, foram observados durante os ensaios que as isoformas apresentaram reversibilidade média de enovelamento nas concentrações inferiores ao do C_m^{conf} . Com relação à formação de precipitados imperceptíveis a olho nú, as análises das leituras na faixa de 400 a 700 nm resultaram em sinais insignificantes nas concentrações testadas. Sendo assim, os valores obtidos pelo ensaio de desenovelamento térmico refletem as mudanças entre os estados enovelado e desenovelado solúveis. Desta forma, os dados foram analisados matematicamente de acordo com a metodologia de Cohen e Pielak (1994) e os resultados são apresentados na Figura 19 e na Tabela 7. A partir destas curvas, foi possível obter parâmetros como CI , ΔH , ΔS_{Tm} , e T_m . Os dados de ΔH e ΔS_{Tm} foram plotados em conjunto para avaliar as tendências destes parâmetros termodinâmicos como uma função da concentração de solvente orgânico (Figura 19).

5.9.1 – Análise do parâmetro ΔH obtido por curvas de desenovelamento das isoformas induzido por temperatura na presença de etanol

O parâmetro ΔH das duas isoformas tende a diminuir conforme a concentração de etanol aumenta até 60% (v/v) para ambas as isoformas. Como ΔH é uma propriedade extensiva e depende do número de proteínas que estão no estado enovelado, uma diminuição no ΔH significa que uma menor quantidade de energia foi necessária para causar o desenovelamento (ROSA

et al., 2017), sendo indicativo de mudança conformacional desestabilizadora do estado enovelado provocado, neste trabalho, pela adição do solvente orgânico. Portanto, a redução do ΔH mostrou que a adição de até 60% (v/v) de etanol levou à redução do número de unidades enoveladas, se comparada à condição sem solvente orgânico.

Conforme a Figura 19, a adição de 20% (v/v) de etanol causou mudanças desestabilizadoras mais pronunciadas na isoforma β -tripsina, uma vez que o seu ΔH foi em média 26% menor que o da α -tripsina na mesma concentração de solventes. Mas a adição de concentrações crescentes de etanol mostrou que a α -tripsina é mais sensível à variação na concentração de solventes, o que pode ser visto pela maior inclinação da linha de tendência (a) de ΔH entre 20% e 60% (v/v) de etanol ($a_{\alpha\text{-tripsina}} = -0,58$ e $a_{\beta\text{-tripsina}} = -0,23$; com regressão linear registrada no APÊNDICE O).

Uma outra análise é que os valores ΔH , juntamente com os resultados espectroscópicos, indicaram que a adição de até 60% (v/v) do etanol não foi capaz de induzir a formação de agregados irreversíveis em ambas as isoformas. Mas a principal diferença no perfil de ΔH pode ser vista em 80% (v/v) de etanol: uma diminuição para este parâmetro em β -tripsina e um aumento para valores semelhantes ao do sistema aquoso em α -tripsina. Juntamente com os resultados espectroscópicos de fluorescência (Figura 15) e de DLS (Figura 17), esses diferentes comportamentos sugerem que β -tripsina formou aglomerados mesmo em alta concentração, enquanto a α -tripsina formou agregados.

Mas o que permite diferenciar aglomerado e agregado pelos resultados de variação de entalpia? Antes de tudo, é importante ter em mente que o ensaio foi realizado sob variação de temperatura. Em condições de altas temperaturas, ocorrem processos de desenovelamento de proteínas e também de dissociação dos rearranjos. Porém, a quantidade de energia envolvida na dissociação desses rearranjos dependerá do tipo de associação (aglomerado e agregado). Como o agregado é um rearranjo forte e irreversível em condições ambientes, é necessário envolver maior quantidade de calor para que ele seja desfeito, e isso se reflete no valor aumentado de entalpia. Já no aglomerado, que é um arranjo fraco e reversível, é necessário fornecer menor quantidade de energia para que ele seja desfeito, e isso se reflete então na redução dos valores de entalpia.

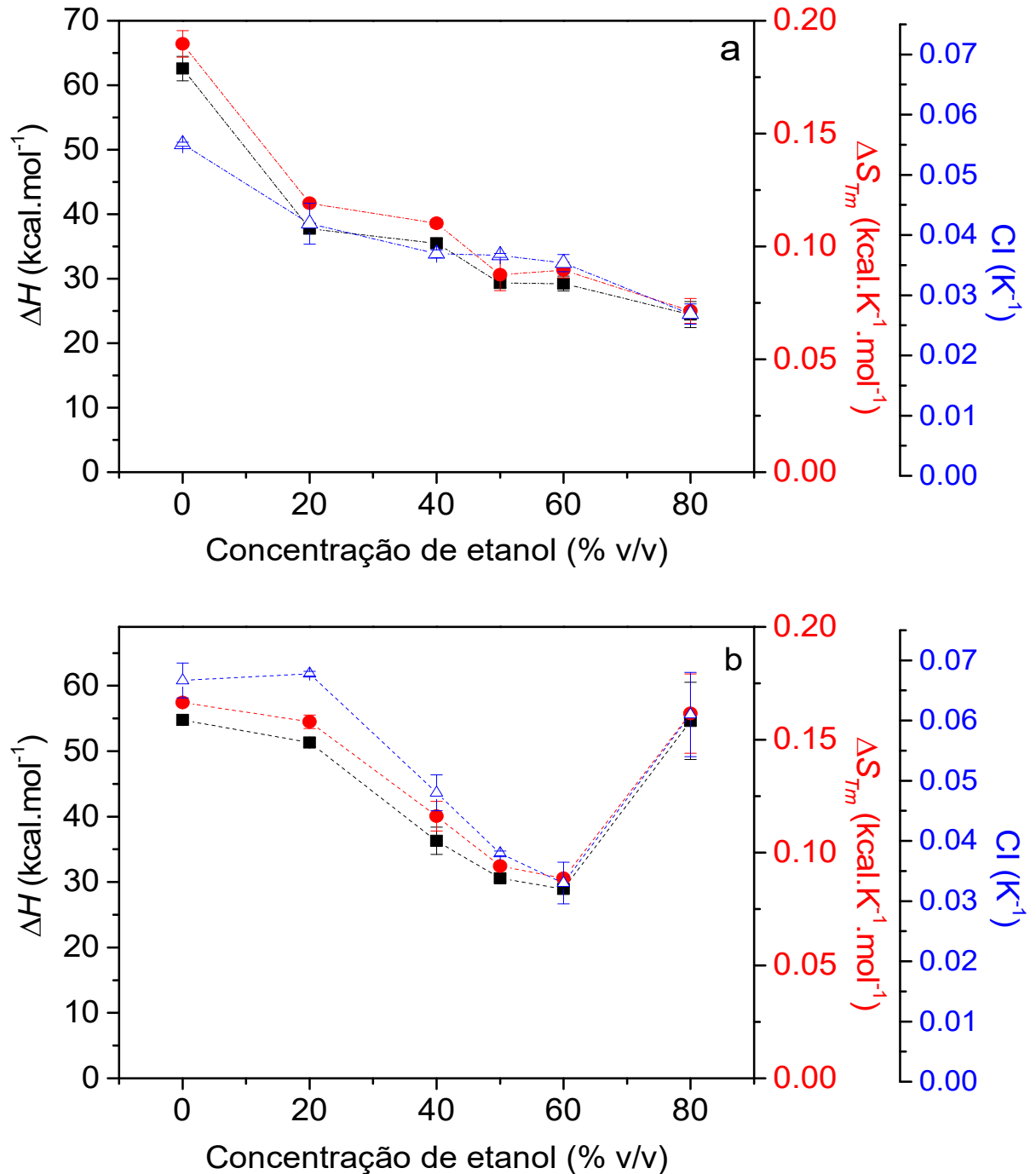


Figura 19: Perfil comparativo de ΔH , ΔS_{Tm} e CI obtidos em função da concentração de etanol. (a) Isoforma β -tripsina. (b) Isoforma α -tripsina. Ensaio realizado com a concentração final de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Dados obtidos através de tratamento matemático das curvas de desenovelamento térmico das isoformas em diferentes concentrações de etanol. As linhas pontilhadas são usadas apenas para guiar os olhos do leitor, não se tratando de ajuste matemático. Legenda: (■) ΔH ; (●) ΔS_{Tm} ; (Δ) índice de cooperatividade.

Outras informações extraídas da variação de entalpia podem ser usadas para corroborar as alterações conformacionais observadas nos resultados da espectroscopia. O valor de $\Delta\Delta H_{0-20\%}$ (Tabela 5) foi maior para β -tripsina e indicou que maiores modificações energéticas ocorreram com a exposição desta isoforma a 20% de etanol. Em outras palavras, esse resultado sugere que houve diferença na conformação nativa β -tripsina em meio aquoso e em presença de etanol, pois em 20% (v/v) a população de moléculas se apresentou menos estável, possivelmente devido a um enfraquecimento das interações intermoleculares, gerando uma estrutura menos compacta que foi evidenciada nos ensaios de fluorescência (Figura 15) e de DLS (Figura 17). Já para a isoforma α -tripsina, o de $\Delta\Delta H_{0-20\%}$ (Tabela 5) indicou que a diferença conformacional entre o meio aquoso e o meio aquo-orgânico foi menor.

Tabela 5: Diferença entre os valores de ΔH obtidos nas diferentes concentrações de etanol.

	β -tripsina	α -tripsina
$\Delta\Delta H_{0-20\%}$ (kcal.mol ⁻¹)	25 ± 2	3 ± 1
$\Delta\Delta H_{20-60\%}$ (kcal.mol ⁻¹)	9 ± 1	22 ± 1

E a explicação para as diferenças energéticas vistas na ausência e na presença de etanol está no grau de compactação da proteína e de interações do núcleo hidrofóbico da estrutura das isoformas em meio aquoso. De acordo com Santos et al. (2008a), no meio aquoso a isoforma β -tripsina apresenta uma estrutura terciária mais compacta. Já com relação a meios aquo-orgânicos, sabe-se que os solventes orgânicos promovem rearranjo das interações intra e intermoleculares, afetando especialmente a camada de solvatação. Sendo assim, como a β -tripsina apresenta estrutura mais compacta do que a α -tripsina em meio aquoso – conforme evidenciado pela literatura e pelos ensaios de fluorescência (Figura 15) e DLS (Figura 17) –, acredita-se que a β -tripsina tenha sofrido maior número de rearranjos das interações intramoleculares na presença de meio aquo-orgânico, resultando numa conformação menos estável energeticamente em relação ao meio aquoso. Porém, a isoforma β -tripsina foi mais estável do que a α -tripsina no meio aquoso. E

essa diferença conformacional entre as isoformas em meio aquoso também foi vista neste trabalho, como pode ser visto nos resultados dos raios hidrodinâmicos e de fluorescência, estando os resíduos no núcleo hidrofóbico da β -tripsina mais próximos do que os da α -tripsina. É importante ressaltar que os eventos intra e intermoleculares ocorreram simultaneamente, visto que as medidas efetuadas em DLS mostraram a existência tanto de monômeros quanto de multímeros, não sendo possível, desta forma, identificá-los isoladamente a partir das medidas efetuadas. Portanto, os resultados espectroscópicos foram considerados resultantes da contribuição desses dois eventos.

E essas diferenças conformacionais das isoformas também explicam os resultados encontrados na presença de diferentes concentrações de solventes orgânicos. O $\Delta\Delta H_{20-60\%}$ (Tabela 5) apresentou valores mais elevados para a α -tripsina, sugerindo que as mudanças desestabilizadoras foram dependentes da concentração de solvente, devido à sua estrutura mais aberta já em meio aquoso evidenciada pelos resultados de fluorescência (Figura 15) e de DLS (Figura 17), o que por sua vez sugere interações intramoleculares mais distantes. O menor valor apresentado para a β -tripsina indicou a ocorrência de mudanças conformacionais menores, sugerindo uma melhor resistência a mudanças conformacionais na presença de concentrações crescentes de etanol.

5.9.2 – Análise do parâmetro ΔS_{T_m} extraído das curvas de desenovelamento térmico na presença de etanol

Assim como ΔH , o ΔS_{T_m} é uma propriedade extensiva e, portanto, é 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. Em relação aos resultados de ΔS_{T_m} (Figura 19), observou-se que, assim como no ΔH , os valores diminuíram para ambas as isoformas até 60% (v/v) de etanol, estando essa variação de entropia relacionada com a entropia do sistema (aquoso e aquo-orgânico). A diminuição de ΔS_{T_m} indicou mudanças conformacionais em direção ao estado desenovelado, sendo a diminuição da entropia interpretado como o resultado do aumento da organização de moléculas de água e etanol ao redor dos resíduos apolares quando estes são expostos ao solvente (PRIVALOV, 2012).

O maior valor de $\Delta\Delta S_{0-20\%}$ (Tabela 6) mostrou que a adição de 20% de etanol causou mudanças entrópicas mais perceptíveis na β -tripsina. Esse fato corrobora a ideia de que os resíduos hidrofóbicos estão mais enterrados nesta isoforma em meio aquoso e a exposição ao solvente orgânico demandaria maior grau mudança conformacional, o que está diretamente relacionado ao fato de a β -tripsina apresentar o estado enovelado mais compacto. Dessa forma, o grau de exposição desses resíduos explica mudanças entrópicas mais acentuadas vistas em β -tripsina, corroborando os resultados do monitoramento por fluorescência das alterações conformais induzidas pelo solvente orgânico. O núcleo hidrofóbico da α -tripsina já está mais exposto ao meio devido ao seu maior raio hidrodinâmico e, portanto, as mudanças no rearranjo das moléculas de água e etanol ao redor dos resíduos apolares são mais discretas, refletindo o menor valor de $\Delta\Delta S_{0-20\%}$ encontrado para esta isoforma.

Tabela 6: Diferença entre os valores de ΔS_{Tm} calculados nas diferentes concentrações de etanol

	β -tripsina	α -tripsina
$\Delta\Delta S_{0-20\%}$ (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	70 ± 2	10 ± 1
$\Delta\Delta S_{20-60\%}$ (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	30 ± 1	70 ± 3

Comparando as isoformas na faixa de concentração de etanol de 20 a 60% (Tabela 6), observou-se que a maior variação de $\Delta\Delta S_{20-60\%}$ foi encontrada para a α -tripsina, sugerindo que a camada de solvatação nesta isoforma foi mais sensível à variação da concentração de solvente, o que por sua vez está associada ao exposição da região hidrofóbica mais dependente da concentração de solvente orgânico. Já para a β -tripsina, o menor valor de $\Delta\Delta S_{20-60\%}$ indicou que a exposição da região hidrofóbica é pouco influenciada pela variação da concentração de etanol e que a camada de solvatação desta isoforma foi menos afetada pela concentração de etanol.

Em 80% do etanol (Figura 19), pode-se observar diferentes comportamentos para valores de variação da entropia entre as isoformas. O aumento de ΔS_{Tm} para a α -tripsina em 80% (v/v) confirmou a agregação irreversível observada em resultados espectroscópico. Esse aumento na entropia reflete a maior quantidade de moléculas

de solventes livres devido à menor quantidade de resíduos expostos ao solvente quando ocorre a agregação e empacotamento das proteínas. A diminuição da entropia de β -tripsina vista em 80% de etanol reforça os resultados espectroscópicos para aglomeração reversível com resíduos apolares expostos ao solvente. A redução na variação de entropia da β -tripsina em 80% (v/v) se deve ao aumento na organização das moléculas de solvente e água no entorno do aglomerado de proteínas no estado desnaturado, já que nesta concentração a isoforma não apresenta atividade biológica.

A diferença na estabilidade das isoformas pode estar relacionada ao número de cadeias que apresentam. A α -tripsina possui duas cadeias, originadas da hidrólise entre os resíduos K₁₃₁-S₁₃₂ da cadeia única de β -tripsina. A formação das duas cadeias torna a α -tripsina mais instável do ponto de vista conformacional, o que pode ser visto pelo ΔH inferior desta isoforma na ausência de solvente orgânico quando comparado com β -tripsina. Com a obtenção dos resultados termodinâmicos, foi possível observar que a adição de diferentes concentrações de solventes orgânicos tornou mais evidentes as diferenças na estabilidade da cadeia das isoformas.

Em geral, o processo de desenovelamento é mais perceptível na isoforma β -tripsina: as diferenças estruturais e conformacionais entre os estados inicial e final são maiores nesta isoforma, uma vez que o estado inicial apresenta uma estrutura mais compacta e resíduos apolares mais enterrados. Isso também é visto neste trabalho devido à maior amplitude nas diferenças de ΔH e ΔS entre o sistema sem solvente orgânico e os sistemas com solvente orgânico.

