UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós – Graduação em Tecnologia Bioquímico – Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico – Farmacêutica

**Aplicação da Proteína Verde Fluorescente, GFPuv,
como indicador biológico na validação da autoclavação de
soluções parenterais e da esterilização por óxido de etileno de
itens termolábeis. Comparação com esporos de *Bacillus subtilis***

Marina Ishii

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna

São Paulo

2006

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

**Aplicação da Proteína Verde Fluorescente, GFPuv,
como indicador biológico na validação da autoclavação de
soluções parenterais e da esterilização por óxido de etileno de
itens termolábeis. Comparação com esporos de *Bacillus subtilis***

Marina Ishii

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna

São Paulo

2006

18.000

DEDALUS - Acervo - CQ

30100012664

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

- I79a Ishii, Marina
Aplicação da proteína verde fluorescente (GFP) como indicador biológico na validação da autoclavação de soluções parenterais e da esterilização por óxido de etileno de itens termolábeis. Comparação com esporos de *Bacillus subtilis* / Marina Ishii. -- São Paulo, 2006.
245p.
- Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Vessoni Penna, Thereza Christina
1. Proteína : Biotecnologia 2. Esterilização industrial
3. Microbiologia aplicada I. T. II. Vessoni Penna, Thereza Christina orientador.

620.8 CDD

Marina Ishii

**Aplicação da Proteína Verde Fluorescente, GFPuv,
como indicador biológico na validação da autoclavação de
soluções parenterais e da esterilização por óxido de etileno de
itens termolábeis. Comparação com esporos de *Bacillus subtilis***

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do título de Doutor

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna
orientador/presidente

Maria Elena Santos Taqueda
1º. Examinador

Leoberto Costa Tavares
2º. Examinador

Inês Conceição Roberto
3º. Examinador

Pedro de Alcântara Pessoa Filho
4º. Examinador

São Paulo, 04 de Outubro de 2006.

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

ALBERT EINSTEIN

*“Sei que o meu trabalho é uma gota
no oceano mas sem ele,
o oceano seria menor.”*

MADRE TERESA DE CALCUTÁ

*Aos meus pais,
Hítoe e Mário
por todo amor, carinho e dedicação,
responsáveis por minha formação e
por mais esta conquista.*

*Rodrigo,
pelo imenso carinho e compreensão,
respeito e amor incondicionais,
essenciais durante mais esta etapa da vida,
sem os quais, muito não seria possível.*

AGRADECIMENTOS

À amiga, orientadora Thereza Christina Vessoni Penna, pela amizade, compreensão, dedicação, incentivo, e confiança em mim depositadas durante todas as etapas de minha vida pessoal e acadêmica, em especial na realização deste trabalho, minha eterna admiração e gratidão por mais esta conquista.

A todos os alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Microbiologia Industrial e, em especial a Alice, Elaine, Hélio, Juliana, Letícia, e Mariane que muito contribuíram para a realização deste trabalho, meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos André, Alzira, Angela, Ângelo, Carlota, Carol, Chiu, Dante, Eliane, Ester, Fábio, Ivan, Luiz, Marcelo, Pérola, Priscila e Renato pelo apoio, sugestões, amizade e convívio sem os quais tudo seria mais árduo.

Aos professores do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pelo apoio, incentivo e contribuição para a realização deste trabalho, em especial aos professores Adalberto Pessoa Júnior, José Abrahão Neto e Michele Vitolo pela convivência diária.

Aos funcionários Irene, Ricardo, Gledson e Graça pelo apoio na parte técnica, sugestões e amizade.

As funcionárias Cândida, Sônia e Marilene pelo convívio e amizade.

Aos funcionários das secretarias do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Míriam, Elza e Juarez e de Pós-Graduação, Elaine, Jorge e Majô pela disposição e atenção às minhas solicitações.

À equipe de manutenção da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela atenção, amizade e prontidão de atendimento às minhas solicitações.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, pela oportunidade de realização desta pesquisa.

À Edwards Lifesciences Industria de Produtos Médico-Hospitalares Ltda e à Aster Laboratórios Médicos pelo uso de suas instalações e material disponibilizado.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, ao Conselho Nacional de Pesquisa e CAPES pelo apoio financeiro.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de Doutorado.

A todos que por ventura não tenham sido citados, mas que me auxiliaram na realização deste trabalho, minha gratidão.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. JUSTIFICATIVA	3
2. INTRODUÇÃO	5
2.1. Solução parenteral de grande volume (SPGV)	5
2.2. Solvente universal: água para injeção, water for injection, WFI	7
2.3. Influência dos componentes nas propriedades intrínsecas das SPGV.	7
2.4. Indicador Biológico	8
2.4.1. Fatores que determinam a estabilidade térmica do Indicador Biológico	9
2.5. Processos de Esterilização	10
2.5.1. Calor úmido saturado	10
2.5.2. Esterilização por Óxido de Etileno	11
2.5.3. Pasteurização ou Higienização	12
2.6. Proteína Verde Fluorescente	13
2.6.1. Bioluminescência	13
2.6.2. <i>Aequorea victoria</i>	14
2.6.3. Proteína Verde Fluorescente selvagem (<i>GFP</i>) e recombinante (<i>GFPuv</i>)	15
2.6.4. Aplicações da Proteína Verde Fluorescente e variantes	18
2.7. Estabilidade de Proteínas	20
2.8. Energia livre de Gibbs (ΔG), <i>entalpia</i> (ΔH) e <i>entropia</i> (ΔS)	23
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAL, MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
Etapa I - Obtenção da Proteína Verde Fluorescente, Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Estabilidade a 25 °C	29
I.1. Objetivo	30
I.2. Material e Métodos	30
I.2.1. Obtenção da Proteína Verde Fluorescente recombinante (<i>GFP</i>)	30
I.2.1.1. Transformação de células de <i>E. coli</i>	30

I.2.1.2. Expressão da proteína verde fluorescente (GFPuv)	30
I.2.1.3. Extração da GFP pelo método de Partição em Três Fases (<i>Three Phases Partitioning ou TPP</i>)	31
I.2.1.4. Purificação da GFPuv	32
I.2.1.5. Quantificação da GFPuv	32
I.2.2. Soluções Parenterais	32
I.2.3. Estabilidade Térmica da GFPuv	33
I.2.3.1. Estabilidade da GFPuv a temperatura de 25 °C	33
I.2.4. Análise de Dados	35
I.2.4.1. Parâmetros cinéticos de Estabilidade Térmica da GFPuv em diferentes composições de soluções e valores de pH	35
I.2.4.1.1. Tempo de Redução decimal (Valor D) e Taxa constante de inativação (valor k)	35
I.2.4.1.2. Valor z e Coeficiente Q ₁₀	37
I.2.4.1.3. Energia de ativação	38
I.2.4.1.4. Energia Livre de Gibbs	39
I.2.4.1.5. Entalpia	40
I.2.4.1.6. Entropia	40
I.3. Resultados e Discussão	41
I.3.1. Valor de pH	41
I.3.2. Densidade e Viscosidade	42
I.3.3. Condutividade	42
I.3.4. Osmolaridade	44
I.3.5. Estabilidade da Proteína Verde Fluorescente (GFPuv) a 25°C	45
I.3.5.1. Valor de pH	45
I.3.5.2. Determinação do tempo de redução decimal, valor D	47
I.3.5.2.1. Soluções de Glicose em água para injeção, WFI	48
I.3.5.2.2. Soluções de Glicose em Tampão Acetato pH 5,0	49
I.3.5.2.3. Soluções de Glicose em Tampão Fosfato pH 6,0	52
I.3.5.2.4. Soluções de Glicose em Tampão Fosfato pH 7,0	54
I.3.5.2.5. Soluções de Glicose em Tampão Tris-EDTA, pH 8,0	56
I.3.5.3. Energia de Ativação	58

I.3.5.4. Energia Livre de Gibbs e Entropia	62
I.4. Conclusões Parciais	64
Etapa II - Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Resistência Térmica da GFPuv a temperatura entre 80 °C e 95 °C em Soluções de Glicose	65
II.1. Objetivo	66
II.2. Material e Métodos	66
II.3. Resultados e Discussão	66
II.3.1. Valor de pH	66
II.3.2. Determinação do tempo de redução decimal, valor D	68
II.3.2.1. Soluções tampão, sem adição de glicose	68
II.3.2.2. Soluções de Glicose em água para injeção	69
II.3.2.3. Soluções de Glicose em Tampão Acetato 10 mM pH 5,0	73
II.3.2.4. Soluções de Glicose em Tampão Fosfato 10 mM pH 6,0	76
II.3.2.5. Soluções de Glicose em Tampão Fosfato 10 mM pH 7,0	80
II.3.2.6. Soluções de Glicose em Tampão Tris-EDTA 10 mM pH 8,0	84
II.3.3. Resistência térmica da GFPuv em água (WFI) e soluções tampão acetato 10mM pH 5,0, fosfato 10mM pH 6,0 e 7,0 e tris-EDTA 10mM pH 8,0	90
II.3.4. Valor z	97
II.3.5. Coeficiente Q_{10}	100
II.3.6. Energia de Ativação	100
II.3.7. Energia Livre de Gibbs, Entalpia, Entropia	104
II.4. Conclusões Parciais	108
Etapa III - Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Estabilidade (25 °C) e Resistência Térmica (entre 80 e 95 °C) da GFPuv em Soluções Parenterais Glicofisiológicas	109
III.1. Objetivo	110
III.2. Material e Métodos	110
III.3. Resultados e Discussão	110
III.3.1. Valor de pH	110
III.3.2. Determinação do tempo de redução decimal, valor D	111

III.3.2.1. Estabilidade da GFPuv a 25°C	111
III.3.2.2. Resistência Térmica da Proteína Verde Fluorescente (GFPuv) as temperaturas entre 80°C e 95°C	112
III.3.2.2.1. Resistência térmica em soluções em água para injeção	112
III.3.2.2.2. Resistência térmica em soluções em acetato pH 5,0	112
III.3.2.2.3. Resistência térmica em soluções em fosfato pH 6,0	114
III.3.2.2.4. Resistência térmica em soluções em fosfato pH 7,0	115
III.3.2.2.5. Resistência térmica em soluções em tris-EDTA pH 8,0	115
III.3.3. Valor z	117
III.3.4. Coeficiente Q ₁₀	118
III.3.5. Energia de Ativação, Ea	120
III.4. Conclusões Parciais	121
Etapa IV - Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Resistência Térmica (entre 80 e 95 °C) da GFPuv em Soluções Parenterais de Cloreto de Sódio	122
IV.1. Introdução	123
IV.2. Objetivo	124
IV.3. Material e Métodos	124
IV.4. Resultados de Discussão	125
IV.4.1. Valor de pH	125
IV.4.2. Perda de Fluorescência da GFPuv ao contato com as soluções de NaCl	127
IV.4.3. Estabilidade térmica da GFPuv	127
IV.4.3.1. Estabilidade térmica da GFPuv em Tris-EDTA 10mM	127
IV.4.3.2. Estabilidade térmica da GFPuv em Fosfato 10mM	129
IV.4.3.3. Estabilidade térmica da GFPuv em água para injeção, WFI	130
IV.4.3.4. Estabilidade térmica da GFPuv em acetato 10 mM	132
IV.4.4. Valor z	133
IV.4.5. Coeficiente Q ₁₀	134
IV.4.6. Energia de Ativação (Ea)	135
IV.5. Conclusões Parciais	139

Etapa V - Aplicação da GFPuv como Indicador Biológico em Processos de Esterilização por Óxido de Etileno	140
V.1. Introdução	141
V.2. Objetivo	141
V.3. Material e Métodos	141
V.3.1. Processo de Esterilização	141
V.3.2. Proteína Verde Fluorescente recombinante, GFPuv	143
V.3.3. Esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i>	145
V.3.4. Disposição dos Indicadores Biológicos	146
V.4. Resultados e Discussão	147
V.5. Conclusões Parciais	151
Etapa VI - Aplicação da GFPuv como Indicador Biológico em Processos de Esterilização por Calor Úmido	152
VI.1. Introdução	153
VI.1.1. Validação de Processo de Autoclavação de Soluções Parenterais	153
VI.1.2. Conceito Validação x Qualificação	154
VI.1.3. Análise da eficácia do ciclo de esterilização	157
VI.2. Objetivos	159
VI.3. Material e Métodos	160
VI.3.1. Suspensão de Esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i> e <i>Bacillus subtilis W 1012</i>	160
VI.3.2. Autoclaves	161
VI.3.2.1. Validação das Autoclaves TREU 1 e 2	161
VI.3.2.2. Validação das Autoclaves Quiminox	164
VI.3.3. Proteína Verde Fluorescente, GFPuv, em Autoclave de Vaso de Bier	168
VI.4. Analise dos resultados	168
VI.5. Resultados e Discussão	171
VI.5.1. Esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i>	172
VI.5.2. Esporos de <i>Bacillus subtilis W 1012</i>	180

VI.5.3. Proteína Verde Fluorescente, GFPuv	183
VI.6. Conclusões Parciais	194
5. CONCLUSÕES	195
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	197

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Exemplos de organismos que apresentam bioluminescência	13
Tabela 02.	Propriedades físicas da GFP selvagem	17
Tabela 03.	Valores de pH das soluções de glicose após 24 horas de preparo	41
Tabela 04.	Valores médios de densidade e viscosidade das soluções de glicose	42
Tabela 05.	Condutividade das soluções de glicose	43
Tabela 06.	Osmolaridade das soluções de glicose	44
Tabela 07.	Valores de pH das soluções de glicose em água e n soluções tampão, antes, após e 24 horas após a adição de GFPuv, armazenadas a 4°C	46
Tabela 08.	Equações e valores D para a GFPuv nas soluções tampão, sem adição de glicose	47
Tabela 09.	Valores D obtidos para a GFPuv em solução de glicose em água, submetida a tratamento a temperatura de 25°C	48
Tabela 10.	Tempos de Redução Decimal, valores D, para GFPuv em solução de glicose em solução tampão acetato, pH 5,0 e submetida à 25 °C	50
Tabela 11.	Tempos de Redução Decimal, valores D, para GFPuv em solução de glicose em solução tampão fosfato, pH 6,0, submetida à 25°C	52
Tabela 12.	Tempos de Redução Decimal, valores D, para GFPuv em solução de glicose em solução tampão fosfato, pH 7,0, submetida à 25°C	54
Tabela 13.	Tempos de Redução Decimal, valores D, da GFPuv em solução de glicose em tampão Tris-EDTA, pH 8,0, submetida à 25°C	56
Tabela 14.	Valores D para a GFPuv em soluções de glicose em água e soluções-tampão, submetidas a tratamento a temperatura de 25°C	57
Tabela 15.	Valores de Energia de Ativação (Ea, Kcal/mol) para os sistemas de GFPuv em soluções de glicose	59
Tabela 16.	Valores de Energia Livre de Gibbs (ΔG) e entropia (ΔS) para a GFPuv em sistemas de água e soluções tampão	62
Tabela 17.	Valores de pH (a 25°C) de soluções entre 1,5% e 50% de glicose ao preparo da solução após a adição de GFPuv e 24 horas após a adição de GFP, estocadas a temperatura de 4°C	67
Tabela 18.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv nas soluções padrões sem adição de glicose às temperaturas de 80°C, 85°C, 90°C e 95°C	68

Tabela 19.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em água Milli-Q e submetida a 80°C	69
Tabela 20.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em água Milli-Q submetida a 85°C	71
Tabela 21.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em água Milli-Q submetida a 90°C	72
Tabela 22.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em água Milli-Q submetida a 95°C	72
Tabela 23.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em solução tampão acetato pH 5, submetida a 80°C	73
Tabela 24.	Tempos de redução decimal, valor D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tampão acetato pH 5,0 e submetida a 85°C	74
Tabela 25.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tampão acetato pH 5,0 e submetida a 90°C	74
Tabela 26.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tampão acetato pH 5,0 e submetida a 95°C	75
Tabela 27.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tampão fosfato pH 6,0 e submetida a 80°C	76
Tabela 28.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tampão fosfato pH 6,0 e submetida a 85°C	77
Tabela 29.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tampão fosfato pH 6,0 e submetida a 90°C	78
Tabela 30.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tampão fosfato pH 6,0 e submetida a 95°C	79
Tabela 31.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tampão fosfato pH 7,0 e submetida a 80°C	80
Tabela 32.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tampão fosfato pH 7,0 e submetida a 85°C	81
Tabela 33.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tampão fosfato pH 7,0 e submetida a 90°C	82
Tabela 34.	Tempo de redução decimal, valor D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tampão fosfato pH 7,0 e submetida a 95°C	83
Tabela 35.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tris-EDTA pH 8,0 submetida a 80°C	85

Tabela 36.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tris-EDTA pH 8,0 submetida a 85°C	86
Tabela 37.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tris-EDTA pH 8,0 submetida a 90°C	87
Tabela 38.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tris-EDTA pH 8,0 submetida a 95°C	88
Tabela 39.	Valores D da GFPuv em sistemas de glicose exposta às temperaturas de 80°C, 85°C, 90°C e 95°C	90
Tabela 40.	Valores z, coeficiente Q_{10} e Energia de Ativação determinados para a GFPuv em sistemas de glicose	99
Tabela 41.	Variação dos valores de Energia livre de Gibbs, determinados para a GFPuv em sistemas de glicose	104
Tabela 42.	Valor de pH (a 25°C) para a GFPuv em água (WFI) e soluções - tampão, sem solutos adicionados (controle) e com 5% de glicose ou 0,9% de NaCl e glicofisiológica (5% de glicose e 0,9% de NaCl, GF)	110
Tabela 43.	Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de cloreto de sódio 0,9% e glicofisiológica, em diferentes soluções tampão a temperatura de 25°C	111
Tabela 44.	Tempos de redução decimal, valores D, determinados para a GFPuv em soluções de cloreto de sódio 0,9%	113
Tabela 45.	Tempos de redução decimal, valores D, determinados para a GFPuv em soluções glicofisiológicas	114
Tabela 46.	Valores D para a GFPuv em soluções parenterais	116
Tabela 47.	Valores z, coeficiente Q_{10} e Energia de Ativação dos sistemas de solução tampão, glicose 5%, cloreto de sódio e glicofisiológica, no intervalo de temperatura entre 80°C e 95°C	119
Tabela 48.	Valores D para a GFPuv em soluções de NaCl a 80°C, 85°C, 90°C e 95°C.	126
Tabela 49.	Valores z, coeficiente Q_{10} e energia de ativação, E_a , da GFPuv em sistemas de solução de cloreto de sódio	134
Tabela 50.	Parâmetros dos ciclos de esterilização realizados.	143
Tabela 51.	Intensidade de Fluorescência remanescente da GFPuv após 2, 4 e 8 horas de exposição ao EtO	148
Tabela 52.	Concentração de GFPuv após 2, 4 e 8 horas de exposição ao EtO	150

Tabela 53.	Valores $D_{100^{\circ}\text{C}}$ determinados para esporos de <i>Bacillus</i> em soluções parenterais de diferentes composições	171
Tabela 54.	Valores F determinados para os ciclos de esterilização das SPGV de Ringer com Lactato, com configuração de carga máxima e o número de ciclos logarítmicos reduzidos de esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i>	175
Tabela 55.	Valores F determinados para os ciclos de esterilização das SPGV de 5% de glicose, com configuração de carga mínima e o número de ciclos logarítmicos reduzidos (n) de esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i> , para a autoclave TREU 1	178
Tabela 56.	Valores F e ciclos logarítmicos decaídos (n) determinados para cada termopar para: (i) câmara vazia e (ii) carga máxima homogênea	180
Tabela 57.	Carga Mista. Valores F e ciclos logarítmicos decaídos (n) determinados para cada termopar	181
Tabela 58.	Carga Mista. Valores F e ciclos logarítmicos decaídos (n) na população de <i>Bacillus subtilis</i> W 1012	182
Tabela 59.	Valores F e ciclos logarítmicos decaídos (n) determinados para cada termopar para: (i) câmara vazia e (ii) carga máxima homogênea	183
Tabela 60.	Concentração ($\mu\text{g/mL}$) e Intensidade de Fluorescência da GFPuv em soluções de 1,5% a 50% de glicose em água à 100 °C em autoclave	184
Tabela 61.	Concentração ($\mu\text{g/mL}$) e Intensidade de Fluorescência da GFPuv em soluções de 1,5% a 50% de glicose em tampão acetato 10mM pH 5,0 à 100 °C em autoclave	186
Tabela 62.	Concentração ($\mu\text{g/mL}$) e Intensidade de Fluorescência da GFPuv em soluções de 1,5% a 50% de glicose em tampão fosfato 10mM pH 6,0 à 100 °C em autoclave	188
Tabela 63.	Concentração ($\mu\text{g/mL}$) e Intensidade de Fluorescência da GFPuv em soluções de 1,5% a 50% de glicose tampão fosfato 10mM pH 7,0 à 100 °C em autoclave	190
Tabela 64.	Concentração ($\mu\text{g/mL}$) e Intensidade de Fluorescência da GFPuv em soluções de 1,5% a 50% de glicose em tampão tris-EDTA 10mM pH 8,0 à 100 °C em autoclave	192

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	<i>Aequorea Victoria</i>	14
Figura 02.	Estrutura barril β -can da GFPuv	15
Figura 03:	Reação de ciclização autocatalítica e oxidação para formação do grupo fluoróforo	16
Figura 04.	Fluorímetro acoplado ao banho de água, utilizado na quantificação da GFPuv	34
Figura 05.	Esquema de cálculo para a determinação do valor D	36
Figura 06.	Decaimento da Intensidade de Fluorescência da GFP em soluções-tampão, sem adição de glicose, a temperatura de 25°C	47
Figura 07.	Variação dos Valores D e de pH para as soluções de glicose em água	49
Figura 08.	Decaimento da intensidade de fluorescência da GFP nas concentrações de 5% e 10% de glicose, em tampão fosfato, pH 6,0	53
Figura 09.	Variação dos valores D e do valor de pH para a GFP em solução de glicose em tampão fosfato, pH 7,0 e água	55
Figura 10.	Valores de Energia de Ativação para a GFP em soluções de glicose	61
Figura 11.	Relação entre valores D e de viscosidade em função da concentração de glicose em Água Milli-Q	70
Figura 12.	Variação do valor D com o aumento da concentração de glicose em tris-EDTA	84
Figura 13.	Curvas de inativação da GFPuv, em solução de glicose e Tris-EDTA, pH 8,0, exposto a temperatura constante de 90°C e 95°C	89
Figura 14.	Variação da Energia de ativação dos sistemas de GFPuv em soluções entre 1,5% e 50% de glicose, em água, acetato e fosfato 6.0	102
Figura 15.	Variação da Energia de ativação dos sistemas de GFPuv em soluções entre 1,5% e 50% de glicose, em água, fosfato pH 7.0 e Tris-EDTA	103
Figura 16	Tempo de Redução Decimal para GFP em Tris-EDTA 10mM 80°C	128
Figura 17.	Tempos de Redução Decimal para GFP em Tris-EDTA 10mM a 85°C, 90 °C e 95 °C	128
Figura 18.	Valores D para a GFPuv relacionadas com o valor de pH da solução em água para injeção, [Valor D = $9,6865 \cdot \text{pH} - 49,52$, $R^2 = 0,95$] e Fosfato 10mM [Valor D = $21,578 \cdot \text{pH} - 113,05$, $R^2 = 0,98$]	131

Figura 19.	Valores D para GFPuv em Acetato 10mM a 80°C, 85°C, 90°C e 95°C	132
Figura 20.	Valor z (°C) e coeficiente para a GFPuv em sistemas de cloreto de sódio diluído Água para Injeção, Fosfato 10mM e Tris-EDTA 10mM no intervalo de temperatura entre 80°C e 95°C	135
Figura 21.	Energia de Ativação (kcal/mol) para a GFPuv em sistemas de Água para Injeção, Fosfato 10mM e Tris-EDTA 10mM no intervalo de temperatura entre 80°C e 95°C	137
Figura 22.	Proteína GFPuv liofilizada e armazenada na parte superior das caixas. Sequência de acondicionamento dos Indicadores Biológicos	144
Figura 23.	Disposição da GFPuv no interior das cânulas de perfusão: (A) GFPuv liofilizada; (B) Cânula com GFPuv inserida; (C) Cânula com frasco contendo GFPuv embalados para esterilização por ETO.	144
Figura 24.	Curva padrão da concentração de GFPuv (mg/mL) em função da intensidade de fluorescência ($\lambda_{exc} = 394\text{nm}$ e $\lambda_{em} = 509\text{nm}$)	145
Figura 25.	Disposição das amostras de GFPuv dentro da autoclave e dentro dos pallets	146
Figura 26.	Perda da Intensidade de Fluorescência da GFPuv das amostras de GFPuv expostas à esterilização por óxido de etileno	147
Figura 27.	Distribuição dos sensores no interior dos autoclaves: (A) no interior da câmara (B) nas bandejas. Na carga máxima e mínima em vermelho sensores internos	162
Figura 28.	Distribuição de termopares para a validação do equipamento, considerando a câmara da autoclave vazia	165
Figura 29.	Distribuição de termopares para a validação do equipamento, considerando a carga máxima da autoclave	166
Figura 30.	Distribuição de termopares para a validação do equipamento, considerando a carga mista da autoclave	167
Figura 31.	Variação do valor F à temperatura de 102 °C de duas autoclaves de configuração idêntica, considerando mesma carga e produto processado	173
Figura 32.	Variação do Valor F e do número de ciclos logarítmicos pelo tempo de processo para a carga máxima de Ringer com lactato	179
Figura 33.	Variação da intensidade de fluorescência da GFPuv e valor de pH em soluções de glicose em água e submetidas à temperatura de 100 °C em autoclave	185

