

# INTERAÇÃO MOLECULAR ENTRE ALFA-CICLODEXTRINA E TRIPTOFANO

Giani Andréa Linde<sup>1</sup>  
Nelson Barros Colauto<sup>2</sup>  
Flávio Faria de Moraes<sup>3</sup>  
Gisella Maria Zanin<sup>4</sup>

LINDE<sup>1</sup>, G. A; COLAUTO<sup>2</sup>, N. B; MORAES<sup>3</sup>, F. F; ZANIN<sup>4</sup>, G. M. Interação Molecular entre Alfa-Ciclodextrina e Triptofano. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar*, Umuarama, v. 11, n. 1, p. 11-14, jan./jun. 2008.

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi determinar a constante de formação do complexo de inclusão entre a alfa-ciclodextrina e o aminoácido triptofano. Para a determinação da constante de inclusão, foi utilizado o método competitivo do alaranjado de metila. O triptofano realiza interações moleculares com a alfa-ciclodextrina com constante de inclusão de 36,16 M<sup>-1</sup>. Estes resultados embasam o desenvolvimento de trabalhos de entrega metabólica de triptofano e a redução de gostos indesejados de proteínas hidrolisadas utilizadas na alimentação animal.

**PALAVRAS-CHAVE:** Espectrofotometria. Absorvância. Absorbância. Trp. Gosto Amargo.

## ALFA-CICLODEXTRIN AND TRYPTOPHAN MOLECULAR INTERACTION

**ABSTRACT:** The objective of this research was to determine the inclusion constant between tryptophan and alpha-cyclodextrin (alpha-CD) by spectrophotometry based on methyl orange molecular probe. Tryptophan and alpha-CD showed molecular interaction with inclusion formation constants of 36.16 M<sup>-1</sup>. These results are important for the development of tryptophan metabolic delivery and reduction of the bitter taste from hydrolyzed proteins used to feed animals.

**KEYWORDS:** Spectrophotometry. Absorbance. Trp. Bitter Taste.

## INTERACCIÓN MOLECULAR ENTRE ALFA-CICLODEXTRINA Y TRIPTÓFANO

**RESUMEN:** El objetivo de esta investigación fue determinar la constante de formación del complejo de inclusión entre alfa-ciclodextrina y triptófano. Para la determinación de la constante de inclusión, fue utilizado el método competitivo del naranja de metilo. El triptófano realiza interacciones moleculares con el alfa-ciclodextrina con constante de inclusión de 36,16 M<sup>-1</sup>. Estos resultados fundamentan el desarrollo de trabajos de entrega metabólica de triptófano y la reducción de gustos indesejados de proteínas hidrolizadas utilizadas en la alimentación animal.

**PALABRAS CLAVE:** Espectrofotometría. Absorbancia. Absorbencia. Trp. Gosto Amargo.

### Introdução

A soja integral e os subprodutos derivados do beneficiamento do grão de soja são uma das principais fontes de proteína nas formulações de rações para animais, principalmente após o aumento da incidência de casos de encefalopatia espongiforme bovina. Aminoácidos e peptídeos, derivados da hidrólise das proteínas, são essenciais para a saúde animal, principalmente em condições de stress, traumas, doenças, atividade física intensa ou ainda nas fases de crescimento e reprodução (SAPKOTA et al., 2007). A proteína hidrolisada vem sendo utilizada na indústria de rações e suplementos animais, principalmente para aumento da biodisponibilidade de aminoácidos, peptídeos e minerais na forma de quelatos protéicos (WANG et al., 2008). Entretanto, os hidrolisados protéicos apresentam a desvantagem de ter gosto amargo e são normalmente recusados pelos animais. Formas de mascarar ou inibir a percepção do gosto amargo

vêm sendo testadas com pouco sucesso, como o uso de óleos em dietas de suínos (MIGDA et al., 2004).