5.9.3 – Análise do índice de cooperatividade obtido a partir das curvas de desenovelamento térmico em presença de etanol

Para confirmar as previsões feitas para a cooperatividade das transições a partir de análises de desenovelamento por indução química monitorado por fluorescência, foram calculados os valores de CI a partir das curvas de desenovelamento térmico e os resultados foram registrados na Figura 19. Como dito anteriormente no tópico 4.9.1, a cooperatividade que é obtida por meio da variação de temperatura está associada à eficiência da transmissão de calor intramolecular. Quanto maior a cooperatividade, maior a eficiência desta transmissão e,

conseqüentemente, menor é o número de subestados que a molécula pode apresentar durante a transição $F \rightarrow U$. As mudanças nestes parâmetros seguiram um perfil similar aos de ΔS_{T_m} e ΔH . A cooperatividade do processo de desenovelamento da β -tripsina em meio aquoso foi em média 30% a 100% maior comparado ao meio aquo-orgânico ($Cl_{0\%} = 0,055$, $Cl_{20\%} = 0,042$, e $Cl_{80\%} = 0,027 \text{ K}^{-1}$). Já a cooperatividade do processo de desenovelamento da isoforma α -tripsina foi em média 10% a 75% maior quando comparado ao meio aquo-orgânico ($Cl_{0\%} = 0,067$; $Cl_{50\%} = 0,038$ e $Cl_{80\%} = 0,061 \text{ K}^{-1}$).

Comparando-se os resultados obtidos para as isoformas em meios variando entre 20% e 60% (v/v), observou-se que a cooperatividade da isoforma β -tripsina foi cerca de 17% maior que a da α -tripsina, sugerindo que a isoforma β -tripsina apresente menor número de subpopulações no estado intermediário. Além disso, pode-se observar que a adição de solventes orgânicos induziu mudanças conformacionais mais notáveis em β -tripsina, o que também foi visto nos ensaios conformacionais de fluorescência por meio dos resultados de $\Delta\lambda$ e de "valor m ". Já a α -tripsina, por apresentar uma estrutura menos estável no seu estado nativo, mostrou modificações estruturais e conformacionais menos pronunciadas.

5.9.4 – Análise do T_m obtido em diferentes concentrações de etanol

O T_m é uma propriedade intensiva da molécula e, sendo assim, não depende da quantidade de moléculas no meio onde se encontram. Isto significa que os valores obtidos refletem diretamente a estabilidade de macromoléculas, independentemente de sua concentração no meio. Ao analisar o T_m registrado na Tabela 7, observou-se que os valores obtidos para as isoformas β -tripsina e α -tripsina foram muito próximos, porém apresentaram diferença estatisticamente significativa. A única diferença foi encontrada em 40% (v/v) de etanol, ponto no qual foi registrada uma diferença de 10 K entre os T_m 's das isoformas. Ainda, observou-se que na faixa de 0 a 50% (v/v) de etanol, o valor de T_m reduz cerca de 8 K. A partir de 60% (v/v), o valor deste parâmetro volta a aumentar e alcança valores próximos aos vistos no sistema sem solvente orgânico. Em 80% (v/v) de etanol, o valor de T_m chega a ser mais de 10 K maior do o T_m encontrado na ausência de etanol.

Tabela 7: Temperatura média de desenovelamento (T_m) das isoformas em diferentes concentrações de etanol obtidas das curvas de desenovelamento térmico em pH 3,0 monitorado por absorção UV.

Etanol (% v/v)	T_m (K)	
	β -tripsina	α -tripsina ^e
0	329,6 \pm 0,2	329,3 \pm 0,8
20 ^a	316,4 \pm 1,2	313,8 \pm 0,6
40 ^b	322,0 \pm 1,1	311,0 \pm 1,5
50 ^c	321,3 \pm 2,4	320,9 \pm 0,3
60 ^c	326,5 \pm 0,8	327,0 \pm 1,0
80 ^d	341,7 \pm 2,2	338,1 \pm 0,2

^a Esta concentração representa a região de pré-transição.

^b Esta concentração refere-se ao C_m^{conf} .

^c Esta concentração refere-se ao C_m^{er} .

^d Esta concentração representa a região de pós-transição.

^e Dados em 0, 40%, 60% e 80% foram publicados por ROSA et al., 2017.

A redução do T_m corrobora a ocorrência de mudanças conformacionais desestabilizadoras nas isoformas de tripsina na presença de até 50% (v/v) de etanol. Esse resultado indica o enfraquecimento de forças intermoleculares combinada com uma redução na estabilidade da camada de solvatação da proteína na presença de solventes orgânicos polares (GORMAN; DORDICK, 1992; ROSA et al., 2017). Há também efeitos de termoestabilização indicados pelo aumento do T_m a partir de 60% (v/v), o que poderia ser explicado pelo aumento da rigidez das isoformas na presença de grandes quantidades de solvente orgânico (KLIBANOV; 1989). Porém este efeito não pode ser associados apenas a uma população monomérica de moléculas.

Este processo é melhor observado em elevadas concentrações de etanol. Especificamente, a elevada estabilidade aparente para as isoformas de tripsina são alcançadas na concentração de 80% (v/v) de etanol, onde as isoformas apresentam

um comportamento supramolecular de agregados irreversíveis ou de aglomerados reversíveis (PARK; MARQUSEE, 2004), ou seja, os valores de T_m encontrados nesta concentração de etanol se referem a um conjunto de partículas se comportando energeticamente como se fossem uma única unidade. Sendo assim, foi necessária maior quantidade de energia para levar à dissociação desses arranjos. Portanto, a análise do T_m (Tabela 7) revelou que o etanol aumenta a instabilidade termodinâmica nas isoformas e que até 60% (v/v) de etanol os resultados obtidos estão relacionados ao comportamento de desenovelamento das unidades monoméricas, enquanto que em 80% (v/v) de etanol os resultados refletem principalmente o comportamento de dissociação dos arranjos multiméricos.

5.9.5 – Análise das curvas de desenovelamento da β -tripsina obtidas por microcalorimetria diferencial de varredura (DSC)

Esta seção traz apenas alguns dados relacionados à isoforma β -tripsina porque a coleta de dados foi interrompida pela pandemia de Sars-CoV-2. Portanto, os dados obtidos por meio desta técnica são preliminares, sendo possível realizar poucas corridas no equipamento. O objetivo deste ensaio em DSC foi obter medidas diretas dos parâmetros termodinâmicos, a fim de compará-los com os dados obtidos pelo desenovelamento térmico monitorado por UV. E os resultados dessas medidas são mostrados nas Figuras 20, 21 e 22, tendo sido originados por meio do tratamento dos dados brutos com a subtração da linha de base e o ajuste matemático da curva gaussiana mais próxima da experimental (dados brutos registrados nos Apêndices Q, R e S). Este ajuste pode ser usado para modelos que seguem uma transição em dois estados ou para alguns modelos que não passam somente por dois estados desde que apresentem uma transição cooperativa e os estados estejam em equilíbrio (HAYNIE, 2001).

De acordo com os resultados obtidos das curvas ajustadas, a β -tripsina apresentou um desenovelamento térmico com uma transição em dois estados nas condições sem etanol e em 20% (v/v) de etanol, com valor da relação de $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ mais próximo à unidade na condição do tampão. Com a adição de 50% (v/v) de etanol ao meio, foi observada uma tendência de redução dessa relação, com valores tendendo a 0,5.

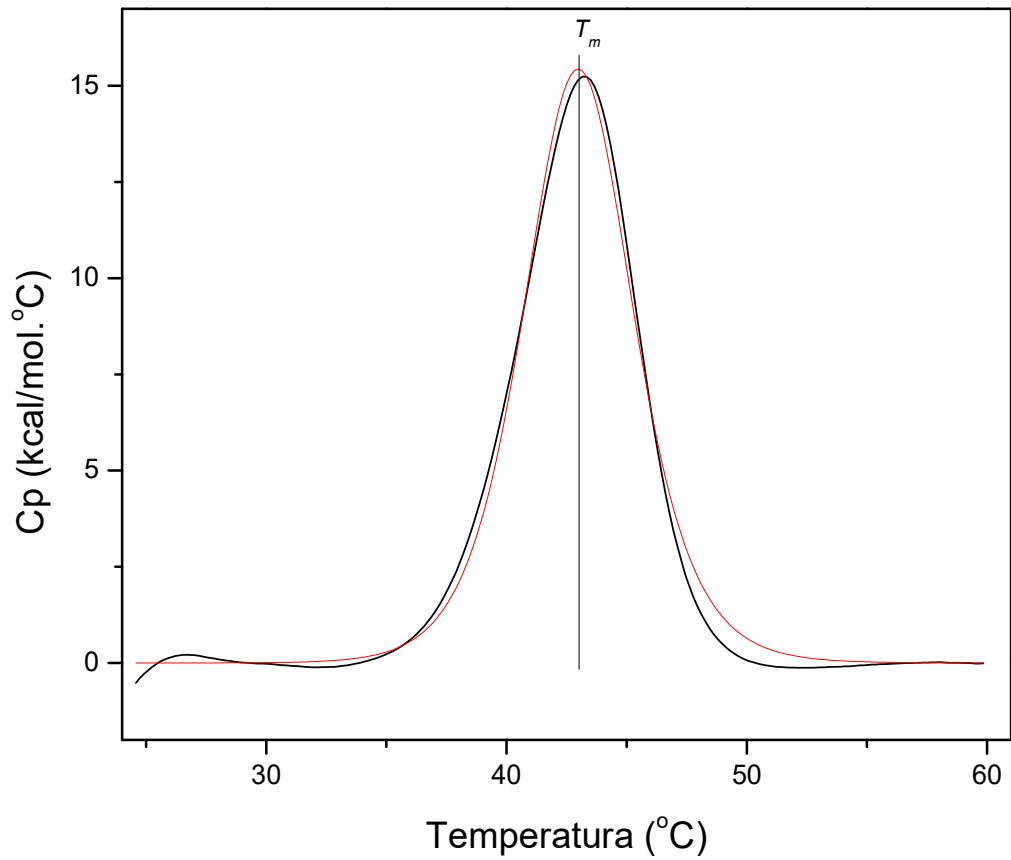


Figura 20: Curva de desenovelamento por indução térmica de β -tripsina a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão glicina a $50,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 3,0 e CaCl_2 a $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$. Linha contínua preta é o dado original e a linha vermelha é o dado submetido ao ajuste para uma transição em um modelo de não-dois estados (MN2ST) e T_m é a temperatura média de desenovelamento.

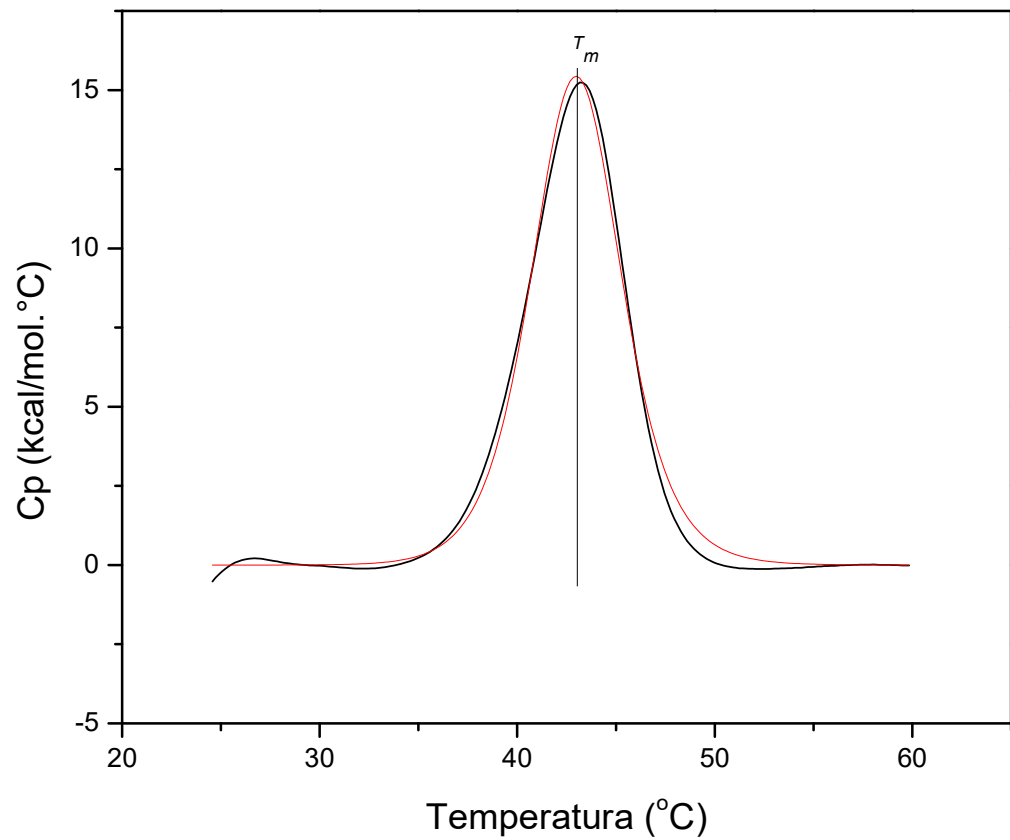


Figura 21: Curva de desenovelamento por indução térmica de β -tripsina em etanol 20% (v/v). A amostra foi preparada a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Foi utilizado o tampão glicina a $50,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 3,0 contendo CaCl_2 $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ em mistura ao etanol. Linha contínua preta é o dado original e a linha vermelha é o dado submetido ao ajuste para uma transição em um modelo de não-dois estados (MN2ST) e T_m é a temperatura média de desenovelamento.

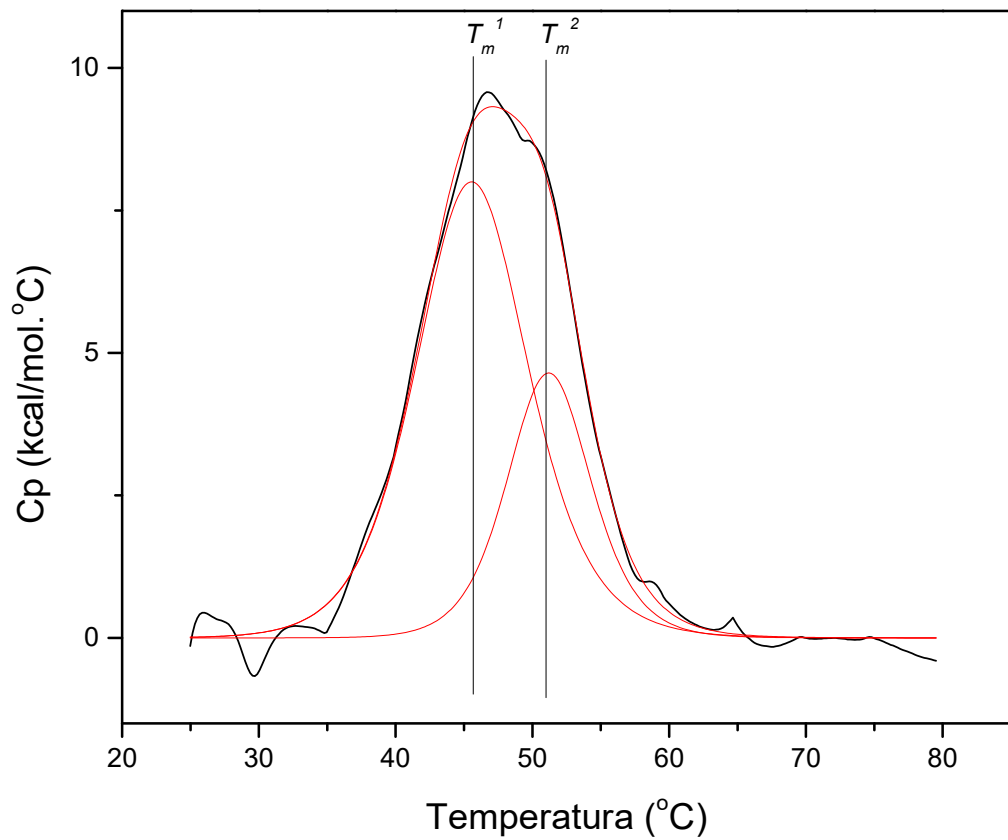


Figura 22: Curva de desenovelamento por indução térmica de β -tripsina em etanol 50% (v/v). A amostra foi preparada a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Foi utilizado o tampão glicina a $50,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 3,0 contendo CaCl_2 $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ em mistura ao etanol. Linha contínua preta é o dado original e a linha vermelha é o dado submetido ao ajuste para uma transição em um modelo de não-dois estados (MN2ST) e T_m é a temperatura média de desenovelamento.

Outro ponto a se destacar é o perfil das curvas obtidas com o ajuste. Nas Figura 20 e 21, observou-se um perfil simétrico, característico de um processo de transição de dois-estados. Já o perfil apresentado em etanol 50% (Figura 22) mostrou-se assimétrico e indicou a existência de duas populações com uma tendência à transição do tipo “não dois estados”, indicando a formação de estados intermediários do desenovelamento a partir de 50% (v/v) de etanol. Porém tratam-se de dados preliminares, já que foram feitas poucas coletas até a interrupção dos trabalhos pela pandemia. A formação de estados intermediários também foi sugerida na análise dos resultados de estrutura secundária e, desta forma, o dado calorimétrico confirmou mais uma previsão feita a partir de dado espectroscópico.

