

ESTABILIDAD DE LA GLUCOSA OXIDASA EN SISTEMAS AMORFOS FORMADOS POR LOS DISACÁRIDOS SACAROSA, MALTOSA Y TREHALOSA

Hans L. D. Valenzuela

Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de los Andes, Carrera 1, nº 18A10, 5101 Bogota - Colombia

Reynaldo L. R. Ortíz*

Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, 5101 Mérida - Venezuela

Recebido em 11/9/06; aceito em 21/2/07; publicado na web em 29/8/07

GLUCOSE OXIDASE STABILITY IN AMORPHOUS SYSTEMS FORMED BY SACCHAROSE, MALTOSE AND TREHALOSE DISACCHARIDES. Glucose-oxidase (GOD), suffers conformational change during freeze-drying. In order to determine the protection level granted by amorphous matrices (AM) of saccharose, maltose, trehalose and their combinations, the thermal inactivation constants (K_D) of GOD trapped in these systems were determined. For its evaluation, GOD samples were balanced at different water activities and heated up to 30, 50 and 70 °C. The best AM found for GOD stability was saccharose-trehalose (5/10% p/v). The K_D values ($K_D \cdot 10^4$) at $a_w = 0.0$ were 3 at 30 °C and 6 at 70 °C. For non-protected GOD under the same conditions these values were 48 at 30 °C and 257 at 70 °C.

Keywords: stability; inactivation; glucose-oxidase.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas oligoméricas, compuestas por subunidades, presentan una estructura cuaternaria representada por el acoplamiento de varias cadenas polipeptídicas autoensambladas por enlaces débiles. Las fuerzas de interacción que mantienen unidas estas subunidades pueden implicar enlaces disulfuro, enlaces puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals¹.

La exposición de las proteínas a altas temperaturas produce su desnaturalización, por lo que pierden su actividad biológica²; de manera tal que el secado de los bioproductos para su almacenamiento o posterior manejo, debe ser realizado de manera cuidadosa³. El proceso de liofilización, reúne estas condiciones de secado a baja temperatura; ya que se basa en la sublimación del agua presente en el producto congelado. Según Wiseman⁴, al aplicar la liofilización; se reduce el contenido de agua, pero se inactivan algunas enzimas, en particular las que están compuestas de subunidades; limitando así, el uso de esta técnica para estabilizar las enzimas oligoméricas.

La glucosa oxidasa (GOD), está clasificada como una oxidoreductasa (EC 1.1.3.4)⁵, que presenta un grupo prostético denominado Flavín-adenina-dinucleótido (FAD)⁵, posee dos dominios⁶, por lo que corresponde a una enzima oligomérica⁴.

Tanto la congelación como la sublimación, afecta la estabilidad de la GOD⁷⁻¹⁰, lo cual limita su uso en ciertas aplicaciones como por ejemplo en biosensores^{11,12}, para la determinación de la glucosa en diversos medios.

Existen muchas vías para estabilizar la estructura de una proteína o enzima, estas no son siempre fáciles de racionalizar¹³, Tanaka *et al.*¹⁴, incrementaron la estabilidad de la Quinoproteína glucosa deshidrogenasa (PQQGDH-B), obtenida a partir del *Acinetobacter calcoaceticus*; empleando la estrategia de introducir interacciones hidrofóbicas en la interfase de las dos subunidades que conforman la estructura cuaternaria de esta enzima.

Estudios realizados, a las semillas anhidrobitas del desierto de Atacama¹⁵, han permitido generar un modelo teórico de comportamiento *in vitro* de biomoléculas sensibles tanto a la temperatura de congelación, como a la de deshidratación o secado. Este modelo se ha tomado como una referencia para los estudios acerca de la estabilidad de las enzimas oligoméricas así como también de productos farmacéuticos lábiles en sistemas amorfos; el modelo considera las interacciones moleculares existentes en el sistema y el efecto sinérgico de los factores que influyen en la matriz amorfa presente.