Ciclodextrinas, também conhecidas como dextrinas de Schardiger, são oligossacarídeos formados pela ciclização de cadeias lineares de glicopiranoses unidas por ligações  $\alpha$ ,1-4 (SOBRAL et al., 2002). A ciclodextrina (CD) pode ser descrita como um tronco cone oco com exterior hidrofílico e interior hidrofóbico. Esta estrutura permite que moléculas com polaridade e estrutura espacial adequadas formem complexos de inclusão. Estes complexos são mantidos por forças não covalentes, como dipolo-dipolo, hidrofóbicas, eletrostáticas, van der Waals e interações tipo pontes de hidrogênio (YUEXIAN et al., 2005). Devido a estas características as CDs são utilizadas principalmente na formulação de medicamentos, mas também vêm sendo aplicadas em agroquímicos, fragrâncias, química fina, alimentos e para mascarar o gosto amargo de alimentos (DEL VALLE, 2004).

Dentre os diversos compostos de interesse a serem

<sup>1</sup>Prof. Dra. Adjunta do Curso de Farmácia da Universidade Paranaense, Laboratório de Biologia Molecular. Praça Mascarenhas de Moraes 4282, Umuarama – PR, CEP 87.502-210. E-mail: gianilinde@unipar.br

<sup>2</sup>Prof. Dr. Titular do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Paranaense, Laboratório de Biologia Molecular. Praça Mascarenhas de Moraes 4282, Umuarama – PR, CEP 87.502-210. E-mail: nbc@unipar.br

<sup>3</sup>Prof. PhD Titular do Curso de Química da Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química, Av. Colombo, 5790, Jd Universitário, Maringá – PR, CEP 87020-900. E-mail: flaviomoraes@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Prof. Dra. Titular do Curso de Química da Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química, Av. Colombo, 5790, Jd Universitário, Maringá – PR, CEP 87020-900. E-mail: gimaza@yahoo.com.br

inclusos em CDs, os aminoácidos são interessantes quando há a necessidade de sua entrega em partes específicas do organismo, principalmente no caso de tratamento de doenças (WANG; MEJIA, 2005) em que, neste contexto, o sabor se torna menos relevante, apesar de sua importância. O triptofano (Trp) é um aminoácido que pode ser utilizado como calmante e inibidor de agressão e estresse em diversos animais (GRIMMETT; SILLENCE, 2005). Também é relatado como importante no mecanismo de regulação às respostas inflamatórias e no mecanismo de defesa de patógenos intracelulares (BROWN et al., 2001). Além da importância terapêutica, este aminoácido participa da formação do acentuado gosto amargo das proteínas hidrolisadas (ADLER-NISSEN, 1984), sendo este um problema principalmente na alimentação de suínos (MIGDA et al., 2004).

O Trp possui cadeia lateral apolar (LEHNINGER et al., 1995), que, em solução aquosa, pode estabilizar-se na cavidade da alfa-ciclodextrina, desde que não existam impedimentos estéricos. A inclusão molecular da cadeia lateral do triptofano, em ciclodextrinas, pode, tanto aumentar a biodisponibilidade terapêutica deste aminoácido, como reduzir o sabor amargo dos hidrolisados protéicos. A inibição do gosto amargo permite a aceitação do alimento pelo animal e permite o funcionamento das atividades de secreção das glândulas que favorecem o aproveitamento do alimento pelo organismo (SAPKOTA et al., 2007).

Devido à importância do Trp na terapêutica e na alimentação de animais, torna-se relevante a verificação da capacidade que este aminoácido possui de ser incluso pela cavidade das ciclodextrinas. O objetivo deste trabalho é determinar a constante de formação do complexo de inclusão entre a alfa-ciclodextrina e o aminoácido triptofano, visando obter indicativos de inclusão para permitir o desenvolvimento de novas formas de entrega de Trp e, ao mesmo tempo, redução do gosto amargo de hidrolisados protéicos pelo uso de alfa-CD.

