

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CÍNTIA TIEMI MISUGI

**EFEITOS DO CONGELAMENTO E DE CRIOPROTETORES NA
INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNA MODELO GINK E ATP POR
CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA**

CURITIBA

2014

CÍNTIA TIEMI MISUGI

EFEITOS DO CONGELAMENTO E DE CRIOPROTETORES NA
INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNA MODELO GINK E ATP POR
CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos, no curso de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério Mafra

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Maria Lúcia Masson

CURITIBA

2014

Ao meu pai Paulo, à minha mãe Dirce e ao meu irmão Rodrigo por estarem sempre presentes me apoiando e torcendo por mim. Vocês tem todo o meu amor, respeito e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pela pessoa que sou hoje, vocês são meus bens mais preciosos. Ao meu querido pai Paulo Misugi, fonte de orgulho, admiração e exemplo de responsabilidade e competência. À minha querida mãe Dirce Misugi, amiga, fonte de carinho e incentivo eternos. E ao meu irmão Rodrigo Misugi pelo carinho e companheirismo.

Aos meus orientadores Dr. Marcos Rogério Mafra e Dr.^a Maria Lúcia Masson pela paciência, orientação e dedicação durante todo o trabalho e por todos os conhecimentos transmitidos.

À banca examinadora, Dr. Everson Miranda, Dr.^a Isabel Miyata e Dr. Marco Oliveira pelas observações e sugestões que contribuíram com o trabalho.

Às amigas, Caroline, Laís e Lizandra, pelo companheirismo e amizade durante todas as horas. Podem contar comigo sempre mocinhas!

Às Técnicas do Laboratório de Análises Térmicas, Andrea e Patrícia, pela paciência, atenção e dedicação durante todo o período do trabalho.

Aos amigos do LATOS, Anderson, Danielle, Elaine, Érika, João, Giovanna, Heron, Thiago e Sheila, por todo apoio, amizade e companheirismo. Sou uma pessoa muito sortuda por ter conhecido e ainda poder conviver com pessoas tão boas e especiais como vocês!

Aos amigos e colegas do mestrado pelos momentos de descontração nas horas vagas e pelas trocas de conhecimento e auxílio.

Ao Alexandre pelo carinho e apoio.

Ao Laboratório de Fixação de Nitrogênio - Bioquímica e ao professor Dr. Marco Aurélio, pelo tempo e atenção dedicados, pelo auxílio nas análises e pelas valiosas informações.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Paulo Krainski, pela paciência, exemplo de eficiência e auxílio durante o mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realização deste

trabalho, pela disponibilização dos recursos físicos e financeiros. E, em especial à todos os professores do programa.

A CAPES por conceder a bolsa de mestrado.

A todos que de alguma maneira colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O congelamento é uma técnica de conservação empregada em alimentos. Este processo tem como finalidade a redução da velocidade de reações bioquímicas, microbiológicas e de oxidação nos produtos. Os efeitos negativos desta técnica estão relacionados às modificações nas propriedades sensoriais e de textura dos alimentos, como consequência da formação de cristais de água (gelo). Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de ciclos de congelamento e dos crioprotetores ácido lactobiônico (ALB) e glicerol na estrutura da proteína GlnK por meio da sua interação com a adenosina trifosfato (ATP) avaliado por calorimetria de titulação isotérmica (ITC). A GlnK de *Herbaspirillum seropedicae*, foi purificada por cromatografia FPLC e quantificada por espectrofotometria. O processo de purificação da GlnK se mostrou adequado para as análises de ITC. Os ensaios de ITC revelaram que o congelamento alterou a interação entre as amostras de proteína e o ATP, o que pôde ser observado devido alterações na entalpia de interação e na saturação. O glicerol 10% não apresentou atividade crioprotetora, diferente do observado para amostras com ALB. Nas amostras com ALB não foram observadas alterações nas entalpias de interação e na saturação dos sistemas GlnK-ATP decorrentes dos ciclos de congelamento. Portanto, este trabalho comprova a adequação da calorimetria de titulação isotérmica (ITC) na avaliação dos danos estruturais de sistema proteico submetidos ao congelamento, bem como demonstrou o efeito crioprotetor do ALB, como descrito na literatura.

Palavras-chave: Soluções proteicas, Ciclos de congelamento, Interação Molecular, Termodinâmica.

ABSTRACT

Freezing is a common technique used in food preservation. This process aims to reduce the biochemical, microbiological and oxidation reactions rate in the products. The negative effects of this technique are related to changes in sensory and textural properties of foods, as a consequence of water crystal formation (ice). This study aimed to evaluate the effects of freezing process and of the cryoprotectants lactobionic acid (ALB) and glycerol on the structure of the GlnK protein through its interaction with the ATP by isothermal titration calorimetry (ITC). The GlnK from *Herbaspirillum seropedicae* was purified by FPLC chromatography and quantified by spectrophotometry. The purification process of GlnK was adequate for the analysis of ITC. ITC assays revealed that freezing modified the interactions between protein samples and ATP, which was observed in changes in interaction enthalpy and saturation. Glycerol 10% presented no cryoprotective activity, different from observed for samples with ALB. ALB samples presented no changes in interaction enthalpy and saturation of GlnK-ATP systems subjected to freezing cycles. Therefore, this paper proves the suitability of isothermal titration calorimetry (ITC) in the assessment of structural damage in protein systems subjected to freezing and showed the effect of ALB as a cryoprotectant, as indicated in the literature.

Key-words: Protein Solutions, Freezing Cycles, Molecular Interaction, Thermodynamics.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Objetivo Geral	19
1.2	Objetivos Específicos.....	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	Preservação de produtos alimentícios	20
2.1.1	Fundamentos do congelamento e sua importância na preservação de alimentos.....	21
2.1.2	Efeitos do congelamento em sistemas proteicos.....	24
2.2	Aditivos alimentares	27
2.2.1	A importância das substâncias crioprotetoras encontradas na natureza	28
2.2.2	Propriedades e importância do aditivo alimentar ácido lactobiónico (ALB)	29
2.2.3	Atividade crioprotetora do aditivo glicerol	33
2.3	Proteínas	34
2.3.1	Estrutura química, propriedades e importância das proteínas.....	35
2.3.2	Proteína GlnK: Estrutura, importância e a interação GlnK-ATP.....	37
2.4	Análises térmicas	42
2.4.1	Técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	43
2.5	Considerações finais da Revisão da Literatura	50
3	MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1	Materiais e equipamentos	51
3.2	Métodos	52
3.2.1	Purificação da proteína GlnK de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	52
3.2.2	Eletroforese de proteína em gel desnaturante Tris-Glicina.....	54
3.2.3	Quantificação de proteínas	55

3.2.4	Procedimento de diálise das soluções contendo GlnK para análises de ITC	55
3.2.5	Interação entre a proteína GlnK e o ATP avaliado por ITC.....	56
3.2.6	Congelamento e descongelamento das soluções proteicas de GlnK	57
3.2.7	Adição de crioprotetores nas interações moleculares de complexos formados por GlnK e ATP (ITC)	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1	Purificação da proteína GlnK da <i>Herbaspirillum seropedicae</i> por FPLC.....	58
4.2	Eletroforese das frações de GlnK obtidas no processo de purificação e quantificação da GlnK por espectrofotometria	60
4.3	Avaliação da interação entre GlnK-ATP (ITC)	62
4.3.1	Interação molecular entre a proteína GlnK e o ATP por ITC	63
4.3.2	Efeito do congelamento na interação entre GlnK e ATP avaliado por ITC	66
4.3.3	Efeito dos aditivos ALB e glicerol na estrutura da proteína GlnK submetida à ciclos de congelamento avaliada por ITC	68
5	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DESCRIÇÃO DA CRISTALIZAÇÃO DE UM PRODUTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS. A: CRISTALIZAÇÃO À -5 °C, OS CRISTAIS DE ÁGUA FORMADOS SÃO MAIORES E EM MENOR QUANTIDADE. B: CRISTALIZAÇÃO À -15 °C, OS CRISTAIS DE ÁGUA SÃO MENORES E EM MAIOR QUANTIDADE.....	22
FIGURA 2 - RESULTADO DAS ANÁLISES DE DSC PARA MÚSCULO DE BLUE WHITING ARMAZENADO À -10 °C POR 8 E 16 SEMANAS. OS PRIMEIROS PICOS SÃO REFERÊNTES A MIOSINA E PROTEÍNAS SARCOPLÁSTICAS E O ÚLTIMO PICO À ACTINA.	26
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO LACTOBÍÔNICO.....	30
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO GLICEROL.....	33
FIGURA 5 - RESULTADOS DE ANÁLISES DE DSC PARA SISTEMAS COMPOSTOS POR GLICEROL EM CONCENTRAÇÕES (%) DE 0, 10, 30, 35, 40, 50, 53, 55, 70 E 100. (a) REPRESENTAM OS PICOS DE FUSÃO, (b) REPRESENTAM OS PICOS DE CRISTALIZAÇÃO (c) REPRESENTAM TRANSIÇÕES VÍTREAS, (d) REPRESENTAM ONDULAÇÕES DE CAUSAS DESCONHECIDAS.....	34
FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DOS AMINOÁCIDOS.	35
FIGURA 7 - CLASSIFICAÇÃO DOS 20 AMINOÁCIDOS PRIMÁRIOS DAS PROTEÍNAS, EM PH 7, NOS GRUPOS APOLARES E ALIFÁTICOS, POLARES MAS NÃO CARREGADOS, AROMÁTICOS, CARREGADOS POSITIVAMENTE E CARREGADOS NEGATIVAMENTE.....	36

FIGURA 8 - MODELO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA GLNK DE *E. coli*. EM DIFERENTES ÂNGULOS. (A) CONFORMAÇÃO DOS T-LOOPS E DA POSIÇÃO TYR51, O QUAL É O SÍTIO DE URIDILAÇÃO EM MUITAS PROTEÍNAS PII. (B) SÍTIO DE INTERAÇÃO PARA O ATP/ADP LOCALIZADO NA FENDA DA SUBUNIDADE INTERNA. 38

FIGURA 9 - ESTRUTURA QUÍMICA DA ADENOSINA TRIFOSFATO (ATP) EM pH 7,4..... 39

FIGURA 10 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC) PARA A INTERAÇÃO ENTRE ATP E GLNK DE *E. coli* EM PRESENÇA DE 1 mmol.L⁻¹ 2-OG (A) E 0,1 mmol.L⁻¹ 2-OG (B).41

FIGURA 11 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC) PARA A INTERAÇÃO ENTRE ADP E GLNK DE *E. coli* EM PRESENÇA DE 1 mmol.L⁻¹ 2-OG (D) E 0,1 mmol.L⁻¹ 2-OG (E).
..... 41

FIGURA 12 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO CALORÍMETRO DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA..... 44

FIGURA 13 - EXEMPLO DA OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS POR MEIO DA CURVA DE ITC. 45

FIGURA 14 - INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA GLNK EM UMA SOLUÇÃO A 0,1 mmol.L⁻¹ E ATP EM UMA SOLUÇÃO A 3 mmol.L⁻¹ NO ITC. AJUSTE DO MODELO DE TRÊS SÍTIOS AOS DADOS EXPERIMENTAIS. 47

FIGURA 15 - INTERAÇÃO ENTRE A IMUNOGLOBULINA G COM O SULFONATO DE NAFTALENO-1-8-ANILINO POR ITC. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: ■, □, 10 mmol.L⁻¹ DE ACETATO (PH 4,5); ●, ○, 10 mmol.L⁻¹ DE ACETATO (PH 4,5) COM 10 mmol.L⁻¹ DE NACL; ▲, Δ, 10 mmol.L⁻¹ DE ACETATO (PH 4,5) COM 10 mmol.L⁻¹ DE NACL. OS SÍMBOLOS ABERTOS SÃO REFERENTES ÀS AMOSTRAS SUBMETIDAS À TRATAMENTO

TÉRMICO (63 °C POR 30 MIN) E AS FECHADAS AS QUE NÃO FORAM SUBMETIDAS (30 °C)..... 48

FIGURA 16 - ANÁLISE DE ITC DA INTERAÇÃO ENTRE UMA SOLUÇÃO DE LIPOSSOMAS COM SOLUÇÕES DE ALBUMINA DE SORO BOVINO (A), LIPOZIMA (B) E CITOCROMO C (C). OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS EM PH 7,5 E TEMPERATURA DE 30 °C..... 49

FIGURA 17 - CROMATOGRAMA GERADO PELO FPLC DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GLNK DE *H. seropedicae*. A CURVA AZUL INDICA A ABSORBÂNCIA EM 280 nm, A VERDE O GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE NaCl E A LARANJA O FLUXO DE TAMPÃO (50 mmol.L⁻¹ TRIS-CI PH 8,0; 50 mmol.L⁻¹ NaCl; GLICEROL 5%)..... 60

FIGURA 18 - ELETROFORESE DAS FRAÇÕES OBTIDAS NA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GLNK DE *H. seropedicae* EM COLUNA DE HEPARINA (HITRAP GE HEALTHCARE), EMPREGANDO O GEL SDS-PAGE 12%. PISTA 1 - CONTÉM O MARCADOR DE MASSA MOLAR (GE HEALTHCARE) COM AS RESPECTIVAS MASSAS EM KDa. PISTA 2 – EXTRATO BRUTO; PISTA 3 – PROTEÍNAS SOLÚVEIS; PISTA 4 – PROTEÍNAS INSOLÚVEIS; PISTA 5 – PROTEÍNAS NÃO LIGADAS À COLUNA; PISTA 6 – LAVAGEM DA COLUNA; PISTA 7 A 21 – FRAÇÕES DA ELUIÇÃO COM NaCl (SOLUÇÃO DE GLNK).61

FIGURA 19 - INTERAÇÃO ENTRE UMA SOLUÇÃO DE ATP A 3 mmol.L⁻¹ E A SOLUÇÃO TAMPÃO (50 mmol.L⁻¹ TRIS-CI PH 8,0; 100 mmol.L⁻¹ NaCl; 5 mmol.L⁻¹ MgCl₂) AVALIADA POR ITC. GRÁFICO SUPERIOR: PICOS REFERENTES AOS DADOS DE FLUXO DE CALOR (mcal/s) POR TEMPO (MIN). GRÁFICO INFERIOR: DADOS DE ENERGIA DE INTERAÇÃO COM A RAZÃO MOLAR ENTRE OS LIGANTES. 64

FIGURA 20 - INTERAÇÃO ENTRE UMA SOLUÇÃO DE GLNK A $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ E UMA SOLUÇÃO DE ATP A 3 mmol.L^{-1} AVALIADA POR ITC. GRÁFICO SUPERIOR: PICOS REFERENTES AOS DADOS DE FLUXO DE CALOR (mcal/s) POR TEMPO (MIN). GRÁFICO INFERIOR: DADOS DE ENERGIA DE INTERAÇÃO COM A RAZÃO MOLAR ENTRE OS LIGANTES..... 65

FIGURA 21 - CURVAS DE ITC AVALIANDO O EFEITO DOS CICLOS DE CONGELAMENTO NAS INTERAÇÕES ENTRE AS SOLUÇÕES DE PROTEÍNA GLNK $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ E DE ATP Á 3 mmol.L^{-1} . ■ GLNK NÃO SUBMETIDA A CICLOS DE CONGELAMENTO, • GLNK SUBMETIDA A 1 CICLO DE CONGELAMENTO, ▲ GLNK SUBMETIDA A 2 CICLOS DE CONGELAMENTO..... 68

FIGURA 22 - CURVAS DE ITC AVALIANDO O EFEITO DOS CICLOS DE CONGELAMENTO E DO GLICEROL 10% (CRIOPROTETOR) NAS INTERAÇÕES ENTRE AS SOLUÇÕES DE PROTEÍNA GLNK $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ E DE ATP 3 mmol.L^{-1} . ■ GLNK NÃO SUBMETIDA A CICLOS DE CONGELAMENTO, • GLNK SUBMETIDA A 1 CICLO DE CONGELAMENTO, ▲ GLNK SUBMETIDA A 2 CICLOS DE CONGELAMENTO. 69

FIGURA 23 - CURVAS DE ITC AVALIANDO O EFEITO DOS CICLOS DE CONGELAMENTO E DO ÁCIDO LACTOBÍÔNICO 10 mmol.L^{-1} (CRIOPROTETOR) NAS INTERAÇÕES ENTRE AS SOLUÇÕES DE PROTEÍNA GLNK $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ E DE ATP Á 3 mmol.L^{-1} . ■ GLNK NÃO SUBMETIDA A CICLOS DE CONGELAMENTO, • GLNK SUBMETIDA A 1 CICLO DE CONGELAMENTO, ▲ GLNK SUBMETIDA A 2 CICLOS DE CONGELAMENTO..... 70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PARÂMETROS TERMODINÂMICOS ENVOLVIDOS NAS INTERAÇÕES DE ATP E ADP COM GLNK DE *E. coli*. EXPERIMENTOS REALIZADOS NA PRESENÇA DE 2-OG EM CONCENTRAÇÕES DE 1 mmol.L⁻¹ E 0,1 mmol.L⁻¹. OS VALORES DE ΔG SÃO A SOMA DOS VALORES DE CADA UM DOS 3 SÍTIOS. 40

TABELA 2 - PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DE K_D , ΔH E ΔS OBTIDOS DA LIGAÇÃO ENTRE SOLUÇÃO DE GLNK A 0,1 mmol.L⁻¹ E UMA SOLUÇÃO DE ATP A 3 mmol.L⁻¹. OS DADOS FORAM OBTIDOS POR MEIO DO MODELO MATEMÁTICO DE 3 SÍTIOS DE INTERAÇÃO NO PROGRAMA ORIGIN 7.0 ASSOCIADO AO ITC₂₀₀. 66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2-OG	-	2-oxoglutarato
ABIA	-	Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos
AFP	-	do inglês, <i>Antifreeze protein</i> (Proteína anti-congelante)
ALB	-	Ácido lactobiônico
ADP	-	Adenosina difosfato
ATP	-	Adenosina trifosfato
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMPC	-	Dimiristoilfosfatidilcolina
DMPG	-	Dimiristoilfosfatidiletanolamina
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DPPC	-	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPH	-	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DSC	-	do inglês, Differential scanning calorimeter (Calorimetria exploratória diferencial)
FPLC	-	do inglês, <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (Cromatografia líquida rápida de proteínas)
INCT	-	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
IPTG	-	β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
ITC	-	do inglês, <i>Isothermal titration calorimetry</i> (Calorimetria de titulação isotérmica)
LA	-	Luria Bertani Ágar (meio de cultura)
LATOS	-	Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação
LB	-	Luria-Bertani (meio de cultura)
MD DE	-	Maltodextrina em equivalente de dextrose
Me ₂ SO	-	Dimetilsulfóxido
PDC-109	-	Proteína do plasma seminal
PVP	-	Polivinilpirrolidona
SDS	-	do inglês, Sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sódio)
TRIS	-	Tris(hidroximetil)-aminometano
FDA	-	do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
UV-VIS	-	Ultravioleta-visível

LISTA DE SIMBOLOS

ΔG	-	Energia livre de Gibbs
ΔH	-	Varição da entalpia
ΔS	-	Varição de entropia
K_A	-	Constante de ligação
K_D	-	Constante de dissociação
n	-	Estequiometria da reação
R	-	Constante universal dos gases
T	-	Temperatura

1 INTRODUÇÃO

As técnicas de conservação de alimentos são de grande importância para o melhor aproveitamento, aumento da vida-de-prateleira e armazenamento de produtos alimentícios. Algumas técnicas comumente utilizadas são a refrigeração, congelamento, irradiação e secagem. Esses processos têm como princípio básico reduzir ou eliminar a atividade microbiana, reações enzimáticas e de oxidação nos produtos (SILVA, 2000).

O congelamento é um dos métodos mais empregados na manutenção da estabilidade química e microbiológica de produtos alimentícios (XIONG, 1997). Entretanto, em alguns alimentos, o processo provoca alguns efeitos negativos como alterações de textura (rupturas na parede celular), perda de vitaminas e alterações de sabor (consequência da oxidação de alguns constituintes do alimento) (ORDÓNEZ *et al.*, 2005; OETTERER *et al.*, 2006). A nível celular, a formação de cristais de gelo pode alterar a rigidez do citoesqueleto e da membrana plasmática (RAGOONANAN *et al.*, 2013) ou até mesmo causar o rompimentos na membrana, liberando enzimas hidrolíticas e causando uma autodigestão celular (TAPPEL (1966) citado por GAVA (1977)). E em proteínas, são encontrados estudos que demonstram que o congelamento e o armazenamento pode causar redução no teor de proteínas e aminoácidos (YAMASHITA *et al.*, 2003; GARCÍA-ARIAS *et al.*, 2003), desnaturação (HERRERA, *et al.*, 2001) e alterações conformacionais e térmicas nesse sistema (WANG *et al.*, 2014).

Como alternativa para minimizar os danos por congelamento, a indústria de alimentos faz uso de aditivos com ação crioprotetora. Crioprotetores são substâncias que previnem a desnaturação proteica e protegem tecidos biológicos de danos por congelamento (HUBALÉK, 2003; XIONG, 1997). Este efeito pode ser obtido por três diferentes formas: agentes nucleantes, proteínas anti-congelantes e solutos compatíveis (FULLER, 2004).