Figura 34.	Variação da intensidade de fluorescência da GFPuv e do pH em soluções de glicose em tampão acetato pH 5,0 e submetidas à 100 °C em autoclave	187
Figura 35.	Variação da intensidade de fluorescência da GFPuv e valor de pH em soluções de glicose em tampão fosfato pH 6,0 e submetidas à 100 °C em autoclave	189
Figura 36.	Variação da intensidade de fluorescência da GFPuv e pH em soluções de glicose em solução tampão fosfato pH 7,0 e submetidas à 100 °C em autoclave	191
Figura 37.	Variação da intensidade de fluorescência da GFPuv e valor de pH em soluções de glicose preparadas em solução tampão Tris-EDTA pH 8,0 e submetidas à 100°C em autoclave	193

ANEXOS

Anexo 1.	Soluções Tampão	209
Anexo 2	Determinação das Propriedades Físicas das Soluções de Glicose	212
Anexo 3	Artigo Publicado	215
Anexo 4	Declaração de Dispensa do Comitê de Ética em Pesquisa	243

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Aa	Atividade de água
ATCC	American Type Culture Collection
β - can	beta can
λ	comprimento de onda
$\mu\text{g/mL}$	microgramas /mililitro
$^{\circ}\text{C}$	graus <i>Celsius</i> -
Å	ângstron
Aa	atividade de água
Ala	alanina
Cα	carbono alfa
Cβ	carbono beta
Ca²⁺	íon cálcio
CFC	clorofluorcarbono
CIP	Clean – in – Place System
cm	centímetro
Ea	Energia de Ativação
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EtCG	etilenocloridrina
EtG	etilenoglicol
EtO	Óxido de etileno
g	gramas
GFP	proteína verde fluorescente (<i>green fluorescent protein</i>)
GFPuv	proteína verde fluorescente recombinante
Gly	glicina
HIC	<i>Hydrophobic Interaction Column</i>
HMF	Hidroximetifurfural
IB	indicador biológico
K	graus Kelvin
k	taxa de inativação constante
kcal	kilocalorias

KDa	kilodalton
log₁₀	logaritmo decimal
LOX	lipoxigenase
Met	metionina
Mg²⁺	íon magnésio
mg/mL	miligramas /mililitro
min	minutos
mM	milimolar
nm	nanômetro
pH	potencial hidrogeniônico
PEBD	Polietileno de baixa densidade
PEMD	Polietileno de media densidade
Phe	fenilalanina
PME	pectinesterase
POX	Polifenoloxidase
R²	coeficiente de correlação
s	segundos
SAL	Sterility Assurance Level
Ser	serina
SPGV	Solução Parenteral de Grande Volume
Thr	treonina
TPP	three phases partitioning
Tyr	tirosina
UV	ultra-violeta
Val	valina
WFI	Water for Injection

RESUMO

A Proteína Verde Fluorescente recombinante, GFPuv, é um sistema marcador atrativo pois, sua presença pode ser visualizada através da intensidade de fluorescência emitida, sem o uso de substratos ou meios complexos. Sendo uma molécula estável à presença de substâncias orgânicas, temperaturas acima de 70 °C e ampla faixa de pH, é um potencial Indicador Biológico (IB) para diversas aplicações.

A estabilidade térmica da GFPuv, foi avaliada pela medida da perda de intensidade de fluorescência, expressa em valores D (min), tempo de exposição necessário para redução de 90% da intensidade de fluorescência inicial da GFPuv. GFPuv (3,5-9,0 µg/mL), expressa por *E. coli* e isolada por extração de Partição em Três Fases (TPP) e purificação por Cromatografia de Interação Hidrofóbica (HIC), foi diluída nas soluções parenterais preparadas em tampão (10 mM cada: Tris-EDTA, pH 8; Fosfato, pH 6 e 7, e Acetato, pH 5) e em água para injeção, WFI; pH = 6,70±0,40), e expostas a temperaturas de 25°C e ao intervalo entre 80°C e 100°C. A 95°C, os valores D para a GFPuv em soluções de 1,5% a 50% de glicose variaram de: (i) 1,63 (±0,23) min em acetato pH 5; (ii) 2,64 ± 0,26 min em WFI; (iii) 2,50 ± 0,18 min em fosfato pH 6; (iv) 3,24 ± 0,28 min em fosfato pH 7 e, (v) 2,89 ± 0,44 min em Tris-EDTA pH 8. Cloreto de sódio associado aos tampões proporcionou influência positiva na estabilidade da GFPuv, sendo que em soluções de Tris-EDTA, a adição de 15-20% de NaCl dobrou a estabilidade térmica da GFPuv (valores D de 65,79 min e 18,12 min a 80 °C e 85 °C) em relação à solução sem cloreto de sódio.

Nos processos de esterilização por óxido de etileno (45°C-60°C), a GFPuv pode ser utilizada como IB para monitorar a distribuição de gás dentro da câmara, pois, apresentou variação na concentração remanescente de até 80%, após processamento, estabelecendo áreas distintas dentro da câmara. No tratamento em autoclave, a GFPuv em solução apresentou resistência térmica em solução de fosfato pH 7,0 (valor F = 2,53 min (± 0,12)). Quando expressa por esporos de *Bacillus subtilis*, a intensidade de fluorescência emitida por esporos sobreviventes se manteve. A estabilidade térmica da GFPuv atestou sua potencialidade como indicador biológico fluorescente da garantia da eficácia de tratamento de soluções e materiais expostos ao calor.

Palavras-chave: Proteína Verde Fluorescente, GFPuv, Indicador biológico, Solução parenteral, Glicose, Resistência térmica

ABSTRACT

The recombinant Green Fluorescent Protein, GFPuv is an attractive system marker due to its ability to emit fluorescence when exposed to ultraviolet light, without use of substrates or complex environment. Being a stable molecule even in the presence of organic substances, temperatures above 70 °C and wide range of pH, it is a potential Biological Indicator, BI, for many applications, including thermal processes.

GFPuv thermal stability was evaluated by the loss of fluorescence intensity. expressed in decimal reduction time (D-value, min), the exposure time required to reduce 90% of the GFPuv initial fluorescence intensity. GFPuv (3.5-9.0 µg/mL), expressed by *E. coli* and isolated by Three Phases Partitioning, TPP extraction with Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC, was diluted in buffered solutions (each 10 mM: Tris-EDTA, pH 8; phosphate, pH 6 and 7, and acetate, pH 5) and in water for injection, WFI; pH = 6.70 ($\pm$ 0.40), and exposed to temperatures of 25°C and between 80°C and 95°C. At 95°C, the D-value for GFPuv in 1.5%-50% glucose, ranged from: (i) 1.63 ± 0.23 min in acetate pH 5; (ii) 2.64 ± 0.26 min in WFI; (iii) 2.50 ± 0.18 min in phosphate, pH 6; (iv) 3.24 ± 0.28 min in phosphate, pH 7, (v) 2.89 ± 0.44 min in Tris-EDTA, pH 8. Sodium chloride provided a positive influence over GFPuv stability. In Tris-EDTA solutions, the addition of 15% and 20% of NaCl doubled the thermal stability of GFPuv ($D = 65.79$ min and $D = 18.12$ min at 80 °C, and 85 °C, respectively, in relation to the solutions without NaCl.

For ethylene oxide sterilization processes (45°C-60°C), GFPuv can be used as biological indicator to monitor gas distribution into the chamber. After processing, the protein concentration varied by 80%, showing distinct areas into the chamber. In autoclave, GFPuv in solution showed thermal resistance in phosphate pH 7.0 solution (F-value = 2.53 ($\pm$ 0.12) min. When expressed by *Bacillus subtilis* spores, the fluorescence intensity was kept constant after thermal processing. The thermal stability of GFPuv provides the basis for its potential utility as a fluorescent biological indicator to assess the efficacy of the treatment of liquids and materials exposed to steam.

Keywords: Green Fluorescent Protein, GFPuv, Biological indicator, Parenteral solutions, glucose, Thermal Resistance

1. JUSTIFICATIVA

Soluções Parenterais de Grande Volume, SPGV, são medicamentos de dose única, destinados às reposições de perdas hídricas, eletrolíticas ou energéticas e utilizados como veículos na administração de medicamentos auxiliares (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, BRASIL, 1997). Sendo as SPGV os medicamentos mais consumidos e utilizados no universo farmacêutico e hospitalar (Associação Brasileira de Produtores de Soluções Parenterais, ABRASP, 2006), as etapas de produção das mesmas, e em especial da autoclavação terminal, devem ser rigorosamente controladas por protocolos microbiologicamente avaliados, pois, a menor contaminação microbiana ou a presença de endotoxinas, resultante de crescimento bacteriano pode comprometer a saúde do usuário e da coletividade.

Esporos bacterianos são altamente resistentes às condições ambientais adversas e são usualmente utilizados como indicadores biológicos (IB) na avaliação do desempenho e condições de operação da: (i) autoclavação por calor úmido; (ii) esterilização por óxido de etileno (EtO); (iii) limpeza e desinfecção. Esporos de *B. subtilis* são considerados convenientes IBs na autoclavação de SPGV acondicionadas em embalagem plástica de polietileno. Sendo o crescimento de sobreviventes bacterianos dependente do tempo e condições de incubação, a Proteína Verde Fluorescente recombinante, GFPuv, foi escolhida para ser avaliada como potencial IB na aferição da eficiência dos procedimentos elencados devido a apresentar rapidez e confiabilidade de resposta. A GFP tem como principal característica a emissão de fluorescência quando submetida à luz ultravioleta (UV) e, por não necessitar de substratos ou meios complexos, torna-se uma ferramenta atrativa para aplicação. O emprego da GFPuv em relação aos esporos de *B. subtilis* visa agilizar os testes e resultados da validação de desempenho dos procedimentos em questão. O emprego da GFPuv facilita as validações operacionais e de desempenho do processo, indicando por visualização com lâmpada UV as áreas de maior e de menor acesso de temperatura, concentração do agente esterilizante, umidade e pressão na câmara esterilizadora.

A comparação entre os indicadores biológicos convencionais, esporos de *B. subtilis* e a proteína GFPuv proporciona uma base de dados para o desenvolvimento

de ferramenta biotecnológica, capaz de otimizar o processo de obtenção de resposta sobre a eficácia do processo térmico esterilizante. Por detecção direta da emissão de fluorescência sob luz UV, a GFPuv proporciona alternativa aos métodos convencionais utilizados, criando um novo panorama e progresso na área da saúde.

2. INTRODUÇÃO

2.1. Solução Parenteral de Grande Volume (SPGV)

Por definição da Portaria nº. 500/1997 do Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, de 09/10/1997, Regulamento Técnico – 3ª parte, tem-se que: *“Soluções Parenterais de Grande Volume (SPGV) são soluções em bases aquosas, estéreis, apirogênicas, acondicionadas em recipiente único com capacidade de 100 mL ou mais, esterilizadas terminalmente”*. Estão incluídas nesta definição as soluções para administrações endovenosas, irrigação e diálise peritoneal. Nessa Portaria, regulamentaram-se as “Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos – BPF”, para laboratórios e áreas de saúde produtora de medicamentos, com capítulo exclusivo sobre as diretrizes suplementares para a fabricação de medicamentos estéreis.

Soluções Parenterais são utilizadas no restabelecimento de condições clínicas não adequadas, promovendo: (i) a correção do balanço de eletrólitos; (ii) a reposição de fluidos no organismo; (iii) nutrição básica e, (iv) a administração de fármacos (TURCO, 2000).

Os componentes mais utilizados nas formulações das soluções parenterais são: a glicose e o manitol, como fontes de carbono, os eletrólitos, como os íons sódio na forma de cloreto ou lactato, potássio, magnésio e cálcio, na forma de cloreto, os quais participam de reações bioquímicas diversas.

As SPGV são também administradas como veículo de medicamentos auxiliares (BRASIL, 1997). Sendo o corpo humano constituído por 70% de água, a SPGV participa de todas as fases dos sistemas orgânicos. Durante a internação hospitalar, a solução parenteral, também conhecido por soro, está presente em todos os procedimentos. Estima-se que 85% da população internada em um centro de saúde esteja conectada a um soro.

Observa-se nos últimos anos a grande quantidade de notícias informando dezenas de óbitos de pacientes que receberam SPGV com suspeitas de contaminação, por falhas na obtenção da água para injeção – (WFI), nas operações unitárias de despirogenização e de autoclavação terminal (OESP, 2001). A presença de pirogênios no produto final, acima dos limites especificados, é o melhor indicador da elevada

contaminação microbiana nas etapas que precedem a autoclavagem terminal. Esta deve ser validada em função do indicador biológico escolhido para garantir a conservação da SPGV até o usuário (VESSONI PENNA et al., 2002; USP 29, 2006).

As Boas Práticas de Preparação das SPGV têm recebido especial atenção das autoridades do Ministério da Saúde, órgãos ligados à saúde pública e especialmente pela ANVISA, na padronização das normas de preparo e distribuição das SPGV. A ANVISA tem por objetivo avaliar os protocolos de procedimentos das diferentes etapas de preparação das SPGV em cada um dos estabelecimentos industriais, farmácias de manipulação e centros de saúde.

No município de Caruaru (Pernambuco, 1996), sessenta pacientes que faziam hemodiálise em uma clínica faleceram devido a soluções para diálise contaminadas (MOREIRA, 1998). Fica evidente que é necessário extremo controle também na preparação das soluções para o usuário final, pois, a menor contaminação microbiana pode ser fatal ou causar grave quadro de sepsia generalizado como indicado em diversas reportagens ao longo dos anos (OESP, 2001).

Em outubro de 1996, 35 crianças recém-nascidas morreram no berçário de um hospital de 200 leitos em Roraima, Brasil. Vinte das mortes foram atribuídas a sepsia. O relatório de investigação do Ministério da Saúde relatou que a origem era intravenosa, devido a reações de pirogênios presentes nas soluções parenterais reforçando a necessidade de controle na etapa de manipulação da SPGV (GARRET; McDONALD, 1998).

Em março de 2001, o uso de soluções parenterais contaminadas no interior do Estado de São Paulo e Minas Gerais foi responsável por dezenas de óbitos de pacientes hospitalizados (OESP, 2001).

Soluções parenterais são os medicamentos mais utilizados no universo farmacêutico e hospitalar. A estimativa da ABRASP indica o uso de aproximadamente 300 milhões de litros por ano no Brasil (ABRASP, 2006). Apesar disto, o descuido com as etapas de fabricação, processamento e utilização no paciente final ainda existem e, sendo uma problemática de saúde básica, há a necessidade da continuidade de trabalhos e pesquisas nesta área.

2.2. Solvente universal: água para injeção, water for injection, WFI)

Desde que grande parte dos medicamentos no ambiente hospitalar é administrado de forma diluída, o componente presente em maior proporção é o veículo, o qual não possui atividade terapêutica e é atóxico.

O solvente utilizado na preparação de soluções parenterais é a água para injeção ou *water for injection*, *WFI*, obtido de sistemas integrados de purificação de água. WFI é especialmente distribuída e utilizada de maneira a satisfazer os requisitos de pureza e isenção de pirogênicos das normas vigentes (BRASIL, 1997; AVIS; LEVCHUCK, 2000). A qualidade da WFI determina a qualidade do produto final, tanto nas características físico-químicas como biológicas. A obtenção de WFI é uma das etapas mais importantes na preparação de soluções parenterais. Os procedimentos de limpeza e desinfecção (*clean – in – Place System*, *CIP*) do sistema de purificação de água são determinantes para a qualidade da WFI (VESSONI PENNA; MAZZOLA; MARTINS, 2001, 2002).

2.3. Influência dos componentes nas propriedades intrínsecas das SPGV

Determinadas soluções aquosas são válidas para uso parenteral. Frequentemente, são utilizadas como veículo isotônico, no qual o fármaco pode ser adicionado ao momento da administração, reduzindo possível desconforto ocasionado por aumento da osmolaridade da solução. Dentre estas soluções incluem-se: solução de cloreto de sódio, glicose, cloreto de sódio e glicose associados, Ringer e Ringer com lactato.

A natureza química, a estrutura, o grau de pureza e a concentração dos componentes na composição das SPGV determinam as propriedades intrínsecas das soluções, tais como: (i) valor de pH; (ii) condutividade e osmolaridade; (iii) viscosidade e atividade de água; (iv) nível de caramelização e formação de compostos à base de Hidroximetilfurfural, HMF, produtos da degradação da glicose. Estas propriedades devem ser registradas antes e após o processo de autoclavação, visto que são sensíveis às exposições variáveis de temperatura.

2.4. Indicador Biológico

Indicador biológico (IB) por definição é um sistema de desafio, contendo microrganismos viáveis, e, que possui resistência definida a um processo de esterilização específico (ISO 11138-1, 2006, VESSONI PENNA et al., 2000).

O indicador biológico não deve ser patogênico ou pirogênico, deve ser rapidamente identificável, fornecer reprodutibilidade e precisão em relação ao método, apresentar resistência ao agente físico ou químico independente da microbiota presente no artigo ou ambiente, em relação à finalidade que se destinam, além de facilitar o diagnóstico e a definição dos parâmetros de processo.

Microrganismos e enzimas são comumente classificados como indicadores biológicos no processamento de produtos, como por exemplo a pectinesterase, e a polifenoloxidase (ALBERT et al, 1998, GÖKMEN et al, 2005, McCORMICK et al, 2003).

Esporos bacterianos são geralmente selecionados para serem utilizados como indicadores biológicos (IBs) na avaliação do nível de aceitação do processo em questão quanto à segurança e conservação do item e ambiente considerados. Esporos de *Geobacillus stearothermophilus* e *Bacillus atrophaeus* em suspensão são considerados convenientes IBs na autoclavação de SPGV. A escolha do IB e a determinação dos parâmetros de autoclavação são funções da natureza química da embalagem plástica que condiciona SPGV (SPICHER et al, 2002, ISO 11138-1, 2006):

(i) frascos de polietileno apresentam baixa absorção à água, alta resistência aos solventes e baixa resistência ao calor ($T < 110\text{ }^{\circ}\text{C}$). Porém, as embalagens de polietileno de baixa densidade (PEBD) e em menor frequência de média densidade (PEMD) são preferidas, pois são confeccionadas nos estabelecimentos de produção das SPGV, sendo o custo final competitivo;

(ii) bolsas de polipropileno que apresentam elevada resistência à maioria dos solventes, e à autoclavação à temperatura de $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, representam hoje o melhor tipo de embalagem, porém são de elevado custo;

(iii) esporos de *B. subtilis* ATCC 9372, reclassificados como *Bacillus atrophaeus* (BURKE et al., 2004, ISO 11138-2, 2006) são IBs escolhidos para SPGV em frascos de polietileno, nas operações de autoclavação terminal, às temperaturas entre $94\text{ }^{\circ}\text{C}$

e 104 °C; e esporos de *G. stearothermophilus* ATCC 7953 são IBs selecionados para SPGV em bolsas de polipropileno, em processos a 121 °C;

(iv) na higienização de produtos alimentícios (pH > 4,5), na pasteurização de sucos e fluidos (pH < 4,5) e nos tratamentos térmicos de vacinas e fatores hemofílicos liofilizados, enzimas são escolhidas como IBs nos processos térmicos entre 50 °C e 100 °C.

A escolha do IB não exclui a avaliação da biocarga da SPGV, pois a autoclavação não elimina substâncias pirogênicas, mas ativa formas esporuladas sobreviventes e compromete a conservação da SPGV.

A estabilidade térmica do IB depende do ambiente, e deve ser determinada no produto anteriormente à definição dos parâmetros de autoclavação. A termoestabilidade do conjunto SPGV envasada deve ser igualmente considerada (VESSONI PENNA et al., 2002). Os parâmetros de autoclavação são determinados em relação ao IB, à natureza da SPGV e da embalagem.

2.4.1. Fatores que determinam a estabilidade térmica do Indicador Biológico

As diferentes composições das SPGV podem influenciar a estabilidade térmica do IB: tipo de componente, a associação dos componentes da SPGV, pH, osmolaridade, condutividade, atividade de água e viscosidade. Dependendo da concentração do componente e do valor de pH final da solução, a germinação do IB é inibida após a ativação térmica durante o processo.

Estudos realizados no Laboratório de Microbiologia Industrial têm demonstrado que a adição de eletrólitos nas SPGV glicosadas aumenta a estabilidade térmica do IB formado por esporos de *Bacillus* (VESSONI PENNA et al., 2002). BERGER e NELSON (1994) verificaram que formulações com cloreto de potássio favorecem a termo-estabilidade bacteriana, comparativamente às formulações com cloreto de sódio. A definição dos parâmetros cinéticos de destruição térmica do IB em função das diversas formulações de SPGV é extremamente necessária para se atingir a otimização dos ciclos de autoclavação, conservação das características intrínsecas das SPGV, redução de custos e aumento da segurança, eficácia e qualidade do produto final.

2.5. Processos de Esterilização

Esterilização é o processo que objetiva destruir todas as formas de vida com capacidade de desenvolvimento durante os estágios de conservação e de utilização de produtos. Conservar é manter as características do produto durante a sua vida útil de armazenamento, também denominada vida de prateleira, a temperatura ambiente.

Esterilidade ou nível de segurança é a incapacidade de desenvolvimento das formas sobreviventes ao processo de esterilização, durante a conservação e utilização do produto. A manutenção do nível de esterilidade conferido ao produto garante o prolongamento da vida útil e depende das condições operacionais de pré-esterilização, de esterilização e pós-esterilização.

Os métodos de esterilização permitem assegurar níveis de esterilidade compatíveis com as características exigidas em produtos farmacêuticos, médico-hospitalares e alimentícios. O método escolhido depende da natureza e da carga microbiana inicialmente presente na matéria-prima considerada. O calor, a filtração, a radiação e o óxido de etileno são alguns agentes esterilizantes (VESSONI PENNA; MACHOSHVILI, 1997).

2.5.1. Calor úmido saturado

A destruição microbiana é função da perda da estrutura terciária das proteínas proveniente da quebra das ligações de hidrogênio responsáveis pelo rearranjo espacial da molécula proteica. Esta mudança inativa as proteínas e os sistemas enzimáticos, comprometendo as funções vitais dos microrganismos.

A destruição de esporos altamente resistentes ao calor é dependente da presença de umidade condensada para hidratação do córtex e conseqüente desnaturação de ácidos nucléicos e proteínas celulares, inibindo a germinação dos esporos (VESSONI PENNA; MACHOSHVILI, 1997). O calor úmido saturado atravessa por condução a superfície da embalagem e é transferido para a SPGV por convecção, elevando assim a temperatura do fluido, hidratando o esporo IB, e destruindo a célula germinativa.

2.5.2. Esterilização por Óxido de Etileno

O óxido de etileno, EtO, composto éter cíclico de fórmula molecular (C_2H_4O), é um gás incolor, inodoro, inflamável, explosivo e potencialmente carcinogênico.

Em mistura com gás inerte e sob determinadas condições, o óxido de etileno tem sido utilizado na esterilização de produtos médico-hospitalares e odontológicos, críticos e semi-críticos que são termossensíveis. A incorporação de EtO na concentração entre 8% e 12% ao dióxido de carbono (CO_2), nitrogênio ou aos compostos de clorofluorcarbono (CFC) minimiza os riscos de explosão do gás. Devido aos danos do CFC à camada de ozônio, em 31 de dezembro de 1995, foram proibidas a produção e utilização do CFC. Aos hospitais e estabelecimentos de esterilização são disponibilizadas misturas alternativas para uso seguro: (i) 8,5% EtO em 91,5% de CO_2 ; (ii) EtO misturado com hidrofluorcarbonos; (iii) e 100% EtO utilizado na presença de nitrogênio (NOGAROTO e VESSONI PENNA, 2006).