## Material e Métodos

O aminoácido triptofano (Trp) foi adquirido da Sigma Chemical Company. Alfa-CD foi doada pela Cargill Food & Pharma Specialties North America. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. A alfa-CD e os aminoácidos foram secos 24 horas a 60 °C, com depressão de 600 mmHg.

A metodologia fundamentou-se na eliminação da cor do alaranjado de metila, que, ao ser incluso na alfa-CD, forma um complexo de inclusão com reduzida absorvância. Para a determinação da constante de inclusão, tanto entre a CD e o alaranjado de metila, quanto entre a CD e o Trp, foi utilizado o formalismo teórico desenvolvido por Hamon e Moraes (1990). A constante de equilíbrio termodinâmico para a formação do complexo de inclusão entre a alfa-CD e o alaranjado de metila foi obtida a partir da Equação (1) (TARDIOLI, 1988).

$$[CD] = [a] \left( 1 - \frac{Abs}{Abs_0} \right) \left[ 1 + \frac{Abs_0}{K_1 \cdot [a] \cdot Abs} \right] \quad (1)$$

[a] = concentração do cromóforo na cubeta (M); Abs = absorvância na presença de ciclodextrina; Abs<sub>0</sub> = Absorvância na ausência de ciclodextrina.

A formação do complexo de inclusão entre a alfa-CD e Trp foi acompanhada pela variação da absorvância de uma mistura contendo alfa-CD, Trp e alaranjado de metila, que competem pela cavidade da CD. Para a modelagem teórica da formação de complexos de inclusão, neste caso, Watanabe (2005) assumiu a formação de dois complexos distintos. Seguindo o mesmo modelo, neste trabalho assumiu-se a formação dos complexos: alfa-CD-alaranjado-de-metila e alfa-CD-Trp. A formação destes complexos foi tratada como reações independentes que estão em equilíbrio termodinâmico na cubeta de dosagem. A constante de equilíbrio termodinâmico foi definida conforme a Equação (2).

$$[CD] = \frac{\left( \frac{K_1 a (K_1 - K_2) Abs^2}{Abs_0} + (K_1 K_2 (a + b) + K_1 - K_2) Abs + K_2 Abs_0 \right) (Abs_0 - Abs)}{K_1 Abs ((K_1 - K_2) Abs + K_2 Abs_0)} \quad (2)$$

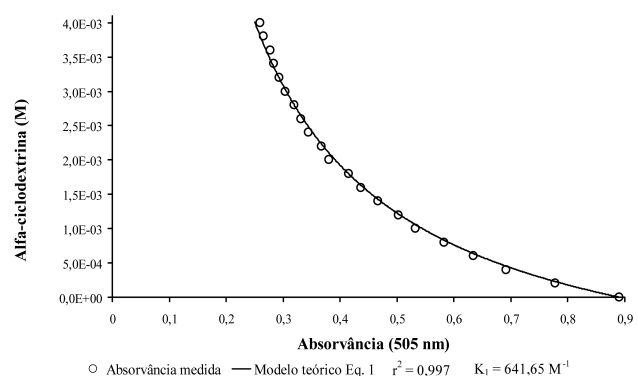
b = concentração do aminoácido de interesse (M).

Para o cálculo do valor da constante de formação do complexo de inclusão entre a alfa-CD e o cromóforo alaranjado de metila, foram obtidos valores de absorvância para a mistura binária. Para tanto, em 21 tubos de ensaio foi adicionado 1 mL de alfa-CD (0 a 40 mM), 1 mL de alaranjado de metila (2,16x10<sup>-4</sup> M) e 1 mL de ácido sulfúrico (1 M). Para obtenção da constante de formação de complexo de inclusão do aminoácido com a alfa-CD à solução de alaranjado de metila, foi adicionada Trp para obter relações molares de alfa-CD: aminoácido (CD: aa) na faixa de 1: 1 a 1: 3. O volume foi ajustado para 10 mL. Após agitação a mistura ficou em repouso por 30 minutos e a absorvância foi medida a 505 nm, em temperatura ambiente (cerca de 23 °C).