O ácido lactobiônico (ALB) é um aditivo alimentar, aprovado pela US FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) (FDA, 2013), com propriedades quelante, umectante e antioxidante.

Este aditivo é obtido a partir da oxidação química ou microbiana da lactose e tem gerado grande interesse por parte das indústrias alimentícias,

farmacêuticas, químicas e de cosméticos em função de suas propriedades funcionais (GUTIÉRREZ *et al.*, 2012). Ainda não há estudos na literatura a respeito do mecanismo de ação desse crioprotetor. Entretanto, há relatos do seu efeito benéfico quando utilizado na preservação de órgãos de transplante a baixas temperaturas (ISAACSON *et al.*, 1989; CHARLOUX *et al.*, 1995) e na redução do inchaço celular, hipotermicamente induzido, em diversos tecidos (SHEPHERD *et al.*, 1993). Portanto ainda há muito a ser estudado em relação a interação do ALB com diversos compostos, bem como seu comportamento durante o processo de congelamento.

A proteína GlnK de *Herbaspirillum seropedicae* foi abordada neste trabalho em razão de sua disponibilidade, estrutura conhecida e por sua interação com a adenosina trifosfato no ITC já estar descrita na literatura (BONATTO *et al.*, 2012; XU *et al.*, 1998). A proteína GlnK faz parte da família de proteínas PII. As PII são uma das famílias de proteínas de transdução de sinal mais amplamente distribuídas na natureza. Essas proteínas participam do controle do metabolismo de nitrogênio em bactérias, arqueias e também é encontrada em plastídios de plantas (ARCONDE'GUY *et al.*, 2001). As P II têm a possibilidade de fazer a interação com três ligantes, a adenosina trifosfato (ATP), a adenosina difosfato (ADP) e o 2-oxoglutarato (2-OG). Essa capacidade permite que essas proteínas sejam capazes de sensoriar três diferentes condições metabólicas da célula: o nível de nitrogênio (através da uridililação), o estado energético (através da razão ATP:ADP) e do nível de carbono (através do 2-OG) (RADCHENKO e MERRICK, 2011).

O ITC é uma técnica calorimétrica que permite a medição de parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação entre duas moléculas. Por meio desta técnica podem ser obtidos dados de entalpia (ΔH), entropia (ΔS), variação energia de Gibbs (ΔG), estequiometria da reação (n) e constante de ligação (K_A) (PEROZZO *et al.*, 2004).

Visando conhecer os princípios de atuação e os efeitos de crioprotetores no acondicionamento de alimentos proteicos, este trabalho pretendeu avaliar os efeitos do congelamento e de agentes crioprotetores na interação entre a proteína GlnK e o ligante adenosina trifosfato a partir da calorimetria de titulação isotérmica (ITC).

1.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do congelamento e dos crioprotetores ácido lactobiônico e glicerol na estrutura da proteína GlnK por meio da interação entre a GlnK e o ATP por calorimetria de titulação isotérmica (ITC).

1.2 Objetivos Específicos

Nesse sentido, afim de se conhecer melhor sobre como o congelamento e os crioprotetores modificam a estrutura da proteína GlnK quanto a sua interação com o ATP, foram definidas as seguintes metas:

- Determinação dos parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS , K_A) envolvidos nas interações moleculares de GlnK-ATP por ITC em temperatura de 20 °C;
- Avaliação do efeito de 1 e 2 ciclos de congelamento na estrutura da GlnK em relação a proteína sem o congelamento. Para isso foi feito um estudo das interações moleculares GlnK-ATP por ITC com a GlnK submetida aos ciclos de congelamento e uma comparação com o mesmo sistema (GlnK-ATP) sem congelar.
- Avaliação do efeitos dos crioprotetores ALB e glicerol nas interações moleculares entre GlnK-ATP, quando submetidos a 1 e 2 ciclos de congelamento por ITC em comparação com as amostras sem congelar.

Desta forma, foi possível conhecer melhor os efeitos do congelamento e dos agentes crioprotetores quando adicionados à proteína GlnK.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo serão abordados o conceito dos alimentos congelados, a importância do congelamento na durabilidade dos produtos e os fundamentos da técnica. Serão apresentados também alguns crioprotetores comumente utilizados neste processo, em especial o ácido lactobiônico (ALB) e o glicerol, aditivos estes empregados neste trabalho.

Além disso, serão apresentadas características da proteína GlnK, proteína empregada nos ensaios de congelamento deste trabalho.

Também será abordada a técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC), com destaque nos seus aspectos fundamentais e termodinâmicos. E por fim, serão apresentados e discutidos trabalhos demonstrando a aplicação do ITC na interação entre proteínas e outros componentes.

2.1 Preservação de produtos alimentícios

Os alimentos disponíveis para o consumo humano podem ser de fonte orgânica (organismos vivos) ou inorgânica (minerais). Em especial, os de origem animal são muito perecíveis. A baixa estabilidade destes produtos se deve principalmente à ação dos micro-organismos, enzimas autolíticas, reações químicas não enzimáticas e manuseamento durante o processamento. Os micro-organismos encontram nesses alimentos condições favoráveis para sua sobrevivência, como a riqueza em nutrientes e alta atividade de água. As enzimas autolíticas, responsáveis por atividades metabólicas nos organismos vivos, após morte ou deterioração desses organismos, passam a destruir os próprios tecidos. Assim como a ação das enzimas, algumas reações químicas continuam a ocorrer nos alimentos e contribuem com reações de oxidação, escurecimento e desnaturação proteica. O cuidado durante a manipulação do alimento também influencia na estabilidade do produto, como por exemplo, os

danos mecânicos (amassamentos) de embalagens e produtos (ORDÓNEZ *et al.*, 2005).

Com a finalidade de que os alimentos estejam em condições sensoriais, sanitárias e nutricionais satisfatórias por um maior período de tempo, são empregadas algumas técnicas de preservação. Estas técnicas têm por objetivo prevenir ou retardar as alterações (físicas, químicas ou biológicas) por meio da eliminação total ou parcial dos agentes deteriorantes. O processo de conservação empregado, ou o conjunto de processos, irá depender da composição da matéria-prima a ser tratada. Alguns dos processos mais comumente utilizados são a pasteurização, a refrigeração, o congelamento, a secagem, o branqueamento, a adição de conservantes (SILVA, 2000).

Dentre as técnicas utilizadas, o congelamento na presença de aditivos crioprotetores se apresenta como uma alternativa promissora na preservação de sistemas proteicos e biológicos.

2.1.1 Fundamentos do congelamento e sua importância na preservação de alimentos

O congelamento da água e de outras substâncias é um processo de alta complexidade. Durante a cristalização, a temperatura da mistura cristal de água-líquido tende a se aproximar da temperatura de equilíbrio de congelamento do sistema. A fase líquida não congela instantaneamente durante o processo, mas o calor é removido continuamente até que toda água livre passe para o estado sólido (PATAPOFF e OVERCASHIER, 2002). O fenômeno pode ser dividido em quatro etapas principais:

1. Resfriamento da solução abaixo da temperatura de equilíbrio de congelamento, sob uma taxa de congelamento definida;
2. Nucleação primária, onde ocorre a formação de um núcleo de cristal de água primário;
3. Nucleação secundária, momento em que ocorre o crescimento do núcleo para os cristais de água;

4. Conclusão da transição de fase líquida para sólida, resultado de um maior crescimento dos cristais de água (SEARLES *et al.*, 2001).

Dentre as etapas citadas, sabe-se que as etapas de nucleação são processos de difícil compreensão, já que representam a transição de fase em que moléculas passam de um estado desordenado para um estado ordenado. Já a etapa de crescimento é um processo melhor caracterizado e de mecanismos melhor entendidos (MCPHERSON, 2004).

A temperatura de congelamento é uma importante variável que afeta a estrutura e quantidade dos cristais de água formados durante o processo. A Figura 1 mostra o congelamento de um produto em diferentes temperaturas. O sistema A apresenta um congelamento à $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o sistema B à $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foi observado que o sistema B apresenta cristais de menor tamanho e em maior quantidade em relação ao sistema A. Essas diferenças se devem a diferença de temperatura entre os sistemas. Quanto menor a temperatura de congelamento, maior será a taxa de congelamento e os cristais de água serão formados mais rapidamente, em maior quantidade e menor tamanho (GEIDOBLE e WINTER, 2013).

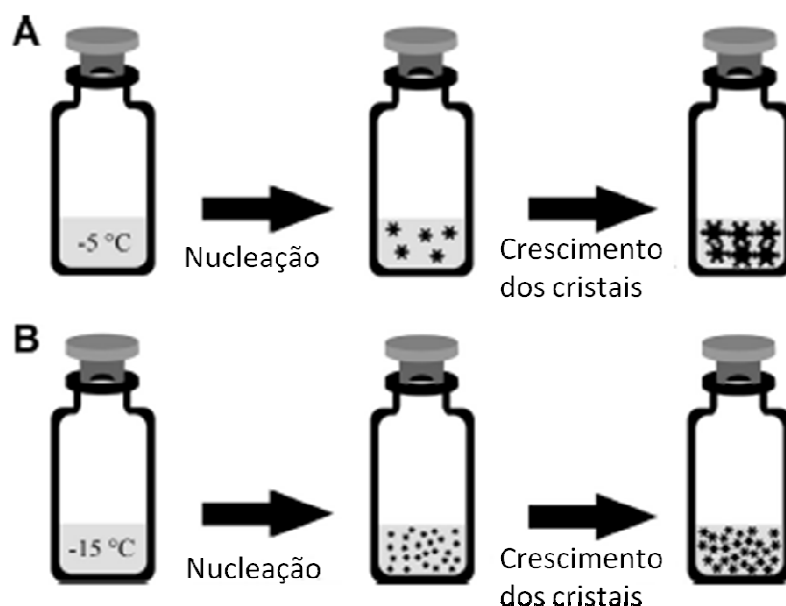


FIGURA 1 - DESCRIÇÃO DA CRISTALIZAÇÃO DE UM PRODUTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS. A: CRISTALIZAÇÃO À $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, OS CRISTAIS DE ÁGUA FORMADOS SÃO MAIORES E EM MENOR QUANTIDADE. B: CRISTALIZAÇÃO À $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, OS CRISTAIS DE ÁGUA SÃO MENORES E EM MAIOR QUANTIDADE.

Fonte: Adaptado de Geidobler e Winter (2013).

O congelamento é um dos métodos mais empregados para a conservação de alimentos (XIONG, 1997). Em comparação com outras técnicas, ele possibilita a preservação em geral com menores alterações no aroma natural, digestibilidade e valor nutritivo do produto. Para a obtenção de bons resultados com essa técnica, devem ser seguidos alguns princípios: o alimento deve ser sadio (o frio não melhora a qualidade do produto), a retirada de calor deve ocorrer de forma mais breve possível após a colheita ou preparo, o armazenamento deve ser feito em temperatura constante e o processo não deve ser interrompido (ORDÓNEZ *et al.*, 2005).

Alguns dos aspectos negativos do congelamento são a perda de vitaminas, endurecimento de alguns produtos (gorduras e óleos), danos pelo frio (escurecimento em bananas e maçãs), modificação na textura, rupturas nas paredes celulares e extravasamento do líquido celular (ORDÓNEZ *et al.*, 2005; OETTERER *et al.*, 2006), sabor desagradável (ranço) resultado de deterioração oxidativa, aparecimento de um líquido viscoso (líquido metacriótico), que favorece o desenvolvimento de microorganismos em produtos congelados não embalados (GAVA, 1977).

Estudo realizado com espinafre apresentou dados referentes aos danos pelo frio provocados por processo de congelamento (MIN *et al.*, 2014). O congelamento provocou no produto as seguintes alterações: acúmulo de espécies reativas ao oxigênio ($O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2), acúmulo de malondialdeído (biomarcador utilizado na avaliação do estresse oxidativo) e vazamento de eletrólitos do sistema. O estudo ainda demonstrou que os danos foram maiores quanto maior o período em que o alimento permaneceu congelado.

O congelamento pode provocar alterações em estruturas celulares e em proteínas. Estudo realizado por Tappel (1966) citado por Gava (1977) mostra que ciclos de congelamento e descongelamento afetam negativamente a organização celular. O processo de congelamento pode favorecer rompimentos da membrana, com isso, enzimas hidrolíticas (nucleases, fosfatases, sulfatases, etc.) ficam livres para atacar o próprio material celular, ocorrendo uma autodigestão. Organelas, como o núcleo, mitocôndrias e lisossomas, são afetadas em diversos graus por este processamento, em especial o lisossoma.

Estudo realizado por Ragoonanan *et al.* (2013) mostrou que mudanças no volume celular durante processos de congelamento e descongelamento alteram a rigidez do citoesqueleto, bem como a membrana plasmática. Em condições drásticas de congelamento podem ocorrer interações entre a membrana e os cristais de água, podendo provocar um aumento na rigidez da membrana.

A baixa temperatura afeta também a mobilidade e agregação das moléculas em um sistema, modificando, assim as propriedades e qualidades iniciais do alimento. Por meio dessas alterações pode-se avaliar as alterações durante o congelamento. Um exemplo é a avaliação de hortaliças congeladas, na qual a qualidade pode ser determinada por meio da quantidade de clorofila que foi transformada em feotina durante o congelamento (OETTERER *et al.*, 2006).

A forma como as interações moleculares de em alimentos são afetadas durante o congelamento merece ser melhor estudada e compreendida para contribuir com a eficácia da técnica.

2.1.2 Efeitos do congelamento em sistemas proteicos

A cristalização de macromoléculas biológicas, em especial de proteínas, como qualquer outra cristalização, envolve os passos de nucleação e crescimento. Entretanto, por esse sistema apresentar grande sensibilidade a condições externas, estes estudos muitas vezes apresentam dificuldades técnicas (LITTLECHILD, 1991).

Na literatura são encontrados alguns estudos a respeito do efeito do processo de congelamento em proteínas, a maioria utilizando a carne de peixes como fonte proteica.

O congelamento de proteínas da carne de peixe resulta em alguns efeitos negativos nesses sistemas. Yamashita *et al.* (2003) verificaram o efeito do congelamento e do armazenamento à -25 °C por 120 dias sobre a proteína miofibrilar do peixe lagarto. O efeito do congelamento foi avaliado por meio da medição da atividade Miofibrilar Ca - ATPase nas proteínas. Foi observado um

decréscimo de 40% dos valores iniciais para os primeiros 30 dias de armazenamento e para os próximos 90 dias foi observado um decréscimo gradual até a inativação da reação Miofibrilar Ca - ATPase. O trabalho também avaliou o efeito da quitina hidrolisada sobre o sistema e foi verificado um decréscimo na taxa de inativação da reação Miofibrilar Ca - ATPase em relação a amostra sem aditivo.

García-Arias *et al.* (2003) mostraram que o processo de congelamento e descongelamento de filés de sardinha resultou em uma diminuição do teor de proteínas nas amostras. O congelamento das amostras foi realizado à -30 °C, o armazenamento à -20 °C por um período de 4 meses e o descongelamento à 4 °C por aproximadamente 12 horas ou por micro-ondas por 4 minutos. O teor de proteínas foi analisado por metodologia de Kjeldahl e o teor de aminoácidos por cromatografia de troca iônica em um analisador de aminoácidos antes e após o congelamento. Foi verificado um decréscimo na quantidade de grupos -SH, característico das cisteínas, nas amostras descongeladas à 4 °C (21,57 %) e nas amostras descongeladas em micro-ondas (24,92 %) em relação à amostra fresca. E a análise de aminoácidos mostrou uma redução de diversos grupos, sendo a cisteína a mais afetada pelo processo de congelamento e descongelamento.

Estudo realizado por Herrera, *et al.* (2001) mostrou, por meio da calorimetria exploratória diferencial (DSC), que as proteínas actina e miosina do peixe *Blue whiting* sofrem desnaturação térmica em condições de congelamento e armazenamento. A Figura 2 mostra o resultado da análise do DSC comparando amostras congeladas à -10 °C e armazenadas por 8 e 16 semanas. Podem ser observadas duas regiões endotérmicas, sendo que a primeira região apresenta a desnaturação térmica da miosina e das proteínas sarcoplásticas e a segunda região apresenta a desnaturação de filamentos de actina. É possível observar ainda na Figura 2 que o congelamento afetou principalmente a miosina e as proteínas sarcoplásticas. Em relação ao tempo de armazenamento observa-se que quanto maior for esse tempo, a transição térmica se torna menos definida, com o 1º e o 3º pico se tornando praticamente uma extensão do 2º pico.

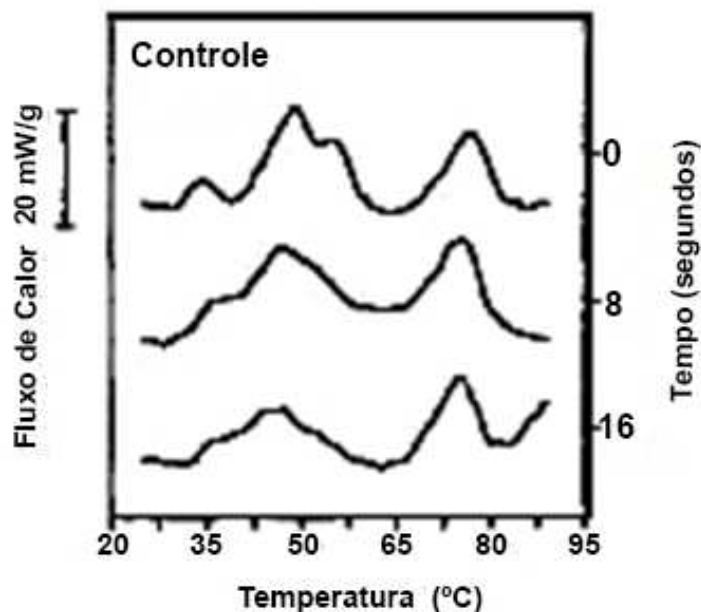


FIGURA 2 - RESULTADO DAS ANÁLISES DE DSC PARA MÚSCULO DE BLUE WHITING ARMAZENADO À -10 °C POR 8 E 16 SEMANAS. OS PRIMEIROS PICOS SÃO REFERENTES A MIOSINA E PROTEÍNAS SARCOPLÁSTICAS E O ÚLTIMO PICO À ACTINA.

Fonte: Adaptado de Herrera et al. (2001).

Outras fontes proteicas utilizadas na verificação dos efeitos do congelamento são as proteínas do glúten (glúten, glutenina e gliadina). Estudo realizado por Wang *et al.* (2014a) mostrou que a capacidade de sorção de água em amostras de proteínas do glúten congeladas à -18 °C por 60 dias diminuiu em relação à amostras frescas. Esse resultado sugeriu que após o congelamento das proteínas, mais sítios hidrofóbicos de sua estrutura foram expostos. Quanto a mobilidade de água, o congelamento promoveu um aumento deste parâmetro nas proteínas hidratadas de glúten, tanto para os sistemas compostos por glutenina-água quanto por gliadina-água. Análises termogravimétricas (TGA) e de calorimetria exploratória diferencial (DSC) mostraram que as temperaturas de degradação nas proteínas diminuíram para as amostras submetidas ao congelamento. Entretanto para amostras ricas em glúten, a estabilidade térmica quanto a desnaturação aumentou com o aumento do tempo de armazenamento. Em relação ao parâmetro de entalpia, para todas as amostras, os valores de entalpia diminuíram com a exposição ao

congelamento. Com esses resultados os autores concluíram que o processo de congelamento e armazenamento provocaram alterações conformacionais nas proteínas do glúten.

Em estudo recente Wang *et al.* (2014b) avaliaram o efeito do congelamento nas propriedades físico-químicas das proteínas do glúten. O congelamento foi realizado à -35 °C por 12 horas e o armazenamento à -18 °C por até 60 dias. Foi observado que ocorreu a despolimerização do macropolímero da glutenina por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão de tamanho nas amostras. Como consequência o conteúdo de tiol também foi alterado e os autores concluíram que essa despolimerização da glutenina foi o maior indicador da deterioração do glúten e da glutenina em processos de congelamento e armazenamento.

2.2 Aditivos alimentares

O conceito de aditivo alimentar pode variar de país para país e determinada substância permitida em um pode ser proibida em outro. Essa divergência com relação aos aditivos criou a necessidade de uma unificação do conceito. O Brasil segue as normas da Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos (ABIA) com relação a utilização de aditivos em alimentos e seus limites. Para unificar esse conceito e facilitar as exportações, os técnicos do *Food and Drug Administration* (FDA), órgão governamental americano responsável pelo controle dos alimentos, suplementos alimentares, medicamentos, cosméticos e materiais biológicos, definiram "*aditivo alimentar como sendo uma substância não nutritiva adicionada intencionalmente ao alimento, geralmente em pequenas quantidades para melhorar a aparência, o sabor, a textura, o aroma e suas propriedades de armazenamento*" (SILVA, 2000).

