UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

**Efeito de polímeros e sais na estabilidade térmica da proteína verde
fluorescente (GFP)**

Letícia Celia de Lencastre Novaes

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a Dr^a Thereza Christina Vessoni Penna

São Paulo

2009

Letícia Celia de Lencastre Novaes

**Efeito de polímeros e sais na estabilidade térmica da proteína verde
fluorescente (GFP)**

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dr^a. Thereza Christina Vessoni Penna

Orientadora/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, _____ de _____.

Aos meus pais,
Celia Regina e José Antonio
por todo amor, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À profª Drª Thereza Chrisitna Vessoni Penna pela orientação, suporte e incentivo, que durante estes anos de convivência muito me ensinou, contribuindo para o meu crescimento.

À todos os alunos de iniciação científica do Laboratório de Microbiologia Aplicada, em especial ao Flávio e Saulo, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, em especial ao prof. Adalberto Pessoa Júnior, que contribuiu para a realização deste trabalho.

À Angela e a Priscila, pelo apoio, incentivo, e amizade.

Aos amigos e companheiros de disciplinas e laboratórios do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, em especial ao André, Valéria, Daniela, Luciana, Carolina, Marcos, Marcelo, Lívia e Ana.

Aos funcionários do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica: Mirian, Elza, Juarez, Irene, Ricardo, Gledson, Candida, Sônia, Marilene e Ivani, pelo apoio, convívio e amizade.

Aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação: Elaine e Jorge, pelo auxílio, esforço e eficiência.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Pesquisa, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À minha família que sempre esteve presente e me auxiliou em todos os momentos.

Agradeço por tudo e a todos que de alguma forma me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

NOVAES, L. C. L. **Efeito de polímeros e sais na estabilidade térmica da proteína verde fluorescente (GFP)**. 2009, 88f Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2009

O emprego de aditivos hidrossolúveis como açúcares, tensoativos, sais e polímeros é prática comum na tentativa de se estabilizar proteínas durante aquecimento. Diversos polímeros têm sido utilizados para estabilizar proteínas, sendo seu efeito dependente das características da proteína. Sais podem estabilizar, desestabilizar ou não ter efeito na estabilidade de proteínas; dependendo do tipo, concentração, natureza das interações iônicas e resíduos carregados da proteína. A termoestabilidade da proteína verde fluorescente (GFP) tem sido demonstrada ao calor úmido, à temperaturas elevadas ($T \geq 95^{\circ}\text{C}$), à valores de pH alcalinos e a alguns agentes químicos. Sua denaturação térmica é altamente reprodutível e a variação da intensidade de fluorescência pode ser facilmente determinada por espectrofluorimetria. O objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento da GFP na presença de diferentes soluções aquosas de polímeros (polietileno glicol, DEAE-Dextrana e ácido poliacrílico) e sais (citrato e fosfato). A partir dos dados obtidos, pode-se concluir que o citrato favoreceu a preservação da estrutura nativa da GFP nas temperaturas estudadas (70 a 95°C), em concentrações acima de 10% m/m. O ácido poliacrílico também auxiliou na manutenção da estrutura nativa da GFP, porém em menor intensidade, e com concentrações acima de 20% m/m.

PALAVRAS CHAVE: GFP, estabilidade térmica, polímeros, sais, citrato, fosfato

ABSTRACT

The addition of hydrosoluble excipients, such as, sugars, surfactants, salts and polymers is a common practice in the intent of stabilization of proteins during heating. Several polymers have been used to proteins stabilization, being their effect dependent of protein characteristics, however in some cases, it could cause a reduction of stability. Salts can stabilize proteins, or have no influence in their stability, and these behaviors depend on the type, concentration, ionic interaction and charged protein residues. Thermal stability of green protein fluorescent (GFP) have been demonstrated to humid heat, elevated temperatures ($T \geq 95^{\circ}\text{C}$), alkaline pH and to some chemical agents. Its thermal denaturation is highly reproducible and the variation of fluorescence intensity can be easily determinate by spectrofluorometry. The objective of this work was study the behavior of GFP in the presence of different aqueous solutions of polymers (polyethylene glycol, DEAE-Dextran and acid polyacrylic) and salts (citrate and phosphate). From the results, it may be concluded that the citrate favored the preservation of native structure of GFP in the temperatures studied (70°C to 95°C), in concentrations above 10% m/m. The PAA polymer also favored the GFP thermal stability, but in a minor intensity and in concentrations above 20% m/m.

KEYWORDS: GFP, thermal stability, polymers, salts, citrate, phosphate

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação do cromóforo.....	4
Figura 2: Estrutura barril da GFP.....	5
Figura 3: Espectro de emissão e excitação da GFP.....	5
Figura 4: Estrutura do Polietileno Glicol.....	15
Figura 5: Estrutura do DEAE-Dextrana.....	19
Figura 6: Estrutura do Ácido Poliacrílico.....	22
Figura 7: Estrutura do íon citrato.....	25
Figura 8: Estrutura química geral do íon fosfato.....	27
Figura 9: Curva padrão linear para determinação da concentração da GFP.....	34
Figura 10: Esquematização para o cálculo do Valor D.....	37
Figura 11: Esquematização para o cálculo do Valor Z.....	37
Figura 12: Esquematização para o cálculo da Energia de Ativação.....	38
Figura 13: Esquematização para o calculo de entropia e entalpia.....	39
Figura 14: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) em função da massa molar e concentração de PEG (% m/m) a 70°C. O losango sólido (◆) representa PEG 600 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PEG 4000 g/mol; e o triangulo sólido (▲) representa PEG 10000 g/mol em diferentes concentrações, expostas a 70°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.	41
Figura 15: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) em função da massa molar e concentração de PEG (% m/m) a 75°C. O losango sólido (◆) representa PEG 600 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PEG 4000 g/mol; e o triangulo sólido (▲) representa PEG 10000 g/mol em diferentes concentrações, expostas a 75°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.	42
Figura 16: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) em função da massa molar e concentração de PEG (% m/m) a 80°C. O losango sólido (◆) representa PEG 600 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PEG 4000 g/mol; e o triangulo sólido (▲) representa PEG	

10000 g/mol em diferentes concentrações, expostas a 80°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.	43
Figura 17: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) em função da massa molar e concentração de PEG (% m/m) a 85°C. O losango sólido (◆) representa PEG 600 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PEG 4000 g/mol; e o triângulo sólido (▲) representa PEG 10000 g/mol em diferentes concentrações, expostas a 85°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.	44
Figura 18: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) em função da massa molar e concentração de PEG (% m/m) a 90°C e 95°C. O losango sólido (◆) representa PEG 600 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PEG 4000 g/mol; e o triângulo sólido (▲) representa PEG 10000 g/mol em diferentes concentrações expostas a 90°C. O losango (◇) representa PEG 600 g/mol; o quadrado (□) representa PEG 4000 g/mol; e o triângulo (△) representa PEG 10000 g/mol em diferentes concentrações expostas a 95°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.	45
Figura 19: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de DEAE-Dextrana (% m/m) a 70°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.	48
Figura 20: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de DEAE-Dextrana (% m/m) a 75°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.	49
Figura 21: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de DEAE-Dextrana (% m/m) a 80°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.	50
Figura 22: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de DEAE-Dextrana (% m/m) a 80°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.	51

- Figura 23: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de DEAE-Dextrana (% m/m) a 90°C e 95°C. O losango sólido (◆) representa DEAE-Dextrana em diferentes concentrações expostas a 90°C. O losango (◇) representa DEAE-Dextrana em diferentes concentrações expostas a 95°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.....52
- Figura 24: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de PAA (% m/m) a 70°C. O losango sólido (◆) representa PAA 8000 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PAA 30000 g/mol em diferentes concentrações, expostas a 70°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.53
- Figura 25: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de PAA (% m/m) a 75°C. O losango sólido (◆) representa PAA 8000 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PAA 30000 g/mol; em diferentes concentrações, expostas a 75°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.54
- Figura 26: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de PAA (% m/m) a 80°C. O losango sólido (◆) representa PAA 8000 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PAA 30000 g/mol; em diferentes concentrações, expostas a 80°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.55
- Figura 27: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de PAA (% m/m) a 85°C. O losango sólido (◆) representa PAA 8000 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PAA 30000 g/mol; em diferentes concentrações, expostas a 85°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.56

Figura 28: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de PAA (% m/m) a 90°C e 95°C. O losango sólido (◆) representa PAA 8000 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PAA 30000 g/mol em diferentes concentrações expostas a 90°C. O losango (◇) representa PAA 8000 g/mol; o quadrado (□) representa PAA 30000 g/mol em diferentes concentrações expostas a 95°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.	57
Figura 29: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de citrato (% m/m) a 70°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.	58
Figura 30: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de citrato (% m/m) a 75°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.....	59
Figura 31: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de citrato(% m/m) a 80°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.....	60
Figura 32: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de citrato (% m/m) a 85°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.....	61
Figura 33: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de citrato (% m/m) a 90°C e 95°C. O losango sólido (◆) representa citrato em diferentes concentrações expostas a 90°C; o quadrado sólido (■) representa citrato em diferentes concentrações expostas a 95°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.	62
Figura 34: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de fosfato (% m/m) a 70°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.	63

- Figura 35: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de fosfato (% m/m) a 75°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.....63
- Figura 36: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de fosfato (% m/m) a 80°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.....64
- Figura 37: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de fosfato (% m/m) a 85°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.....65
- Figura 38: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de fosfato (% m/m) a 90°C e 95°C. O losango sólido (◆) representa fosfato em diferentes concentrações expostas a 90°C; o losango (◇) representa citrato em diferentes concentrações expostas a 95°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.66
- Figura 39: Representação do logaritmo decimal da concentração de GFP (em µg/mL) versus tempo (min.) na ausência de polímeros e sais a 70°C. Cada curva representa a replicata do ensaio. A partir destas curvas foi possível obter o tempo de redução decimal (valor D; min.), através da inclinação das mesmas.84
- Figura 40: Representação do logaritmo decimal da concentração de GFP (em µg/mL) versus tempo (min.) na ausência de polímeros e sais a 75°C. Cada curva representa a replicata do ensaio. A partir destas curvas foi possível obter o tempo de redução decimal (valor D; min.), através da inclinação das mesmas.85
- Figura 41: Representação do logaritmo decimal da concentração de GFP (em µg/mL) versus tempo (min.) na ausência de polímeros e sais a 80°C. Cada curva representa a replicata do ensaio. A partir destas curvas foi

possível obter o tempo de redução decimal (valor D; min.), através da inclinação das mesmas.	85
Figura 42: Representação do logaritmo decimal da concentração de GFP (em $\mu\text{g/mL}$) versus tempo (min.) na ausência de polímeros e sais a 85°C . Cada curva representa a replicata do ensaio. A partir destas curvas foi possível obter o tempo de redução decimal (valor D; min.), através da inclinação das mesmas.	86
Figura 43: Representação do logaritmo decimal da concentração de GFP (em $\mu\text{g/mL}$) versus tempo (min.) na ausência de polímeros e sais a 90°C . Cada curva representa a replicata do ensaio. A partir destas curvas foi possível obter o tempo de redução decimal (valor D; min.), através da inclinação das mesmas.	86
Figura 44: Representação do logaritmo decimal da concentração de GFP (em $\mu\text{g/mL}$) versus tempo (min.) na ausência de polímeros e sais a 95°C . Cada curva representa a replicata do ensaio. A partir destas curvas foi possível obter o tempo de redução decimal (valor D; min.), através da inclinação das mesmas.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores D para a GFP obtidos na ausência de polímeros e sais, nas temperaturas estudadas.....	40
Tabela 2: Valor Z da GFP em contato com diferentes polímeros (PEG, DEAE-Dextrana, PAA) e sais (citrato e fosfato), em diferentes concentrações.	67
Tabela 3: Energia de ativação de GFP em contato com diferentes polímeros (PEG, DEAE-Dextrana, PAA) e sais (citrato e fosfato) em diferentes concentrações.....	69
Tabela 4: Entalpia de ativação ($\Delta H^\ddagger$) da GFP em contato com diferentes polímeros (PEG, DEAE-Dextrana, PAA) e sais (citrato e fosfato), em diferentes concentrações.....	71
Tabela 5: Entropia ($\Delta S^\ddagger$) da GFP em contato com diferentes polímeros (PEG, DEAE-Dextrana, PAA) e sais (citrato e fosfato), em diferentes concentrações.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Fator pré-exponencial da equação de Arrhenius
Ala	Alanina
AOX	Álcool Oxidase
cDNA	DNA complementar
CPO	Cloroperoxidase
DEAE-Dextrana	Dietilaminoetil-Dextrana
Ea	Energia de ativação
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GFP	Proteína Verde Fluorescente
Gly	Glicina
h	Constante de Planck
HIC	Cromatografia de interação hidrofóbica
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranoside
K _B	Constante de Boltzmann
k _{obs}	Constante condicional da equação de Arrhenius
LB	Luria-Bertani
Met	Metionina
PAA	Ácido Poliacrílico
PEG	Polietileno glicol
Phe	Fenilalanina
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluor
R	Constante universal dos gases
Ser	Serina
T	Temperatura absoluta
TCAM	Ribonuclease T1
Thr	Treonina
TPP	<i>Three Phase Partitioning</i> – partição em três fases
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta

Val	Valina
$\Delta H^\ddagger$	Entalpia
$\Delta S^\ddagger$	Entropia

SUMARIO

RESUMO	viii
ABSTRACT.....	ix
1. JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. <i>Proteína Verde Fluorescente – GFP</i>	3
2.2. <i>Importância de se estudar e conhecer a estabilidade de proteínas na presença de sais e de polímeros</i>	11
2.3. <i>Polímeros</i>	11
2.3.1. Polietileno Glicol (PEG).....	12
2.3.2. Dextrana.....	15
2.3.3. Ácido Poliacrílico (PAA).....	19
2.3. <i>Sais</i>	22
2.3.1. Citrato	23
2.3.2. Fosfato.....	25
2.4. <i>Termodinâmica</i>	27
3. OBJETIVO GERAL.....	30
3.1. <i>Objetivos Específicos</i>	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. <i>Proteína verde fluorescente (GFP)</i>	31
4.1.1. Produção.....	31
4.1.2. Extração.....	32
4.1.3. Purificação.....	32
4.2. <i>Polímeros utilizados</i>	34
4.2. <i>Sais utilizados</i>	35
4.3. <i>Metodologia de desnaturação</i>	35
4.4. <i>Metodologia de análise dos dados</i>	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

APÊNDICE 1 - Preparo de solução tampão Tris-EDTA 200 mM (pH 8,0).....	82
APÊNDICE 2 - Preparo da solução tampão de extração.....	83
APÊNDICE 3 – Curvas logaritmo decimal da concentração de GFP versus tempo	84
ANEXOS OBRIGATÓRIOS.....	88

1. JUSTIFICATIVA

O termo “estabilidade térmica”, ou “termoestabilidade”, refere-se à resistência da proteína a influências intrínsecas e/ou extrínsecas, ou seja, propriedades inerentes a proteína para resistir a denaturação e inativação a partir da exposição a altas temperaturas ou outros agentes deletérios (ISHII et al., 2007).