Diversos autores^{16,17}, han estudiado las anhidrobitas, y señalan que las mismas pueden resistir completa deshidratación y sobrevivir en este estado por largos periodos de tiempo. Durante el secado, la viscosidad citoplasmática incrementa dramáticamente, transformándose en estado vítreo. También indican que todo organismo tolerante a la desecación forma un estado amorfo bajo secado¹⁶, Crowe *et al.*¹⁷, al respecto indican que muchos organismos son capaces de sobrevivir más o menos en completa deshidratación. Algo común en su bioquímica, es que ellos acumulan grandes cantidades de disacáridos, y los más comunes son la sacarosa y la trehalosa. Los mismos autores indican que estos disacáridos forman matrices vítreas o amorfas cuando se deshidratan o se secan.

Según Lins *et al.*¹⁸, la trehalosa como disacárido no reductor, parece ser uno de los protectores más efectivos tanto *in vivo* como *in vitro*. La trehalosa protege bioestructuras tales como proteínas y membranas de daños debido a la deshidratación, calor o frío. Los mismos señalan que todavía no está claro el mecanismo responsable de sus propiedades de estabilización. En cuanto al mecanismo Magazù *et al.*¹⁹, señalan que existen muchas hipótesis formuladas para clarificar la acción bioprotectiva de la trehalosa; Green y Angell²⁰, citados por Magazù¹⁹ sugieren que la eficacia bioprotectiva de la trehalosa,

podría ser adjudicada al más alto valor de su temperatura de transición vítrea y a sus mezclas con agua. Algunos autores²¹⁻²⁴, sugieren que una de las más importantes propiedades de la trehalosa, es su temperatura de transición vítrea, la cual es más alta que otros

*e-mail: reynaldo@ula.ve

carbohidratos pequeños. Branca *et al.*²⁵ en sus hallazgos, indican que la trehalosa con respecto a otros disacáridos, destruye más rápidamente la red tetraédrica intermolecular del agua, así también señalan que los disacáridos muestran un notable carácter Kosmotropa, es decir, la fuerza de interacción entre un disacárido y el agua es mayor que la interacción entre las moléculas de agua, pero Magazú y Blanca²⁵⁻²⁹ encontraron que aún a baja concentración de agua la interacción entre disacárido y agua, sigue siendo aún más fuerte para toda mezcla de disacáridos y en particular para mezclas de trehalosa.

El estado amorfo es crítico en la determinación de las propiedades físicas y químicas del estado sólido, de muchas formas de dosificación de productos farmacéuticos³⁰; el estado vítreo puede ser definido como amorfo metaestable, donde existe una condición de no-equilibrio³¹; una matriz amorfa o vítrea puede ser formada a partir de carbohidratos mediante la liofilización³². Las mezclas de soluciones de azúcares con proteínas previamente congeladas y liofilizadas; se tornan vítreas, protegiendo y estabilizando así las proteínas en la matriz³³.

Las matrices vítreas formadas por mezclas de carbohidratos son bastante estables, esta estabilidad se debe en gran parte a la poca tendencia de estas mezclas a cristalizarse³⁴. Ciertos estudios han demostrado que al co-liofilizar trehalosa, lactosa y rafinosa, en conjunto con la sacarosa, se inhibe su cristalización³⁵.

Para evitar la cristalización del sistema amorfo, la trehalosa juega un rol preponderante por su capacidad de remover o tomar agua del medio amorfo, pasando a su forma dihidratada, evitando así que el estado amorfo se convierta en estado gomoso³⁶.

Uno de los aspectos importantes para mantener estable un sistema amorfo, es la no cristalización del sistema; pero en cuanto a la estabilidad de las enzimas oligoméricas en matrices amorfas, se requieren otros compromisos o factores; entre estos podemos citar uno de los más relevantes para el sistema modelo (matriz vítrea + enzima oligomérica), la hidratación de la enzima atrapada en el seno del sistema amorfo.

En cuanto a la hidratación, Carpenter y Crowe³⁷ han sugerido que ciertos carbohidratos probablemente protegen las proteínas secadas, al sustituir la función del agua de hidratación, lo que implica que estos se ligan a la proteína. Los mismos autores³⁸, proveen de evidencia acerca de la liga o unión mediante puentes de hidrógeno entre los carbohidratos y la proteína secada. También indican que esta unión es indispensable para la preservación de las proteínas lábiles durante los procesos de secado. Solamente ciertos carbohidratos, específicamente disacáridos (Trehalosa, Maltosa y Sacarosa), pueden preservar la actividad de la enzima oligomérica fosfofructoquinasa durante el proceso de congelación-secado o secado con aire³⁹.