2.2.1 A importância das substâncias crioprotetoras encontradas na natureza

Alguns aditivos alimentares possuem propriedades crioprotetoras e portanto podem ser utilizados na conservação de congelados. Crioprotetores são substâncias que previnem a desnaturação proteica e protegem tecidos biológicos de danos por congelamento (HUBALÉK, 2003; XIONG, 1997). A escolha do crioprotetor a ser utilizado depende do organismo a ser protegido, uma vez que o mecanismo de crioproteção é influenciado pelas seguintes propriedades dos aditivos: massa molar, toxicidade, taxa de penetração no tecido, entre outros (HUBALÉK, 2003).

O efeito protetor contra o congelamento pode ser obtido de diversas formas e por diferentes tipos de organismos (artrópodes terrestres, plantas nativas de ambientes extremos, insetos, peixes marinhos polares). Este efeito pode ser classificado de três diferentes formas: agentes nucleantes, proteínas anti-congelantes e solutos compatíveis (FULLER, 2004).

Os agentes nucleantes são compostos utilizados por alguns organismos para induzir a formação de cristais de gelo em lugares específicos, evitando o super-resfriamento generalizado e reduzindo o dano intracelular. Estudos realizados com o inseto *Hemideina maori*, organismo resistente ao congelamento, mostraram que moléculas de origem proteica atuam como agentes nucleantes responsáveis pela características de sobrevivência a baixas temperaturas nesses organismos (WILSON e RAMLOV, 1995).

As proteínas anticongelantes (AFP, do inglês *Antifreeze proteins*) pertencem a uma classe de polipeptídeos que possibilitam a sobrevivência de organismos em temperaturas inferiores a 0 °C. Elas se ligam aos cristais de gelo e modificam seu crescimento evitando seu aumento e o processo de cristalização, protegendo as membranas celulares de danos pelo congelamento (GRIFFITH E EWART, 1995). Elas são encontradas em alguns vertebrados, plantas, fungos e bactérias e classificadas em AFP tipo I, II, III e IV de acordo com a ordem de suas descobertas (DAVIES E SYKEST, 1997).

Os solutos compatíveis são metabólitos produzidos por determinados organismos, quando estes se encontram em condições não favoráveis para sua sobrevivência. Na criopreservação, dois destes metabólitos muito

estudados são açúcares e a glicerina, sendo que estes compostos aumentam a viscosidade das soluções, inibindo a formação de cristais de gelo (FULLER, 2004). Em sua revisão, Hubalék (2003) discute a utilização de aditivos crioprotetores na preservação de micro-organismos. O autor compara alguns crioprotetores mais estudados como o dimetilsulfóxido, o glicerol, a albumina de soro bovino, a sacarose, a glicose, o metanol e a polivinilpirrolidona (PVP).

Na área de alimentos, há relatos da utilização de crioprotetores na preservação de peixes em baixa temperatura. Herrera *et al.* (2001) utilizaram maltodextrinas como aditivos no congelamento do peixe *Blue whiting* à -10 e -20 °C. O composto inibiu a formação de formaldeído e ao final do experimento, as amostras com aditivo sofreram menor desnaturação que as amostras sem crioprotetor.

Compostos que possuem efeito crioprotetor ou que auxiliam de alguma forma no congelamento são objetos de interesse para o estudo da melhoria da qualidade de alimentos congelados.

A seguir serão apresentados alguns estudos e características a respeito dos crioprotetores abordados neste trabalho: ácido lactobiônico e glicerol.

2.2.2 Propriedades e importância do aditivo alimentar ácido lactobiônico (ALB)

Um aditivo alimentar com propriedades de interesse na conservação de alimentos é o ácido lactobiônico (ALB). O ALB é um ácido orgânico, obtido a partir da oxidação química ou microbiana da lactose. Possui fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{12}$ e estrutura química de um dissacarídeo formado pelo ácido glucônico e por uma galactose (Figura 3).

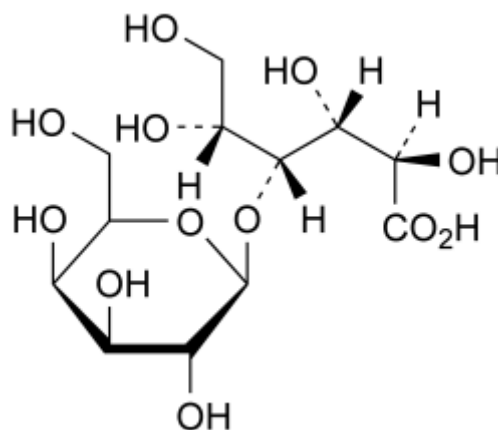


FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO LACTOBIÔNICO.
Fonte: EUROPE (2004).

O ALB é um agente quelante, umectante e com propriedades antioxidantes, portanto tem gerado grande interesse para indústrias alimentícias, farmacêuticas, químicas e de cosméticos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2012). Entretanto, os mecanismos de ação não estão ainda completamente estabelecidos. Este composto foi aprovado como aditivo alimentar pelo FDA (FDA, 2013) sendo comercializado na forma de pó branco, de massa molar 358,30 Da. Esse composto possui caráter higroscópico, resultado de muitos grupos hidroxila em sua estrutura (EUROPE, 2004).

Atualmente o ALB possui aplicações nas áreas farmacêutica, alimentícia, química e de nanotecnologia (GUTIÉRREZ *et al.*, 2012).

Na área farmacêutica, em virtude de suas propriedades quelantes, o ALB é empregado principalmente na preservação de órgãos para transplante a baixas temperaturas. Sabe-se que os superóxidos e os radicais hidroxila possuem um efeito negativo na estabilidade desses órgãos, assim como os íons Fe (II) e Fe (III) que através da reação de Fenton geram radicais livres de oxigênio a partir do H₂O₂. Em seu estudo, Isaacson *et al.* (1989) demonstraram por meio de espectrofotometria UV-VIS que o ALB ajuda na solubilização do ferro, além de se ligar à ele. Também foi observado que o complexo formado por Fe (III) e ALB é menos reativo que o Fe (III) para a formação de formaldeído na reação de Fenton a partir do dimetilsulfóxido. Portanto, a

presença do ALB, devido a sua ação quelante, torna esses compostos menos reativos para a formação de radicais livres.

Em 1995, Charloux *et al.* publicaram um estudo comprovando que o lactobionato de sódio reduziu o dano por oxidação em tecidos durante a preservação de órgãos. No experimento foi utilizado um sistema tipo Fenton para gerar radicais $\bullet\text{OH}$ e foi observado que a complexação entre o lactobionato e íon ferroso inibiu a produção de radicais hidroxila. A quantificação dos radicais formados foi realizada por metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na concentração de 12 mmol.L^{-1} de lactobionato a inibição foi de 75,5% e em 50 mmol.L^{-1} foi de 100%.

Outra propriedade do ALB, resultado de seu tamanho e estrutura tridimensional, foi a capacidade de suprimir o inchaço celular (hipotermicamente induzido) de diversos tecidos e não penetrar nas membranas celulares em baixas temperaturas (SHEPHERD *et al.*, 1993).

Como consequência de seu potencial antioxidante, de cicatrizar feridas, ação anti-idade e ter propriedades de formar géis, o ALB é um valioso ingrediente de diversas formulações na indústria cosmética, sendo assim bastante utilizado (GREEN *et al.*, 2009).

Tasic-Kostov *et al.* (2012) demonstraram o potencial antioxidante do ALB em solução e em emulsão. O sistema de emulsão utilizado foi composto por alquil-poliglucosídeos e surfactantes selecionados, livre de polietilenoglicóis e de origem natural. O potencial antioxidante foi avaliado por metodologia de DPPH (determinação da capacidade do antioxidante em capturar radicais livres) e por metodologia do sistema β -caroteno/ácido linoleico, método que avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico com auxílio de espectrofotometria. Os resultados para a atividade antioxidante do ALB foram satisfatórios por ambas as metodologias e pôde-se concluir que em quantidades seguras, o ALB captura radicais livres e inibe a oxidação lipídica mesmo em emulsão composta por alquil-poliglucosídeos.

Na área alimentícia o ALB é um aditivo de grandes possibilidades, tendo sido aprovado como aditivo alimentar pela FDA (FDA, 2013). Pesquisas apontam diversas aplicações para o ALB como sendo um acidulante com sabor

doce, ingrediente em queijos, espessante e fortificante de bebidas com minerais essenciais como o ferro e o cobre (GUTIÉRREZ *et al.*, 2012).

Estudo com leite fortificado com Fe (III) e Cu (II) mostrou que o ALB pode ser utilizado como agente quelante desses metais na formulação. O leite de vaca fortificado com 20 mg de Fe (III), 3 mg de Cu (II) e com ALB foi ministrado para crianças de 6 até 15 anos com anemia, em 5 de 7 dias da semana durante 3 meses. Os resultados indicaram que esse grupo apresentou um aumento de hemoglobina (proteína que contém ferro e participa no transporte de O₂ pelo sistema circulatório) significativo de 0,1 g.L⁻¹ em relação ao grupo controle (leite sem fortificação) (RIVERA *et al.*, 1982).

Como resultado de seu caráter ácido e de suas propriedades complexantes, há relatos da utilização do ALB na acidificação em produtos lácteos fermentados (QVIST *et al.*, 2012) e na fortificação de alimentos e bebidas por meio da complexação de minerais como o cálcio (OE e KIMURA, 2008). Na indústria de panificação, ele pode ser utilizado como aditivo da farinha para a fabricação de pão na proporção de 0,005 % à 3% (m/m) com o propósito de inibir o envelhecimento e reter a maciez e a elasticidade do miolo (OE e KIMURA, 2011).

Em estudo recente, Nilsen *et al.* (2009) apresentaram pela primeira vez a utilização do ALB como ingrediente em produtos cárneos. Em processos de congelamento e descongelamento sabe-se que os as carnes em geral tendem a ter uma diminuição no rendimento e no conteúdo de água. O ALB tem a propriedade de aumentar a capacidade de retenção de água nesses produtos, quando submetidos aos processos de congelamento, descongelamento ou cozimento. A proporção indicada de ALB para esses produtos é de 0,1% à 20% (peso/peso) para a obtenção dos efeitos desejados de retenção de água.

2.2.3 Atividade crioprotetora do aditivo glicerol

O glicerol (Figura 4) é um álcool de fórmula molecular $(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{OH})_3$ e massa molar 92,09 g/mol. Sua propriedade crioprotetora é amplamente conhecida na microbiologia, sendo uma das substâncias mais utilizadas para a redução de danos por congelamento nessa área (HUBÁLEK, 2003).

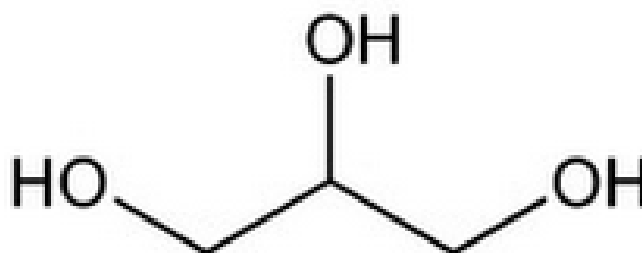


FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO GLICEROL.
Fonte: ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY (2014).

Iijima (1998) mostrou o efeito do glicerol como crioprotetor na preservação de células de sangue congeladas por meio da técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC). Foram encontradas duas zonas onde a solidificação das amostras de sangue ocorreram sem a formação de cristais de gelo. A primeira com o glicerol entre 44% e 55%, onde o congelamento resultou em um estado cristalograficamente amorfo, e a segunda com a concentração do glicerol superior a 55%, onde o estado cristalino ficou totalmente livre de cristais de gelo.

A Figura 5 apresenta uma rampa de aquecimento no DSC da temperatura de -150 à 50 °C de amostras de sangue com diferentes concentrações de glicerol. As curvas mostram que à medida que a concentração do glicerol aumenta, a temperatura de fusão diminui. Os melhores resultados são apresentados para as amostras de glicerol com concentrações maiores do que 50%. Na amostra com glicerol 53%, a temperatura de fusão obtida foi de -35 °C, enquanto que em concentrações maiores que 55%, nenhum pico de fusão ficou evidente.

Portanto a ação crioprotetora do glicerol se deve a redução no ponto de fusão da solução diminuindo, assim, a formação de cristais de gelo.

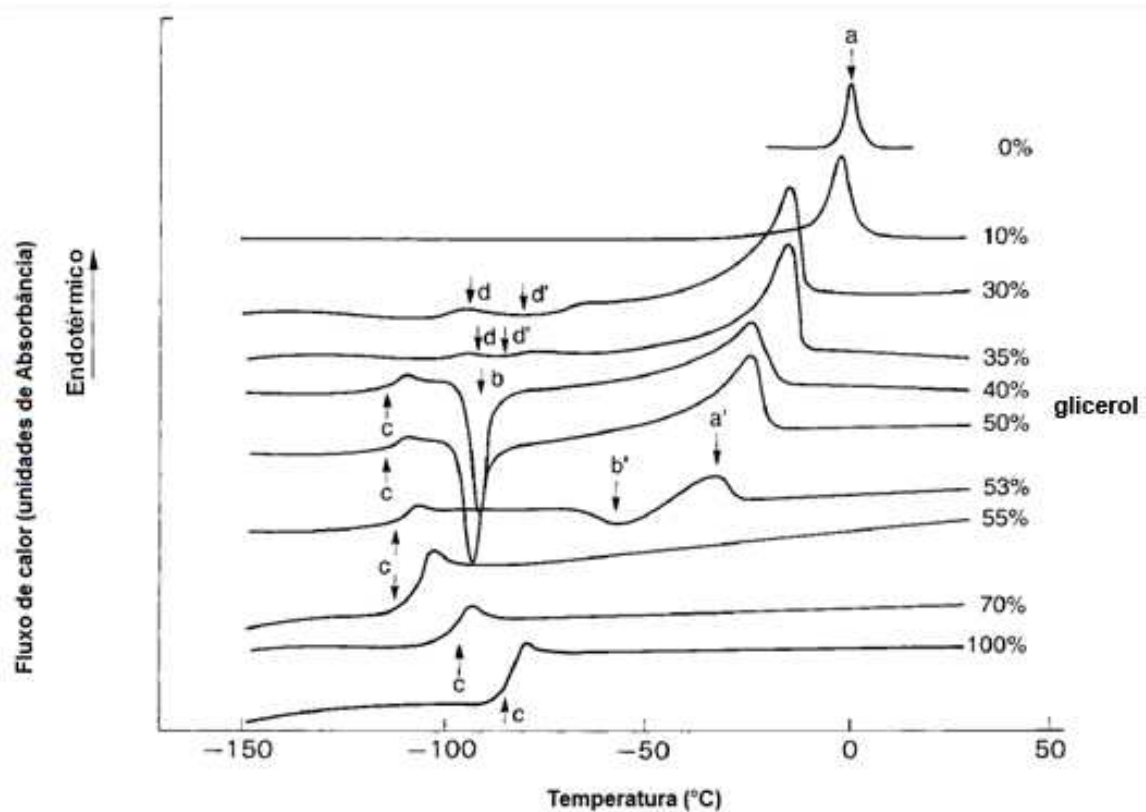


FIGURA 5 - RESULTADOS DE ANÁLISES DE DSC PARA SISTEMAS COMPOSTOS POR GLICEROL EM CONCENTRAÇÕES (%) DE 0, 10, 30, 35, 40, 50, 53, 55, 70 E 100. (a) REPRESENTAM OS PICOS DE FUSÃO, (b) REPRESENTAM OS PICOS DE CRISTALIZAÇÃO (c) REPRESENTAM TRANSIÇÕES VÍTREAS, (d) REPRESENTAM ONDULAÇÕES DE CAUSAS DESCONHECIDAS.

Fonte: IJIMA (1998).

2.3 Proteínas

Nesta seção serão apresentadas a estrutura e propriedades das proteínas com ênfase na proteína GlnK, proteína utilizada neste trabalho.

2.3.1 Estrutura química, propriedades e importância das proteínas

O termo proteína é derivado do grego, *proteios*, e significa o primeiro. As proteínas são componentes presentes em todas as células vivas e participam da maioria das reações fisiológicas no organismo. Possuem inúmeras funções e aplicações, além de serem catalisadoras de reações químicas, participarem das reações imunológicas e da regeneração de tecidos e serem essenciais nos fenômenos de crescimento e reprodução.

Estruturalmente as proteínas são polímeros de alta massa molar, sendo que suas unidades básicas são os aminoácidos ligados por meio de ligações peptídicas (ligação química entre aminoácidos quando o grupo carboxila de uma reage com o grupo amina da outra, liberando uma molécula de água). Suas propriedades são definidas pelos tipos de aminoácidos, sua quantidade e sequência na molécula (BOBBIO & BOBBIO, 2003).

Existem 20 aminoácidos que formam as proteínas, os aminoácidos são estruturalmente formados por um átomo de carbono α ligado covalentemente a um átomo de hidrogênio (-H), um grupo amina (-NH₂), um grupo carboxílico (-COOH) e um grupo R de cadeia lateral (Figura 6) (DAMODARAN *et al.*, 2010).

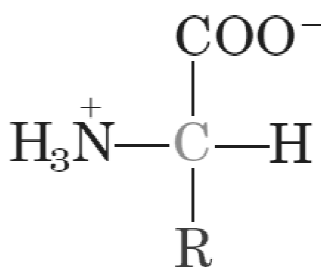


FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DOS AMINOÁCIDOS.
Fonte: NELSON E COX (2004).

A característica do grupamento R irá determinar a polaridade do aminoácido e a tendência deste interagir com água em pH biológico, caracterizando o composto como sendo polares ou apolares. Os aminoácidos podem ser divididos em 5 grupos, classificados de acordo com o tamanho, polaridade e forma dos grupos R, são eles: apolares e alifáticos, polares mas

não carregados, aromáticos, carregados positivamente e carregados negativamente (NELSON E COX, 2004). São apresentados na Figura 7 os 20 aminoácidos primários subdivididos em cada um dos grupos. A área sombreada mostra o grupamento R do composto.

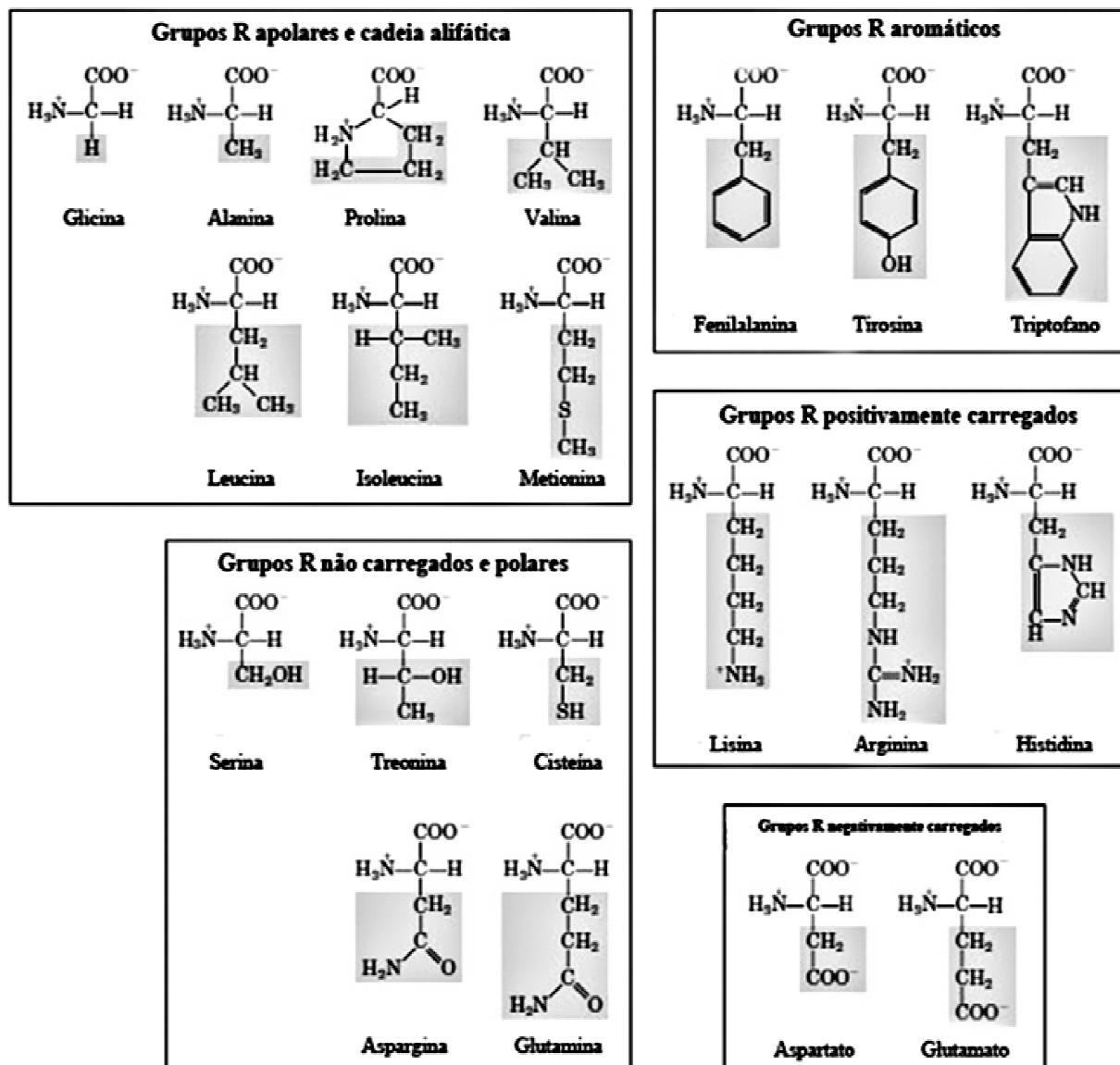


FIGURA 7 - CLASSIFICAÇÃO DOS 20 AMINOÁCIDOS PRIMÁRIOS DAS PROTEÍNAS, EM PH 7, NOS GRUPOS APOLARES E ALIFÁTICOS, POLARES MAS NÃO CARREGADOS, AROMÁTICOS, CARREGADOS POSITIVAMENTE E CARREGADOS NEGATIVAMENTE.

Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2004).

É importante ressaltar que cada aminoácido tem características específicas, mesmo quando classificadas dentro de um mesmo grupo. A alanina e a glicina, por exemplo, são ambas não polares e alifáticas. A primeira

tem importância na estabilização da estrutura das proteínas devido à promoção de interações hidrofóbicas, enquanto que a glicina possui uma cadeia lateral menor que não apresenta esta propriedade (NELSON E COX, 2004).

As proteínas possuem estruturas complexas, cujas características físico-químicas dependem de fatores como: a quantidade e os tipos de aminoácidos que a compõe, interações com sua própria estrutura e interações com o meio em que está inserida. Além disso, informações referentes aos seus principais grupamentos e estruturas são válidos no sentido de ajudar a entender o comportamento da proteína como um todo. No tópico a seguir, será apresentada a proteína GlnK, proteína modelo abordada neste trabalho.

2.3.2 Proteína GlnK: Estrutura, importância e a interação GlnK-ATP

A GlnK é uma proteína da família PII, as quais constituem-se em um dos grupos de proteínas de transdução de sinal mais amplamente distribuídas na natureza. Essas proteínas participam do controle do metabolismo de nitrogênio em bactérias, arqueias e também é encontrada em plastídios de plantas (ARCONDE'GUY *et al.*, 2001). A GlnK pode ser encontrada na β -proteobactéria *Herbaspirillum seropedicae*, micro-organismo que auxilia no metabolismo do nitrogênio de plantas, por meio da redução de nitrogênio atmosférico em amônio (CHUBATSU *et al.*, 2012).

As PII foram divididas em três principais grupos: GlnB, GlnK e *nifI*. Essa classificação foi feita com base na conservação da ligação genética e na semelhança em nível inicial da sequência de aminoácidos das proteínas. Os genes *glnB* estão em sua maioria ligados à *glnA*, os da *glnK* englobam os genes da PII ligados ao *amtB* e os da *nifI*, que envolvem os genes da PII associados com os genes estruturais para a nitrogenase (*nifH*, *nifD* e *nifK*) (RADCHENKO e MERRICK, 2011).

As proteínas PII são capazes de modular o metabolismo celular por interagir com proteínas alvo para regular sua atividade. A interação das proteínas PII com proteínas alvo é controlada em dois níveis: modificação pós-traducional (uridililação de cada um dos monômeros do trímero em um resíduo

de tirosina conservado), que é dependente dos níveis de glutamina, e por ligação de efetores alostéricos. Os efetores que já foram demonstrados ligar a essas proteínas para regular sua atividade são o ATP, ADP e 2-oxoglutarato (2-OG). Esse mecanismo complexo de regulação permite que as proteínas PII sejam capazes de sensoriar três diferentes condições metabólicas da célula: o nível de nitrogênio (através da uridililação), o estado energético (através da razão ATP:ADP) e do nível de carbono (através do 2-OG) (RADCHENKO e MERRICK, 2011).

As proteínas PII apresentam-se como trímeros, e cada um dos monômeros constituintes da proteína têm massa molar de aproximadamente 12-13 kDa (VASUDEVAN *et al.*, 1994; CHEAH *et al.*, 1994). O trímero se apresenta na forma de uma molécula cilíndrica compacta da qual sobressaem-se três longas alças (*T-loops*) (Figura 8). Os *T-loops* são dispostos em sequência, mas são estruturalmente flexíveis, podendo adotar diferentes conformações. Essa flexibilidade é essencial para a interação as proteínas PII e seus ligantes. Estruturalmente, as proteínas ainda são compostas por três fendas de subunidades internas laterais, onde internamente estão duas alças menores (*B-loop* e *C-loop*) (RADCHENKO e MERRICK, 2011).

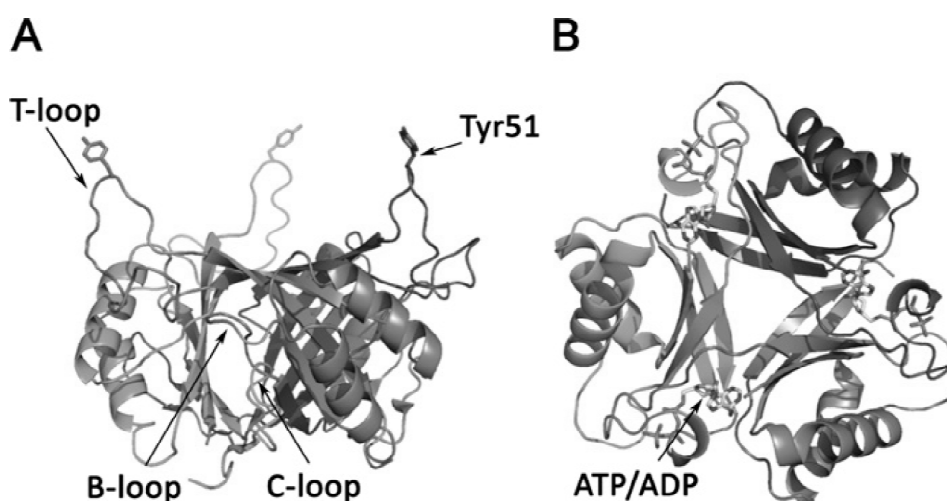


FIGURA 8 - MODELO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA GLNK DE *E. coli*. EM DIFERENTES ÂNGULOS. (A) CONFORMAÇÃO DOS T-LOOPS E DA POSIÇÃO TYR51, O QUAL É O SÍTIO DE URIDILAÇÃO EM MUITAS PROTEÍNAS PII. (B) SÍTIO DE INTERAÇÃO PARA O ATP/ADP LOCALIZADO NA FENDA DA SUBUNIDADE INTERNA.

Fonte: RADCHENKO E MERRICK (2011).

Quanto à sua interação com o ATP, sabe-se que a GlnK possui 3 sítios de ligação para este composto com ligação anti-coperativa (CARR *et al.*, 1996; XU *et al.*, 1998; BONATTO *et al.*, 2012).

O ATP é um nucleotídeo responsável pela transferência de energia intracelular. Ele é composto por uma adenosina ligada a três radicais fosfatos e armazena energia em suas ligações químicas (Figura 9). Em vista de sua função energética, o ATP participa de inúmeras reações químicas e bioquímicas.

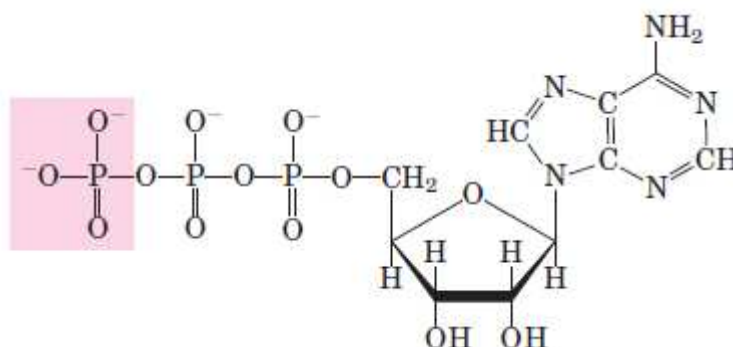


FIGURA 9 - ESTRUTURA QUÍMICA DA ADENOSINA TRIFOSFATO (ATP) EM pH 7,4. FONTE: NELSON E COX (2004).

Estudo realizado por Radchenko *et al.* (2010) mostrou que a proporção entre ATP e ADP no sistema influencia a interação GlnK-ATP. Esse comportamento ocorre visto que ambos os nucleotídeos compartilham o mesmo sítio de interação em GlnK. Em busca de mais dados a respeito do efeito das concentrações dos ligantes sobre a proteína, os autores ainda avaliaram por técnica de ITC as interações entre a GlnK com o ATP ou o ADP em baixa (0,1 mM) ou alta (1 mM) concentração de 2-oxoglutarato (2-OG). Os resultados mostraram que o melhor ajuste para todos os dados foi o modelo de 3 sítios de interação, a interação GlnK-ATP foi favorecida com alta concentração de 2-OG (Figura 10) e a interação GlnK-ADP com baixa concentração de 2-OG (Figura 11). Analisando a Figura 10 e a Tabela 1 percebe-se que a afinidade de ATP por GlnK é aproximadamente 11 vezes maior na presença de alta concentração de 2-OG em relação à baixa. Em relação a ligação ADP-GlnK (Fig. 11 e Tab. 1), os resultados mostraram que o ADP tem afinidade 4 vezes menor em alta concentração de 2-OG comparado

com baixa concentração de 2-OG, ou seja, comportamento similar à interação de ATP. Ao avaliar a ΔG das interações ATP-GlnK e ADP-GlnK, os resultados apresentados corroboraram com os resultados acima.

TABELA 1 - PARÂMETROS TERMODINÂMICOS ENVOLVIDOS NAS INTERAÇÕES DE ATP E ADP COM GlnK DE *E. coli*. EXPERIMENTOS REALIZADOS NA PRESENÇA DE 2-OG EM CONCENTRAÇÕES DE 1 mmol.L⁻¹ E 0,1 mmol.L⁻¹. OS VALORES DE ΔG SÃO A SOMA DOS VALORES DE CADA UM DOS 3 SÍTIOS.

Moléculas ligantes	K _{d1} (μmol.L ⁻¹)	K _{d2} (μmol.L ⁻¹)	K _{d3} (μmol.L ⁻¹)	ΔG (kcal.mol ⁻¹)
ATP				
GlnK/2-OG (1 mmol.L ⁻¹)	7,2 ± 0	28,9 ± 3,4	141,3 ± 41,1	-18,7 ± 0,2
GlnK/2-OG (0,1 mmol.L ⁻¹)	81,2 ± 6,1	36,1 ± 2,3	326,0 ± 76,7	-16,6 ± 0,2
ADP				
GlnK/2-OG (1 mmol.L ⁻¹)	56,9 ± 11,4	135,9 ± 30,2	347,1 ± 48,9	-16,0 ± 0,3
GlnK/2-OG (0,1 mmol.L ⁻¹)	14,9 ± 6,9	90,3 ± 25,1	377,5 ± 16,3	-17,0 ± 0,3

Fonte: Adaptado de Radchenko *et al.* (2010).

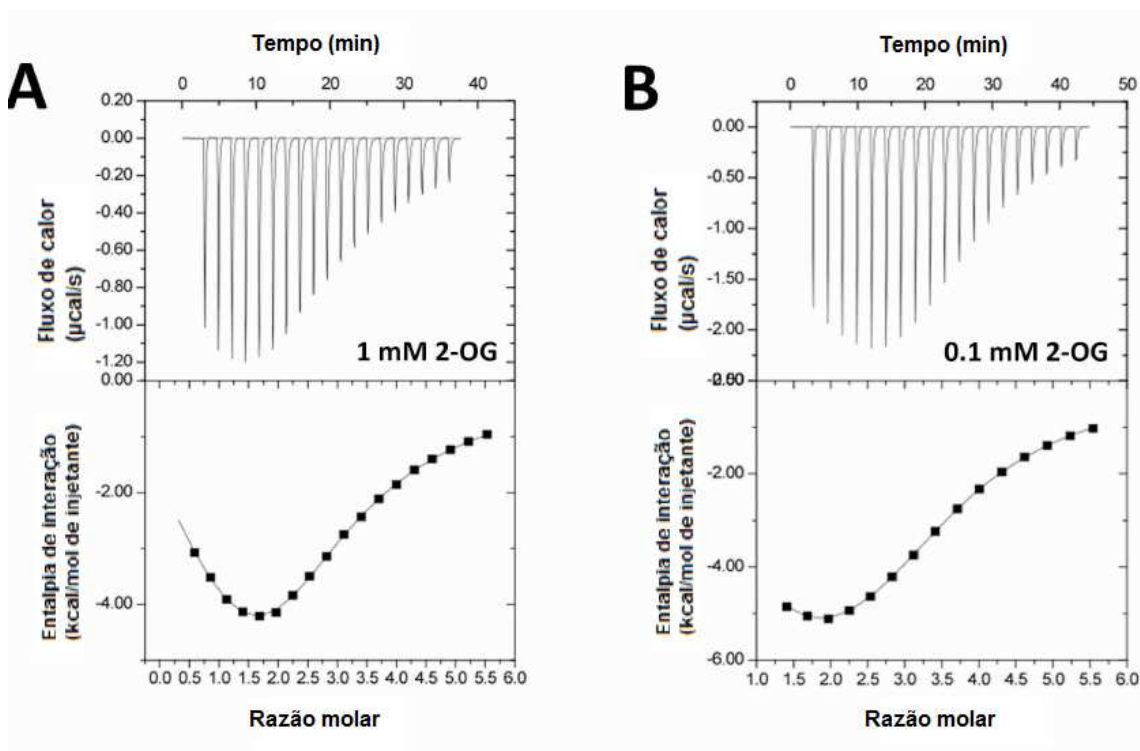


FIGURA 10 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC) PARA A INTERAÇÃO ENTRE ATP E GLNK DE *E. coli* EM PRESENÇA DE 1 mmol.L^{-1} 2-OG (A) E $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ 2-OG (B).
Fonte: RADCHENKO *et al.* (2010).

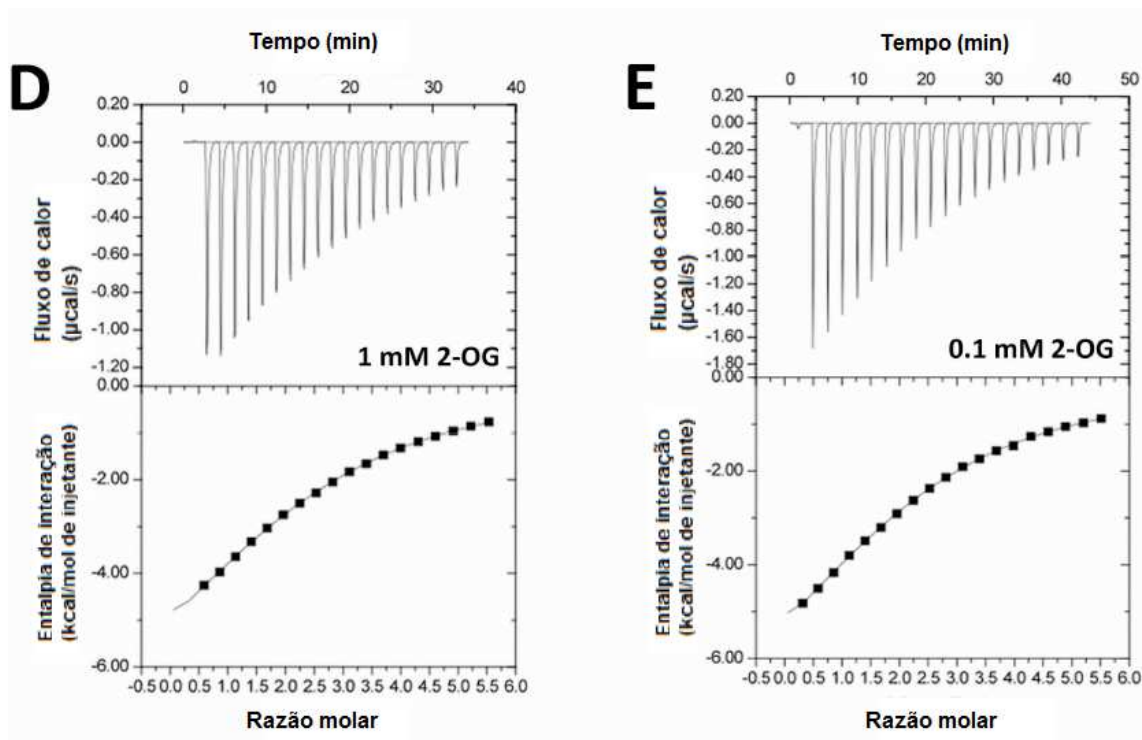


FIGURA 11 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC) PARA A INTERAÇÃO ENTRE ADP E GLNK DE *E. coli* EM PRESENÇA DE 1 mmol.L^{-1} 2-OG (D) E $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ 2-OG (E).
Fonte: RADCHENKO *et al.* (2010).

2.4 Análises térmicas

Para se entender melhor alguns processos e reações químicas que ocorrem entre ligantes de pequeno tamanho e entre algumas macromoléculas, o estudo das interações moleculares e dos dados dos parâmetros termodinâmicos envolvidos na ligação se torna necessário.

Os parâmetros termodinâmicos de entalpia (ΔH), energia livre de Gibbs (ΔG), entropia (ΔS), constante de afinidade (K_A) e capacidade calorífica (C_p) são importantes na determinação das forças que governam as interações moleculares (PEROZZO *et al.*, 2004),

O ΔH é o calor gerado ou absorvido durante o evento de associação entre dois compostos. O K_A fornece informações sobre a afinidade entre os ligantes e está diretamente relacionado com a energia de Gibbs ($K_A = e^{-\Delta G/RT}$). A energia de Gibbs prevê a espontaneidade do processo e está relacionada com a entalpia e a entropia do processo por meio da relação $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ (FREIRE, 2004).

Há duas formas de obtenção do ΔH envolvido na interação entre compostos, a técnica de ITC e a formulação termodinâmica de van't Hoff (Equação 1).

van't Hoff:

$$\begin{aligned} \frac{d \ln K}{d T} &= \frac{\Delta H^0}{RT^2} \\ \ln \frac{K_2}{K_1} &= \frac{\Delta H^0}{R} \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \\ \ln K &= -\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta S}{R} \\ \Delta G^0 &= -RT \cdot \ln K \end{aligned} \quad (1)$$

A técnica de ITC possui as vantagens de ser uma medida direta, permitir a medida do K_A e da estequiometria da reação, e com esses dados ainda podem ser calculados o ΔS e o ΔG (modelos matemáticos) (HOLDGATE e WARD, 2005).

Como foi visto acima, o estudo das interações moleculares e dos parâmetros termodinâmicos é importante na compreensão da interação entre determinados sistemas. As técnicas calorimétricas são ferramentas muito valiosas nessa área. Neste contexto o próximo capítulo irá abordar o ITC, técnica que foi utilizada no desenvolvimento deste trabalho.

2.4.1 Técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Esta seção apresentará os fundamentos da técnica calorimétrica de ITC em estudos de determinação de parâmetros termodinâmicos com proteínas.

2.4.1.1 Fundamentos da técnica de ITC

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma técnica calorimétrica que permite medir os parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação entre moléculas. O método permite a obtenção do perfil termodinâmico do complexo formado a partir da determinação de três parâmetros: variação da entalpia (ΔH), constante de ligação (K_A) e estequiometria da reação (n) (PEROZZO *et al.*, 2004). Ainda podem ser calculados por meio de relações termodinâmicas (Equação 2) mais duas propriedades: a variação de entropia (ΔS) e a energia livre de Gibbs (ΔG) (HOLDGATE e WARD, 2005).

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S \quad (2)$$

O equipamento é composto por duas células, uma para a amostra e outra para a referência, sendo ambas envoltas por uma camisa adiabática. A seringa responsável pela titulação do ligante na célula com amostra e sensores de temperatura responsáveis por determinar a diferença de temperatura entre as duas células. A Figura 12 mostra um esquema dos componentes do ITC.

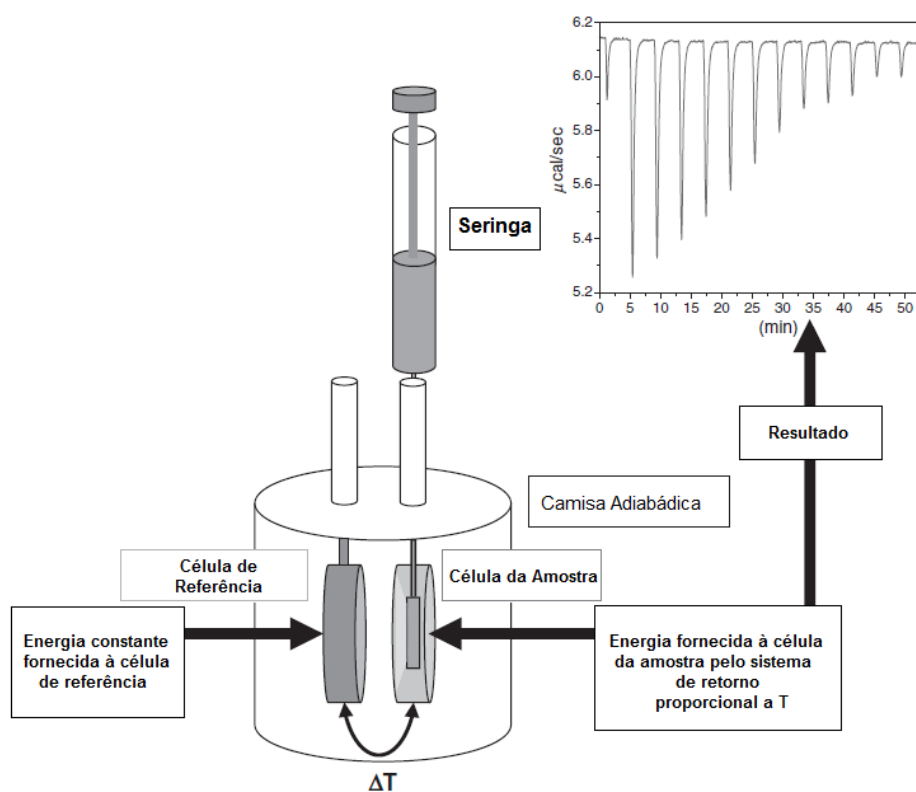


FIGURA 12 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO CALORÍMETRO DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA

Fonte: Adaptado de Freyer e Lewis (2008).