O emprego de proteínas em práticas industriais é muitas vezes limitado pela baixa resistência destas às condições tecnológicas, especialmente altas temperaturas. Metodologias importantes baseando-se em reparação do DNA e mutagêneses *in situ* em células microbianas, imobilização de estruturas proteicas em suportes sólidos, uso de aditivos hidrossolúveis, químicos, enzimáticos, químico-enzimáticos, e modificações da superfície da proteína, têm sido desenvolvidas e notificadas para melhorar a termoestabilidade das proteínas.

Do ponto de vista industrial, o uso de aditivos hidrossolúveis é uma das mais promissoras abordagens para contornar essa limitação, considerando a facilidade e o baixo custo deste procedimento. Alginatos e dextranas são empregados como ingredientes, excipientes ou estabilizantes proteicos em indústrias alimentícias e farmacêuticas ou para propósitos biotecnológicos (meio de imobilização para enzima ou bactéria / preparação de hidrogéis) (SANTAGAPITA et al., 2008).

No desenvolvimento de uma formulação proteica, a tarefa mais desafiadora é a estabilização da proteína para se obter uma vida de prateleira (*shelf life*) aceitável. Devido às modificações estruturais, proteínas são comumente estabilizadas por excipientes. Os estabilizantes mais utilizados incluem açúcares, polióis, tensoativos, sais, polímeros, íons metálicos e aminoácidos (WANG, 1999; VARDHANABHUTI e FOEGEDING, 2008). Existe grande interesse em utilizar polímeros para estabilizar soluções proteicas para aplicações farmacêuticas.

Em outubro de 2008, a Academia Real de Ciências da Suécia anunciou a premiação de Osamu Shimomura, Martin Chalfie e Roger Y. Tsien, com o prêmio Nobel, pela descoberta e desenvolvimento da proteína verde fluorescente (GFP).

A GFP é uma poderosa ferramenta em biologia molecular, podendo quantificar células, seus componentes e reações realizadas nos espaços subcelulares (MARCH, RAO e BENTLEY, 2003); e também pode ser aplicada para estudo das interações proteína-proteína e localizar de proteínas em células vivas (GERDES e KAETHER, 1996; BAUMSTARK-KAN et al., 1998).

Nesse estudo foi investigada a influência de polímeros (polietileno glicol, ácido poliacrílico, e DEAE-Dextrana) e de sais (fosfato e citrato) na termoestabilidade da GFP.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Proteína Verde Fluorescente – GFP

Proteínas verde fluorescentes (GFP) formam pequena classe de cromoproteínas, encontrada apenas em certos celenterados bioluminescentes. Inicialmente, duas espécies foram extensivamente estudadas como representantes desses sistemas de bioluminescência por transferência de energia: *Renilla reniformis*, uma alga; e *Aequorea victoria*, uma água-viva (WARD e BOKMAN, 1982).

Primeiramente isolada da *A. victoria* em 1962 por Shimomura e colaboradores, sua sequência foi descoberta em 1992, quando Prasher a clonou (MARCH, RAO e BENTLEY, 2003). A GFP da *A. victoria* foi fisicamente caracterizada como uma proteína ácida (ponto isoelétrico (pI) entre 4,6 e 5,1), globular, com monômero de massa molar entre 27 a 30 kDa (WARD e BOKMAN, 1982; CODY et al., 1993) com 238 resíduos de aminoácidos (CUBITT et al., 1995).

O desenvolvimento da fluorescência da GFP ocorre via uma maturação multi-passos, em que o dobramento da proteína é seguido por uma ciclização e uma oxidação (Figura 1). O cromóforo é formado por ciclização e oxidação de 3 aminoácidos: Ser65, Tyr66 e Gly67. Estas modificações pós-traducionais (maturação) ocorrem entre 2 a 4 horas após a síntese (GERDES e KAETHER, 1996) e não requerem substratos ou proteínas acessórias para a formação do

cromóforo (REID e FLYNN, 1997); sendo requerido somente oxigênio (ASHBY, IBARAKI e HENLEY, 2004).

Figura 1: Formação do cromóforo.

A estrutura terciária da GFP madura torna-a muito estável. Uma estrutura em forma de barril, formada por 11 folhas β , envolvem e protegem o cromóforo, que se posiciona perto do centro geométrico da chamada β lata ou barril, conforme demonstrado na Figura 2 (SCHEYHING et al., 2002). O cromóforo é uma α -hélice que percorre diagonalmente dentro do barril na estrutura nativa (ASHBY, IBARAKI e HENLEY, 2004).

Figura 2: Estrutura barril da GFP.
<http://www-bioc.rice.edu/Bioch/Phillips/Papers/gfpbio.html>

O espectro de emissão da GFP é de 508 - 509 nm (WARD e BOKMAN, 1982) com um ombro em 540 nm (CODY et al., 1993), e excitação máxima em 395 nm (WARD e BOKMAN, 1982). Exibe um pequeno pico de absorbância a 470 - 475 nm (CODY et al., 1993; CUBITT et al., 1995).

Figura 3: Espectro de emissão e excitação da GFP.

A GFP apresenta grande estabilidade estrutural e alta fluorescência. Sua denaturação ocorre apenas em condições extremas: tratamento ácido ($\text{pH} < 4$), básico ($\text{pH} 12-13$), temperaturas elevadas ($> 65^{\circ}\text{C}$) ou solventes fortemente denaturantes, (WARD e BOKMAN, 1982; CUBITT et al., 1995) o que elimina a fluorescência verde e altera o espectro de emissão (WARD e BOKMAN, 1982). Sua denaturação térmica é altamente reprodutível, mas a linha base muda levemente de experimento para experimento (NAGY et al., 2004).

A perda de fluorescência por denaturação ocorre devido à destruição da estrutura terciária e consequente exposição do cromóforo ao meio aquoso (REID e FLYNN, 1997). A fluorescência verde é, portanto, uma prova da preservação da estrutura da proteína (HUANG et al., 2007).

A renaturação total ou parcial ocorre em minutos desde que as condições adversas sejam revertidas, por exemplo, através de diálise ou neutralização (YANG, MOSS e PHILIPS, 1996). Isto porque o cromóforo maduro mantém-se quimicamente intacto no estado denaturado (REID e FLYNN, 1997).

Apesar das propriedades desta molécula serem conhecidas há anos, somente após a clonagem do cDNA da GFP em 1992 e sua subsequente expressão em *Escherichia coli*, os pesquisadores de diversas áreas perceberam o potencial desta molécula (GERDES e KAETHER, 1996). Muitos laboratórios mostraram que a GFP pode produzir fluorescência verde em uma variedade de organismos, como: bactérias, leveduras, fungos, plantas, insetos e células de mamíferos (CRAMERI et al., 1996; GERDES e KAETHER, 1996). Também é

possível expressar GFP em condições de altas temperaturas e pressões elevadas (SCHEYHING et al., 2002). Como a GFP requer oxigênio para fluorescer, estudos em anaeróbicos obrigatórios torna-se difícil (MARCH, RAO e BENTLEY, 2003).

Sua fluorescência independente de cofatores faz a GFP um marcador ideal para células vivas (REID e FLYNN, 1997). Expressão de GFP é superior a outros ensaios utilizando sistemas marcadores, pois estes requerem incubação das células com substratos específicos ou cofatores para emissão de luz, enquanto a GFP requer apenas exposição à luz UV ou luz azul, podendo assim monitorar células vivas, permitindo sua visualização através de microscopia fluorescente, ou por espectrofluoroscopia (BAUMSTARK-KHAN et al., 1998).

A GFP é uma poderosa ferramenta para a descoberta dos eventos celulares dinâmicos (GERDES e KAETHER, 1996), podendo quantificar células, seus componentes e reações realizadas nos espaços subcelulares (MARCH, RAO e BENTLEY, 2003).

A produção efetiva em vários organismos, alta fluorescência, formação do cromóforo sem substratos ou cofatores adicionais, estabilidade elevada contra proteólise e denaturação, fazem da GFP uma molécula marcadora ideal para proteínas híbridas (SKOSYREV et al., 2001).

As numerosas aplicações da GFP como marcador incluem: estudo da expressão gênica, viabilidade celular de linhagem de células, das interações

proteína-proteína e localizador de proteínas em células vivas (GERDES e KAETHER, 1996; BAUMSTARK-KAN et al., 1998).

A GFP suporta uma fusão no terminal C ou N, mantendo suas funções nativas (YANG, MOSS e PHILIPS, 1996, GERDES e KAETHER, 1996). A fluorescência da GFP é estável e pode ser monitorada na célula viva por métodos não invasivos (BAUMSTARK-KHAN et al., 1998). Esta proteína transmite sua estabilidade a moléculas fusoras e permite facilitar a estimativa da localização da proteína e sua quantificação (MARCH, RAO e BENTLEY, 2003).

Além das aplicações em biologia molecular e engenharia genética, a GFP também tem sido reportada em estudos de monitoramento, como por exemplo: da eficácia de biorremediação, de plantas transgênicas e do gerenciamento e manipulação de microrganismos (SMITH et al., 2002). Ainda no monitoramento de bio-processos, a GFP também vem sendo utilizada para estudar: dispersão de microrganismos contaminantes-degradantes presentes no solo, crescimento microbiano e dispersão baseada na saliva, biofilmes orais, investigação do crescimento celular, transformação de células de plantas, infecção e crescimento de fungos, monitoramento de apoptose de células de rato ou humanas, monitoramento de informações de não produtos, como pH, oxigênio e avaliação de nutrientes (MARCH, RAO e BENTLEY, 2003).

Para o monitoramento de informações, a GFP foi ligada a um promotor sensível a estresse ou ao ambiente, para que a fluorescência servisse como um

indicador do nível de estresse ou da concentração de um composto tóxico após mudanças nas condições ambientais (MARCH, RAO e BENTLEY, 2003).

A GFP constitui-se também de um indicador biológico potencial para validação de desempenho de processos de desinfecção, pasteurização e de branqueamento (CHIARINI e PENNA, 2003).

A análise quantitativa da fluorescência remanescente de amostras submetidas a diferentes processos químicos, físicos e em relação à adição de diferentes componentes (excipientes, fármacos, nutrientes) pode ser determinada por espectrofluorimetria, tornando o método rápido e preciso. A análise qualitativa pode ser realizada por microscopia com ultravioleta ou por observação utilizando lâmpada UV de comprimento de onda (λ) entre 365 - 395 nm (CHIARINI e PENNA, 2003).

A GFP recombinante, expressa por células transformadas de *E. coli*, foi desenvolvida por mutações pontuais no DNA da GFP selvagem, trocando três aminoácidos (Phe66 por Ser, Met153 por Thr e Val163 por Ala). A GFP recombinante é expressa de 2 a 3 vezes mais rápida e tem uma fluorescência 18 vezes mais intensa que a GFP selvagem. Sua massa molar é de 27 kDa, com 238 resíduos de aminoácidos, sendo propensa a dimerização, apresentando fluorescência em ambas as conformações: monomérica e dimérica. A dimerização ocorre via interações hidrofóbicas em soluções de concentração variando de 5 a 10 mg/mL (CHIARINI, 2002). É compacta, globular (CHALFIE, 1998) e ácida (pI 4,6 – 5,4), com 24 Å de diâmetro e 42 Å de comprimento

(CHIARINI, 2002). A fluorescência é estável entre pH 5,5 a 11,5, com um ótimo pH em 8,0 (PENNA e ISHII, 2002).

A GFP recombinante apresenta baixa toxicidade e maior solubilidade no citoplasma das células que a forma selvagem; porém apresenta-se mais suscetível à dimerização. Apesar da recombinação da proteína aumentar a fluorescência, os picos de excitação e emissão permanecem praticamente inalterados em relação à GFP selvagem. A exposição ao microscópio óptico, na intensidade de iluminação próxima ao pico máximo de excitação (340 - 390 nm e 395 - 440 nm), provoca o fenômeno de fotobranqueamento (destruição fotoquímica do cromóforo) da fluorescência emitida por GFP (CHIARINI e PENNA, 2003).

Segundo estudos realizados por Ishii (2003) e Mazzola e colaboradores (2006), a GFP recombinante é resistente ao calor ($T \geq 95^{\circ}\text{C}$), a uma ampla faixa de pH, principalmente alcalino (pH 5,5 – pH 12) e a agentes químicos, como por exemplo, compostos clorados.

Um conhecimento detalhado da estabilidade da GFP pode ser de suma importância para uma aplicação da GFP como um sensor molecular (DIETZ e RIEF, 2004).

2.2. Importância de se estudar e conhecer a estabilidade de proteínas na presença de sais e de polímeros.

Produção de proteínas é uma das principais ferramentas biotecnológicas, na qual processos *upstream* (produção) e *downstream* (purificação) resultam no produto final desejado na forma purificada (BOERIS et al., 2007).

Nos últimos anos, soluções de polímeros de cadeia flexível têm mostrado inúmeras aplicações principalmente por causa de seu uso para separação de macromoléculas ou proteínas de uma mistura natural complexa, sendo uma poderosa técnica para isolar e purificar, e ainda pode ter sua escala aumentada (BOERIS et al., 2007). Extrações em sistemas aquosos bifásicos consistem em extrair uma macromolécula entre duas fases aquosas de um sistema formado por mistura de dois polímeros de cadeia flexíveis neutros ou por um polímero e um sal. Na indústria biotecnológica, essa técnica é um meio de isolar e purificar proteínas em larga escala (BOERIS et al., 2007).

Desse modo faz-se necessário conhecer o comportamento da molécula de interesse, no caso a GFP, em soluções aquosas de polímeros e sais. A escolha dos polímeros e sais baseou-se na potencial utilização para separação de proteínas.