La sacarosa y trehalosa permiten estabilizar las enzimas Ecori⁴⁰ durante su almacenamiento a 37 y 45 °C, prolongando su actividad por 20 d a 37 °C y 12 d a 45 °C.

También se ha encontrado⁴¹, que biomoléculas frágiles como el DNA de restricción y enzimas modificadas, pueden ser deshidratadas *in vitro* en presencia de trehalosa, sin perder su actividad aún después de un prolongado almacenamiento. Estos autores señalan que la trehalosa posee la habilidad de permitir que preparaciones de enzimas, puedan estar expuestas de una manera prolongada a temperaturas tan elevadas como 70 °C.

Carpenter *et al.*⁴², encontraron que proteínas terapéuticas solubilizadas en soluciones de azúcares y posteriormente liofilizadas; al convertirse los azúcares presentes en materiales vítreos al secarse, estabilizan las proteínas.

Estudios realizados sobre la estabilidad del dímero tripsina en presencia de trehalosa⁴³, indican que este disacárido estabiliza dicha

enzima durante el proceso de congelación-secado. Los datos obtenidos por López *et al.*⁴⁴ con formulaciones liofilizadas, indican que la tripsina y los azúcares interactúan mediante puentes de hidrógeno a través de los sitios de hidratación de la proteína. Ellos señalan que la trehalosa a diferencia de la sacarosa, muestra un considerable aumento en el nivel de interacción. En síntesis la preservación de la tripsina parece estar directamente relacionada con el número de enlaces puente de hidrógeno formados⁴⁴.

En este trabajo se estudia la actividad de la GOD inmovilizada o atrapada en sistemas amorfos preparados con los disacáridos: sacarosa, maltosa, trehalosa y sus combinaciones; las actividades permitirán calcular la constante cinética de inactivación de primer orden K_D y los respectivos tiempos de vida media ($t_{1/2}$) de la GOD en las matrices, esto permitirá determinar el nivel de protección o estabilidad otorgado por las matrices formadas frente a condiciones de baja actividad de agua (<0,44), y a temperaturas de hasta 70 °C.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

Reactivos

Los reactivos utilizados fueron obtenidos de un *kit* Ultralab para la determinación de glucosa: Glucosidasa/Peroxidasa, solución estándar de Glucosa de 100 mg/dL, sustratos: 4-aminoantipirina, fenol, solución buffer de fosfato a pH 7,2. Azúcares de alta pureza: Maltosa (Himedia), Trehalosa (Fluka), Sacarosa (Montalban).

Equipos

Se empleó una balanza analítica (Denver Instrument), un liofilizador Labconco, Estufa (Memert), Baño termostático (Grant) y un espectrofotómetro UV-Visible Spectronic Génesis.

Métodos

Preparación de la solución enzima-azúcares

Se prepara una solución enzima-buffer en una proporción volumétrica 1:100, luego se le añade a la solución enzima-buffer los distintos disacáridos a ser empleados según la concentración y la combinación a ser estudiada.

Concentraciones disacáridos (%P/V)

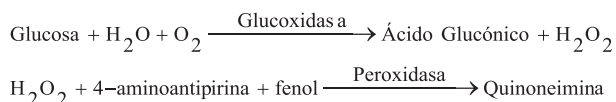
Sin combinar: Sacarosa 5%; Maltosa 5% y 10%; Trehalosa 5% y 10%. Combinaciones: Maltosa 10%-Sacarosa 5%; Trehalosa 10% - Sacarosa 5%.