Durante a análise de ITC são realizadas sucessivas injeções da solução presente na seringa e as mudanças na temperatura da célula são registradas. O equipamento mede a energia necessária para manter as condições isotérmicas entre as duas células a partir de um sistema de compensação de potência semelhante ao presente no DSC de compensação de potência. No tratamento dos dados, a potência ($\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$) é analisada em relação ao tempo (min) e são observados picos de fluxo de energia por tempo. A partir deste perfil térmico é obtida a entalpia de ligação do complexo formado. Ao se plotar a energia de formação em relação à razão molar do ligante com a molécula a

isoterma de ligação é obtida e fornece informações de entalpia (ΔH), constante de ligação (K_a) e a estequiometria da ligação (n) (NÚÑEZ *et al.*, 2012). A Figura 13 apresenta um exemplo dos dois gráficos construídos a partir da análise do ITC. São observados os parâmetros de ΔH , estequiometria da reação e afinidade obtidos graficamente.

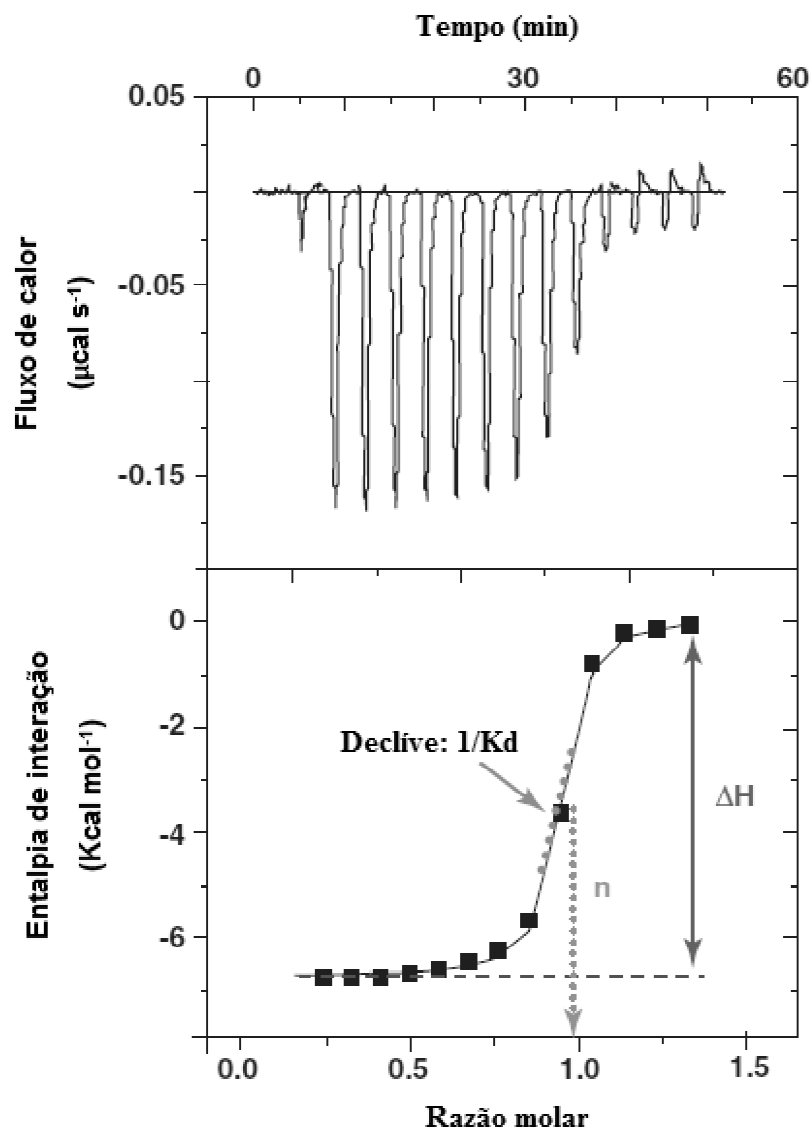


FIGURA 13 - EXEMPLO DA OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS POR MEIO DA CURVA DE ITC.

FONTE: Adaptado de Nunez *et al.* (2012).

2.4.1.2 Aplicações da técnica de ITC em sistemas proteicos:

Na literatura podem ser encontrados estudos abordando a interação molecular e os parâmetros termodinâmicos de alguns sistemas.

Anbazhagan *et al.* (2011) estudaram as interações da proteína PDC-109 (principal proteína do plasma seminal bovino) com diferentes fosfolípidios (dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPG) e dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)), por metodologia de ITC. Os experimentos foram realizados em duplicata e foram obtidos os perfis termodinâmicos para todos os complexos formados. No caso do complexo PDC-109 com DMPC em temperatura de 20 °C os resultados foram: $\Delta H = 4,5 \pm 0,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$, $K = 4,1 \pm 1,5 \text{ M}^{-1}$, $n = 7,2 \pm 0,3$, $\Delta G = -7,52 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $\Delta S = 40,8 \pm 1,8 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$. Os resultados obtidos indicam que como os valores de ΔH e ΔS são positivos a reação é entropicamente favorecida.

Bonatto *et al.* (2012) avaliaram a interação entre a proteína GlnK em uma solução a $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ e ATP em uma solução a 3 mmol.L^{-1} utilizando a técnica de ITC. O modelo de três sítios foi utilizado para ajustar os dados experimentais (Figura 14). Os valores obtidos para as constantes de dissociação (K_d) foram de $3,4 \text{ }\mu\text{M}$, $60 \text{ }\mu\text{M}$ e $160 \text{ }\mu\text{M}$.

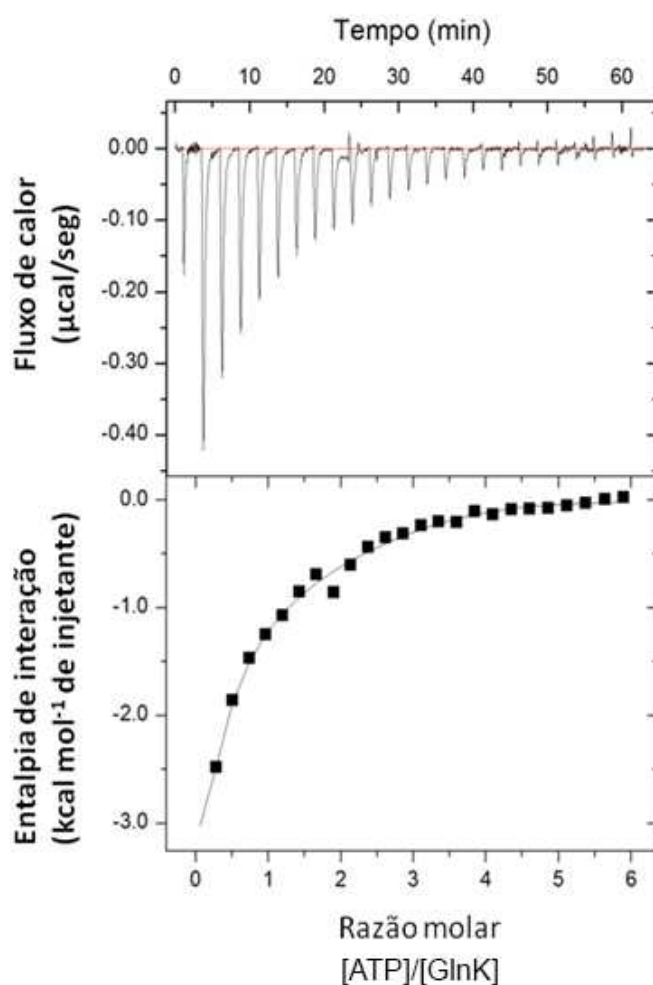


FIGURA 14 - INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA GLNK EM UMA SOLUÇÃO A $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ E ATP EM UMA SOLUÇÃO A 3 mmol.L^{-1} NO ITC. AJUSTE DO MODELO DE TRÊS SÍTIOS AOS DADOS EXPERIMENTAIS.
 FONTE: BONATTO *et al.* (2012).

Rispens *et al.* (2008) estudaram a interação entre a proteína Imunoglobulina G com o sulfonato de naftaleno-1-8-anilino (sonda fluorescente) e como o sistema é influenciado pela temperatura e concentração de NaCl nas amostras. As interações foram avaliadas por meio da técnica de ITC e são apresentadas na Figura 15. Os autores verificaram mudanças na conformação da proteína após o tratamento térmico ($63 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min). O calor de interação entre as amostras submetidas ao tratamento térmico foi superior as que não foram.

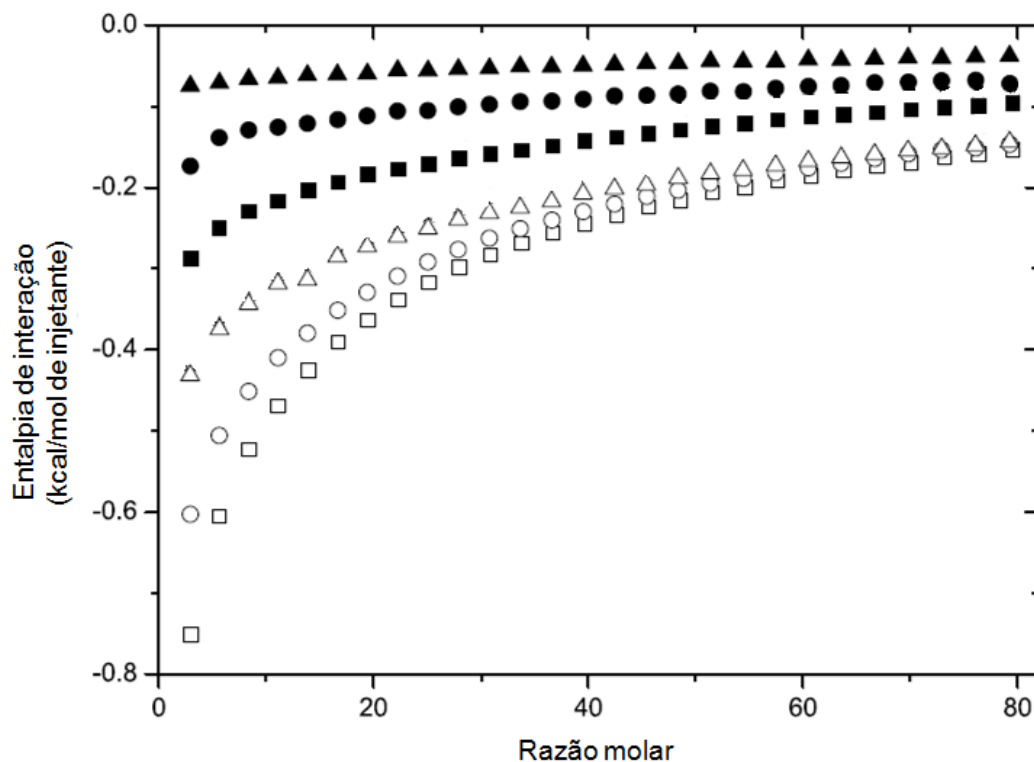


FIGURA 15 - INTERAÇÃO ENTRE A IMUNOGLOBULINA G COM O SULFONATO DE NAFTALENO-1-8-ANILINO POR ITC. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: ■, □, 10 mmol.L⁻¹ DE ACETATO (PH 4,5); ●, ○, 10 mmol.L⁻¹ DE ACETATO (PH 4,5) COM 10 mmol.L⁻¹ DE NACL; ▲, △, 10 mmol.L⁻¹ DE ACETATO (PH 4,5) COM 10 mmol.L⁻¹ DE NACL. OS SÍMBOLOS ABERTOS SÃO REFERENTES ÀS AMOSTRAS SUBMETIDAS À TRATAMENTO TÉRMICO (63 °C POR 30 MIN) E AS FECHADAS AS QUE NÃO FORAM SUBMETIDAS (30 °C).

Fonte: Adaptado de Rispens *et al.* (2008).

Dimitrova *et al.* (2002) estudaram por ITC as propriedades das ligações entre três proteínas globulares (albumina de soro bovino, lisozima e citocromo c) com lipossomas de fosfatidilcolina. As análises foram realizadas em pH 7,5 e 30 °C. Os resultados são apresentados na Figura 16. Foi observado que todas as interações apresentaram picos exotérmicos e que ocorreu uma distinta diferença na saturação entre as três amostras. Os gráficos de ΔH em função da razão molar indicam que as amostras de albumina de soro bovino e de lisozima alcançaram uma saturação em torno de 200/1 enquanto que para o citocromo c a saturação foi atingida em uma razão molar maior do que 300/1. Quanto ao valor de calor de interação este foi diferente para todas as amostras indicando que estas ocorriam por diferentes mecanismos.

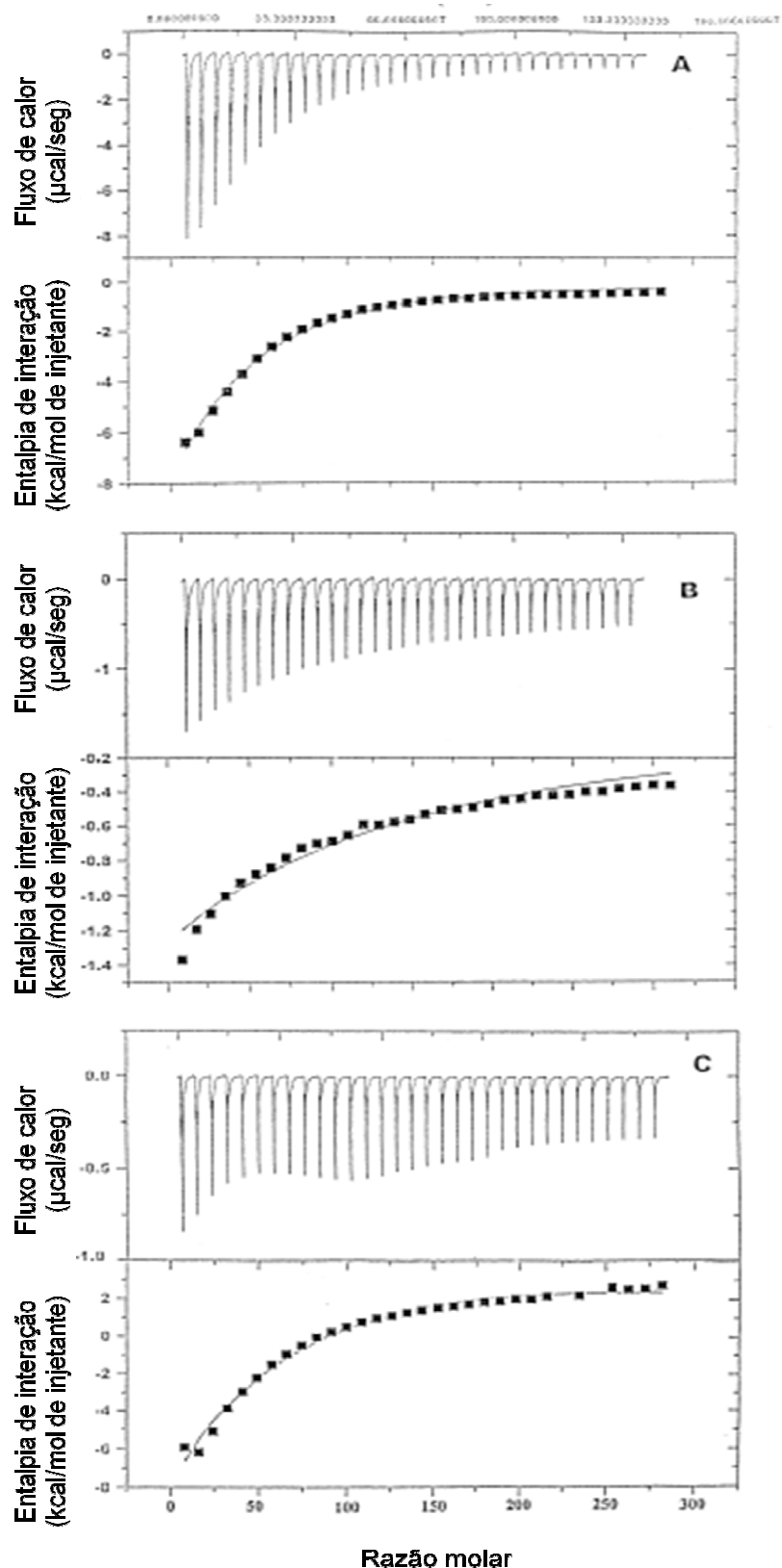


FIGURA 16 - ANÁLISE DE ITC DA INTERAÇÃO ENTRE UMA SOLUÇÃO DE LIPOSSOMAS COM SOLUÇÕES DE ALBUMINA DE SORO BOVINO (A), LISOZIMA (B) E CITOCROMO C (C). OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS EM PH 7,5 E TEMPERATURA DE 30 °C.

Fonte: Adaptado de Dimitrova *et al.* (2002).

2.5 Considerações finais da Revisão da Literatura

Este capítulo teve por objetivo relatar o estado da arte acerca de como o processo de congelamento afeta sistemas proteicos, com maior enfoque na proteína GlnK (proteína utilizada neste trabalho).

Além disso, foi realizada uma abordagem acerca de crioprotetores, que são substâncias que auxiliam no processo de congelamento, em especial o ALB e o glicerol, os aditivos empregados no trabalho. E para finalizar foi apresentado um pouco sobre a técnica de ITC e como a técnica auxilia no estudo do comportamento das proteínas.

Na literatura foram encontrados poucos trabalhos acerca da utilização do ALB no auxílio ao processo de congelamento, portanto, há a necessidade de mais estudos a respeito de suas propriedades crioprotetoras. Quanto as alterações causadas nas proteínas por processo de congelamento, foram encontrados muitos trabalhos na literatura. Entretanto, em nenhum destes trabalhos foi feita a utilização da técnica de ITC, o que motivou a realização deste trabalho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais e equipamentos

A proteína GlnK de *Herbaspirillum seropedicae* foi escolhida como matriz proteica modelo neste trabalho em razão de sua disponibilidade, estrutura conhecida e por sua interação com a adenosina trifosfato no ITC já estar descrita na literatura (BONATTO *et al.*, 2012; XU *et al.*, 1998). O plasmídeo pEMB200 (BONATTO *et al.*, 2007), que expressa a proteína GlnK de *Herbaspirillum seropedicae* a partir do promotor T7, foi fornecido pelo Núcleo de Fixação de Nitrogênio da UFPR. O antibiótico canamicina, IPTG, cloreto de magnésio ($MgCl_2$), triptona, cloreto de cálcio ($CaCl_2$), glicerol, tris(hidroximetil)aminometano (Tris), cloreto de sódio (NaCl) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Para o preparo das soluções foi utilizada água tipo 1 e todos os reagentes foram de grau analítico. Os equipamentos utilizados na obtenção da proteína foram centrífuga, banho térmico, estufa, sonicador, cromatógrafo FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) AKTA (GE Healthcare), coluna de Hi-Trap-Heparin (GE Healthcare).

O SDS-PAGE foi realizado em unidade de eletroforese vertical Bio-Rad seguindo orientações do fabricante. Os reagentes acrilamida, SDS, glicerol, azul de bromofenol, Tris, β -mercaptoetanol, Coomassie Blue R-250, metanol e ácido acético foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Para aquisição de imagem foi utilizado o fotodocumentador "UVP Epi Chemi II *Darkroom*".

A quantificação das proteínas foi realizada em espectrofotômetro Nano Drop (modelo Nanodrop2000 da *Thermoscientific*). Os procedimentos de obtenção da GlnK, análises de eletroforese e quantificação da proteína foram realizados no Núcleo de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica da UFPR.

As diálises das soluções foram realizadas em membrana de porosidade de 12 kDa (*Sigma-Aldrich*) submetidas a agitação constante em agitador magnético em temperatura de 5 °C em geladeira.

Os ensaios de congelamento foram realizados em freezer com temperatura fixada em $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ e as amostras de proteína GlnK, foram congeladas em tubos de polipropileno de 1,5 mL (*Eppendorf*). Os aditivos crioprotetores utilizados nesses ensaios foram o glicerol ($\geq 99\%$ Carlo Erba) e o ácido lactobiônico (97 % *Sigma-Aldrich*).