2.3. Polímeros

Vários tipos de polímeros têm sido utilizados para estabilizar proteínas. A estabilização é geralmente devido a uma ou mais propriedades do polímero:

atividade superficial, exclusão preferencial, impedimento estérico das interações proteína-proteína, e aumento da viscosidade limitando o movimento estrutural da proteína. O efeito dos polímeros na estabilidade das proteínas é dependente da proteína, e em certos casos pode causar desestabilização. Proteínas podem ser estabilizadas por polímeros através de múltiplas interações eletrostáticas (WANG, 1999).

Investigações em sistemas proteína-polímero atraíram a atenção de cientistas devido a sua extensiva aplicação em novas tecnologias farmacêuticas e uso biomédico. Alguns polímeros, como polietileno glicol e a dextrana, são usados geralmente como modificadores do meio reacional de macromoléculas biológicas a fim de melhorar a atividade bioquímica de proteínas ou a biodisponibilidade de medicamentos (ZIELENKIEWICZ et al., 2006).

A habilidade de solutos de estabilizar a estrutura de proteínas é relacionada à hidratação preferencial da molécula em soluções aquosas contendo estes compostos. Hidratação preferencial é um fenômeno termodinâmico que reflete a inabilidade de solutos de interagir com proteínas, levando a uma exclusão destes solutos do domínio da proteína (LEE e LEE, 1987, FARRUGGIA et al., 1997).

2.3.1. Polietileno Glicol (PEG)

Polietilenos glicol (PEG) geralmente são utilizados como crio-protetores e agentes precipitantes/cristalizantes em meio aquoso a altas concentrações. São de natureza hidrofóbica e podem interagir com cadeias laterais hidrofóbicas de

proteínas, promovendo a denaturação, especialmente a temperaturas elevadas (FARRUGGIA et al., 1997). Outra aplicação do PEG é como um agente de preenchimento macromolecular (ZIELENKIEWICZ et al., 2006).

Diversos estudos da estabilidade da lisozima na presença de PEG foram realizados. No estudo de Zielenkiewicz e colaboradores (2006), a adição de PEG a solução tamponada de lisozima mudou a estabilidade térmica da mesma, diminuindo a temperatura de denaturação com o aumento da concentração de PEG, causando redução na estabilidade térmica da lisozima. De acordo com Lee e Lee (1987) PEG diminui a estabilidade térmica da lisozima devido às propriedades hidrofóbicas do polímero e da lisozima.

No estudo de Hancock e Hsu (1996), a lisozima denatura a temperaturas mais baixas em 20% de PEG 1000 g/mol (de 73,7°C para 69,5°C), e a conformação nativa da lisozima foi minimamente afetada pela presença de 5 a 10% (m/m) de PEG 300 g/mol, mas em PEG 200, 300, e 1000 g/mol a 5 a 20% (m/m), a conformação nativa da lisozima permaneceu intacta.

Farruggia e colaboradores (1997) mostraram que a estabilidade térmica da albumina do soro humano (HSA, do inglês *human serum albumin*) é drasticamente diminuída na presença de PEG 1000 g/mol, enquanto PEG 10000 g/mol apresentou um efeito estabilizante, assim como o PEG 8000 g/mol. PEG de baixa massa molar possui uma interação preferencial positiva pela a HSA, que é favorecida a altas temperaturas.

Azevedo e colaboradores (2004) demonstraram que um aumento na concentração de PEG levou a uma diminuição na estabilidade da álcool oxidase (AOX). A maior retenção de atividade foi obtida na presença de 0,01% PEG 400 g/mol.

A presença de PEG induz um efeito desestabilizante, no caso de PEG 1500 g/mol, ou um pequeno efeito estabilizante na presença de PEG 400 g/mol na lipase de *Rhizomucor miehei* (NOEL e COMBES, 2003).

O aumento da estabilidade das proteínas por PEG e outros polímeros neutros tem sido atribuído a exclusão estérica do polímero da vizinhança da proteína, promovendo uma hidratação preferencial da proteína, apesar do PEG poder interagir, e possivelmente ligar, com os resíduos não polares da superfície da proteína (AZEVEDO et al., 2004; HANCOCK e HSU, 1996).

Apesar da habilidade do PEG de diminuir a polaridade de um solvente, estabilizando o estado denaturado de uma proteína, também é esperado que o PEG possa favorecer o estado compacto, nativo da proteína devido ao grande volume de exclusão do estado denaturado (ZIELENKIEWICZ et al., 2006). Moléculas de PEG de baixa massa molar são excluídas da superfície da proteína, estabilizando a conformação nativa desta por um fenômeno de hidratação, enquanto moléculas de PEG de alta massa molar interagem com os muitos sítios hidrofóbicos das proteínas, levando assim a estabilização do estado denaturado da proteína (NOEL e COMBES, 2003).

Em estudo anterior, (JOHANSSON et al., 2007), sugere-se que existe uma atração entálpica entre GPF e PEG; porém, esta atração pode ser compensada pelo efeito entrópico de exclusão de volume. Por causa da repulsão estérica, nenhuma parte de qualquer uma das duas macromoléculas podem ocupar o mesmo espaço ao mesmo tempo. Esta parte do volume total que não pode ser ocupada por um soluto em particular, a um dado instante, é chamado de volume de exclusão. Este efeito leva a depleção da camada entre o polímero e a proteína (HANCOCK e HSU, 1996). Portanto existe um problema do efeito da estabilização de um polímero em uma proteína, e este efeito pode depender do tamanho do polímero.

Figura 4: Estrutura do Polietileno Glicol.

2.3.2. Dextrana

Dextrana é um polímero constituído de unidades de D-glicose, é linear, inerte, altamente solúvel, muitas vezes neutro em larga faixa de pH (PING, YANG e YUAN, 2006; SANTAGAPITA et al., 2008). Esse polímero tem sido utilizado em vários estudos experimentais para efeitos macromoleculares de aglomeração, principalmente por sua natureza inerte e neutra (PING, YANG e YUAN, 2006, SASAHARA; MINTON, 2003), por essas propriedades não afeta a

estabilidade de proteínas por interações eletrostáticas (SANTAGAPITA et al., 2008).

Os efeitos da adição de dextrana em uma variedade de reações têm sido atribuídos ao volume de exclusão (SASAHARA e MINTON, 2003, ENGEL et al., 2008). A explicação corrente para estabilização de proteínas na presença de dextrana vem do modelo de aglomeração molecular para estabilidade de proteínas e do fato que dados experimentais são consistentes com a predição do modelo (SASAHARA e MINTON, 2003). Algumas condições criadas pela presença de dextrana podem mimetizar as circunstâncias de aglomeração no citoplasma de células de *E. coli* (ENGEL et al., 2008).

Em concentrações requeridas para observar o efeito de aglomeração macromolecular existe um aumento substancial do volume ocupado, ao mesmo tempo, ocorre uma significativa diminuição na concentração de água. A estrutura de água ao redor de uma molécula proteica é, provavelmente, um fator importante para a estabilidade de uma proteína (SASAHARA e MINTON, 2003).

Alguns estudos demonstram a capacidade de estabilização de proteínas pela dextrana, como por exemplo: estabilização da conformação nativa da ubiquitina (PING, YANG e YUAN, 2006); inibição da oxidação catalisada por metal da relaxina humana (WANG, 1999); proteção da álcool oxidase (AOX) da *Hansenula polymorpha* contra desativação térmica (AZEVEDO et al., 2004); proteção contra denaturação por calor da RNase (WANG, 1999).

Santagapita e colaboradores (2008) demonstraram que a dextrana combinada com trealose ofereceu uma melhor estabilidade a invertase, visto que somente a presença de dextrana não conferiu estabilidade adequada.

No estudo de Engel e colaboradores (2008) observa-se um aumento na temperatura de denaturação da apoflavodoxina, devido à adição de dextrana, refletindo um aumento na estabilidade da proteína induzida por aglomeração. A adição de 3 diferentes massas molares de dextrana levou a um aumento significativo na temperatura de denaturação da apoflavodoxina. A adição de 30% (m/v) de dextrana 20 levou a um aumento de 2,9°C; a adição de 40% (m/v) de dextrana 06, dextrana 20, ou dextrana 70 aumentou em 4°C a temperatura de denaturação da apoflavodoxina.

Zhi e colaboradores demonstraram que o efeito estabilizante da dextrana é diretamente proporcional a sua concentração. A 25°C e 40°C, a dextrana não estabilizou a cloroperoxidase (CPO), inativando a proteína, mas a temperaturas elevadas, a CPO manteve sua atividade na presença de dextrana. A compatibilidade entre dextrana e CPO torna-se maior com o aumento da temperatura, melhores efeitos protetores são observados a temperaturas superiores a 40°C.

No estudo de Qu e Bolen (2002) maiores concentrações de dextrana 70 proporcionaram um aumento na estabilidade da ribonuclease T1 (TCAM) no estado nativo. Os métodos apontaram um aumento de aproximadamente 5 -

7,5 vezes na constante de equilíbrio de natação de TCAM na presença de 400 mg/mL de dextrana 70.

Por meio de estudos de estabilidade, Gloger, Witthohn e Müller (2003) demonstraram que a dextrana de baixa massa molar oferece estabilidade a aviscumina em produtos liofilizados.

No estudo de Arakawa e colaboradores (1993), porém, foi observado que a dextrana não foi efetiva na estabilização da catalase como os sacarídeos de baixa massa molar, e ainda, que a efetividade da dextrana diminuiu conforme a massa molar aumentou.

O polímero dextrana sozinho não protege a enzima subtilisina por que o impedimento estérico impede efetivas ligações de hidrogênio a proteína liofilizada (DEPAZ et al., 2002).

No estudo de estabilidade da álcool oxidase (AOX) da *Hansenula polymorpha* encontrou-se uma dependência da carga da dextrana. Sulfato de dextrana e DEAE-dextrana podem formar complexos com a proteína devido à interação das cargas. Estes complexos estabilizam AOX provavelmente em virtude da formação de uma rede de cadeias de polímeros ao redor da superfície da proteína, que a envolve impedindo assim sua denaturação e a dissociação das subunidades do octâmero (AZEVEDO et al., 2004).

O contrário também foi observado: a proteção contra agregação de denaturação por calor da RNase por sulfato de dextrana a 0,1 ou 1% é

aparentemente devido ao aumento da repulsão de cargas negativas adicionadas na proteína (WANG, 1999).

Neste estudo utilizou-se o Dietilaminoetil-Dextrana (DEAE-Dextrana); que é um derivado policatiônico do Dextrana, produzido pela reação do cloreto de dietilaminoetil com o Dextrana. O grau de substituição corresponde a aproximadamente um DEAE substituinte para três unidades de glicose.

Figura 5: Estrutura do DEAE-Dextrana.

2.3.3. Ácido Poliacrílico (PAA)

O ácido poliacrílico (PAA) é um polieletrólito hidrofílico, ácido fraco, derivado da polimerização de diferentes esteres do ácido acrílico (COCCA et al., 2004; BOERIS et al., 2007).

Polieletrólitos são polímeros carregados, solúveis em água, que interagem com proteínas com carga oposta por interações eletrostáticas. São de baixo custo, não tóxicos, recicláveis e formam sistemas de duas fases a

baixas concentrações comparadas a polímeros não iônicos (GUPTA, NATH e CHAND, 2002).

O PAA tem sido utilizado na precipitação seletiva de proteínas de uma mistura aquosa, baseado na diferença de solubilidade, e na formação de complexos não solúveis polieletrólito-proteína, devido a um mecanismo coulumbiano de interação (BOERIS et al., 2007; ROMANINI et al., 2007). Por causa do tamanho do polieletrólito ser 10 vezes maior que a proteína, o número de moléculas proteicas ligadas por polímero é alta, diminuindo com o aumento do tamanho da molécula proteica (ROMANINI et al., 2007).

A recuperação por precipitação é um típico processo *downstream* para processamento de produtos biológicos, especialmente aplicados em larga escala e purificação de proteínas no campo da bioengenharia, como em indústrias alimentícias e farmacêuticas. Entre os diferentes métodos de precipitação, a por polieletrólitos recebeu muita atenção das pesquisas por causa de suas vantagens particulares: baixo consumo de aditivo, alta recuperação de proteínas e alto grau de fracionamento de enzimas alvo (KIM, HIRASAWA e KIM, 2001, CHEN, WALKER e BERG, 1992). O primeiro estágio de formação do complexo com uma proteína resulta da atração (eletrostática, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas) entre a proteína e o polieletrólito (CHEN, WALKER e BERG, 1992).

Poli-ânions induzem uma variedade de atividades biológicas e como tal receberam considerável atenção pela literatura imunológica. Poli-ânions

sintéticos, como o ácido poliacrílico (PAA), exibem atividade imunoadjuvante em vários modelos e, dando atenção à inoculação, conferem proteção contra viroses. Comparado com outros poli-ânions relativos, como sulfato de dextrana, poliestirenosulfonado e polivinilsulfato, o PAA demonstra significativa atividade antiviral e é menos citotóxico. PAA também mostrou induzir a liberação de interferon (MUSTAFAEV et al., 1996). Além disso foi relatado como uma alternativa promissora aos adjuvantes a base de óleo presente em várias vacinas veterinárias, visto que o PAA é um forte adjuvante para respostas imunológicas primária e secundária (TUPOZUGULLARI et al., 2007).

PAA foi relatado em aplicações farmacêuticas baseado em interação/formação de complexo entre drogas e outros polímeros. Govender e colaboradores (1999) demonstraram que, apesar de atrações eletrostáticas serem necessárias para iniciar a formação de complexo entre PAA e procaína HCl, as forças não eletrostáticas tiveram um papel dominante na estabilização do complexo entre a droga e o polímero (GOVENDER et al., 1999).

Os resultados obtidos no estudo de Zhang e colaboradores (2007) indicaram que, a altas temperaturas, forças hidrofóbicas e eletrostáticas desestabilizaram a mioglobina, lisozima e citocromo c, na presença de PAA (ZHANG et al., 2007).

O PAA induziu uma estabilização termodinâmica da quimotripsina e aumentou o valor da temperatura de denaturação da catalase (BOERIS et al.,

2007). Segundo o mesmo estudo, o PAA aumentou a hidrofobicidade da superfície da catalase e da quimotripsina.

Figura 6: Estrutura do Ácido Poliacrílico.