Nos artigos esterilizados por óxido de etileno, os limites máximos de resíduos de EtO e subprodutos varia de acordo com o material do produto e de sua aplicação e tempo de exposição final. No Brasil, a legislação (BRASIL, 1999) estabelece para materiais e correlatos variação de limites entre 5 ppm e 250 ppm para o óxido de etileno (EtO); entre 10 ppm e 250 ppm para a etilenocloridrina (EtCH) e limite máximo de 250 ppm para etilenoglicol (EtG). De acordo com a ISO 10993-7 (2005) os limites máximos permitidos dos resíduos variam entre 20 mg e 60 mg para o óxido de etileno (EtO); entre 12 ppm e 60 ppm para a etilenocloridrina (EtCH), por período de 30 dias, não sendo aplicada para etilenoglicol (EtG) (NOGAROTO; VESSONI PENNA, 2006). A atividade microbicida do EtO é considerada resultante da alquilação das proteínas, do DNA e do RNA, impedindo a multiplicação celular. Esporos de *B. atrophaeus* (BURKE et al, 2004) são selecionados como IBs inoculados nos artigos a serem submetidos ao processo.

Embora os testes microbiológicos sugiram um processo de esterilização eficiente, e, que a concentração de gás que atinge o produto é o principal fator para que a esterilização ocorra, um método preciso que quantifique a distribuição do gás pela câmara mostra-se extremamente necessário (HUCKER; MACHMERTH; KRAMER 2001).

A eficácia da esterilização por EtO depende de quatro fatores essenciais: temperatura, umidade, a concentração de gás e sua distribuição na câmara, e a relação destes fatores com o tempo de exposição.

Dentro de certos limites, o aumento na temperatura pode encurtar o tempo de processamento do material. O processo por EtO apresenta custo elevado, é lento (varia entre 48h e 72h, incluindo a etapa de aeração), potencialmente perigoso e carcinogênico para o grupo operacional. Requer ambiente isolado e aerado e proteção individual ao profissional.

A legislação brasileira orienta quanto às instalações para armazenamento e emprego do óxido de etileno, do controle de saúde do usuário e da proteção individual e coletiva durante o processo de esterilização (ISO 11138-2, 2006).

2.5.3. Pasteurização ou Higienização

O tratamento térmico de produtos por calor úmido, em temperatura inferior a 100 °C, à pressão ambiente, é uma das principais técnicas das indústrias alimentícias e farmacêuticas para a conservação de seus produtos. O tratamento visa a inibição da atividade enzimática e bacteriana evitando alteração de origem orgânica nos produtos. Várias combinações de tempo e temperatura podem ser aplicadas dependendo das propriedades dos produtos e do tempo de vida exigidos.

Uma operação utilizada freqüentemente é a pasteurização ($\text{pH} < 4,5$, $A_a > 0,90$) ou de higienização ($\text{pH} > 4,5$, $A_a > 0,90$), processo térmico criado por Pasteur em 1864. O tratamento pode ser realizado por imersão em água quente, calor seco, vapor, corrente elétrica ou radiação ionizante. Indica-se a pasteurização na conservação de produtos: (i) que constituem substratos favoráveis para microrganismos mesófilos; (ii) que têm atividade ideal na faixa de temperatura de 35 °C e não suportam calor superior a 65 °C; (iii) em líquidos (vinhos, sucos de frutas, $\text{pH} < 4,5$), pois são meios impróprios para a proliferação microbiana, sendo sujeitos à proliferação de fungos e leveduras; (iv) na higienização de fluidos previamente filtrados por filtros esterilizantes e que contém mínima carga microbiana e envasados em containers termolábeis (GAVA, 1985).

2.6. Proteína Verde Fluorescente, GFPuv

2.6.1. Bioluminescência

A bioluminescência é um fenômeno natural observado em diversas espécies de organismos marinhos e terrestres (Tabela 01). No ambiente terrestre, o vaga-lume é o representante mais conhecido. Os animais marinhos utilizam-se da bioluminescência para afastar predadores, para camuflagem mimetizando outras espécies, para atrair suas presas e seus parceiros no período reprodutivo e como fonte alternativa de energia. (BARNES, 1991).

O mecanismo químico de produção de luz por organismos marinhos difere para cada espécie. A maioria apresenta somente quimioluminescência ou bioluminescência resultante de reação química mediada por fotoproteínas. O exemplo mais bem elucidado é a reação de oxidação da luciferina a oxiluciferina catalisada pela enzima luciferase, produzindo luz. Outros mecanismos de luminescência são independentes de substrato e apresentam sistemas próprios. A fluorescência ocorre quando um elétron excitado é deslocado para uma órbita de maior energia e ao retornar para o estado de menor energia, emite um “fóton”.

Tabela 01. Exemplos de organismos bioluminescentes (CHALFIE e KAIN, 1998).

Tipo de organismo	Gênero representativo	Mecanismos/ Componentes de emissão de fluorescência	Característica/Função
Bactéria	<i>Photobacterium</i>	Flavina reduzida e aldeído da cadeia longa de luciferase	emissão constante
Dinoflagelados	<i>Noctiluca</i>	Cintilação através de organelas celulares ($\lambda=470\text{nm}$)	Brilho em flashes rápidos para afugentar predadores
cnidários medusas hidróides	<i>Aequorea</i> <i>Obelia</i>	Ca^{2+} , coelenterazina / aequorina núcleos imidazólicos-pirazínicos ($\lambda=460 - 510\text{nm}$), emissão: GFPuv	brilho em flashes rápidos para afugentar predadores. Mais estudado.
ctenóforos	<i>Beroe</i>	Ca^{2+} , coelenterazina ($\lambda=460\text{nm}$)	brilho em flashes rápidos para afugentar predadores
crustáceos	<i>Cypridina</i>	núcleos imidazólicos-pirazínicos ($\lambda=465\text{nm}$)	liberar enzimas em substratos
Insetos, vaga-lume	<i>Photinus</i> , <i>Photuris</i>	núcleo benzotiazólico, ATP, Mg^{2+} ($\lambda=550-580\text{nm}$)	Flashes, afastar predadores, acasalamento

2.6.2. *Aequorea victoria*

A *Aequorea victoria* é um cnidário de corpo totalmente transparente em forma de guarda-chuva, com diâmetro entre 7 e 10 cm que apresenta grânulos bioluminescentes ao redor de seu corpo, formando um círculo.

Figura 01 *Aequorea victoria*

www.gurdon.cam.ac.uk/~pineslab/Projects/gfp.htm

Em 1961, foi observado que o extrato destes grânulos apresentava luminescência azul, o qual foi denominado extrato de aequorina, diferentemente da bioluminescência observada no organismo vivo.

Experimentos realizados com a medusa *A. victoria* mostraram que quando imersa em solução de cloreto de potássio emitia luz verde e quando mergulhada em água destilada emitia luz verde mais tênue que aos poucos se transformava em azul, provavelmente devido à lise celular (CHALFIE e KAIN, 1998).

Argumentou-se que se tratava de dois tipos diferentes de substâncias luminescentes: a aequorina, uma fotoproteína dependente de Ca^{2+} que produz luz azul (emissão em $\lambda = 460\text{nm}$) e a proteína verde fluorescente, GFP, que produz luz verde (emissão em $\lambda = 488\text{nm}$) quando excitadas por luz ultravioleta. Consiste de sistema acoplado onde a luz azul emitida pela fotoproteína aequorina dependente de cálcio é transferida para a GFP, que emite luz verde ao ser excitada diretamente por radiação exógena. (WARD et al., 1980, ZIMMER, 2002).

Biologicamente, a GFP atua na mudança da cor da bioluminescência de azul para verde nos celenterados luminosos e para intensificar o fóton de emissão de luz. Todos os celenterados utilizam a mesma luciferina nas reações bioluminescentes, produzindo uma proteína ligada, a oxiluciferina que emite luz azul na ausência da GFP. Entretanto, na presença da GFP, a luz emitida é verde, sendo idêntica quanto às propriedades espectrais de emissão fluorescente do espectro da GFP quando excitada diretamente por radiação exógena.

2.6.3. Proteína Verde Fluorescente selvagem (GFP) e recombinante (GFPuv)

A GFP da *A. victoria* ou GFP selvagem é uma proteína globular que contém na sua estrutura primária 238 aminoácidos, sendo um monômero de peso molecular de 27 kDa (CODY et al., 1993).

Segundo Yang, Moss e Philips (1996), a estrutura cristalina da GFPuv é o conjunto de dois monômeros dispostos em 11 fitas formados por β -folha pregueada externamente em forma de barril ou cilindro, o qual abriga em seu centro geométrico o grupo fluoróforo que permanece ligado ao cilindro por α -hélices, denominada de β -can. A GFPuv não se apresenta obrigatoriamente na forma de dímero (ZIMMER, 2002). A estrutura tridimensional em forma de cilindro apresenta diâmetro de 24 Å por 42 Å de altura (Figura 02), e é apontada como a responsável pela estabilidade da proteína (ZIMMER, 2002). O grupo fluoróforo da GFP selvagem é formado por três aminoácidos: Serina, Tirosina e Glicina (Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷).

Figura 02. Estrutura barril β -can da GFPuv

(<http://www-bioc.rice.edu/Bioch/Phillips/Papers/gfpbio.html>)

Heim, Cubitt e Tsien (1995) observaram que a GFP nascente não apresentava fluorescência, mas que a formação do grupo fluoróforo ocorria somente após algumas horas. O grupo fluoróforo forma-se sem o uso de co-fatores, além do oxigênio, através de uma reação de ciclização autocatalítica entre a carbonila da Tyr⁶⁶ e o grupo amino da Gly⁶⁷, e da carbonila da Ser⁶⁵ e o grupo amino da Tyr⁶⁶ formando uma ligação covalente e uma etapa lenta dependente de oxigênio onde a ligação simples entre os carbonos C α - C β da Tyr⁶⁶, é oxidada à dupla ligação. (HEIM; CUBITT; TSIEN, 1995; ZIMMER, 2002) O resultado é a formação de duplas conjugadas nesta estrutura que tem propriedades fluorescente estável (figura 03).

Figura 03: Reação de ciclização autocatalítica e oxidação para formação do grupo fluoróforo (PALM; WLODAWER, 1999)

Dentre as variantes da GFP utilizadas como ferramenta de estudo da expressão gênica, está a GFPuv, variante que emite fluorescência 18 vezes mais intensa do que a GFP selvagem (CRAMERI et al., 1996).

A proteína verde fluorescente recombinante, GFPuv, emite máxima fluorescência quando excitada por luz ultravioleta (360-400nm)., sendo largamente utilizada em estudos de expressão gênica por ser facilmente visualizada sob luz UV.

A GFPuv foi recombinada através de técnicas sofisticadas de mutações pontiforme no DNA da GFP *in vitro*, resultando na substituição de três aminoácidos (Phe⁹⁹ por Ser, Met¹⁵³ por Thr e Val¹⁶³ por Ala) da GFP selvagem, resultando na GFPuv. Geralmente, mutações interferem nos picos de absorção e emissão das variantes da GFP, exceto GFPuv que mantém o comprimento de onda de emissão em 509nm (CRAMERI et al., 1996).

A GFP selvagem emite luz azul com um pico máximo a 395 nm e com menor pico a 470 nm, emitindo luz verde com pico máximo de emissão a 509 nm e espalhamento em 540 nm.

Tabela 02. Propriedades físicas da GFP selvagem

Característica	Valor
Massa Molar do monômero	27kDa
Ponto Isoelétrico	4.6 - 5.1
Emissão máxima de fluorescência	509nm
Rendimento quântico da fluorescência	0.80
Proporção de absorção 397nm/380nm	1.25

A GFP selvagem expressa em *E. coli* apresentou-se insolúvel, pouco fluorescente e precipitou no citoplasma. (WARD et al., 1980). A GFPuv expressa nas mesmas condições, apresentou-se solúvel e com fluorescência intensa, porém mais citotóxica e com maior possibilidade de dimerizar. A proporção das formas monoméricas ou diméricas depende da concentração da proteína no meio. A GFPuv é fluorescente em ambas formas, mas ocorre diminuição da absorção a 470 nm e aumento da absorção em 395 nm quando dimerizada (entre 5 e 10 mg/mL) (CRAMERI et al., 1996).

O tempo de formação do fluoróforo mostrou-se de 2 a 3 vezes mais lento quando comparado ao tempo de formação do fluoróforo da GFP selvagem expressa pelo mesmo microrganismo (CRAMERI et al., 1996).

A GFP selvagem é resistente a temperaturas inferiores a 70°C, pH alcalino (inferior a 12), detergentes, solventes orgânicos e algumas proteases (ROBART; WARD, 1990). Alguma fluorescência foi observada quando nanogramas da proteína

nativa foi aplicada em 1% dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida (INOUE; TSUJI, 1994). A GFPuv apresentou resistência a temperaturas $> 70^{\circ}\text{C}$, em pH 6,0 – 9,0 (ISHII, 2003).

2.6.4. Aplicações da Proteína Verde Fluorescente e variantes

A GFPuv tem sido utilizada para investigar questões fundamentais em biologia molecular, biotecnologia, neurobiologia, citometria, bioquímica, biofísica, genética e ecologia. Isto é possível, pois a GFPuv é espécie independente e pode ser inserida em diversos hospedeiros de filos diferentes: bactérias (CHALFIE et al., 1994), leveduras (KAHANA; SCHNAPP; SILVER, 1995), plantas, drosófilas (WANG; HAZELRIGG, 1994), peixes (AMSTERDAM; LIN; HOPKINS, 1996) e em células de mamíferos.

A GFPuv pode ser utilizada para diversas finalidades, dentre elas: (i) diferenciar culturas mistas; (ii) monitorar a expressão gênica frente a múltiplos promotores em células, tecidos e organismos; (iii) observar a permeabilização da membrana; (iv) localizar e/ou analisar em tempo real interação proteína-proteína; (v) visualizar o transporte e a função de organelas intracelulares e também a estrutura do citoesqueleto e (vi) separar culturas mistas em células que expressam diferentes variantes de GFP utilizando FACS “cell sorter” (CHALFIE E KAIN, 1998).

A GFPuv não requer cofatores, catalisadores ou substratos para sua atividade (CHALFIE et al., 1994). Pode ser expressa com funcionalidade em diversas espécies bacterianas.

A temperatura de incubação do microrganismo pode afetar a fluorescência e a formação do grupo fluoróforo parece ocorrer no terço final da fase logarítmica do crescimento bacteriano. A formação do fluoróforo ocorre aproximadamente duas horas após a síntese proteica.

A GFPuv pode ser inserida com sucesso em bactérias esporuladas e continuar expressando a fluorescência nas células das gerações seguintes, sendo uma importante ferramenta para indicador biológico revelando sobreviventes em processos de esterilização.

O gene que expressa a GFPuv pode ser clonado com um gene que expressa outra proteína, por apresentar semelhanças estruturais com o N- ou C-terminal, mantendo a expressão e a atividade de ambas proteínas (STEARNS, 1995).

Wang e Hazelrigg (1994) relataram que a *GFP* selvagem clonada com proteínas de ensaios imunológicos, podem aumentar a sensibilidade e a resolução das colorações utilizadas em técnicas padrões para anticorpos e também eliminar as etapas de fixação, permeabilização celular e incubação do anticorpo se for utilizado um anticorpo fluorescente.

A GFPuv clonada permite estudos da cinética molecular em células vivas, localização de proteínas utilizando a GFPuv como marcador luminoso (FLACH *et al.*, 1994).

Webb et al. (1995) realizaram estudos da formação do endósporo em *Bacillus subtilis*, fundindo a GFPuv com a proteína CotE. Estudo semelhante foi realizado por Lewis e Errington (1996) que fundiram a GFPuv com a proteína DacF e SpoIVA do *B. subtilis* para detectar o gene de expressão célula-específica e sua localização subcelular durante a esporulação.

Flach et al. (1994) visualizaram o movimento de ida e volta do RNA transportador entre o núcleo e o citoplasma utilizando a proteína histona fluorescente no núcleo de leveduras.

Kaether e Gerdes (1995) visualizaram o transporte de proteínas ao longo de membranas secretoras utilizando a proteína verde fluorescente.

Shiga, Tanaka e Hayashi (1996) estudaram a morfogênese das células de drosófilas utilizando como ferramenta uma β -galactosidase fluorescente nuclear.

Heinlein et al. (1995) relataram a interação do tobamovírus com o citoesqueleto do pé-de-tabaco através da fluorescência dos microfilamentos.

Sullivan, Hahn e Shelby (1995) observaram a sequência *in vivo* de formação do centrômero no DNA humano marcado com EGFP (Enhanced GFP), em células humanas.

A GFPuv apresenta uma grande vantagem como indicador biológico em relação ao método de quantificação. A análise quantitativa da fluorescência remanescente das amostras submetidas aos processos de desinfecção pode ser

determinada por espectrofotometria de fluorescência, tornando o método rápido e preciso. A análise qualitativa pode ser determinada por microscopia de fluorescência.

Conhecer as propriedades físico-químicas da GFPuv, sua estabilidade térmica e resistência são as primeiras etapas para o desenvolvimento de um Indicador Biológico.

2.7. Estabilidade de Proteínas

A estabilidade de uma proteína refere-se a manutenção de sua integridade estrutural e função biológica na presença de mudanças nas condições ambientes, como por exemplo, o valor de pH, temperatura ou a adição de outros agentes, como solventes orgânicos, sais, e polímeros inertes (FAGAÍN, 1995).

Entre as propriedades funcionais das proteínas, a solubilidade tem maior importância devido a sua influência significativa sobre as outras propriedades. A solubilidade é resultado da superfície das proteínas quando imersas em um solvente, e que pode ser afetada pela forma e tamanho da proteína, da viscosidade e agregação das partículas imersas no meio. Pode ser relacionada às interações de superfícies hidrofóbicas (proteína - proteína) e hidrofílicas (proteína -solvente) com a água. A proporção relativa da superfície dos grupos hidrofóbicos e hidrofílicos estabelece o grau de solvatação da água.

A solubilidade das proteínas aumenta com o número de grupos hidrofílicos presentes, que pode ser realizado pela adição de resíduos de aminoácidos hidrofílicos, de grupos glicol ou fosfato.

A solubilidade de uma proteína sob condições definidas foi reconhecida como limitação crucial no seu uso como substância de referência biológica na composição de um fármaco ou alimento ou como indicador biológico que sinalize uma mudança ambiental (MIDDAUGH; VOLKIN, 1992).

Carboidratos como a sacarose, a glicose, a manose e a trealose bem como os álcoois polihídricos (glicerol, sorbitol e manitol) têm sido frequentemente utilizados para aumentar a solubilidade das proteínas (ARAKAWA; TIMASHEFF, 1982). Este efeito é, provavelmente, mediado pela combinação dos mecanismos de hidratação preferencial e o aumento da tensão superficial do solvente, bem como as fracas

interações com a superfície da proteína (BOLEN, 2004, COLLINS, 2004, BOSTÖM et al., 2005).

Em solução, as cadeias laterais dos aminoácidos são envolvidas por diferentes interações: forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Em geral, para minimizar termodinamicamente a energia livre de estabilização, os resíduos hidrofílicos dos aminoácidos são orientados para a parte externa da molécula e os resíduos hidrofóbicos dos aminoácidos são orientados para o interior da molécula. Assim, a proporção e a distribuição das partes hidrofóbicas da superfície são os principais fatores na determinação do grau de solubilidade da proteína, sobressaindo a hidrofobicidade total e a densidade de carga baseada na composição de aminoácidos.

As características de superfície de uma proteína são extremamente influenciadas pelas condições ambientais do meio em que se insere, tais como o pH, a força iônica, a temperatura, componentes do solvente e outros componentes (VOJDANI, 1996, KAUSHIK; BHAT, 1999).

Osmólitos são solutos orgânicos tais como açúcares, metilaminas e aminoácidos que se acumulam nos organismos quando estes são submetidos a situações de estresse, e, são conhecidos por inibir mudanças conformacionais em larga escala e estão associadas à desnaturação de proteínas. Estabilizam o estado nativo porque são excluídos preferencialmente da superfície da proteína. A exclusão preferencial aumenta o potencial químico da proteína, em proporção a seu solvente - área de superfície exposta, favorecendo um estado nativo mais compacto (KULMYRZAEV; BRYANT; McCLEMENTS, 2000). Osmólitos não tem carga e afetam a viscosidade do solvente e a tensão de superfície (FÁGÁIN, 1995).

Os álcoois polihídricos e os açúcares têm sido utilizados muitos anos como agentes estabilizadores para a manutenção da atividade biológica de macromoléculas (ARAKAWA E TIMASHEFF, 1982), Lee e Timasheff (1981) analisaram termodinamicamente os sistemas aquosos de sacarose e verificaram que o efeito estabilizante da sacarose na hidratação preferencial das proteínas neste meio e que isto, por sua vez, pode ser relacionado ao aumento da energia livre da formação da cavidade induzida pela adição da sacarose na água.

As interações de proteínas com (i) outras moléculas; (ii) com moléculas de água (iii) com íons dissolvidos; (iv) com outros componentes do sistema de altos e baixos pesos moleculares (alimentos, soluções parenterais, soluções de nutrição gastroentérica (SEMENOVA; ANTIPOVA e BELYAKOVA, 2002)) formam base para estabelecer suas propriedades como a estabilidade a temperatura ambiente (25 °C) e a reologia dos produtos, como por exemplo, soluções parenterais.

Em sistemas de nutrição, as proteínas são dispersas em uma fase aquosa que contém uma variedade de co-solventes que podem alterar a conformação e as interações das proteínas e, conseqüentemente, suas propriedades funcionais com uma variedade de mecanismos físico-químicos diferentes. Co-solventes podem influenciar diretamente nas características moleculares e funcionais da proteína ligando-se aos grupos na superfície da proteína, ou indiretamente alterando a estrutura e as propriedades físico-químicas da água. A natureza das interações e sua influência nas funções da proteína dependem do tipo e da concentração dos co-solventes presentes.

As Soluções Parenterais são componentes nutritivos e estruturais de sistemas multicomponentes, geralmente complexos para cuidados à saúde. A expressão destes atributos funcionais em um produto depende da estrutura molecular, do ambiente químico e do comportamento da proteína frente a tratamento térmico.

A otimização do processo e das operações utilizadas na manufatura de alimentos e fármacos, depende de maior compreensão da influência das condições de processamento, da composição do material nas propriedades da proteína. A compreensão das bases moleculares das funções das proteínas sob uma variedade de condições é desafiante, devido a complexidade da composição, da estrutura e da dinâmica de fármacos e produtos alimentícios do meio e por causa do estresse físico e mecânico que o material sofre durante as etapas de processamento, armazenamento e consumo. (BAIER; McCLEMENTS, 2001). Os atributos funcionais de um determinado produto após processamento, podem ser monitorados utilizando-se da estrutura, ambiente e histórico de estabilidade térmica estabelecidos para um indicador biológico específico.

Há numerosos relatos a respeito de contaminação e/ou sobrevivência de microrganismos em soluções parenterais de glicose (HUGBO et al, 1998). As injeções de glicose a cinco por cento são as mais utilizadas por via intravena, na

nutrição e na reposição de fluidos. A faixa de pH de uma solução de glicose 5% pode variar entre 3,5 e 6,5. Esta variação nos valores de pH é devido à presença de ácidos livres do açúcar, e formados durante a esterilização e o armazenamento da solução (TURCO, 2000).

Para garantir a esterilidade de Soluções Parenterais de Grande Volume, incluindo as soluções de glicose, faz-se necessário o desenvolvimento de um indicador biológico, que apresente respostas rápidas e seguras sobre a eficiência do processo de autoclavação. Desde que o objetivo da esterilização é apresentar um produto livre de microrganismos viáveis (ISO 14937, 2000), o indicador biológico ideal para provar a eficácia do processo é uma forma resistente de microrganismos ou proteínas, com população ou concentração conhecida, ao processo de esterilização (AVIS E LEVCHUCK, 2000). Esporos de *Bacillus atrophaeus* e de *Geobacillus stearothermophilus* são escolhidos como indicadores biológicos para monitorar os processos de esterilização por calor úmido a temperaturas de 104 °C e 121 °C, respectivamente (USP 29, 2006, ISO 11138-1, ISO 11138-2, 2006).

Sendo a GFPuv um sistema marcador atrativo para monitorar células bacterianas no ambiente e sua detecção não requer nenhum substrato exógeno, meio complexo ou série de equipamentos (ERRAMPALI et al., 1999), ela pode ser utilizada como indicador biológico sensível, de fácil detecção e quantificação, assegurando a eficiência do processo da esterilização, em alternativa aos esporos de *Bacillus* tradicionalmente utilizados.

2.8. Energia livre de Gibbs (ΔG), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS)

A desestabilização ou desnaturação da proteína pode ser expressa como uma simples reação de equilíbrio entre o estado nativo (N) e o estado desnaturado (ou desestabilizado, D); o qual expressa o deslocamento de equilíbrio para a forma nativa ou estável da proteína pela adição de co-solvente (S) (MIDDAUGH; VOLKIN, 1992).