Cabe ressaltar que o perfil de transição em dois-estados também foi observado no ensaio de fluorescência (Figura 15), porém esse resultado foi extraído de uma tendência matemática apresentada no respectivo gráfico. Portanto, os dados espectroscópicos só podem afirmar de maneira superficial qual tipo de transição ocorre na presença de um tipo de solvente orgânico. Já a avaliação do tipo de transição por calorimetria é mais específica, pois as curvas são obtidas para cada concentração de etanol avaliada, fornecendo uma informação específica para cada ponto testado. Para as concentrações de etanol testadas no calorímetro, foi possível observar que em 50% (v/v) o tipo de transição é diferente do que foi observado no meio aquoso e na concentração representativa da região de pré-transição. Para tornar mais clara a discussão a seguir, a descrição dos parâmetros apresentados no próximo tópico foi acompanhada do termo “da cadeia”, em referência às cadeias proteicas das isoformas, já que as medidas calorimétricas estão relacionadas exclusivamente às modificações ocorridas nas isoformas.

5.9.6 – Determinação de T_m , ΔH_{cal} , ΔH_{VH} , ΔS_{Tm} e ΔC_p da β -tripsina obtidos por DSC.

Para a determinação destes parâmetros termodinâmicos, foram realizadas duas corridas isoladas no DSC para cada condição do meio. Os resultados para estas análises estão dispostos na Tabela 8.

Analisando a Tabela 8, pode-se observar que o T_m da β -tripsina em tampão se mostrou próximo ao relatado por Bittar et al., (2003), que foi de $327,0 \pm 0,1$ K. Com a adição de etanol, a isoforma passou a apresentar um valor de T_m inferior ao da condição sem solvente orgânico, com uma diferença de até 12,8 K. Logo, estes

valores confirmaram que a adição de etanol levou à redução da estabilidade conformacional, conforme já indicado também nos estudos espectroscópicos.

Outro ponto a se destacar é que o T_m obtido pelas técnicas espectroscópica e calorimétrica foram muito próximos em todas as concentrações testadas (0, 20% e 50% (v/v)), mostrando que a técnica espectroscópica pode providenciar uma estimativa confiável deste parâmetro na impossibilidade de se obter este dado por medida calorimétrica direta. No caso do T_m em 50%, observou-se que o T_m espectroscópico (Tabela 7) foi uma média aproximada dos T_m obtidos por DSC (Tabela 8).

Tabela 8: Determinação de parâmetros termodinâmicos para β -tripsina a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ em pH 3,0 obtidos por DSC.

Etanol (% v/v)	T_m (K)	ΔH_{cal} (kcal.mol ⁻¹)	ΔH_{vH} (kcal.mol ⁻¹)	$\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$	ΔS_{Tm} (cal.K ⁻¹ .mol ⁻¹)	ΔC_p ³ (kcal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
0	329,0 ± 0,1	84,00 ± 0,45	98,60 ± 0,60	0,85	255,3	0,42
20	316,2 ± 0,4	93,72 ± 0,55	130,8 ± 0,95	0,72	365,9	4,16
50 ¹	318,8 ± 0,2	87,77 ± 0,47	73,62 ± 0,13	1,20	275,3	0
50 ²	324,4 ± 0,2	37,94 ± 0,46	102,5 ± 0,47	0,37	117,0	-6,36

¹ Dados extraídos da primeira área obtida pela deconvolução matemática da Figura 22.

² Dados extraídos da segunda área obtida pela deconvolução matemática da Figura 22.

³ É uma variação estimada da capacidade calorífica, obtida pela diferença entre os valores no eixo y para a pós-transição a pré-transição no gráfico de C_p x Temperatura.

Os valores de ΔH_{cal} da β -tripsina para as condições sem solvente orgânico e com 20% (v/v) foram parecidos (porém com diferença estatística significativa), reafirmando que esta concentração de etanol representa bem a região pré-transição definida nos ensaios de atividade (Figura 14) e de fluorescência (Figura 15). Este valor está dentro do esperado para pequenas proteínas globulares (BECKTEL; SCHELLMAN, 1987). A única diferença marcante foi encontrada na variação de entalpia de desenovelamento em 50% (v/v) de etanol, que tem um valor consideravelmente menor em uma das populações. Como o parâmetro ΔH está associado à quantidade de moléculas no estado enovelado, pode-se dizer que essa redução indica também que a população predominante é aquela com menor estabilidade termodinâmica, ou seja, com o menor T_m .

E ao comparar os resultados obtidos por espectroscopia e por DSC, observa-se que os valores são diferentes, principalmente para aqueles parâmetros que dependem da concentração de proteína na amostra. E essas pequenas diferenças se devem principalmente a dois motivos: o primeiro é pela diferença na forma de obtenção dos dados. No DSC, os dados obtidos correspondem à medida direta do calor trocado durante o processo de desenovelamento, sendo, portanto, os parâmetros termodinâmicos obtidos por esta técnica não dependentes de modelos matemáticos. Já os dados obtidos por espectroscopia não são uma medida direta do calor trocado durante o desenovelamento, mas sim uma medida da mudança de absorção causada por modificações estruturais na proteína, sendo este método de obtenção modelo-dependente. O segundo motivo é devido ao preparo de amostras. Como se sabe, o ΔH é uma propriedade extensiva e, portanto, depende do número de moléculas aptas a transitarem. Em teoria, quanto maior a concentração de proteína nativa em solução, maior será o ΔH obtido. No ensaio monitorado por absorção, as amostras a serem testadas foram preparadas para a concentração final de 0,5 mg/mL. Já para as corridas de beta-tripsina em DSC, as amostras foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL. Neste último caso, não foi utilizada a mesma concentração da espectroscopia porque o ΔH_{cal} obtido por DSC em concentrações inferiores a 0,75 mg/mL não são precisos e se tornam difíceis de serem analisados (SANTOS, 2009).

Outra avaliação que os dados calorimétricos permitem realizar é a influência da concentração de etanol sobre as propriedades termodinâmicas da proteína. Por

meio da relação de $\Delta H_{cal}/\Delta H_{VH}$, pode-se entender com maior clareza a natureza do processo de transição entre estados (PRIVALOV, 2012). Antes de tudo, é importante lembrar alguns conceitos. O primeiro deles é sobre a entalpia de van't Hoff, que é uma medida da taxa de variação da razão entre a concentração da produção e a concentração do reagente em função da temperatura, ou seja, descreve a dependência da constante de equilíbrio como uma função da temperatura (BITTAR et al., 2003). No caso de proteínas, as unidades monoméricas e multiméricas são esses reagentes/produtos, sendo que os multímeros são considerados como se fossem uma única molécula para efeitos da contribuição do número de moléculas na concentração proteica da solução e, ao se dissociarem, as partes dissociadas passam a serem contabilizadas individualmente para a determinação da concentração da solução (HAYNIE, 2008). Portanto, se uma proteína for monomérica com desenovelamento cooperativo, a quantidade de produto formada será igual à do reagente. Já se a proteína for dimérica ou se ela não se desenovelar cooperativamente, a quantidade de produto formado (que no caso seria a quantidade de proteína desenovelada) não será igual à quantidade inicial de produto.

E essas diferenças se refletem na obtenção desta entalpia, já que ΔH_{VH} representa a dependência da constante de equilíbrio pela temperatura, sendo a constante de equilíbrio definida pela relação entre a concentração de proteína desenovelada (produto) pela de proteína enovelada (reagente). Já a mudança de entalpia calorimétrica, ao contrário, é uma medida do calor absorvido durante uma reação, e ela independe da concentração de moléculas que estão enoveladas e desenoveladas (HAYNIE, 2008). Desta forma, a correlação entre as duas variações de entalpia fornece informações importantes sobre o número de estados povoados durante um processo de desenovelamento. Para transições em dois-estados, a relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{VH}$ é igual a 1. Já para transições não-dois-estados, o valor desta relação cai para 0,5, podendo ser relacionado a processos supramoleculares de agregação. E para valores maiores do que 1, ocorre o desacoplamento de subunidades ou de domínios (BITTAR et al., 2003).

Os resultados desta correlação podem ser vistos na Tabela 8. A dependência da relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{VH}$ nos meios 0 e 20% de etanol mostrou que a transição da isoforma β -tripsina apresentou um comportamento em dois-estados, com resultados

de $\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$ mais próximos a 1. Já em 50% (v/v) de etanol, a isoforma apresentou dois comportamentos distintos. Estes resultados também explicam, do ponto de vista termodinâmico, a redução de cooperatividade vista em outros ensaios, pois as transições “não-dois-estados” foram menos cooperativas, apresentando maior largura da meia altura na curva de desenovelamento. E isso porque esta medida guarda correlação inversa com a cooperatividade dos processos de transição (Relkin, 1994). E menores valores de cooperatividade seriam esperados em transições “não-dois-estados”, já que neste caso há a formação de estados intermediários. Uma transição em “dois-estados” só seria observada se ela fosse altamente cooperativa (HAYNIE, 2008), refletindo uma relação $\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$ próxima de 1 (um).

Além disso, o resultado de $\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$ em 50% também confirmou a existência de duas populações distintas, sendo a primeira menos estável (menor T_m), em maior preponderância (maior ΔH) e com comportamento de desenovelamento com desacoplamento dos domínios, já que apresentou uma correlação mais próxima de 1. E esta interpretação é bem plausível, já que os domínios da isoforma β -tripsina apresentam quantidades diferentes de pontes dissulfeto (4 no primeiro domínio e 1 no segundo domínio). Já a outra população (maior T_m) – em menor quantidade – refere-se ao conjunto que já se apresenta na forma multimérica devido à correlação $\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$ próxima de 0,5 formado por estados intermediários de enovelamento.

Quanto aos dados de entropia (Tabela 8), observou-se o mesmo comportamento apresentado nos resultados espectrofotométricos em 0 e em 20% (v/v) de etanol (item 5.9.2): a redução dos valores de entropia conforme a concentração de etanol aumentou. Porém, dois perfis foram apresentados em 50% (v/v), reforçando também a existência de duas populações distintas de moléculas. A primeira população, conforme sugerido nos parágrafos anteriores, é formada por moléculas com comportamento de desenovelamento monomérico, e esta observação pode ser reforçada pelo resultado entrópico com valor próximo ao encontrado no meio sem solvente orgânico. Os valores de entropia dessa primeira população em 50% (v/v) sugerem que há semelhança na composição da camada de solvatação da β -tripsina solubilizada neste sistema com a solubilizada no meio sem este solvente orgânico. Já o valor apresentado pela segunda população encontrada

em 50% (v/v) mostrou um valor reduzido em comparação às demais condições. E neste caso, o valor da entropia sugeriu uma exposição da região hidrofóbica ao ambiente polar, o que levaria à redução da liberdade conformacional dessa região. A exposição de regiões hidrofóbicas facilita a formação de aglomerados e agregados, já que ao interagirem levam ao aumento da entropia de solvatação, o que é energeticamente favorável. E conforme discutido nos resultados de DLS e ZP, em 50% (v/v) de etanol foi observada a formação de aglomerados.

Com a exposição da região hidrofóbica, espera-se que aumente a quantidade de moléculas de água e de etanol ligadas na camada de solvatação, o que pôde ser notado para a β -tripsina na presença de 20% (v/v) de etanol tanto pelos resultados de ΔC_p quanto pelos resultados de ΔS_{Tm} (Figura 19), já que a redução de entropia indica aumento na organização das moléculas do sistema. Portanto, outra análise que se pode fazer em cima deste resultado é que houve uma modificação na organização da água na camada de solvatação da β -tripsina, estando uma maior quantidade de moléculas de água mais aprisionadas na camada de solvatação tanto pela interação direta com as moléculas de etanol quanto por uma ligeira exposição da região hidrofóbica da proteína. De acordo com (MOMENI et al., 2018), o solvente orgânico pode atuar concomitantemente de forma direta, por meio de interação solvente-proteína, e de forma indireta, por meio da interação deste com as moléculas de água da camada de solvatação.

Com relação aos resultados obtidos para a segunda população em 50% (v/v) de etanol, observou-se que $\Delta C_p < 0$. Isso significa que o estado de pós-transição apresentou um C_p menor que o estado inicial (ou seja, $\Delta C_p < 0$), indicando que os resíduos estariam mais próximos entre si, e que as moléculas da camada de solvatação estariam mais desorganizadas. E essa proximidade estaria atribuída a duas hipóteses: a da compactação da estrutura monomérica ou a da ocorrência de rearranjos supramoleculares. Como o ensaio de DLS mostrou a ocorrência desses rearranjos, a segunda hipótese foi atribuída ao resultado encontrado de ΔC_p . Além disso, a redução de ΔH em 50% (v/v) de etanol (na comparação com o meio sem solvente) não suporta a primeira hipótese, pois em casos de enrijecimento da estrutura as interações intramoleculares se tornam mais intensas, o que demandaria uma maior quantidade de calor para desfazer essas interações e desenovelar a proteína, sendo esperado portanto um aumento do ΔH . Uma outra análise

complementar que pode ser feita está relacionada à relação entre o desenovelamento e a camada de solvatação. Conforme falado no parágrafo anterior, espera-se que o C_p do estado desenovelado seja maior em relação ao estado enovelado, e que isso então reflète uma exposição do núcleo hidrofóbico ao ambiente polar e, conseqüentemente, maior quantidade de moléculas de solvente e água são forçadas a se organizarem na camada de solvatação. Portanto, como $\Delta C_p < 0$, pode-se entender que ocorreu um aumento na quantidade de moléculas de água e solvente com baixo grau de organização, sendo reflexo da redução do número dessas moléculas na camada de solvatação da proteína. E isso também corrobora a existência de aglomerados proteicos, tendo como consequência a liberação de moléculas de solventes da camada de solvatação. Portanto, esses resultados confirmam as previsões de rearranjo supramolecular feitas a partir de dados espectroscópicos.

E para concluir a discussão sobre as alterações termodinâmicas, cabe salientar que a sonda espectroscópica utilizada para o ensaio de desenovelamento induzido por temperatura mostrou-se satisfatória para o propósito na qual foi destinada, ou seja, avaliar indiretamente a mudança conformacional em direção ao estado desenovelado das proteínas sob ação do calor (MARTINS et al., 2003; NASSER BRUMANO; ROGANA; SWAISGOOD, 2000; RAMPRAKASH et al., 2008). Este fato pode ser comprovado comparando-se os resultados espectroscópicos com os obtidos por DSC, que é considerada a técnica de referência para obtenção destes dados calorimétricos.

5.10 – A otimização do desenho experimental para estudo de biomoléculas com potencial de aplicação industrial

O estudo de uma biomolécula modelo em todos os aspectos mostrou-se de grande importância, uma vez que a otimização de enzimas ou de meios reacionais depende diretamente do grau de conhecimento acerca dessas biomoléculas. A realização de uma triagem dos pontos de solvente orgânico a serem testados pode ser feita através dos ensaios de atividade e/ou de alterações conformacionais. Esses ensaios são rápidos e demandam baixa quantidade de proteínas. Quanto à quantidade de concentrações a serem escolhidas para esses tipos de ensaios de triagem, é recomendável que haja pelo menos 3 pontos em cada região das curvas

sigmoidais (pré-transição, transição e pós-transição) para que seja possível fazer o tratamento matemático do conjunto de pontos obtidos. E esses pontos podem ser reajustados após o primeiro ensaio, por meio de complementação de dados nas regiões que porventura não alcancem a quantidade mínima de pontos.

Para a escolha dos pontos para demais estudos, sugere-se que sejam tomados um ponto no meio da região de pré-transição, um ponto no meio da região de pós-transição e o ponto de inflexão no ponto da região de transição. Desta forma, há economia de tempo, de amostra e de recurso financeiro. Para exemplificar, pode-se citar o que foi utilizado neste trabalho: enquanto nos ensaios de triagem foram testadas 10 a 15 concentrações, nos ensaios de pós-triagem foram utilizados apenas 4 a 5 pontos. A escolha das técnicas a serem utilizadas pode variar de acordo com a disponibilidade do equipamento, custo do ensaio e limitação da técnica quanto à sensibilidade e à incompatibilidade com as soluções utilizadas. Porém, aconselha-se que seja feito ao menos um teste para cada aspecto a ser avaliado, a saber: atividade, estrutura, organização supramolecular e estabilidade termodinâmica. Conforme demonstrado na discussão, esses aspectos se complementam para conferir as informações completas a respeito do comportamento da enzima em outros diferentes meios.

