

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**Catalase PEGuilada como potencial biofármaco para tratamento do
vitiligo**

Beatriz de Mendonça Rocha

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientador(a):

Prof.(a). Dr(a) Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo

2020

SUMÁRIO

	Pág.
Agradecimentos	1
Lista de abreviaturas	2
Lista de figuras	3
Lista de tabelas	5
RESUMO	6
1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Manifestações clínicas do vitiligo	7
1.2. Fisiopatologia do vitiligo	9
1.3. Tratamentos disponíveis	11
1.4. PEGuilação como aprimoramento de biofármacos	12
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Materiais	15
3.2. Desenvolvimento de protocolo de PEGuilação N-terminal da catalase	15
3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida sem SDS (Nativa)	16
3.4. Purificação da catalase mono-PEGuilada	16
3.5. Determinação da concentração de catalase	17
3.6. Determinação da atividade enzimática da catalase	17
3.7. Avaliação da estrutura proteica	19
3.8. Estudo de estabilidade pelo tempo	20
3.9. Atividade antioxidante da pele <i>in vitro</i>	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Estudo do pH – determinação da melhor condição de reação	22
4.2. Estudo do tamanho do PEG	25
4.3. Efeito da PEGuilação na estrutura proteica	28
4.4. Estabilidade ao longo do tempo	33
4.5. Atividade antioxidante da pele <i>in vitro</i>	35
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIAS	39
7. ANEXOS	44

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente a todas as pessoas e entidades que fizeram parte de todo o processo de formação e gostaria de agradecer especialmente àqueles que, tão generosamente, fizeram parte do desenvolvimento deste trabalho, indireta ou diretamente.

À Professora Doutora Carlota Yagui, que tão gentilmente me recebeu no Nanobio Lab, confiou no potencial do meu trabalho e aceitou o desafio de me orientar não uma, mas duas vezes ao longo de minha formação acadêmica.

Ao time do Nanobio Lab, em especial o pós-doutorando João Henrique Santos, que sempre se mostrou disponível, empenhado e gentil em me ajudar e me receber no laboratório. Agradeço a confiança depositada em mim e o aprendizado imensurável passado por essa equipe.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, por proporcionar um ambiente diverso e nos encorajar a trilhar nosso caminho, dentre tantas possibilidades.

À minha família, pelo apoio incondicional e de valor inestimável. Palavras não são suficientes para expressar minha gratidão.

Às minhas amigas, por estarem sempre por perto. O apoio de vocês foi essencial em todas as etapas deste imenso processo de crescimento intelectual, profissional e pessoal.

LISTA DE ABREVIATURAS

ASDB	<i>Amelanotic with sharply demarcated borders</i>
BCA	Ácido Bicinconílico
BRENDA	<i>Braunschweig Enzyme Database</i>
BSA	<i>Body Surface Area</i>
CAT	Catalase
CAT-PEG 10	Catalase conjugada ao polímero PEG de 10 kDa
CAT-PEG 20	Catalase conjugada ao polímero PEG de 20 kDa
CAT-PEG 40	Catalase conjugada ao polímero PEG de 40 kDa
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>
DC	Dicroísmo Circular
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
HPDB	<i>Hypomelanotic with poor defined borders</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
mPEG-NHS	Metóxi-poli(etilenoglicol) carboximetil N-hidroxisuccinimidil éster
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

LISTA DE FIGURAS

	Págs.
Figura 1. Variante Lip-Tip do vitiligo.	8
Figura 2. Vitiligo universal.	8
Figura 3. Mecanismo de patogênese do vitiligo.	10
Figura 4. Estrutura geral do polímero PEG.	12
Figura 5. Resíduos PEGuiláveis da proteína.	13
Figura 6. Cromatograma (SEC) obtido após purificação para a PEGuilação da catalase (CAT) em pH 6,0 com PEG 10 kDa.	23
Figura 7. Cromatograma (SEC) obtido após purificação para a PEGuilação da catalase (CAT) em pH 6,5 com PEG 10 kDa.	23
Figura 8. Cromatograma (SEC) obtido após purificação para a PEGuilação da catalase (CAT) em pH 7,0 com PEG 10 kDa.	24
Figura 9. Cromatograma (SEC) obtido após purificação para a PEGuilação da catalase (CAT) em pH 7,5 com PEG 10 kDa.	24
Figura 10. Cromatograma (SEC) obtido após purificação para a PEGuilação da catalase (CAT) em pH 8,0 com PEG 10 kDa.	25
Figura 11. Cromatograma (SEC) obtido após purificação para a PEGuilação da catalase (CAT) em pH 8,0 com PEG 20 kDa.	25
Figura 12. Cromatograma (SEC) obtido após purificação para a PEGuilação da catalase (CAT) em pH 8,0 com PEG 40 kDa.	26
Figura 13. Eletroforese em gel nativo (8% wt acrilamida) das amostras de catalase PEGuiladas com PEG-NHS de 10 kDa (CAT-PEG 10), 20 kDa (CAT-PEG 20) e 40 kDa (CAT-PEG 40).	27
Figura 14. Espectro de dicroísmo circular em região de UV distante (<i>FAR UV</i>) para a catalase (CAT) e suas variantes PEGuiladas antes do aquecimento.	29
Figura 15. Espectro de dicroísmo circular em região de UV distante (<i>FAR UV</i>) para a catalase (CAT) e suas variantes PEGuiladas após o aquecimento.	29

Figura 16. Fingerprints terciários gerados a partir dos espectros de dicroísmo circular em região de UV próximo (NEAR UV) para a catalase (CAT) e suas variantes PEGuiladas antes do aquecimento.	30
Figura 17. Espectro de dicroísmo circular – elipticidade para a catalase (CAT), gerado em 222 nm e com variação de temperatura entre 30°C e 95°C.	30
Figura 18. Espectro de dicroísmo circular – elipticidade para a CAT-PEG 10, gerado em 222 nm e com variação de temperatura entre 30°C e 95°C.	30
Figura 19. Espectro de dicroísmo circular – elipticidade para a CAT-PEG 20, gerado em 222 nm e com variação de temperatura entre 30°C e 95°C.	31
Figura 20. Espectro de dicroísmo circular – elipticidade para a CAT-PEG 40, gerado em 222 nm e com variação de temperatura entre 30°C e 95°C.	31
Figura 21. Espectro de dicroísmo circular – elipticidade para a catalase (CAT) com reta ajustada para determinação de Tfusão.	31
Figura 22. Espectro de dicroísmo circular – elipticidade para a CAT-PEG 10 com reta ajustada para determinação de Tfusão.	32
Figura 23. Espectro de dicroísmo circular – elipticidade para a CAT-PEG 20 com reta ajustada para determinação de Tfusão.	32
Figura 24. Espectro de dicroísmo circular – elipticidade para a CAT-PEG 40 com reta ajustada para determinação de Tfusão.	33
Figura 25. Estabilidade da catalase (CAT) e suas formas PEGuiladas em função do tempo a 4°C.	34
Figura 26. Estabilidade da catalase (CAT) e suas formas PEGuiladas em função do tempo a 37°C.	35
Figura 27. Porcentagem de peroxidação lipídica depois de 24 horas de permeação das amostras em estrato córneo de pele de porco.	36
Figura 28. Porcentagem de peroxidação lipídica depois de 24 horas de permeação das amostras em epiderme de pele de porco.	37

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Preparação das soluções para medida de atividade enzimática da catalase.	18
Tabela 2. Rendimentos obtidos nas reações de PEGuilação de catalase.	27
Tabela 3. Atividade enzimática da catalase (CAT) e variantes PEGuiladas, baseada em ensaios de degradação de peróxido de hidrogênio (método A).	28
Tabela 4. Temperaturas de fusão das amostras de catalase nativa e PEGuilada, determinadas por dicroísmo circular.	33
Tabela 5. Dados referentes à Figura 21, da reta ajustada para determinação de Tfusão, obtida por dicroísmo circular da catalase (CAT).	44
Tabela 6. Dados referentes à Figura 22, da reta ajustada para determinação de Tfusão, obtida por dicroísmo circular da CAT-PEG 10.	44
Tabela 7. Dados referentes à Figura 23, da reta ajustada para determinação de Tfusão, obtida por dicroísmo circular da CAT-PEG 20.	45
Tabela 8. Dados referentes à Figura 24, da reta ajustada para determinação de Tfusão, obtida por dicroísmo circular da CAT-PEG 40.	45

RESUMO

ROCHA, B. de M. Catalase PEGuilada como potencial biofármaco para tratamento do vitiligo. 45 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Palavras-chave: PEGuilação; Catalase; Vitiligo

INTRODUÇÃO: A catalase (CAT) está envolvida na decomposição do peróxido de hidrogênio. Recentemente, ela foi sugerida como potencial biofármaco para o tratamento do vitiligo, visto que pacientes acometidos têm concentrações menores desta enzima na epiderme, além de acumularem radicais livres capazes de levar ao estresse oxidativo, como demonstrado na fisiopatologia deste agravo. Por essa razão, o uso tópico da CAT em associação com terapia de raios UV tem sido sugerido como uma nova modalidade de tratamento. Desse modo, investigou-se a PEGuilação da CAT como ferramenta para o desenvolvimento de um potencial biofármaco com maior estabilidade a longo prazo. **OBJETIVOS:** Desenvolver um protocolo de PEGuilação sítio-específica N-terminal da catalase, realizar estudos de estabilidade em função do tempo e da temperatura e, por fim, verificar a capacidade de prevenção de peroxidação lipídica em amostras de pele irradiadas. **MATERIAIS E MÉTODOS:** A fim de definir um protocolo reacional ideal, tanto pH da reação quanto tamanho do polímero foram estudados. De maneira geral, soluções de 1 mg/mL de catalase e mPEG-NHS 10 kDa, na proporção de 25:1 (PEG:proteína), em tampão PBS de pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 foram utilizadas e mantidas por 60 minutos sob agitação a 400 rpm e 22 °C. Para purificação e determinação de rendimentos de reação, cromatografia de exclusão molecular foi utilizada. Estudos de avaliação da estrutura proteica do conjugado enzima-polímero e de estabilidade térmica e ao longo do tempo também foram realizados, além de ensaio *in vitro* da capacidade de permeação e antioxidante do produto PEGuilado, utilizando tecido de orelha suína em sistema de difusão de Franz e ensaio TBARS. **RESULTADOS:** Determinou-se a condição de reação ótima com o pH reacional 8,0 e PEG reativo de 20 kDa. Além disso, por meio de dicroísmo circular, observou-se que a estrutura secundária da catalase se manteve com a PEGuilação, bem como parâmetros como ponto de fusão, apesar de sofrer leve queda na atividade enzimática em relação à variante nativa. A atividade enzimática da enzima e variantes PEGuiladas foi acompanhada ao longo do tempo em temperatura de geladeira (4°C) e à 37°C e mostraram a capacidade da PEGuilação em conferir proteção à degradação enzimática. Por fim, os ensaios *in vitro* mostraram a capacidade da enzima PEGuilada de permanecer em camadas mais superficiais da pele, promovendo redução da peroxidação lipídica. **CONCLUSÃO:** A PEGuilação, além de ser uma ferramenta de grande importância para o melhoramento de moléculas usadas em tratamentos já existentes, é um procedimento com grande potencial no desenvolvimento de um biofármaco para o tratamento para o vitiligo. Os resultados deste estudo são favoráveis à investigação mais profunda da ação da catalase PEGuilada *in vitro* e, posteriormente, *in vivo*.

1. INTRODUÇÃO

A catalase é uma importante enzima envolvida na decomposição de peróxido de hidrogênio endógeno e consequente geração de água e oxigênio molecular. Ela tem potencial terapêutico e vem sendo bastante estudada nas últimas décadas,^{1,2} em especial no tratamento do vitiligo, que se acredita estar associado ao aumento de radicais livres, capazes de destruir os melanócitos.^{3,4,5}

O vitiligo, doença que afeta aproximadamente 0,5% da população mundial,⁶ tem caráter multifatorial e consiste, de maneira geral, em despigmentação da epiderme e folículos pilosos. Assim como outras doenças de acometimento dermatológico como acne e alopecia areata, o vitiligo já foi outrora considerado pela comunidade médica e científica como doença cosmética.⁷ A re-caracterização desta condição pela Organização Mundial da Saúde (OMS) foi um marco importante para os pacientes por ela afetados, à medida que definiu o vitiligo como doença médica, tornando o acesso ao tratamento possível por meio dos sistemas de saúde ao redor do mundo.

1.1 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO VITILIGO

Os pacientes acometidos por este agravio podem desenvolver lesões diferentes, com ou sem presença de prurido, classificadas a partir do padrão de despigmentação apresentado e da região acometida.^{8,9} A observação feita sob a Luz de Wood é capaz de diferenciar dois principais padrões:

1. Lesão amelanótica com bordas bem definidas (ASDB);
2. Lesão hipomelanótica com bordas mal definidas (HPDB), dentro da qual pode, ainda, apresentar: (a) Tricromia; (b) Pentacromia; (c) Bordas mais inflamadas ou (d) Despigmentação do tipo “Confetti”.

Já segundo a localização das zonas despigmentadas, o vitiligo pode ser classificado como:

1. Localizado: (a) Focal, caracterizado por manchas isoladas, pequenas (10-15 cm²) e unilaterais, que não progridem por pelo menos dois anos, sendo Acrofacial se limitadas à cabeça, mãos e pés; “Lip-tip” se aparecerem nas

áreas distais dos dedos das mãos e dos pés e orifícios faciais; e (b) Mucosa se a lesão for única e de localização oral ou genital.

2. Universal: se a despigmentação da pele for quase completa ou completa ($\geq 80\%$ da área corpórea superficial - BSA), incluindo ou não o cabelo (leucotriquia).