## Resultado e Discussão

### Constante de inclusão alfa-CD-alaranjado de metila (K<sub>1</sub>)

A concentração de alaranjado de metila foi fixada em 2,16 x 10<sup>-5</sup> M e a concentração de alfa-CD variou de 0 a 4,0 x 10<sup>-3</sup> M. Na Figura 1 é apresentada a absorvância da mistura medida a 505 nm e a constante de formação do complexo de inclusão (K<sub>1</sub>) foi determinada pelo ajuste não-linear da Equação (1).



**Figura 1** - Absorvância das soluções contendo alfa-ciclodextrina (variando de 0 a 4x10<sup>-3</sup> M), e alaranjado de metila (2,16x10<sup>-5</sup> M)

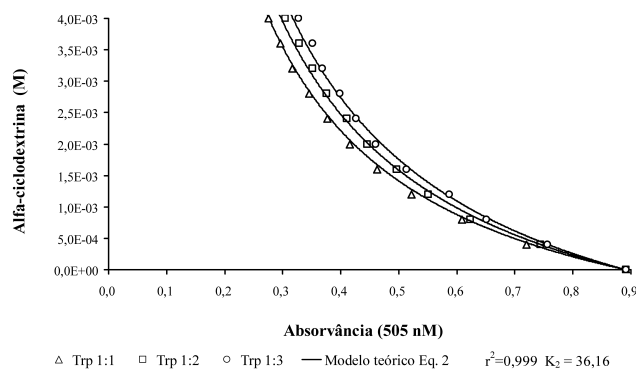
Na Figura 1 pode-se observar que a absorvância da mistura entre alfa-CD e alaranjado de metila é gradativamente reduzida com o aumento da concentração de alfa-

CD. O alaranjado de metila é normalmente utilizado como indicador de pH, que muda sua coloração do amarelo para o vermelho quando o pH da solução muda de 3,0 para 4,4. Em solução de  $H_2SO_4$  (0,1 M, pH 0,7) este indicador possui forma iônica dipolar, com coloração vermelha. Na presença de alfa-CD ele é incluído na cavidade, formando um complexo com modificações de coplanariedade do alaranjado de metila, que sofre restrição espacial na cavidade da alfa-CD (YUEXIAN et al., 2005).

O  $K_1$  determinado pela análise não-linear da Equação (1) foi de  $641,65 M^{-1}$ , com coeficiente de ajuste  $r^2 = 0,997$ . O ajuste obtido entre os valores de absorvância medidos e o modelo teórico (Equação 1) demonstraram a confiabilidade do modelo para a determinação de  $K_1$ . Desta forma, procedeu-se à continuidade dos experimentos para determinação da constante de formação do complexo de inclusão entre a alfa-CD e o aminoácido.

### Constante de inclusão alfa-CD-Trp ( $K_2$ )

Os valores de absorvância obtidos para a solução de alfa-CD com concentração variando de 0 a  $4 \times 10^{-3}$  M, alaranjado de metila com concentração de  $2,16 \times 10^{-5}$  M e triptofano com concentração variando de 4 a  $12 \times 10^{-3}$  M (relação molar na mistura: alfa-CD: Trp 1: 1 a 1: 3) são apresentados na Figura 2. Pode-se observar que a absorvância da mistura entre a alfa-CD e o alaranjado de metila é diretamente proporcional a concentração do Trp.