2.3. Sais

A estrutura e a função de uma proteína podem ser reguladas por interações não específicas, como por exemplo, interações iônicas frente a presença de sais. Nesse fenômeno os sais podem atuar em benefício ou não, no que tange a estabilidade proteica. Esses fatores dependem do tipo e da concentração do sal, do caráter das interações iônicas; além dos resíduos carregados na proteína (FORMANECK, MA e CUI, 2006)

Como afirmado por Wang (1999), as baixas concentrações, sais podem afetar a cobertura eletrostática e enfraquecer atração/repulsão iônica como *counter íons*; e os sais estabilizantes parecem aumentar a tensão superficial da interface água-proteína e fortalecer interações hidrofóbicas, mantendo grupos hidrofóbicos longe das moléculas de água, induzindo a hidratação preferencial das proteínas.

2.3.1. Citrato

Dentro dos sais de ácido carboxílicos, o acetato e o citrato têm sido conhecidos por agir como estabilizantes de proteínas. Em alguns estudos, levantados na bibliografia do texto, podemos observar a diversificação da utilização do citrato como estabilizante em diversas biomoléculas. Além disso, citrato tem sido utilizado como substituto do fosfato, visto que o citrato é biodegradável e não tóxico.

A adição de 0,5 M de citrato aumenta a T_m (temperatura onde 50% das proteínas se tornaram denaturadas) da RNase por 8 – 10°C na presença de variadas concentrações de cloreto de guanidina. (KAUSHIK e BHAT, 1999).

No estudo de Bottomley e Tew (2000), a adição de 0,5 M de citrato a $\alpha 1$ -antitripsina aumenta a estabilidade por 2,2 kcal/mol, possivelmente devido à ligação específica do citrato com a enzima. Esta interação resulta numa variedade de mudanças nas propriedades físicas da proteína, como o aumento na estabilidade conformacional. Apesar disso, não foi possível observar qualquer mudança estrutural significativa .

O anticorpo LA298 é mais estável quando em tampão citrato a pH 5,0 e 5,5 e a baixas temperaturas (ZENG e JANIS, 2006). Já para a malato desidrogenase mitocondrial, o citrato aumenta o valor da energia livre de Gibbs (ΔG) para -5,4 kcal/mol (STANIFORTH et al., 1994).

Entre as pequenas moléculas, os íons fosfato, sulfato e citrato foram efetivos na estabilização da RPR 114849, um fator de crescimento de

fibroblasto, sendo o citrato o que apresentou efeito mais acentuado (WON et al., 1998).

Segundo Remmele e colaboradores (1998) os resultados e discussões precedentes obtidos sugerem que formulações em pH 6 em tampão citrato de sódio com NaCl suficiente para manter isotônica, contribuiu para atingir a estabilidade ótima do receptor interleucina 1 (IL-1R).

No estudo de Jensen e colaboradores (1996), notou-se que 0,05 M de citrato foi muito mais efetivo que qualquer outro sal, nesta concentração, na estabilidade da malato desidrogenase mitocondrial, extraída do tecido cardíaco suíno, na denaturação térmica. A mesma estabilidade foi observada a altas concentrações de sais de citrato, com exceção de 1,46 M citrato de potássio onde a atividade da enzima diminuiu cerca de 15%. O grau relativo de estabilização da malato desidrogenase mitocondrial por ânions estudados (independentemente do cátion usado) seguiu a ordem: citrato > sulfato > tartarato > fosfato > fluoreto, acetato > cloreto > brometo. Pode-se hipotetizar que a estabilização desta proteína por baixas concentrações de ânions, como citrato, envolve ligações específicas destes ânions com os resíduos de aminoácidos positivamente carregados da enzima.

Chen e Arakawa (1996) testaram quatro sais: fosfato de sódio, sulfato de amônio, citrato de sódio, e cloreto de sódio, frente à estabilidade do fator de crescimento de queratinócito. Os primeiros três sais aumentaram os valores da temperatura inicial de denaturação drasticamente. Os valores aumentaram por

29, 20 e 16°C em 1 M citrato de sódio, fosfato de sódio e sulfato de amônio, respectivamente. Quando combinaram dois estabilizantes fortes, por exemplo: citrato de sódio e sarcosina, citrato de sódio e sulfato de amônio, citrato de sódio e fosfato de sódio, ou sacarose e citrato de sódio, essas combinações aumentaram a temperatura inicial de denaturação mais que 17°C. Parece que os três sais – citrato de sódio, fosfato de sódio e sulfato de amônio –, seguem o mesmo mecanismo: suas espécies aniônicas multivalentes ligam ao fator de crescimento de queratinócito no estado nativo e estabilizam-no.

Figura 7: Estrutura do íon citrato.

2.3.2. Fosfato

O íon fosfato é um íon poliatômico, com a fórmula empírica PO_4^{3-} e massa molar de 94,973 g/mol. Consiste em um átomo central de fósforo, cercado por quatro átomos de oxigênio em um arranjo tetraédrico.

Sais fosfatos são compostos inorgânicos contendo o íon fosfato (PO_4^{3-}), o íon hidrogênio fosfato (HPO_4^{2-}), ou o íon dihidrogênio fosfato (H_2PO_4^-), junto com um cátion. Pelo fato do íon fosfato ser tribásico, pode formar sais

monofosfato, difosfato e trifosfato, em que um, dois ou três hidrogênios do ácido são trocados por um cátion.

Os íons fosfatos têm efeito de aumentar a taxa do dobramento espontâneo da malato desidrogenase mitocondrial (STANIFORTH et al., 1994). Há uma tendência de aumentar a agregação de LA298, utilizando-se tampão fosfato na preparação. No caso de espécies tampão, o monômero LA298 denatura muito mais rápido em tampão fosfato que em citrato, tartarato e succinato, a 25°C (ZENG e JANIS, 2006). A temperatura de denaturação da lactoferrina em tampão fosfato, foi maior que em leite desnatado (CONESA et al, 2007).

Todorova e Atanasov (2004) encontraram um efeito estabilizante do fosfato na proteína Sso7d do *Sulfolobus solfataricus*: a temperatura de denaturação possui valores aumentados em tampão fosfato comparado aos obtidos em glicina. Isto pode ser relacionado a algum efeito de estabilização dos íons fosfato na proteína, sendo que a natureza desta interação é eletrostática.

Aumento na concentração de fosfato de sódio monobásico – Na_2HPO_4 - de 0,3 para 50 mM, em pH 7, leva a um desvio progressivo das curvas de denaturação em direção a baixas temperaturas da apolipoproteína A-2 do plasma humano. Em contraste, as curvas de denaturação a altas temperaturas não foram alteradas com o aumento da concentração de Na_2HPO_4 de 0,3 a 50 mM (GURSKY e ATKINSON, 1996)

Tanto fosfato de potássio quanto de amônio, promoveram proteção significativa da malato desidrogenase mitocondrial extraída do tecido cardíaco suíno, contra inativação térmica a concentrações maiores que 0,5 mol/L, com estabilização moderada sendo observada a 50 mM. Com fosfato de potássio a estabilidade da enzima foi dominada por uma entropia negativa de ativação compatível com a participação de uma forte contribuição hidrofóbica (JENSEN et al., 1996).

Figura 8: Estrutura química geral do íon fosfato.

2.4. Termodinâmica

A proteína pode alterar suas funções em relação à temperatura a qual é exposta, por este motivo avalia-se sua termodinâmica através de análises experimentais simples, como espectrofotometria UV/VIS. A termodinâmica lida com as mudanças entre as diferentes formas de energia, é o estudo das trocas e transformações de energia que acompanham os fenômenos físicos e químicos (TINOCO JR.; SAUER e WANG,1995).

A estabilidade de uma proteína em seu estado naturalizado, seu grau de flexibilidade conformacional, e sua eficiência funcional dependem fortemente do

ambiente termodinâmico. Em um modelo de dois estados de dobramento da proteína, somente os estados naturo e denaturado contribuem para a termodinâmica da proteína (JACOBS e DALLAKYAN, 2005).

Osmólitos podem estabilizar o estado nativo por que são preferencialmente excluídos da superfície da proteína. Portanto, pelo princípio de Le Chatelier, osmólitos favorecem o estado mais compacto, ou seja, o estado nativo sobre o estado estruturalmente expandido desnaturado (HAQUE et al., 2005).

A termoestabilidade da proteína depende de interações específicas, ficando evidente quando os fatores de entalpia e entropia se alteram (FORMANECK, MA e CUI, 2006).

Energia de ativação é definida como a quantidade mínima de energia requerida para ativar moléculas para uma condição que é igualmente provável delas seguirem a reação química ou retornar ao estado original. Observações feitas por Arrhenius mostraram que, para a maioria das reações químicas, existe uma relação logarítmica entre a constante de velocidade e o inverso da temperatura em Kelvin (TINOCO JR.; SAUER e WANG,1995).

Entalpia (H) é uma grandeza física, que descreve a energia interna total de um sistema. É uma variável de estado, definida como a soma da energia interna e o produto de pressão e volume de um sistema termodinâmico. Portanto seu valor é determinado pela temperatura, pressão e composição do sistema em um dado momento (TINOCO JR.; SAUER e WANG,1995). A entalpia

de um sistema não pode ser medida diretamente, sendo medida então a mudança de entalpia (ΔH).

Entropia (S) é uma grandeza termodinâmica, geralmente associada ao grau de desordem, quanto maior a desordem, maior a entropia. Mede a parte da energia que não pode ser transformada em trabalho. A entropia de ativação caracteriza as mudanças nas configurações dos reagentes através do caminho reacional (TINOCO JR.; SAUER e WANG,1995).

3. OBJETIVO GERAL

Estudar a termoestabilidade da proteína verde fluorescente (GFP) em polietilenoglicol, DEAE-Dextrana, ácido poliacrílico, citrato e fosfato.

3.1. Objetivos Específicos

- Estudar o decaimento da fluorescência da proteína verde fluorescente (GFP) frente aos polímeros e sais propostos;
- Comparar a denaturação da GFP com o seu decaimento da fluorescência;
- Determinar os parâmetros termodinâmicos da denaturação da GFP frente aos polímeros e sais propostos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Proteína verde fluorescente (GFP)

4.1.1. Produção

A GFP foi produzida por meio do crescimento da cepa de *Escherichia coli* DH5- α congelada em glicerol. Uma alçada foi transferida para uma placa de Petri contendo agar LB (Luria-Bertani, Difco), isopropil- β -D-tiogalactopiranoside (IPTG, Sigma), indutor da expressão de fluorescência da proteína nas células, em concentração final de 0,5 mM (v/v) e 100 mg/mL de ampicilina. A placa foi incubada a 37°C, por 24 horas. Após este período, uma colônia foi transferida para 25 mL de caldo LB (Luria-Bertani, Difco) acrescentado de 100 mg/ml de ampicilina, e cultivada em agitador rotatório a 100 rpm, 37°C por 24 h. Após 2 horas de cultivo, adicionou-se IPTG suficiente para que a concentração final no frasco Erlenmeyer fosse de 0,5 mM (v/v).

Após 24 h de cultivo, o conteúdo de cada frasco Erlenmeyer foi transferido para tubos de centrífuga de 50 mL e centrifugado a 8820 g por 20 minutos a temperatura ambiente (BR4i, Jouan). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo as células de *E. coli* foi ressuspenso em 2 mL de tampão de extração (25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM β -mercaptoetanol, 0,1 mM fenilmetilsulfonilfluor (PMSF), descrito no Apêndice 2) com o auxílio de vórtice. Após a homogeneização a GFP foi extraída das células pela técnica do TPP (*Three Phase Partitioning* – partição em três fases), item 4.1.2.

4.1.2. Extração

A extração direta por partição em três fases (TPP) tem sido utilizada para extrair, concentrar e purificar proteínas de origem vegetal e bacteriana. O método TPP combina vários princípios de extração, quais sejam: precipitação salina convencional (*salting-out*), precipitação isoelétrica, precipitação por cossolvente; pressão osmótica e cosmotropia (CHIARINI e PENNA, 2003).

O *pellet* ressuspenso de dois tubos de centrífuga foi transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL (4 mL de amostra), sendo homogeneizado em vórtice. Em cada tubo foi adicionado 3,0 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 M e 7,0 mL de t-butanol sendo agitados vigorosamente por 8 minutos em vórtice. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 8820 g, por 20 minutos a temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e o disco de células formado e foi verificado se a solução restante continha GFP, com o auxílio de uma lâmpada UV. Adicionou-se ao restante mais 7 mL de t-butanol, agitando-se em vórtice vigorosamente por 8 minutos. Centrifugou-se novamente a 8820 g, por 20 minutos a temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e dissolveu-se o disco formado (GFP) em 2 mL de tampão de extração.

4.1.3. Purificação

A escolha do tipo de cromatografia depende das características biológicas e físico-químicas da molécula da proteína: tamanho (cromatografia de filtração em gel), carga elétrica (cromatografia de troca iônica), características de bio-especificidade (cromatografia por afinidade) e hidrofobicidade (cromatografia

de interação hidrofóbica – HIC). A HIC possui vantagens em relação a outros tipos de cromatografia, pois se utiliza do nível de hidrofobicidade da molécula para sua separação por meio da interação entre a região hidrofóbica imóvel do ligante (HIC) e a região apolar da superfície da proteína. A adsorção da proteína ao ligante (HIC) e a consequente eluição da mesma dependem da concentração do sal na fase móvel $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e do eluente. HIC utiliza-se da propriedade hidrofóbica da proteína em meio polar, sem causar a denaturação da mesma (CHIARINI e PENNA, 2003)

Para a purificação da GFP, preparou-se a amostra adicionando a um volume de *pool* (GFP + tampão de extração) um volume de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 M. Utilizou-se uma coluna cromatográfica de interação hidrofóbica HiPrep™ 16/10 Butyl FF (Amersham Pharmacia). Equilibrou-se a coluna com 40 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 M. Em seguida, a amostra foi adicionada a coluna; seguido de 20 a 40 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,3 M. Adicionou-se tampão Tris-EDTA até eluir toda a GFP aderida na coluna, recolhendo-a em frascos.

A concentração de GFP produzida foi determinada usando um espectrofluorímetro (RF 5301 PC, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A fluorescência de GFP foi obtida utilizando os seguintes comprimentos de onda de excitação e emissão: $\lambda_{\text{ex}} = 394 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 509 \text{ nm}$, respectivamente. GFP recombinante pura (95% de pureza, obtida da Clontech, USA) foi utilizada para gerar uma curva padrão linear para determinar a concentração de GFP versus a intensidade de fluorescência.

Figura 9: Curva padrão linear para determinação da concentração da GFP.