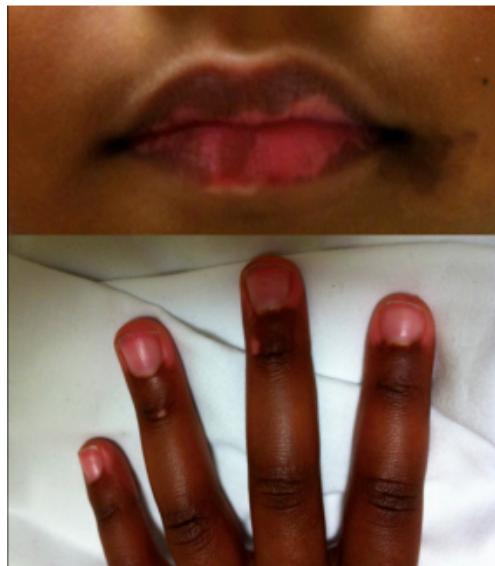


Figura 1. Variante Lip-Tip do vitiligo (RODRIGUES et al, 2017).



Figura 2. Vitiligo universal (RODRIGUES et al, 2017)

Além das manifestações dermatológicas, é possível a relação do vitiligo com outras doenças autoimunes⁷, uma vez que o sistema imunológico do paciente já é autorreativo (vide item 1.2). Aproximadamente 15-25% dos pacientes portadores de vitiligo apresentam condições autoimunes como tireoidite, bem como aumento de prevalência de agravos como anemia perniciosa, miastenia gravis, lúpus eritematoso sistêmico, psoríase, diabetes tipo 1 e tantas outras.^{10, 11}

Elencando as manifestações dermatológicas e as relações imunorreativas supracitadas, entende-se como o vitiligo pode afetar a qualidade de vida do paciente, especialmente os mais jovens. O desenvolvimento de transtornos psicológicos decorrentes desta condição não é incomum e representa tanto um prejuízo social, quanto prejuízo econômico.^{7, 9} É por este motivo que os esforços devem ser movidos para a elucidação completa da fisiopatologia, de forma que um tratamento definitivo e eficaz seja desenvolvido e disponibilizado pelos diversos sistemas de saúde ao redor do mundo.

1.2 FISIOPATOLOGIA DO VITILIGO

Apesar de seu caráter multifatorial, o vitiligo é considerado uma doença autoimune. Seu mecanismo de patogênese envolve defeitos intrínsecos aos melanócitos e auto reatividade das células imunes, que terminam por atacar os melanócitos na epiderme.¹² Fisiologicamente, a produção de melanina pelos melanócitos é responsável pela ativação da Resposta a Proteínas Mal Enoveladas (UPR) devido ao fato de a produção de grandes quantidades de proteína aumentar o risco de elas sofrerem mal enovelamento no retículo endoplasmático.¹³ A ativação de UPR, por sua vez, induz o fator de transcrição X-box-binding protein 1 (XBP1) e sua forma ativada (XBP1s), que levam à produção de interleucinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-8).¹⁴ Esse sinal serve como *Damage-Associated Molecular Pattern* (DAMP), um padrão molecular que leva à ativação de células dendríticas e, consequentemente, da resposta imune adaptativa. Além disso, para que a melanina seja sintetizada, grande quantidade de energia é despendida, o que leva a mitocôndria à atividade aumentada, aumentando por consequência a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas.

As duas vias parecem estar hiperativadas nas células dos pacientes portadores de vitiligo, mostrando uma relação direta entre o estresse celular, fator

aparentemente desencadeador da condição, a imunidade inata e a imunidade adaptativa. Os marcadores celulares da doença reforçam essa relação de proximidade e mostram um padrão importante na classificação da atividade e progressão: o vitiligo classificado como estável, associado às lesões do tipo ASDB, tem pouca ou nenhuma reação inflamatória a nível histológico, com rara presença de linfócitos T CD8+ somente na derme; já o vitiligo ativo, associado às lesões do tipo HPDB, apresenta clara presença de infiltração linfocitária T CD8+ na borda da lesão, em contato íntimo com os melanócitos, tanto na derme quanto na epiderme.⁸ Os linfócitos T CD8+ são necessários e suficientes para a destruição dos melanócitos, e sua quantidade nas lesões é proporcional à gravidade da doença.⁹

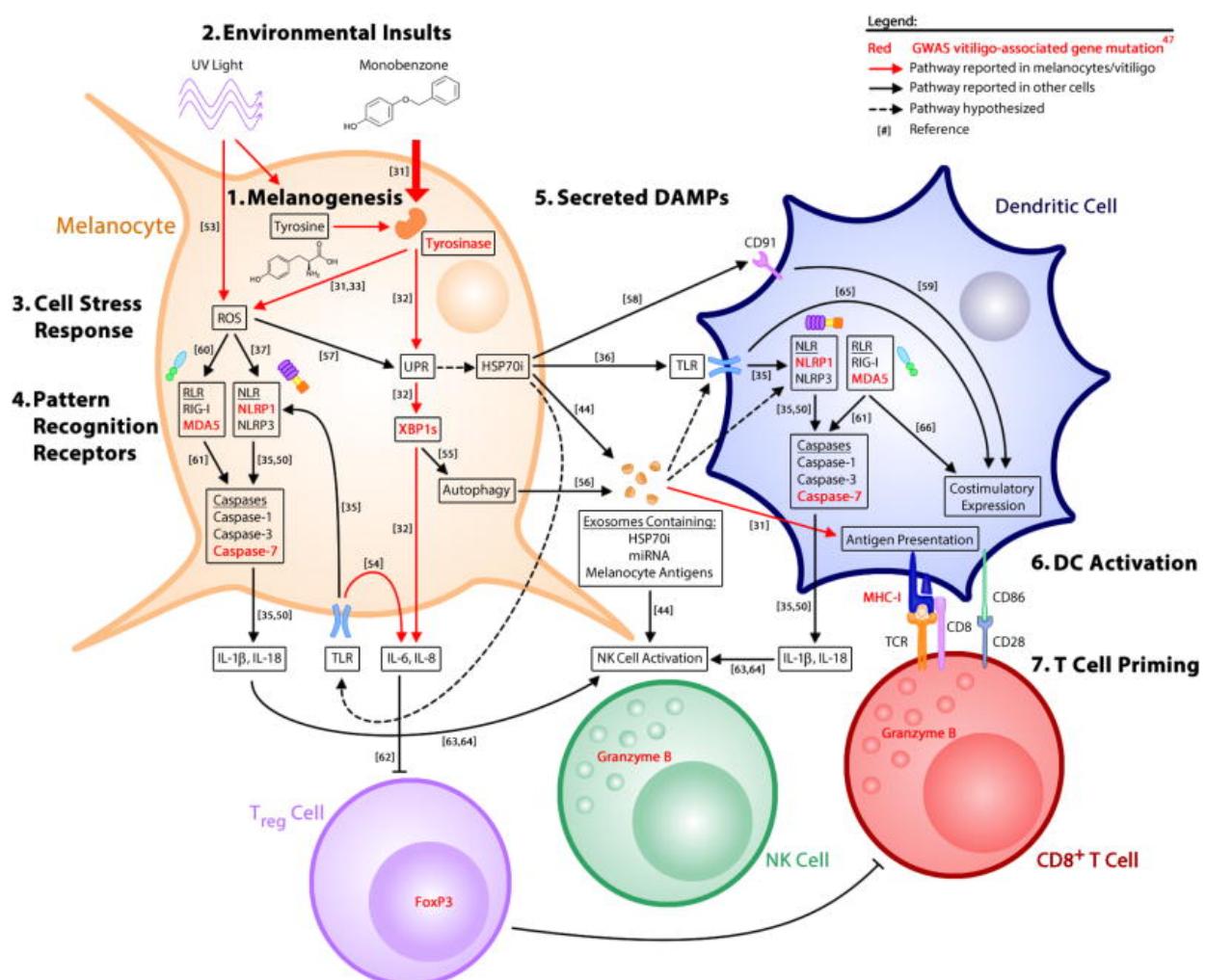


Figura 3. Mecanismo de patogênese do vitiligo

Fonte: RICHMOND, FRISOLI & HARRIS, 2013.

1.3 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS

Historicamente, há um amplo leque de medicamentos e procedimentos para o controle do vitiligo. A escolha do tratamento leva em consideração diversos fatores: subtipo de vitiligo, percentual de BSA envolvido, progressão da doença, tratamentos prévios, efeitos adversos, tendência à quebedo, comorbidades e efeitos na qualidade de vida.¹⁵ Apesar disso, devido à elucidação gradual da fisiopatologia do vitiligo, ainda não há disponível um tratamento capaz de trazer a cura para essa doença.

Os métodos de controle do vitiligo atualmente se dividem em (a) sistêmicos, dentro do qual se encontram imunossupressores em OMP (Oral Minipulse Therapy); (b) tópicos, dentro do qual se encontram corticosteróides, agentes inibidores de calcineurina e outros agentes antioxidantes e imunossupressores, além da pseudocatalase; (c) fototerapia combinada com tratamento tópico, em que se encontram classificadas PUVA (UVA + psoraleno), NB-UVB (Narrow band-UVB); UVB dirigido e pseudocatalase + NB-UVB; (d) tratamentos cirúrgicos como excisões ou implantes de tecidos doados para estímulo de repigmentação; e (e) novos tratamentos baseados em alvos imunológicos, como inibidores de IFN- γ e análogos de hormônio estimulante de α -melanócitos.

Como citado, na classe dos tratamentos tópicos, se encontra a pseudocatalase em combinação com a terapia de raios UVB de banda estreita. Nesse potencial tratamento, é utilizada a catalase de forma tópica, baseado na teoria sobre o envolvimento, na fisiopatologia da doença, do estresse oxidativo e acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela inativação de enzimas como a catalase na epiderme despigmentada.¹⁶ Sendo assim, a reposição enzimática se daria com a aplicação tópica de um complexo apolar, popularmente conhecido como “pseudocatalase”, e quimicamente caracterizado por Bis-manganês III-EDTA(HCO^{3-})₂, ativado pelos raios UVB.^{6, 17} Ainda que promissor, o uso da formulação contendo pseudocatalase não se mostrou completamente favorável, visto que ainda não se obteve um consenso nos resultados dos estudos realizados, em relação à redução da despigmentação característica deste agravo. Uma razão possível para isso está ligada à capacidade catalítica limitada do complexo enzimático em relação à enzima endógena: segundo o *Braunschweig Enzyme Database* (BRENDA), a catalase nativa é capaz de catalisar a hidrólise de 2,8 milhões de moléculas de peróxido de

hidrogênio por segundo, sendo classificada como a enzima com maior taxa de catálise, o que torna qualquer complexo mimético a ela potencialmente inferior.¹⁸

Outra razão possível para que os estudos não tenham sido conclusivos a favor da eficácia da formulação contendo pseudocatalase está relacionada à instabilidade da enzima em pHs e temperaturas extremas e também à dificuldade de se obter uma formulação farmacêutica estável com ela. Tendo em vista essas restrições, é proposta a PEGuilação da catalase como meio de aumentar sua estabilidade e tornar a formulação contendo-a mais fácil de ser desenvolvida.

1.4 PEGUILAÇÃO COMO APRIMORAMENTO DE FÁRMACOS

A PEGuilação, no âmbito dos biofármacos, aparece como uma abordagem tecnológica eficaz para o aprimoramento desta classe de compostos terapêuticos, com a superação de barreiras biológicas importantes presentes na administração de proteínas, como a catalase.

O método de PEGuilação utilizado consiste em adição do polímero polietilenoglicol (PEG), aprovado pelo FDA e já utilizado em medicamentos com sistema de liberação controlada, à superfície de proteínas por ligações em sua maioria covalentes. Uma vez ligado à proteína, o PEG fica com sua extremidade não-reativa livre, porém incapaz de se ligar a outras estruturas.

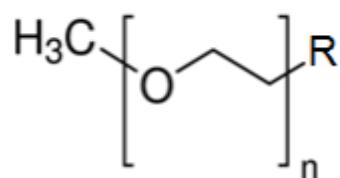


Figura 4 – Estrutura geral do polímero PEG. R representa o grupamento reativo, variável conforme o tipo de reação (MENEGUETTI, 2017).

Com cadeias de PEG ligadas à superfície proteica, a molécula passa a ter maior volume hidrodinâmico e torna-se possível minimizar problemas de biodisponibilidade, como a baixa meia-vida plasmática influenciada por: (1) alto *clearance* renal, que aumenta a excreção em um mesmo intervalo de tempo, tornando necessária a administração mais frequente; (2) imunogenicidade¹⁹, já que epítopos imunogênicos da enzima estão expostos aos anticorpos e essa exposição

se intensifica pela administração mais frequente; e (3) sensibilidade à degradação por proteases plasmáticas *in vivo*. Com a PEGuilação, o *clearance* renal diminui, a administração não precisa mais ser tão frequente, os epítópos imunogênicos se tornam menos expostos e a molécula fica protegida de degradação enzimática. Todos esses parâmetros aumentam a biodisponibilidade plasmática. Adicionalmente, a PEGuilação pode conferir às proteínas maior estabilidade frente a variações de temperatura e pH, além de aumentar a estabilidade do biofármaco ao longo do tempo, aumentar a solubilidade da proteína em água e reduzir sua agregação, já que o impedimento estérico é responsável pela repulsão entre a superfície das cadeias de PEG.^{20,21} Todos os parâmetros passíveis de alteração com a PEGuilação dependem do número de polímeros ligados à superfície proteica, da massa molecular destes polímeros e da região da proteína a qual eles se ligarão.²²

Atualmente, diversas abordagens são propostas para a PEGuilação de fármacos e biofármacos. O leque de opções abrange ligação do polímero por ligações covalentes, bem como por ligações lábeis, capazes de, no alvo molecular do fármaco, liberar a enzima nativa para a interação necessária para seu efeito.²¹ Dentro das opções de reação para obtenção de ligações covalentes, ainda, há uma série de possibilidades, variando conforme o sítio de ligação do PEG à enzima (Figura 5).