Por definição, a constante de equilíbrio (K) desta reação é função da concentração do estabilizante, representada por $K(S) = [D]/[N]$, onde, alterando a concentração do co-solvente (S), a mudança na constante de equilíbrio é dada pela

diferença no número de moléculas do co-solvente ligadas pelas moléculas desnaturadas da proteína (D) e nativas (N). Com a estabilização, a reação é deslocada para a forma nativa (N), de modo que a constante de equilíbrio diminui com o aumento da concentração do co-solvente. Ou seja, há um menor número de ligações do co-solvente (S) à forma desnaturada (D) da proteína do que ao estado nativo (N). Ocorre um excesso de água ao redor da proteína, tornando-a preferencialmente hidratada ou seja, ocorre a exclusão preferencial do ligante pelo domínio da proteína. O fenômeno de exclusão é uma migração das moléculas de solvente de regiões de ligação da superfície da proteína para o solvente, deixando uma camada enriquecida com água.

A maneira mais conveniente de discutir as propriedades da solução de uma substância, i , é em termos do potencial químico (μ). O potencial químico ou a energia molar-livre parcial pode ser definido como a quantidade que descreve a maneira na qual a energia livre de um sistema aberto é alterada quando o número de moles de i (n_i) muda a temperatura (T) e pressão (P) constantes (MIDDAUGH; VOLKIN, 1992).

Glicerol, sacarose e alguns sais podem ser utilizados na preservação da estrutura da proteína e na estabilização da atividade biológica quando adicionados em concentrações elevadas (> 1 M), tais como as soluções de glicose em concentrações $> 15\%$ (0,83 M).

Co-solventes em altas concentrações são conhecidos por estabilizar a estrutura nativa das proteínas, e são excluídos da proteína. Considerando que as interações com proteínas são determinadas estritamente pelas propriedades do solvente, é por isso que as proteínas são consideradas inertes. O mecanismo é baseado na perturbação da energia livre de superfície (tensão de superfície) da água pelo co-solvente (zona da exclusão). Desde que a superfície do contato entre a proteína e o solvente constitui uma interface, deve haver nesta superfície uma tensão (de superfície) interfacial.

Aditivos perturbam a força de coesão da água e dessa forma sua tensão de superfície. Assim como mostrado pela isoterma de adsorção de Gibbs, estes resultados estão com excesso ou com deficiência de aditivo na camada de superfície. Está claro que se uma substância aumenta a tensão de superfície da água, seu excesso

na camada de superfície será negativo; isto é, será excluído preferencialmente da superfície. Este mecanismo parece ser o mecanismo mais difundido na estabilização de proteína em sistemas com solventes. O mecanismo não é determinado por interações químicas entre os componentes dos solventes e a estrutura da proteína; é um mecanismo no qual as interações com proteínas são determinadas estritamente pelas propriedades do solvente; isto é, as proteínas são basicamente inertes.

A superfície de uma proteína globular em pH neutro pode ser considerada como um mosaico de cargas e a densidade da carga pode ser elevada mesmo que a carga líquida possa ser próxima a zero. O efeito é um balanço entre os dois tipos de interações, com a exclusão preferencial geralmente predominando. O efeito entre co-solventes estabilizando-se e proteínas globulares nativas é uma das exclusões preferenciais. Isto não significa que as moléculas de co-solvente são excluídas totalmente do contato com as proteínas. Elas podem penetrar na zona de hidratação preferencial e ligar-se às proteínas em sítios específicos. A observação líquida é o balanço entre a ligação e a exclusão, a qual, para a estabilização, favorece a exclusão. Conseqüentemente, quando as interações são definidas pelas propriedades do sistema do solvente, a proteína sendo essencialmente um componente inerte, a extensão da exclusão deve ser determinada pelo contato de superfície com o solvente. Esta superfície aumenta sobre a desnaturação, então, a exclusão preferencial deve aumentar. Isto conduz à estabilização da estrutura da proteína. É aceito que a exclusão preferencial do co-solvente varia aproximadamente com a superfície total de contato com a proteína, então a exclusão preferencial da forma denaturada (D) deve ser maior do que na forma nativa (N); assim, o equilíbrio deve se deslocar à forma nativa, isto é, a proteína é estabilizada na forma nativa (N) (TIMASHEFF, 1992).

A solubilidade das proteínas (utilizada como parâmetro de um efeito físico ou químico em um sistema complexo onde a estabilidade máxima é requerida) é determinada na água livre de sais ou na água que contém um sal específico em valor de pH constante (mantido por um tampão) e força iônica.

A escolha de um tampão tem muitas implicações importantes além da criação de um ambiente estável de pH. Assim, a menor concentração possível de tampão requerida para manter o valor de pH é usada para minimizar o efeito não-específico

da força iônica. Na maioria dos casos onde a proteína é facilmente dissolvida, uma concentração de tampão de 20 - 100 mM é utilizada dependendo da faixa de pH (VODJANI, 1996). Neste estudo, as concentrações das soluções tampão de 10 mM são usadas para estabilizar o pH das soluções parenterais avaliadas.

3. OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho é avaliar a potencialidade da aplicação da Proteína Verde Fluorescente recombinante, GFPuv, como indicador biológico em processos térmicos. Desenvolver um Indicador Biológico eficiente de monitoramento de processos de autoclavação de soluções parenterais e de esterilização por óxido de etileno. A característica de emissão de fluorescência pela GFPuv torna ágil e fácil a detecção da sua presença, otimizando o período de confirmação da eficácia do processo.

No desenvolvimento da GFPuv como Indicador Biológico, avaliou-se a estabilidade e resistência térmica da proteína, em diversas condições ambientes de forma a garantir a estabilidade, a integridade e a viabilidade do Indicador Biológico proposto, descrito em etapas:

1. Determinação dos parâmetros de estabilidade térmica, a 25 °C, da proteína GFPuv extraída de células competentes de *E. coli DH5-α*, isolada e purificada em laboratório em soluções de 1,5% a 50% de glicose a 25 °C;
2. Determinação dos parâmetros cinéticos de resistência térmica, no intervalo entre 80 °C e 95°C , da GFPuv em soluções de 1,5% a 50% de glicose a 25 °C;
3. Determinação dos parâmetros cinéticos de estabilidade, 25 °C, e resistência térmica, no intervalo entre 80 °C e 95°C , da GFPuv em solução fisiológica e glicofisiológica;
4. Determinação dos parâmetros cinéticos de estabilidade, 25 °C, e resistência térmica, no intervalo entre 80 °C e 95 °C, da GFPuv em solução de 0.9% a 30% de cloreto de sódio;
5. Avaliar a aplicação da GFPuv como indicador biológico em processos de esterilização por gás óxido de etileno;
6. Avaliar a aplicação da GFPuv como indicador biológico em processos de esterilização por calor úmido e comparar o Indicador Biológico proposto, GFPuv, com esporos de *Bacillus atrophaeus*, convencionalmente utilizados na autoclavação de soluções parenterais.

4. MATERIAL, MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Etapa I

Obtenção da Proteína Verde Fluorescente

Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Estabilidade a 25 °C (*)

* **Artigo Publicado:** VESSONI PENNA, T.C., ISHII, M., KUNIMURA, J.S., CHOLEWA, O., Stability of recombinant Green Fluorescent Protein (GFPuv) in glucose solutions at different concentrations and pH values, *Appl Biochem Biotechnol.*, v. 121-124, p.501-528, 2005.

I.1. Objetivo

Esta etapa compreendeu a obtenção da Proteína Verde Fluorescente, GFPuv, e a avaliação da Estabilidade da GFPuv em Solução Parenteral de Glicose a temperatura de 25 °C.

I.2. Material e Métodos

I.2.1. Obtenção da Proteína Verde Fluorescente recombinante (GFPuv)

I.2.1.1. Transformação de células de *E. coli*

A expressão de genes clonados em células de *E. coli* para produção de proteínas recombinantes é bastante difundida por proporcionar um sistema viável para avaliação da estrutura e função de proteínas (BASS; YANG, 1997), por ser um dos microrganismos mais estudados até hoje, ter seu mapa cromossômico definido e bem caracterizado. As células hospedeiras de *E. coli* cepa DH5- α tornam-se facilmente competentes para incorporação de plasmídeos. Muitos autores utilizaram a *Escherichia coli* como célula hospedeira para produção de mutantes da proteína verde fluorescente (HEIM *et al*, 1996).

Células de *Escherichia coli* DH5- α foram utilizadas para expressão da Proteína Verde Fluorescente, GFPuv. As células foram transformadas com o plasmídeo pGFP (Clontech, Palo Alto, CA, Estados Unidos), de acordo com o protocolo do manual de biologia molecular (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), através do método de cloreto de cálcio, já realizado pelo grupo de pesquisa anteriormente (VESSONI PENNA; ISHII, 2002, VESSONI PENNA *et al.*, 2002, 2004).

I.2.1.2. Expressão da proteína verde fluorescente (GFPuv)

As células transformadas de *E.coli* DH5- α , expressando a GFPuv, foram conservadas em meio de cultivo Luria Bertani (LB, Merck, Darmstadt, Alemanha) /

ampicilina (1 mM), adicionadas de glicerol (1:1) a temperatura de (-75°C) (Ultra Freezer, Series 100, Kelvinator, Estados Unidos). Colônias isoladas de *E.coli* transformadas desenvolveram-se na superfície de placas contendo LB ágar/ampicilina (1 mM) acrescidas de IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo, dioxane free, USB, Itália, Ohio) em concentração final de 100 mM, depois de incubadas a temperatura de 37°C por 24 horas.

Uma colônia foi isolada e transferida para erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de meio LB caldo/1 mM ampicilina (solução mãe). O conjunto foi incubado em shaker (Tecnal modelo TE-240, São Paulo, SP, Brasil) a $37^{\circ}\text{C}/100\text{ rpm}$ até atingir densidade ótica, $\text{DO}_{660\text{nm}} = 0,1$ (Espectrofotômetro Beckman DU-600, Hayward, CA, Estados Unidos). Transferiu-se 1 mL deste inoculo para 25 mL de LB/ampicilina (erlenmeyer 250 mL) e incubou-se o conjunto em shaker (Tecnal modelo TE-240, São Paulo, SP, Brasil) a $100\text{ rpm} / 37^{\circ}\text{C} / 24\text{ h}$. Adicionou-se IPTG quando a densidade ótica atingiu $\text{DO}_{660\text{nm}}=0,01$.

O crescimento bacteriano foi monitorado por densidade ótica a 660nm e a contagem padrão de células realizada em placas de Petri contendo LB ágar/ampicilina/IPTG após semeadura por profundidade a $37^{\circ}\text{C} / 24\text{ h}$ e expressa em unidades formadoras de colônias (UFC/ mL). Armazenou-se a cultura a $4^{\circ}\text{C} / 24\text{ h}$.

I.2.1.3. Extração da GFPuv pelo método de Partição em Três Fases (*Three Phases Partitioning ou TPP*)

O cultivo celular foi centrifugado a $4000\text{ rpm} / 30\text{ min} / 4^{\circ}\text{C}$ (Centrífuga Jouan, modelo BR4i, França). Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso (*pellet*) em 1 mL de tampão de extração (pH 8,0): Tris-EDTA 25 mM; 1 mM β -mercaptoetanol; e 0,1 mM PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride, USB/Cleveland, Ohio, Estados Unidos), e homogeneizado em vortex. Adicionou-se 4 mL de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 M e 7 mL de t-butanol (álcool butílico terciário, Reagen, São Paulo, SP, Brasil) a alíquotas de 3 mL da suspensão de células em tubos de centrífuga de 15 mL e agitou-se por 8 minutos em vortex. Centrifugou-se a $4000\text{ rpm} / 10\text{ min} / 25^{\circ}\text{C}$. Descartou-se o sobrenadante e a fase intermediária formada por um disco branco de restos celulares. Adicionou-se 7 mL de t-butanol à

fase inferior $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{GFPuv}]$ e agitou-se por 8 minutos em vortex. Centrifugou-se a 4000rpm / 10 min/ 25 °C. Desprezou-se a fase superior de t-butanol e o disco fluorescente (GFPuv) formado foi dissolvido em 1 mL de tampão de extração (VESSONI PENNA; ISHII, 2002).

I.2.1.4. Purificação da GFPuv

Alíquota da proteína extraída das células de *E. coli* foi adicionada a igual volume de solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 M e transferida para o topo de uma coluna cromatográfica de interação hidrofóbica de resina butil (Amersham Biosciences, Uppsala, Suíça) acoplada a uma bomba peristáltica (modelo P1, Amersham Biosciences, Uppsala, Suíça) para purificação final. A coluna foi previamente equilibrada com 40 mL de solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 M e após adsorção da GFPuv, a coluna foi “lavada” com 20 mL de solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,3 M para eluição das proteínas fracamente ligadas à resina. A GFPuv foi eluída em 50 mL de solução tampão de Tris-EDTA 10 mM, pH 8,0, e armazenada a 4°C.

I.2.1.5. Quantificação da GFP

Quantificou-se a concentração e intensidade de fluorescência da GFPuv através de fluorímetro (RF-5301, Shimadzu, Kioto, Japão) aos comprimentos de onda de excitação $\lambda = 394$ nm e de emissão, $\lambda = 509$ nm, baseando-se na curva padrão, preparada com GFPuv padrão (Clontech, Palo Alto, CA, Estados Unidos).

I. 2.2. Soluções Parenterais

As soluções parenterais foram preparadas em água para injeção, e soluções tampão (10 mM): acetato pH 5,0, fosfato pH 6,0 e 7,0 e Tris-EDTA pH 8,0 (anexo 1).

A água utilizada foi obtida através do sistema de abastecimento de água acoplado a sistema de purificação com filtração por membrana de poro 0,22 μm ,

(Bio-RIOS, Millipore®, São Paulo, Brasil), fornecendo água de qualidade para injeção, *water for injection* ou WFI.

As Soluções de Glicose foram preparadas nas concentrações de 1,5%, 5,0%, 7,0%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% e 50% (m/v); as soluções de cloreto de sódio (Etapa IV) em concentrações entre 0,9% e 30% (m/v) e a solução glicofisiológica na concentração de 0,9% (m/v) de cloreto de sódio, adicionadas de 5% (m/v) de glicose (Etapa III).

Cada peso definido de solutos foi dissolvido em volume de solução-tampão (10 mM, acetato pH 5,0, fosfato pH 6,0 e 7,0 e tris-EDTA, pH 8,0) ou em água para injeção com auxílio de barra magnética. Após completa dissolução, a solução foi transferida para balão volumétrico (250 mL) e o volume final ajustado. A solução foi filtrada em Sistema Millipore® (membrana de poro 0,22 µm) acoplado a uma bomba de vácuo (Fabbe Primar, São Paulo SP, Brasil) em fluxo laminar (classe 100) e transferida para frasco estéril.

Determinou-se o pH das soluções logo após o preparo e 24 horas depois. Para monitorar possíveis contaminações, 1mL das soluções filtradas foi distribuído em placas de Petri com *Plate Count Ágar* (PCA) e incubadas a 35 °C por 24 horas. As soluções foram armazenadas à temperatura de 4 °C até o momento de uso.

A determinação das propriedades físicas (pH, condutividade, viscosidade, densidade e osmolaridade) das soluções de glicose foi realizada de acordo com metodologia descrita no Anexo 02.

I. 2.3. Estabilidade Térmica da GFPuv

I.2.3.1. Estabilidade da GFPuv a temperatura de 25 °C

A cada alíquota de 4900 µL da solução parenteral em solução-tampão ou água para injeção, 100 µL da GFPuv extraída por método de Partição em Três Fases, TPP, em concentração inicial de cerca de 400µg GFPuv/mL, e previamente purificada por coluna de interação hidrofóbica de resina butil HiPrep 16/10 Butyl FF (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) foi adicionada e homogeneizada, resultando em concentração final de cerca de 8 µg GFPuv/mL. A intensidade de

fluorescência da GFPuv foi medida no momento de preparo da amostra a ser tratada e 24 horas após. As alíquotas permaneceram armazenadas a 4 °C até a leitura seguinte.

Alíquotas de GFPuv extraída e purificada foram diluídas em soluções de glicose de diferentes concentrações nas soluções tampão (10 mM): (i) acetato, pH 5,0; (ii) fosfato, pH 6,0 e 7,0 e (iii) Tris-EDTA, pH 8,0.

Alíquota de 2 mL de GFPuv em solução de glicose foi transferida para cubeta de quartzo (caminho ótico, 1cm) e esta recoberta com *parafilme* para evitar possível evaporação. A cubeta foi inserida no respectivo compartimento e o tratamento térmico iniciado nos comprimentos de onda de 394 nm e de 509 nm para a excitação e emissão da fluorescência, respectivamente. Os dados de intensidade de fluorescência foram coletados em intervalos de tempo de 1 minuto, durante período de 3 horas.

O fluorímetro é conectado a um banho de água (modelo Thermo – bath TB 85, Shimadzu, Kioto, Japão)), (Figura 04) o qual permite circulação de água a temperatura constante, com auxílio de bomba, tornando o tratamento térmico homogêneo, e que foi mantido a 25 ($\pm 0,05$) °C.

Figura 04. Fluorímetro acoplado ao banho de água utilizado na quantificação da GFPuv

I.2.4. Análise de Dados

I.2.4.1. Parâmetros cinéticos de Estabilidade Térmica da GFPuv em diferentes composições de soluções e valores de pH (VESSONI PENNA; MACHOSHVILI, 1997).

I.2.4.1.1. Tempo de Redução decimal (Valor D) e Taxa constante de inativação (valor k)

A estabilidade da GFP foi avaliada através da determinação do parâmetro de resistência térmica, a taxa constante de inativação (k) e o tempo de redução decimal, valor D.

O tempo de redução decimal, valor D é o intervalo de tempo requerido para a redução de um ciclo logarítmico decimal da intensidade de fluorescência inicial da GFP ou 90% da intensidade de fluorescência inicial da GFP a temperatura de referência (T_R) constante.

A inativação de concentração conhecida de proteínas é considerada de primeira ordem. O fenômeno de inativação térmica pode ser representado pelo modelo de curva linearizada, semi-logarítmica de concentração de proteínas não desnaturadas. A representação gráfica do logaritmo decimal da intensidade de fluorescência residual de proteína em relação ao tempo de exposição à temperatura constante, pode ser exemplificada pelo esquema abaixo (Figura 05):

Figura 05. Esquema de cálculo para a determinação do valor D.

O valor D_{TR} foi calculado pelo inverso negativo do coeficiente angular da reta resultante da regressão linear aplicado à região linear da curva de decaimento, podendo ser representado pela equação:

$$tg \alpha = \frac{\text{Log}_{10} I_f - \text{Log}_{10} I_0}{T_2 - T_1} = -\left(\frac{k}{2,303}\right) * t \quad \text{ou} \quad (1)$$

$$\log_{10} I_f = \log_{10} I_0 - \left(\frac{k}{2,303}\right) * t$$

O valor D relaciona-se com a constante específica de reação através da relação:

$$\text{Valor } D = \frac{2,303}{k},$$

portanto, a equação (1) pode ser igualmente representada por

$$\log_{10} I_f = \log_{10} I_0 - \left(\frac{1}{D_{TR}}\right) * t$$

onde: I_0 = intensidade de fluorescência inicial de GFPuv ;

I_f = intensidade de fluorescência final de GFPuv ;

k = constante específica de inativação (h^{-1});

t = tempo de exposição à temperatura de tratamento (min).

I.2.4.1.2. Valor z e Coeficiente Q₁₀

O valor z, expresso em graus Celsius (°C), é definido como o intervalo de temperatura necessário para ocasionar variação de um ciclo logarítmico no Valor D. É determinado pela equação de relação entre o logaritmo do Valor D e as correspondentes temperaturas de tratamento. Pode ser calculado pelo inverso negativo do coeficiente angular da reta resultante da regressão linear aplicado ao intervalo de temperatura analisado sendo representado pela equação:

$$\begin{aligned} \operatorname{tg} \alpha &= \frac{\operatorname{Log}_{10} D_2 - \operatorname{Log}_{10} D_1}{T_2 - T_1} = -\left(\frac{1}{z}\right) \\ \operatorname{Log}_{10} D_2 - \operatorname{Log}_{10} D_1 &= -\left(\frac{1}{z}\right) * (T_2 - T_1) \\ \operatorname{Log}_{10} \left(\frac{D_2}{D_1}\right) &= \left(\frac{1}{z}\right) * (T_1 - T_2), \text{ então} \\ \left(\frac{D_2}{D_1}\right) &= 10^{\left(\frac{T_1 - T_2}{z}\right)} \end{aligned}$$

onde: D_1 = valor D à temperatura de tratamento, T_1 ;
 D_2 = valor D à temperatura de tratamento, T_2

O valor z representa o intervalo de temperatura que ocasiona variação de 10 vezes na velocidade de destruição microbiana. Quanto menor o valor z, maior a velocidade de destruição em relação á temperatura de exposição (VESSONI PENNA; MACHOSHVILI, 1997).

O coeficiente Q_{10} , fator que avalia a dependência da taxa constante de inativação, “k”, com a variação de 10 °C na temperatura de tratamento (T, °C), pode ser estimado pela relação:

$$Q_{10} = \left(\frac{k_{(T+10)}}{k_T} \right)$$

ou relacionado ao valor z:

$$Q_{10} = 10^{\left(\frac{10}{z} \right)}$$

I.2.4.1.3. Energia de ativação

A energia presente em um sistema é denominada de Energia de Ativação (E_a =kcal/mol), a qual representa a energia necessária para a desestabilização de um sistema a uma dada temperatura de tratamento.

A Energia de Ativação foi estimada utilizando-se a equação de Arrhenius, a qual foi aplicada para avaliar a dependência entre a taxa de inativação constante (k) com a temperatura, podendo ser representada pela equação:

$$\begin{aligned} \lg \alpha &= - \left(\frac{E_a}{(2,303 * R)} \right) \\ \frac{\log_{10} k_1 - \log_{10} k_2}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)} &= - \left(\frac{E_a}{(2,303 * R)} \right) \\ \log_{10} k_1 &= \log_{10} k_2 - \frac{E_a}{(2,303 * R)} * \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \end{aligned}$$

onde: k = taxa constante de inativação (h^{-1});
 T_1 e T_2 = temperaturas de tratamento em graus Kelvin (K)
 R = constante universal dos gases (1,987calorias /mol*K),

I.2.4.1.4. Energia Livre de Gibbs

A energia livre de Gibbs, ΔG , potencial químico de uma substância é uma propriedade intrínseca do sistema, é uma comparação das variações de entalpia e entropia antes e após mudanças no sistema, a qual mostra a tendência da transformação (a redução ($\Delta G < 0$); o aumento ($\Delta G > 0$) ou a não variação ($\Delta G = 0$)), em um processo a temperatura e pressão constantes. A tendência da energia livre é decréscimo espontâneo na transformação, em direção ao equilíbrio, quando $\Delta G = 0$, e pode ser representada pela equação:

$$\Delta G = \Delta H - T * \Delta S$$

$$\Delta G = R * T * \ln \left(\frac{k * h}{B * T} \right)$$

onde:

ΔG = variação de energia livre de Gibbs, kcal.mol⁻¹

ΔH = variação de entalpia, kcal.mol⁻¹

ΔS = variação de entropia, kcal.mol⁻¹

B = constante de Boltzmann = $1,38 \times 10^{-23}$ J.K⁻¹ = $5,77 \times 10^{-23}$ cal. mol⁻¹

h = constante de Planck = $3,987 \times 10^{-32}$ J. min = $16,68 \times 10^{-32}$ cal. mol⁻¹

R = constante dos gases ideais = $1,987$ cal mol⁻¹ K⁻¹

T = temperatura absoluta, K

..

Um decréscimo na energia livre de Gibbs associada com uma mudança de estado é igual à quantidade máxima de trabalho que pode ser obtida na transformação, podendo ser:

- 1) $\Delta G < 0$ – ocorre espontaneamente ou naturalmente;
- 2) $\Delta G = 0$ – sistema em equilíbrio com esta transformação;
- 3) $\Delta G > 0$ – não ocorre espontaneamente ou naturalmente

O termo espontâneo significa que há possibilidade da reação ocorrer. Em uma transformação natural, a temperatura e a pressão são constantes e ΔG é negativo.

Quando o ΔG é negativo, ΔH é negativa e ΔS é positivo, a transformação é exotérmica. Em uma transformação natural e espontânea o sistema busca atingir a mínima entalpia (mínima energia interna) e máxima entropia (máxima desordem).