As análises de interação entre a proteína GlnK submetida a diferentes condições de congelamento com o ligante ATP ($\geq 99\%$ Sigma-Aldrich) foram realizadas no equipamento ITC₂₀₀ da Microcal (Brasil). E os resultados foram tratados com o software Origin 7.0.

Os procedimentos de diálise e congelamento foram realizados nos laboratórios LATOS e de Análise de Alimentos e as análises de ITC na Central Analítica, ambos do programa de pós graduação em Engenharia de Alimentos da UFPR.

3.2 Métodos

3.2.1 Purificação da proteína GlnK de *Herbaspirillum seropedicae*

3.2.1.1 Transformação do plasmídeo

Para a expressão da proteína GlnK de *Herbaspirillum seropedicae*, o plasmídeo pEMB200 foi transformado em células de *E. coli* BL21 termocompetentes. Para o preparo de células termocompetentes, um pré-inóculo de 3 mL da célula foi crescido sob agitação durante a noite em meio LB. O meio LB foi preparado com $5,0\text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura, 10 g.L^{-1} de cloreto de sódio (NaCl) e 10 g.L^{-1} de triptona. O inóculo foi preparado a partir de $400\text{ }\mu\text{L}$ de pré-inóculo em 40 mL de meio LB, em frasco erlenmeyer de 250 mL e incubado até atingir DO_{600} entre 0,4 e 0,6. A cultura de células foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O “pellet” de células foi então ressuspensão em aproximadamente 12 mL de

solução de MgCl_2 100 mmol.L^{-1} gelada estéril, levando de 3 a 5 minutos para esse procedimento. As células foram novamente coletadas por centrifugação por 10 minutos a 4000 rpm e então o sobrenadante descartado. O "pellet" foi ressuspensão em aproximadamente 5 mL de solução de CaCl_2 100 mmol.L^{-1} gelada estéril. Após a ressuspensão mais 25 mL de solução de CaCl_2 foi adicionada. Essa suspensão foi mantida em gelo por pelo menos 20 minutos e então novamente centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ressuspensão em 1 mL de solução de CaCl_2 100 mmol.L^{-1} em 15% de glicerol gelado estéril. As células foram divididas em alíquotas de 100 μL e estocadas a -80°C até o momento do uso.

Para a transformação as células foram misturadas com 5 μL de DNA plasmidial e a mistura mantida em gelo por 30 minutos. Após esse tempo, a mistura foi submetida a um choque térmico a 42°C por 90 segundos e em seguida por 2 minutos em gelo novamente. Essa mistura foi ressuspensa em meio LB e incubada em estufa a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, estas células foram plaqueadas em meio sólido seletivo contendo o antibiótico canamicina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

3.2.1.2 Expressão e purificação da proteína GlnK

Três colônias da célula BL21 transformada com o plasmídeo pEMB200 de acordo com o item 3.2.1.1 foram inoculadas em 50 mL de meio LB e incubadas "overnight" durante a noite a 37°C com agitação constante (*Shaker New Brunswick C25 Incubator*). Vinte mililitros desta cultura fresca saturada foram inoculados em 2 L de LB. As células foram mantidas sob agitação a 37°C até DO_{600} em torno de 0,5, quando então a expressão da proteína foi induzida com 0,5mM de IPTG durante 3 horas. Após indução as células foram coletadas por centrifugação e o "pellet" estocado a -20°C até o momento do uso.

O "pellet" de células foi ressuspensão em 30 mL do tampão PP1 (50 mmol.L^{-1} Tris-Cl pH 8,0; 50 mmol.L^{-1} NaCl; 5% glicerol). As células foram lisadas por sonicação e o extrato total de proteínas foi aquecido em banho-maria a 70°C por 15 minutos. Esse extrato foi então centrifugado a 15000 rpm

a 4°C durante 30 minutos. A purificação foi realizada em cromatógrafo FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) AKTA (GE *Healthcare*). O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi aplicado em uma coluna de Hi-Trap-Heparin de 5 mL (GE *Healthcare*) pré-equilibrada com 3 volumes de tampão PP1. A injeção das proteínas solúveis na coluna foi feita em um fluxo de 1 mL.min⁻¹. Em seguida, a coluna foi lavada com 3 volumes de tampão PP1, em um fluxo de 2 mL.min⁻¹. As proteínas adsorvidas foram eluídas em 10 volumes de coluna em gradiente crescente de NaCl (50-1000 mmol.L⁻¹). As frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE. As proteínas purificadas foram dialisadas contra tampão (50 mmol.L⁻¹ TRIS pH 8,0; 100 mmol.L⁻¹ NaCl; 5 mmol.L⁻¹ MgCl₂).

3.2.2 Eletroforese de proteína em gel desnaturante Tris-Glicina

A eletroforese das frações de proteína foi realizada em gel de poliacrilamida desnaturante conforme protocolo descrito por Laemmli (1970). A concentração do gel separador utilizado em todas as eletroforeses de proteína realizadas foi de 12% (m/v) e do gel de empilhamento foi de 4%. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo orientação do fabricante (BioRad). As amostras foram misturadas com tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol.L⁻¹ de Tris-HCl pH6,8, 5% de β-mercaptoetanol) e fervidas antes da aplicação. A corrida foi realizada aplicando-se uma voltagem de 200 V, utilizando o tampão Laemmli (3 g.L⁻¹ de Tris-base, 14 g.L⁻¹ de glicina e 1 g.L⁻¹ de SDS). Após a eletroforese, as proteínas presentes no gel foram coradas com corante Coomassie Blue R-250 e descorados em uma solução com 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético.

3.2.3 Quantificação de proteínas

Após a purificação da proteína GlnK, a mesma foi quantificada por espectrofotometria no UV no equipamento Nano Drop (modelo Nanodrop2000 da *Thermoscientific*).

Nessa metodologia, a concentração das amostras é determinada por meio da lei de Lambert-Beer à 280 nm (Equação 3).

$$A = \epsilon IC \quad (3)$$

onde ϵ é o coeficiente de absorção molar (mol.L.cm^{-1}), l é o caminho ótico (cm), e C é a concentração da proteína (mol.L^{-1}) (NOBLE e BAILEY, 2009; PACE *et al.*, 1995).

No comprimento de onda próximo a 280 nm as proteínas apresentam uma absorção ultravioleta característica. A absorção é referente à presença das cadeias laterais aromáticas de aminoácidos (NOBLE e BAILEY, 2009). O branco utilizado foi a solução tampão na qual a proteína foi dialisada.

Os dados utilizados para o cálculo da concentração da proteína (coeficiente de extinção molar e massa molar) foram estimados pelo *software online Protparam* (GASTEIGER *et al.*, 2005).

3.2.4 Procedimento de diálise das soluções contendo GlnK para análises de ITC

O procedimento de diálise para as amostras avaliadas no ITC foi desenvolvido com base em ensaios preliminares e permitiu a obtenção de dados mais precisos, como descrito por Freyer e Lewis (2008). Neste trabalho a diálise teve como objetivo remover o excesso de sal na amostra resultante do processo de purificação da proteína GlnK. Além disso, este procedimento propiciou a produção de um meio com características semelhantes tanto na solução de proteína (GlnK), quanto na solução do ligante (ATP), uma vez que

solução externa à membrana de diálise foi utilizada no preparo das solução de ATP. Este procedimento evitou nos ensaios de ITC variações de entalpia decorrentes da interação entre os solventes.

O sistema de diálise foi composto por um sistema de proteína e um sistema tampão. O sistema de proteína foi constituído de aproximadamente 3 mL de solução de GlnK purificada, posicionada no interior de uma membrana de diálise com limite de exclusão de 12 kDa (*Sigma-Aldrich*). A proteína foi dialisada contra 900 mL de tampão com composição (50 mmol.L⁻¹ Tris-Cl pH 8,0; 100 mmol.L⁻¹ NaCl; 5 mmol.L⁻¹ MgCl₂). Para os ensaios com a proteína GlnK na presença de aditivos, a composição dos tampões utilizados foram respectivamente de (50 mmol.L⁻¹ Tris-Cl pH 8,0; 100 mmol.L⁻¹ NaCl; 5 mmol.L⁻¹ MgCl₂; ALB 10 mmol.L⁻¹) e (50 mmol.L⁻¹ Tris-Cl pH 8,0; 100 mmol.L⁻¹ NaCl; 5 mmol.L⁻¹ MgCl₂; glicerol 10%) para os aditivos ALB e glicerol. O sistema de diálise permaneceu a 5 °C, sob agitação constante por 16 horas para garantir o equilíbrio do sistema.

Ao final do processo a proteína foi retirada da membrana, quantificada por espectrofotometria e armazenada em frascos esterilizados de polietileno à 5 °C por um período de até 3 semanas. O tampão resultante da diálise foi utilizado para dissolver os ligantes para as análises de ITC.

3.2.5 Interação entre a proteína GlnK e o ATP avaliado por ITC

A metodologia desenvolvida para as análises de ITC foi baseada no trabalho de Bonatto *et al.*, (2012), o qual utilizou o modelo VP-ITC (MicroCal). Neste trabalho, os experimentos foram conduzidos no ITC₂₀₀ da *Microcal*. A temperatura foi fixada em 20 °C e a agitação foi mantida constante em 300 rpm. A célula de referência foi preenchida com 200 µL de água deionizada tipo 1, enquanto a célula da amostra foi preenchida com o mesmo volume de solução de proteína GlnK 0,1 mmol.L⁻¹ dialisada. A solução de ATP 3 mmol.L⁻¹ foi injetada na célula da amostra a partir da seringa de injeção com 40 µL de capacidade. A titulação foi realizada com uma primeira injeção de 0,4 µL da solução de ATP, a qual é descartada e tem o objetivo de eliminar efeitos de

gases dissolvidos e de impurezas entre as soluções da seringa e da célula. Na sequência foram realizadas 24 injeções sucessivas de 1,5 μL da solução de ATP na célula contendo GlnK. O tempo de cada injeção foi de 3 s e o intervalo entre elas de 150 s. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.2.6 Congelamento e descongelamento das soluções proteicas de GlnK

Para a avaliação dos ciclos de congelamento foram utilizadas alíquotas (400 μL) da solução de proteína GlnK 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ dialisada. As amostras foram separadas em tubos de polipropileno de 1,5 mL e submetidas a um e dois ciclos de congelamento. A temperatura do freezer foi fixada em $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ e os tempos de congelamento e descongelamento das amostras foram, respectivamente, de 1 hora e 10 minutos. Após o tratamento térmico, as soluções de proteína descongeladas foram tituladas com solução de ATP 3 m.mol.L^{-1} por ITC conforme descrito na seção 3.2.5. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.2.7 Adição de crioprotetores nas interações moleculares de complexos formados por GlnK e ATP (ITC)

Os crioprotetores utilizados neste trabalho foram o glicerol e o ALB. As concentrações finais dos aditivos nas soluções utilizadas foram de 10 % para o glicerol e 10 mmol.L^{-1} para o ALB. As soluções de proteína GlnK purificada foram dialisadas contra tampão contendo glicerol (50 mmol.L^{-1} Tris-Cl pH 8,0; 100 mmol.L^{-1} NaCl; 5 mmol.L^{-1} MgCl_2 ; glicerol 10%) ou tampão contendo ALB (50 mmol.L^{-1} Tris-Cl pH 8,0; 100 mmol.L^{-1} NaCl; 5 mmol.L^{-1} MgCl_2 ; ALB 10 mmol.L^{-1}) e diluídas para concentração final 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Após a diálise, as amostras foram submetidas aos ciclos de congelamento, conforme descrito no item 3.2.6, sendo a interação da GlnK com o ATP foi avaliada conforme descrito no item 3.2.5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são avaliadas as interações moleculares entre a proteína GlnK e o ATP e o efeito dos ciclos de congelamento e da presença de agentes crioprotetores (glicerol e ácido lactobiônico) nestas interações. Neste sentido os resultados são apresentados na seguinte forma:

- Purificação da proteína GlnK por FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*);
- Análise de eletroforese das frações de GlnK obtidas no processo de purificação e quantificação da GlnK por espectrofotometria;
- Avaliação da interação da proteína GlnK com o ATP por ITC;
- Efeito do congelamento sobre a estrutura da GlnK avaliado por meio da interação GlnK-ATP (ITC);
- Efeito do ALB e do glicerol na interação GlnK-ATP antes e após os ciclos de congelamento (ITC).

4.1 Purificação da proteína GlnK da *Herbaspirillum seropedicae* por FPLC

A expressão e a purificação da proteína GlnK de *H. seropedicae* foram realizadas no laboratório INCT do Departamento de Bioquímica da UFPR. Nas etapas de expressão e purificação da proteína GlnK o plasmídeo pEMB200 foi transformado em células de *E. coli* BL21 sendo na sequência purificada por FPLC de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.1.1.

Após a obtenção do extrato bruto de proteína, foi realizada a purificação em coluna de Heparina (*HiTrap GE Healthcare*) empregando o sistema FPLC. Por meio dessa técnica foram obtidas 20 frações de proteínas, que foram eluídas em um gradiente crescente de NaCl (50-1000 mmol.L⁻¹).

O cromatograma gerado no FPCL da purificação da proteína GlnK de *H. seropidicae* pode ser observado na Figura 17. A presença de proteínas nas amostras é evidenciada pela absorvância da luz ultravioleta (280 nm), cujo perfil está indicado pela curva azul. A curva em verde indica o gradiente de concentração de sal que compete com a proteína pela ligação na coluna. À medida que se aumenta a concentração de sal, as proteínas de interesse são eluídas e coletadas. A curva em laranja representa o fluxo de tampão através da coluna.

Os primeiros 40 mL do cromatograma indicado na Figura 17 correspondem à injeção de proteínas na coluna, e a absorvância observada é devida a eluição das proteínas que não ligam na proteína. A seguir, a coluna foi lavada com 10 mL de tampão PP1. À partir de 50 mL se inicia o gradiente de concentração de sal no tampão (curva verde), momento no qual o NaCl começa a competir com as proteínas pela ligação na coluna, provocando a eluição das proteínas. São nessas frações que a proteína GlnK de interesse está presente.

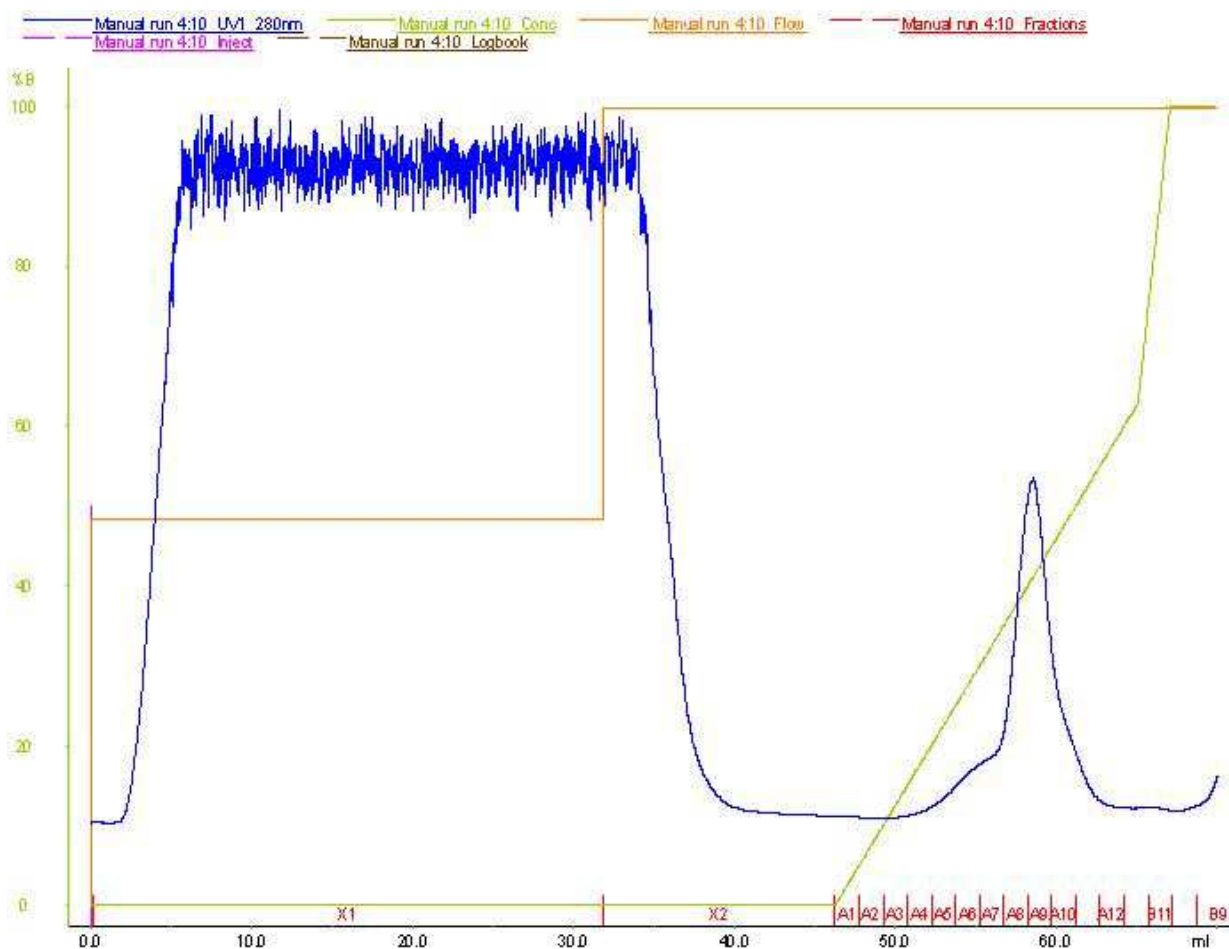


FIGURA 17 - CROMATOGRAMA GERADO PELO FPLC DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnK DE *H. seropedicae*. A CURVA AZUL INDICA A ABSORBÂNCIA EM 280 nm, A VERDE O GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE NaCl E A LARANJA O FLUXO DE TAMPÃO (50 mmol.L⁻¹ TRIS-CI PH 8,0; 50 mmol.L⁻¹ NaCl; GLICEROL 5%).

4.2 Eletroforese das frações de GlnK obtidas no processo de purificação e quantificação da GlnK por espectrofotometria

A eletroforese foi empregada neste trabalho para determinar a pureza das frações obtidas por FPLC. A quantificação de proteína (GlnK) nestas soluções foi determinada por espectrofotometria.

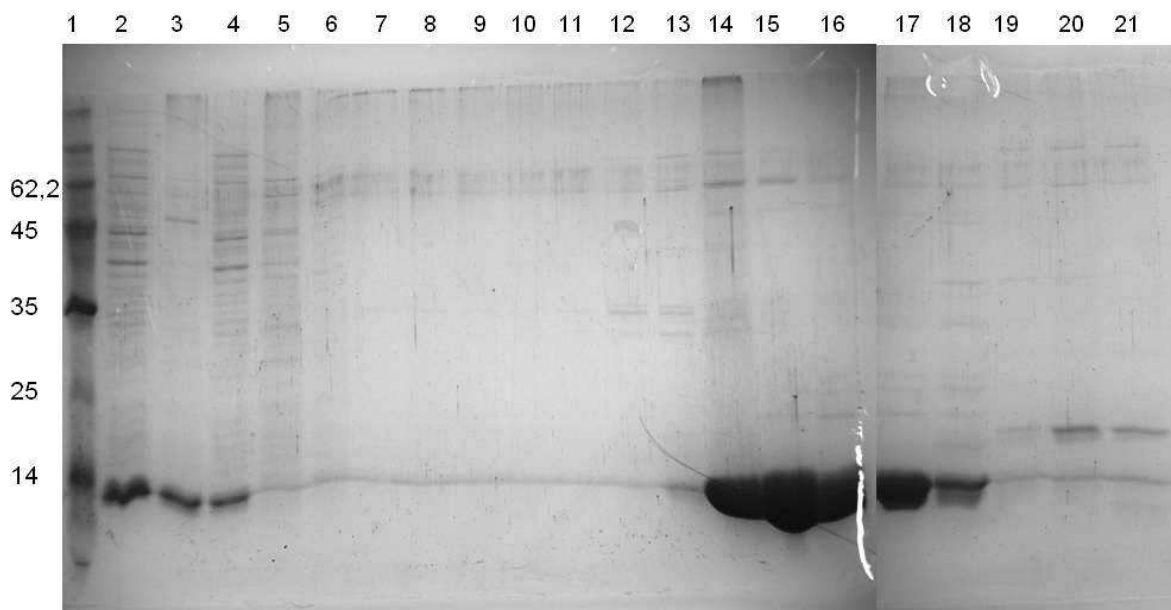


FIGURA 18 - ELETROFORESE DAS FRAÇÕES OBTIDAS NA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnK DE *H. seropedicae* EM COLUNA DE HEPARINA (HITRAP GE HEALTHCARE), EMPREGANDO O GEL SDS-PAGE 12%. PISTA 1 - CONTÉM O MARCADOR DE MASSA MOLAR (GE HEALTHCARE) COM AS RESPECTIVAS MASSAS EM KDa. PISTA 2 – EXTRATO BRUTO; PISTA 3 – PROTEÍNAS SOLÚVEIS; PISTA 4 – PROTEÍNAS INSOLÚVEIS; PISTA 5 – PROTEÍNAS NÃO LIGADAS À COLUNA; PISTA 6 – LAVAGEM DA COLUNA; PISTA 7 A 21 – FRAÇÕES DA ELUIÇÃO COM NaCl (SOLUÇÃO DE GlnK).