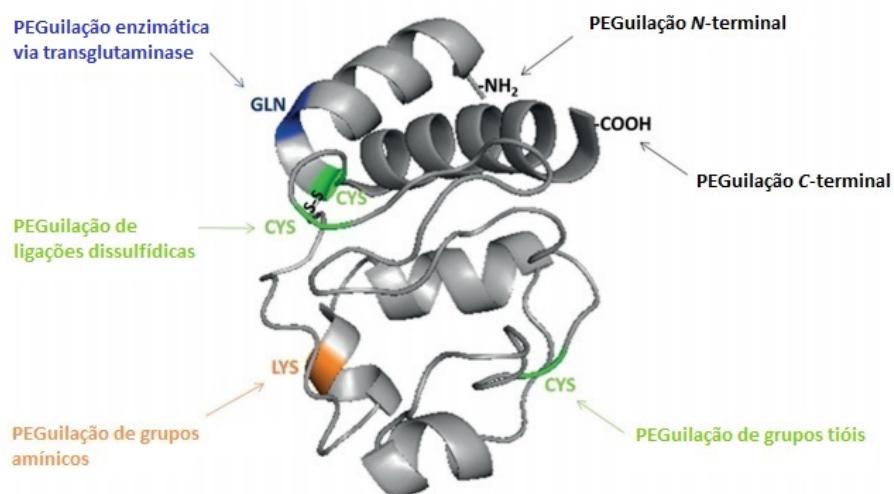


Figura 5. Resíduos PEGuiláveis da proteína, representando diferentes estratégias para obtenção do conjugado enzima-polímero.

Fonte: adaptado de SANTOS, J.H.P.M. *et al*, 2018

Especificamente nas reações realizadas nos grupamentos amínicos, os fármacos mais conhecidos, já aprovados pelo FDA e comercializados, são produtos de reações aleatórias, com quantidade de polímero ligado à enzima variável. Apesar de ser uma técnica promissora e marcar o início de uma nova era na obtenção de fármacos, a PEGuilação aleatória enfrenta problemas que giram em torno da quantidade variável de polímero: desde queda do rendimento de reação, até obtenção de isômeros posicionais de difícil reprodução,²³ essa variante se torna inferior às que produzem conjugados de tamanhos e quantidades previsíveis de polímero.

A PEGuilação da catalase proposta neste estudo se baseia nos estudos realizados por Abuchowski, Yabe *et al.* e Pfistera e Morbidelli.^{24,25,26} Abuchowski, pioneiro neste tipo de abordagem, obteve a mesma enzima ligada ao PEG a partir de reação dela com o polímero (metóxipoli(etilenoglicol) *N*-succinimidil succinato) de tamanhos 1900, 5000 e 5200 Da em tampão borato 50 mM e pH 9,2 durante 24h e a 4°C, no escuro. Seus estudos provaram que, após a ligação do polímero à enzima, a atividade enzimática permaneceu similar à atividade da catalase nativa; que o polímero não afetou a estabilidade dela em altas temperaturas e, ainda, que essa ligação do PEG mostrou ser eficaz em tornar a catalase resistente à digestão proteolítica (especificamente resistente à degradação pela tripsina, quimiotripsina e protease de *S. griseus*). A metodologia empregada, entretanto, refere-se à PEGuilação aleatória descrita anteriormente e a preparação resultante apresenta significativa polidispersão em relação ao grau de PEGuilação da catalase.

Desse modo, a proposta desse estudo é o desenvolvimento de uma estratégia de PEGuilação sítio-específica *N*-terminal da catalase, reação que consiste em ataque nucleofílico da amina primária do resíduo *N*-terminal da proteína ao grupamento éster (NHS) do polímero, criando uma ligação amida estável e liberando o NHS como subproduto da reação.

Juntamente ao desenvolvimento da estratégia de reação, propõe-se o estudo dos diferentes tamanhos de PEG na reação e a avaliação da estrutura proteica após modificação. Espera-se que, assim, a enzima tenha sua biodisponibilidade aumentada, maior resistência a variações de temperatura e pH e menor potencial imunogênico, para que futuramente o seu potencial como biofármaco para o tratamento do vitiligo seja verificado.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a PEGuilação N-terminal, posterior purificação da catalase PEGuilada e avaliação de sua estrutura e atividade enzimática após adição de PEG. Além disso, foram estudadas a termoestabilidade e estabilidade em função do tempo para a enzima tanto PEGuilada quanto não PEGuilada e foi avaliada *in vitro* a capacidade do produto de diminuir a peroxidação lipídica, bem como a permeabilidade da enzima PEGuilada nos diferentes estratos da pele.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Para o desenvolvimento do projeto, foi empregada a catalase de fígado bovino (240 kDa, pl 5,4) obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) em reações de PEGuilação com polímero PEG de 10.000, 20.000 e 40.000 Da. O polímero metoxi-polí(etenoglicol) carboximetil *N*-hidroxisuccinimidil éster (mPEG-NHS) foi obtido da Nanocs (New York, NY). Todas as soluções foram preparadas com água deionizada por sistema de purificação de água Millipore tipo Milli-Q (Bedford, MA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2. DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE PEGUILAÇÃO N-TERMINAL DA CATALASE²⁶

A fim de definir um protocolo de PEGuilação ideal, pHs reacionais diferentes foram testados, variando entre 6 e 8. Para a PEGuilação, soluções de 1 mg/mL de catalase e mPEG-NHS 10 kDa, na proporção de 25:1 (PEG:proteína), em tampão PBS de pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 foram feitas. As soluções foram mantidas por 60 minutos sob agitação a 400 rpm, 22 °C e, após esse intervalo, hidroxilamina 0,2 M foi adicionada à mistura reacional em quantidade equivalente a 20% do volume reacional (200 µL), para clivar qualquer sítio instável de PEGuilação que tenha sido

formado na proteína. O sistema, então, foi mantido sob agitação por mais uma hora. Reações de PEGuilação também foram realizadas usando mPEG-NHS de 20 e 40 kDa, em tampão PBS pH 8,0, que ofereceu melhor condição para PEGuilação. As amostras do meio reacional foram purificadas por cromatografia de exclusão molecular, FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*), em cromatógrafo AKTA e analisadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes (gel nativo). O rendimento da reação foi estimado pela integração dos picos obtidos na purificação pelo método de FPLC.

3.3. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SEM SDS (NATIVA)

Para as análises de eletroforese foi empregado gel de empacotamento de 5% (m/v) de poliacrilamida e gel de corrida de 8% em suporte de 0,75 mm. O gel para separação eletroforética foi preparado com 375 mM de Tris-HCl pH 8,8, 8,1% de acrilamida/bis-acrilamida, 0,1% (m/v) de persulfato de amônio (PSA) e 0,06% (v/v) de tetraetilelenodiamina (TEMED). Já o gel empacotador foi preparado com 125 mM de Tris-HCl pH 6,8, 5% de acrilamida/bis-acrilamida, 0,1% (m/v) de PSA e 0,1% (v/v) de TEMED. Para as análises, amostras de 10 µL de meio reacional foram adicionadas a 5 µL de tampão de proteína 4x e 5 µL de água ultrapurificada. O tampão de corrida foi Tris-Glicina 1x pH 8,3 e os géis foram decorados sob corrente de 80 mA a 22°C. Após essa etapa, o gel foi submetido à coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0.1 % em metanol: água: ácido acético glacial (45:45:10).²³

3.4. PURIFICAÇÃO DA CATALASE MONO-PEGUILADA²⁷

A purificação da catalase mono-PEGuilada foi realizada por meio de duas etapas: (a) diafiltração em membrana celulósica Amicon® de 10 kDa (Millipore, Sigma), realizada com a finalidade de remover a *N*-hidroxisuccinimida e o sal de hidroxilamina, presentes no meio reacional; e (b) cromatografia por exclusão molecular em sistema de purificação AKTA™ (GM Healthcare), contendo uma coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL pré-empacotada com resina de alta resolução de agarose-dextrano, a fim de separar a enzima mono-PEGuilada da enzima nativa e de outros produtos de PEGuilação remanescentes (PEG e

conjugados poli-PEGuilados). A coluna foi equilibrada com tampão fosfato 0,1 M (0,14 M de NaCl, pH = 7,4) e, com esse mesmo tampão, foi feita uma corrida em fluxo de 0,75 mL/min. A quantificação de cada conjugado e das proteínas puras remanescentes foi feita pelo mesmo método de cromatografia de exclusão molecular e monitoramento do perfil de eluição por absorbância no UV a 280 nm, com coleta de frações de 1 mL e posterior quantificação da concentração da enzima nas mesmas (item 3.5).

3.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CATALASE

A quantificação da catalase foi feita por meio de reação com ácido bicinconílico (BCA), que se baseia na redução de Cu²⁺ para Cu⁺ pelas ligações peptídicas da proteína, cuja quantidade é proporcional à quantidade de proteína presente e pode ser detectada pela mudança de cor para roxo/azul (detectada em espectrofotômetro em 562 nm) devido à formação de complexo BCA-Cu⁺. Para esse ensaio, BCA é misturado ao sulfato de cobre 4% na proporção de 50:1, formando o Reagente BCA. Em seguida, 25 µL da amostra de proteína são adicionados a 200 µL do Reagente BCA em placas de 96 poços. A placa, então, é incubada por 60 minutos a 37°C e a absorbância em cada poço é medida em espectrofotômetro a 562 nm. Por fim, é traçada a curva padrão com catalase nas concentrações de 200 a 1000, tornando possível, por meio dessa curva, a determinação da concentração de catalase.²³

3.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE

3.6.1. Método A (decaimento de absorbância)²⁸

Neste método, a atividade específica da catalase foi determinada com base no decaimento de absorbância a 374 nm pela reação de degradação do peróxido de hidrogênio catalisada pela enzima. Para que fosse obtido sucesso utilizando este método, foi necessário preparar algumas soluções além da solução contendo a amostra (tubo teste):

Tabela 1 - Preparação das soluções para medida de atividade enzimática da catalase.

	Teste	Controle	Padrão	Branco
Amostra	100 µL a 2 µg/mL	100 µL	-	-
Água deionizada	-	1000 µL	100 µL	1100 µL
Peróxido de hidrogênio	1000 µL	-	1000 µL	-
Molibdato de amônio	4000 µL	4000 µL	4000 µL	4000 µL

Todos os tubos foram incubados a 37°C, por 3 minutos. Em seguida, a reação foi parada pela adição de 4 mL de solução de molibdato de amônio em tampão fosfato, a absorbância foi lida em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 374 nm e os valores obtidos foram utilizados para determinar a atividade enzimática, segundo a equação (1):

$$\text{Atividade enzimática (kU)} = \frac{2,303}{t} * \log \log \frac{S^\circ}{S-M} * \frac{Vt}{Vs} \quad (1)$$

em que: t = tempo; S° = absorbância do tubo padrão; S = absorbância do tubo teste; M = absorbância do tubo controle (fator de correção) ; Vt = volume total de reagentes no tubo teste e Vs = volume de amostra

Por fim, o valor obtido em kU foi transformado em U/mg, gerando o valor de atividade específica da catalase.

3.6.2. Método B (altura da espuma)²⁹

Outro método de determinação da atividade específica da enzima, utilizado nos ensaios de estabilidade, é o que se baseia na formação de bolhas após reação entre a catalase e seu substrato, o peróxido de hidrogênio. As bolhas de oxigênio formadas na decomposição do peróxido de hidrogênio são aprisionadas pelo tensoativo não-iônico Triton X-100 diluído, formando, então, uma camada de

espuma passível de medição, visto que é proporcional à atividade enzimática. Para que fosse possível a determinação da atividade por meio deste método, uma curva de calibração (altura da espuma no tubo X atividade enzimática) foi necessária. No momento da medição, 100 µL de cada um dos reagentes (Triton X-100 1% v/v e peróxido de hidrogênio 30% v/v) e também da amostra de enzima foram adicionados a um tubo de ensaio de 13 mm de diâmetro, que, durante a reação, foi colocado por 15s em vórtex e, em seguida, deixado em repouso por 15 minutos, a fim de medir a maior altura possível da espuma formada. Os valores obtidos, em mm, foram então transformados em unidades de atividade (U) por meio da reta de calibração ($y = 0,3794x - 2,0909$) e, por fim, transformados em atividade relativa para fins comparativos.

3.7. AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA PROTEICA

Esta avaliação foi dividida em duas partes e baseadas na técnica de Dicroísmo Circular (DC), que tem como princípio a absorbância diferencial de luz circularmente polarizada por compostos quirais, como a própria estrutura proteica. Os ensaios foram realizados em colaboração com o Dr. Gustavo Carretero Batesini, pós-doutorando no Instituto de Química da USP.

Na primeira parte, foi realizada uma comparação das estruturas secundárias, cujo espectro (das formas nativa e PEGuiladas) foi obtido a partir de média de seis varreduras a 30°C, subtraído o espectro do tampão PBS 100 mM pH 8.2, em espectropolarímetro Jasco J-815. Estes espectros foram obtidos na faixa de 190-260 nm (*far-UV*) e na faixa de 250-350 nm (*near-UV*) para, respectivamente, investigar o conteúdo da estrutura secundária da enzima e acessar as “digitais” (*fingerprints*) da estrutura terciária da amostra. As medições em *near* e *far-UV* foram ambas realizadas antes e depois dos processos de aquecimento e resfriamento da amostra para avaliar as mudanças conformacionais secundárias da enzima mediante aumento de temperatura e posterior resfriamento. As amostras, numa concentração de 0,4 µM, foram colocadas em células ópticas de quartzo de 5 nm e seus espectros (θ , mdeg) foram convertidos em elipticidade molar residual ([θ], deg.cm².dmol⁻¹) segundo a equação (2):

$$[\theta] = \theta / (10 * C * I * n) \quad (2)$$

em que: "C" é a concentração de proteína (mol/L), "I" é o comprimento óptico (cm) e "n" é o número estimado de resíduos na estrutura proteica.