I.2.4.1.5. Entalpia

A entalpia é definida como a quantidade de energia de cada substância participante de uma reação. A variação da entalpia de um sistema é o calor liberado ou absorvido quando uma transformação ocorre sob pressão constante, e pode ser definida através da relação:

$$\Delta H = \Delta E_a - R \cdot T,$$

onde:

ΔH = variação de entalpia, kcal.mol⁻¹

ΔE = variação da Energia de Ativação, kcal.mol⁻¹

R = constante dos gases ideais = 1,987 cal mol⁻¹ K⁻¹

T = temperatura absoluta, K

I.2.4.1.6. Entropia

Entropia é definida como a medida de desordem do sistema. A desordem ocorre espontaneamente e, dessa forma, a entropia tende a aumentar. Se o número de moléculas não varia com a transformação, uma pequena variação na entropia (positiva ou negativa) é esperada. Quando este fato acontece, significa que esta reação envolve uma transferência natural de carga. A entropia pode ser determinada pela relação:

$$\Delta S = \frac{(\Delta H - \Delta G)}{T}$$

onde:

ΔS = variação de entropia, kcal.mol⁻¹

ΔH = variação de entalpia, kcal.mol⁻¹

ΔG = variação de energia livre de Gibbs, kcal.mol⁻¹ e,

T = temperatura absoluta, K

I.3. Resultados e Discussão

As propriedades físicas das soluções parenterais de glicose em soluções tampão de diferentes valores de pH foram avaliadas.

I.3.1. Valor de pH

Soluções de glicose de concentração entre 1,5% (0,08 M) e 50% (2,8 M) são comumente encontradas no ambiente médico-hospitalar. Foram preparadas em água Milli-Q estéril (pH 6,26) e a adição de glicose ocasionou variação no valor de pH das soluções de pH 5,94 a 7,78 (tabela 03).

A GFPuv apresenta estabilidade máxima medida por fluorescência entre pH 6,0 e 8,0 (ISHII, 2004) para um ponto isoelétrico entre pH 4,9 e 5,1. Visando minimizar a influência do valor de pH na estabilidade da proteína, as soluções parenterais foram preparadas em soluções-tampão (10mM): (i) acetato de sódio/ácido acético, pH 5,0; (ii) fosfato de potássio monobásico/dibásico pH 6,0 e pH 7,0 e (iii) tampão tris-EDTA, pH 8,0.

Tabela 03. Valores de pH das soluções de glicose após 24 horas de preparo

(*) neste capítulo lê-se Tris-HCl/EDTA 10mM.

Glicose (%)	Molaridade (M)	pH (24 horas após o preparo)				
		Água	Acetato pH 5,0	Fosfato pH 6,0	Fosfato pH 7,0	Tris-EDTA pH 8,0 (*)
1,5	0,08	6,59	5,13	6,10	7,02	8,22
5	0,28	7,38	5,12	6,05	6,97	8,22
7	0,39	5,94	5,27	6,00	7,04	8,01
10	0,56	6,91	5,26	5,96	6,98	8,02
15	0,83	7,78	5,25	5,92	6,95	8,05
20	1,11	7,76	5,23	5,89	6,87	7,99
25	1,39	7,23	5,13	5,86	6,82	7,88
30	1,67	7,77	5,24	5,79	6,80	7,88
35	1,94	7,30	5,20	5,78	6,78	8,00
40	2,22	7,41	5,20	5,72	6,74	7,95
45	2,50	6,16	5,15	5,7	6,69	7,91
50	2,78	6,05	5,08	5,67	6,63	7,50
pH médio		7,02 (±0,68)	5,19 (±0,06)	5,87 (±0,14)	6,86 (± 0,13)	7,80 (±0,06)

Soluções de glicose preparadas nos tampões sofreram menor variação de pH quando comparadas às soluções preparadas em água, sendo o pH médio de 7,02 ($\pm 0,68$). Nas soluções-tampão, a variação de pH foi menor: 5,19 ($\pm 0,06$); 5,87 ($\pm 0,14$); 6,86 ($\pm 0,13$) e 7,80 ($\pm 0,06$) nos tampões acetato pH 5,0, fosfato pH 6,0 e 7,0 e tris-EDTA pH 8,0, respectivamente, indicando que os tampões exerceram sua função de minimizar variação de pH (Tabela 04).

I.3.2. Densidade e Viscosidade

Os parâmetros de densidade e viscosidade das soluções, dependentes diretamente das concentrações de glicose empregadas, foram similares para todos os solventes utilizados, indicando-se os valores médios obtidos, sendo:

(i) densidades entre 0,95 ($\pm 0,01$) g/cm³ e 1,12 ($\pm 0,01$) g/cm³ e,

(ii) viscosidades entre 1,76 ($\pm 0,01$) mPas.s e 5,90 ($\pm 0,01$) mPas.s,

nas concentrações de 1,5% a 50% de glicose, respectivamente (tabela 04).

Tabela 04. Valores médios de densidade e viscosidade das soluções de glicose

Glicose (m/v %)	Densidade (g/cm ³)	Viscosidade (mPas.s)	Glicose (m/v %)	Densidade (g/cm ³)	Viscosidade (mPas.s)
	DP=0,01	DP=0,10		DP=0,01	DP=0,10
0,0	0,95	1,76			
1,5	0,95	1,75	25	1,03	2,64
5,0	0,96	1,83	30	1,05	3,02
7,0	0,97	1,88	35	1,07	3,48
10	0,98	1,97	40	1,09	4,08
15	1,00	2,15	45	1,10	4,83
20	1,01	2,38	50	1,12	5,90

mPa.s = Mille Pascal * second = 1 centipoise

DP = desvio padrão

I.2.3. Condutividade

Condutividade é o valor associado com a habilidade das soluções aquosas de transmitir corrente elétrica, entre dois eletrodos metálicos quando uma voltagem é aplicada entre eles. Embora a água seja pobre condutora de eletricidade, a presença

de íons na água aumenta consideravelmente o valor de condutividade, que reflete a concentração, a mobilidade e a carga dos íons nas soluções.

A condutividade dos solventes utilizados no preparo das soluções de glicose foi determinada (tabela 05), sendo: (i) 1,84 $\mu\text{S}/\text{cm}$, (ii) 656 $\mu\text{S}/\text{cm}$; (iii) 1210 $\mu\text{S}/\text{cm}$; (iv) 1940 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e (v) 4460 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para água Milli-Q, tampões (10 mM): acetato pH 5,0, fosfato pH 6,0, fosfato pH 7,0 e tris-EDTA pH 8,0, respectivamente.

Tabela 05. Condutividade das soluções de glicose em diferentes soluções-tampão

Glicose (m/v %)	Condutividade				
	Água pH=6-7	Acetato pH 5,0	Fosfato pH 6,0	Fosfato pH 7,0	Tris-EDTA pH 8,0
0,0	1,84	656	1210	1940	4460
1,5	1760	728	1190	1860	2360
5,0	1324	664	1070	1710	2090
7,0	2210	667	1000	1610	1930
10	2370	598	892	1400	1760
15	1085	513	778	1240	1480
20	1000	403	662	1010	1250
25	666	346	563	851	968
30	490	292	471	702	865
35	658	254	404	579	205
40	466	210	328	487	165
45	364	162	260	386	137
50	314	130	205	308	339

Concentrações superiores a 10% de glicose em solução reduziram a condutividade, verificando-se que a quantidade de glicose presente interfere na condutividade da solução.

Em solução tampão acetato, pH 5,0, a condutividade do tampão não foi afetada pela adição de glicose até a concentração de 7%, decaindo em concentrações acima deste valor.

Em soluções tampão fosfato, pH 6,0 e pH 7,0, e tris-EDTA pH 8,0, a adição de glicose ocasionou queda na condutividade da solução, correspondendo a decréscimo máximo de 47,5% na condutividade em tris-EDTA 10mM com adição de 1,5% de glicose.

I.3.4. Osmolaridade

A osmolaridade foi determinada através do ponto de congelamento das soluções entre 1,5% e 50% de glicose (tabela 06). Não foi possível determinar a osmolaridade através do ponto de congelamento em concentrações iguais ou superiores a 35% de glicose em água. A adição de eletrólitos influenciou a determinação da osmolaridade, não sendo possível a determinação em soluções acima de 25% em tampão acetato e tris-EDTA e superiores a 30% de glicose em tampão fosfato pH 6,0 e 7,0.

Tabela 06. Osmolaridade das soluções de glicose nas diferentes soluções-tampão

Glicose (m/v, %)	Osmolaridade (mOsM / kg)				
	Solução-Tampão 10mM				
	Água pH=6-7	Acetato pH 5,0	Fosfato pH 6,0	Fosfato pH 7,0	Tris- EDTA pH 8,0
0,0	ND	ND	ND	ND	ND
1,5	0,06	0,13	0,13	0,08	0,13
5,0	0,29	0,36	0,36	0,27	0,33
7,0	0,37	0,50	0,50	0,40	0,39
10	0,56	0,75	0,75	0,57	0,62
15	0,90	1,18	1,14	0,88	ND
20	1,29	1,70	1,54	1,29	1,33
25	1,77	NC	1,98	1,68	NC
30	2,28	NC	NC	NC	NC
35	NC	NC	NC	NC	NC
40	NC	NC	NC	NC	NC
45	NC	NC	NC	NC	NC
50	NC	NC	NC	NC	NC

NC – não cristaliza, ND – não determinado

I.3.5. Estabilidade da Proteína Verde Fluorescente (GFPuv) a 25 °C

Com o intuito de desenvolver Indicador Biológico, IB que reporte a eficiência dos processos térmicos, o estudo da estabilidade da fluorescência emitida pela GFPuv quando diluída em Solução Parenteral, a temperatura de 25 °C, se faz necessária, pois durante o processo produtivo, existe tempo de espera entre o envase e a autoclavação dos produtos de até 5 horas.

I.3.5.1. Valor de pH

Após 24 horas do preparo das soluções de glicose nos tampões não foi observada variação nos valores de pH das soluções de glicose (tabela 07), se comparados à variação de pH das soluções preparadas em água (pH de 5,94 a 7,78):

- (i) pH 5,08 a pH 5,27 nas soluções em tampão acetato 10mM, pH 5,0;
- (ii) pH 5,67 a pH 6,10 nas soluções em tampão fosfato 10mM pH 6,0;
- (iii) pH 6,63 a pH 7,01 nas soluções em tampão fosfato 10mM, pH 7,0 e,
- (iv) pH 7,50 a pH 8,22 nas soluções em tampão tris-EDTA 10mM, pH 8,0.

Embora o aumento da concentração de glicose nas soluções (adicionadas de GFPuv, $8,0 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$) reduzisse o pH das mesmas, a variação foi maior e equivalente nos sistemas formados por água Milli-Q ($\text{pH } 6,18 \pm 0,11$) e tris-EDTA ($\text{pH } 6,64 \pm 0,10$). E menor nos sistemas de tampão acetato ($\text{pH} = 5,24 \pm 0,02$) e fosfato ($\text{pH} = 5,90 \pm 0,03$ e $\text{pH} = 6,45 \pm 0,07$).

Correlacionando o valor de pH das soluções com a concentração de glicose empregada, não houve variação significativa em sistemas tampão acetato pH 5,0; e em tampões fosfato pH 6,0 e 7,0 e tris-EDTA pH 8,0, houve linearidade entre o valor de pH e a concentração de glicose. A variação de pH das soluções preparadas em água Milli-Q foi elevada.

Tabela 07. Valores de pH das soluções de glicose em água e tampões: acetato, pH 5,0, fosfato pH 6,0 e 7,0 e tris-EDTA, pH 8,0, antes, após e 24 horas após a adição de GFPuv, armazenadas a 4°C.

Glicose (%, m/v)	Água			Tampão Acetato pH 5,0			Tampão Fosfato pH 6,0			Tampão Fosfato pH 7,0			Tampão Tris - EDTA pH 8,0		
	pH sol	pH sol+GFP	pH GFP (24h)	pH sol	pH sol+GFP	pH GFP (24h)	pH sol	pH sol+GFP	pH GFP (24h)	pH sol	pH sol+GFP	pH GFP (24h)	pH sol	pH sol+GFP	pH GFP (24h)
0	6,72		6,69	5,18		5,22	6,17		6,13	7,07		7,01	8,10		8,04
1,5	6,59	6,90	6,75	5,13	5,17	5,13	6,10	6,08	6,07	7,02	6,82	6,85	8,22	7,28	7,16
5	7,38	6,74	6,79	5,12	5,13	5,14	6,05	6,01	6,07	6,97	6,86	6,80	8,22	7,26	7,16
7	5,94	6,50	6,53	5,27	5,23	5,29	6,00	5,99	6,04	7,04	6,84	6,81	8,01	7,16	7,14
10	6,91	6,79	6,76	5,26	5,20	5,22	5,96	6,02	5,99	6,98	6,77	6,72	8,02	7,14	7,05
15	7,78	6,76	6,62	5,25	5,20	5,24	5,92	6,00	5,98	6,95	6,69	6,67	8,05	7,19	6,98
20	7,76	6,79	6,29	5,23	5,27	5,24	5,89	5,96	5,90	6,87	6,67	6,68	7,99	7,07	6,89
25	7,23	6,54	6,12	5,23	5,22	5,21	5,86	5,86	5,83	6,82	6,54	6,39	7,88	6,93	6,54
30	7,77	6,77	5,70	5,24	5,36	5,38	5,79	5,80	5,83	6,80	6,46	6,25	7,88	7,07	6,65
35	7,30	6,58	6,00	5,20	5,32	5,32	5,78	5,78	5,84	6,78	6,34	6,18	8,00	6,98	6,30
40	7,41	6,57	5,91	5,20	5,24	5,28	5,72	5,70	5,75	6,74	6,11	6,06	7,95	6,41	6,06
45	6,16	6,77	5,42	5,15	5,24	5,30	5,70	5,71	5,74	6,69	6,25	6,04	7,91	6,66	5,98
50	6,05	6,54	5,21	5,08	5,19	5,14	5,67	5,68	5,71	6,63	6,25	5,97	7,50	6,39	5,80
Média	7,02	6,69	6,18	5,20	5,23	5,24	5,87	5,88	5,90	6,86	6,55	6,45	7,97	6,96	6,64

pH sol: pH da solução; *pH sol+GFP*: pH da solução adicionada de GFPuv; *pH GFP (24h)*: pH da solução com GFP após 24h; *DP*: desvio padrão

I.3.5.2. Determinação do tempo de redução decimal, valor D

A estabilidade da GFPuv a temperatura de 25 °C foi avaliada em termos do tempo de redução decimal, valor D, tempo necessário para o decaimento de 90% da intensidade de fluorescência da GFPuv em soluções-tampão, sem adição de glicose (Figura 06) e em soluções variando de 1,5% a 50% de glicose.

Tabela 08. Equações e valores D para a GFPuv em soluções tampão, sem glicose

Solução-Tampão (10mM)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade de Fluorescência} =$	$R^2 =$	Valor D	
			horas	dias
Água	$= 2,6854 + 0,0002 * t$	0,86	69,44	2,89
Acetato pH 5,0	$= 2,4393 - 0,0031 * t$	0,98	5,56	0,23
Fosfato pH 6,0	$= 2,75 - 0,0003 * t$	0,88	55,56	2,31
Fosfato pH 7,0	$= 2,7825 - 0,0003 * t$	0,93	69,44	2,89
Tris-EDTA pH 8,0	$= 2,7989 - 0,0002 * t$	0,95	69,44	2,89

Figura 06. Decaimento da Intensidade de Fluorescência da GFPuv em soluções-tampão, sem adição de glicose, a temperatura de 25 °C

Em soluções de glicose preparadas industrialmente, o valor de pH varia entre 4,5 e 6,0 (VESSONI PENNA et al., 2002). Para avaliar a influência da glicose sobre a estabilidade da GFPuv, o valor D foi correlacionado com o pH constante das soluções tampão utilizadas.

Menor estabilidade da GFPuv foi determinada em solução tampão acetato, pH 5,0, sem a adição de glicose (Figura 06), correspondendo a valor D de 5,6 horas, 12 vezes menor do que os valores D ($D = 69,4$ horas) determinados para a GFPuv em água e soluções-tampão fosfato pH 6,0 e 7,0 e tris-EDTA, pH 8,0 (tabela 08).

1.3.5.2.1. Soluções de Glicose em água para injeção, WFI

Em soluções de glicose preparadas em água, o valor D da GFPuv manteve-se em 83,33 horas (Tabela 09 e Figura 07), em concentrações de até 10% de glicose.

Tabela 09. Valores D para a GFPuv em solução de glicose em água, submetida a 25°C

Glicose (m/v,%)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R^2	Valor D	
			horas	dias
1,5%	$= -0,0002 * t + 2,83$	0,68	83,33	3,47
5%	$= -0,0002 * t + 2,8609$	0,96	83,33	3,47
7%	$= -0,0002 * t + 2,8167$	0,91	83,33	3,47
10%	$= -0,0002 * t + 2,8044$	0,85	83,33	3,47
15%	$= -0,0003 * t + 2,9289$	0,89	55,56	2,31
20%	$= -0,0004 * t + 2,8318$	0,98	41,67	1,74
25%	$= -0,0005 * t + 2,8264$	0,97	33,33	1,39
30%	$= -0,001 * t + 2,8259$	0,993	16,67	0,69
35%	$= -0,0011 * t + 2,8708$	0,997	15,15	0,63
40%	$= -0,0012 * t + 2,8668$	0,96	13,89	0,58
45%	$= -0,0018 * t + 2,8254$	0,98	9,26	0,39
50%	$= -0,0018 * t + 2,8405$	0,95	9,26	0,39

(*) t = tempo

A estabilidade da GFPuv foi independente do valor de pH e diretamente dependente da concentração de glicose utilizada, com decaimento de cerca de 80% na estabilidade da GFPuv. A variação do valor $D_{\text{médio}}$ para a GFPuv nas soluções de concentrações entre 30% e 50 % de glicose foi de 44,45%.

Figura 07. Variação dos Valores D e de pH para as soluções de glicose em água

A intensidade de fluorescência da GFPuv foi influenciada em concentrações iguais ou superiores a 30% de glicose em água, considerada como uma zona de transição.

O valor D de 9,26 horas determinados nas concentrações de 45% e 50% de glicose correspondeu a um decaimento de 89% e 33%, respectivamente em relação à concentração de 10% ($D = 83,33$ horas) e 40% de glicose ($D = 13,89$ horas).

Houve perda de 90% na intensidade de fluorescência para a faixa de concentração entre 1,5% ($D = 83,33$ h) e 50% ($D = 9,26$ h) em água.

I.3.5.2.2. Soluções de Glicose em Tampão Acetato 10mM pH 5,0

Em soluções de glicose em tampão acetato 10 mM pH 5,0, houve queda inicial na intensidade de fluorescência da GFPuv de 20% nas concentrações de até 40% de glicose e, perda de 30% e 50% nas concentrações de 45% e 50% de glicose, respectivamente.

Nos primeiros 20 minutos de contato da proteína com o sistema glicose-acetato a 25 °C, houve declínio de 60 a 100 unidades de intensidade de fluorescência, equivalente a 1,9 - 2,2 µg GFPuv/mL e valor D entre 4,62 e 5,55 horas.

O valor de pH médio 5,24 ($\pm 0,02$) manteve-se constante nas concentrações de glicose consideradas e os valores D obtidos para a GFPuv foram lineares para baixas concentrações de glicose (Tabela 07).

Em concentrações de glicose de 45% (D= 46,30 h) e 50% (D= 39,68 h) foi observada linearidade entre o decaimento da intensidade de fluorescência e o tempo em que a GFPuv foi exposta ao sistema glicose-acetato a 25 °C.

Tabela 10. Tempos de Redução Decimal, valores D, determinados para GFPuv em solução de glicose em solução tampão acetato, pH 5,0 e submetida a tratamento a 25°C

Glicose (m/v, %)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	$R^{2(*)}$	Valor D (h)			
			Determinado		Recalculado	
			(h)	(dias)	(h)	(dias)
1,5%	$= -0,0004 * t + 2,6253$	0,90	41,67	1,74	2,77	0,11
5%	$= -0,0031 * t + 2,4203$	0,93	5,38	0,22	5,60	0,23
10%	$= -0,0009 * t + 2,622$	0,80	18,52	0,77	12,16	0,51
15%	$= -0,0016 * t + 2,5987$	0,88	10,42	0,43	13,90	0,58
50%	$= -0,0005 * t + 2,4328$	0,88	33,33	1,39	39,68	1,65

t = tempo

(**) 180 leituras em intervalos de 1 minuto

A intensidade de fluorescência da GFPuv não mostrou linearidade nas concentrações de glicose entre 20% e 40%, sendo calculado pela relação:

$$t = n * \text{valor D} \text{ ou } \text{valor D} = t / n,$$

onde,

t = 180 min de exposição à temperatura de 25 °C,

n= ciclos logarítmicos de decaimento da intensidade de fluorescência da GFPuv,

nas concentrações de 20% (D= 23,84 h); 25% (D= 22,16 h), 30% (D= 33,57 h), 35% (D= 28,90 h) e 40% (D= 41,28 h) de glicose.

A linearidade resultante entre o valor D e o aumento da concentração de glicose em solução tampão acetato (pH=5,0) pode ser dada pela relação:

$$\text{Valor D} = 4,6821 + 0,819 * (\text{concentração de glicose, \%}), (R^2=0,91)$$

Em valores de pH inferiores ao ponto isoeletrico (pI), a maioria das ligações de pontes de hidrogênio entre moléculas de açúcares e moléculas de proteína protonadas tornam-se mais vulneráveis, e, as moléculas de glicose apresentam-se como competidores das moléculas de proteína pela água, o que induz a desidratação da proteína seguida por uma intensa agregação das mesmas (SEMENOVA; ANTIPOVA; BELYAKOVA, 2002), fenômeno o qual reforça o fato da estabilidade da configuração nativa da proteína em altas concentrações de glicose.

O comportamento da GFPuv em sistema de tampão acetato foi inverso ao comportamento em sistema de água, onde a estabilidade da GFPuv reduziu proporcionalmente com o aumento da concentração de glicose presente e o decaimento do valor de pH.

A conformação da GFPuv apresentou-se sensível ao valor de pH no meio. A intensidade de fluorescência emitida depende da carga dos aminoácidos de sua estrutura e da transferência e ligações de íons H⁺ com os aminoácidos do fluoróforo (ASHBY; IBARAKI; HENLEY, 2004). Em ambientes de pH próximo ao pI da GFPuv, a intensidade de fluorescência é reduzida e a dependência da fluorescência pelo pH do meio pode ser descrita como o equilíbrio destas ligações.

1.3.5.2.3. Soluções de Glicose em Tampão Fosfato pH 6,0

Em sistema de tampão fosfato, pH 6,0 o pH das soluções de glicose foi de 5,90 ($\pm 0,13$), e ocasionou: (i) aumento de 31% na intensidade de fluorescência da GFPuv em soluções de até 10% de glicose dissolvida; (ii) aumento entre 1% a 5% em soluções de até 40% de glicose e, (iii) perda de 8% na intensidade de fluorescência da GFPuv em solução com 50% de glicose.

Tabela 11. Tempos de Redução Decimal, valores D, determinados para GFPuv em solução de glicose em solução tampão fosfato, pH 6,0, submetida a tratamento a 25°C

Glicose (%)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R^2 (**)	Valor D	
			horas	dias
1,5	$= 2,8553 + 0,0002 * t$	0,85	(*)---	(*)---
5	$= 2,9571 - 0,0003 * t$	0,88	55,56	2,31
10	$= 2,948 - 0,0003 * t$	0,93	55,56	2,31
50	$= 2,7484 + 0,0001 * t$	0,59	(*)---	(*)---

t = tempo

(*) valor D não determinado, pois não houve decaimento,

(**) 180 leituras em intervalos de 1 minuto

A estabilidade da GFPuv em solução tampão fosfato, pH 6,0 apresentou melhor comportamento em todas as concentrações de glicose estudadas.

Em solução tampão sem adição de glicose, o valor D = 55,6 horas foi o mesmo determinado para as soluções de 5% e 10% de glicose (tabela 11).

A intensidade de fluorescência foi recuperada após tratamento a 25 °C e, houve aumento em cerca de 8% a 10% na intensidade da GFPuv em relação à concentração inicial (incremento de 50 a 80 unidades na intensidade de fluorescência), exceto para as concentrações de 5% e 10% de glicose, onde houve declínio de 100 e 150 unidades de intensidade de fluorescência, respectivamente, refletindo a tendência de instabilidade da proteína a baixas concentrações de glicose (Figura 08).

Figura 08. Decaimento da intensidade de fluorescência da GFPuv nas concentrações de 5% e 10% de glicose, em tampão fosfato, pH 6,0

O sistema de soluções de glicose em tampão fosfato, pH 6,0 mostrou ser o sistema ideal para manutenção da integridade da GFPuv a 25°C.