É possível observar na Figura 18 o resultado da eletroforese em gel SDS-PAGE 12% para o processo de purificação da proteína GlnK. As colunas, aqui denominadas "pistas", são identificadas pelos números 1 ao 21 e referem-se às amostras em diferentes etapas da purificação por FPLC. A pista 1 contém o marcador de massa molar (GE Healthcare) expressas em kDa. A pista 2 apresenta o extrato bruto de proteínas, a pista 3 apresenta as proteínas solúveis, a pista 4 as proteínas insolúveis, a pista 5 as proteínas não ligadas à coluna, a pista 6 a lavagem da coluna e as pistas 7 a 21 as frações de proteína solúveis que foram eluídas com NaCl, sendo estas últimas as frações ricas em GlnK.

As pistas 14 a 18 são referentes as amostras que foram utilizadas nas análises posteriores. Estas foram escolhidas por estar em quantidade e pureza adequadas para as análises de ITC. Nessas amostras são observadas regiões de grande concentração de proteína, cuja as massas molares são menores que 14 kDa. Essas bandas correspondem aos monômeros da proteína GlnK,

aproximadamente 12 kDa, resultado similar ao apresentado por Bonatto *et al.*, (2007). As soluções contendo as proteínas foram agrupadas, dialisadas por 16 horas contra tampão (50 mmol.L⁻¹ Tris-Cl pH 8,0; 100 mmol.L⁻¹ NaCl; 5 mmol.L⁻¹ MgCl₂) e armazenadas em geladeira.

A determinação da concentração da solução de proteína foi realizada por espectrofotometria UV no equipamento NanoDrop. Os valores específicos para a GlnK de coeficiente de absorção molar (2,98 M⁻¹.cm⁻¹) e massa molar (36 kDa) foram estimados pelo *software online* Protparam (GASTEIGER *et al.*, 2005), com base na sequência de aminoácidos da proteína. Esses dados foram utilizados no espectrofotômetro para a determinação da concentração de proteína na amostra, cujo valor obtido foi de aproximadamente 300 μ.mol.L⁻¹. Após a produção e purificação da GlnK, as amostras foram armazenadas à 5 °C por até 3 semanas para utilização nos ensaios de ITC.

Ao final do processo de expressão e purificação da GlnK, a solução de proteína obtida se mostrou com pureza e concentração adequadas para ser utilizada nas análises de ITC.

4.3 Avaliação da interação entre GlnK-ATP (ITC)

Nos próximos tópicos deste capítulo são apresentados e discutidos os resultados de ITC acerca das interação moleculares entre a GlnK e o ATP, de como a estrutura da GlnK é afetada por ciclos de congelamento e como a presença de aditivos auxilia no processo de congelamento.

Para o sucesso destas análises, alguns ensaios preliminares e o procedimento de diálise se mostraram como etapas importantes, as quais são discutidas a seguir com mais detalhes.

4.3.1 Interação molecular entre a proteína GlnK e o ATP por ITC

Para facilitar o entendimento dos dados obtidos por ITC para os sistemas abordados neste trabalho, esta seção apresentará detalhadamente os resultados obtidos pela técnica para a interação de GlnK-ATP.

Neste ensaio a solução de proteína GlnK na concentração de 0,1 mmol.L⁻¹ alimentada na célula e a solução de ATP 3 mmol.L⁻¹ na seringa durante os experimentos de ITC. Foi realizada uma primeira injeção de 0,4 µL, seguida por 24 injeções de 1,5 µL de ATP em 200 µL de GlnK. Na primeira injeção, normalmente ocorre um erro volumétrico por conta do próprio equipamento. Por conta deste erro, em muitos experimentos, são utilizados volumes menores de amostra nesta injeção (Mizoue e Tellinghuisen, 2004).

Na Figura 19 são apresentados os gráficos referentes ao "branco" gerados a partir da interação entre a solução de ATP com a solução tampão (50 mmol.L⁻¹ Tris-Cl pH 8,0; 100 mmol.L⁻¹ NaCl; 5 mmol.L⁻¹ MgCl₂). Esses dados são descontados dos dados de interação entre a proteína e o ligante para que o calor de diluição não seja computado no resultado final. No gráfico superior são observados os picos referentes aos dados de fluxo de calor (µcal/s) por tempo (min), enquanto que o gráfico inferior é obtido a partir dos dados de energia de ligação com a razão molar entre o complexo. Esses dados representam o calor de diluição envolvido na interação entre a solução de ATP com o solvente. Essa diluição é levemente endotérmica, observada pela direção dos picos, e contribui com menos de 0,2 µcal de calor para cada injeção do ligante.

Na Figura 20 são apresentados os dados referentes a interação entre a proteína GlnK e o ATP (os dados do branco já estão descontados). Observando o sentido do fluxo de calor conclui-se que a reação GlnK-ATP é exotérmica. O primeiro pico apresenta uma menor intensidade em relação ao segundo pico devido ao menor volume de ATP utilizado na injeção. A segunda injeção possui a maior intensidade dos picos. Esse resultado mostra que a cada injeção, diminui-se a quantidade de sítios de ligação para o ATP.

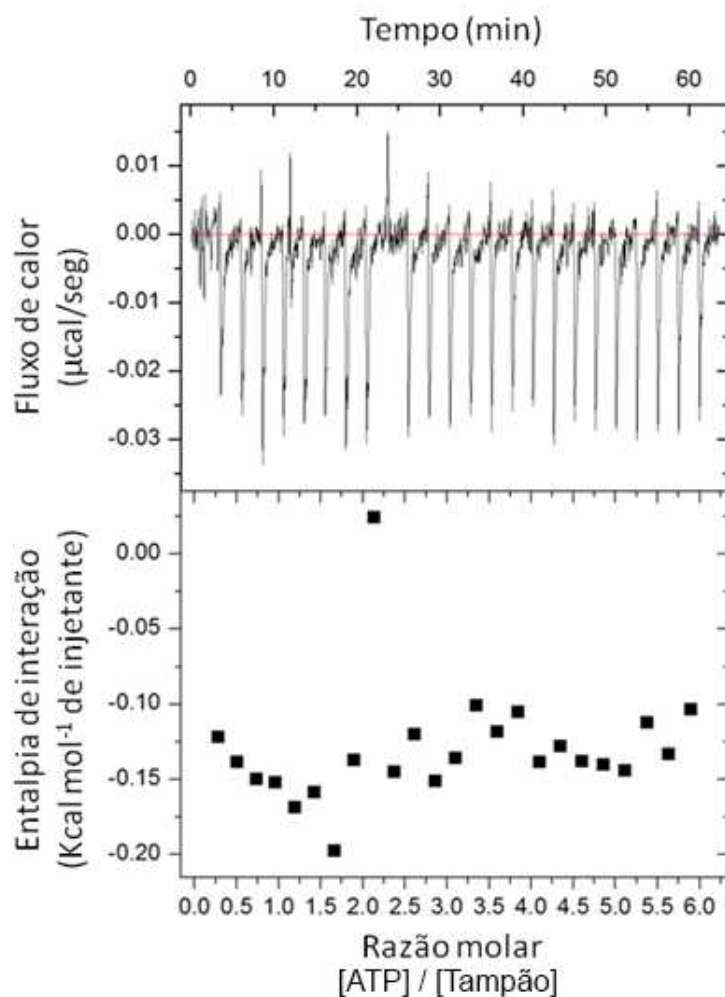


FIGURA 19 - INTERAÇÃO ENTRE UMA SOLUÇÃO DE ATP A 3 mmol.L^{-1} E A SOLUÇÃO TAMPÃO (50 mmol.L^{-1} TRIS-Cl PH 8,0; 100 mmol.L^{-1} NaCl; 5 mmol.L^{-1} MgCl_2) AVALIADA POR ITC. GRÁFICO SUPERIOR: PICOS REFERENTES AOS DADOS DE FLUXO DE CALOR ($\mu\text{cal/s}$) POR TEMPO (MIN). GRÁFICO INFERIOR: DADOS DE ENERGIA DE INTERAÇÃO COM A RAZÃO MOLAR ENTRE OS LIGANTES.

O programa do ITC associado ao Origin 7.0 permite a utilização de modelos matemáticos para ser ajustados aos dados experimentais. Nos modelos, podem ser ainda definidas a quantidade de sítios de ligação disponíveis para a interação. Essa quantidade de sítios é específica para cada ligante. No caso da proteína GlnK, sabe-se que são disponíveis 3 sítios de ligação anti-cooperativa para o ATP (Bonatto *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 1998; Radchenko *et al.*, 2010), o que justificou o emprego do modelo de 3 sítios no ajuste dos dados. Para este modelo, o programa forneceu valores de constante de ligação (K), entalpia de ligação (ΔH) e entropia (ΔS) para cada um dos sítios de ligação.

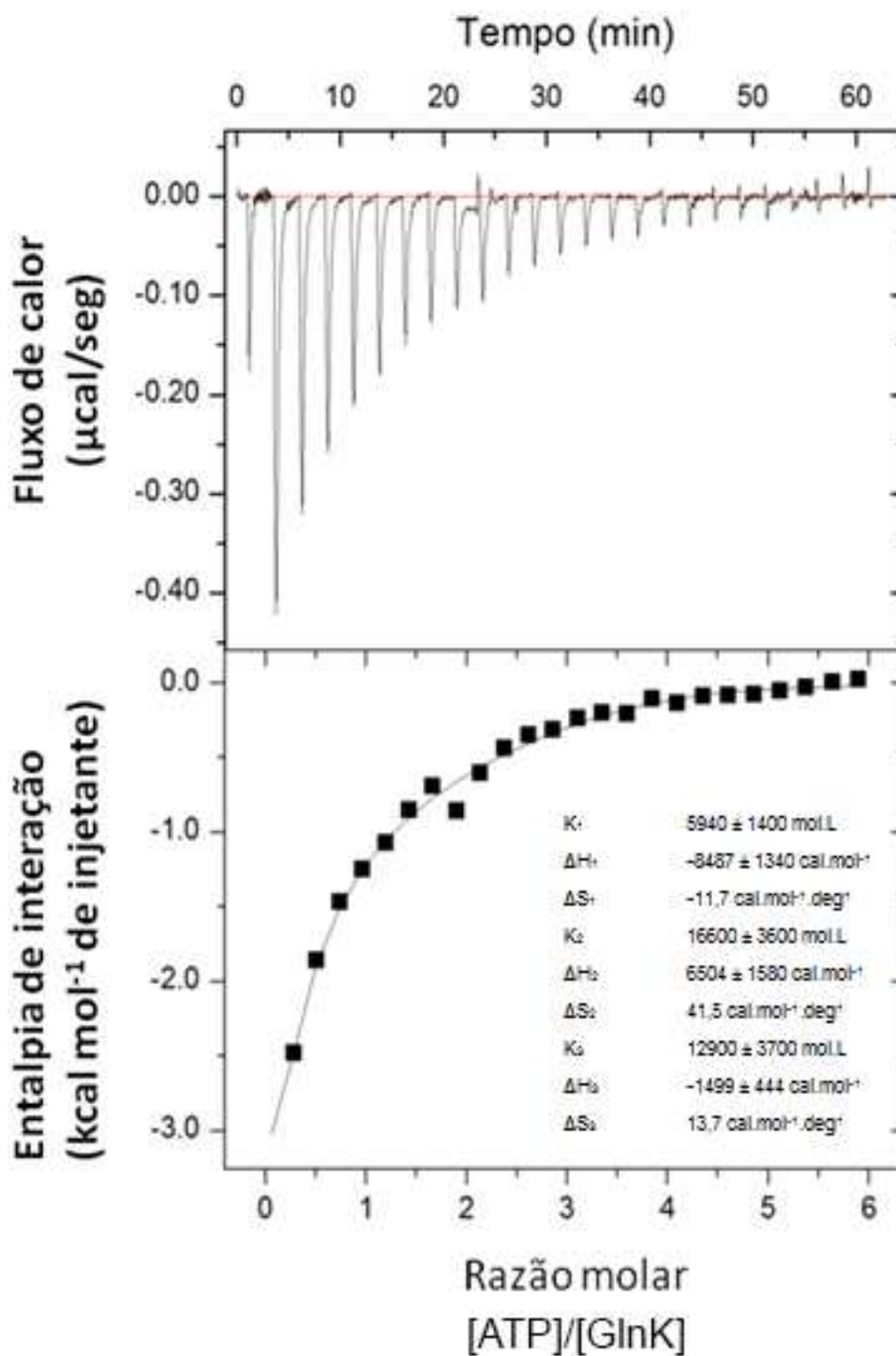


FIGURA 20 - INTERAÇÃO ENTRE UMA SOLUÇÃO DE GLNK A $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ E UMA SOLUÇÃO DE ATP A 3 mmol.L^{-1} AVALIADA POR ITC. GRÁFICO SUPERIOR: PICOS REFERENTES AOS DADOS DE FLUXO DE CALOR ($\mu\text{cal/s}$) POR TEMPO (MIN). GRÁFICO INFERIOR: DADOS DE ENERGIA DE INTERAÇÃO COM A RAZÃO MOLAR ENTRE OS LIGANTES.

Foram calculados os valores das constantes de dissociação (K_D) a partir da Equação 4 e dos valores de constante de afinidade (K_A), sendo K_A os valores mostrados na Figura 20 (K_1 , K_2 e K_3).

$$K_D = \frac{1}{K_A} \quad (4)$$

Os valores de K_D , ΔS e ΔH obtidos para este sistema estão expressos na Tabela 2.

TABELA 2 - PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DE K_D , ΔH E ΔS OBTIDOS DA LIGAÇÃO ENTRE SOLUÇÃO DE GLNK A $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ E UMA SOLUÇÃO DE ATP A 3 mmol.L^{-1} . OS DADOS FORAM OBTIDOS POR MEIO DO MODELO MATEMÁTICO DE 3 SÍTIOS DE INTERAÇÃO NO PROGRAMA ORIGIN 7.0 ASSOCIADO AO ITC₂₀₀.

Parâmetro termodinâmico	Sítio 1	Sítio 2	Sítio 3
K_D ($\mu\text{mol/L}$)	168,4	60,2	78
ΔH (cal/mol)	-8487	6584	1499
ΔS (cal/moldeg)	-11,7	41,5	13,7

Do ponto de vista energético, a interação entre a proteína GlnK e o ATP é exotérmica, ou seja, a interação molecular entre as moléculas possui caráter atrativo. Esse caráter exotérmico é verificado por meio da direção dos picos (Figura 20) e está de acordo com os trabalhos de Bonatto *et al.*, 2012 e Radchenko *et al.*, 2010 que avaliaram a interação da GlnK com o ATP por ITC.

4.3.2 Efeito do congelamento na interação entre GlnK e ATP avaliado por ITC

Com a finalidade de se verificar os efeitos do congelamento sobre a estrutura da proteína GlnK, soluções da proteína à $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ foram submetidas à ciclos de congelamento e suas interações com uma solução de ATP à 3 mmol.L^{-1} foram avaliadas por ITC. Os experimentos foram realizados em duplicata e a média dos valores obtidos são apresentadas na Figuras 21.

As curvas representam os dados das proteínas submetidas aos ciclos de congelamento. É possível observar dois aspectos que diferenciam o comportamento das amostras.

O primeiro trata da diferença na entalpia de interação entre essas amostras. As amostras que não foram congeladas possuem uma variação de entalpia maior do que as congeladas. Na figura os valores de entalpia estão indicados pelas setas. Essa variação na entalpia é causada possivelmente por modificação no mecanismo de interação entre os compostos (Brown *et al.*, 2009). A alteração no mecanismo de interação de proteínas por consequência de um tratamento térmico está de acordo com os resultados de Rispens *et al.* (2008). Neste trabalho os autores verificaram alterações na conformação da proteína Imunoglobulina G após submeter a proteína a tratamento térmico de 63 °C por 30 minutos em relação as amostras mantidas à 30 °C. Foi verificado por meio de análises de ITC que o calor de interação das amostras que foram submetidas ao aumento da temperatura foi maior quando comparado com amostras que não foram submetidas a este tratamento.

Outro aspecto que diferencia as curvas de ITC em relação ao efeito do congelamento é referente a saturação do sistema GlnK-ATP. A quantidade de solução de ATP necessária para saturar o sistema proteico foi menor nas amostras submetidas ao congelamento (1 e 2 ciclos de congelamento). A saturação do sistema foi analisada na Figura 21 como em Dimitrova *et al.* (2002) (Figura 16, página 49). Observa-se que na curva das amostras que não foram submetidas ao congelamento não é possível identificar a saturação do sistema. Entretanto, nas curvas das amostras submetidas a ciclos de congelamento há uma tendência de saturação a partir da razão molar ATP/GlnK de 4,5. Essa mudança na saturação do sistema pode ter ocorrido devido a um processo de desnaturação em que sítios de interação da proteína GlnK possam ter sido prejudicados pelo congelamento.

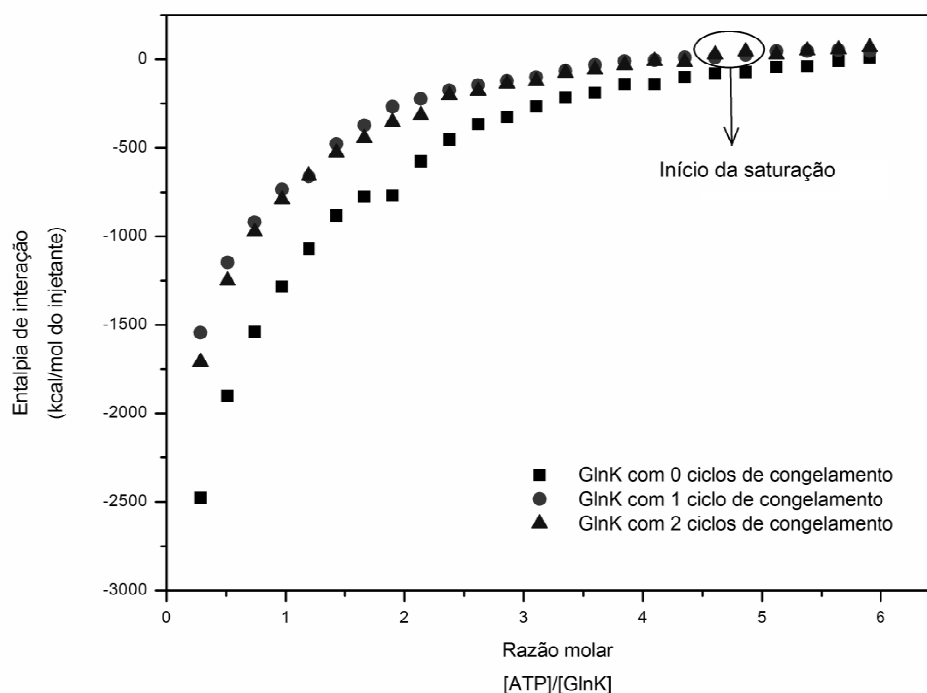


FIGURA 21 - CURVAS DE ITC AVALIANDO O EFEITO DOS CICLOS DE CONGELAMENTO NAS INTERAÇÕES ENTRE AS SOLUÇÕES DE PROTEÍNA GlnK $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ E DE ATP À 3 mmol.L^{-1} . ■ GlnK NÃO SUBMETIDA A CICLOS DE CONGELAMENTO, ● GlnK SUBMETIDA A 1 CICLO DE CONGELAMENTO, ▲ GlnK SUBMETIDA A 2 CICLOS DE CONGELAMENTO.

4.3.3 Efeito dos aditivos ALB e glicerol na estrutura da proteína GlnK submetida à ciclos de congelamento avaliada por ITC

São apresentados na sequência os efeitos dos aditivos ALB e glicerol nas interações entre a proteína GlnK e o ATP antes e após ciclos de congelamento, demonstrando as alterações estruturais na proteína GlnK submetida ao congelamento.

As interações entre as soluções de proteína GlnK à $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ e glicerol 10% submetidas ao congelamento com a solução de ATP à 3 mmol.L^{-1} avaliadas por ITC são mostrados na Figura 22. As curvas de ITC não revelam diferenças significativas entre as amostras analisadas. Dessa forma, não é possível observar efeito crioprotetor do glicerol 10%. Entretanto, as amostras submetidas a ciclos de congelamento (1 e 2 ciclos) apresentam diferenças nas entalpias de interação entre a proteína GlnK e o ATP em relação ao sistema

que não foi submetido ao congelamento. Quanto a saturação, observa-se que as amostras submetidas aos ciclos de congelamento apresentam uma saturação em razões molares menores (4,0) em relação as amostras que não foram submetidas ao congelamento (Figura 22).

A ineficiência do glicerol na proteção da estrutura da GlnK pode ser explicada pela baixa concentração do composto (10%). Em muitos estudos o glicerol é utilizado em faixas de concentração maiores do que 45%. Acima dessa concentração o glicerol afeta a formação de cristais de gelo e a temperatura de congelamento da solução (Ijima, 1998).