Para concluir, destaca-se que a proposta apresentada neste tópico é apenas um norteador para otimizar estudos de caracterização de biomoléculas com potencial de aplicação industrial. Isso significa que adaptações devem ser feitas conforme o objetivo do estudo, o tipo do meio reacional e as condições do ensaio. Neste estudo em particular, a proposta foi elaborada em cima de uma enzima que apresenta modelo de transição em dois estados no meio aquoso e em cima da ação de solventes orgânicos sobre os diferentes estágios da transição de enzimas. Assim, dependendo da proposta do estudo, alguns ensaios podem ser adicionados ou excluídos e este estudo pode ser tomado como norte para realizar essas escolhas.

6 – CONCLUSÕES

Este trabalho de tese mostrou que as isoformas α - e β -tripsina apresentam diferenças em estrutura, conformação e atividade, sendo essas diferenças acentuadas na presença de solventes orgânicos. A atividade da β -tripsina foi superior à da α -tripsina em todos os solventes testados (metanol, etanol e n-propanol), sendo o etanol o solvente no qual ambas as isoformas apresentaram os melhores resultados para a atividade amidásica. Com relação aos ensaios conformacionais e estruturais, os ensaios em etanol mostraram que a isoforma β -tripsina apresenta maior grau de alterações conformacionais e estruturais, bem como um processo de desenovelamento mais cooperativo do que a α -tripsina. A comparação entre os resultados da atividade e da conformação mostrou que os processos de desenovelamento e de desnaturação ocorrem em diferentes concentrações, indicando que o processo de transição entre estados não é totalmente cooperativo nas duas isoformas.

Os parâmetros termodinâmicos mostraram que a isoforma β -tripsina é mais estável em meio aquo-orgânico, sendo esse um padrão já relatado em literatura para o meio aquoso. Além disso, por meio dos dados termodinâmicos foi possível confirmar que a cooperatividade da transição é diferente entre as isoformas, sugerindo que o número de intermediários de transição na isoforma β -tripsina é maior do que o da α -tripsina. Com relação aos estudos supramoleculares, as isoformas se rearranjaram na presença de meio aquo-orgânico, com perfil de aglomeração até 60% (v/v) para ambas as isoformas, o que foi confirmado pelos resultados termodinâmicos e pela presença de atividade parcial até esta concentração de etanol. Já em 80% (v/v), observou-se padrões distintos de rearranjo, sendo que a isoforma β -tripsina parece se manter aglomerada, enquanto a α -tripsina parece se agregar, sendo essas ideias suportadas pelos resultados termodinâmicos. Por fim, os resultados confirmam a hipótese de que as diferenças na atividade, estrutura e termodinâmica entre as isoformas, vistas em estudos realizados em meios aquosos, se mantêm na presença de meios aquo-orgânicos.

7 – PERSPECTIVA

Como observa-se na literatura, o estudo de enzimas em solventes orgânicos já é amplamente explorado. Porém quase não se encontram estudos que versam sobre a influência de solventes orgânicos sobre isoformas de uma mesma enzima. E este tipo de estudo é interessante para entender a contribuição de cada isoforma de uma mesma enzima na sua atividade global. Sendo assim, este trabalho deu os primeiros passos no estudo de isoformas em solventes orgânicos, sendo avaliado até aqui algumas alterações conformacionais, estruturais e termodinâmicas.

Para que esse estudo envolvendo isoformas e solventes orgânicos se torne completo, ainda é necessário finalizar os estudos termodinâmicos de ambas as isoformas em meio aquo-orgânico utilizando DSC, já que alguns parâmetros termodinâmicos são obtidos exclusivamente por meio desta técnica. Além disso, para completar essa avaliação também é necessário realizar um estudo de cinética enzimática para ambas as isoformas nas mesmas concentrações de meios aquo-orgânicos utilizados neste trabalho, além da realização dos ensaios nas mesmas condições descritas nesta tese para a tripsina comercial, servindo esse resultado como parâmetro para a comparação da contribuição de cada isoforma na mistura comercial. Desta forma, a avaliação da influência dos solventes orgânicos seria completa, já que envolveria comparações em diversas frentes, tais como atividade, cinética, estrutura, conformação e termodinâmica.

Finalmente, para que possa considerar um completo entendimento acerca das mudanças das isoformas em presença de solventes orgânicos, seria interessante realizar os mesmos ensaios utilizando outros solventes orgânicos, além dos utilizados neste trabalho de tese, o que representa ainda muito trabalho futuro!

8 – BIBLIOGRAFIA

- ABIDI, F. et al. Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2301–2310, 2011.
- AHMAD, F.; YADAV, S.; TANEJA, S. Determining stability of proteins from guanidinium chloride transition curves. **The Biochemical journal**, v. 287, p. 481–485, 1992.
- ALEXANDRESCU, A. T.; NG, Y. L.; DOBSON, C. M. **Characterization of a trifluoroethanol-induced partially folded state of α -lactalbumin** *Journal of Molecular Biology*, 1994.
- ALONSO, D. O. V.; DILL, K. A. Solvent Denaturation and Stabilization of Globular Proteins. **Biochemistry**, v. 30, n. 24, p. 5974–5985, 1991.
- ANDREWS, J. M.; ROBERTS, C. J. Non-native aggregation of α -chymotrypsinogen occurs through nucleation and growth with competing nucleus sizes and negative activation energies. **Biochemistry**, v. 46, n. 25, p. 7558–7571, 2007.
- ANTOSIEWICZ, J. M.; SHUGAR, D. UV–Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 1: basic principles and properties of tyrosine chromophore. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 2, p. 151–161, 4 jun. 2016.
- ARAKAWA, T. et al. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 307–326, 2001.
- ARAKAWA, T. Protein–solvent interaction. **Biophysical Reviews**, v. 10, n. 2, p. 203–208, 2 abr. 2018.
- ARZENŠEK, D.; KUZMAN, D.; PODGORNIK, R. Colloidal interactions between monoclonal antibodies in aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 384, n. 1, p. 207–216, 2012.
- ASCENZI, P. et al. Steady-state and pre-steady-state kinetics of the trypsin-catalysed hydrolysis of alpha-CBZ-L-lysine-p-nitrophenyl ester. **BBA - Enzymology**, v. 658, n. 1, p. 158–164, 1981.
- ASHTON, D. S. et al. On the Analysis of Bovine Trypsin by Electrospray Mass-Spectrometry. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 199, n. 2, p. 694–698, mar. 1994.
- BALL, P. Water as an active constituent in cell biology. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 74–108, 2008.
- BALÓ, J.; BANGA, I. Elastase and Elastase-Inhibitor. **Nature**, v. 164, n. 4168, p. 491–491, 1949.
- BARNETT, G. V. et al. Aggregate structure, morphology and the effect of aggregation mechanisms on viscosity at elevated protein concentrations. **Biophysical Chemistry**, v. 207, p. 21–29, 2015.

BARRETT, D. Zymogen activation as a sensitive enzyme-amplifying assay for a protease with tryptic specificity. **The Biochemical journal**, v. 117, n. 1, p. 57–59, 1970.

BECKTEL, W. J.; SCHELLMAN, J. A. Protein stability curves. **Biopolymers**, v. 26, n. 11, p. 1859–1877, nov. 1987.

BEECHEM, J. M.; BRAND, L. Time-Resolved Fluorescence of Proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, n. 1, p. 43–71, jun. 1985.

BENJWAL, S. Monitoring protein aggregation during thermal unfolding in circular dichroism experiments. **Protein Science**, v. 15, p. 635–639, 1 fev. 2006.

BEY, H. et al. Structure and properties of native and unfolded lysing enzyme from *T. harzianum*: Chemical and pH denaturation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 860–866, 2016.

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.

BODE, W.; CHEN, Z.; BARTELS, K. Refined 2 Å X-ray Crystal Structure of Porcine Pancreatic Kallikrein A, a Specific Trypsin-like Serine Proteinase. Crystallization, Structure Determination, Crystallographic refinement, structure and its comparison with bovine trypsin. **J. Mol. Biol**, v. 164, p. 237–282, 1983.

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

BODE, W.; SCHWAGER, P. The refined crystal structure of bovine β -trypsin at 1.8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamide binding site and Active site at pH 7.0. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, n. 4, p. 693–717, 1975.

BODE, W.; SCHWAGER, P.; HUBER, R. The Transition of Bovine Trypsinogen to a Trypsin-like State upon Strong Ligand Binding. The Refined Crystal Structures of the Bovine Trypsinogen-Pancreatic Trypsin Inhibitor Complex and of its Ternary Complex with Ile-Val at 1.9 Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 118, p. 99–112, 1978.

BOUGATEF, A. Trypsins from fish processing waste: Characteristics and biotechnological applications - Comprehensive review. **Journal of Cleaner Production**, v. 57, p. 257–265, 2013.

BRANDEN, C.; TOOZE, J. Folding and Flexibility. In: **Introduction to Protein Structure**. Second ed. New York: Garland Publishing, 1999. p. 89–121.

BUCK, M.; RADFORD, S. E.; DOBSON, C. M. A Partially Folded State of Hen Egg White Lysozyme in Trifluoroethanol: Structural Characterization and Implications for Protein Folding. **Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 669–678, 1993.

- BURSTEIN, E. A.; ABORNEV, S. M.; RESHETNYAK, Y. K. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. I. Decomposition algorithms. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 3, p. 1699–1709, 2001.
- BURSTEIN, E. A.; VEDENKINA, N. S.; IVKOVA, M. N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. **Photochemistry and Photobiology**, v. 18, n. 4, p. 263–279, out. 1973.
- BUTTNER, L. G. Enzymes in non-aqueous solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 1, p. 253–259, 1979.
- CARREA, G.; RIVA, S. Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 39, p. 2226–2254, 2000.
- CHEN, R. F. Fluorescence Quantum Yields of Tryptophan and Tyrosine. **Analytical Letters**, v. 1, n. 1, p. 35–42, 1967.
- CHEN, Y.; BARKLEY, M. D. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. **Biochemistry**, v. 37, n. 28, p. 9976–9982, 1998.
- CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta Potential Measurement. In: **Methods in Molecular Biology**. 697. ed. [s.l.] Humana Press, 2011. p. 63–70.
- COHEN, D. S.; PIELAK, G. J. Stability of yeast iso-1-ferricytochrome c as a function of pH and temperature. **protein science**, v. 3, p. 1253–1260, 1994.
- COSTELA, A. et al. Photophysics and photochemistry of p-nitroaniline as photoinitiator. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 77–86, 1997.
- CROMWELL, M. E. M.; HILARIO, E.; JACOBSON, F. Protein aggregation and bioprocessing. **AAPS Journal**, v. 8, n. 3, 2006.
- CUNHA, A. R. Understanding the ergodic hypothesis via analogies. **Physicae**, v. 10, p. 9–12, 2011.
- CUNNINGHAM, L. W. Molecular-kinetic properties of crystalline diisopropyl phosphoryl trypsin. **The Journal of biological chemistry**, v. 211, n. 1, p. 13–19, 1954.
- DADSHAHI, Z. et al. Extraction and purification of a highly thermostable alkaline caseinolytic protease from wastes *Litopenaeus vannamei* suitable for food and detergent industries. **Food Chemistry**, v. 202, p. 110–115, 2016.
- DAVIE, E. W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. **Biochemistry**, v. 30, n. 43, p. 10363–10370, 1991.
- DAVIE, E. W.; NEURATH, H. Identification autocatalytic of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 212, n. 2, p. 515–529, 1954.
- DE DIEGO, T. et al. Fluorescence and CD spectroscopic analysis of the α -chymotrypsin stabilization by the ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium

bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 916–924, 2004.

DEMCHENKO, A. P. Spectroscopic Properties of Protein Chromophores. In: **Ultraviolet Spectroscopy of Proteins**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1986a. p. 5–26.

DEMCHENKO, A. P. Difference Spectra of Proteins. In: **Ultraviolet Spectroscopy of Proteins**. [s.l.] Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1986b. v. 1p. 64–90.

DI CERA, E. Serine proteases. **IUBMB Life**, v. 61, n. 5, p. 510–515, 2009.

DONG, A. et al. Intermolecular beta-sheet results from trifluoroethanol-induced nonnative alpha-helical structure in beta-sheet predominant proteins: infrared and circular dichroism spectroscopic study. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 355, n. 2, p. 275–281, 1998.

DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 270–282, 2010.

DYSON, H. J. et al. Folding of peptide fragments comprising the complete sequence of proteins. Models for initiation of protein folding I. Myohemerythrin. **Journal of Molecular Biology**, v. 226, n. 3, p. 795–817, 1992a.

DYSON, H. J. et al. Folding of peptide fragments comprising the complete sequence of proteins. Models for initiation of protein folding. II. Plastocyanin. **Journal of Molecular Biology**, v. 226, n. 3, p. 819–835, 1992b.

EFTINK, M. R. The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. **Biophysical Journal**, v. 66, p. 482–501, 1994.

EFTINK, M. R. Intrinsic Fluorescence of Proteins. In: **Topics in Fluorescence Spectroscopy**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002. v. 6p. 1–15.

ELSHEREEF, R. et al. Fluorescence Spectroscopy as a tool for monitoring solubility and aggregation behavior of b-lactoglobulin after heat treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, n. 5, p. 863–874, 2006.

ENGLAND, J. L.; HARAN, G. Role of Solvation Effects in Protein Denaturation: From Thermodynamics to Single Molecules and Back. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 257–277, 2011.

EPPENDORF. **Manipulação de líquidos difíceis**. Disponível em: <<https://www.eppendorf.com/BR-pt/produtos/manipulacao-de-liquidos-dificeis/>>. Acesso em: 8 ago. 2021.

FAIZULLIN, D. A. et al. Food Hydrocolloids Secondary structure and colloidal stability of beta-casein in microheterogeneous water-ethanol solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 349–355, 2017.

FAN, P.; BRACKEN, C.; BAUM, J. Structural Characterization of Monellin in the Alcohol-Denatured State by NMR: Evidence for β -Sheet to α -Helix Conversion. **Biochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1573–1582, 1993.

FINK, A. L. Compact Intermediate States in Protein Folding. **Annual Review Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 24, p. 495–522, 1995.

FINK, A. L. Protein aggregation : folding aggregates , inclusion bodies and amyloid. **Folding & Design**, v. 3, n. 1, p. 9–23, 1998.

FOGARTY, A. C.; POTESIO, R.; KREMER, K. Adaptive resolution simulation of a biomolecule and its hydration shell: Structural and dynamical properties. **The Journal of Chemical Physics**, v. 142, n. 19, p. 22–529, 2015.

FOUCAULT, G. et al. Comparative study of some conformational properties of α , β and Ψ bovine trypsins. **Biochimie**, v. 56, n. 10, p. 1343–1350, 1974.

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

GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: **The proteomics protocols handbook**. [s.l.: s.n.]. p. 571–607.

GHISAIDOOBE, A. B. T.; CHUNG, S. J. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: A focus on Förster resonance energy transfer techniques. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 22518–22538, 2014.

GORAI, S. **Preferential solvation of p-nitroaniline in alcohol-dioxan binary solvent mixture**. [s.l.] National Institute of Technology, 2010.

GORMAN, L. A. S.; DORDICK, J. S. Organic solvents strip water off enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, p. 392–397, 20 fev. 1992.

GRIEBENOW, K.; KLIBANOV, A. M. On protein denaturation in aqueous-organic mixtures but not in pure organic solvents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 47, p. 11695–11700, 1996.

GUINN, R. M.; BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. Effect of a water-miscible organic solvent on the kinetic and structural properties of trypsin. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n. 4, p. 320–326, 1991.

HAYNIE, D. T. **Biological Thermodynamic**. Second Ed. ed. New York: Cambridge University Press, 2008.

HAZAN, M. Proteolytic enzymes in podiatry. **Journal of the American Podiatry Association**, v. 50, p. 207–208, 1960.

HELLMANN, N.; SCHNEIDER, D. Hands On: Using tryptophan fluorescence spectroscopy to study protein structure. In: KISTER, A. E. (Ed.). **Protein Superscondary Structures**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2019. v. 1958p. 379–401.

HONG, D. P. et al. Clustering of fluorine-substituted alcohols as a factor responsible for their marked effects on proteins and peptides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 37, p. 8427–8433, 1999.

HUBER, R.; BODE, W. Structural basis of the activation and action of trypsin.

Accounts of Chemical Research, v. 11, n. 3, p. 114–122, mar. 1978.

ILLANES, A. et al. Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 48–57, 2012.

INNERFIELD, I.; ANGRIST, A.; SCHWARZ, A. Parenteral administration of trypsin. Clinical effect in 538 patients. **Journal of the American Medical Association**, v. 152, n. 7, p. 597–605, 13 jun. 1953.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1019–1032, 2008.

JOSHI, V. et al. Circular dichroism spectroscopy as a tool for monitoring aggregation in monoclonal antibody therapeutics. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 23, p. 11606–11613, 2014.

KAMATARI, Y. O. et al. The methanol-induced globular and expanded denatured states of cytochrome c: A study by CD fluorescence, NMR and small-angle X-ray scattering. **Journal of Molecular Biology**, v. 259, p. 512–523, 1996.