I.3.5.2.4. Soluções de Glicose em Tampão Fosfato pH 7,0

Em sistema de tampão fosfato, pH 7,0, o valor de pH 6,45 ($\pm 0,34$) após 24 horas do preparo das amostras foi próximo ao valor de pH 6,18 ($\pm 0,54$) em soluções de glicose em água.

Tabela 12. Tempos de Redução Decimal, valores D, para GFPuv em solução de glicose em tampão fosfato, pH 7,0, submetida a 25°C

Glicose (m/v, %) (**)	Equação Log ₁₀ Intensidade =	R ² (*)	Valor D	
			horas	dias
1,5	= -0,0001 * t + 2,7785	0,35	166,67	6,94
5	= -0,0001 * t + 2,7707	0,40	166,67	6,94
7	= -0,0001 * t + 2,7676	0,84	166,67	6,94
10	= -0,0001 * t + 2,7625	0,69	166,67	6,94
15	= -0,0001 * t + 2,7623	0,59	166,67	6,94
20	= -0,0002 * t + 2,7405	0,93	83,33	3,47
25	= -0,0003 * t + 2,7707	0,97	55,56	2,31
30	= -0,0003 * t + 2,7357	0,93	55,56	2,31
35	= -0,0004 * t + 2,7401	0,993	41,67	1,74
40	= -0,0003 * t + 2,7366	0,96	55,56	2,31
45	= -0,0005 * t + 2,7313	0,991	33,33	1,39
50	= -0,0004 * t + 2,7177	0,87	41,67	1,74

t = tempo

(*) 180 leituras em intervalos de 1 minuto

(**) de 1,5% e 5% de glicose, há uma projeção de estabilidade.

As concentrações de GFPuv decaíram similarmente de 7,52 µg de GFPuv /mL a 6,38 µg de GFPuv /mL, em água e em sistema de tampão fosfato pH 7,0, quando a proteína foi inserida no sistema.

Similarmente, a perda foi de 5% na concentração de GFPuv (24 horas a 4 °C) nas concentrações de até 35% de glicose e no máximo de 12% nas concentrações entre 40% e 50% de glicose em solução tampão fosfato, pH 7,0.

A GFPuv nas soluções de até 15% de glicose em tampão fosfato pH 7,0, manteve-se estável, sendo o valor D de 166,67 horas a temperatura de 25 °C, valor duas vezes maior do que o valor D de 83,33 horas determinado para a GFPuv em soluções de concentração de até 10% de glicose em água (tabela 12).

Figura 09. Variação dos valores D e pH para a GFPuv em solução de glicose em tampão fosfato, pH 7,0 e água

Em soluções de 20% de glicose em tampão, a estabilidade da GFPuv decaiu pela metade (Valor D = 83,33 horas), influenciada pela concentração de glicose dissolvida.

A estabilidade da proteína em termos de valor D entre 55,55 horas e 41,67 horas foi reduzida em 33% para a GFPuv em sistema de glicose entre 25% e 45% e, foi similar ao comportamento da GFPuv em concentração entre 15% e 20% de glicose em água.

A média do valor D = 33,3 horas para a GFPuv em 50% de glicose foi similar ao valor determinado em água na concentração de 25% de glicose e 72% maior do que o valor em 50% de glicose em água (valor D = 9,26 horas).

Sistemas de glicose em tampão fosfato pH 7,0, mostraram-se bons sistemas para manutenção da intensidade de fluorescência da GFPuv, representando o dobro

da estabilidade da proteína comparado aos sistemas preparados em água, em termos de valor D (Figura 09).

I.3.5.2.5. Soluções de Glicose em Tampão Tris-EDTA, pH 8,0

Tabela 13. Tempos de Redução Decimal, valores D, da GFPuv em solução de Glicose em tampão Tris-EDTA, pH 8,0, submetida a tratamento a temperatura de 25°C

Glicose (m/v,%)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	$R^2 (*)$	Valor D	
			Horas	dias
1,5	$= 0,00002 * t + 2,7647$	0,46	833,33	34,72
5	$= 0,00006 * t + 2,7102$	0,85	277,78	11,57
7	$= 0,00007 * t + 2,7341$	0,83	238,10	9,92
10	$= 0,00003 * t + 2,7334$	0,21	555,56	23,15
15	$= -0,00003 * t + 2,7341$	0,40	555,56	23,15
20	$= -0,00002 * t + 2,7641$	0,16	833,33	34,72
25	$= -0,00002 * t + 2,709$	0,06	833,33	34,72
30	$= -0,0002 * t + 2,7171$	0,97	83,33	3,47
35	$= -0,0001 * t + 2,7152$	0,64	166,67	6,94
40	$= -0,0002 * t + 2,719$	0,82	83,33	3,47
45	$= -0,0001 * t + 2,701$	0,85	166,67	6,94
50	$= -0,0004 * t + 2,7079$	0,89	41,67	1,74

t = tempo

(*) 180 leituras em intervalos de 1 minuto

A estabilidade da GFPuv em solução tampão Tris-EDTA pH 8,0 (Tabela 13) mostrou-se 10 e 5 vezes maior do que a estabilidade determinada em água e em tampão fosfato, pH 7,0, respectivamente, nas concentrações de até 25% de glicose.

O comportamento da GFPuv entre 30% e 45% de glicose em Tris-EDTA foi similar ao tampão fosfato em concentrações menores ou iguais a 20% de glicose, sendo os valores D de 83,33 e 166,67 horas para variação similar de pH.

Em concentração de 50% de glicose, a intensidade de fluorescência decaiu para valor D de 41,67 horas e mostrou comportamento similar para os sistemas de

tris-EDTA e fosfato pH 7,0, confirmando a influência da concentração de glicose sobre a estabilidade da GFPuv.

Tabela 14. Valores D para a GFPuv em soluções de glicose em água e soluções-tampão, submetidas a tratamento a temperatura de 25 °C

Glicose (m/v,%)	Valor D (h)				
	Água	Acetato pH 5,0	Fosfato pH 6,0	Fosfato pH 7,0	Tris-EDTA pH 8,0
0	69,40	5,55	55,56	69,40	69,40
1,5	83,33	2,77	(*)	166,67	833,33
5	83,34	5,38	55,56	166,67	277,78
7	83,33	17,57	(*)	166,67	238,10
10	83,33	12,16	55,56	166,67	555,56
15	55,56	13,89	(*)	166,67	555,56
20	41,67	23,84	(*)	83,33	833,33
25	33,33	22,16	(*)	55,56	833,33
30	16,67	33,57	(*)	55,56	83,33
35	15,15	28,90	(*)	41,67	166,67
40	13,89	41,28	(*)	55,56	83,33
45	9,26	46,30	(*)	33,33	166,67
50	9,26	39,68	(*)	41,67	41,67

t = tempo

(*) valor D não determinado, pois não houve decaimento

A GFPuv apresentou-se sensível às variações da composição da solução e do valor de pH à temperatura de 25 °C (Tabela 14). O aumento da concentração de glicose no meio reduziu a estabilidade da GFPuv e, o valor de pH utilizado em cada solução, o que pode ocasionar a desprotonação de resíduos de aminoácidos presentes na superfície da GFPuv (PALM; WLODAWER, 1999), modificando sua conformação, reduzindo a intensidade de fluorescência e, conseqüentemente, a estabilidade térmica em termos de valor D.

I.3.5.3. Energia de Ativação

A energia de ativação, E_a , representa a energia presente em um sistema. Quanto maior a energia de ativação, mais facilmente o sistema é desestabilizado devido ao grau de desordem das moléculas.

Sistemas formados por água e tampão fosfato pH 7,0, apresentaram $E_a = 633,33 \text{ kcal. mol}^{-1}$ em até 10% de glicose em água e 20% de glicose em tampão fosfato pH 7,0 e de $755,68 \text{ kcal.mol}^{-1}$ nas concentrações de até 15% de glicose em tampão fosfato pH 7,0, refletindo a desordem das moléculas nos sistemas (tabela 15).

A energia de ativação foi de $245,58 \text{ kcal.mol}^{-1}$ nas concentrações de 45% e 50% de glicose em água, representando perda de 60% de energia no sistema e um forte arranjo entre as moléculas de glicose, água e proteína. A estabilidade da proteína em 50% de glicose em água foi dependente do arranjo favorável imobilizado entre as moléculas, o qual torna a proteína facilmente exposta a estresses físicos externos.

Tabela 15. Valores de Energia de Ativação (Ea, Kcal/mol) para os sistemas de GFPuv em soluções de glicose em água e soluções-tampão

Glicose (%)	WFI			Acetato 10mM pH 5,0			Fosfato 10mM pH 7,0			Tris-EDTA 10mM pH 8,0		
	k (h ⁻¹)	Log k	Ea (kcal/mol)	k (h ⁻¹)	Log k	Ea (kcal/mol)	k (h ⁻¹)	Log k	Ea (kcal/mol)	k (h ⁻¹)	Log k	Ea (kcal/mol)
0	0,033	-1,48	633,33	0,415	-0,38	155,23	0,033	-1,48	601,05			
1,5	0,028	-1,55	633,33	0,831	-0,08	32,59	0,014	-1,86	755,68	0,003	-2,56	1039,71
5	0,028	-1,56	755,68	0,428	-0,37	149,74	0,014	-1,86	755,68	0,008	-2,08	845,83
7	0,028	-1,56	633,33	0,131	-0,88	358,61	0,014	-1,86	755,68	0,010	-2,01	818,62
10	0,028	-1,56	633,33	0,189	-0,72	293,66	0,014	-1,86	755,68	0,004	-2,38	968,16
15	0,041	-1,38	561,80	0,166	-0,78	317,14	0,014	-1,86	755,68	0,004	-2,38	968,16
20	0,055	-1,26	511,03	0,097	-1,02	412,47	0,028	-1,56	633,33	0,003	-2,56	1039,71
25	0,069	-1,16	471,61	0,104	-0,98	399,58	0,041	-1,38	561,80	0,003	-2,56	1039,71
30	0,138	-0,86	349,33	0,069	-1,16	472,88	0,041	-1,38	561,80	0,028	-1,56	633,33
35	0,152	-0,82	332,46	0,080	-1,10	446,44	0,055	-1,26	511,03	0,014	-1,86	755,68
40	0,166	-0,78	317,14	0,056	-1,25	509,37	0,041	-1,38	561,80	0,028	-1,56	633,33
45	0,249	-0,60	245,58	0,050	-1,30	529,61	0,069	-1,16	471,61	0,014	-1,86	755,68
50	0,249	-0,60	245,58	0,058	-1,24	502,40	0,055	-1,26	511,03	0,055	-1,26	511,03

Em solução-tampão fosfato pH 7,0, o valor da energia de ativação entre 471,61 kcal.mol⁻¹ e 511,61 kcal.mol⁻¹, dos sistemas de concentrações superiores a 35% de glicose, representou a metade da energia de ativação determinada nas concentrações de até 15% de glicose em tampão e o dobro da energia de ativação encontrada para as concentrações de 45% e 50% de glicose em água.

A energia de ativação entre 471,61 kcal.mol⁻¹ e 511,03 kcal.mol⁻¹ para concentrações de 20% e 25% glicose em água foi equivalente aos valores encontrados nas concentrações entre 35% e 50% em tampão fosfato pH 7,0.

O sistema de tampão fosfato, pH 7,0 mostrou habilidade de manter a energia de ativação do sistema, mantendo o dobro da estabilidade da GFPuv comparado aos sistemas de água nas concentrações superiores a 25% de glicose, devido a arranjo entre as moléculas de glicose e água.

A avaliação em água verificou a influência da glicose na estabilidade da intensidade de fluorescência da GFPuv.

O declínio do valor da energia de ativação do sistema com o aumento da concentração de glicose em água foi o mais linear dentre todos os avaliados.

Dentre as soluções tampão estudadas, sistemas formados por tampão acetato, pH 5,0 promoveram maior estabilidade à GFPuv com o aumento da energia de ativação no sistema. A energia de ativação elevou-se 15 vezes com o aumento da concentração de glicose em solução, variando de 32,59 kcal.mol⁻¹ a 509,61 kcal.mol⁻¹.

A energia de ativação entre 502,40 kcal.mol⁻¹ e 529,61 kcal.mol⁻¹ entre 40% e 50% de glicose em acetato foi similar aos valores encontrados para as concentrações entre 35% e 50% em tampão fosfato pH 7,0 e para 15% a 20% em água.

As soluções de glicose preparadas em pH 6,0 (pH_{médio} 5,87) foram responsáveis pela maior estabilidade da GFPuv no sistema, quando comparado com os sistemas de água e soluções tampão, inclusive o tampão fosfato pH 7,0.

Em sistema de Tris-EDTA, pH 8,0, pH ótimo para sua estabilidade e emissão de fluorescência, a GFPuv mostrou-se instável com o aumento da concentração de glicose nas soluções, resultando na redução de metade do valor da energia de Ativação, variando de 511,03 kcal.mol⁻¹ a 1039,71 kcal.mol⁻¹ em concentrações entre 25% e 50% de glicose, respectivamente.

O elevado valor de energia de ativação, em baixas concentrações de glicose, indicou a alta instabilidade do sistema que pode ser influenciado por um mínimo de interferências externas na solução.

Em sistema de tris-EDTA em concentrações maiores ou iguais a 30% de glicose, com valores de energia de ativação entre 511,03 kcal.mol⁻¹ e 633,34 kcal.mol⁻¹, a estabilidade da GFPuv foi equivalente à determinada em tampão fosfato pH 7,0 em concentrações inferiores a 20% de glicose; em água nas concentrações de até 20% e em solução tampão acetato em concentrações superiores ou iguais a 40% de glicose.

Figura 10. Valores de Energia de Ativação para a GFPuv em soluções de glicose

A GFPuv apresentou o dobro de estabilidade em sistemas de solução-tampão quando comparados com água (Figura 10).

1.3.5.4. Energia Livre de Gibbs e Entropia

A variação da energia livre de Gibbs, ΔG , indica a espontaneidade de uma proteína em se ajustar a um sistema e manter a estabilidade de sua estrutura. Um decréscimo no valor da energia livre mostra a espontaneidade e a estabilidade natural da proteína no sistema considerado.

O acréscimo de glicose na solução alterou os valores da energia livre de Gibbs para a GFPuv e as concentrações entre 25% e 30% de glicose foram determinantes na distinção de valores (Tabela 16), tanto em sistemas de água como em Tris-EDTA.

Em tampão fosfato pH 7,0 a estabilidade da GFPuv foi espontânea e equivalente a $\Delta G_{\text{médio}} = -24,41 (\pm 0,37) \text{ kcal.mol}^{-1}$, mantendo a fluorescência da GFPuv.

Tabela 16. Variação da energia Livre de Gibbs (ΔG) e entropia (ΔS) para a GFPuv em sistemas de água e soluções tampão (*)

Glicose (%)	Energia Livre de Gibbs (ΔG) e Entropia (ΔS) (kcal. mol ⁻¹)							
	Água para Injeção		Acetato pH 5,0		Fosfato pH 7,0		Tris-EDTA pH 8,0	
	ΔG	ΔS	ΔG	ΔS	ΔG	ΔS	ΔG	ΔS
0	-24,31	2,21	-22,81	0,60	-24,31	2,10		
1,5	-24,42	2,21	-22,40	0,18	-24,83	2,62	-25,78	3,58
5	-24,42	0,69	-22,79	0,58	-24,83	2,62	-25,13	2,92
7	-24,42	0,59	-23,50	1,28	-24,83	2,62	-25,04	2,83
10	-24,42	0,59	-23,28	1,06	-24,83	2,62	-25,54	3,33
15	-24,18	0,53	-23,36	1,14	-24,83	2,62	-25,54	3,33
20	-24,01	0,49	-23,68	1,46	-24,42	2,21	-25,78	3,58
25	-23,87	0,46	-23,63	1,42	-24,18	1,97	-25,78	3,58
30	-23,46	0,36	-23,88	1,67	-24,18	1,97	-24,42	2,21
35	-23,41	0,34	-23,79	1,58	-24,01	1,79	-24,83	2,62
40	-23,36	0,33	-24,00	1,79	-24,18	1,97	-24,42	2,21
45	-23,12	0,27	-24,07	1,86	-23,87	1,66	-24,83	2,62
50	-23,12	0,27	-23,98	1,77	-24,01	1,79	-24,01	1,79
Média	-23,89	0,72	23,47	1,26	24,41	2,20	25,09	2,88
DP (**)	($\pm 0,52$)	($\pm 0,67$)	($\pm 0,53$)	($\pm 0,53$)	($\pm 0,37$)	($\pm 0,37$)	($\pm 0,61$)	($\pm 0,61$)

(*) lê-se Δ = variação; (**) DP = desvio padrão

A estabilidade da GFPuv foi menor em sistema acetato ($\Delta G = -22,67$ kcal.mol⁻¹) nas concentrações de até 5% de glicose, aumentou para $\Delta G = -23,59$ kcal.mol⁻¹ entre 7% e 35% de glicose, e foi similar ($\Delta G = -24,00$ kcal.mol⁻¹) ao valor determinado em tampão fosfato pH 7,0 e Tris-EDTA pH 8,0, entre 40% e 50% de glicose.

Sistemas em água não se mostraram favoráveis para a estabilidade da GFPuv em concentrações maiores de 20% de glicose.

Em sistemas de 50% de glicose em soluções-tampão acetato, fosfato e tris-EDTA, o valor médio, $\Delta G = -24,00$ kcal.mol⁻¹ confirmou a equivalência na estabilidade nos tampões estudados.

O sistema de GFPuv com glicose em água foi o mais organizado, em comparação aos outros sistemas avaliados, em termos de entropia (ΔS entre 0,27 e 2,21 kcal.mol⁻¹, entre 1,5% e 50% de glicose, respectivamente), excluindo-se o sistema de tampão fosfato pH 6,0. Sem a adição de glicose, a entropia ($\Delta S = 2,21$ kcal.mol⁻¹), foi similar àquela determinada em tampão fosfato, pH 7,0, nas mesmas condições ($\Delta S = 2,10$ kcal.mol⁻¹). O acréscimo de 1,5% de glicose em água, não interferiu na organização do sistema.

Os sistemas de tampão fosfato pH 7,0 e tris-EDTA pH 8,0 mostraram maior instabilidade quando comparados com o sistema de água, variando a entropia de 1,79 kcal.mol⁻¹ a 2,10 kcal/mol em tampão fosfato pH 7,0 e de 1,79 a 3,58 kcal/mol em tampão tris-EDTA pH 8,0, nas concentrações de 1,5% a 50% respectivamente.

A GFPuv em solução de 20% de glicose em tampão fosfato pH 7,0 e 30% de glicose em tris-EDTA apresentou mesma entropia do sistema em água sem glicose ($\Delta S = 2,21$ kcal.mol⁻¹).

Nas soluções de glicose em tampão fosfato pH 7,0, a GFPuv mostrou-se menos influenciada por interferências externas do que em tris-EDTA, onde a entropia foi maior, igualando-se em concentração de 50% de glicose ($\Delta S = 1,79$ kcal.mol⁻¹).

Em acetato, pH 5,0, houve aumento da entropia com o aumento da concentração de glicose, que favoreceu a instabilidade do mesmo, variando de 0,18 kcal.mol⁻¹ a 1,77 kcal.mol⁻¹ nas concentrações entre 1,5% e 50%, respectivamente.

I.4. Conclusões Parciais

Sistemas em água não se mostraram favoráveis à estabilidade da GFPuv em concentrações maiores de 20% de glicose. A estabilidade da GFPuv foi independente do valor de pH e diretamente dependente da concentração de glicose utilizada. A adição de 50% de glicose no meio reduziu cerca de 80% a estabilidade da GFPuv, sendo os valores $D = 83,33$ min e $D = 9,26$ min nas concentrações de 1,5% e 50% de glicose, respectivamente.

O comportamento da GFPuv em sistema de tampão acetato foi inverso ao comportamento em sistema de água, aumentando a estabilidade da GFPuv com o aumento da concentração de glicose presente e o decaimento do valor de pH. A conformação da GFPuv apresentou-se sensível ao valor de pH no meio.

As soluções de glicose preparadas em tampão fosfato pH 6,0 proporcionaram a maior estabilidade para a GFPuv, quando comparado com os sistemas de água e outras soluções tampão, pois não houve decaimento na intensidade de fluorescência da proteína.

Sistemas de glicose em tampão fosfato, pH 7,0, mostraram-se como bons sistemas para a GFPuv, mantendo o dobro da estabilidade da proteína comparado aos sistemas preparados em água (valores $D = 166,67$ min a $D = 41,6$ min para a GFPuv em soluções de 1,5% e 50% de glicose).

A estabilidade da GFPuv em solução tampão Tris-EDTA pH 8,0 (Tabela 13) mostrou-se 10 e 5 vezes maior do que a estabilidade determinada em água e em tampão fosfato, pH 7,0, respectivamente, nas concentrações de até 25% de glicose.

O declínio do valor da Energia de Ativação do sistema com o aumento da concentração de glicose em água foi o mais linear dentre todos os avaliados.

No intervalo de temperatura estudado, sistemas formados por tampão acetato, pH 5,0, promoveram maior estabilidade à GFPuv com o aumento da energia de ativação no sistema. A energia de ativação elevou-se 15 vezes com o aumento da concentração de glicose em solução, variando de $32,59 \text{ kcal.mol}^{-1}$ a $509,61 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Etapa II

Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Resistência Térmica da GFPuv a temperatura entre 80 °C e 95 °C em Soluções de Glicose ^(*)

^(*) Artigo submetido à Publicação no *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, em fase de revisão. ISHII, M., VESSONI PENNA, T. C., KUNIMURA, J. S., CHOLEWA, O., “Study on the Thermal Stability of Green Fluorescent Protein (GFPuv) in Glucose Parenteral Formulations”.

II.1. Objetivo

Esta etapa avaliou a resistência térmica da proteína verde fluorescente recombinante, GFPuv, em Solução Parenteral de Glicose frente a temperaturas de 80 °C, 85 °C, 90 °C e 95 °C.

II.2. Material e Métodos

A metodologia e análise de dados seguiram a descrição da Etapa I para soluções de glicose às temperaturas de 25 °C.

II.3. Resultados e Discussão

II.3.1. Valor de pH

O pH das soluções de glicose entre 1,5% e 50% em soluções-tampão e em água foi avaliado, variando entre pH 4,99 a 8,08 (tabela 17).

O valor de pH médio (25 °C) foi determinado em 7,02 ($\pm 0,68$) nos sistemas de água Milli-Q e em 5,20 ($\pm 0,06$); 5,87 ($\pm 0,14$); 6,86 ($\pm 0,13$) e 7,80 ($\pm 0,06$) nos tampões acetato pH 5,0, fosfato pH 6,0 e 7,0 e tris-EDTA pH 8,0, respectivamente. A adição da GFPuv não alterou o valor de pH das soluções.

Após 24 horas do preparo, houve estabilização dos sistemas sendo os valores de pH médio: (i) 6,77 ($\pm 0,24$) em água Milli-Q; (ii) 5,13 ($\pm 0,11$), em tampão acetato pH 5,0; (iii) 5,98 ($\pm 0,13$) em tampão fosfato pH 6,0; (iv) 6,76 ($\pm 0,17$) em tampão fosfato pH 7,0 e, (v) 7,85 ($\pm 0,13$) em tris-EDTA pH 8,0.