Liofilización -Tratamiento térmico

Se coloca en viales de 2,5 mL las soluciones de enzima-azúcar, se procede a congelar las soluciones con nitrógeno líquido. Las soluciones congeladas, se someten a liofilización por un período de 24 h. Luego, las muestras se equilibran en desecadores o cámaras cerradas, dentro de las cuales se generan atmósferas con humedades relativas o aw constantes: 0,00; 0,22; 0,44 respectivamente. El punto de equilibrio se determina mediante un higrómetro y se alcanza el mismo, al reestablecerse la actividad de agua correspondiente. Grupo de muestras se introducen en estufas a temperaturas de: 30, 50 y 70 °C respectivamente y son sacados de las estufas a diferentes tiempos: 5, 10, 30, 60, 80 min, esto permite determinar la influencia de la temperatura sobre la actividad de la GOD en los sistemas amorfos contemplados. Finalmente las muestras tratadas son reconstituidas en agua destilada, y se procede luego a la medición de las actividades de cada una de las muestras.

Medición de la actividad enzimática

La actividad de la glucosidasa estabilizada en sistemas amorfos, es evaluada por espectrofotometría del compuesto coloreado quinoneimina que se produce a partir de las reacciones de óxido-reducción de la glucosa, catalizada por las enzimas glucosidasa (GOD) y peroxidasa (POD), peróxido de hidrógeno y aminoantipirina según las reacciones :



La medición de la absorbancia del compuesto coloreado formado, se mide a una longitud de onda de 510 NM, los resultados se expresan en UAE/mg (unidad de actividad enzimática por mg de enzima), mediante la relación

$$\text{Act. Enzimática} = \frac{\Delta A * V / t}{\text{mg de enzima}} = \frac{\text{UAE}}{\text{mg de enzima}}$$

donde, ΔA = absorbancia leída, V =Volumen de solución en mL, t = tiempo en min y UAE= Unidad de Actividad Enzimática.

Para medir la absorbancia de cada muestra, se agregan 25 μL de sustrato, 20 μL de glucosa, y se incuba a 35 $^\circ\text{C}$ por un período de 10 min.

El valor de ΔA se obtiene por diferencia de la absorbancia leída con respecto al blanco utilizado, el cual corresponde a la solución enzimática sometida a baño de maría durante 5 min, logrando así la inactivación de la enzima, efecto que se observa por la apariencia incolora del producto final, luego de agregar el sustrato 4-amino antipirina más fenol y glucosa. Las determinaciones se realizaron por triplicado a fin de promediar cada resultado.

Cálculo de la actividad residual

La actividad residual (*Act. res.*) luego del tratamiento térmico, se determina según la expresión:

$$\% \text{Act. Res} = \frac{\text{Act.}_f}{\text{Act.}_i} * 100$$

donde Act._i corresponde a la actividad de la enzima liofilizada, sin tratamiento térmico y equilibrada a la misma a_w de la muestra problema; Act._f es la actividad de la enzima con tratamiento térmico.

Cálculo de la constante cinética de inactivación de primer orden (K_D)

La constante K_D , se calcula suponiendo que la inactivación de la GOD en las matrices amorfos, sigue un modelo de primer orden⁴⁵ – $dA/dt = -K_D A$, que al resolver y reordenarse resulta en: $\log(\% \text{ Act. Residual}) = -K_D t$ y el tiempo de vida media será $t_{1/2} = 0,643/K_D$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 podemos apreciar los resultados de graficar el logaritmo de la Actividad Residual en función del tiempo a $a_w = 0,0$ y temperaturas de 30, 50 y 70 $^\circ\text{C}$. En esta figura podemos apreciar que la GOD en las distintas matrices amorfos se inactiva siguiendo una cinética de primer orden. Las linealizaciones se ajustan muy bien y permitieron calcular las pendientes que corresponden a los K_D a las diferentes condiciones de tratamiento de las muestras (Tabla 1). Los datos de los K_D permitieron calcular el tiempo de vida media $t_{1/2}$ de la GOD control y la GOD en las matrices (Tabla 2).