Na segunda parte, também em espectropolarímetro Jasco-815, foi avaliada a termoestabilidade da catalase e de suas formas PEGuiladas. Para estudar os processos de desenovelamento e reenovelamento, foram feitas varreduras de temperatura, respectivamente, em intervalo de 30°C a 95°C e de 95°C a 30°C. As amostras submetidas a este procedimento estavam em concentração de 0,4 µM e em celas como as já descritas anteriormente. Deste modo, foram medidas ao longo da mudança de temperatura as intensidades de elipticidade a 222 nm (θ_{222} , mdeg). Com os mesmos dados obtidos, foi possível determinar a temperatura de fusão (*melting point*) das enzimas a partir da equação de Hill (3):

$$\text{Elipticidade} = \text{Elipticidade}_{30^\circ\text{C}} + (\text{Elipticidade}_{80^\circ\text{C}} - \text{Elipticidade}_{30^\circ\text{C}}) \times T^n / (T_{\text{Melting}}^n + T^n) \quad (3)$$

em que Elipticidade e T são, respectivamente, as variáveis y e x; Elipticidade_{30°C} e Elipticidade_{80°C} são os valores de elipticidade medidos até 30°C e 80°C; T_{Melting} é a temperatura de fusão e n é o coeficiente de cooperatividade.

3.8. ESTUDO DE ESTABILIDADE PELO TEMPO

A fim de estudar o comportamento da enzima ao longo do tempo, realizou-se um ensaio de estabilidade pelo tempo em duas temperaturas distintas: 4°C e 37°C, respectivamente em geladeira e estufa. As respectivas amostras de catalase PEGuilada com mPEG-NHS de 10, 20 e 40 kDa, bem como a enzima nativa foram deixadas durante quatro semanas à temperatura constante e tiveram suas atividades medidas a cada 7 dias (3 para amostras específicas).

3.9. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA PELE *IN VITRO*

A determinação da capacidade da catalase PEGuilada (CAT-PEG 20) de agir como antioxidante na pele foi feita por meio de ensaio de difusão vertical em células de Franz, que tem como objetivo avaliar a permeabilidade do composto PEGuilado

em sistema que mimetiza a pele humana por meio da monitorização da passagem do composto de um compartimento a outro, separado por membrana^{30,31}, seguido por quantificação por ensaio de TBARS, que visa avaliar indiretamente a produção de radicais livres, por meio da consequente peroxidação lipídica por eles causados. Para o ensaio, amostras de pele de orelhas de porco foram empregadas como modelo de membrana, obtidas a partir de um abatedouro local. Após a coleta, as amostras de pele foram limpas, removendo-se os pelos e cartilagem, com auxílio de bisturi, e, posteriormente, estocadas sob refrigeração (-20 °C) até a utilização nos ensaios.³² O ensaio de difusão de Franz foi realizado com área média de difusão de 0,75 cm². O compartimento receptor continha fase receptora com tampão PBS de pH 7,4, e foi mantido a 32,0°C, sob agitação de 130 rpm. O compartimento doador continha 1 mL de cada amostra (catalase nativa, usada como padrão – CAT e catalase PEGuilada com 20 kDa – CAT-PEG 20) e sua evaporação foi prevenida com o uso de aparelhos oclusivos. Após 24h, cada compartimento exposto às amostras foi lavado com tampão PBS três vezes. As amostras de pele foram, então, irradiadas em Atlas Suntest ® CPS + simulador com lâmpada xênon (1500 W) a 5506 KJ/m² (765 W/m²). Depois da irradiação, o estrato córneo foi removido com o uso de fita adesiva, a pele foi cortada em pequenos pedaços e deixada em 10 mL de metanol. Por fim, as amostras foram colocadas em banho ultrassônico por 15 minutos e filtradas em membrana de 0,45 µm.³³

A avaliação se seguiu com o ensaio de TBARS, que consiste em reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com malondialdeído (MDA), um dos produtos majoritariamente formados na peroxidação lipídica. Em pH baixo e temperatura alta, o ácido tiobarbitúrico reage com o malondialdeído, gerando um composto rosa. Seguindo esse racional, 1 mL de cada amostra foi adicionado à 144 µL de BHT a 0,2% (em metanol) e 400 µL de H₃PO₄ 0,44 M. Em seguida, 600 µL de TBA 0,6% (em 0,44 M de H₃PO₄) foram também adicionados e os tubos foram colocados em vórtex. Após a agitação, foram deixados em banho de 90°C por 45 minutos e, então, 600 µL de n-butanol foi adicionado a cada amostra e elas foram centrifugadas a 3000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi analisado por cromatografia líquida (HPLC) com coluna C18 (250 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 mm) (Phenomenex, Luna) precedida por pré-coluna 10 x 4,6 mm. A fase móvel se compôs por metanol:tampão PBS 50 mM, pH 7,0 na proporção 65:35 e nela foi aplicado fluxo de 1,0 mL/min e a cromatografia foi realizada sob temperatura de

30°C. A detecção foi realizada por meio de detector de diodos (Shimadzu, Japan)³⁴ a 532 nm, a curva-padrão foi obtida a partir da solução de MDA gerada pela hidrólise de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TEP) e os resultados foram expressos como porcentagem de peroxidação lipídica.³⁵ Por fim, as análises estatísticas foram feitas com auxílio do software Minitab (versão 16), com intervalo de significância de 0,5% ($\alpha = 0,05$) e os dados foram tratados usando análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para múltiplas comparações.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO DO pH – DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONDIÇÃO DE REAÇÃO

Inicialmente, a reação de PEGuilação foi realizada com o PEG de 10 kDa e em diferentes valores de pH (variando entre 6,0 e 8,0). Os meios reacionais obtidos foram purificados por cromatografia de exclusão molecular e foram obtidos os cromatogramas apresentados nas Figuras de 6 a 10. É possível perceber que, apesar da quantidade de PEG que não reagiu (representado pelo pico que eluiu por volta de 20 mL) aumentar em função do pH empregado, houve o aparecimento de um pico por volta de 11 mL de eluição. Esse pico é relativo à catalase PEGuilada e aumenta com o aumento de pH, indicando maior taxa de conjugação da enzima ao polímero. Além dele, é possível notar também a diminuição do pico referente à catalase nativa, confirmando o efeito do pH na reação. Portanto, definiu-se o valor de pH 8,0 como adequado à PEGuilação *N*-terminal da catalase.

O motivo para esse valor de pH ser o ideal para a reação se baseia no fato de o resíduo *N*-terminal da enzima estar desprotonado e, portanto, hábil a realizar um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico deficiente em elétrons do PEG reativo. Ainda, o valor encontrado se justifica também pelo fato de não ser tão alto a ponto de desprotonar também as lisinas presentes na estrutura proteica, o que as tornaria também hábeis à reação, mostrando, então, uma queda no rendimento da reação, uma vez que seriam formadas diversas estruturas proteicas poli-PEGuiladas.

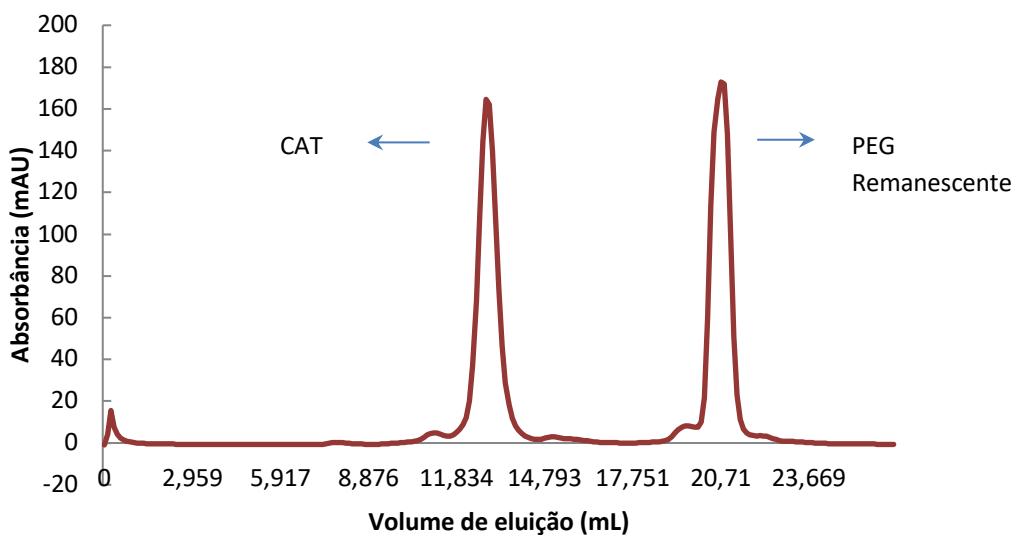


Figura 6. Cromatograma (SEC) obtido após purificação para a PEGilação da catalase (CAT) em pH 6,0 com PEG 10 kDa.

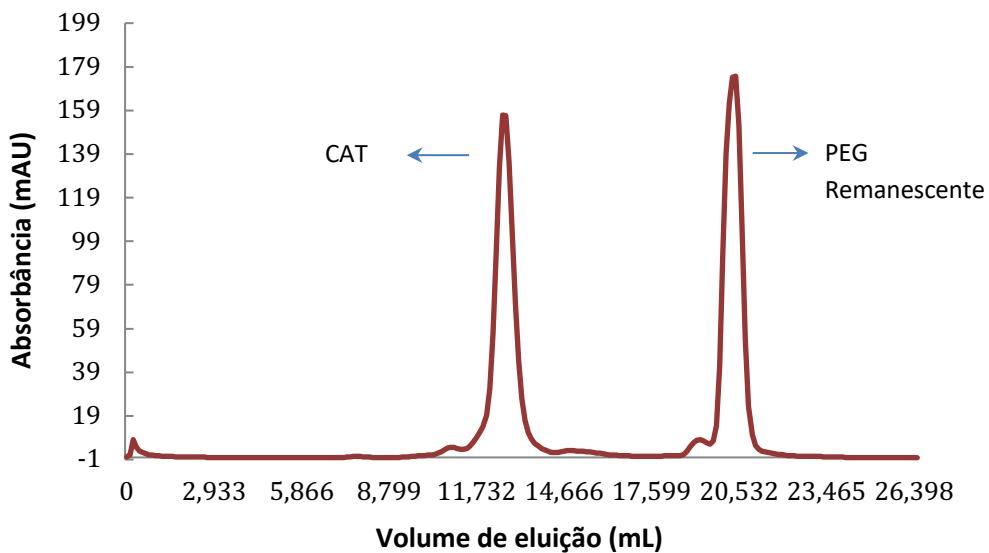


Figura 7. Cromatograma (SEC) obtido após purificação para a PEGilação da catalase (CAT) em pH 6,5 com PEG 10 kDa.

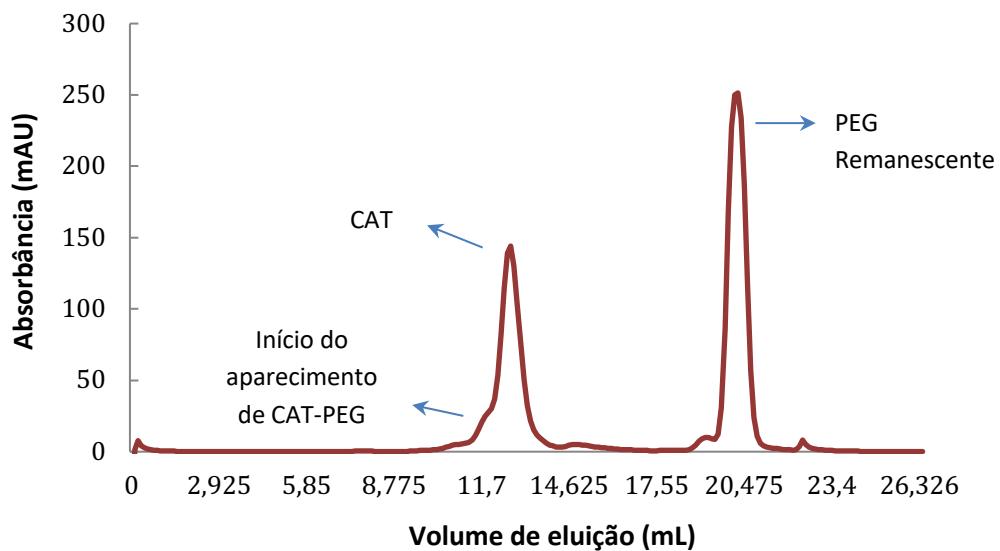


Figura 8. Cromatograma (SEC) obtido após purificação para a PEGilação da catalase (CAT) em pH 7,0 com PEG 10 kDa.

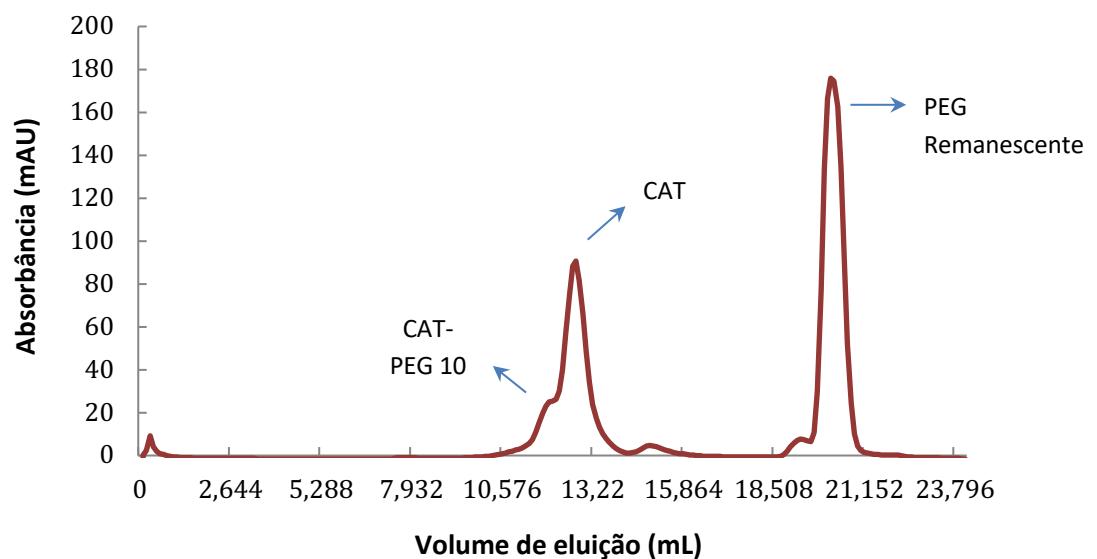


Figura 9. Cromatograma (SEC) obtido após purificação para a PEGilação da catalase (CAT) em pH 7,5 com PEG 10 kDa.