KAUL, P.; ASANO, Y. Strategies for discovery and improvement of enzyme function: State of the art and opportunities. **Microbial Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 18–33, 2012.

KEIL, B. Trypsin. In: BOYER, P. D. (Ed.). **The Enzymes**. 3rd ed, 3rd ed. New York and London: Elsevier B.V., 1971. p. 249–275.

KHMELNITSKY, Y. L. et al. Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 12, p. 710–724, 1988.

KHMELNITSKY, Y. L. et al. Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. **European Journal of Biochemistry**, v. 198, n. 1, p. 31–41, 1991.

KHURANA, R. et al. Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. **Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3525–3535, 2001.

KIPPEN, A. D.; SANCHO, J.; FERSHT, A. R. Folding of Barnase in Parts. **Biochemistry**, v. 33, n. 12, p. 3778–3786, 1994.

KLEIN, G. et al. Efficacy and tolerance of an oral enzyme combination in painful osteoarthritis of the hip. A double-blind, randomised study comparing oral enzymes with non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 24, n. 1, p. 25–30, 2006.

KLIBANOV, A. M. Enzymatic Catalysis in Anhydrous Organic-Solvents. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 14, p. 141–144, 1989.

KONY, D. B.; HÜNENBERGER, P. H.; VAN GUNSTEREN, W. F. Molecular dynamics simulations of the native and partially folded states of ubiquitin: Influence of methanol cosolvent, pH, and temperature on the protein structure and dynamics.

Protein Science, v. 16, n. 6, p. 1101–1118, jun. 2007.

KRAUT, J. Chymotrypsin-Chemical Properties and Catalysis. **Enzymes**, v. 3, n. C, p. 213–248, 1971.

KURTOVIC, I.; MARSHALL, S. N.; SIMPSON, B. K. Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric ceca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 143, n. 4, p. 432–440, 2006.

LAANE, C. et al. Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 81–87, 1987.

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**. Boston, MA: Springer US, 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.

LI, Q. et al. Commercial proteases: Present and future. **FEBS Letters**, v. 587, n. 8, p. 1155–1163, 2013.

LI, Y.; BARRON, A. R. **Dynamic light scattering** **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, 2014. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22099337>>

LI, Y.; OGUNNAIKE, B. A.; ROBERTS, C. J. Multi-variate approach to global protein aggregation behavior and kinetics: Effects of pH, NaCl, and temperature for α -chymotrypsinogen A. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 645–662, fev. 2010.

LONGWORTH, J. W. Intrinsic Fluorescence of Proteins. In: **Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy in Biochemistry and Biology**. Boston, MA: Springer US, 1983. p. 651–725.

LUETZ, S.; GIVER, L.; LALONDE, J. Engineered enzymes for chemical production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 647–653, 2008.

MACDONALD, R. J. et al. Primary Structure of Two Distinct Rat Pancreatic Preproelastases Determined by Sequence Analysis of the Complete Cloned Messenger Ribonucleic Acid Sequences. **Biochemistry**, v. 21, n. 6, p. 1453–1463, 1982.

MAKSIMOV, E. G. et al. Probing of carotenoid-tryptophan hydrogen bonding dynamics in the single-tryptophan photoactive Orange Carotenoid Protein. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.

MANHART, N. et al. Administration of proteolytic enzymes bromelain and trypsin diminish the number of CD4+ cells and the interferon-gama response in Peyer's

- patches and spleen in endotoxemic balb/c mice. **Cellular Immunology**, v. 215, n. 2, p. 113–119, 2002.
- MARES-GUIA, M.; FIGUEIREDO, A. F. S. Trypsin-Organic Solvent Interaction. The Simultaneous Operation of Competitive Inhibition and Dielectric Effect. **Biochemistry**, v. 11, n. 11, p. 2091–2099, 1972.
- MARES-GUIA, M.; SHAW, E.; COHEN, W. Studies on the active center of trypsin. Further characterization of the hydrophobic binding site. **Journal of Biological Chemistry**, v. 242, n. 23, p. 5777–5781, 1967.
- MARTINS, N. F. et al. The denaturation of α , β and Ψ bovine trypsin at pH 3.0: Evidence of intermediates. **Protein and Peptides Letters**, v. 10, n. 1, p. 73–81, 2003.
- MATSUBARA, T. et al. Stability of Protease in Organic Solvent: Structural Identification by Solid-State NMR of Lyophilized Papain Before and After 1-Propanol Treatment and the Corresponding Enzymatic Activities. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, n. 5, p. 928–933, 2006.
- MERGNY, J.-L.; LACROIX, L. Analysis of Thermal Melting Curves. **Oligonucleotides**, v. 13, p. 515–537, 2003.
- MICSONAI, A. et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 24, p. E3095–E3103, 16 jun. 2015.
- MIKES, O. et al. Covalent structure of bovine trypsinogen. The position of the remaining amides. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 24, n. 3, p. 346–352, 1966.
- MÖLLER, M.; DENICOLA, A. Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 30, n. 3, p. 175–178, 2002.
- MOMENI, L. et al. A molecular simulation and spectroscopic approach to the binding affinity between trypsin and 2-propanol and protein conformation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 477–485, 2018.
- MORRISON, I. D.; ROSS, S. **Colloidal dispersions: suspensions, emulsions, and foams**. New York: [s.n.].
- MOZHAEV, V. V. et al. Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/organic cosolvent mixtures. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 184, p. 597–602, 1989.
- NAKAI, S.; MODLER, H. W. **Food proteins: properties and characterization**. New York, NY, USA: John Wiley & Sons Inc., 1996.
- NASSER BRUMANO, M. H.; ROGANA, E.; SWAISGOOD, H. E. Thermodynamics of Unfolding of β -Trypsin at pH 2.8. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 382, n. 1, p. 57–62, 2000.
- NELSON, J. W.; KALLENBACH, N. R. Stabilization of the ribonuclease S \square peptide

α -helix by trifluoroethanol. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 1, n. 3, p. 211–217, 1986.

NELSON, J. W.; KALLENBACH, N. R. Persistence of the α -Helix Stop Signal in the S-Peptide in Trifluoroethanol Solutions. **Biochemistry**, v. 28, n. 12, p. 5256–5261, 1989.

NEMETHY, G.; PEER, W. J.; SCHERAGA, H. A. Effect of Protein-Solvent Interactions on Protein Conformation. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 10, n. 1, p. 459–497, jun. 1981.

PACE, C. N.; SHIRLEY, B. A.; THOMSON, J. A. Measuring the conformational stability of a protein. In: **Protein structure: A practical approach**. New York: Oxford University Press, 1989. p. 311–330.

PARK, C.; MARQUSEE, S. Analysis of the stability of multimeric proteins by effective ΔG and effective m -values. **Protein Science**, v. 13, n. 9, p. 2553–2558, 2004.

PATEL, S.; GORAI, S.; MALIK, P. K. Preferential solvation through selective functional group recognition in p-nitroaniline. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 219, n. 1, p. 76–83, 2011.

PRIVALOV, P. L. Stability of Proteins Small Globular Proteins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 33, n. C, p. 167–241, 1979.

PRIVALOV, P. L. **Microcalorimetry of Macromolecules**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012.

PRIVALOV, P. L.; POTEKHIN, S. A. [2]Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.: s.n.]. v. 131p. 4–51.

RAMPRAKASH, J. et al. Comparison of the chemical and thermal denaturation of proteins by a two-state transition model. **Analytical Biochemistry**, v. 374, n. 1, p. 221–230, 2008.

RESHETNYAK, Y. K.; BURSTEIN, E. A. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. II. The statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 3, p. 1710–1734, 2001.

ROBINSON, N. C.; NEURATH, H.; WALSH, K. A. Relation of the α -amino group of trypsin to enzyme function and zymogen activation. **Biochemistry**, v. 12, n. 3, p. 420–426, 1973.

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. et al. Evaluation of biological activities, structural and conformational properties of bovine beta- and alpha-trypsin isoforms in aqueous-organic media. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 176, p. 291–303, 2021.

ROSS, J. B. A.; SZABO, A. G.; HOGUE, C. W. V. Enhancement of protein spectra with tryptophan analogs: Fluorescence spectroscopy of protein-protein and protein-nucleic acid interactions. **Methods in Enzymology**, v. 278, p. 151–190, 1997.

RUSS LEHRMAN, S.; TULS, J. L.; LUND, M. Peptide α -Helicity in Aqueous Trifluoroethanol: Correlations with Predicted α -Helicity and the Secondary Structure of the Corresponding Regions of Bovine Growth Hormone. **Biochemistry**, v. 29, n. 23, p. 5590–5596, 1990.

SAMPAIO, B. S. **Avaliação do impacto no resultado das medições de volume pela alteração de parâmetros da norma ISO 8655**. [s.l.] Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 2014.

SANTORO, M. M.; BOLEN, D. W. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. **Biochemistry**, v. 27, p. 8063–8068, 1988.

SANTORO, M. M.; BOLEN, D. W. A test of the linear extrapolation of unfolding free energy changes over an extended denaturant concentration range. **Biochemistry**, v. 31, p. 4901–4907, 1992.

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

SANTOS, A. M. C. et al. Improved purification process of β - and α -trypsin isoforms by ion-exchange chromatography. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 4, p. 511–521, ago. 2008b.

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**. [s.l: s.n.].

SCHELLMAN, J. A. Protein stability in mixed solvents: A balance of contact interaction and excluded volume. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 1, p. 108–125, 1 jul. 2003.

SCHIFFER, C. A.; DÖTSCH, V. The role of protein-solvent interactions in protein unfolding. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 428–432, 1996.

SCHMID, A. et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 258–268, 2001.

SCHROEDER, D. D.; SHAW, E. Chromatography of trypsin and its derivatives: Characterization of a new active form of bovine trypsin. **The Journal of biological chemistry**, v. 243, n. 11, p. 2943–2949, 10 jun. 1968.

SEGAWA, S. et al. Local structures in unfolded lysozyme and correlation with secondary structures in the native conformation: Helix-forming or -breaking propensity of peptide segments. **Biopolymers**, v. 31, n. 5, p. 497–509, 1991.

SHAHIDI, F.; JANAK KAMIL, Y. V. . Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12,

n. 12, p. 435–464, dez. 2001.

SHAW, K. L. et al. **Protein Structure, Stability, and Interactions**. Totowa, NJ: Human Press, 2009. v. 490

SHERRY, S.; FLETCHER, A. Proteolytic enzymes: a therapeutic evaluation. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 1, n. 2, p. 202–226, 1960.

SHOTTON, D. M. [7] Elastase. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Academic Press, 1970. v. 19p. 113–140.

SIMON, L. M. et al. Structure and Activity of α -Chymotrypsin and Trypsin in Aqueous Organic Media. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, n. 5, p. 1367–1371, fev. 2001.

SINDREWICZ, P. et al. Intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy reliably determines galectin-ligand interactions. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 11851, 14 dez. 2019.

SMITH & SHAW. Pseudotrypsin: a modified bovine trypsin produced by limited autodigestion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 17, p. 4704–4712, 1969.

STEPANKOVA, V. et al. Strategies for Stabilization of Enzymes in Organic Solvents. **ACS Catalysis**, v. 3, n. 12, p. 2823–2836, 6 dez. 2013.

STOYTICHEVA, M. et al. High sensitive trypsin activity evaluation applying a nanostructured QCM-sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 862–866, mar. 2013.

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

SZABÓ, Z. et al. An FT-IR Study of the β -Amyloid Conformation: Standardization of Aggregation Grade. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 265, n. 2, p. 297–300, nov. 1999.

THOLSTRUP SEJERSEN, M. et al. Zeta potential of pectin-stabilised casein aggregates in acidified milk drinks. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 4, p. 302–307, abr. 2007.

VALIVETY, R. H.; HALLING, P. J.; MACRAE, A. R. Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1118, n. 3, p. 218–222, 1992a.

VALIVETY, R. H.; HALLING, P. J.; MACRAE, A. R. Rhizomucor miehei lipase remains highly active at water activity below 0.0001. **FEBS Letters**, v. 301, n. 3, p. 258–260, 1992b.

VIANA, P. A. et al. Spectroscopic and thermodynamic properties of Debaryomyces hansenii UFV-1 α -galactosidases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 3, p. 298–303, 2010.

VIVIAN, J. T.; CALLIS, P. R. Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in

Proteins. **Biophysical Journal**, v. 80, p. 2093–2109, maio 2001.

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

WALSH, K. A.; WILCOX, P. E. Serine Proteases. **Methods in Enzymology**, v. 19, p. 31–41, 1970.

WALSH, K. A.; NEURATH, H. Trypsinogen and Chymotrypsinogen As Homologous Proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 52, p. 884–889, 1964.

WANG, S. et al. Enzyme Stability and Activity in Non-Aqueous Reaction Systems: A Mini Review. **Catalysts**, v. 6, n. 2, p. 32, 22 fev. 2016.

WANG, W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, n. 1–2, p. 1–30, 2005.

WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Reaction Kinetics of Immobilized α -Chymotrypsin in Organic Media 1. Influence at solvent polarity. **Biocatalysis**, v. 7, p. 149–161, 1993.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392–400, 2008.

YANG, H. et al. **Intrinsic fluorescence spectra of tryptophan, tyrosine and phenylalanine**. (Y. Lv et al., Eds.) Selected Papers of the Chinese Society for Optical Engineering Conferences held October and November 2016. **Anais...** 8 mar. 2017 Disponível em:
<<http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.2268397>>

YU, Y. et al. The effects of organic solvents on the folding pathway and associated thermodynamics of proteins: A microscopic view. **Scientific Reports**, v. 6, n. September 2015, p. 1–12, 2016.

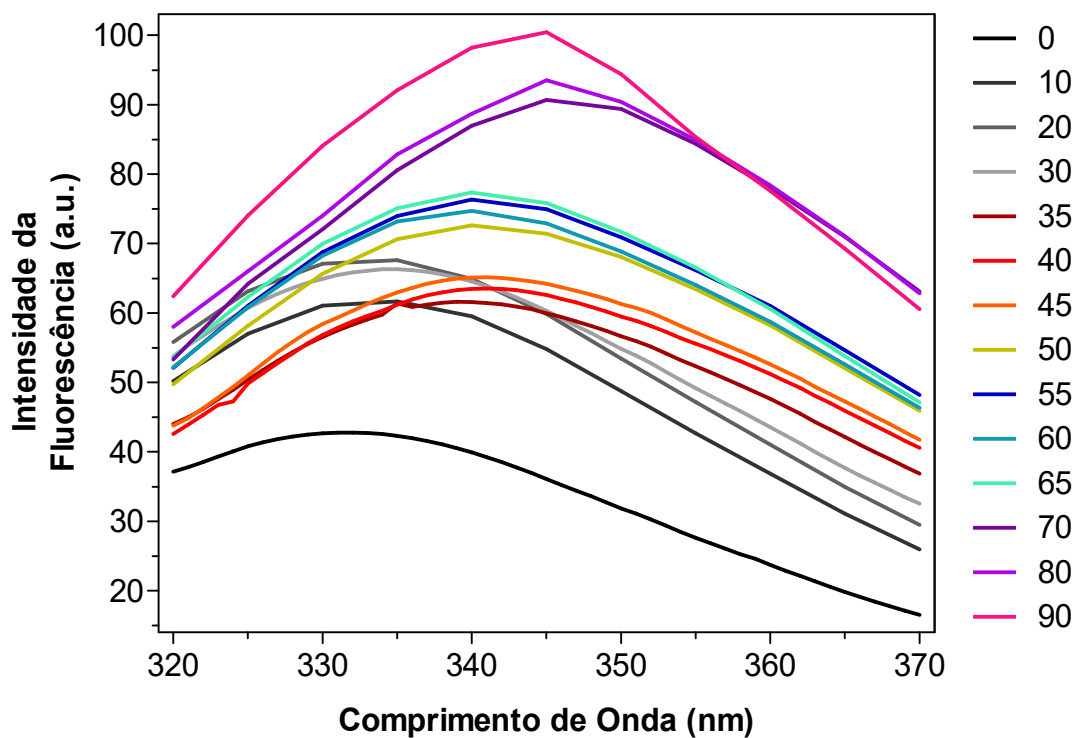
ZAJICEK, J. L.; CARTER, R. M.; GHIRON, C. A. A spectroscopic analysis of the thermally induced folding-unfolding transition of beta-trypsin. **Biophysical journal**, v. 35, p. 23–30, 1981.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 17, p. 8017–8021, 1988a.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 7, p. 3194–3201, 1988b.