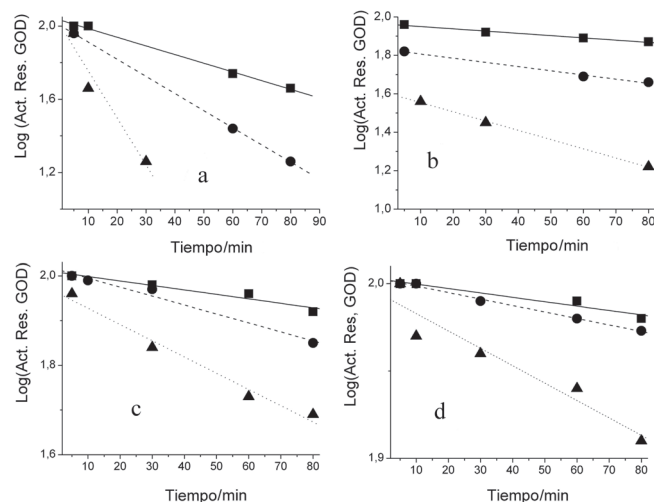


Figura 1. Logaritmo Actividad Residual GOD Liofilizada: a: sin protección en matrices amorfos; b: sacarosa al 5% p/v; c: sacarosa al 5% - maltosa al 10% p/v; d: sacarosa al 5% - trehalosa al 10% p/v. Temperatura: ■ 30 $^\circ\text{C}$ ● 50 $^\circ\text{C}$ ▲ 70 $^\circ\text{C}$

La GOD sin protección en matrices amorfos como se muestra en la Tabla 1, refleja los mayores K_D , se inactiva rápidamente a medida que la temperatura sube de 30 a 70 $^\circ\text{C}$ para las diferentes a_w (0,0; 0,22; 0,44), se observa también que la tendencia a inactivarse es mayor cuando el nivel de agua en el sistema es más bajo ($a_w = 0,0$), lo que podría significar que el agua de hidratación de la GOD es pobre a estas condiciones, comprometiendo la estabilidad de la GOD y por ende su rápida inactivación.

En la Tabla 1 se observa además, que a las diferentes actividades de agua mencionadas anteriormente, al aumentar la temperatura desde 30 a 70 $^\circ\text{C}$ en los sistemas amorfos, los K_D también aumenta, pero en proporción inferior a las del control (GOD sin protección).

Este resultado es una buena evidencia de que la enzima GOD se inactiva con menos facilidad en los sistemas amorfos formados por los disacáridos Sacarosa, maltosa, trehalosa y sus combinaciones; esto concuerda con los resultados del $t_{1/2}$ reflejado en la Tabla 2, donde los tiempos de vida media de la GOD sin protección son menores que los reflejados por las distintas matrices amorfos formadas por los disacáridos antes indicados.

Comparando entre sí las constantes K_D de la GOD en las matrices amorfos de los disacáridos sacarosa, maltosa, trehalosa y sus mezclas, se observa (en la Tabla 1), que los K_D de la trehalosa al 10% en todos los casos son menores que las correspondientes a los otros disacáridos. También se nota que los valores de K_D para la trehalosa al 5% (Tabla 1) son mayores que los K_D de la trehalosa al 10%, por lo que la concentración de trehalosa podría estar jugando un papel importante.

Comparando los K_D de la trehalosa al 5% con la maltosa al 5%, se nota que en las diferentes condiciones son menores, pero sus valores están muy cerca de las arrojadas por la sacarosa al 5%. Al incrementar la concentración de maltosa al 10% P/V, los K_D arrojan resultados cercanos a las correspondientes a la trehalosa al 5% P/V y en algunas condiciones supera a la trehalosa al 5%, sin embargo los K_D de las matrices de Maltosa al 10% P/V son equiparables a los de sacarosa al 5% P/V.

La combinación de la Sacarosa al 5% P/V y Maltosa al 10% P/V arroja valores de K_D muy bajos, pero no superan a la trehalosa al 10% P/V ni a la mezcla de Sacarosa al 5% P/V con trehalosa al 10% P/V. Los mejores resultados son arrojados por la combinación de trehalosa y Sacarosa en proporción de 5%:10% P/V; los K_D respectivos, son los bajos y sus $t_{1/2}$ los mayores (Tabla 2).