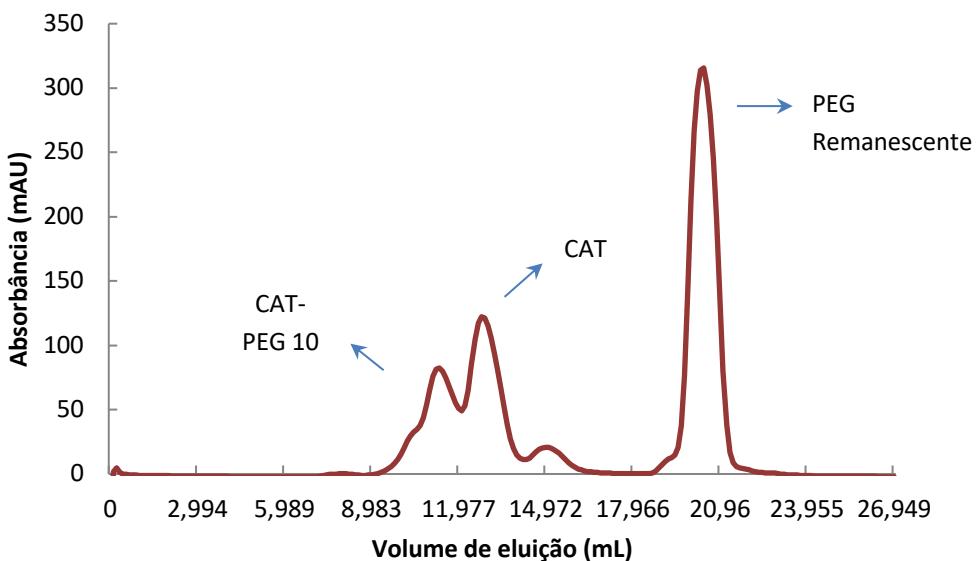


Figura 10. Cromatograma (SEC) obtido após purificação para a PEGuilação da catalase (CAT) em pH 8,0 com PEG 10 kDa.

4.2 ESTUDO DO TAMANHO DO PEG

A PEGuilação da catalase foi então realizada empregando-se os PEGs de 20 e 40 kDa, em pH 8,0 (Figuras 11 e 12).

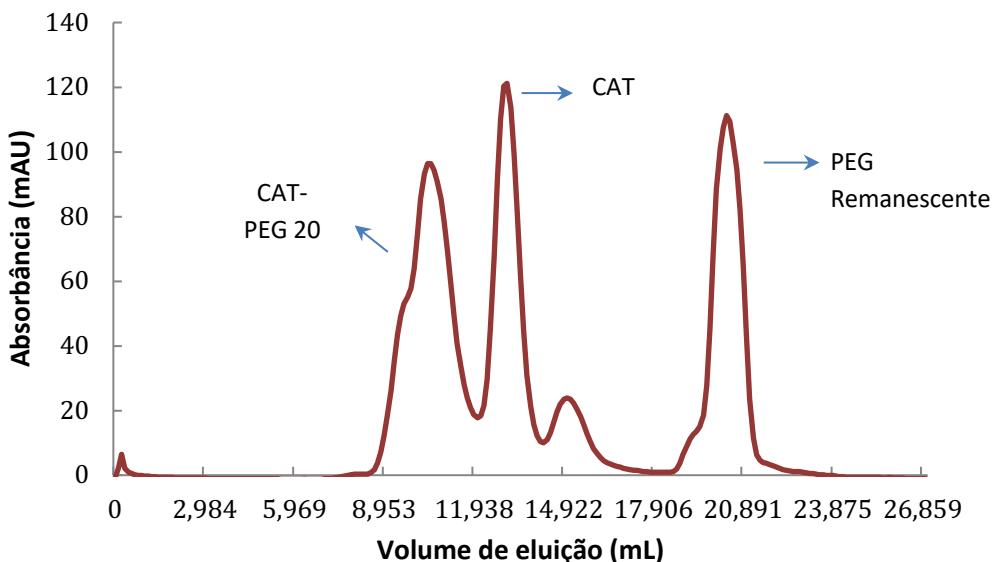


Figura 11. Cromatograma (SEC) obtido após purificação para a PEGuilação da catalase (CAT) em pH 8,0 com PEG 20 kDa.

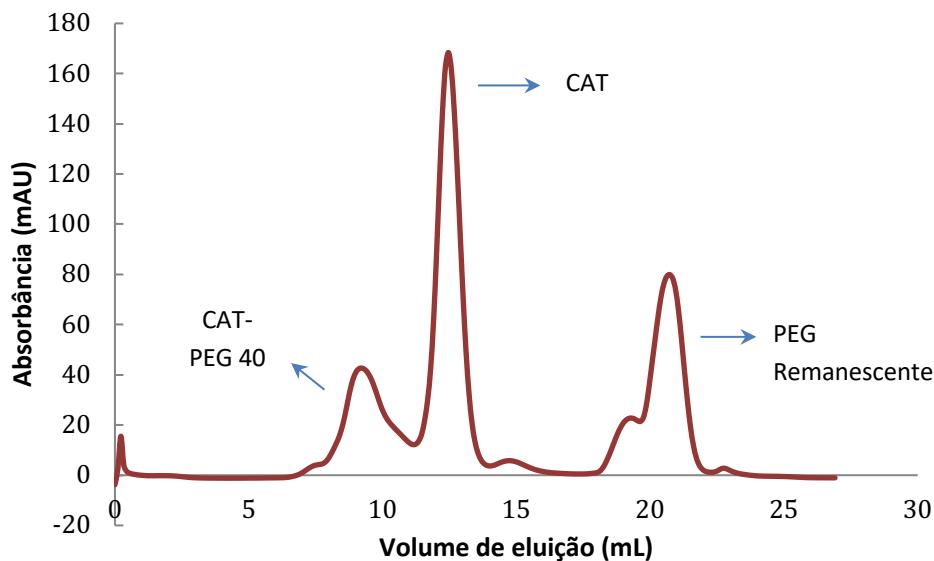


Figura 12. Cromatograma (SEC) obtido após purificação para a PEGilação da catalase (CAT) em pH 8,0 com PEG 40 kDa.

A partir da comparação entre as figuras 10, 11 e 12, é possível perceber que a reação utilizando o PEG de massas moleculares maiores, como de 20 e 40 kDa, resulta em cromatogramas com melhor resolução entre os picos, indicando melhor separação da enzima PEGuilada dos demais resíduos. A diferença maior de tamanho faz com que a retenção da catalase PEGuilada na coluna seja menor em relação aos demais componentes do meio (proteína nativa que não reagiu e PEG residual), que acabam permanecendo mais tempo na coluna e eluindo mais tardiamente. Além disso, também é possível perceber uma diminuição do pico de polímero que não reagiu com o aumento da massa molecular do PEG. Apesar desse aumento de massa molecular estar relacionado à maior utilização do PEG reativo na reação, isso não se traduz em aumento de rendimento da reação em todos os casos: como é possível ver na Tabela 2, a catalase PEGuilada com PEG-NHS de 40 kDa (CAT-PEG 40) não teve o maior rendimento de reação como esperado, e o motivo principal para este achado é o impedimento estérico causado pelo polímero acoplado à enzima, que dificulta a reação.

O rendimento das três reações foi calculado a partir da integração dos picos referentes à catalase PEGuilada (1) e catalase nativa (2) e mostrou os valores apresentados na Tabela 2. Como pode ser observado, o maior rendimento ocorreu com o PEG de 20 kDa e o menor com o PEG de 40 kDa, que, como anteriormente discutido, sofreu maior impedimento estérico.

Tabela 2 – Rendimentos obtidos nas reações de PEGuilação da catalase.

Tamanho do PEG (kDa)	Área dos picos 1 e 2 (mAU x mL)	Rendimento da reação (%)
10	124,67 e 150,17	45
20	171,18 e 121,21	59
40	77,54 e 172,38	31

A eletroforese em gel nativo (Figura 13) mostra que, após purificação, realmente se obteve a catalase PEGuilada com PEG de 10, 20 e 40 kDa. No poço correspondente à catalase nativa, é possível perceber uma forte banda na região equivalente a 240 kDa, que é a massa molecular da enzima; no segundo poço, correspondente à CAT-PEG 10, é possível perceber uma banda mais acima da banda da catalase nativa, o que indica que a amostra correu menos no gel por ser maior, visto que CAT-PEG 10, por ser um tetrâmero com 4 grupamentos *N*-terminais, tem tamanho aproximado de 280 kDa. No terceiro e quarto poços correspondentes a CAT-PEG 20 e CAT-PEG 40, respectivamente, a tendência de se observar bandas superiores no gel se mantém. Ainda, no quarto poço, além da banda referente à CAT-PEG 40 é possível perceber outra banda, provavelmente relativa a uma impureza, como aparece no cromatograma por volta de 14 mL eluídos.

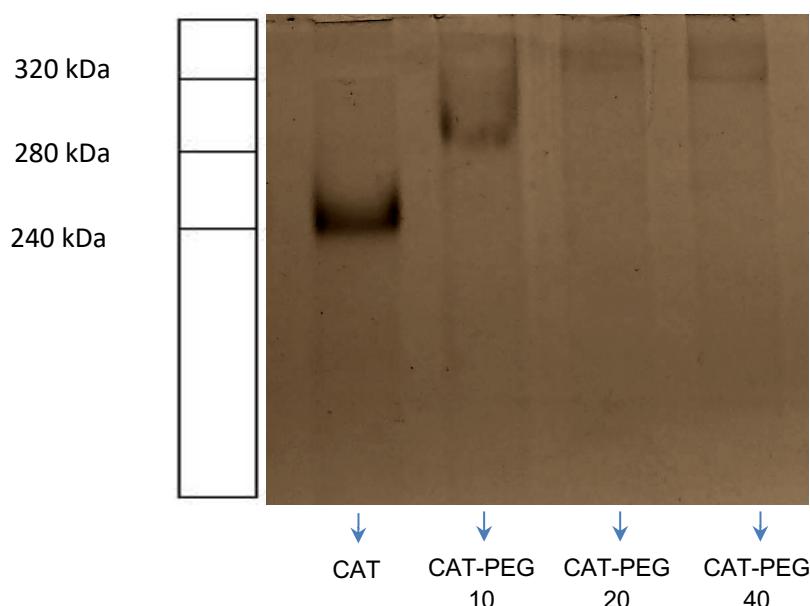


Figura 13. Eletroforese em gel nativo (8% wt acrilamida) das amostras de catalase PEGuiladas com PEG-NHS de 10 kDa (CAT-PEG 10), 20 kDa (CAT-PEG 20) e 40 kDa (CAT-PEG 40).

A Tabela 3 apresenta os resultados de atividade enzimática para a catalase nativa e suas formas PEGuiladas com os diferentes tamanhos do polímero. Como pode ser observada, a atividade da enzima diminui com o tamanho da cadeia de PEG ligado covalentemente. Isso ocorre pelo fato de a enzima PEGuilada passar a apresentar maior restrição conformacional, dificultando a reação de catálise. Ainda assim, os valores de atividade se mantiveram na mesma ordem de grandeza, o que significa que a atividade foi relativamente preservada. Considerando essa preservação e também o potencial ganho em estabilidade, as enzimas PEGuiladas continuam a representar uma ferramenta promissora.

Tabela 3 – Atividade enzimática da catalase (CAT) e variantes PEGuiladas, baseada em ensaios de degradação de peróxido de hidrogênio (método A).

	CAT	CAT-PEG 10	CAT-PEG 20	CAT-PEG 40
Atividade enzimática (kU/L)	-	17,57 ± 0,14	11,30 ± 0,09	10,82 ± 0,05
Atividade específica (kU/mg)	10.000	8788	5652	5409

4.3 EFEITO DA PEGUILAÇÃO NA ESTRUTURA PROTEICA

O efeito do PEG na estrutura da catalase foi avaliado pela técnica de Dicroísmo Circular. Os resultados, apresentados nas Figuras 14, 15 e 16, indicam que não há comprometimento das estruturas secundária e terciária da catalase após a ligação *N*-terminal de PEG, seja de 10, 20 ou 40 kDa. Portanto, a PEGuiliação preservou a estrutura da enzima. As pequenas variações observadas nas curvas obtidas para as proteínas PEGuiladas na análise de dicroísmo circular em região de UV próximo (*NEAR UV CD*) devem-se à flexibilidade das cadeias de PEG ligadas à enzima.

O que se observa a partir das Figuras 14 e 15 é a tendência, em todas as amostras, à mudança de conformação secundária após aquecimento. Pelos gráficos, se percebe que, antes do aquecimento, há predominância de conformação em folha β -pregueada, que tem um pico de absorção a 211 nm aproximadamente; e

se percebe também que após o aquecimento esta conformação passa a ser predominantemente α -hélice, com picos de absorção em 208 e 222 nm aproximadamente.

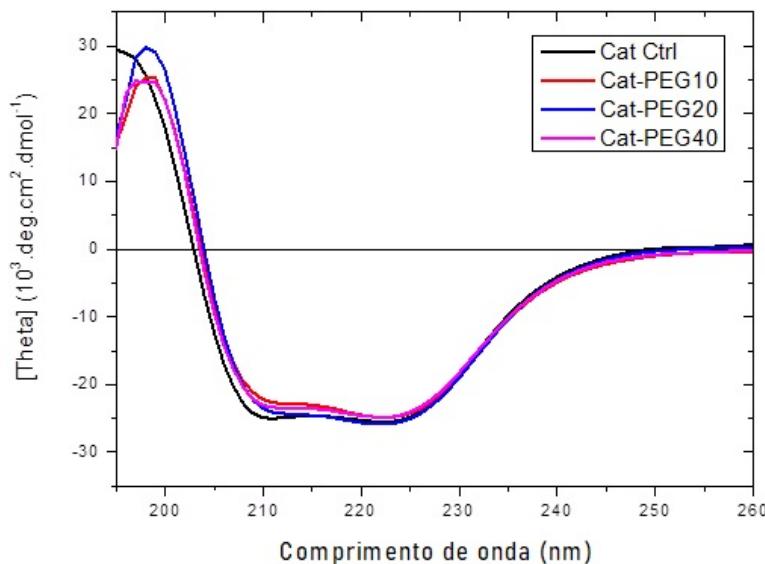


Figura 14. Espectro de dicroísmo circular em região de UV distante (*FAR UV*) para a catalase (CAT) e suas variantes PEGuiladas antes do aquecimento.