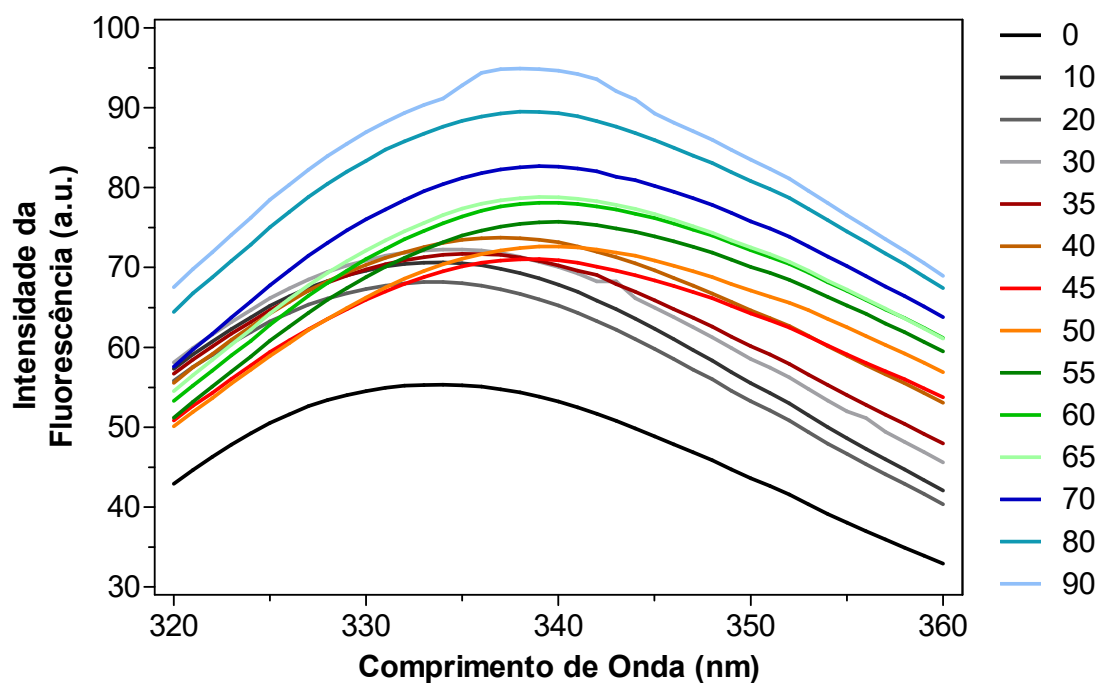
9 - APÊNDICE

APÊNDICE A - Curvas de emissão de fluorescência da isoforma β -tripsina em diferentes concentrações de etanol.



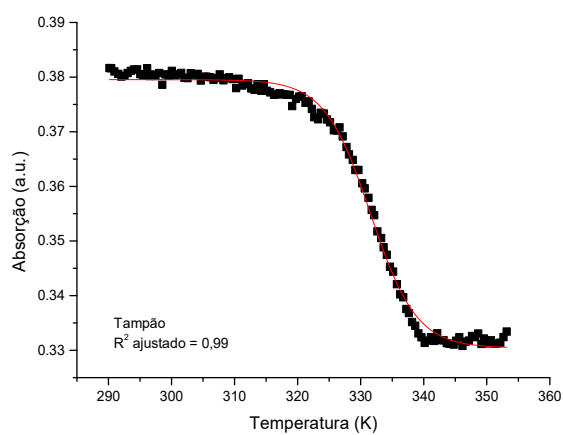
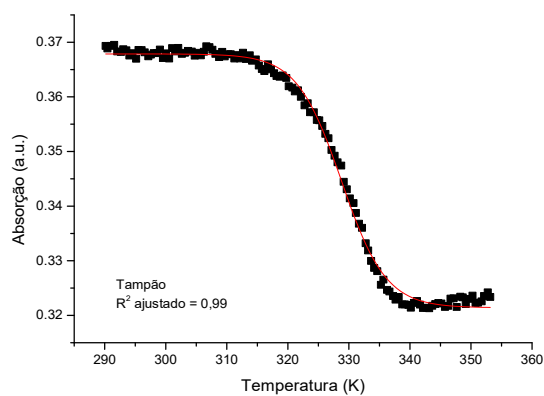
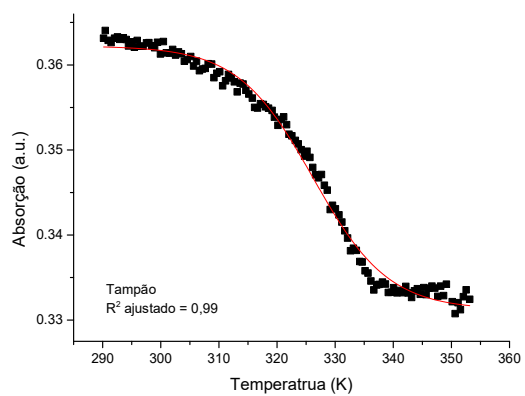
O comprimento de onda máximo é retirado a partir da análise de segunda derivada dessas curvas e é plotado em função da respectiva concentração de solvente, fornecendo curvas do tipo sigmoidal (**Figura 15**).

APÊNDICE B - Curvas de emissão de fluorescência da isoforma α -tripsina em diferentes concentrações de etanol.



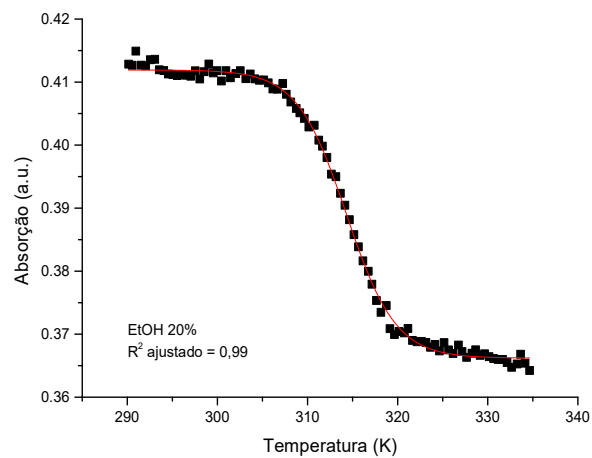
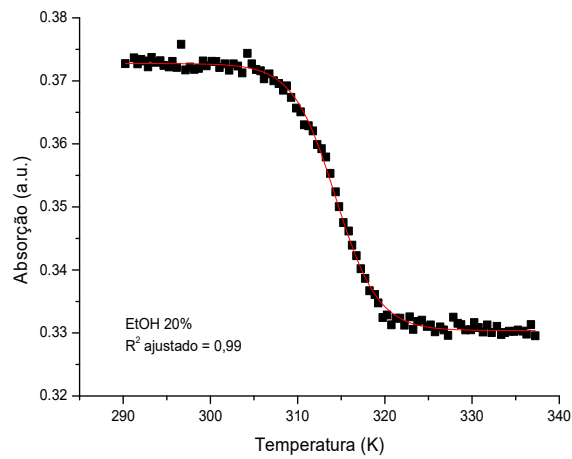
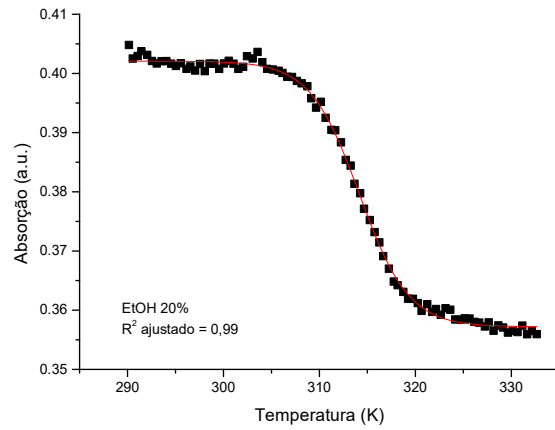
O comprimento de onda máximo é retirado a partir da análise de segunda derivada dessas curvas e é plotado em função da respectiva concentração de solvente, fornecendo curvas do tipo sigmoidal (**Figura 15**).

APÊNDICE C - Curvas de desenovelamento térmico da isoforma α -tripsina em tampão.



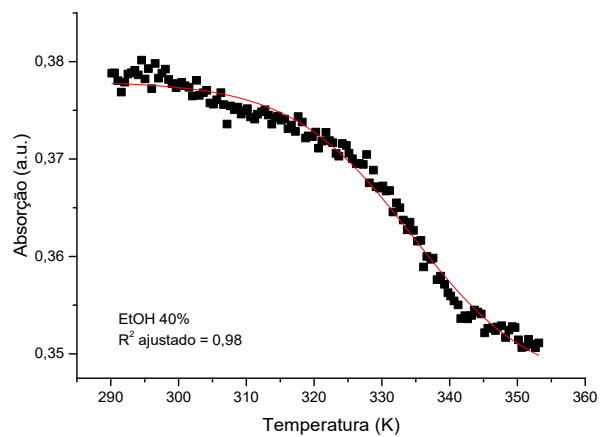
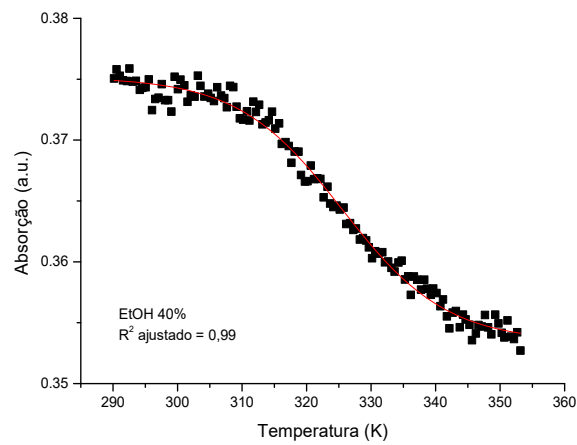
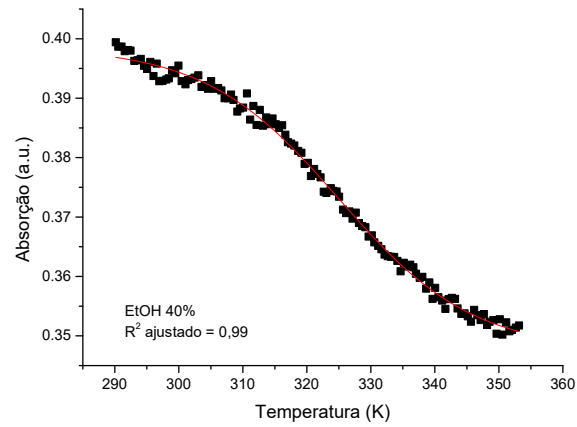
Obs: Os pontos pretos representam a leitura de absorbância e a linha vermelha representa o ajuste não-linear de Boltzmann.

APÊNDICE D - Curvas de desenovelamento térmico da isoforma α -tripsina em etanol 20% (v/v).



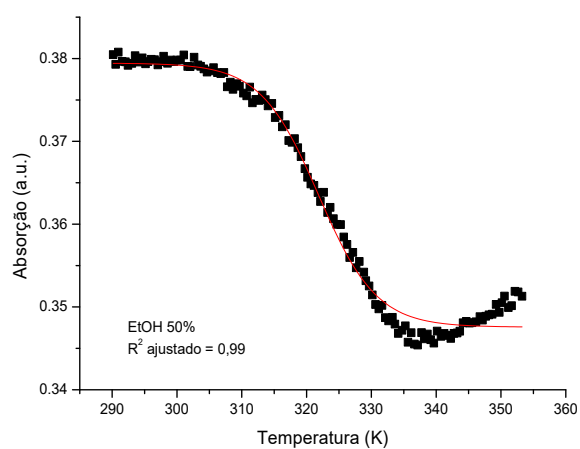
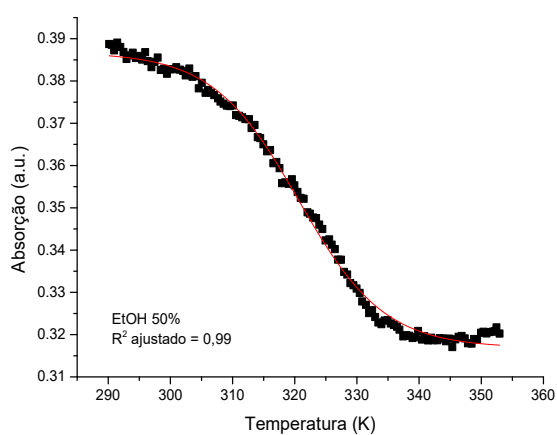
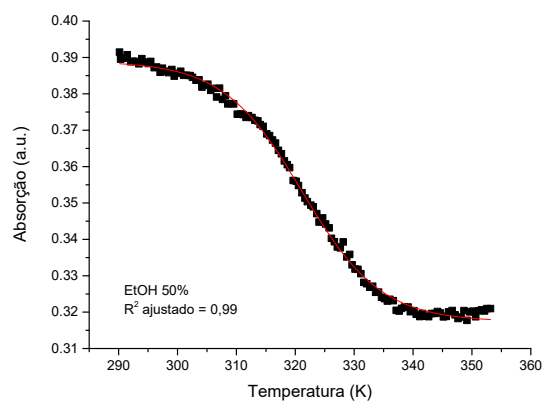
Obs: Os pontos pretos representam a leitura de absorbância e a linha vermelha representa o ajuste não-linear de Boltzmann.

APÊNDICE E - Curvas de desenovelamento térmico da isoforma α -tripsina em etanol 40% (v/v).



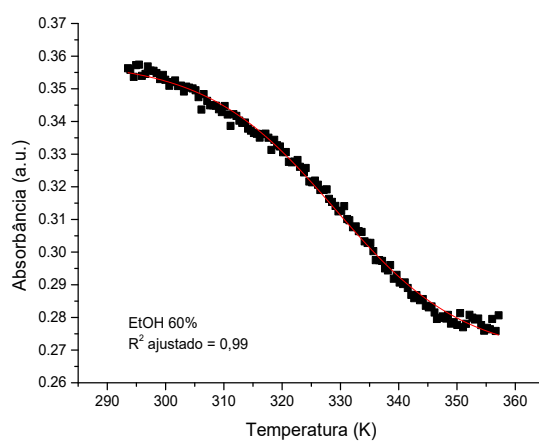
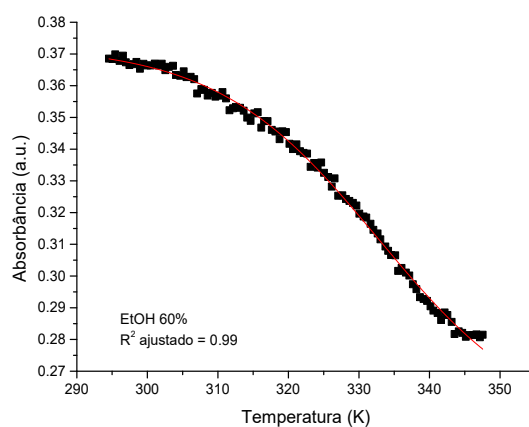
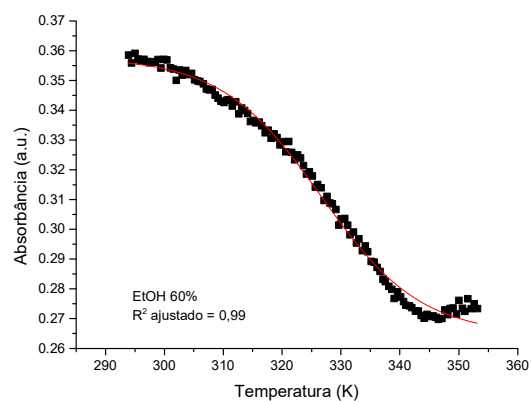
Obs: Os pontos pretos representam a leitura de absorbância e a linha vermelha representa o ajuste não-linear de Boltzmann.

APÊNDICE F - Curvas de desenovelamento térmico da isoforma α -tripsina em etanol 50% (v/v).



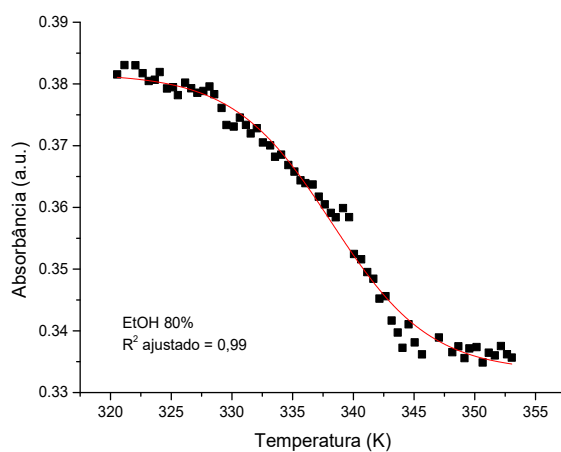
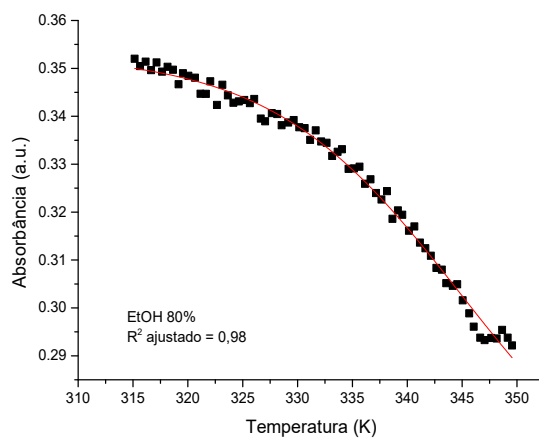
Obs: Os pontos pretos representam a leitura de absorbância e a linha vermelha representa o ajuste não-linear de Boltzmann.