Tabla 1. Constante de inactivación térmica ($K_D \cdot 10^{-4}$) de la GOD en sistemas amorfos (min^{-1})

Matrices amorfas (Disacáridos)	Actividad de agua (a_w)								
	0,0			0,22			0,44		
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)			Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)			Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)		
	30	50	70	30	50	70	30	50	70
Ninguna (Control)	48	94	257	55	75	144	50	104	157
Sacarosa 5%P/V	13	22	48	23	28	55	24	28	69
Maltosa 5%P/V	23	36	83	22	28	78	23	26	63
Trehalosa 5%P/V	13	31	62	13	21	74	17	20	71
Maltosa 10%P/V	18	21	46	17	26	43	23	32	38
Trehalosa 10%P/V	8	9	14	9	16	25	17	23	28
Sacarosa 5%P/V + Maltosa 10%P/V	8	20	36	17	21	42	18	26	27
Sacarosa 5%P/V + Trehalosa 10%P/V	3	4	6	5	15	20	12	15	17

Tabla 2. Tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la GOD en sistemas amorfos (min)

Matrices amorfas (Disacáridos)	Actividad de agua (a_w)								
	0,0			0,22			0,44		
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)			Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)			Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)		
	30	50	70	30	50	70	30	50	70
Ninguna (Control)	144	74	27	126	92	48	139	67	44
Sacarosa 5%P/V	533	315	144	301	248	126	289	248	100
Maltosa 5%P/V	301	193	83	315	248	89	301	267	110
Trehalosa 5%P/V	533	224	112	533	330	94	408	347	98
Maltosa 10%P/V	385	330	151	408	267	161	301	217	182
Trehalosa 10%P/V	866	770	495	770	433	277	408	301	248
Sacarosa 5%P/V + Maltosa 10%P/V	866	347	193	408	330	165	385	267	257
Sacarosa 5%P/V + Trehalosa 10%P/V	2310	1733	1155	1386	462	347	578	462	408

CONCLUSIONES

Tanto la trehalosa al 5% P/V como al 10% P/V ejercen un efecto protector y estabilizador de la GOD en sus respectivas matrices, pero la trehalosa al 10% P/V provee de una matriz amorfa con un buen nivel de protección y de estabilización de la GOD, pero al combinar la trehalosa al 10%P/V con la sacarosa al 5% P/V se observan efectos sinérgicos, producto de sus respectivas propiedades, que le confiere una capacidad excepcional a la matriz amorfa, para confinar la GOD en su seno y así darle una buena estabilidad y resistencia térmica al no desnaturalizarse con facilidad.

La liofilización de enzimas oligoméricas como la GOD en presencia de disacáridos capaces de formar sistemas amorfos estables, constituye una buena alternativa para aumentar la estabilidad térmica de la misma, además su desempeño durante el almacenamiento mejoraría.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento del CEP-ULA.