Tabela 17. Valores de pH (a 25 °C) de soluções entre 1,5% e 50% de glicose ao preparo da solução após a adição de GFPuv e 24 horas após a adição de GFPuv, estocadas a temperatura de 4 °C

Glicose (%, m/v)	Água			Tampão Acetato pH 5,0			Tampão Fosfato pH 6,0			Tampão Fosfato pH 7,0			Tampão Tris - EDTA pH 8,0		
	pH sol	pH Sol+GFP	pH GFP (24h)	pH sol	pH sol+GFP	pH GFP (24h)	pH sol	pH sol+GFP	pH GFP (24h)	pH sol	pH sol+GFP	pH GFP (24h)	pH sol	pH sol+GFP	pH GFP (24h)
0	6,72	6,90	6,60	5,18	5,05	5,04	6,17	6,22	6,09	7,07	7,12	7,12	8,10	7,89	8,06
1,5	6,59	7,14	6,81	5,13	5,18	5,08	6,10	6,12	6,14	7,02	7,05	6,99	8,22	7,83	7,83
5	7,38	6,65	6,54	5,12	5,07	5,07	6,05	6,23	6,09	6,97	7,00	6,93	8,22	7,85	7,87
7	5,94	6,94	6,75	5,27	5,06	5,06	6,00	6,07	6,11	7,04	6,95	6,91	8,01	7,80	7,93
10	6,91	6,92	6,81	5,26	5,27	5,25	5,96	6,06	6,10	6,98	6,91	6,93	8,02	7,71	7,84
15	7,78	7,15	6,82	5,25	5,01	5,00	5,92	5,96	6,00	6,95	6,89	6,88	8,05	8,08	8,11
20	7,76	7,00	6,66	5,23	5,20	5,21	5,89	6,04	6,05	6,87	6,85	6,82	7,99	7,72	7,82
25	7,23	7,64	7,24	5,23	4,99	4,99	5,86	5,87	5,90	6,82	6,76	6,73	7,88	8,02	8,02
30	7,77	7,53	7,10	5,24	5,35	5,34	5,79	5,85	5,88	6,80	6,70	6,66	7,88	7,71	7,70
35	7,30	7,25	6,95	5,20	5,06	5,06	5,78	5,84	5,86	6,78	6,61	6,63	8,00	7,87	7,85
40	7,41	7,00	6,58	5,20	5,14	5,14	5,72	5,82	5,82	6,74	6,59	6,58	7,95	7,71	7,71
45	6,16	6,70	6,46	5,15	5,29	5,30	5,70	5,84	5,90	6,69	6,56	6,51	7,91	7,79	7,82
50	6,05	6,71	6,51	5,08	5,18	5,17	5,67	5,70	5,74	6,63	6,56	6,51	7,50	7,73	7,65
Média	7,02	7,05	6,77	5,20	5,14	5,13	5,87	5,97	5,98	6,86	6,79	6,76	7,97	7,82	7,85
DP	0,68	0,31	0,24	0,06	0,11	0,11	0,14	0,16	0,13	0,13	0,18	0,17	0,19	0,12	0,13

pH sol: pH da solução; pH sol+GFP: pH da solução adicionada de GFP; pH GFP (24h): pH da solução com GFP após 24h; DP: desvio padrão

II. 3.2. Determinação do tempo de redução decimal, valor D

A resistência térmica da GFPuv foi avaliada em termos do tempo de redução decimal, valor D, nas concentrações de glicose entre 1,5% e 50% de glicose às temperaturas de 80 °C, 85 °C, 90 °C e 95 °C. A extensão da desnaturação da proteína pelo tempo de exposição à temperatura, foi avaliada até que a queda da intensidade de fluorescência alcançasse aproximadamente 100 unidades de fluorescência, que corresponde a cerca de 2 µg de GFPuv/mL.

II. 3.2.1. Soluções tampão, sem glicose

Tabela 18. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv nas soluções padrões sem adição de glicose às temperaturas de 80 °C, 85 °C, 90 °C e 95 °C

Temperatura (°C)	Solução (10mM)	Equação $\text{Log}_{10} \text{Int de Fluorescência} =$	R ² =	Valor D (min)
80	Água	$= -0,0722*t + 2,8145$	0,995	13,85
	Acetato pH 5,0	$= -0,2451*t + 2,791$	0,91	4,08
	Fosfato pH 6,0	$= -0,0649*t + 2,7589$	0,991	15,41
	Fosfato pH 7,0	$= -0,0248*t + 2,6619$	0,98	40,32
	Tris-EDTA pH 8,0	$= -0,037*t + 2,7392$	0,997	27,03
85	Água	$= -0,3549*t + 3,1054$	0,80	2,82
	Acetato pH 5,0	$= -0,5163*t + 3,0829$	0,89	1,94
	Fosfato pH 6,0	$= -0,2744*t + 2,9153$	0,85	3,64
	Fosfato pH 7,0	$= -0,0939*t + 2,7759$	0,98	10,65
	Tris-EDTA pH 8,0	$= -0,1489*t + 2,991$	0,98	6,71
90	Água	$= -0,4508*t + 3,0666$	0,81	2,22
	Acetato pH 5,0	$= -0,7073*t + 2,985$	0,83	1,41
	Fosfato pH 6,0	$= -0,3595*t + 2,9773$	0,79	2,78
	Fosfato pH 7,0	$= -0,2806*t + 3,0025$	0,86	3,56
	Tris-EDTA pH 8,0	$= -0,3023*t + 3,1686$	0,91	3,30
95	Água	$= -0,4587*t + 3,0827$	0,73	2,18
	Acetato pH 5,0	$= -0,6047*t + 3,0486$	0,80	1,65
	Fosfato pH 6,0	$= -0,4258*t + 2,8289$	0,76	2,35
	Fosfato pH 7,0	$= -0,344*t + 3,012$	0,81	2,91
	Tris-EDTA pH 8,0	$= -0,4218*t + 3,2258$	0,83	2,37

A GFPuv apresentou resistência térmica menor em solução tampão acetato, pH 5,0, correspondendo aos valores D de 4,08 min, 1,94 min, 1,41 min e 1,65 min às temperaturas de 80 °C, 85 °C, 90 °C e 95 °C, respectivamente (Tabela 18).

A instabilidade da GFPuv em tampão acetato é dada pela proximidade à faixa do ponto isoelétrico (pI), confirmada pela perda de 90% da intensidade de fluorescência após 3 minutos de exposição a 80 °C, sem a presença de glicose

Em solução-tampão fosfato pH 7,0, a GFPuv apresentou maior resistência térmica, com valores D de 40,32 min, 10,65 min, 3,56 min e 2,91 min nas temperaturas de 80 °C, 85 °C, 90 °C e 95 °C, respectivamente.

II. 3.2.2. Soluções de Glicose em água para injeção

A resistência térmica da GFPuv em soluções de glicose em água Milli-Q, a temperatura de 80 °C (tabela 19) foi similar à solução padrão, sem adição de glicose, onde o valor D = 13,85 minutos foi comparável aos valores D das soluções de até 10% de glicose.

Tabela 19. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em água Milli-Q e submetida a 80 °C

Glicose (m/v, %)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R^2 (*)	Valor D (min)
1,5	$= -0,075*t + 2,8527$	0,993	13,33
5	$= -0,0795*t + 2,7786$	0,995	12,58
7	$= -0,069*t + 2,7876$	0,996	14,49
10	$= -0,0833*t + 2,9346$	0,991	12,00
15	$= -0,0624*t + 2,7964$	0,997	16,03
20	$= -0,0544*t + 2,7068$	0,98	18,38
25	$= -0,0362*t + 2,6822$	0,98	27,62
30	$= -0,0357*t + 2,7427$	0,98	28,01
35	$= -0,0344*t + 2,6773$	0,98	29,07
40	$= -0,0525*t + 2,761$	0,994	19,05
45	$= -0,0462*t + 2,6373$	0,990	21,65
50	$= -0,0474*t + 2,7197$	0,990	21,10

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 30 minutos; t = tempo (s)

A resistência térmica da GFPuv em água alcançou valor máximo em concentrações entre 25% e 50% de glicose. A estabilidade térmica da GFPuv variou no intervalo entre 1,5% e 50% de glicose através da relação polinomial:

Valor D (min) =

$$= 10,263 + 0,7865 * (\text{glicose} (\%)) - 0,0117 * (\text{glicose} (\%))^2, (R^2=0,73)$$

Concentrações de até 30% de glicose em água favoreceram a resistência térmica da GFPuv.

A resistência térmica da GFPuv decaiu em concentrações superiores a 35% de glicose em água. Esta solução apresentou viscosidade de $\nu = 3,48$ mPa.s, duas vezes maior do que a solução padrão, sem adição de glicose, $\nu = 1,76$ mPa.s. A variação da viscosidade da solução com o aumento de glicose, no intervalo entre 1,5% e 50% seguiu a relação (Figura 11):

$$\text{Viscosidade (mPa.s)} = 1,84 - 0,0138 * (\text{glicose} (\%)) + 0,0018 * (\text{glicose} (\%))^2; (R^2 = 0,99) \text{ (Figura 11)}$$

Figura 11. Relação entre valores D e de viscosidade em função da concentração de glicose em Água Milli-Q

Tabela 20. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em água Milli-Q submetida a 85 °C

Glicose (m/v, %)	Equação Log₁₀ Intensidade =	R²(*)	Valor D (min)
1,5	= -0,198*t + 2,9334	0,94	5,05
5	= -0,191*t + 2,9055	0,96	5,24
7	= -0,2291*t + 2,8758	0,91	4,36
10	= -0,1858*t + 2,8912	0,96	5,38
15	= -0,1735*t + 2,8561	0,97	5,76
20	= -0,2066*t + 2,8884	0,93	4,84
25	= -0,1686*t + 2,9147	0,95	5,93
30	= -0,1834*t + 2,8787	0,91	5,45
35	= -0,1841*t + 2,8537	0,91	5,43
40	= -0,1679*t + 2,8408	0,96	5,95
45	= -0,1957*t + 2,8613	0,86	5,11
50	= -0,1294*t + 2,7364	0,97	7,73

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 15 minutos; t = tempo (s)

Os valores D para a GFPuv em soluções de glicose a temperatura de 85 °C (tabela 20) preparadas em água, variaram de D_{1,5%} = 5,05 min a D_{50%} = 7,73 min, representando redução de até 3 vezes na resistência térmica da GFPuv, quando comparada ao tratamento térmico à temperatura de 80 °C.

Os valores D para a GFPuv em soluções de glicose preparadas em água a temperatura de 90 °C, variaram de D_{1,5%} = 3,35 min a D_{50%} = 3,63 min (tabela 21).

Tabela 21. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em água Milli-Q submetida a 90 °C

Glicose (m/v, %)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R^2	Valor D (min)
1,5	$= -0,3082*t + 2,9181$	0,83	3,24
5	$= -0,2981*t + 2,9431$	0,89	3,35
7	$= -0,3114*t + 2,8464$	0,82	3,21
10	$= -0,2818*t + 2,9117$	0,84	3,55
15	$= -0,2715*t + 2,9099$	0,86	3,68
20	$= -0,2751*t + 2,9024$	0,85	3,64
25	$= -0,2305*t + 2,779$	0,89	4,34
30	$= -0,2575*t + 2,8512$	0,86	3,88
35	$= -0,2874*t + 2,9352$	0,85	3,48
40	$= -0,2385*t + 2,5665$	0,88	4,19
45	$= -0,2637*t + 2,8371$	0,81	3,79
50	$= -0,2756*t + 3,1331$	0,85	3,63

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 12 minutos; t = tempo (s)

À 90 °C reduziu em até 3 vezes a resistência térmica da GFPuv, quando comparada à temperatura de 80 °C e o valor D médio = 3,70 ($\pm 0,34$) min.

Os valores D para a GFPuv em soluções de glicose em água à 95 °C, variaram de 2,47 min a 3,06 min. À 95 °C, a temperatura sobressaiu à influência da glicose em solução, sendo o valor D médio = 2,79 ($\pm 0,31$) min (tabela 22).

Tabela 22. Tempos de redução decimal, valores D para a GFPuv em soluções de glicose em água Milli-Q submetida a 95 °C

Glicose (m/v, %)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R^2 (*)	Valor D (min)
1,5	$= -0,4049*t + 3,0718$	0,75	2,47
5	$= -0,3854*t + 2,9212$	0,79	2,59
7	$= -0,3619*t + 3,0439$	0,75	2,76
10	$= -0,3479*t + 2,9033$	0,81	2,87
15	$= -0,375*t + 2,8867$	0,78	2,67
20	$= -0,4038*t + 2,845$	0,82	2,48
25	$= -0,2878*t + 2,889$	0,83	3,47
30	$= -0,435*t + 3,0692$	0,75	2,30
35	$= -0,335*t + 3,0785$	0,83	2,98
40	$= -0,3648*t + 3,0851$	0,81	2,74
45	$= -0,3561*t + 2,8861$	0,77	2,81
50	$= -0,3266*t + 3,0203$	0,81	3,06

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 8 minutos; t = tempo (s)

II. 3.2.3. Soluções de Glicose em Tampão Acetato 10mM pH 5,0

A temperatura de 80 °C, a resistência térmica da GFPuv permaneceu constante, sendo o valor $D_{\text{médio}} = 4,48 (\pm 0,44)$ minutos (tabela 23) em soluções de glicose preparadas em tampão acetato pH 5,0 independentemente da adição gradual de glicose até a concentração de 35% e similar ao valor $D_{\text{médio}} = 4,72 (\pm 0,90)$ minutos para GFPuv em soluções de até 50% de glicose em solução tampão fosfato pH 6,0, a temperatura de 85 °C.

Tabela 23. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em solução tampão acetato pH 5,0, submetida a 80 °C

Glicose (m/v, %)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R^2	Valor D (min)
0	$= -0,24518*t + 2,791$	0,91	4,08
1,5	$= -0,2089*t + 2,6596$	0,93	4,79
5	$= -0,2359*t + 2,7123$	0,92	4,24
7	$= -0,2489*t + 2,7446$	0,92	4,02
10	$= -0,2157*t + 2,7457$	0,93	4,64
15	$= -0,2706*t + 2,6876$	0,92	3,70
20	$= -0,2241*t + 2,6822$	0,94	4,46
25	$= -0,1943*t + 2,6466$	0,95	5,15
30	$= -0,1205*t + 2,6929$	0,97	8,30
35	$= -0,1908*t + 2,6159$	0,96	5,24
40	$= -0,1595*t + 2,6189$	0,97	6,27
45	$= -0,1039*t + 2,6913$	0,98	9,62
50	$= -0,1*t + 2,6839$	0,997	10,00

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 30 minutos; t = tempo (s)

A resistência térmica de GFPuv em solução tampão acetato pH 5,0, a temperatura de 80 °C dobrou (valor D = 8,97 ($\pm 1,47$) minutos) para o intervalo entre 40% e 50% de glicose adicionada no sistema.

Tabela 24. Tempos de redução decimal, valor D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tampão acetato pH 5,0 submetida a 85 °C

Glicose (m/v, %)	Equação Log₁₀ Intensidade =	R²	Valor D (min)
0	= -0,5163*t + 3,0829	0,89	1,94
1,5	= -0,5397*t + 3,0913	0,84	1,85
5	= -0,5426*t + 3,0417	0,87	1,84
7	= -0,5544*t + 3,1636	0,88	1,80
10	= -0,3984*t + 2,9141	0,82	2,51
15	= -0,4978*t + 2,751	0,84	2,01
20	= -0,383*t + 2,8792	0,84	2,61
25	= -0,4693*t + 2,8278	0,83	2,13
30	= -0,3392*t + 2,8503	0,86	2,95
35	= -0,4096*t + 2,688	0,84	2,44
40	= -0,2856*t + 2,8253	0,88	3,50
45	= -0,2856*t + 2,8253	0,88	3,50
50	= -0,3044*t + 2,5852	0,89	3,29

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 15 minutos; t = tempo (s)

À 85 °C, os valores D para GFPuv no intervalo de concentração entre 1,5% e 50% de glicose variaram de valor D = 1,94 minutos a D = 3,29 minutos, reduzindo a resistência térmica da GFPuv em até 3 vezes, quando comparada à resistência em temperatura de 80 °C (tabela 24).

Tabela 25. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tampão acetato pH 5,0 e submetida a 90 °C

Glicose (m/v, %)	Equação Log₁₀ Intensidade =	R²	Valor D (min)
0	= -0,7073*t + 2,985	0,83	1,41
1,5	= -0,6415*t + 2,948	0,82	1,56
5	= -0,6089*t + 2,958	0,81	1,64
7	= -0,626*t + 2,9207	0,81	1,60
10	= -0,6216*t + 3,0048	0,82	1,61
15	= -0,6159*t + 2,8366	0,81	1,62
20	= -0,6627*t + 2,9994	0,82	1,51
25	= -0,5523*t + 2,8192	0,82	1,81
30	= -0,4345*t + 2,8854	0,81	2,30
35	= -0,4987*t + 2,8332	0,82	2,01
40	= -0,5085*t + 2,7872	0,82	1,97
45	= -0,3931*t + 2,8971	0,81	2,54
50	= -0,3686*t + 2,8516	0,82	2,71

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 12 minutos; t = tempo (s)

A temperatura de 90 °C, os valores D variaram de 1,56 a 2,71 minutos no intervalo entre 1,5% e 50% de glicose em tampão acetato pH 5,0 (tabela 25). A estabilidade da GFPuv em concentração de até 50% de glicose em tampão acetato foi metade do valor determinado, em sistema tampão fosfato pH 6,0 ($D = 4,72 (\pm 0,90)$ minutos) e em água Milli-Q, ($D = 5,32 (\pm 0,48)$ minutos) em concentração entre 1,5% e 45% de glicose.

Tabela 26. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tampão acetato pH 5,0 e submetida a 95 °C

Glicose (m/v, %)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R²	Valor D (min)
0	$= -0,6047*t + 3,0486$	0,8	1,65
1,5	$= -0,6392*t + 2,866$	0,78	1,56
5	$= -0,6627*t + 2,8806$	0,79	1,51
7	$= -0,7418*t + 2,8962$	0,79	1,35
10	$= -0,6511*t + 2,8637$	0,78	1,54
15	$= -0,6595*t + 2,8315$	0,79	1,52
20	$= -0,7214*t + 2,8766$	0,8	1,39
25	$= -0,6863*t + 2,8643$	0,8	1,46
30	$= -0,5229*t + 2,9223$	0,78	1,91
35	$= -0,6238*t + 2,8232$	0,8	1,60
40	$= -0,6138*t + 2,846$	0,81	1,63
45	$= -0,4633*t + 2,8892$	0,79	2,16
50	$= -0,5149*t + 2,8832$	0,79	1,94

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 8 minutos; t = tempo (s)

A temperatura de 95 °C, os valores D variaram de 1,56 a 1,94 minutos para o intervalo entre 1,5% e 50% de glicose em tampão acetato pH 5,0 (tabela 26), sendo o valor D médio = $1,60 (\pm 0,22)$ minutos.

II. 3.2.4. Soluções de Glicose em Tampão Fosfato 10 mM pH 6,0

Tabela 27. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose preparadas em solução tampão fosfato pH 6,0 e submetida a 80 °C

Glicose (m/v, %)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R²	Valor D (min)
0	$= -0,0649 \cdot t + 2,7589$	0,991	15,41
1,5	$= -0,1087 \cdot t + 2,9164$	0,994	9,20
5	$= -0,1175 \cdot t + 2,9031$	0,993	8,51
7	$= -0,0837 \cdot t + 2,7062$	0,999	11,95
10	$= -0,1036 \cdot t + 2,8612$	0,997	9,65
15	$= -0,1209 \cdot t + 2,9109$	0,993	8,27
20	$= -0,0652 \cdot t + 2,6954$	0,999	15,34
25	$= -0,0932 \cdot t + 2,7318$	0,998	10,73
30	$= -0,0759 \cdot t + 2,6685$	0,999	13,75
35	$= -0,0541 \cdot t + 2,6267$	0,998	18,48
40	$= -0,0439 \cdot t + 2,5364$	0,996	22,78
45	$= -0,0345 \cdot t + 2,5745$	0,994	28,98
50	$= -0,039 \cdot t + 2,5654$	0,996	25,64

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 30 minutos; t = tempo (s)

A temperatura de 80 °C, o valor D = 15,41 minutos para GFPuv em tampão de fosfato pH 6,0, sem adição de glicose, decaiu para valor D = 9,52 ($\pm 1,47$) minutos com adição de até 15% de glicose em solução (tabela 27).

A resistência térmica da GFPuv foi de valor D = 14,58 ($\pm 3,23$) minutos entre 20% e 35% de glicose.

Tabela 28. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose preparadas em solução tampão fosfato pH 6,0 submetida a 85 °C

Glicose (m/v, %)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R²	Valor D (min)
0	$= -0,2744*t + 2,9153$	0,85	3,64
1,5	$= -0,2451*t + 2,9528$	0,88	4,08
5	$= -0,2619*t + 2,9974$	0,88	3,82
7	$= -0,2513*t + 2,9675$	0,87	3,98
10	$= -0,2262*t + 2,9435$	0,89	4,42
15	$= -0,1792*t + 2,9062$	0,95	5,58
20	$= -0,2324*t + 3,0045$	0,92	4,30
25	$= -0,222*t + 2,9243$	0,9	4,50
30	$= -0,221*t + 2,9897$	0,92	4,52
35	$= -0,2007*t + 2,9229$	0,93	4,98
40	$= -0,1941*t + 2,8899$	0,93	5,15
45	$= -0,1446*t + 2,8387$	0,97	6,92
50	$= -0,1831*t + 2,9119$	0,96	5,46

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 15 minutos; t = tempo (s)

A temperatura de 85 °C, os valores D foram reduzidos de três (até 30% de glicose) a quatro (entre 35% e 50% de glicose) vezes em relação ao tratamento a temperatura de 80 °C (tabela 28).

A adição de até 30% de glicose não interferiu na estabilidade térmica da GFPuv, na qual o valor D = 4,32 ($\pm 0,57$) minutos foi próximo ao valor em solução tampão sem adição de glicose (D = 3,64 minutos).

O intervalo de concentração entre 35% e 50% de glicose proporcionou aumento de 30% no valor D = 5,63 ($\pm 0,88$) minutos, que foi similar em água Milli-Q entre 1,5% e 45% de glicose (valor D = 5,32 ($\pm 0,48$) minutos) e em água Milli-Q com até 50% de glicose (valor D = 5,31 ($\pm 1,09$) min).

Tabela 29. Tempo de redução decimal, valor D, para a GFPuv em soluções de glicose preparadas em solução tampão fosfato pH 6,0 e submetida a 90 °C

Glicose (m/v, %)	Equação Log₁₀ Intensidade =	R²	Valor D (min)
0	= -0,3595*t + 2,9773	0,79	2,78
1,5	= -0,3021*t + 2,9707	0,81	3,31
5	= -0,374*t + 2,9534	0,77	2,67
7	= -0,355*t + 3,0011	0,81	2,82
10	= -0,3182*t + 2,9965	0,82	3,14
15	= -0,3464*t + 3,03	0,78	2,89
20	= -0,3319*t + 2,9938	0,81	3,01
25	= -0,341*t + 2,9628	0,82	2,93
30	= -0,3166*t + 2,9362	0,82	3,16
35	= -0,3113*t + 2,9406	0,84	3,21
40	= -0,2787*t + 2,952	0,87	3,59
45	= -0,2503*t + 2,931	0,90	4,00
50	= -0,2695*t + 2,915	0,88	3,71

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 12 minutos; t = tempo (s)

À 90 °C e 95 °C (tabelas 29 e 30), em soluções de até 50% de glicose em solução tampão fosfato pH 6,0, a estabilidade térmica diferenciou-se em até 20%, sendo $D_{90^{\circ}\text{C}} = 3,17(\pm 0,39)$ minutos e $D_{95^{\circ}\text{C}} = 2,50 (\pm 0,28)$ minutos, similares em água Milli-Q com até 50% de glicose.

Tabela 30. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose preparadas em solução tampão fosfato pH 6,0 e submetida a 95 °C

Glicose (m/v, %)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R²	Valor D (min)
0	$= -0,4258*t + 2,8289$	0,76	2,35
1,5	$= -0,431*t + 3,0511$	0,76	2,32
5	$= -0,4161*t + 2,9907$	0,75	2,40
7	$= -0,4208*t + 2,9958$	0,75	2,38
10	$= -0,4149*t + 2,973$	0,77	2,41
15	$= -0,4099*t + 2,9818$	0,76	2,44
20	$= -0,41*t + 3,0007$	0,82	2,44
25	$= -0,4034*t + 2,9757$	0,77	2,48
30	$= -0,3938*t + 2,9622$	0,78	2,54
35	$= -0,3651*t + 2,9482$	0,83	2,74
40	$= -0,4041*t + 3,0061$	0,83	2,47
45	$= -0,3355*t + 2,9398$	0,85	2,98
50	$= -0,383*t + 2,9977$	0,89	2,61

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 8 minutos; t = tempo (s)

Sistemas de tampão fosfato pH 6,0 e água Milli-Q proporcionaram estabilidade térmica para GFPuv no intervalo de temperatura entre 85 °C e 95 °C mesmo com a adição de 50% de glicose nas soluções, onde a resistência térmica da proteína foi estável quando comparada com solução de glicose 1,5% ou solução padrão.

II. 3.2.5. Soluções de Glicose em Tampão Fosfato 10mM pH 7,0

Tabela 31. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tampão fosfato pH 7,0 e submetida a 80 °C

Glicose (m/v, %)	Equação Log₁₀ Intensidade =	R²	Valor D (min)
1,5	= -0,0344*t + 2,6774	0,98	29,07
5	= -0,0242*t + 2,6399	0,97	41,32
7	= -0,028*t + 2,6494	0,97	35,71
10	= -0,0272*t + 2,6708	0,97	36,76
15	= -0,0229*t + 2,6846	0,98	43,67
20	= -0,0208*t + 2,7075	0,98	48,08
25	= -0,0192*t + 2,6618	0,97	52,08
30	= -0,0167*t + 2,5299	0,96	59,88
35	= -0,0138*t + 2,6229	0,97	72,46
40	= -0,0135*t + 2,5866	0,98	74,07
45	= -0,0112*t + 2,5627	0,96	89,29
50	= -0,0083*t + 2,5525	0,96	120,48

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 30 minutos; t = tempo (s)

A temperatura de 80 °C, a estabilidade térmica da GFPuv em tampão fosfato pH 7,0 (tabela 31), apresentou aumento de 4 vezes no valor D ($D_{1,5\%} = 29,07$ minutos e $D_{50\%} = 120,48$ minutos). Em relação à solução tampão sem adição de glicose, o aumento foi de 3 vezes ($D_{0\%} = 40,32$ minutos e $D_{50\%} = 120,48$ minutos).