APÊNDICE G - Curvas de desenovelamento térmico da isoforma α -tripsina em etanol 60% (v/v).



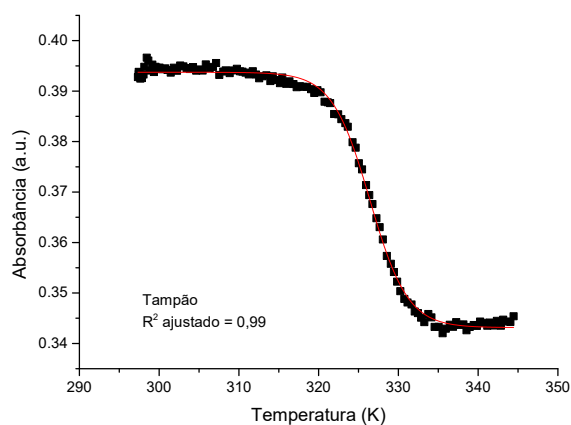
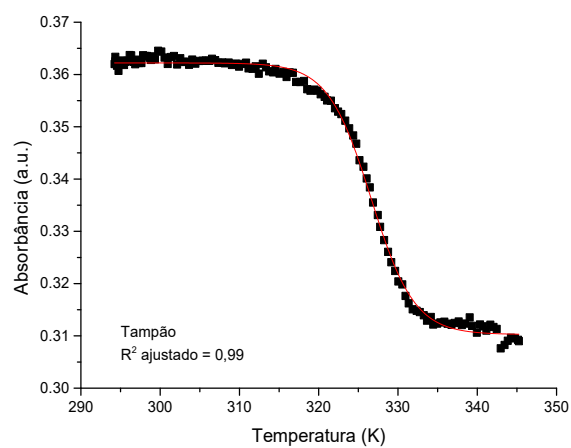
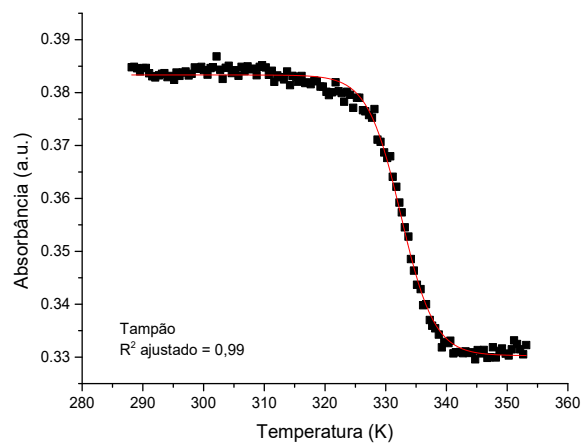
Obs.: Os pontos pretos representam a leitura de absorbância e a linha vermelha representa o ajuste não-linear de Boltzmann.

APÊNDICE H - Curvas de desenovelamento térmico da isoforma α -tripsina em etanol 80% (v/v).



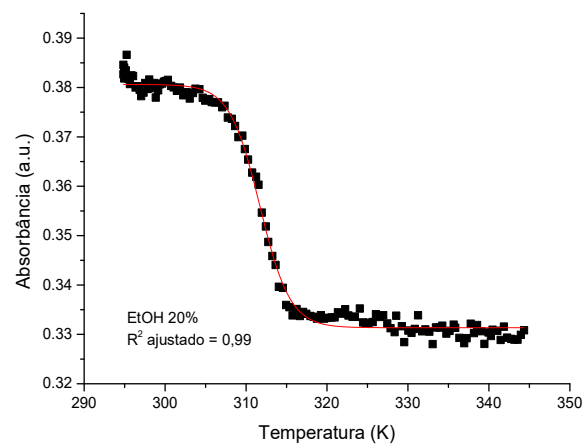
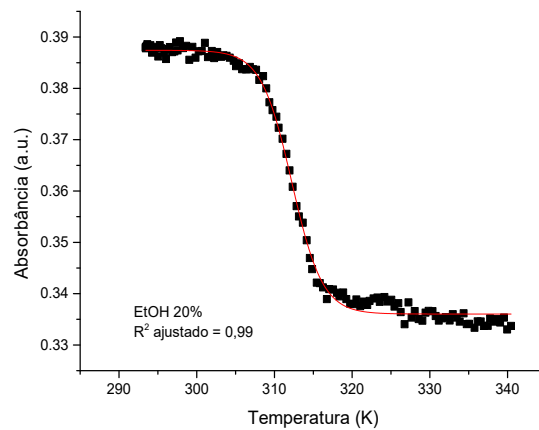
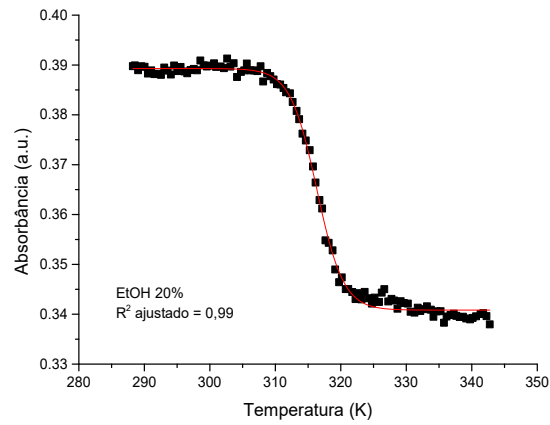
Obs: Os pontos pretos representam a leitura de absorbância e a linha vermelha representa o ajuste não-linear de Boltzmann.

APÊNDICE I - Curvas de desenovelamento térmico da isoforma β -tripsina em tampão.



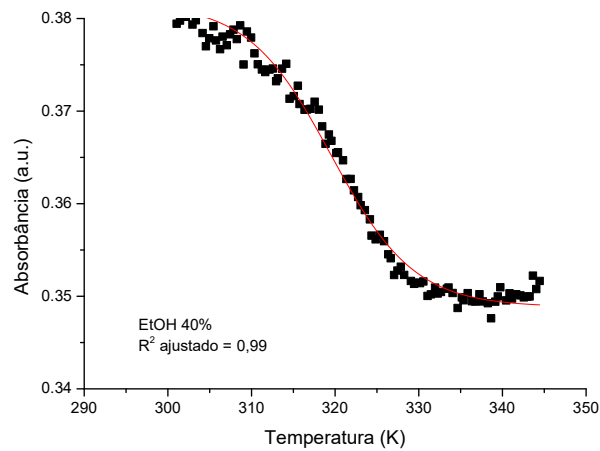
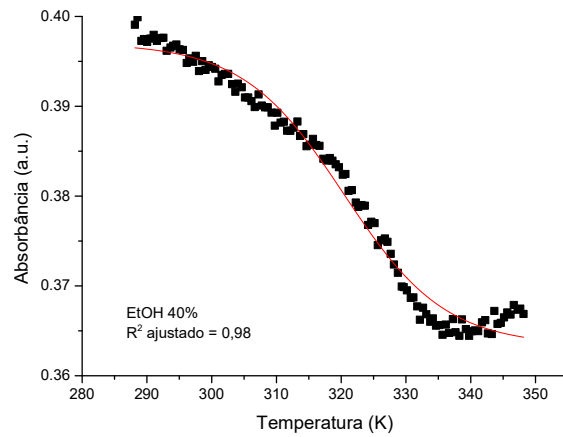
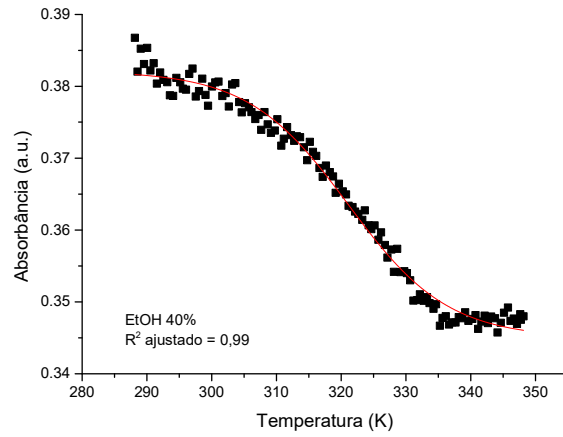
Obs.: Os pontos pretos representam a leitura de absorbância e a linha vermelha representa o ajuste não-linear de Boltzmann.

APÊNDICE J - Curvas de desenovelamento térmico da isoforma β -tripsina em etanol 20% (v/v).



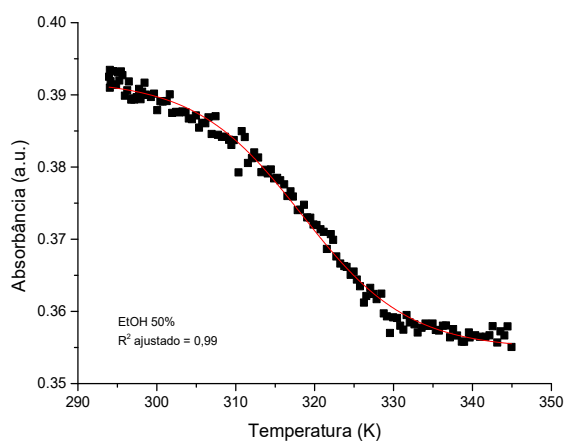
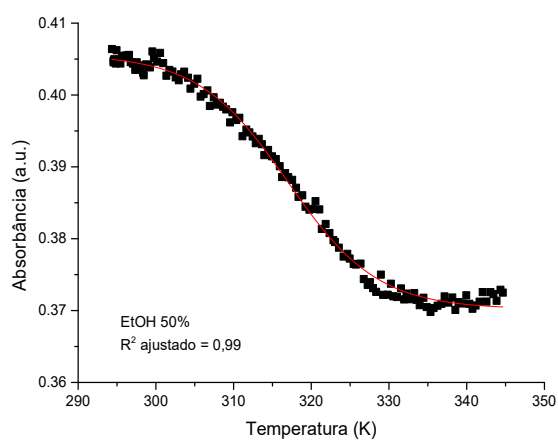
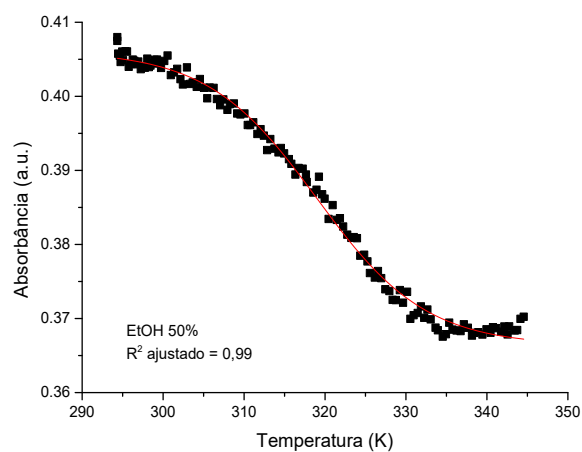
Obs.: Os pontos pretos representam a leitura de absorbância e a linha vermelha representa o ajuste não-linear de Boltzmann.

APÊNDICE K - Curvas de desenovelamento térmico da isoforma β -tripsina em etanol 40% (v/v).



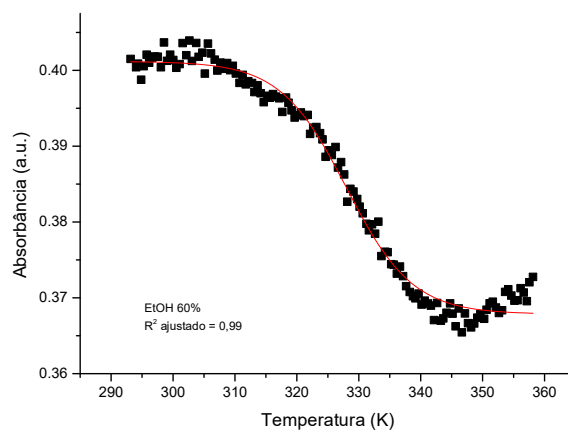
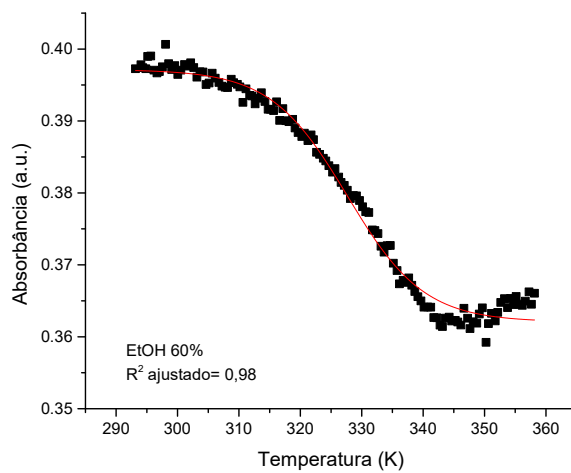
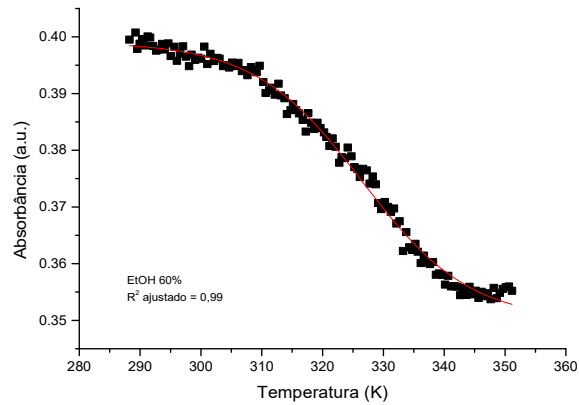
Obs.: Os pontos pretos representam a leitura de absorbância e a linha vermelha representa o ajuste não-linear de Boltzmann.

APÊNDICE L - Curvas de desenovelamento térmico da isoforma β -tripsina em etanol 50% (v/v).



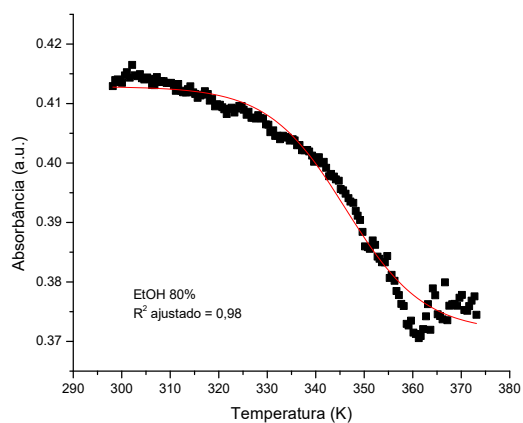
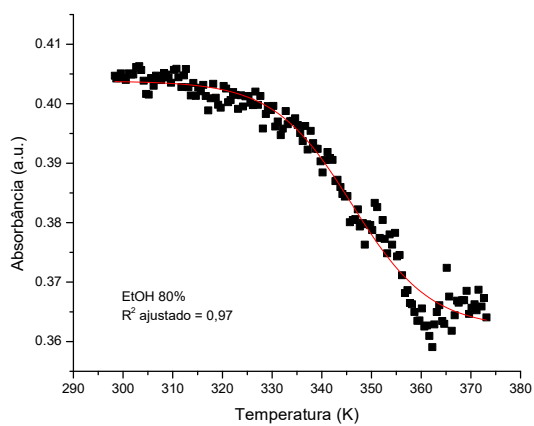
Obs.: Os pontos pretos representam a leitura de absorbância e a linha vermelha representa o ajuste não-linear de Boltzmann.

APÊNDICE M - Curvas de desenovelamento térmico da isoforma β -tripsina em etanol 60% (v/v).