Desta curva obteve-se a seguinte equação:

$$y = 91,9479x - 23,4744$$

Equação 1

$$R^2 = 0,9987$$

Onde y é intensidade de fluorescência e x é concentração de GFP (µg/mL).

4.2. Polímeros utilizados

Polietileno glicol (PEG) 10000 g/mol e 600 g/mol foram adquiridos da Merck (Hohenbrunn, Alemanha), PEG 4000 g/mol foi adquirido da Synth (Diadema, Brasil), ácido poliacrílico 8000 g/mol, na forma de sal sódico, solução em água de 45% da Aldrich (EUA); e ácido poliacrílico 30000 g/mol, na forma de sal sódico, solução em água de 40% da Aldrich (Alemanha); DEAE-Dextrana

hidro-cloreto, massa molar de aproximadamente 500.000 g/mol, da Sigma (Dinamarca).

PEG 10000 g/mol e 4000g/mol foram preparados em solução estoque aquosa de 60% (m/m), PEG 600g/mol não foi diluído. DEAE-Dextrana foi preparada em solução estoque aquosa de 50% (m/m).

4.2. *Sais utilizados*

Citrato de sódio ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) e o fosfato monobásico de sódio (Na_2HPO_4) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA) e preparados em solução estoque aquosa de 40% e 20% (m/m), respectivamente.

4.3. *Metodologia de denaturação.*

Para a determinação da estabilidade da GFP foi preparada para cada massa molar de PEG, soluções nas seguintes concentrações: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, e 40% (m/m); para cada massa molar do ácido poliacrílico nas concentrações de 5, 10, 15, 20, e 25% (m/m); para o DEAE-dextrana nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, e 30% (m/m); para o citrato nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30, e 35% (m/m), e para o fosfato nas concentrações 5, 10 e 15% (m/m).

Alíquotas das soluções estoque (GFP, polímero ou sal, e tampão Tris-HCl) foram misturadas em tubo tipo *ependorf* sendo que a massa final total foi de 0,7 g; resultando nas soluções testes. A concentração de GFP foi mantida

próxima a 7 $\mu\text{g/mL}$. O preparo do tampão Tris-EDTA está descrito no Apêndice 1.

As soluções teste foram colocadas em cubeta de quartzo (cerca de 0,5 mL), sendo seladas com filme plástico. A cubeta, colocada no suporte do espectrofluorímetro, é exposta à temperatura constante através de um banho de água (Julabo MC, Julabo Labortechnik GMBH, Alemanha), previamente equilibrado nas temperaturas de 70, 75, 80, 85, 90 ou 95°C. A fluorescência foi determinada em tempo real, sendo capturada uma leitura a cada 5 segundos por no máximo 1h de exposição.

4.4. Metodologia de análise dos dados.

Cada curva de decaimento da fluorescência foi tratada de modo que a intensidade de fluorescência fosse convertida para concentração de GFP ($\mu\text{g/mL}$), com o auxílio da curva padrão (Figura 9).

Valor D, um dos mais importantes parâmetros para avaliar a estabilidade de proteínas, é definido como tempo requerido para redução de um logaritmo decimal da concentração inicial da proteína nativa exposta a um polímero ou sal em uma dada temperatura.

O valor D foi determinado a partir do inverso negativo da inclinação da curva de regressão, usando a porção linear da curva do logaritmo decimal da concentração de GFP *versus* tempo a uma temperatura constante. O valor D foi usado como parâmetro cinético principal para comparar a influência dos polímeros ou sais na estabilidade da proteína. Visto que o decaimento de cada

situação estudada foi realizado em triplicata, foi possível calcular a média e o desvio padrão para o Valor D.

Figura 10: Esquematização para o cálculo do Valor D.

Valor Z, definido como temperatura requerida para reduzir um logaritmo decimal da concentração de GFP, foi calculado a partir da negativa da inclinação da curva de regressão dos gráficos de logaritmo decimal do valor D *versus* temperatura.

Figura 11: Esquematização para o cálculo do Valor Z.

A energia de ativação da desnaturação da GFP foi calculada segundo a equação de Arrhenius (equação 2):

$$k_{obs} = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (\text{Equação 2})$$

Onde k_{obs} (s^{-1}): constante condicional, A (s^{-1}): fator pré-exponencial, E_a ($kJ\ mol^{-1}$): energia de ativação, R : constante universal dos gases, e T (K): temperatura absoluta.

Plotando $\ln(k_{obs})$ contra T^{-1} obtemos uma curva onde a inclinação é igual a $-E_a \cdot R^{-1}$, conforme apresentado na Figura 12.

Figura 12: Esquematização para o cálculo da Energia de Ativação.

A entalpia e entropia foram determinadas usando a equação de Eyring (equação 3) e plotando $\ln(k_{obs}/T)$ contra T^{-1} , conforme apresentado pela Figura 13.

$$k_{obs} = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right) = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta H + T\Delta S}{RT}\right) \quad (\text{Equação 3})$$

k_B e h são as constantes de Boltzmann e Planck, respectivamente.

Figura 13: Esquematização para o cálculo de entropia e entalpia.

A entalpia de ativação, $\Delta H^\ddagger$, foi calculada a partir da inclinação da curva, representada pela Figura 13, e a entropia, $\Delta S^\ddagger$, foi calculada por extrapolação no eixo das ordenadas, segundo a equação 4.

$$\ln\left(\frac{k_{obs}}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT} \quad (\text{Equação 4})$$

k_B e h são as constantes de Boltzmann e Planck, respectivamente.

Os valores Z , entalpia ($\Delta H^\ddagger$) e entropia ($\Delta S^\ddagger$), foram analisados estatisticamente pelo método de Tukey, onde as condições que apresentaram $p\text{-valor} < 0,05$, foram considerados significativamente diferentes frente ao valor (Z , $\Delta H^\ddagger$, ou $\Delta S^\ddagger$) obtido na ausência do polímero ou sal estudado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A termoestabilidade da GFP foi estudada na presença dos seguintes polímeros: polietileno glicol (PEG), DEAE-Dextrana, e ácido poliacrílico (PAA); e nos sais, citrato e fosfato; nas seguintes temperaturas: 70, 75, 80, 85, 90 e 95°C.

No Apêndice 3 encontram-se as curvas obtidas de concentração de GFP ($\mu\text{g/mL}$) *versus* tempo (min) na ausência de polímeros ou sais, das quais definiu-se o valor D referência dos ensaios, apresentados na tabela a seguir:

Tabela 1: Valores D para a GFP obtidos na ausência de polímeros e sais, nas temperaturas estudadas.

Temperatura	Valor D (min)
70°C	409,83
75°C	96,62
80°C	42,13
85°C	7,55
90°C	4,71
95°C	3,05

Na presença de PEG 600, 4000 e 10000 g/mol, os valores D para a GFP nas temperaturas escolhidas para estudo estão apresentadas nas Figuras 14 a 18. A 70°C (Figura 14) somente 10% m/m PEG 600 g/mol mostrou um valor D 1,10 vezes maior comparado com a solução sem polímero. Para outras concentrações e massas moleculares de PEG, não foi observada a proteção da molécula de GFP aos efeitos térmicos de denaturação.

Figura 14: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) em função da massa molar e concentração de PEG (% m/m) a 70°C. O losango sólido (◆) representa PEG 600 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PEG 4000 g/mol; e o triângulo sólido (▲) representa PEG 10000 g/mol em diferentes concentrações, expostas a 70°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

A 75°C, (Figura 15) o valor D foi superior em 5, 10 e 15% m/m PEG 600 g/mol, comparado com o valor D encontrado na ausência do polímero (96,06 min), correspondendo aos seguintes valores: 122,16 min; 128,05 min e 108,08 min; respectivamente. Na mesma temperatura observa-se o mesmo efeito para todas as concentrações de PEG 4000 g/mol estudadas; o valor D, na presença deste polímero, aumentou em média 1,3 vezes. Para PEG 10000 g/mol, esse fato somente ocorreu a 5% de concentração, tornando a proteína 1,22 vezes mais resistente. Outras concentrações favoreceram a denaturação da GFP, resultando em valores D menores que na ausência de PEG.

Figura 15: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) em função da massa molar e concentração de PEG (% m/m) a 75°C. O losango sólido (◆) representa PEG 600 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PEG 4000 g/mol; e o triangulo sólido (▲) representa PEG 10000 g/mol em diferentes concentrações, expostas a 75°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

Podemos observar pela Figura 16, representando os ensaios a temperatura de 80°C, que PEG não protegeu a molécula de GFP em nenhuma concentração ou massa molar estudada. Todos mostraram valores D inferiores ao obtido na ausência de PEG, indicando que a esta temperatura PEG favoreceu a denaturação da proteína.

Figura 16: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) em função da massa molar e concentração de PEG (% m/m) a 80°C. O losango sólido (◆) representa PEG 600 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PEG 4000 g/mol; e o triangulo sólido (▲) representa PEG 10000 g/mol em diferentes concentrações, expostas a 80°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

Pode-se observar que para as temperaturas de 85°C, 90°C e 95°C, os valores D obtidos na presença de PEG foram praticamente constantes, não importando a concentração ou massa molar estudada, mostrando que a temperatura foi mais predominante que a influência da presença de PEG (Figuras 17 e 18). Ishii e colaboradores (2007) encontraram resposta similar nestas temperaturas, frente a diferentes concentrações de glicose.

Figura 17: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) em função da massa molar e concentração de PEG (% m/m) a 85°C. O losango sólido (◆) representa PEG 600 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PEG 4000 g/mol; e o triângulo sólido (▲) representa PEG 10000 g/mol em diferentes concentrações, expostas a 85°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

Figura 18: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) em função da massa molar e concentração de PEG (% m/m) a 90°C e 95°C. O losango sólido (◆) representa PEG 600 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PEG 4000 g/mol; e o triângulo sólido (▲) representa PEG 10000 g/mol em diferentes concentrações expostas a 90°C. O losango (◇) representa PEG 600 g/mol; o quadrado (□) representa PEG 4000 g/mol; e o triângulo (△) representa PEG 10000 g/mol em diferentes concentrações expostas a 95°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

Resultados de Lee e Lee (1987) indicam que PEG realmente induz uma diminuição nas temperaturas termais de transição (T_m) para todas as proteínas por eles estudadas (RNase, lisozima, α -lactoglobulina, e quimotripsinogênio). É interessante notar uma dependência na massa molar de PEG: a qualquer concentração de PEG, uma maior diminuição na T_m foi associada com o maior aumento do polímero. No caso da lisozima, a presença de PEG não causa mudanças na T_m e nos valores de ΔH (LEE e LEE, 1987).

Farruggia e colaboradores (1997) mostraram que a estabilidade térmica da albumina do soro humano (HSA) é dramaticamente diminuída em PEG 1000 g/mol, enquanto PEG 10000 g/mol apresentou um efeito estabilizante na albumina, devido à interação preferencial deste polímero com a forma denaturada da proteína.

Na presença de PEG 400 g/mol, a lipase do *Rhizomucor miehei* tem sua temperatura de desativação aumentada por 0,5°C a uma concentração de 285 g/l; e na presença de PEG 1500 g/mol, uma forte queda na temperatura de denaturação é notada (NOEL e COMBES, 2003).

O efeito de PEG em proteínas a temperaturas denaturantes é devido ao ganho entrópico da denaturação e interações entálpicas dos grupamentos metileno do PEG com os resíduos hidrofóbicos do interior da proteína e ligações de hidrogênio com oxigênio do grupamento éter do PEG (HANCOCK e HSU, 1996).

A interação hidrofóbica e ligações de hidrogênio entre PEG e a GFP, podem compensar os ganhos pelas interações hidrofóbicas e entalpias disponíveis para o dobramento da GFP e a perda entrópica do aumento da água ao redor dos resíduos hidrofóbicos expostos. Esses dois fatores podem ajudar a desestabilizar a GFP na presença de PEG. A altas temperaturas, a proteína denatura de modo a interagir com o PEG.

Apesar do PEG poder estabilizar proteínas, como a α -amilase e a glicose oxidase, por exclusão preferencial ao redor da periferia da proteína, esse polímero também mostrou ser um agente desestabilizante em presença de

outras proteínas, como a α -lactoglobulina, ribonuclease, lisozima e quimotripsinogenio (NOEL e COMBES, 2003). Apenas em condições específicas PEG pode estabilizar a GFP, conforme mostrado neste estudo.

Lembrando que a superfície da proteína pode ser considerada um mosaico de cargas e, também, que o PEG não apresenta afinidade às espécies carregadas, é lógico concluir que tal interface, a interação de PEG e estas cargas, é termodinamicamente desfavorável, levando a uma exclusão do PEG do domínio da proteína (LEE e LEE, 1987).

As Figuras 19 a 23 apresentam os valores D para a GFP, obtidos na presença de DEAE-Dextrana, nas temperaturas de estudo. A 70°C, somente as concentrações de 5 e 10% apresentaram valor D maior que o obtido na ausência de polímero (Figura 19). Nas concentrações restantes, 30 e 15% m/m de DEAE-Dextrana o valor D obtido foi de 2 a 5 vezes menor do que na ausência do polímero, respectivamente, favorecendo a denaturação da GFP.

Figura 19: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) *versus* concentração de DEAE-Dextrana (% m/m) a 70°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

A Figura 20, demonstra que, com exceção das concentrações de 10 e 15% m/m de DEAE-Dextrana, onde o valor D foi 1,2 e 2,1 vezes maiores que na ausência deste polímero; nas demais concentrações os valores D foram inferiores, comparado com o encontrado nos ensaios que não continham DEAE-Dextrana.

Figura 20: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) *versus* concentração de DEAE-Dextrana (% m/m) a 75°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

A 80°C, o polímero DEAE-Dextrana não protegeu a molécula de GFP da denaturação térmica em nenhuma concentração estudada, conforme podemos observar pela Figura 21. Obteve-se valores D próximos ao encontrado na ausência do polímero nas concentrações de 5, 10, e 30% m/m de DEAE-Dextrana; e nas outras concentrações estudadas, o valor D foi 1,6 a 4 vezes menor (25 e 20% m/m de DEAE-Dextrana, respectivamente).

Figura 21: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) *versus* concentração de DEAE-Dextrana (% m/m) a 80°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

A 85°C, os valores D obtidos foram menores na presença de DEAE-Dextrana do que em sua ausência, com exceção ao encontrado a 5% m/m de DEAE-Dextrana, onde se obteve valor D 1,3 vezes maior que na ausência do polímero (Figura 22).