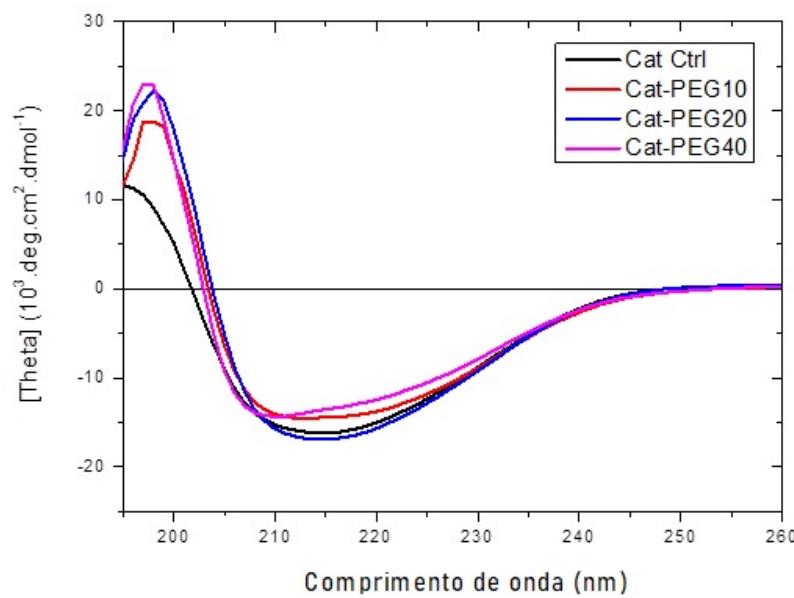


Figura 15. Espectro de dicroísmo circular em região UV distante (*FAR UV*) para catalase (CAT) e suas variantes PEGuiladas após o aquecimento.

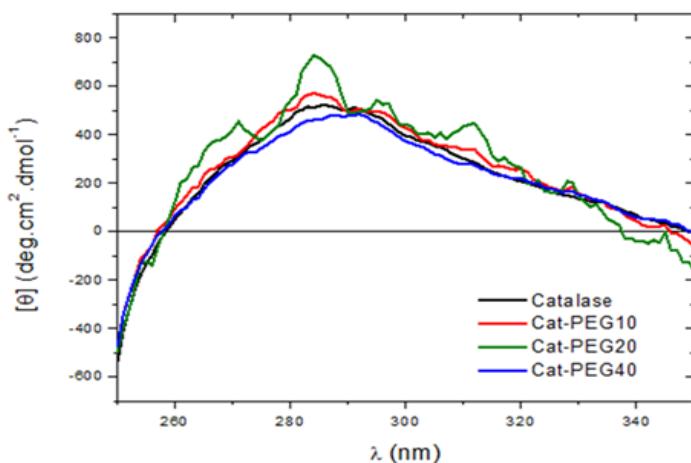


Figura 16. Fingerprints terciários gerados a partir dos espectros de dicroísmo circular em região de UV próximo (NEAR UV) para a catalase (CAT) e suas variantes PEGuiladas antes do aquecimento.

A termoestabilidade das formas nativa e PEGuilada também foi investigada por dicroísmo circular, capaz de fornecer informações sobre o comportamento das amostras sob aquecimento até 95°C e posterior resfriamento a 30°C (Figuras 17 a 20). É possível observar pela diferença nas curvas preta e vermelha (correspondentes ao processo de aquecimento e resfriamento, respectivamente) que a alteração conformacional sofrida pela enzima ao longo do aumento de temperatura é irreversível, ou seja, a proteína foi irreversivelmente desnaturada com o aumento da temperatura até 95°C.

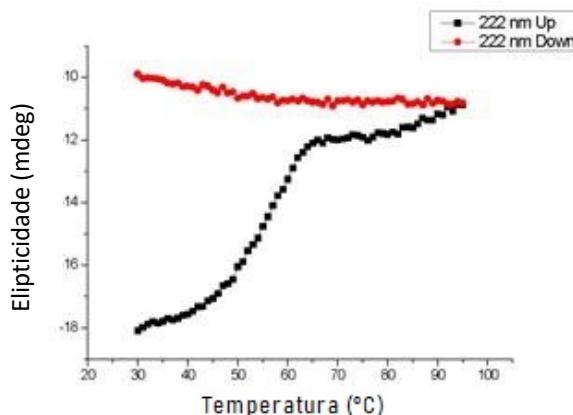


Figura 17. Espectro de dicroísmo circular - elipticidade para a catalase (CAT), gerado em 222 nm e com variação de temperatura entre 30°C e 95°C.

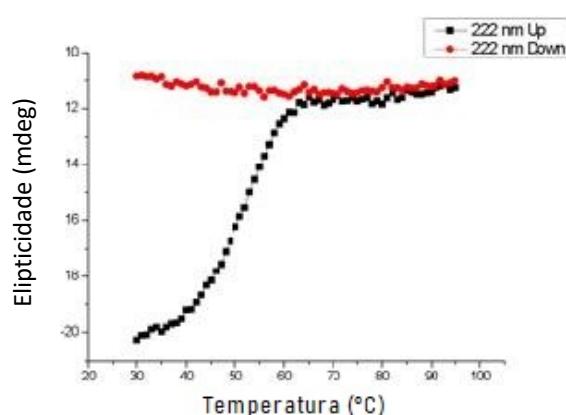


Figura 18. Espectro de dicroísmo circular - elipticidade para a CAT-PEG 10, gerado em 222 nm e com variação de temperatura entre 30°C e 95°C.

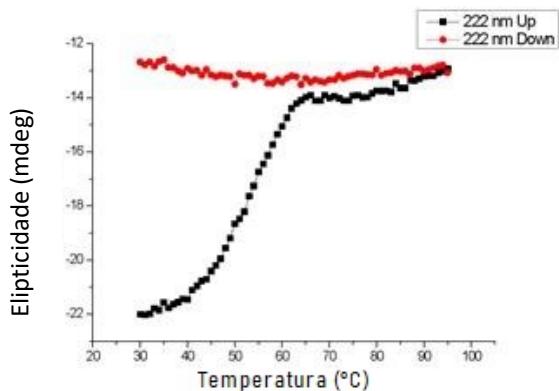


Figura 19. Espectro de dicroísmo circular - elipticidade para a CAT-PEG 20, gerado em 222 nm e com variação de temperatura entre 30°C e 95°C.

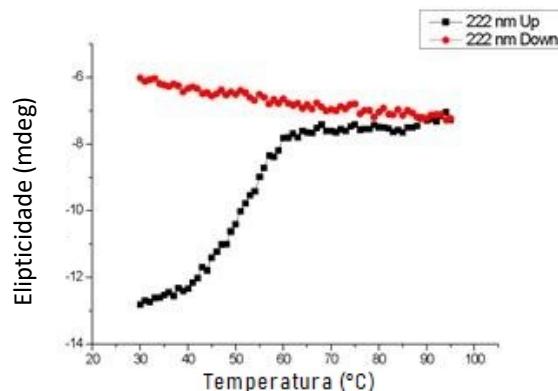


Figura 20. Espectro de dicroísmo circular - elipticidade para a CAT-PEG 40, gerado em 222 nm e com variação de temperatura entre 30°C e 95°C.

Por fim, se determinou os respectivos pontos de fusão das amostras, que correspondem à metade das curvas pretas apresentadas nas figuras 21 a 24. Os valores obtidos estão resumidos na Tabela 4. A partir dela, é possível perceber que, apesar da ligeira queda nos valores de temperatura de fusão, eles não têm diferença significativa quando comparados ao valor respectivo à catalase nativa, ou seja, mesmo com a adição de polímeros de alta massa molecular, o ponto de fusão é um parâmetro que não sofre grande variação.

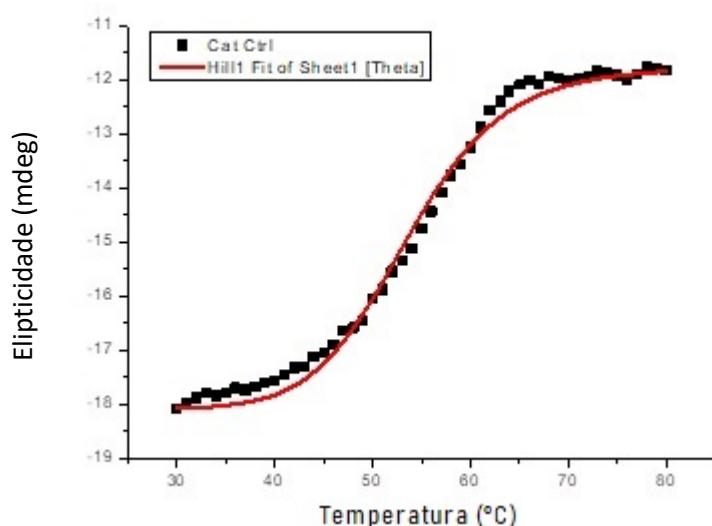


Figura 21. Espectro de dicroísmo circular - elipticidade para a catalase (CAT) com reta ajustada para determinação de Tfusão.

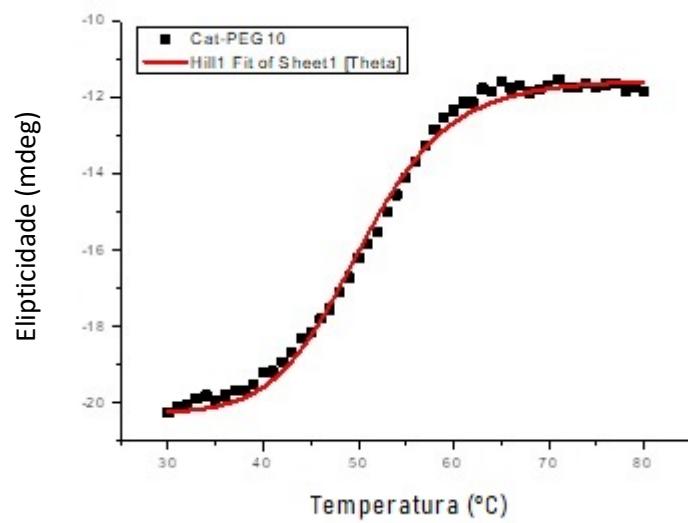


Figura 22. Espectro de dicroísmo circular - elipticidade para a CAT-PEG 10 com reta ajustada para determinação de Tfusão.

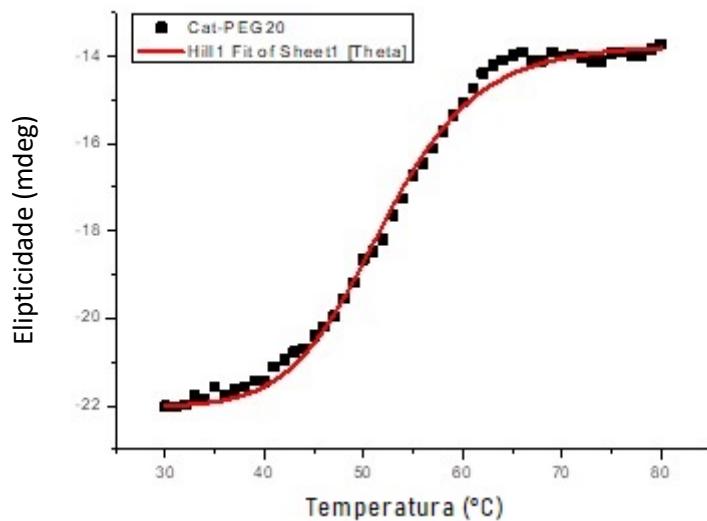


Figura 23. Espectro de dicroísmo circular - elipticidade para a CAT-PEG 20 com reta ajustada para determinação de Tfusão.

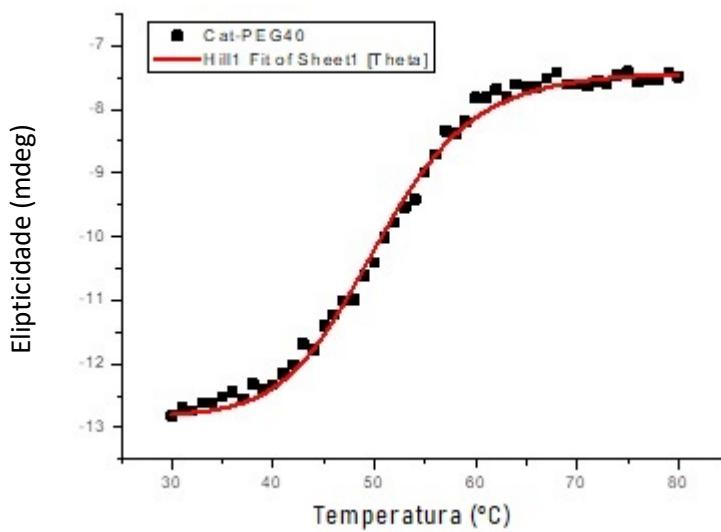


Figura 24. Espectro de dicroísmo circular - elipticidade para a CAT-PEG 40 com reta ajustada para determinação de $T_{\text{fusão}}$.

Tabela 4 – Temperaturas de fusão das amostras de catalase nativa e PEGuilada, determinadas por dicroísmo circular.