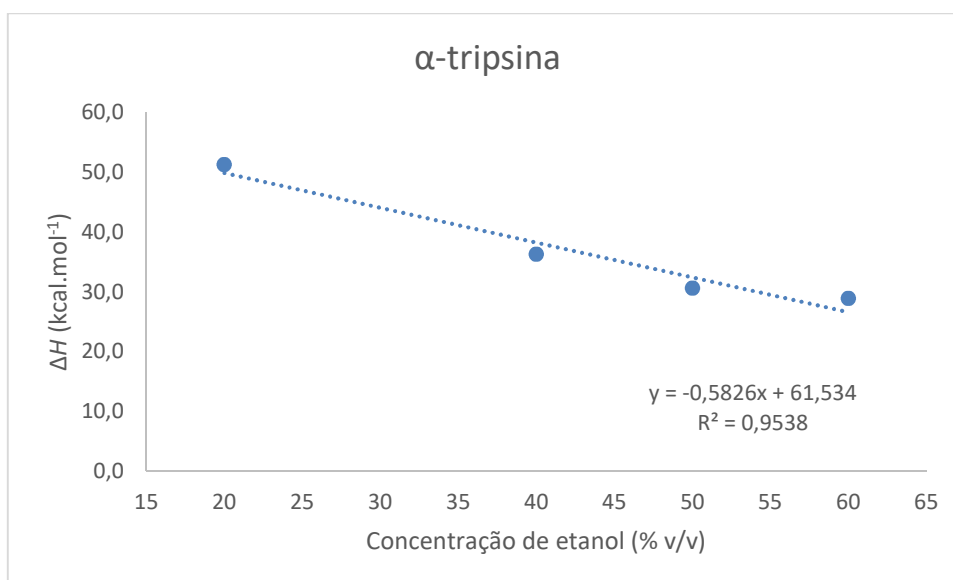
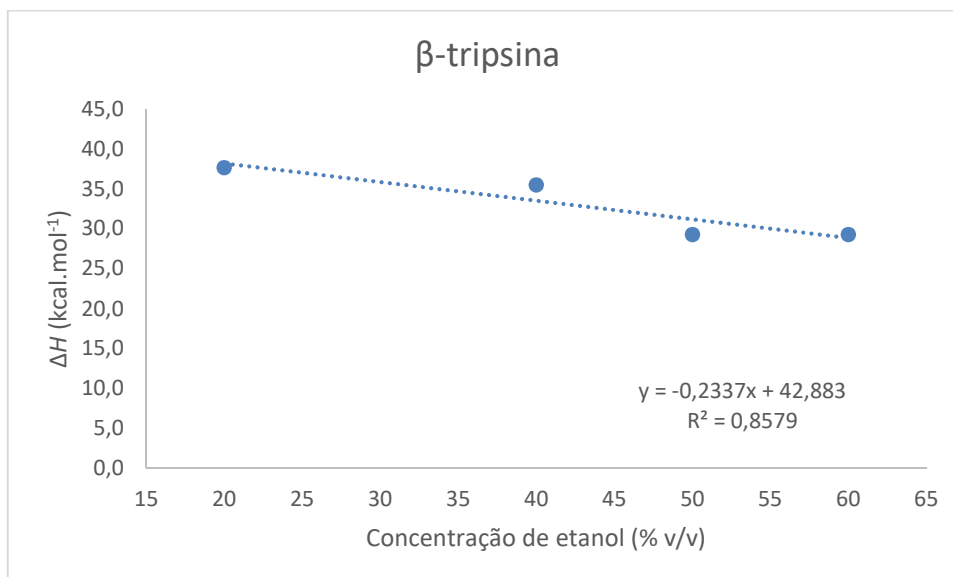
Obs.: Os pontos pretos representam a leitura de absorbância e a linha vermelha representa o ajuste não-linear de Boltzmann.

APÊNDICE N - Curvas de desenovelamento térmico da isoforma β -tripsina em etanol 80% (v/v).

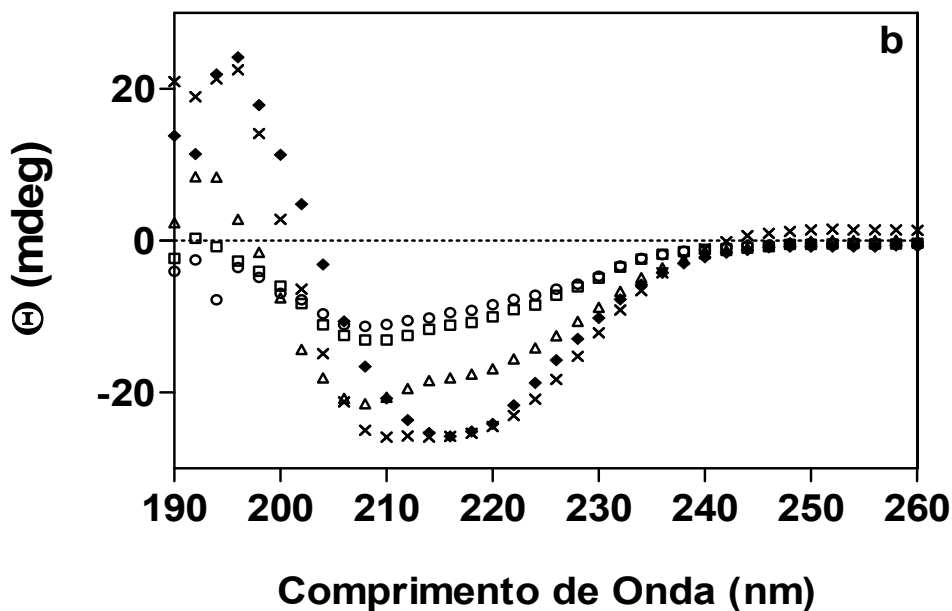
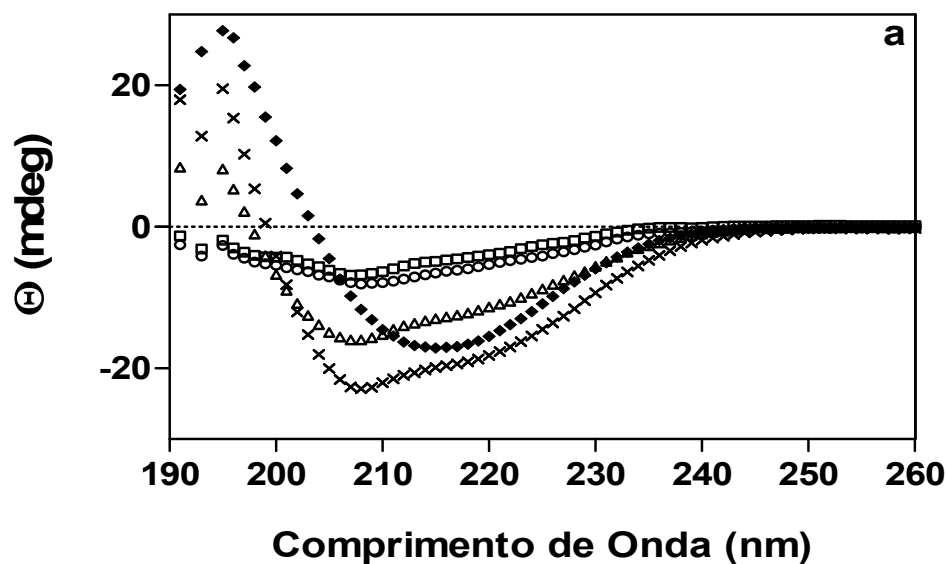


Obs.: Os pontos pretos representam a leitura de absorbância e a linha vermelha representa o ajuste não-linear de Boltzmann.

APÊNDICE O - Quantificação da inclinação das linhas de tendências ΔH obtidas pela desnaturação induzida por temperatura (dados registrados no item 5.9.1).

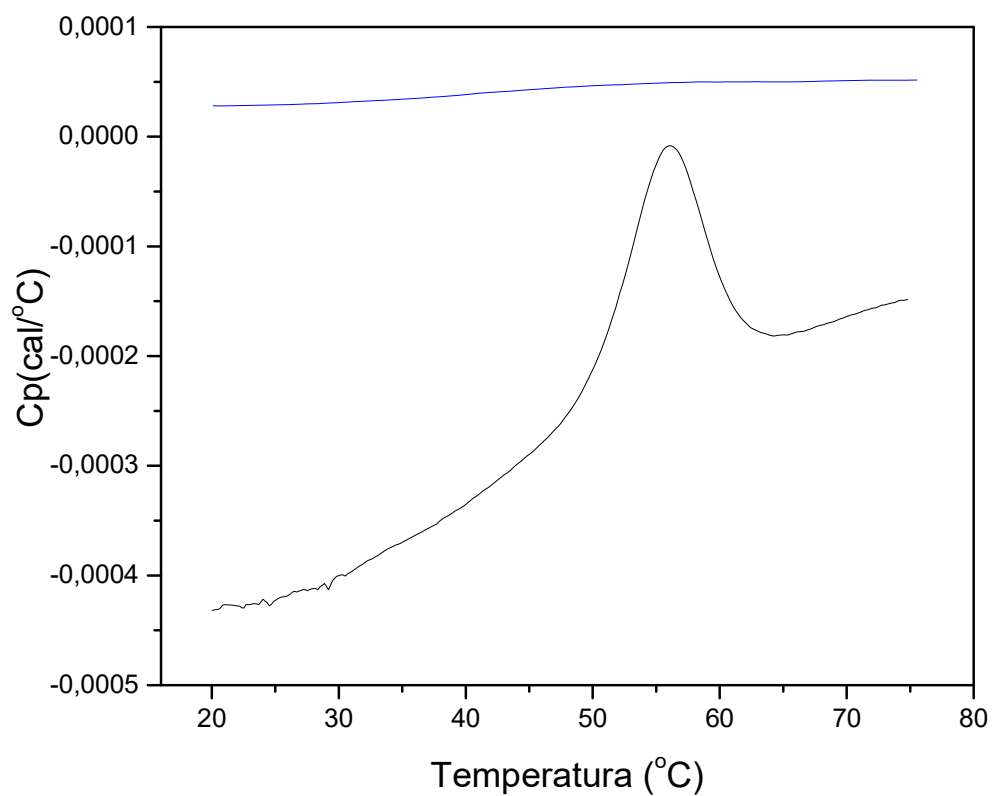


APÊNDICE P - Espectros de CD das isoformas (a) β -tripsina e (b) α -tripsina.



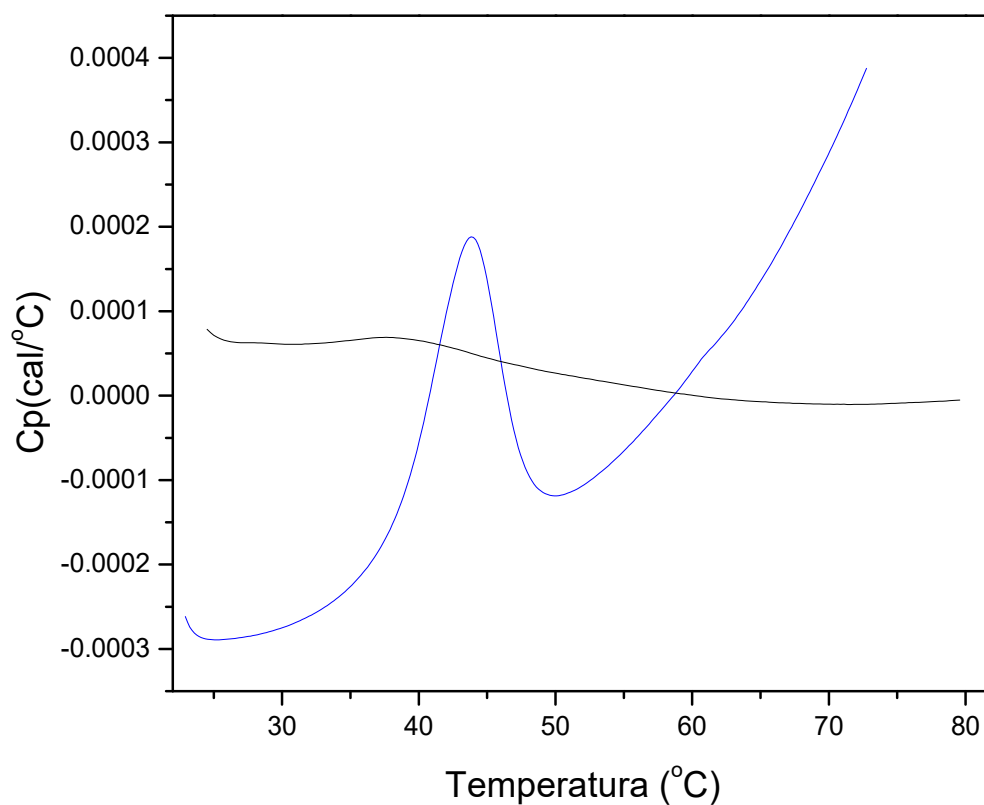
Legenda: (\circ) 0% (v/v); (\square) 20% (v/v); (Δ) concentração de etanol correspondente ao C_m^{conf} (35% para β -tripsina e 40% para α -tripsina); (\times) correspondente ao C_m^{er} (50% para β -tripsina e 60% para α -tripsina) e (\blacklozenge) 80% (v/v). Figura (b) retirada de ROSA et al., 2017. Esses dados foram submetidos ao banco de dados do Dichroweb® para estimativa do conteúdo de estruturas secundárias apresentadas na Figura 16.

APÊNDICE Q - Perfil característico de desnaturação térmica de proteínas obtido por DSC



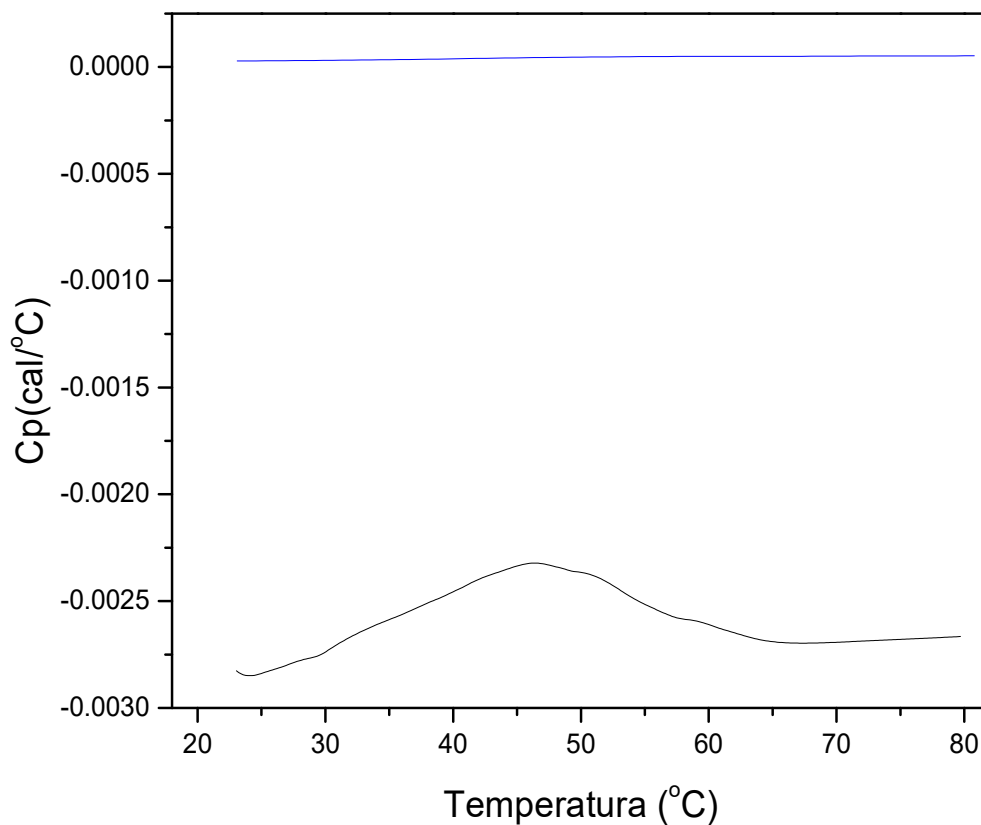
Obs.: Amostra β -tripsina $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão glicina 50 mmol.L^{-1} pH 3,0, contendo CaCl_2 a 20 mmol.L^{-1} . Velocidade de varredura ajustada para 60 K.h^{-1} . A linha preta refere-se à β -tripsina e a linha azul refere-se à linha de base. Descontando-se a linha de base da curva de desenovelamento, obteve-se o resultado mostrado na Figura 20.

APÊNDICE R - Perfil de desnaturação térmica da β -tripsina na presença de etanol 20% (v/v) em DSC.



Obs.: Amostra preparada a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão glicina 50 mmol.L^{-1} pH 3,0, contendo CaCl_2 a 20 mmol.L^{-1} em mistura ao etanol. Velocidade de varredura ajustada para 60 K.h^{-1} . A linha preta refere-se à β -tripsina e a linha azul refere-se à linha de base. Descontando-se a linha de base da curva de desenovelamento, obteve-se o resultado mostrado na Figura 21.

APÊNDICE S - Perfil de desnaturação térmica da β -tripsina na presença de etanol 50% (v/v) em DSC.



Obs.: Amostra preparada a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão glicina 50 mmol.L^{-1} pH 3,0, contendo CaCl_2 a 20 mmol.L^{-1} em mistura ao etanol. Velocidade de varredura ajustada para 60 K.h^{-1} . A linha preta refere-se à β -tripsina e a linha azul refere-se à linha de base. Descontando-se a linha de base da curva de desenvolvimento, obteve-se o resultado mostrado na Figura 22.