A escolha de se utilizar o glicerol em uma concentração mais baixa, 10%, foi feita para que a solução não se tornasse muito viscosa e afetasse as análises de ITC.

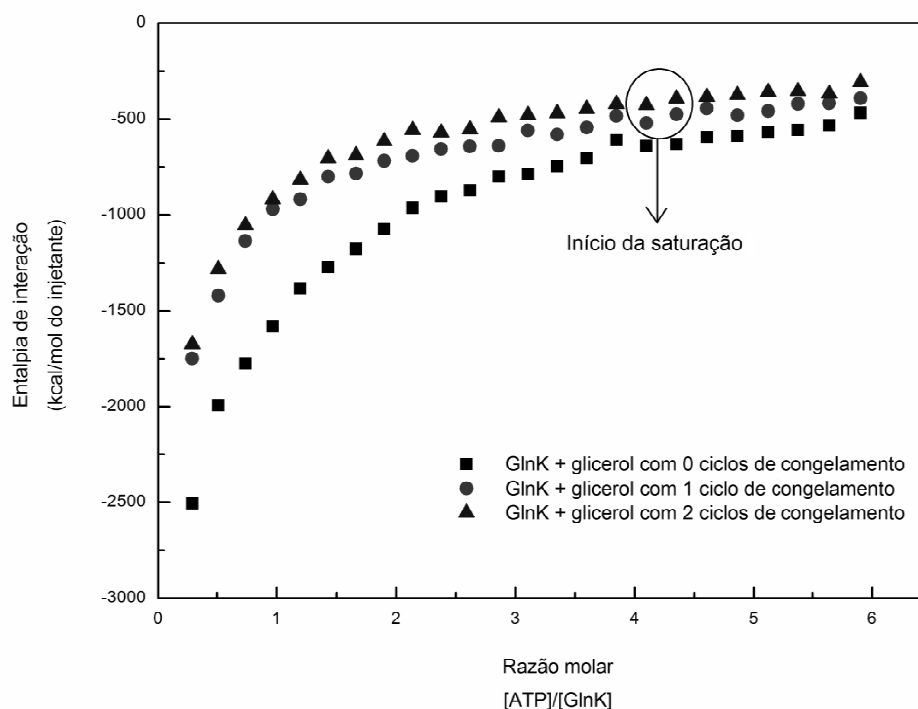


FIGURA 22 - CURVAS DE ITC AVALIANDO O EFEITO DOS CICLOS DE CONGELAMENTO E DO GLICEROL 10% (CRIOPROTETOR) NAS INTERAÇÕES ENTRE AS SOLUÇÕES DE PROTEÍNA GLNK $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ E DE ATP 3 mmol.L^{-1} . ■ GLNK NÃO SUBMETIDA A CICLOS DE CONGELAMENTO, • GLNK SUBMETIDA A 1 CICLO DE CONGELAMENTO, ▲ GLNK SUBMETIDA A 2 CICLOS DE CONGELAMENTO.

As interações entre as soluções de proteína GlnK à $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ e ALB 10 mmol.L^{-1} submetidas ao congelamento com a solução de ATP à 3 mmol.L^{-1} avaliadas por ITC são mostrados na Figura 23.

É possível observar que o ALB apresentou efeito crioprotetor na estrutura da GlnK após o congelamento. Ao contrário do que ocorreu com as amostras sem aditivo ou com glicerol, as amostras de proteína com ALB submetidas aos ciclos de congelamento mantiveram suas características iniciais. O calor de interação não foi alterado com os ciclos de congelamento, indicando que o mecanismo de interação não sofreu alterações. O congelamento também não provocou alterações na estrutura molecular da proteína que prejudicassem a sua interação com o ATP, visto que não houve alteração na saturação do sistema.

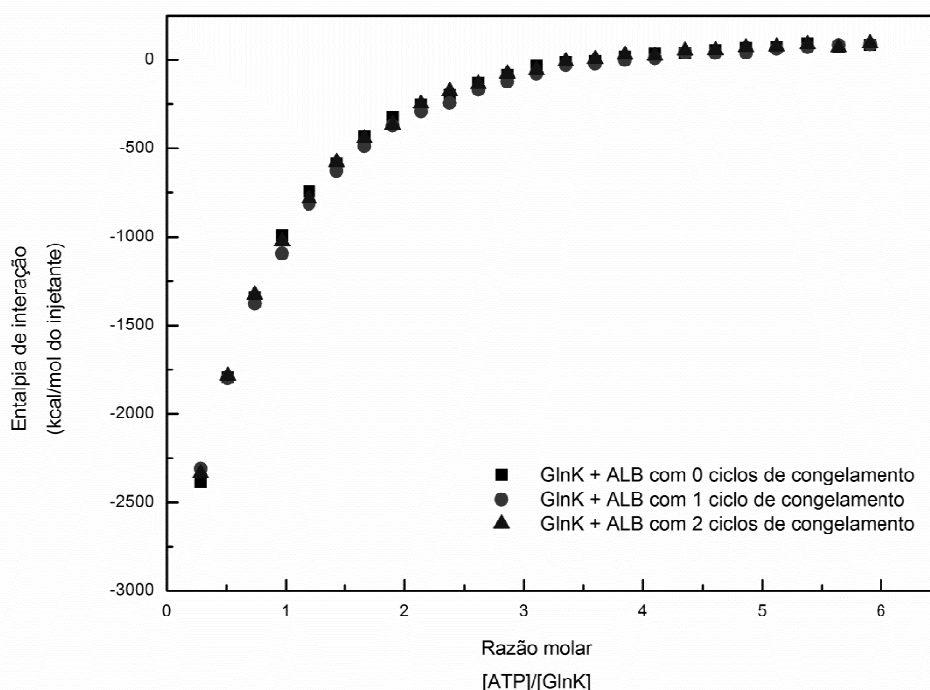


FIGURA 23 - CURVAS DE ITC AVALIANDO O EFEITO DOS CICLOS DE CONGELAMENTO E DO ÁCIDO LACTOBÍÔNICO 10 mmol.L^{-1} (CRIOPROTETOR) NAS INTERAÇÕES ENTRE AS SOLUÇÕES DE PROTEÍNA GLNK $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ E DE ATP À 3 mmol.L^{-1} . ■ GLNK NÃO SUBMETIDA A CICLOS DE CONGELAMENTO, ● GLNK SUBMETIDA A 1 CICLO DE CONGELAMENTO, ▲ GLNK SUBMETIDA A 2 CICLOS DE CONGELAMENTO.

5 CONCLUSÃO

O principal objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do congelamento e dos crioprotetores ácido lactobiônico e glicerol na estrutura da proteína GlnK por meio da interação entre a GlnK e o ATP avaliada por calorimetria de titulação isotérmica (ITC).

Para a obtenção das soluções de proteína foram realizados procedimentos de expressão da GlnK e purificação por FPLC. As soluções de proteína obtida se mostraram com pureza e concentração adequadas para serem utilizadas nas análises de ITC.

Os ensaios de ITC para a interação entre a solução de proteína GlnK à $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ e a solução contendo ATP à 3 mmol.L^{-1} apresentaram resultados de caráter exotérmico. Para estas amostras, o modelo matemático de três sítios de ligação foi ajustado, permitindo a determinação dos parâmetros termodinâmicos (K_D , ΔH e ΔS).

O efeito do congelamento sob a estrutura da GlnK foi avaliado a partir da sua interação molecular com o ATP avaliado por ITC. Nesta etapa pôde-se observar que os ciclos de congelamento afetaram o comportamento das curvas de ITC, principalmente no que se refere a entalpia de interação e ponto de saturação. Amostras submetidas a ciclos de congelamento apresentaram menor entalpia de interação e atingiram a saturação em menores razões molares de ATP/GlnK. Portanto, é possível afirmar que o processo de congelamento altera a estrutura molecular da GlnK.

O efeito crioprotetor do glicerol e do ALB foi avaliado para amostras que não foram submetidas a ciclos de congelamento e para amostras submetidas a 1 e 2 ciclos de congelamento. As curvas de ITC para o sistema com glicerol 10% não revelaram alterações que pudessem comprovar o efeito crioprotetor do glicerol. Entretanto, para o sistema com ALB os resultados obtidos por ITC indicaram que o mesmo apresentaram efeito crioprotetor sobre a estrutura da proteína GlnK, conforme descrito na literatura. Diferente do que ocorreu com as amostras sem aditivo ou com glicerol, nos sistemas com ALB não foram observadas modificações na variação de entalpia, bem como na saturação do sistema, quando estas foram submetidas a ciclos de congelamento.

Ao final deste trabalho a técnica de ITC se mostrou adequada na avaliação dos efeitos do congelamento e de aditivos crioprotetores no sistema estudado, tendo o ALB demonstrado efeito crioprotetor para os sistemas proteicos avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANBAZHAGAN, V.; SANKHALA, R. S.; SINGH, B. P.; SWAMY, M. J., Isothermal titration calorimetric studies on the interaction of the major bovine seminal plasma protein, PDC-109 with phospholipid membranes, **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. 1-10, 2011.

ARCONDE´GUY T, JACK R, MERRICK M. PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p.80–105, 2001.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 3ª edição. São Paulo - Livraria Varela, 2003.

BONATTO, A. C.; SOUZA, E. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; MONTEIRO, R. A.; CHUBATSU, L. S.; HUERGO, L. F.; PEDROSA, F. O. Uridylylation of *Herbaspirillum seropedicae* GlnB and GlnK proteins is differentially affected by ATP, ADP and 2-oxoglutarate in vitro. **Archives of Microbiology**, v. 194, p. 643–652, 2012.

BONATTO, A. C.; COUTO, G. H.; SOUZA, E. M.; ARAÚJO, L. M.; PEDROSA, F. O.; NOINDORF, L.; BENELLI, E. M. Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expression and Purification**, v. 55, p. 293–299, 2007.

BROWN, R. K.; BRANDTS, J. M.; O'BRIEN, R.; PETERS, W. B. ITC-derived binding constants: Using microgram quantities of protein., label-free biosensors techniques and applications. **Cambridge University Press**, p. 223-250, 2009.

CARR, P. D.; CHEAH, E.; SUFFOLK, P. M.; VASUDEVAN, S. G.; DIXON, N. E.; OLLIS, D. L. X-ray structure of the signal transduction protein from *Escherichia coli*. **Acta Crystallographica**, v. 52, p. 93–104, 1996.

CHARLOUX, C.; PAUL, M.; LOISANCE, D.; ASTIER, A. Inhibition of hydroxyl radical production by lactobionate, adenine, and tempol. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 5, p. 699-704, 1995.

CHEAH, E.; CARR, P. D.; SUFFOLK, P. M.; VASUDEVAN, S. G.; DIXON, N. E. OLLIS, D. L. Structure of the *Escherichia coli* signal transducing protein PII. **Structure**, v. 2, n. 10, p. 981–990, 1994.

CHUBATSU, L. S.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; BONATTO, A. C.; HUERGO, L. F.; STEFFENS, M. B. R.; Rigo, L. U.; PEDROSA, F. O. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, p. 197-207, 2012.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R., **Química de Alimentos de Fennema**; tradução Adriano Brandelli. – 4ª Ed. – Porto Alegre: Artmed, 2010.

DAVIES, P. L.; SYKEST, B. D. Antifreeze proteins, **Journal of Structural Biology**, v. 7, p. 828-834, 1997.

DIMITROVA, M. N.; MATSUMURA, H.; TEREZOVA, N.; NEYTCHEV, V. Binding of globular proteins to lipid membranes studied by isothermal titration calorimetry and fluorescence., **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 24, p. 53–61, 2002.

EUROPE, C. O. **European Pharmacopoeia 5.0** v. 2, 5ª Ed, Council of Europe, 2004.

QVIST, K. B.; TAMS, J. W.; FAERGEMAND, M, GARRIGUES, C.; NIELSEN, P. M. **Method for producing an acidified milk product**. United States Patent Application Pub. n.: US 20120045546 A1; 2012.

FDA U.S. **Food and Drug Administration (Acid Lactobionic)**, disponível em <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?CFRPart=172&showFR=1&subpartNode=21:3.0.1.1.3.8>> Acesso em 06/07/2013.

FREIRE, E. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 3, 2004.

FREYER, M. W.; LEWIS, E. A. Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interaction. **Methods in Cell Biology**, v. 84, p. 79-113, 2008.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state, **CryoLetters**, v. 25, n. 6, p. 375-388, 2004.

GARCÍA-ARIAS, M. T.; PONTES, E. A.; GARCÍA-LINARES, M. C.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. C.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Grilling of sardine fillets. Effects of frozen and thawed modality on their protein quality. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technology**. v. 36, p. 763–769, 2003.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**, Ed Nobel - SP, p. 230-231, 1977.

GASTEIGER E.; HOOGLAND C.; GATTIKER A.; DUVAUD S.; WILKINS M. R.; APPEL R. D.; BAIROCH A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. **Methods in Molecular Biology**. p. 571-607, 2005.

GEIDOBLE, R.; WINTER, G. Controlled ice nucleation in the field of freeze-drying: Fundamentals and technology review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, p. 214–222, 2013.

GREEN, B. A.; YU, R. J.; SCOTT, E. J. V. Clinical and cosmeceutical uses of hydroxyacids. **Clinics in Dermatology**, v. 27, p. 495–501, 2009.

GRIFFITH, M.; EWART, K. V. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 3, p. 375-402, 1995.

GUTIÉRREZ, L. F.; HAMOUDI, S.; BELKACEMI, K. Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. **International Dairy Journal**, v. 26, p. 103-111, 2012.

HERRERA, J. J.; PASTORIZA, L.; SAMPEDRO, G. A DSC study on the effects of various maltodextrins and sucrose on protein changes in frozen-stored minced blue whiting muscle. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 377-384, 2001.

HOLDGATE, G. A.; WARD, W. H. J. Measurements of binding thermodynamics in drug discovery, **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 22, 2005.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms, **Cryobiology**, v. 46, p. 205–229, 2003.

IJIMA, T. Thermal analysis of cryoprotective solutions for red blood cells. **Cryobiology**, v. 36, P. 165–173, 1998.

ISAACSON, Y.; SALEM, O.; SHEPHERD, R. E.; THIEL, D. H. V. Lactobionic acid as an iron chelator: A Rationale for its effectiveness as an organ preservative, **Life Sciences**, v. 45, p. 2373-2380, 1989.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LITTLECHILD, J. A. Protein crystallization: magical or logical: can we establish some general rules? **Journal of Physics D: Applied Physics**. v. 24, n. 2, p. 111-118, 1991.

MCPHERSON, A. Introduction to protein crystallization. **Macromolecular Crystallization**, v. 34, n. 3, p. 254–265, 2004.

MIN, K.; CHEN, K.; ARORA, R. Effect of short-term versus prolonged freezing on freeze–thaw injury and post-thaw recovery in spinach: Importance in laboratory freeze–thaw protocols. **Environmental and Experimental Botany**, v. 106, p. 124-131, 2014.

MIZOUE, L. S.; TELLINGHUISEN, J. The role of backlash in the “first injection anomaly” in isothermal titration calorimetry. **Analytical Biochemistry**, v. 326, p. 125–127, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. Editora W. H. Freeman, 4ª Edição, p. 75-81, 2004.

NIELSEN, P. M. **Meat based food product comprising lactobionic acid**. United States Patent Application Pub. n.: US 2009/0214752 A1; 2009.

NOBLE, J. E.; BAILEY, M. J. A. Quantitation of Protein. **Methods in enzymology**, v. 46, p. 80-82, 2009.

NÚÑEZ, S.; VENHORST, J.; KRUSE, C. G. Target–drug interactions: first principles and their application to drug discovery, **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 1 e 2, 2012.

OE, K.; KIMURA T. **Mineral absorption promoter**. Japan Patent Application Pub. No.: JP2008303208; 2008. Disponível em <<http://www.google.com/patents/US20120021093>> acesso em 10/07/2013.

OE, K.; KIMURA, T. **Aging inhibitor for bread**. Japan Patent Application Pub. No.: JP2011177121; 2011. Disponível em <<http://en.astamuse.com/published/JP/No/2005333843>> acesso em 10/07/2013.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Ed. Manole - SP, p. 485-501, 2006.

ORDÓÑEZ, J. A., **Tecnologia dos alimentos. Volume 1. Componentes dos alimentos e processos**, 1^a. Ed, Ed. Artmed – SP, p. 103-107 e 155-195, 2005.

PACE, C. N.; VAJDOS, F.; FEE, L.; GRIMSLEY, G.; GRAY, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Science**, v. 4, p. 2411-2423, 1995.

PATAPOFF, T. W.; OVERCASHIER, D. E. The importance of freezing on lyophilization cycle development. **Biopharm International**, v. 3, p. 16–21, 2002.

PEROZZO, R.; FOLKERS, G.; SCAPOZZA, L. Thermodynamics of protein–ligand interactions: history, presence, and future aspects, **Journal of Receptors and Signal Transduction**. v. 24, n. 1 e 2, p. 1–52, 2004.

RADCHENKO, M.; MERRICK, M., The role of effector molecules in signal transduction by PII proteins., **Biochemical Society Transactions**. v. 39, p. 189–194, 2011.

RADCHENKO, M. V.; THORNTON, J.; MERRICK, M., Control of AmtB-GlnK complex formation by intracellular levels of ATP, ADP, and 2-Oxoglutarate., **The Journal of Biological Chemistry**. v. 285, p. 31037–31045, 2010.

RAGOONANAN, V.; LESS, R.; AKSAN, A. Response of the cell membrane–cytoskeleton complex to osmotic and freeze/thaw stresses. Part 2: The link between the state of the membrane–cytoskeleton complex and the cellular damage., **Cryobiology**, v. 66, p. 96–104, 2013.

RISPENS, T.; LAKEMON, C. M. M.; DERKSEN, N. I. L.; AALBERSE, R. C. Detection of conformational changes in immunoglobulin G using isothermal titration calorimetry with low-molecular-weight probes. **Analytical Biochemistry**, v. 380, p. 303–309, 2008.

RIVERA, R.; RUIZ, R.; HEGENAUER, J.; SALTMAN, P.; GREEN, R. Bioavailability of iron- and copper-supplemented milk for mexican school children¹⁻³. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.36, p. 1162-1169, 1982.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, The merck index online Glycerol, disponível em: <<https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/MONO1500004520?q=unauthorize> 2014>, acesso em 20/04/2014.

SEARLES, J. A.; CARPENTER, J. F.; RANDOLPH, T. W. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 7, p.860–871, 2001.

SHEPHERD, R. E.; ISAACSON, Y.; CHENSNY, L.; ZHANG, S.; KORTES, R.; JOHN, K. Lactobionic and gluconic acid complexes of Fe^{II} and Fe^{III}; Control of oxidation pathways by an organ transplantation preservative, **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 49, p. 23-48, 1993.

SILVA, J. A. **Tópicos de tecnologia de alimentos**, Ed. Varela - SP, p. 113-122 e 207-226, 2000.

TAPPEL, A. L. **Effects of low temperatures and freezing on enzymes and enzyme systems**. Em GAVA, A. J. *Princípios de Tecnologia de Alimentos*, 1977.

TASIC-KOSTOV, M.; PAVLOVIC, D.; LUKIC, M.; JAKSIC, I.; ARSIC, I.; SAVIC, S. Lactobionic acid as antioxidant and moisturizing active in alkyl polyglucoside-based topical emulsions: the colloidal structure, stability and efficacy evaluation, **International Journal of Cosmetic Science**, v. 34, p. 424–434, 2012.

VASUDEVAN, S. G. C.; GEDYE, N. E.; DIXON, E.; CHEAH, P. D.; CARR, P. M.; SUFFOLK, P. D.; JEFFREY,; OLLIS, D. *Escherichia coli* PII protein: purification, crystallisation and oligomeric structure. **FEBS Letters**. v. 337, p. 255–258, 1994.

WANG, P.; XU, L.; NIKOO, M.; OCEN, D.; WU, F.; YANG, N.; JIN, Z.; XU, X. Effect of frozen storage on the conformational, thermal and microscopic properties of gluten: Comparative studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions., **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 238-246, 2014a.

WANG, P.; CHEN, H.; MOHANAD, B.; XU, L.; NING, Y.; XU, J.; WU, F.; YANG, N.; JIN, Z.; XU, X., Effect of frozen storage on physico-chemistry of wheat gluten proteins: Studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions., **Food Hydrocolloids** v. 39, p. 187-194, 2014b.

WILSON, P.; RAMLOV, H. Hemolymph ice nucleating proteins from the New Zealand alpine weta *Hemideina maori* (Orthoptera: Stenopetmatidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 112B, n. 3, p. 535-542, 1995.

XIONG, Y. L. Protein denaturation and functionality losses. In M. C. Erickson, e Y. C. Hung (Eds.), **Quality of frozen foods**. p. 111-139, 1997.

XU, Y.; CHEAH, E.; CARR, P. D.; VAN HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H. V.; VASUDEVAN, S. G.; OLLIS, D. L. GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. **Journal of Molecular Biology**. v. 282, p. 149–16, 1998.

YAMASHITA, Y.; ZHANG, N.; NOZAKI, Y. Effect of chitin hydrolysate on the denaturation of lizard fish myofibrillar protein and the state of water during frozen storage. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 569–576, 2003.