CAT nativa	CAT-PEG 10	CAT-PEG 20	CAT-PEG 40
Temperatura de fusão ($T_{\text{fusão}}$)	53,6°C	50,3°C	51,9°C

4.4 ESTABILIDADE AO LONGO DO TEMPO

O ensaio de estabilidade a 4°C ocorreu em geladeira durante 35 dias, sendo a atividade das amostras determinada a cada sete dias. Tanto a catalase como suas formas PEGuiladas não apresentaram variação significativa no valor de atividade enzimática ao longo do tempo (Figura 25), indicando estabilidade à temperatura de 4°C. Já o ensaio de estabilidade a 37°C ocorreu em estufa durante 27 dias. A Figura 26 mostra o perfil obtido para as quatro variantes e, como pode ser observada, a atividade das amostras diminui com o tempo, um resultado já esperado mesmo considerando a temperatura ótima da enzima (37°C). Também é possível perceber, em comparação à catalase nativa, que a queda da atividade relativa nesta temperatura foi consideravelmente menor para as variantes

PEGuiladas, indicando que o PEG ligado à estrutura conferiu estabilidade térmica à enzima. O efeito do PEG não se mostrou correlacionado ao tamanho da cadeia de polímero, sendo que os melhores resultados em termos de estabilidade a 37°C foram observados com o PEG de 20 kDa. Por ser um polímero de tamanho considerável, o impedimento estérico e hidratação das cadeias de PEG tornaram a catalase menos sujeita à agregação proteica. Além de aumentar o potencial imunogênico de um biofármaco, a agregação proteica está relacionada com a diminuição de hidrossolubilidade do produto, dificultando, entre outros fatores, o desenvolvimento de uma forma farmacêutica estável para distribuição e uso. No caso do PEG de 40 kDa, acredita-se que o efeito de *cloud point* da temperatura sobre PEGs maiores, que refere-se à desidratação das cadeias de PEG com interação entre estas pelo aumento da temperatura, pode ter causado a diminuição de atividade enzimática em relação ao PEG de 20 kDa. Não obstante, o acoplamento do PEG é uma ferramenta promissora no desenvolvimento de uma formulação à base de biomolécula, com potencial promoção de termoestabilidade.

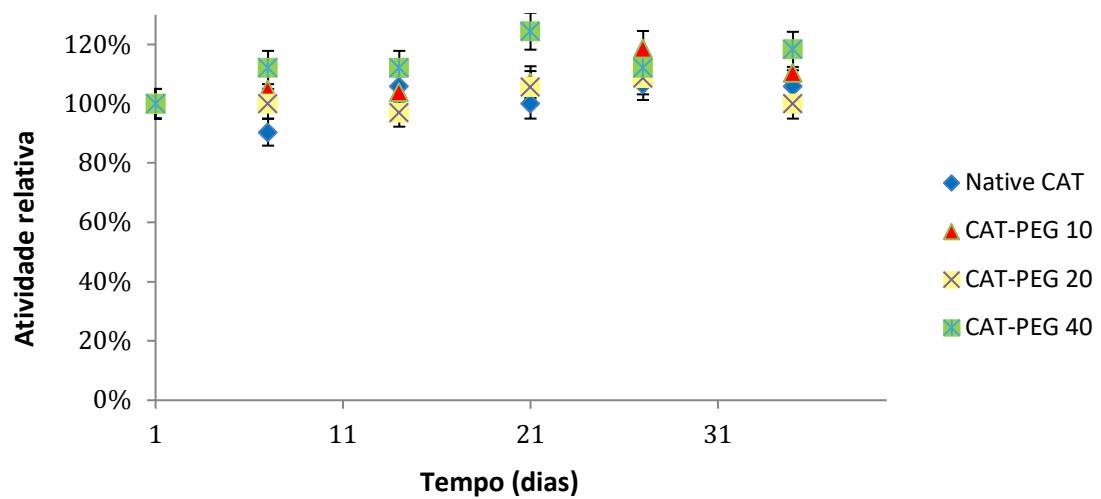


Figura 25. Estabilidade da catalase (CAT) e suas formas PEGuiladas em função do tempo a 4°C.

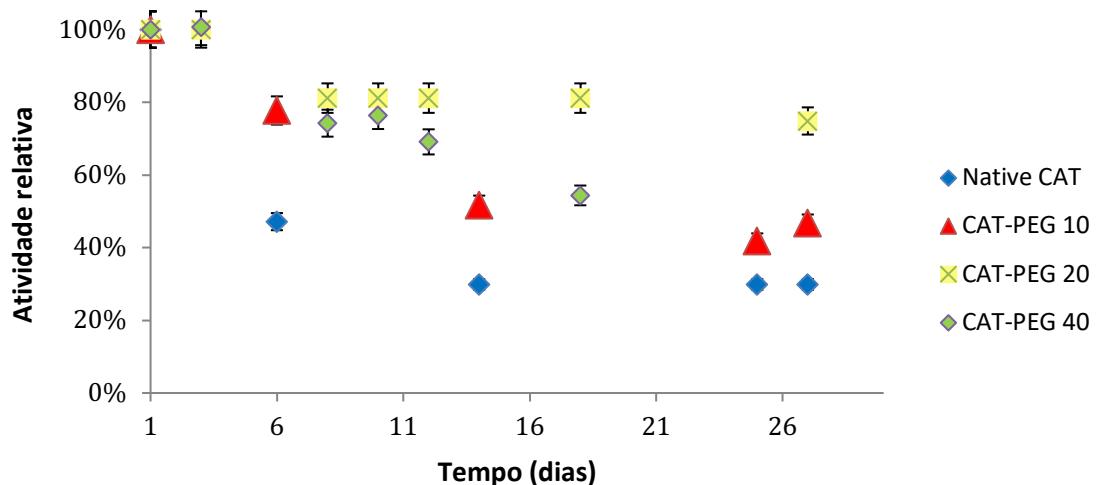


Figura 26. Estabilidade da catalase (CAT) e suas formas PEGiladas em função do tempo a 37°C.

4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA PELE *IN VITRO*

O potencial antioxidante da aplicação tópica da catalase nativa (CAT) e catalase PEGilada com 20 kDa (CAT-PEG 20) no estrato córneo e epiderme viável + derme foi determinado pela quantificação do produto formado pela reação de malondialdeído e ácido tiobarbitúrico. Os resultados foram analisados em função do decaimento na porcentagem de peroxidação lipídica e em comparação ao controle positivo (pele irradiada).

A radiação ultravioleta aumenta o estresse oxidativo na pele, em primeira instância, e esse estresse é medido por meio da formação de peróxido de hidrogênio e, consequentemente, de radicais livres, capazes de danificar a pele pela peroxidação das barreiras lipídicas. Esse mecanismo, em conjunto com o desencadeamento do sistema imunológico, tem participação importante no desenvolvimento das lesões características do vitiligo (item 1.2 – fisiopatologia do vitiligo). Os resultados obtidos pelos testes *in vitro* indicam que a catalase nativa (CAT) é capaz de reduzir significativamente a peroxidação lipídica tanto na camada superior da pele (estrato córneo), quanto nas mais profundas, representadas pela epiderme viável + derme. As Figuras 27 e 28 mostram que a peroxidação lipídica diminuiu no estrato córneo com o uso da enzima nativa e PEGilada a ponto de não poder ser detectada (ND). Apesar disso, a variante PEGilada com polímero de 20 kDa (CAT-PEG 20) se mostrou capaz de eliminar

a peroxidação lipídica apenas no estrato córneo, já que seu efeito nas camadas mais profundas não foi completo. Esse resultado aponta uma diferença importante entre o perfil de permeação da enzima nativa e de sua variante PEGuilada, o que se mostra favorável ao se pensar na capacidade aumentada do complexo catalase-polímero em agir somente no estrato córneo, proporcionando maior segurança na aplicação tópica do produto. Isso significa que a ligação do polímero PEG à catalase é capaz de proporcionar vantagens farmacodinâmicas e farmacocinéticas: por permanecer majoritariamente na camada superior da pele, a aplicação é mais segura, já que é menos capaz de alcançar a circulação sistêmica e também é mais eficaz, uma vez que próximo a este estrato da pele é que se encontra a maior expressão induzida por UV da catalase (nos queratinócitos da camada granular).^{36,37}

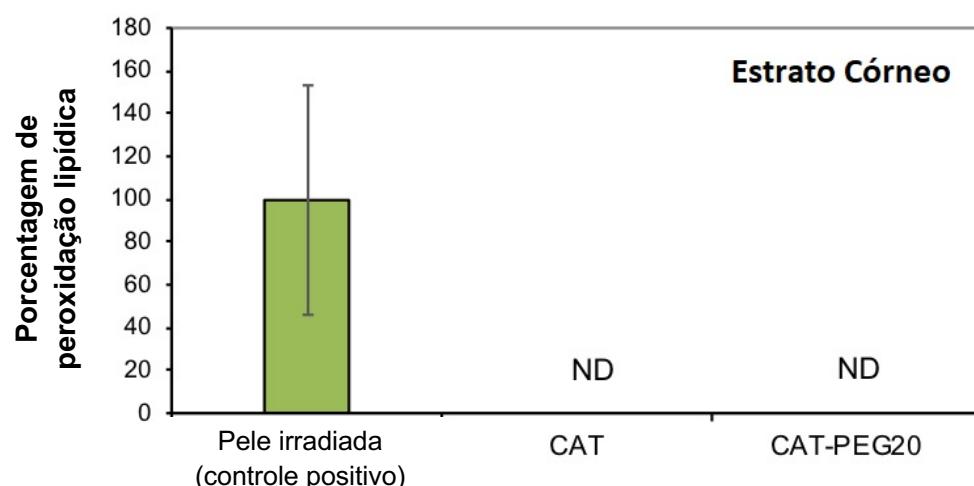


Figura 27. Porcentagem de peroxidação lipídica depois de 24 horas de permeação das amostras em estrato córneo de pele de porco. ND representa o pico não detectado. CAT: catalase nativa em solução de 0,24 mg/mL; CAT-PEG 20: catalase PEGuilada com polímero de 20 kDa, em solução de 0,24 mg/mL.

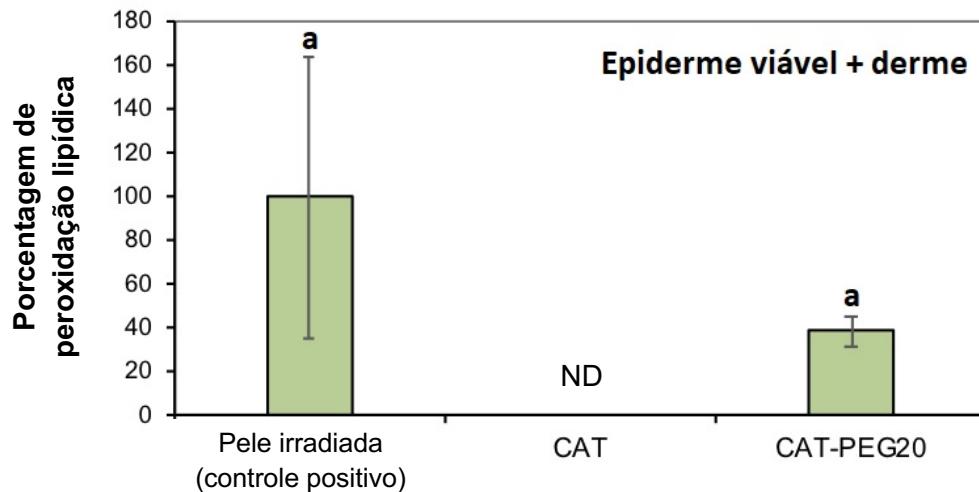


Figura 28. Porcentagem de peroxidação lipídica depois de 24 horas de permeação das amostras em epiderme viável + derme de pele de porco. ND representa o pico não detectado e as letras diferentes indicam diferença estatística entre as amostras ($p<0,05$; $n=3$). CAT: catalase nativa em solução de 0,24 mg/mL; CAT-PEG 20: catalase PEGuilada com polímero de 20 kDa, em solução de 0,24 mg/mL.

Além de ter um papel no mecanismo de desenvolvimento do vitiligo, a radiação UVA e UVB induz estresse oxidativo que também está relacionado ao dano actínico e à patogênese do fotoenvelhecimento.³⁷ Sabendo disso, pelo fato de ser capaz de eliminar as espécies reativas de oxigênio (EROs), o complexo de catalase PEGuilada também se mostra uma ferramenta importante no desenvolvimento de formulações tecnológicas e modernas de filtros solares. Esses produtos não só refletem e absorvem a radiação ultravioleta como os filtros clássicos disponíveis no mercado, como também são compostos por ativos capazes de tratar o dano induzido pela exposição à radiação ultravioleta.^{38,39}

5. CONCLUSÃO

Nesse estudo realizou-se a PEGilação *N*-terminal da catalase, de maneira seletiva. Para isso, foi estudada a melhor condição para a reação acontecer e foi possível definir o pH 8,0 como ótimo para esse procedimento, fornecendo maiores valores de rendimento.

Além disso, estudou-se a influência do tamanho do polímero empregado na reação, chegando à conclusão de que os de maior tamanho (20 e 40 kDa) facilitam o processo de purificação, ainda que na reação com PEG de 10 kDa tenha sido obtido um rendimento consideravelmente maior do que na reação com o polímero de 40 kDa. A atividade específica da catalase PEGuilada diminuiu com a PEGuição, no entanto os valores ainda se apresentaram adequados ao potencial uso da catalase, sendo que nenhum dos PEGs comprometeu a estrutura quaternária da enzima. Quanto à estabilidade das formas nativa e PEGuiladas, foi possível observar, em especial a 37°C, que a ligação do polímero confere estabilidade à enzima, fato evidenciado pelo aumento da atividade relativa dela ao longo do tempo, em comparação à forma nativa. Por meio de Dicroísmo Circular, foi possível perceber que a ligação do polímero diminuiu ligeiramente a temperatura de fusão da enzima, ainda que o processo de desnaturação com o aumento de temperatura não tenha sofrido grandes mudanças (em todas as amostras observou-se que houve mudança conformacional irreversível). Deste modo, é possível concluir que a queda de atividade específica da catalase, causada pela ligação de PEG, e a leve diminuição de temperatura de fusão da enzima são fatores compensados pelo ganho considerável de estabilidade do conjugado e pela ausência de comprometimento da estrutura enzimática.