Figura 22: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) *versus* concentração de DEAE-Dextrana (% m/m) a 80°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

A 90°C e 95°C, DEAE-Dextrana não protegeu a molécula de GFP em nenhuma concentração estudada, pois os valores D obtidos foram muito próximos ao obtido na ausência do polímero (Figura 23).

Figura 23: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) *versus* concentração de DEAE-Dextrana (% m/m) a 90°C e 95°C. O losango sólido (◆) representa DEAE-Dextrana em diferentes concentrações expostas a 90°C. O losango (◇) representa DEAE-Dextrana em diferentes concentrações expostas a 95°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

Os efeitos da adição de dextrana em uma variedade de reações têm sido atribuídos ao seu volume de exclusão (SASAHARA e MINTON, 2003, ENGEL et al., 2008). A dextrana ocupa um grande volume, diminuindo a quantidade de água ao redor da proteína, fator importante para estabilidade da proteína (SASAHARA e MINTON, 2003).

Apesar de estudos demonstrarem a capacidade de estabilização de proteínas pela dextrana, a DEAE-Dextrana interagiu negativamente com a molécula de GFP, favorecendo, principalmente, a denaturação desta. Este fato pode ter ocorrido devido à carga positiva da DEAE-Dextrana.

As Figuras 24 a 28 apresentam os valores D para a GFP obtidos na presença de PAA 8000 g/mol e 30000 g/mol, nas diferentes temperaturas estudadas. A 70°C, a presença de 25% m/m de PAA 8000 g/mol aumentou o valor D em 10 vezes para a GFP, quando comparado ao obtido na ausência do polímero. Nas demais concentrações e massas molares estudadas, o polímero também protegeu a molécula de GFP da denaturação térmica, porém em menor grau (3,3 a 11,3 vezes menor que a 25% m/m), conforme pode-se observar na Figura 24.

Figura 24: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) *versus* concentração de PAA (% m/m) a 70°C. O losango sólido (◆) representa PAA 8000 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PAA 30000 g/mol em diferentes concentrações, expostas a 70°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

A 75°C a GFP mostrou maiores valores D em todas as concentrações e massas molares estudadas de PAA, comparado com o encontrado na ausência do polímero. As duas massas molares estudadas apresentaram comportamento

muito semelhante, resultando em valores D muito próximos, 184,59 e 194,75; 221,87 e 159,85; 282,10 e 320,49; 559,58 e 505,95; 1688,71 e 1644,37; para 5, 10, 15, 20 e 25% m/m PAA 8000 e 30000 g/mol, respectivamente; como podemos observar pela Figura 25.

Figura 25: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) *versus* concentração de PAA (% m/m) a 75°C. O losango sólido (◆) representa PAA 8000 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PAA 30000 g/mol; em diferentes concentrações, expostas a 75°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

A 80°C, nas concentrações de 5 e 10% de PAA 8000 g/mol e 30000 g/mol, os valores D resultantes foram muito próximos ao valor D encontrado na ausência do polímero. Já para as concentrações superiores, obteve-se um aumento no valor D de até 6 vezes comparado a ausência do polímero, o que leva a uma melhor proteção da estrutura nativa da molécula de GFP. Ressalta-se que o PAA 8000 g/mol e 30000 g/mol comportaram-se de maneira bastante semelhante, como observado a temperatura de 75°C.

Figura 26: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) *versus* concentração de PAA (% m/m) a 80°C. O losango sólido (◆) representa PAA 8000 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PAA 30000 g/mol; em diferentes concentrações, expostas a 80°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

A 85°C, os valores D obtidos foram muito próximos ao valor D encontrado na ausência do polímero nas concentrações de 5 e 10% de PAA 8000 g/mol, e 5, 10 e 15% de PAA 30000 g/mol. Nas outras concentrações estudadas, o valor D aumentou até 8 vezes comparado a ausência do polímero. O comportamento de PAA 8000 g/mol e 30000 g/mol continuam semelhantes, porém nesta temperatura, o PAA 8000 g/mol apresentou valores D levemente superiores ao PAA 30000 g/mol, nas concentrações de 15, 20 e 25% m/m, conforme apresentado na Figura 27.

Figura 27: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de PAA (% m/m) a 85°C. O losango sólido (◆) representa PAA 8000 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PAA 30000 g/mol; em diferentes concentrações, expostas a 85°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

Pode-se observar, por meio da Figura 28, que para as temperaturas de 90°C e 95°C, os valores D obtidos foram praticamente constantes, não importando a concentração ou massa molar de PAA estudada. Esse fato demonstra que a temperatura foi mais predominante do que a presença do polímero. Apenas na concentração de 25% m/m (8000 e 30000 g/mol) a 90°C e 95°C, os valores D foram 1,5 vezes maiores que na ausência do polímero.

Figura 28: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) *versus* concentração de PAA (% m/m) a 90°C e 95°C. O losango sólido (◆) representa PAA 8000 g/mol; o quadrado sólido (■) representa PAA 30000 g/mol em diferentes concentrações expostas a 90°C. O losango (◇) representa PAA 8000 g/mol; o quadrado (□) representa PAA 30000 g/mol em diferentes concentrações expostas a 95°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

Forças eletrostáticas e hidrofóbicas estabilizaram a proteína GFP na presença do PAA. Podem ter ocorrido formações de complexos entre PAA e a GFP, favorecendo a manutenção da estrutura nativa da proteína.

As Figuras 29 a 33 apresentam os valores D para a GFP, obtidos na presença de citrato, nas temperaturas estudadas. A 70°C, nas concentrações de 15, 20, 25, 30 e 35% m/m de citrato, não foi possível calcular o valor D. Isso se deve ao fato que não houve decaimento da intensidade de fluorescência da GFP, o que indica que nestas condições, o citrato favoreceu a preservação

da estrutura nativa da proteína. A 5 e 10% m/m de citrato, obteve-se valores D 4 e 9 vezes maiores que na ausência do sal, respectivamente (Figura 29).

Figura 29: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) *versus* concentração de citrato (% m/m) a 70°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

A 75°C, nas concentrações de 25, 30 e 35% m/m de citrato também não foi possível calcular o valor D, pois não houve decaimento da intensidade de fluorescência da GFP, levando a concluir que nestas concentrações, o citrato protegeu a molécula da GFP dos efeitos térmicos de denaturação. Nas outras concentrações estudadas, obteve-se valores D 2 a 38 vezes maiores que na ausência do sal: 218,11 min a 5%, e 3649,83 min a 20% m/m de citrato, respectivamente (o valor D obtido na ausência do sal foi 96,62 min), conforme apresentado na Figura 30.

Figura 30: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) *versus* concentração de citrato (% m/m) a 75°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

Nas concentrações de 30 e 35% m/m de citrato, a 80°C (Figura 31), não houve decaimento da intensidade de fluorescência da GFP, indicando que estas condições favorecem a permanência da estrutura nativa da proteína, não sendo possível o cálculo do valor D. Nesta temperatura, obteve-se valores D 2 a 33 vezes maiores que na ausência do citrato (5 e 25% m/m de citrato respectivamente) nas outras concentrações de citrato estudadas.

Figura 31: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) *versus* concentração de citrato(% m/m) a 80°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

Pode-se observar, pela Figura 32, que a 85°C, temos valores D superiores ao encontrado na ausência de citrato, até 485 vezes maiores (3658,95 min a 35% m/m de citrato, frente a 7,55 min obtido na ausência do sal). Esses valores demonstram que a adição de citrato protegeu a molécula de GFP dos efeitos térmicos de denaturação.

Figura 32: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de citrato (% m/m) a 85°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

A 90°C, em 5 e 10% m/m de citrato obteve-se valores D muito próximos ao encontrado na ausência do sal (Figura 33). A partir da concentração de 15% m/m, os valores D obtidos foram maiores que na ausência de citrato. Já a 95°C, temos a 5, 10 e 15% m/m, valores D semelhantes ao obtido na ausência do sal. A partir de 20% m/m de citrato, os valores D foram 2 a 5 vezes superiores ao encontrado na ausência de citrato (20 e 35% m/m de citrato, respectivamente), conforme podemos observar na Figura 33.

Figura 33: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) *versus* concentração de citrato (% m/m) a 90°C e 95°C. O losango sólido (◆) representa citrato em diferentes concentrações expostas a 90°C; o quadrado sólido (■) representa citrato em diferentes concentrações expostas a 95°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

Pode-se hipotetizar que a estabilização da GFP por baixas concentrações de ânions, como citrato, envolve ligações específicas destes ânions com os resíduos de aminoácidos positivamente carregados da proteína.

As Figuras 34 a 38 apresentam os valores D para a GFP obtidos na presença de fosfato, nas temperaturas escolhidas para estudo. A 70°C, na concentração de 15% m/m de fosfato, não foi possível calcular o valor D, pois não ocorreu decaimento da intensidade de fluorescência da GFP. Este comportamento indica que nessa condição a presença de fosfato preservou a estrutura nativa da proteína. A 5 e 10% m/m de fosfato, obteve-se valores D de 718,45 min e 1372,74 min, respectivamente (2 e 3 vezes maiores que na ausência do sal: 409, 83 min).

Figura 34: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) *versus* concentração de fosfato (% m/m) a 70°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

Já a 75°C foi possível calcular o valor D para todas as concentrações de fosfato estudadas. Nestas concentrações, o fosfato protegeu a GFP contra a denaturação térmica: obteve-se valores D 2 a 7 vezes maiores que na ausência do sal (5 e 15% m/m de fosfato, respectivamente).

Figura 35: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) *versus* concentração de fosfato (% m/m) a 75°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

Conforme podemos observar pela Figura 24, a 80°C, obteve-se valores D maiores que na ausência do fosfato: 42,13 min na ausência do sal, 66,00 min a 5%; 104,34 min a 10% e 144,60 min a 15% m/m de fosfato. Esses valores indicam que a presença de fosfato permitiu que a GFP tivesse sua estrutura nativa preservada.

Figura 36: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) *versus* concentração de fosfato (% m/m) a 80°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

A 85°C, o fosfato mais uma vez tornou a proteína mais resistente frente a denaturação térmica, visto que temos valores D superiores ao encontrado na ausência do sal, obtendo-se valores até 5 vezes maiores (15% m/m de fosfato), como demonstrado na Figura 34.

Figura 37: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) versus concentração de fosfato (% m/m) a 85°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

Nas temperaturas de 90 e 95°C, obteve-se valores D muito próximos ao encontrado na ausência de fosfato, não importando a concentração estudada. Esse fato demonstra que a temperatura teve maior influência do que a da presença do sal. Somente a 15% m/m de fosfato, a 90°C, obteve-se um valor D 1,3 vezes superior ao encontrado na ausência do sal.

Figura 38: Representação do tempo de redução decimal (valor D; min.) *versus* concentração de fosfato (% m/m) a 90°C e 95°C. O losango sólido (◆) representa fosfato em diferentes concentrações expostas a 90°C; o losango (◇) representa citrato em diferentes concentrações expostas a 95°C. As barras de erro representam limites de 95% confiança para as medidas.

Os sais citrato e fosfato seguem o mesmo mecanismo ao interagir com proteínas: suas espécies aniônicas multivalentes ligam-se a proteína no estado nativo e estabilizam-a (CHEN e ARAKAWA, 1996). Desse modo, os sais citrato e fosfato favorecem o estado nativo da GFP, estabilizando a sua estrutura nativa nas temperaturas estudadas.

Tabela 2: Valor Z da GFP em contato com diferentes polímeros (PEG, DEAE-Dextrana, PAA) e sais (citrato e fosfato), em diferentes concentrações.

	Valor Z (°C)							
	PEG 600 g/ mol	PEG 4000 g/mol	PEG 10000 g/mol	DEAE- Dextrana	PAA 8000 g/mol	PAA 30000 g/mol	Citrato	Fosfato
0%	11,42	11,42	11,42	11,42	11,42	11,42	11,42	11,42
5%	11,05	11,47	11,72	11,83	10,14	10,93	9,21	10,01
10%	10,88	11,21	13,39	11,19	9,73	10,12	8,12*	9,01*
15%	12,17	11,36	15,02*	18,02*	9,22	9,43	7,82*	8,44*
20%	11,83	12,42	14,10	12,59	8,14*	9,43	6,96*	-
25%	12,41	11,88	14,27	16,69*	7,62*	7,42*	6,47*	-
30%	12,82	12,00	15,53*	14,60*	-	-	5,61*	-
35%	12,67	12,21	16,69*	-	-	-	4,22*	-
40%	13,68	13,23	14,31	-	-	-	-	-

* valor significativamente diferente ao encontrado na ausência de polímero ou sal (p-valor < 0,05)

Na Tabela 2 temos os respectivos valores Z, temperatura requerida para reduzir um logaritmo decimal da concentração de GFP, para cada polímero, ou sal nas concentrações estudadas. Os valores Z foram analisados pelo método de Tukey, onde as condições que apresentaram p-valor < 0,05, são considerados significativamente diferentes frente ao valor obtido na ausência de polímero ou sal.

Pode-se observar que o valor Z aumenta com o aumento da massa molar do polietileno glicol estudado, porém esse aumento só é significativo a 15, 30 e 35% m/m PEG 10000 g/mol.

Na presença de DEAE-Dextrana, obteve-se valores Z próximos ao encontrado para a ausência deste polímero, porém nas concentrações de 15,

25 e 30% m/m, o valor Z encontrado foi significativamente maior, ou seja, superiores ao valor Z encontrado na ausência deste polímero (11,42°C).

Tanto para PAA 8000 g/mol quanto 30000 g/mol obteve-se os menores valores Z, abaixo do valor encontrado na ausência do polímero. O valor Z em ambas massas molares de PAA estudadas diminuiu com o aumento da concentração do PAA. Porém esta diferença é significativa apenas a 20 e 25% m/m de PAA 8000 g/mol e 25% m/m 30000 g/mol.

Na presença do sal citrato, o valor Z diminui com o aumento da concentração deste sal, sendo significativamente diferente ao valor Z encontrado na ausência de citrato, nas concentrações de 10 a 35% m/m.

Já para o sal fosfato, o valor Z encontrado também foi menor que na sua ausência, com diferença significativa a 10 e 15% m/m de fosfato.

Tabela 3: Energia de ativação de GFP em contato com diferentes polímeros (PEG, DEAE-Dextrana, PAA) e sais (citrato e fosfato) em diferentes concentrações.