REFERENCIAS

- Bernhard, S. A.; *Estructura y Función de las Enzimas*, Ediciones H. Blume: Madrid, 1977.
- Lehninger, A.; *Bioquímica. Las Bases Moleculares de la Estructura Celular*, Ediciones Omega S. A: Barcelona, 1991, p. 59, 64-65.
- Bu'lock, J.; Kristiansen, B.; *Biología Básica*, Ed. Acribia S. A.: Zaragoza, 1987, p. 195.
- Wiseman, A.; *Principios de Biotecnología*, Ed. Acribia S. A.: Zaragoza, 1986, p. 192.
- Whitaker, J. R.; *Principles of Enzymology for the Food Science*, Marcel Dekker Inc.: New York, 1994, p. 533.
- Akhtar, Md. S.; Ahmad, A.; Bhakuni, V.; *Biochemistry* **2002**, *41*, 7142.
- Moreno, K.; Valenzuela, H.; *Memorias, V Jornadas Científico Técnicas, Fac. de Ingeniería*, Mérida, Venezuela, 2002.
- Valenzuela, H.; Prieto, J.; *Memorias, V Jornadas Científico Técnicas, Fac. de Ingeniería*, Mérida, Venezuela, 2002.
- Valenzuela, H.; Araujo, N.; *Memorias, V Jornadas Científico Técnicas, Fac. de Ingeniería*, Mérida, Venezuela, 2002.
- Valenzuela, H.; Pérez, M.; *Memorias, V Jornadas Científico Técnicas, Fac. de Ingeniería*, Mérida, Venezuela, 2002.
- Zhang, S.; Yang, W.; Nin, Y.; Sun, C.; *Anal. Chim. Acta.* **2004**, *523*, 209.
- Chaniotakis, N. A.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 89.
- Eijsink, V.; Gaseidnes, S.; Borcheit, T. V.; van den Burg, B.; *Biomol. Eug.* **2005**, *22*, 21.
- Tanaka, S.; Igarashi, S.; Ferri, A.; Sode, K.; *BMC Biochemistry* **2005**, *6*, 1.
- Valenzuela, H.; trabajo no publicado.
- Buitink, J.; Leprince, O.; *Cryobiology* **2004**, *48*, 215.
- Crowe, J.; Carpenter, J.; Crowe, L.; *Annu. Rev. Physiol.* **1998**, *60*, 73.
- Lins, R. D.; Pereira, C. S.; Hünenberger, P. H.; *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2004**, *55*, 177.
- Magazù, S.; Migliardo, F.; Mondelli, C.; Vadalà, M.; *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2796.
- Green, J. L.; Angell, C. A.; *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 2880.
- Crowe, L. M.; Reid, D. S.; Crowe, J. H.; *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2089.
- Ding, S. P.; Fan, J.; Green, J. L.; Lu, Q.; Sánchez, E.; Angell, C. A.; *J. Thermal. Anal.* **1996**, *47*, 1391.
- Chen, T.; Fowler, A.; Toner, M.; *Cryobiology* **2000**, *40*, 277.
- Miller, D. P.; de Pablo J. J.; *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 8876.
- Branca, C.; Magazù, S.; Maisano, G.; Migliardo, P.; *J. Chem. Phys.* **1999**, *111*, 281.
- Magazù, S.; Migliardo, P.; Musolino, A. M.; Sciortino, M. T.; *J. Phys. Chem.* **1997**, *101*, 2348.
- Branca, C.; Magazù, S.; Maisano, G.; Migliardo, F.; Romeo, G.; *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 10140.
- Branca, C.; Magazù, S.; Maisano, G.; Migliardo, F.; *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **2001**, *64*, 224204.
- Branca, C.; Magazù, S.; Maisano, G.; Migliardo, F.; Soper, A. K.; *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.* **2002**, *74*, 450.
- Hancock, B.; Zografì, G.; *J. Pharm. Sci.* **2000**, *86*, 1.
- Leopold, A. C.; Sun, W. Q.; Bernal - Lugo, I.; *Seed Science Research* **1994**, *4*, 267.

32. Slade, L.; Levine, H.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1991**, *30*, 115.
33. Pikal, M. J.; *Proceedings of the 10th Internacional Drying Symposium* 1996, vol. B, p. 1246.
34. Caffrey, M.; Fonseca, V.; Leopold, A. C.; *Plant Physiol.* **1988**, *86*, 754.
35. Saleki, G. A.; Zografi, G.; *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 1166.
36. Aldous, B. J.; Auffret, A. D.; Franks, F.; *Cryo. Lett.* **1995**, *16*, 181.
37. Carpenter, J. F.; Crowe, J. H.; *Cryobiology* **1988b**, *25*, 459.
38. Carpenter, J. F.; Crowe, J. H.; *Biochemistry* **1989**, *28*, 3916.
39. Carpenter, J. F.; Crowe, L. M.; Crowe, J. H.; *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *923*, 109.
40. Rossi, S.; Buera, P.; Moreno, S.; Chirife, J.; *Biotechnol. Conitec* **1997**, *13*, 609.
41. Colaço, C.; Sen, S.; Thangavelu, M.; Pinder, S.; Roser, B.; *Biotechnology* **1992**, *10*, 1007.
42. Carpenter, J. F.; Pikal, M. J.; *Science* **1995**, *267*, 1923.
43. Méndez, J.; Valenzuela, H.; trabajo não publicado.
44. López, E.; Bone, S.; *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1673*, 139.
45. Andrés, L.; *Biología de Enzimas*, Secretaria general OEA, Ediciones Universitarias de Valparaíso de la UCV: Valparaíso, 1994, p. 168.