**Figura 2** - Absorvância das soluções contendo alfa-ciclodextrina (variando de 0 a  $4 \times 10^{-3}$  M), alaranjado de metila ( $2,16 \times 10^{-5}$  M) e triptofano variando de 4 a  $12 \times 10^{-3}$  M (relação molar na mistura alfa-CD: Trp de 1: 1 a 1: 3)

A constante de formação do complexo de inclusão entre o triptofano e a alfa-CD, na relação molar de 1: 1, determinada pelo ajuste não-linear dos resultados de absorvância à Equação (2), foi de 36,16 com coeficiente de ajuste  $r^2 = 0,999$  (Figura 2). O valor da constante confirma a formação de interações moleculares entre o aminoácido e a alfa-CD. A hipótese mais provável é que áreas apolares dos aminoácidos, quando em solução aquosa, possuam atração pela cavidade da ciclodextrina. O triptofano é um aminoácido com cadeia lateral apolar (LEHNINGER et al., 1995), que, em solução aquosa, pode estabilizar-se na cavidade da alfa-ciclodextrina, desde que não existam impedimentos estéricos. O valor do coeficiente de ajuste para a constante de formação do complexo de inclusão entre a alfa-CD e o Trp ( $r^2 = 0,999$ ) permite confirmar a adequação do modelo (Equação 2) aos

dados experimentais obtidos e dar confiabilidade ao valor da constante de formação do complexo de inclusão determinada neste trabalho.

### Conclusões

O triptofano realiza interações moleculares com a alfa-ciclodextrina. Estes resultados embasam a continuidade do desenvolvimento de trabalhos de entrega metabólica de triptofano e de redução de gostos indesejados em proteínas hidrolisadas, com uso potencial para a terapia e alimentação animal.

### Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Paranaense, DEGPA pela bolsa de doutorado, DEGPP/COPIC pelo financiamento parcial da pesquisa, à Universidade Estadual de Maringá e ao CNPq, pelo financiamento da pesquisa.

### Referências

ADLER-NISSEN, J. Control of proteolytic reaction and of the level of bitterness in protein hydrolysis process. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Chichester, v. 34b, p. 215-222, 1984.

BROWN, J.; HOWIE, S. E. M.; ENTRICAN, G. A role for tryptophan in immune control of chlamydial abortion in sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 82, p. 107-119, 2001.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 39, p. 1033-1046, 2004.

GRIMMETT, A.; SILLENCE, M. N. Calmative for the excitable horse: a review of L-tryptophan. **The Veterinary Journal**, Amsterdam, v. 170, p. 24-32, 2005.

HAMON, V.; MORAES, F. F. **Etude préliminaire a l'immobilisation de l'enzyme CGTase WACKER**. 1990. 234 f. Relatório de Pesquisa. Laboratoire de Technologie Enzymatique, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, 1990.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 803 p. MIGDA, W. et al. Positive and negative aspects of supplementing pig feeds with plant oils. **Rosliny Oleiste**, Cracow, v. 25, p. 561-572, 2004.

SAPKOTA, A. R. et al. What do we feed to food production animal? A review of animal feed ingredients and their potential impacts on human health. **Environmental Health Perspectives**, Cary, v. 115, n. 5, p. 663-670, 2007.

SOBRAL, K. C. A. et al. Immobilization of cyclodextrin-glycosyltransferase (CGTase) from *Bacillus firmus* in commercial chitosan. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Oxford, v. 44, p. 383-386, 2002.

TARDIOLI, P. W. **Produção de ciclodextrinas em reator de leite fluidizado com a enzima ciclodextrina glicosiltransferase imobilizada**. 1998. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1998.

WANG, J. et al. Intrauterine growth restriction affects the proteomes of the small intestine, liver, and skeletal muscle in newborn pigs. **The Journal of Nutrition**, Stanford, v. 138, p. 60-66, 2008.

WANG, W.; MEJIA, E. G. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 4, p. 63-78, 2005.

WATANABE, S. **Determinação da constante de complexação da glicirrizina com a  $\gamma$ -ciclodextrina**. 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade de Maringá, Maringá, 2005.

YUEXIAN, F. et al. Molecular recognition of  $\alpha$ -cyclodextrin (CD) to choral amino acids based on methyl orange as a molecular probe. **Spectrochimica Acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, Oxford, v. 61, p. 953-959, 2005.

---

Recebido em: 10/03/2008

Aceito em: 18/09/2008