	Ea (kJ/mol)							
	PEG 600 g/mol	PEG 4000 g/mol	PEG 10000 g/mol	DEAE- Dextrana	PAA 8000 g/mol	PAA 30000 g/mol	Citrato	Fosfato
0%	212,59	212,59	212,59	212,59	212,59	212,59	212,59	212,59
5%	219,42	220,39	205,34	204,22	235,74	232,82	232,72	241,88
10%	224,02	216,37	187,25	216,98	248,20	233,97	297,86*	267,67*
15%	198,29	213,63	162,48*	132,73*	268,07*	227,86	307,57*	290,92*
20%	208,67	194,76	172,58	81,43*	283,11*	274,87*	352,64*	-
25%	195,65	199,74	167,61*	152,10*	316,98*	318,93*	383,71*	-
30%	220,79	206,60	164,48*	165,41*	-	-	449,94*	-
35%	191,94	163,21*	145,65*	-	-	-	285,92*	-
40%	177,93	185,73	170,43	-	-	-	-	-

* valor significativamente diferente ao encontrado na ausência de polímero ou sal (p-valor < 0,05)

As energias de ativação encontradas neste estudo, apresentadas na Tabela 3, analisadas pelo método de Tukey, foram muito próximas umas das outras entre as massas molares de PEG estudadas. O mesmo ocorreu para as diferentes massas molares de PAA estudadas. O DEAE-Dextrana apresentou Ea menores que a obtida na ausência de polímeros, enquanto o citrato e fosfato, apresentaram Ea superiores ao encontrado na ausência destes.

Dentre as concentrações de PEG 4000 g/mol estudadas, apenas a 35% m/m a Ea foi significativamente menor que na ausência do polímero, o mesmo ocorrendo a 15, 25, 30 e 35% m/m PEG 10000 g/mol. Para as outras concentrações e massas molares estudadas, não houve diferença significativa entre as Ea encontradas e a ausência do polímero.

Nas concentrações de 15 a 30% m/m de DEAE-Dextrana, as E_a foram significativamente menores que a obtida na ausência do polímero. Já na presença de PAA 8000 g/mol, a E_a foi significativamente maior que na ausência do polímero nas concentrações de 15, 20 e 25% m/m; o mesmo ocorrendo para as concentrações de 20 e 25% m/m de PAA 30000 g/mol.

Dentre as concentrações dos sais estudadas, apenas a 5% m/m não houve diferença significativa da E_a , comparada a ausência de sal, sendo que, nas outras concentrações estudadas a E_a encontrada foi superior ao da ausência de sal, para ambos sais estudados, citrato e fosfato.

Quanto menores as energias de ativação, maior a facilidade da GFP passar para o seu estado denaturado. Desse modo, os sistemas mais estáveis para a proteção da estrutura nativa da GFP são aqueles com maiores E_a , que em ordem decrescente de E_a são: 20, 25 e 30% m/m citrato.

Os valores de E_a obtidos para DEAE-Dextrana foram menores, o que demonstra que soluções DEAE-Dextrana fornecem a proteína um sistema mais favorável a indução da denaturação do que as outras condições estudadas.

Tabela 4: Entalpia de ativação ($\Delta H^\ddagger$) da GFP em contato com diferentes polímeros (PEG, DEAE-Dextrana, PAA) e sais (citrato e fosfato), em diferentes concentrações.

	$\Delta H^\ddagger$ (kJ/mol)							
	PEG 600 g/mol	PEG 4000 g/mol	PEG 10000 g/mol	DEAE- Dextrana	PAA 8000 g/mol	PAA 30000 g/mol	Citrato	Fosfato
0%	209,64	209,64	209,64	209,64	209,64	209,64	209,64	209,64
5%	216,46	217,44	202,39	201,27	232,78	229,87	229,76	238,92
10%	221,07	213,41	184,29	214,02	245,24	231,02	294,91*	264,72*
15%	195,35	210,67	159,53*	129,77*	265,12*	224,91	304,59*	287,94*
20%	205,71	191,80	169,63	78,44*	280,15*	271,92*	349,67*	-
25%	192,70	196,78	164,66*	149,15*	314,02*	315,95*	380,71*	-
30%	217,84	203,65	161,53*	162,83*	-	-	446,92*	-
35%	188,99	160,25*	142,70*	-	-	-	282,90*	-
40%	174,98	182,78	167,48	-	-	-	-	-

* valor significativamente diferente ao encontrado na ausência de polímero ou sal (p-valor < 0,05)

Tabela 5: Entropia ($\Delta S^\ddagger$) da GFP em contato com diferentes polímeros (PEG, DEAE-Dextrana, PAA) e sais (citrato e fosfato), em diferentes concentrações.

	$\Delta S^\ddagger$ (J/mol)							
	PEG 600 g/mol	PEG 4000 g/mol	PEG 10000 g/mol	DEAE- Dextrana	PAA 8000 g/mol	PAA 30000 g/mol	Citrato	Fosfato
0%	290,27	290,27	290,27	290,27	290,27	290,27	290,27	290,27
5%	309,31	311,99	271,09	266,21	353,44	346,35	344,37	369,14*
10%	323,02	301,37	221,89*	301,63	387,12*	348,59	520,62*	438,65*
15%	252,39	294,62	154,44*	70,92*	440,42*	331,80	543,99*	501,08*
20%	282,04	241,66	182,46*	-70,50*	479,57*	457,57*	665,37*	-
25%	245,75	255,66	169,08*	123,55*	570,17*	577,12*	745,85*	-
30%	320,70	275,22	160,63*	161,37*	-	-	923,35*	-
35%	237,49	156,16*	108,40*	-	-	-	469,49*	-
40%	199,24*	216,71*	176,58*	-	-	-	-	-

* valor significativamente diferente ao encontrado na ausência de polímero ou sal (p-valor < 0,05)

Os valores de entalpia e entropia, também foram analisados pelo método de Tukey, onde as condições que apresentaram p-valor < 0,05, são

considerados significativamente diferentes frente ao valor obtido na ausência de polímero ou sal.

No caso do PEG, as entalpias ($\Delta H^\ddagger$) e entropias ($\Delta S^\ddagger$) encontradas neste estudo foram muito próximas uma das outras, para as diferentes massas molares estudadas (valores apresentados na Tabela 4 e 5).

Para os valores de entalpia ($\Delta H^\ddagger$), apresentam diferença significativa apenas a 35% m/m de PEG 4000 g/mol, e 15, 25, 30 e 35% m/m de PEG 10000 g/mol, quando comparados ao valor de $\Delta H^\ddagger$ obtido na ausência do polímero. Para os valores de entropia ($\Delta S^\ddagger$), apresentam diferença significativa, ao comparar com o valor $\Delta S^\ddagger$ obtido na ausência de polímero, as seguintes condições: 40% m/m PEG 600 g/mol; 35 e 40% m/m PEG 4000 g/mol; e de 10 a 40% PEG 10000 g/mol.

Os parâmetros termodinâmicos associados com a denaturação térmica de proteínas na presença de PEG são consistentes com a interpretação de que este polímero exerce um efeito parcial por causa de sua natureza hidrofóbica (LEE e LEE, 1987).

Para o DEAE-Dextrana, temos as menores entalpias e entropias, condizentes com o observado para os valores D de GFP encontrados na presença desse polímero, sendo significativamente menores que os valores encontrados na ausência do polímero nas concentrações de 15 a 30% m/m. A partir destes dados, podemos afirmar que o DEAE-Dextrana favorece a denaturação da GFP.

Na presença de PAA temos valores de $\Delta H^\ddagger$ e $\Delta S^\ddagger$ superiores aqueles encontrados na ausência de polímero, para as duas massas molares estudadas, indicando uma proteção da estrutura nativa da GFP. Esses valores são significativamente maiores que ao encontrado na ausência do polímero nas concentrações de 15 a 25% m/m PAA 8000 g/mol e 20 e 25% m/m PAA 30000 g/mol para entalpia; e 10 a 25% m/m PAA 8000 g/mol e 20 e 25% m/m PAA 30000 g/mol para entropia.

O mesmo ocorre na presença dos sais citrato e fosfato, ou seja, obteve-se valores de $\Delta H^\ddagger$ e $\Delta S^\ddagger$ superiores aqueles encontrados na ausência dos sais, sendo significativamente superiores a partir da concentração de 10% m/m de ambos sais estudados. Estes dados vão de encontro aos valores D obtidos para estes sais: ambos auxiliam na preservação da estrutura nativa da GFP nas temperaturas estudadas.

6. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos neste estudo, pode-se concluir que o citrato favoreceu a preservação da estrutura nativa da proteína verde fluorescente nas temperaturas estudadas (70 a 95°), em concentrações acima de 10% m/m. O fosfato e o ácido poliacrílico também auxiliaram a proteção da estrutura nativa da GFP, porém em menor intensidade, e, no caso do PAA, em concentrações acima de 20% m/m.

Apenas em condições específicas, o PEG e a DEAE-Dextrana protegeram a GFP dos efeitos térmicos de denaturação, sendo observado nas temperaturas de 70°C: 10% m/m PEG 600 g/mol, 5 e 10% m/m DEAE-Dextrana; 75°C: 5, 10 e 15% PEG 600 g/mol, todas as concentrações estudadas para PEG 4000 g/mol, 10 e 15% m/m DEAE-Dextrana; e em 85°C a 5% m/m DEAE-Dextrana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAKAWA, T.; PRESTRELSKI, S. J.; KENNEY, W. C.; CARPENTER, J. F. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 10:1- 28, 1993.
- ASHBY, M. C.; IBARAKI, K.; HENLEY, J. M. It's green outside: tracking cell surface proteins with pH-sensitive GFP. **TRENDS in Neurosciences**, v.27 nº5, Maio 2004.
- AZEVEDO, A. M.; CABRAL, J. M. S.; PRAZERES, D. M. F.; GIBSON, T. D.; FONSECA, L.P. Thermal and operational stabilities of *Hansenula polymorpha* alcohol oxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 27:37–45, 2004.
- BAUMSTARK-KHAN, C., PALM M., WEHNER, J., OKABE M., IKAWA M., HORNECK, G. Green Fluorescent Protein (GFP) as a Marker for Cell Viability After UV Irradiation. **Journal of Fluorescence**, v. 9, nº 1, 1999.
- BOERIS, V.; FARRUGGIA, B.; NERLI, B.; ROMANINI, D.; PICÓ, G. Protein-flexible chain polymer interactions to explain protein partition in aqueous two-phase systems and the protein–polyelectrolyte complex formation. **International Journal of Biological Macromolecules**, 41:286–294, 2007.
- BOTTOMLEY, S. P., TEW, D. J. The citrate ion increases the conformational stability of $\alpha 1$ -antitrypsin, **Biochimica et Biophysica Acta**, 1481: 11-17, 2000.
- CHALFIE M., KAIN, S. **Green Fluorescent Protein, Properties, Applications and Protocols**, Nova York, EUA, Ed. Willey-Liss, p. 385, 1998.
- CHEN, B.-L., ARAKAWA, T. Stabilization of Recombinant Human Keratinocyte Growth Factor by Osmolytes and Salts, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 85, 4: 419-422, 1996.
- CHEN, W., WALKER, S., BERG, J. C. The mechanism of floc formation in protein precipitation by polyelectrolytes. **Chemical Engineering Science**, v. 47, nº 5, 1039-1045, 1992.
- CHIARINI, E. **Comparação entre os Métodos Físicos e Químicos de Permeação e de Extração da Proteína Verde Fluorescente (GFPuv) de Culturas de *Escherichia coli* DH5- α** . 2002. 64f. Dissertação (Mestrado

em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

CHIARINI, E.; PENNA, T. C. V. Extração, purificação e caracterização físico-química da proteína verde fluorescente recombinante (GFPuv) expressa em *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, nº 4, out./dez., 457-466, 2003.

COCCA, M., D'ARIENZO, L., D'ORAZIO, L., GENTILE, G., MARTUSCELLI, E. Polyacrylates for conservation: chemico-physical properties and durability of different commercial products. **Polymer Testing** 23:333–342, 2004.

CODY, C. W.; PRASHER, D. C.; WESTLER, J. W. M.; PRENDERGAST, F. G.; WARD, W. W. Chemical Structure of the Hexapeptide Chromophore of the *Aequorea* Green-Fluorescent Protein. **Biochemistry**, 32:1212-1218, 1993.

CONESA, C., SANCHEZ, L., PEREZ, M.-D., CALVO, M. A Calorimetric Study of Thermal Denaturation of Recombinant Human Lactoferrin from Rice, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55: 4848-4853, 2007.

CRAMERI, A., WHITEHORN, E. A., TATE, E., STEMMER, W. P. C. Improved Green Fluorescent Protein by Molecular Evolution Using DNA Shuffling. **Nature Biotechnology**, 14:315-319, 1996.

CUBITT, A. G., HEIM, R., ADAMS, S. R., GOYD A. E., GROSS, L. A., TSIEN, R. Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, 20: 448-455, 1995.

DEPAZ, R. A., DALE, D. A., BARNETT C. C., CARPENTER J. F., GAERTNER A. L., RANDOLPH, T. W. Effects of drying methods and additives on the structure, function, and storage stability of subtilisin: role of protein conformation and molecular mobility. **Enzyme and Microbial Technology**, 31:765–774, 2002.

DIETZ, H., RIEF, M. Exploring the energy landscape of GFP by single-molecule mechanical experiments. **PNAS**, v. 101, nº 46 16192–16197, nov., 2004.

ENGEL, R.; WESTPHAL, A. H., HUBERTS, D. H. E. W., NABUURS, S. M., LINDHOUD, S., VISSER, A. J. W. G., VAN MIERLO. C. P. M. Macromolecular Crowding Compacts Unfolded Apoflavodoxin and Causes Severe Aggregation of the Off-pathway Intermediate during Apoflavodoxin Folding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, nº 41, 27383–27394, out., 2008.