Por fim, os testes *in vitro* da variante PEGuilada com PEG de 20 kDa (CAT-PEG 20) indicaram que o complexo é capaz de promover a diminuição dos radicais livres, fato evidenciado pela eliminação da peroxidação lipídica em estrato córneo. Apesar de o mesmo comportamento não ter sido observado nas camadas mais profundas da pele, o produto PEGuilado ainda se mostra promissor no desenvolvimento de um tratamento para o vitiligo por ser seguramente tópico.

Considerando os resultados promissores obtidos neste estudo, para que se tenha conhecimento mais profundo acerca da catalase PEGuilada, possibilitando futuramente seu emprego terapêutico, é necessário determinar parâmetros cinéticos da enzima nas diferentes formas (nativa e PEGuilada), confirmar a ligação de quatro cadeias de PEG por meio de espectrometria de massas, e, por fim, confirmar o potencial terapêutico desta molécula por meio de testes *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS

- 1 SCHALLREUTER, K.U.; MOORE, J.; WOOD, JM. et al. In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H_2O_2) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase. *Investig. Dermatol. Symp.*, vol. 4, n.1, p. 91–96, 1999.
- 2 SCHALLREUTER, K.U.; KRUGER, C.; WURFEL, BA et al. From basic research to the bedside: efficacy of topical treatment with pseudocatalase PC-KUS in 71 children with vitiligo. *International Journal of Dermatology*, vol.47, n.7, p.743–753, Jul 2008.
- 3 YUKSEL, E.P.; AYDIN, F.; SENTURK, N et al. Comparison of the efficacy of narrow band ultraviolet B and narrow band ultraviolet B plus topical catalase-superoxide dismutase treatment in vitiligo patients. *European Journal of Dermatology*, vol.19, n.4, p.341-344, May 2009.
- 4 SCHALLREUTER, K.U.; WOOD, J.M.; LEMKE, K.R. et al. Treatment of vitiligo with a topical application of pseudocatalase and calcium in combination with short-term UVB exposure: a case study on 33 patients. *Dermatology*, vol.190, n.3, p.223-229, 1995.
- 5 KOSTOVIC, K.; PASTAR, Z.; PASIC, A. et al. Treatment of vitiligo with narrow-band UVB and topical gel containing catalase and superoxide dismutase. *Acta Dermatovenerol Croatica*, vol.15, n.1, p.10-14, 2007.
- 6 NAINI, F.F.; SHOOSHTARI, A.V.; EBRAHIMI, B.; MOLAEJ, R. The effect of pseudocatalase/superoxide dismutase in the treatment of vitiligo: a pilot study. *Journal of Research in Pharmacy Practice*, vol.1, n.2, p.77-80, 2012.
- 7 EZZEDINE, K. et al. Vitiligo is not a cosmetic disease. *Journal Of The American Academy Of Dermatology*. Bordeaux, p. 883-885. nov. 2015.
- 8 BENZEKRI, L.; GAUTHIER, Y.. Clinical Markers of Vitiligo Activity. *Journal Of The American Academy Of Dermatology*. Rabat, Marrocos e Bordeaux, França, p. 856-862. fev. 2017.
- 9 RODRIGUES, M. et al. New discoveries in the pathogenesis and classification of vitiligo. *Journal Of The American Academy Of Dermatology*. Victoria, Australia, p. 1-13. jul. 2017.
- 10 SHETH, Vaneeta M; GUO, Ye; A QURESHI, Abrar. Comorbidities Associated with Vitiligo: A Ten-Year Retrospective Study. *Dermatology*. Boston, p. 311-315. jan. 2014.
- 11 GEY, A. et al. Autoimmune thyroid disease in vitiligo: multivariate analysis indicates intricate pathomechanisms. *British Journal Of Dermatology*. Bordeaux, p. 756-761. maio 2013.

- 12 ALIKHAN, A. *et al.* Vitiligo: a comprehensive overview Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. *Journal Of The American Academy Of Dermatology*. Berwyn, p. 473-491. set. 2011.
- 13 TOOSI, S.; ORLOW, S. J.; MANGA, P. Vitiligo-inducing phenols activate the unfolded protein response in melanocytes resulting in upregulation of IL6 and IL8. *Journal Of Investigative Dermatology*. New York, p. 2601-2609. nov. 2012
- 14 RICHMOND, J. M.; FRISOLI, M. L.; HARRIS, J. E.. Innate immune mechanisms in vitiligo: Danger from within. *Current Opinion In Immunology*. Massachusetts, p. 676-682. nov. 2013.
- 15 RODRIGUES, M. *et al.* Current and emerging treatments for vitiligo. *Journal Of The American Academy Of Dermatology*. Victoria, Australia, p. 17-29. jul. 2017.
- 16 ARICAN, O.; KURUTAS, E.B. Oxidative stress in the blood of patients with active localized vitiligo. *Acta Dermatovenerol Croatica*, vol.17, n.1, p.12-16, 2008.
- 17 NAINI, Farahnaz Fatemi *et al.* The effect of pseudocatalase/superoxide dismutase in the treatment of vitiligo: A pilot study. *Journal Of Research In Pharmacy Practice*. Tehran, p. 77-80. dez. 2012.
- 18 SMEJKAL, Gary B.; KAKUMANU, Srikanth. Enzymes and their turnover numbers. *Expert Review Of Proteomics*. Hudson, p. 543-544. jun. 2019.
- 19 BARBOSA, M.D.F.S. Immunogenicity of biotherapeutics in the context of developing biosimilars and biobetters. *Drug Discovery Today*, v.16, n.7/8, p.345-353, 2011.
- 20 BECK A, SANGLIER-CIANFÉRANI S, VAN DORSSELAER A. Biosimilar, biobetter, and next generation antibody characterization by mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2012;84(11):4637-4646.
- 21 REICHERT, C.; BORCHARD, G. Noncovalent PEGylation, An Innovative Subchapter in the Field of Protein Modification. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*. Genebra, p. 386-390. fev. 2016.
- 22 GONZÁLEZ-VALDEZ, J.; RITO-PALOMARES, M.; BENAVIDES, J. Advances and trends in the design, analysis, and characterization of polymer-protein conjugates for "PEGylated" bioprocesses. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*. Monterrey, p. 2225-2235. jun. 2012.
- 23 MENEGUETTI, G. P. Desenvolvimento nanotecnológico da L-asparaginase empregando-se metodologia de peguição. 2017. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- 24 ABUCHOWSKI, A.; MCCOY, J.R.; PALCZUK, N.C. *et al.* Effect of Covalent Attachment of polyethylene Glycol on Immunogenicity and Circulating Life of

- Bovine Liver catalase. The Journal of Biological Chemistry, vol. 252, n.11, p.3582-3586, 1977.
- 25 YABE, Y.; NISHIKAWA, M.; TAMADA, A. et al. Targeted Delivery and Improved Therapeutic Potential of catalase by Chemical Modification: Combination with Superoxide Dismutase Derivatives. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 289, n.2, p.1176-1184, 1999.
- 26 PFISTER, D.; MORBIDELLI, M. Process for protein PEGylation. Journal Of Controlled Release, vol. 180, p.134-149, Maio 2014.
- 27 YU, D.; GHOSH, R. Purification of PEGylated protein using membrane chromatography. Journal of Pharmaceutical Science, v.99, n.8, 2010.
- 28 BEERS, R.F. Jr.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. Journal of Biological Chemistry, v.195, p.133-140, 1952.
- 29 IWASE, T.; TAJIMA, A.; SUGIMOTO, S. et al. A Simple Assay for Measuring catalase Activity: A Visual Approach. Nature, vol.3, n.3081, Outubro 2013.
- 30 FRIEND, D. R.. In vitro skin permeation techniques. Journal Of Controlled Release. Menlo Park, p. 235-248. nov. 1992.
- 31 BRONAUGH, R. L.; STEWART, R. F. Methods for In Vitro Percutaneous Absorption Studies IV: the Flow-Through Diffusion Cell. Journal Of Pharmaceutical Sciences. Washington, p. 64-67. jan. 1985.
- 32 VICIOLLE, E.; CASTILHO, P.; ROSADO, C. In vitro and in vivo assessment of the effect of *Laurus novocanariensis* oil and essential oil in human skin. International Journal of Cosmetic Science. Madeira, p. 546-550. dez. 2012.
- 33 OLIVEIRA, C. A, de et al. Safety and efficacy evaluation of gelatin-based nanoparticles associated with UV filters. Colloids And Surfaces B: Biointerfaces. São Paulo, p. 531-537. abr. 2016.
- 34 HONG, Y. L. et al. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. Clinical Biochemistry. Taichung, p. 619-625. nov. 2000.
- 35 BASTOS, A. S. et al. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. Analytical Biochemistry. Araraquara, p. 141-146. abr. 2012.

- 36 MURAMATSU, S. et al. Differentiation-specific localization of catalase and hydrogen peroxide, and their alterations in rat skin exposed to ultraviolet B rays. *Journal Of Dermatological Science*. Tóquio, p. 151-158. mar. 2005.
- 37 LIEBEL, F. et al. Irradiation of Skin with Visible Light Induces Reactive Oxygen Species and Matrix-Degrading Enzymes. *Journal Of Investigative Dermatology*. Nova Jersey, p. 1901-1907. jul. 2012.
- 38 SEITÉ, S et al. Photodamage to human skin by suberythemal exposure to solar ultraviolet radiation can be attenuated by sunscreens: a review. *The British Journal Of Dermatology*. Asnières, p. 903-914. nov. 2010.
- 39 MEGNA, M. et al. "Active" photoprotection: sunscreens with DNA repair enzymes. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia*. Nápoles, p. 302-307. jun. 2017.
- 40 SANTOS, J. H. P. M. et al. Protein PEGylation for the design of biobetters: from reaction to purification processes. *Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences*. São Paulo, p. 1-17. nov. 2018.
- 41 FONTANA, A. et al. Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Padua, p. 13-28. jan. 2008.
- 42 VERONESE, F. M. et al. Surface modification of proteins. Activation of monomethoxy-polyethylene glycols by phenylchloroformates and modification of ribonuclease and superoxide dismutase. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 11, n. 2, p. 141–152, abr. 1985.
- 43 VERONESE, F. M. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials*, v. 22, n. 5, p. 405–417, mar. 2001..
- 44 VERONESE, F. M.; PASUT, G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today*, v. 10, n. 21, p. 1451–1458, nov. 2005.
- 45 ROBERTS, M. J.; BENTLEY, M. D.; HARRIS, J. M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, set. 2012.
- 46 SCHELLEKENS, H.; HENNINK, W. E.; BRINKS, V. The Immunogenicity of Polyethylene Glycol: Facts and Fiction. *Pharmaceutical Research*, v. 30, n. 7, p. 1729–1734, jul. 2013.
- 47 WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nature Biotechnology*, v. 28, n. 9, p. 917–924, set. 2010.

48 ZALIPSKY, S. Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 16, n. 2–3, p. 157–182, set. 1995.

49 ZALIPSKY, S.; SELTZER, R.; MENON-RUDOLPH, S. Evaluation of a new reagent for covalent attachment of polyethylene glycol to proteins. Biotechnology and Applied Biochemistry, v. 15, n. 1, p. 100–114, 1992.

Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/b9643bul.pdf>, acesso em 21/05/2017.

Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org/>, acesso em 14/09/2020.

H++, <http://biophysics.cs.vt.edu/>, acesso em 14/09/2020

7. ANEXOS

Tabela 5 - Dados referentes à Figura 21, da reta ajustada para determinação de Tfusão, obtida por dicroísmo circular da catalase (CAT).

Model	Hill1		
Equation	$y = \text{START} + (\text{END} - \text{START}) * \frac{x^n}{(k^n + x^n)}$		
Reduced Chi-Sqr	0.0454		
Adj. R-Square	0.99254		
		Value	Standard Error
Ellipticity	START	-18.0803	0
Ellipticity	END	-11.7589	0
Ellipticity	k	53.56707	0.1846
Ellipticity	n	10.76722	0.35164

Tabela 6 - Dados referentes à Figura 22, da reta ajustada para determinação de Tfusão, obtida por dicroísmo circular da CAT-PEG 10.

Model	Hill1		
Equation	$y = \text{START} + (\text{END} - \text{START}) * \frac{x^n}{(k^n + x^n)}$		
Reduced Chi-Sqr	0.05337		
Adj. R-Square	0.99539		
		Value	Standard Error
Ellipticity	START	-20.2583	0
Ellipticity	END	-11.5381	0
Ellipticity	k	50.28258	0.14039
Ellipticity	n	10.79395	0.28546

Tabela 7 - Dados referentes à Figura 23, da reta ajustada para determinação de Tfusão, obtida por dicroísmo circular da CAT-PEG 20.

Model	Hill1		
Equation	$y = \text{START} + (\text{END} - \text{START}) * \frac{x^n}{(k^n + x^n)}$		
Reduced Chi-Sqr	0.04406		
Adj. R-Square	0.99584		
		Value	Standard Error
Ellipticity	START	-22.0223	0
Ellipticity	END	-13.7388	0
Ellipticity	k	51.8837	0.13619
Ellipticity	n	10.82581	0.27023

Tabela 8 - Dados referentes à Figura 24, da reta ajustada para determinação de Tfusão, obtida por dicroísmo circular da CAT-PEG 40.

Model	Hill1		
Equation	$y = \text{START} + (\text{END} - \text{START}) * \frac{x^n}{(k^n + x^n)}$		
Reduced Chi-Sqr	0.0199		
Adj. R-Square	0.99548		
		Value	Standard Error
Ellipticity	START	-12.8089	0
Ellipticity	END	-7.40657	0
Ellipticity	k	50.32503	0.13976
Ellipticity	n	10.59134	0.27343

Data e assinatura do aluno(a)

Data e assinatura do orientador(a)