FARRUGGIA, B.; GARCIA, G.; D'ANGELO, C.; PICÓ, G. Destabilization of human serum albumin by polyethylene glycols studied by thermodynamical

- equilibrium and kinetic approaches. **International Journal of Biological Macromolecules**, 20: 43-51, 1997
- FORMANECK, M. S.; MA, L.; CUI, Q. Effects of Temperature and Salt Concentration on the Structural Stability of Human Lymphotoxin: Insights from Molecular Simulations, **Journal of the American Chemical Society**, 128: 9506-9517, 2006.
- GERDES, H. H., KAETHER, C. Green fluorescent protein applications in cell biology. **FEBS Letters**, 389:44- 47, 1996.
- GLOGER, O., WITTHOHN, K., MÜLLER, B. W. Lyoprotection of aviscumine with low molecular weight dextrans. **International Journal of Pharmaceutics**, 260:59–68, 2003.
- GOVENDER, T., EHTEZAZI, T., STOLNIK, S., ILLUM, L., DAVIS, S. S. Complex formation between the anionic polymer (PAA) and a cationic drug (Procaine HCl): characterization by microcalorimetric studies. **Pharmaceutical Research**, v. 16, nº7, 1999.
- GUPTA, V.; NATH, S.; CHAND, S. Role of water structure on phase separation in polyelectrolyte-polyethyleneglycol based aqueous two-phase systems. **Polymer**, 43:3387-3390, 2002.
- GURSKY, O., ATKINSON, D. High- and low-temperature unfolding of human high-density apolipoprotein A-2, **Protein Science**, 5: 1874- 1882, 1996.
- HANCOCK, T.J. and HSU, J. T. Thermal stability studies of a globular protein in aqueous poly(ethylene oxide) by ^1H NMR. **Biotechnology and Bioengineering**, 51:410-421, 1996.
- HAQUE, I; SINGH, R.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; AHMAD, F. Effect of polyol osmolytes on ΔG_D , the Gibbs energy of stabilization of proteins at different pH values. **Biophysical Chemistry**. 117:1–12; 2005.
- HUANG, J. R.; CRAGG, T. D.; CHRISTODOULOU, J.; JACKSON, S. E. Stable Intermediate State and High Energy Barriers in the Unfolding of GFP. **Journal of Molecular Biology**, 370:356-371, 2007.
- ISHII M. **Determinação dos parâmetros cinéticos de resistência térmica da Proteína Verde Fluorescente recombinante (GFPuv)**. 2003. 82f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

- ISHII, M., KUNIMURA, J. S., PENNA, T. C. V., CHOLEWA, O. Study on the thermal stability of green fluorescent protein (GFP) in glucose parenteral formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, 337:109–117, 2007.
- JACOBS, D. J.; DALLAKYAN, S.; Elucidating Protein Thermodynamics from the Three-Dimensional Structure of the Native State Using Network Rigidity; **Biophysical Journal**, 88:903–915; 2005
- JENSEN, W. A; ARMSTRONG, J. MCD., GIORGIO, J. De; HEAM, M. T W. Stability studies on pig heart mitochondrial malate dehydrogenase: the effect of salts and amino acids, **Biochimica et Biophysica Acta**, 1296: 23-34, 1996.
- JOHANSSON, H. O.; ISHII, M.; MINAGUTI, M.; FEITOSA, E.; PENNA, T. C. V.; PESSOA Jr., A., Separation and partitioning of Green Fluorescent Protein from *Escherichia coli* homogenate in poly(ethylene glycol)/ sodium-poly(acrylate) aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, 62:166–174, 2008.
- KAUSHIK, J. K., BHAT, R. A mechanistic analysis of the increase in the thermal stability of proteins in aqueous carboxylic acid salt solutions. **Protein Science**, 8, 222-233, 1999.
- KIM, W. S., HIRASAWA, I., KIM, W. S. Effects of experimental conditions on the mechanism of particle aggregation in protein precipitation by polyelectrolytes with a high molecular weight. **Chemical Engineering Science**, 56:6525–6534, 2001.
- LEE, L. L.; LEE, J. C. Thermal stability of proteins in the presence of poly(ethylene glycols). **Biochemistry**, 26:7813-7819, 1987.
- MARCH, J. C., RAO, G., BENTLEY, W. E. Biotechnological applications of green fluorescent protein. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 62:303–315, 2003.
- MAZZOLA, P. G.; ISHII, M.; CHAU, E; CHOLEWA, O.; PENNA, T. C. V. Stability of Green Fluorescent Protein (GFP) in Chlorine Solutions of Varying pH. **Biotechnology Progress**, 22: 1702-1707, 2006.
- MUSTAFAEV, M. I., YÜCEL, F., ÖZTÜRZ, S., ÇIRAKOĞLU, B., BERMEK, E. Cu²⁺ mediated complex (PAA) and formation between polyacrylic acid bovine serum albumin. **Journal of Immunological Methods**, 197:31-37, 1996.
- NAGY, A.; MÁLNÁSI-CSIZMADIA, A.; SOMOGYI, B.; LÓRINCZY, D. Thermal stability of chemically denatured green fluorescent protein (GFP): A preliminary study. **Thermochimica Acta**, 410:161-163, 2004.

- NOEL, M., COMBES, D. *Rhizomucor miehei* lipase: differential scanning calorimetry and pressure/temperature stability studies in presence of soluble additives. **Enzyme and Microbial Technology**, 33:299–308, 2003.
- PING, G.; YANG, G.; YUAN, J. M. Depletion force from macromolecular crowding enhances mechanical stability of protein molecules; **Polymer**, 47:2564–2570, 2006.
- PENNA, T. C. V., ISHII, M. Selective Permeation and Organic Extraction of Recombinant Green Fluorescent Protein (*gfpuv*) from *Escherichia coli*. **BMC Biotechnology**, 2:7, 2002.
- QU, Y., BOLEN, D. W. Efficacy of macromolecular crowding in forcing proteins to fold. **Biophysical Chemistry**, 101–102; 155–165, 2002.
- REID, B. G., FLYNN, G. C. Chromophore Formation in Green Fluorescent Protein. **Biochemistry**, 36:6786–6791, 1997.
- REMMELE, R. L., NIGHTLINGER, N. S., SRINIVASAN, S., GOMBOTZ, W. R. Interleukin-1 receptor (IL-1R) Liquid Formulation Development Using Differential Scanning Calorimetry, **Pharmaceutical Research**, 15, 2: 200–208, 1998.
- ROMANINI, D.; BRAIA, M.; ANGARTEN, R. G.; LOH, W.; PICÓ, G. Interaction of lysozyme with negatively charged flexible chain polymers; **Journal of Chromatography B**, 857:25–31, 2007
- SANTAGAPITA, P. R., BRIZUELA, L. G., MAZZOBRE, M. F., RAMIREZ, H. L., CORTI, H. R., SANTANA, R. V., BUERA, M. P. Structure/Function Relationships of Several Biopolymers as Related to Invertase Stability in Dehydrated Systems. **Biomacromolecules**, 9:741–747, 2008.
- SASAHARA, K., MINTON, A. P. Effect of dextran on protein stability and conformation attributed to macromolecular crowding. **Journal of Molecular Biology**, 326:1227–1237, 2003.
- SCHEYHING, C. H., MEERSMAN, F., EHRMANN, M. A., HEREMANS, K., VOGEL, R. F. Temperature–Pressure Stability of Green Fluorescent Protein: A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. **Biopolymers**, 65:244–253, 2002.
- SKOSYREV, V. S., GOROKHOVATSKY, A. Y., VINOKUROV, L. M., RUDENKO, N. V., IVASHINA, T. V., KSENZENKO, V. N., ALAKHOV, Y. B. The Dependence of Stability of the Green Fluorescent Protein–Obelin Hybrids on the Nature of Their Constituent Modules and the Structure of the Amino Acid Linker, **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 27, n° 5, 323–329, 2001. Translated from *Bioorganicheskaya Khimiya*, v. 27, n° 5, 364–371, 2001.

- SMITH, C. B., ANDERSON, J. E., FISCHER, R. L., WEBB, S. R. Stability of green fluorescent protein using luminescence spectroscopy: is GFP applicable to field analysis of contaminants? **Environmental Pollution**, 120:517–520, 2002.
- STANIFORTH, R. A., CORTÉS, A., BURSTON, S. G., ATKINSON, T., HOLBROOK, J. J., CLARKE, A. R. The stability and hydrophobicity of cytosolic and mitochondrial malate dehydrogenases and their relation to chaperonin-assisted folding, **FEBS Letters**, 344: 129-135, 1994.
- TINOCO JR, I., SAUER, K., WANG, J. C. **Physical Chemistry Principles and Applications in Biological Sciences**, New Jersey, EUA, Ed. Prentice-Hall, Inc., third edition, p. 761, 1995.
- TODOROVA, R., ATANASOV, B. The role of the salt concentration, proton, and phosphate binding on the thermal stability of wild and cloned DNA-binding protein Sso7d from *Sulfolobus solfataricus*, **International Journal of Biological Macromolecules**, 34: 135-147, 2004.
- TUPOZUGULLARI, M., ÇIMEN, N. S.; MUSTAFAEVA, Z., MUSTAFAEV, M. Molecular-weight distribution and structural transformation in water-soluble complexes of poly(acrylic acid) and bovine serum albumin. **European Polymer Journal**, 43:2935–2946, 2007.
- VARDHANABHUTI, B., FOEGEDING, E. A. Effects of dextran sulfate, NaCl, and initial protein concentration on thermal stability of b-lactoglobulin and a-lactalbumin at neutral pH. **Food Hydrocolloids**, 22:752–762, 2008.
- WANG, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, 185:129–188, 1999.
- WARD, W. W., BOKMAN, S. H. Reversible Denaturation of *Aequorea* Green-Fluorescent Protein: Physical Separation and Characterization of the Renatured Protein. **Biochemistry**, 21:4535-4540, 1982.
- WON, C. M., MOLNAR, T. E., MCKEAN, R. E., SPENLEHAUER, G. A. Stabilizers against heat-induced aggregation of RPR 114849, an acidic fibroblast growth factor (aFGF), **International Journal of Pharmaceutics**, 167: 25 – 36, 1998.
- YANG, F.; MOSS, L. G.; PHILIPS, G. N. The molecular structure of green fluorescent protein. **Nature Biotechnology**, 14: 1246-1251, 1996.

- ZHANG, H., SAIANI, A., GUENET, J.M., CURTIS, R. Effect of Stereoregular Polyelectrolyte on Protein Thermal Stability. **Macromolecular Symposia**, 251:25–32, 2007.
- ZHENG, J. Y. JANIS, L. J. Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of a humanized monoclonal antibody LA298, **International Journal of Pharmaceutics**, 308: 46-51, 2006.
- ZHI, L., JIANG, Y., WANG, Y., HU, M., LI, S., MA, Y. Effects of Additives on the Thermostability of Chloroperoxidase. **Biotechnology Progress**, 23: 729-733, 2007.
- ZIELENKIEWICZ, W.; SWIERZEWSKI, R.; ATTANASIO, F., RIALDI, G. Thermochemical, volumetric and spectroscopic properties of lysozyme–poly(ethylene) glycol system. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 83, n°3, 587–595, 2006

APÊNDICE 1 - Preparo de solução tampão Tris-EDTA 200 mM (pH 8,0)

Dissolver 2,4225 g de Tris hidroxil metil aminometano (Serva Feinbiochemica GmbH & Co – Alemanha) e 0,0374 g de EDTA (Vetec Química Fina – Brasil) em 60 mL de água destilada. Homogeneizar. Ajustar o pH com solução de 1 M de ácido clorídrico. Ajustar o volume para 100 mL.

APÊNDICE 2 - Preparo da solução tampão de extração

Esta solução é preparada em 3 etapas:

(A) Solução tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,0)

Dissolver 0,30275 g de Tris hidroxil metil aminometano em 90 mL de água destilada. Ajustar o pH com solução 1 M de HCl. Conservar a 4°C.

(B) Solução de PMSF (Fenil Metil Sulfonil Fluoreto, USB – Suíça) 0,1 Mm

Dissolver 0,001742 g de PMSF em 1 mL de etanol. Completar com água até 10 mL.

Adicionar estes 10 mL nos 90 mL da solução A.

(C) Solução de β -Mercaptoetanol 1 mM

Adicionar 0,8 μ L de β -mercaptoetanol em 100 mL da solução B.

O tampão de extração deve ser estocado em frasco âmbar, e mantido sob refrigeração.

APÊNDICE 3 – Curvas logaritmo decimal da concentração de GFP *versus* tempo

Figura 39: Representação do logaritmo decimal da concentração de GFP (em $\mu\text{g/mL}$) versus tempo (min.) na ausência de polímeros e sais a 70°C. Cada curva representa a replicata do ensaio. A partir destas curvas foi possível obter o tempo de redução decimal (valor D; min.), através da inclinação das mesmas.

Figura 40: Representação do logaritmo decimal da concentração de GFP (em $\mu\text{g/mL}$) versus tempo (min.) na ausência de polímeros e sais a 75°C. Cada curva representa a replicata do ensaio. A partir destas curvas foi possível obter o tempo de redução decimal (valor D; min.), através da inclinação das mesmas.

Figura 41: Representação do logaritmo decimal da concentração de GFP (em $\mu\text{g/mL}$) versus tempo (min.) na ausência de polímeros e sais a 80°C. Cada curva representa a replicata do ensaio. A partir destas curvas foi possível obter o tempo de redução decimal (valor D; min.), através da inclinação das mesmas.

Figura 42: Representação do logaritmo decimal da concentração de GFP (em $\mu\text{g/mL}$) versus tempo (min.) na ausência de polímeros e sais a 85°C. Cada curva representa a replicata do ensaio. A partir destas curvas foi possível obter o tempo de redução decimal (valor D; min.), através da inclinação das mesmas.

Figura 43: Representação do logaritmo decimal da concentração de GFP (em $\mu\text{g/mL}$) versus tempo (min.) na ausência de polímeros e sais a 90°C. Cada curva representa a replicata do ensaio. A partir destas curvas foi possível obter o tempo de redução decimal (valor D; min.), através da inclinação das mesmas.

Figura 44: Representação do logaritmo decimal da concentração de GFP (em $\mu\text{g/mL}$) versus tempo (min.) na ausência de polímeros e sais a 95°C. Cada curva representa a replicata do ensaio. A partir destas curvas foi possível obter o tempo de redução decimal (valor D; min.), através da inclinação das mesmas.

ANEXOS OBRIGATÓRIOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros, a banca se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA BIOQUÍMICO-FARMACÊUTICA
Av. Lineu Prestes, 580 - Bloco 16 - Cidade Universitária
05508-900 - São Paulo - SP
Fone (011) 3091.3886 - Fax 3815.6386

São Paulo, 8 de março de 2009

Vimos declarar que o trabalho intitulado "Efeito de polímeros e sais na estabilidade da proteína verde fluorescente (GFP)" dispensa análise do Comitê de Ética em Pesquisa e/ou Comitê de Ética em Experimentação Animal.

Atenciosamente,

Letícia Celia de Lencastre Novaes

Prof. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna

Orientadora