A presença de até 50% de glicose na solução tampão favoreceu a resistência da GFPuv à desnaturação da proteína.

Tabela 32. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em tampão fosfato pH 7,0 e submetida a 85 °C

Glicose (m/v, %)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R²	Valor D (min)
1,5	$= -0,102*t + 2,8279$	0,98	9,80
5	$= -0,0897*t + 2,7989$	0,992	11,15
7	$= -0,0924*t + 2,8034$	0,993	10,82
10	$= -0,0939*t + 2,7968$	0,992	10,65
15	$= -0,0792*t + 2,7368$	0,996	12,63
20	$= -0,0889*t + 2,778$	0,995	11,25
25	$= -0,0518*t + 2,6339$	0,96	19,31
30	$= -0,0579*t + 2,689$	0,990	17,27
35	$= -0,0437*t + 2,6597$	0,97	22,88
40	$= -0,0448*t + 2,6449$	0,97	22,32
45	$= -0,0418*t + 2,5846$	0,97	23,92
50	$= -0,0309*t + 2,6053$	0,96	32,36

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 15 minutos; t = tempo (s)

A temperatura de tratamento de 85 °C ocasionou redução de quatro vezes na estabilidade térmica de GFPuv quando comparada à temperatura de 80 °C (tabela 32).

Os valores D decaíram de $D_{1,5\% - 80\text{ }^{\circ}\text{C}} = 40,32$ minutos e $D_{50\% - 80\text{ }^{\circ}\text{C}} = 120,36$ minutos a temperatura de 80 °C para $D_{1,5\% - 85\text{ }^{\circ}\text{C}} = 10,65$ minutos e $D_{50\% - 85\text{ }^{\circ}\text{C}} = 32,36$ minutos a temperatura de 85 °C, respectivamente.

Tabela 33. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tampão fosfato pH 7,0 e submetida a 90 °C

Glicose (m/v, %)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R²	Valor D (min)
1,5	$= -0,2646*t + 3,0015$	0,86	3,78
5	$= -0,2604*t + 2,9815$	0,86	3,84
7	$= -0,2562*t + 2,9893$	0,88	3,90
10	$= -0,2497*t + 3,0207$	0,88	4,00
15	$= -0,2407*t + 2,9342$	0,88	4,15
20	$= -0,231*t + 3,0349$	0,93	4,33
25	$= -0,1961*t + 2,9163$	0,95	5,10
30	$= -0,1955*t + 2,9082$	0,94	5,12
35	$= -0,1464*t + 2,9593$	0,97	6,83
40	$= -0,1234*t + 2,8085$	0,98	8,10
45	$= -0,1394*t + 2,8249$	0,98	7,17
50	$= -0,115*t + 2,757$	0,992	8,70

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 12 minutos; t = tempo (s)

O aumento da temperatura de tratamento de 85 °C para 90 °C reduziu três vezes a estabilidade térmica da GFPuv (tabela 33).

Os valores D para a GFPuv em temperatura de tratamento de 90 °C em solução tampão de pH 7,0 para GFPuv foram de $D_{1,5\%} = 3,56$ minutos a $D_{45\%} = 7,17$ minutos até a concentração de 45% de glicose

Houve redução de 4 vezes na resistência térmica da GFPuv em solução de glicose 50% ($D = 8,70$ minutos) em relação à temperatura de 85 °C ($D = 32,36$ minutos), e similar em solução de glicose 1,5% a temperatura de 85 °C ($D_{1,5\%} = 9,80$ minutos).

Tabela 34. Tempos de redução decimais, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tampão fosfato pH 7,0 e submetida a 95 °C

Glicose (m/v, %)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R²	Valor D (min)
1,5	$= -0,3203*t + 2,9175$	0,81	3,12
5	$= -0,3209*t + 2,9699$	0,81	3,12
7	$= -0,3346*t + 2,9258$	0,81	2,99
10	$= -0,3289*t + 2,9533$	0,84	3,04
15	$= -0,3289*t + 2,9689$	0,82	3,04
20	$= -0,321*t + 2,9559$	0,83	3,12
25	$= -0,3174*t + 2,9673$	0,84	3,15
30	$= -0,2996*t + 2,9035$	0,87	3,34
35	$= -0,2844*t + 2,9057$	0,87	3,52
40	$= -0,2458*t + 2,884$	0,93	4,07
45	$= -0,2741*t + 2,8907$	0,89	3,65
50	$= -0,2652*t + 2,9161$	0,91	3,77

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 8 minutos; t = tempo (s)

A temperatura de tratamento de 95 °C exerceu maior influência sobre a estabilidade térmica da GFPuv do que a concentração de glicose presente em solução tampão fosfato pH 7,0 (tabela 34).

Os valores D variaram de 3,12 min (sem adição de glicose) a 3,77 min (50% de glicose). Dessa forma, o valor D médio de 3,22 ($\pm 0,28$) minutos confirmou a similaridade de comportamento da GFPuv em solução tampão fosfato pH 7,0, tratada a temperatura de 90 °C, independentemente da concentração de glicose adicionada ao meio.

A avaliação da estabilidade térmica da GFPuv em solução tampão fosfato pH 7,0 com adição de glicose até a concentração de 50%, proporcionou melhor análise do comportamento da GFPuv na faixa de temperatura entre 85°C e 95°C, sendo o decaimento da intensidade de fluorescência expresso em termos de tempo de redução decimal, valor D.

A adição gradual de glicose manteve a intensidade de fluorescência da GFPuv submetida ao tratamento térmico.

II. 3.2.6. Soluções de Glicose em Tampão Tris-EDTA 10 mM pH 8,0

A adição de até 50% de glicose em solução favoreceu a resistência térmica da GFPuv frente à temperatura de tratamento de 80 °C (Tabela 35).

O aumento da estabilidade da proteína foi linear com o aumento da concentração de glicose (Figura 12) e pode ser representado pela equação:

$$\text{Valor D (min)} = 1,6241 * \text{Glicose}(\%) + 29,83, R^2 = 0,93$$

Figura 12. Variação do valor D com o aumento da concentração de glicose em tris-EDTA pH 8,0

Tabela 35. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tris-EDTA pH 8,0 submetida a 80 °C

Glicose (m/v, %)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R²	Valor D (min)
0	$= -0,037*t + 2,7392$	0,997	27,03
1,5	$= -0,0396*t + 2,5941$	0,998	25,25
5	$= -0,0292*t + 2,6769$	0,995	34,25
7	$= -0,0259*t + 2,5161$	0,995	38,61
10	$= -0,0192*t + 2,494$	0,98	52,08
15	$= -0,0173*t + 2,5712$	0,990	57,80
20	$= -0,0149*t + 2,4888$	0,993	67,11
25	$= -0,0148*t + 2,5617$	0,993	67,57
30	$= -0,0103*t + 2,4171$	0,98	97,09
35	$= -0,0115*t + 2,5642$	0,991	86,96
40	$= -0,0106*t + 2,5363$	0,98	94,34
45	$= -0,0108*t + 2,5947$	0,992	92,59
50	$= -0,0093*t + 2,6046$	0,98	107,53

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 30 minutos; t = tempo (s)

A adição de 7% de glicose aumentou em 20% a resistência térmica da GFPuv em solução de Tris-EDTA a 80°C.

Concentrações entre 10% e 25% de glicose, aumentaram em 2,0 a 2,5 vezes a estabilidade térmica da proteína, e, concentrações superiores a 30% de glicose, aumentaram de três a quatro vezes a resistência térmica da GFPuv em relação à solução sem adição de glicose (tabela 35).

A temperatura de 85 °C, nas soluções preparadas em tris-EDTA pH 8,0, a resistência térmica da GFPuv foi reduzida em 3 vezes em relação a 80 °C (tabela 36).

Tabela 36. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tris-EDTA pH 8,0 submetida a 85 °C

Glicose (m/v, %)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R²	Valor D (min)
0	$= -0,1489 \cdot t + 2,991$	0,98	6,71
1,5	$= -0,1501 \cdot t + 2,9981$	0,98	6,66
5	$= -0,1503 \cdot t + 2,9865$	0,98	6,65
7	$= -0,1646 \cdot t + 2,9926$	0,97	6,07
10	$= -0,1454 \cdot t + 2,9668$	0,990	6,88
15	$= -0,0817 \cdot t + 2,7859$	0,999	12,24
20	$= -0,0829 \cdot t + 2,7823$	0,98	12,06
25	$= -0,0564 \cdot t + 2,6746$	0,996	17,73
30	$= -0,0819 \cdot t + 2,7837$	0,998	12,21
35	$= -0,0565 \cdot t + 2,5908$	0,998	17,70
40	$= -0,0624 \cdot t + 2,6207$	0,998	16,02
45	$= -0,0349 \cdot t + 2,6582$	0,996	28,65
50	$= -0,0302 \cdot t + 2,6334$	0,996	33,11

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 15 minutos; t = tempo (s)

A curva de decaimento da intensidade de fluorescência pelo tempo de exposição teve queda mais acentuada em relação à temperatura de 80 °C. Entretanto, concentrações de até 50% realçaram a capacidade da proteína de resistir ao desdobramento.

Soluções entre 45% e 50% de glicose proporcionaram à GFPuv sistema de resistência de 4 a 5 vezes maior se comparado à solução tampão sem adição de glicose a 85 °C.

Em concentrações de até 10% de glicose, a estabilidade térmica da GFPuv foi constante em relação à solução tampão sem adição de glicose. A estabilidade em 10% de glicose foi reduzida em 7 vezes se comparada à temperatura de 80 °C.

A temperatura de 90 °C, os valores D para a GFPuv variaram de 3,45 a 6,12 minutos (tabela 37). Concentrações de até 15% de glicose em solução não influenciaram a estabilidade térmica da GFPuv, se comparadas à solução tampão sem adição de glicose.

Tabela 37. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tris-EDTA pH 8,0 submetida a 90 °C

Glicose (m/v, %)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R²	Valor D (min)
0	$= -0,3023*t + 3,1686$	0,91	3,30
1,5	$= -0,274*t + 2,9366$	0,89	4,05
5	$= -0,2897*t + 2,9741$	0,87	3,45
7	$= -0,2874*t + 2,9795$	0,87	3,48
10	$= -0,261*t + 2,972$	0,90	3,83
15	$= -0,2593*t + 3,037$	0,90	3,86
20	$= -0,1746*t + 2,8823$	0,94	5,73
25	$= -0,1888*t + 3,0291$	0,95	5,30
30	$= -0,2345*t + 2,8983$	0,92	4,26
35	$= -0,2385*t + 2,9161$	0,91	4,19
40	$= -0,2208*t + 2,8968$	0,93	4,53
45	$= -0,169*t + 2,9197$	0,97	5,91
50	$= -0,1635*t + 2,9026$	0,96	6,12

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 12 minutos; t = tempo (s)

Concentrações de glicose entre 20% e 40% aumentaram a estabilidade da GFPuv entre 30% e 70% em relação à solução padrão, enquanto concentrações entre 45% e 50% de glicose aumentaram a resistência térmica da GFPuv entre 80% e 85%.

Tabela 38. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de glicose em solução tris-EDTA pH 8,0 submetida a 95 °C

Glicose (m/v, %)	Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R²	Valor D (min)
0	$= -0,4218*t + 3,2258$	0,83	2,37
1,5	$= -0,4006*t + 3,1233$	0,84	2,50
5	$= -0,3915*t + 3,1481$	0,84	2,55
7	$= -0,3938*t + 3,1758$	0,87	2,54
10	$= -0,399*t + 3,1727$	0,85	2,51
15	$= -0,3379*t + 2,9234$	0,82	2,96
20	$= -0,3648*t + 3,1293$	0,85	2,74
25	$= -0,3258*t + 3,0356$	0,83	3,07
30	$= -0,3461*t + 3,0987$	0,87	2,89
35	$= -0,3416*t + 3,1195$	0,86	2,93
40	$= -0,3227*t + 2,9947$	0,87	3,10
45	$= -0,2851*t + 2,9871$	0,88	3,51
50	$= -0,2557*t + 2,9523$	0,90	3,91

(*) leituras a cada 5 segundos, por até 8 minutos; t = tempo (s)

A temperatura de 95 °C, os valores D variaram entre 2,50 minutos e 3,91 minutos para concentrações entre 1,5% e 50% de glicose (tabela 38).

A influência da glicose sobre a resistência térmica da GFPuv proporcionou aumento de 50% e 65% na estabilidade de GFPuv, nas soluções de 45% e 50%, respectivamente, em relação à solução com 1,5% de glicose (Figura 13).

Figura 13. Curvas de inativação da GFPuv, em solução de glicose e Tris-EDTA, pH 8,0, exposto a temperatura constante de 90°C e 95°C

Nos tratamentos realizados a 90 °C e 95 °C, a temperatura exerceu maior influência sobre a estabilidade térmica da GFPuv.

Embora características de algumas soluções parecessem ter contribuído para as mudanças na forma da curva de decaimento da intensidade de fluorescência, os valores D foram calculados a partir da inclinação de reta da curva semi-logarítmica média, da curva de decaimento.

A coincidência entre os valores D e o tempo de exposição quando ocorreu a inflexão na curva, reforça o uso do valor D médio para estudar a estabilidade térmica da proteína.

As temperaturas de 90 °C e 95 °C, a redução na intensidade de fluorescência da GFPuv mostrou tendência de duas inclinações de reta distintas para todas as concentrações de glicose (Figura 13). Estas inclinações foram relacionadas aos valores D das soluções com glicose e das soluções tampão sem adição de glicose.

Em 90°C, a estabilidade térmica da GFPuv foi o dobro em 50% de glicose se comparada ao valor D em 1,5% de glicose na mesma temperatura. O aumento dos valores D foi proporcional à concentração de glicose presente em solução, indicando a resistência da proteína à temperatura.

II.3.3. Resistência térmica da GFPuv em água (WFI) e soluções tampão acetato 10mM pH 5,0, fosfato 10mM pH 6,0 e 7,0 e tris-EDTA 10mM pH 8,0

Tabela 39. Valores D da GFPuv em sistemas de glicose exposta às temperaturas de 80 °C, 85 °C, 90 °C e 95 °C

Valor D (min)					
Glicose (%)	Água Milli-Q	Acetato 10mM pH 5,0	Fosfato 10mM pH 6,0	Fosfato 10mM pH 7,0	Tris-EDTA 10mM pH 8,0
80 °C					
0	13,85	4,08	15,41	40,32	27,03
1,5	13,33	4,79	9,20	29,07	25,25
5	12,58	4,24	8,51	41,32	34,25
7	14,49	4,02	11,95	35,71	38,61
10	12,00	4,64	9,65	36,76	52,08
15	16,03	3,70	8,27	43,67	57,80
20	18,38	4,46	15,34	48,08	67,11
25	27,62	5,15	10,73	52,08	67,57
30	28,01	4,51	13,75	59,88	97,09
35	29,07	5,24	18,48	72,46	86,96
40	19,05	7,29	22,78	74,07	94,34
45	21,65	9,62	28,98	89,29	92,59
50	21,10	10,00	25,64	120,48	107,53
85 °C					
0	2,82	1,94	3,64	10,65	6,71
1,5	5,05	1,85	4,08	9,80	6,66
5	5,24	1,84	3,82	11,15	6,65
7	4,36	1,80	3,98	10,82	6,07
10	5,38	2,51	4,42	10,65	6,88
15	5,76	2,01	5,58	12,63	12,24
20	4,84	2,61	4,30	11,25	12,06
25	5,93	2,13	4,50	19,31	17,73
30	5,45	2,95	4,52	17,27	12,21
35	5,43	2,44	4,98	22,88	17,70
40	5,95	3,60	5,15	22,32	16,02
45	5,11	3,50	6,92	23,92	28,65
50	7,73	3,29	5,46	32,36	33,11

Tabela 39. Valores D da GFPuv em sistemas de glicose exposta às temperaturas de 80 °C, 85 °C, 90 °C e 95 °C (continuação)

Valor D(min)					
Glicose (%)	Água Milli-Q	Acetato 10mM pH 5,0	Fosfato 10mM pH 6,0	Fosfato 10mM pH 7,0	Tris-EDTA 10mM pH 8,0
90 °C					
0	2,22	1,41	2,78	3,56	3,30
1,5	3,24	1,56	3,31	3,78	4,05
5	3,35	1,64	2,67	3,84	3,45
7	3,21	1,60	2,82	3,90	3,48
10	3,55	1,61	3,14	4,00	3,83
15	3,68	1,62	2,89	4,15	3,86
20	3,64	1,51	3,01	4,33	5,73
25	4,34	1,81	2,93	5,10	5,30
30	3,88	2,30	3,16	5,12	4,26
35	3,48	2,01	3,21	6,83	4,19
40	4,19	1,97	3,59	7,17	4,53
45	3,79	2,54	4,00	8,70	5,91
50	3,63	2,71	3,71	8,10	6,12
95 °C					
0	2,18	1,65	2,35	2,91	2,37
1,5	2,47	1,56	2,32	3,12	2,50
5	2,59	1,51	2,40	3,12	2,55
7	2,76	1,35	2,38	2,99	2,54
10	2,87	1,54	2,41	3,04	2,51
15	2,67	1,52	2,44	3,04	2,96
20	2,48	1,39	2,44	3,12	2,74
25	2,47	1,46	2,48	3,15	3,07
30	2,30	1,91	2,54	3,34	2,89
35	2,98	1,60	2,74	3,52	2,93
40	2,74	1,63	2,47	4,07	3,10
45	2,81	2,16	2,98	3,65	3,51
50	3,06	1,94	2,61	3,77	3,91

A presença de até 50% de glicose nas soluções tampão de acetato pH 5,0, fosfato pH 6,0 e 7,0, a 80 °C, favoreceu a resistência da proteína a desnaturação (tabela 39).

A estabilidade da proteína proporcional ao aumento da concentração de glicose presente pode ser relacionada com as equações para cada sistema:

(a) para acetato pH 5,0:

$$\text{Valor D (min)} = 0,0046 * (\text{glicose (\%)})^2 - 0,1208 * (\text{glicose (\%)}) + 4,6986; (R^2 = 0,92)$$

(b) para fosfato pH 6,0:

$$\text{Valor D (min)} = 0,012 * (\text{glicose } (\%))^2 - 0,2429 * (\text{glicose } (\%)) + 11,656; (R^2 = 0,91)$$

(c) para fosfato pH 7,0:

$$\text{Valor D (min)} = 0,037 * (\text{glicose } (\%))^2 - 0,3679 * (\text{glicose } (\%)) + 37,625; (R^2 = 0,96).$$

A resistência térmica da GFPuv em soluções tampão seguiu uma tendência polinomial similar para os intervalos:

(a) entre 1,5% e 10% de glicose em tampão fosfato pH 7,0 e entre 1,5% e 30% em tampão acetato pH 5,0 e fosfato pH 6,0, onde os valores D foram comparados com àqueles das soluções tampão sem adição de glicose;

(b) entre 10% e 50% de glicose em solução tampão fosfato pH 7,0, entre 30% e 50% em solução tampão acetato pH 5,0 e entre 25% e 50% em solução tampão fosfato pH 6,0, onde a resistência térmica da GFPuv aumentou linearmente.

A presença de até 50% de glicose em solução tampão fosfato pH 7,0 favoreceu a resistência térmica da GFPuv e foi relacionada a solução sem adição de glicose pela relação:

$$\text{Valor D (min)} = 0,037 * (\text{Glicose } (\%))^2 - 0,3679 * (\text{Glicose } (\%)) + 37,625 \\ (R^2 = 0,96)$$

A tendência polinomial para o aumento da resistência térmica da GFPuv em solução tampão fosfato pH 7,0 foi observado em soluções de glicose acima de 15%, onde houve aumento de 2,79 unidades de valor D, a cada acréscimo de 5% de glicose, atingindo o máximo de 15,74 unidades em solução de 50%.

No intervalo de concentração entre 10%-30% de glicose em água Milli-Q, a cada 5% de aumento na concentração de glicose, houve incremento de 4,36 unidades para os valores D relacionados pela equação:

$$\text{Valor D (min)} = 2,964 + 0,8722 * (\text{glicose, } \%); (R^2 = 0,93).$$

No intervalo entre 35% e 50% de glicose preparada em água, a cada 5% de aumento na concentração de glicose, houve decréscimo de 2,13 unidades para os valores D relacionados pela equação:

$$\text{Valor D (min)} = 40,14 - 0,428 * (\text{glicose, } \%); (R^2 = 0,90).$$

No intervalo de concentração entre 35% e 50% de glicose em solução tampão acetato, para cada incremento de 5% de glicose em solução, houve um incremento de 1,54 unidades para todos os valores D relacionados pela relação linear:

$$\text{Valor D (min)} = 0,3072 * ((\text{Glicose (\%)} - 4,6986), (R^2=0,95)$$

No intervalo de concentração entre 25% e 50% de glicose em solução tampão fosfato pH 6,0, a cada incremento de 5% de glicose em solução, houve um aumento de 3,6 unidades para todos os valores D relacionados pela relação linear:

$$\text{Valor D (min)} = 0,7117 * (\text{glicose(\%)} - 6,6271), (R^2=0,90).$$

A presença de até 50% de glicose em solução tampão fosfato pH 7,0 proporcionou à GFPuv resistência térmica exibindo cinco comportamentos distintos de linearidade nos intervalos de concentração entre:

(a) 1,5% e 50% de glicose, a cada 5% de glicose houve um incremento de 7,04 unidades para todos os valores D relacionados, para todos os valores D relacionados dados pela equação:

$$\text{Valor D (min)} = 1,4072 * (\text{glicose(\%)} + 26,48), (R^2=0,86);$$

(b) 5% e 45% de glicose, a cada 5% de glicose em solução houve incremento de 6,19 unidades para todos os valores D relacionados, para todos os valores D relacionados dados pela equação:

$$\text{Valor D (min)} = 1,2386 * (\text{glicose(\%)} + 26,596; (R^2=0,93);$$

(c) 10% a 40% de glicose, a cada 5% de glicose em solução houve incremento de 6,48 unidades para todos os valores D relacionados, para todos os valores D relacionados dados pela equação:

$$\text{Valor D (min)} = 1,295 * (\text{glicose(\%)} + 22,909, (R^2=0,97);$$

(d) 10% a 45% de glicose, a cada 5% de glicose em solução houve um incremento de 7,15 unidades para todos os valores D relacionados dados pela equação:

$$\text{Valor D (min)} = 1,4301 * (\text{glicose(\%)} + 20,208, (R^2=0,96);$$

(e) 40% a 50% de glicose, a cada 5% de glicose em solução houve incremento de 23,20 unidades para todos os valores D relacionados, para todos os valores D relacionados dados pela equação:

$$\text{Valor D (min)} = 4,641 * (\text{glicose}(\%)) - 114,23, (R^2=0,96);$$

Nas soluções preparadas em água, em concentrações superiores a 30% de glicose em solução, a resistência térmica da GFPuv decaiu linearmente: para cada adição de 5% de glicose em solução, houve decaimento de 2,13 unidades no valor D da GFPuv.

A temperatura de 85 °C, a adição de até 20% de glicose na solução tampão fosfato pH 7,0, proporcionou à GFPuv resistência térmica de $D_{1,5\% - 20\% \text{ (média)}} = 10,99 (\pm 0,86)$ minutos, sendo a estabilidade 20% maior em relação àquela em solução de glicose em tris-EDTA nas concentrações de até 10% de glicose ($D = 6,59$ minutos) e similar ao intervalo entre 15% e 30% de glicose em Tris-EDTA pH 8 ($D = 12,17 (\pm 0,10)$ minutos). No intervalo de concentração entre 25% e 30% de glicose e entre 35% e 40% de glicose houve elevação gradual de 1,5 e 2,0 vezes na resistência térmica da GFPuv, respectivamente, representadas pelas médias, Valor D = 18,29 ($\pm 1,44$) minutos e valor D = 23,04 ($\pm 0,81$) minutos. Os valores D determinados foram próximos àqueles das soluções de glicose em Tris-EDTA 10 mM, $D = 16,89 (\pm 1,44)$ minutos e $D = 28,65$ minutos para as soluções de 35% e 40% de glicose e de 45%, respectivamente.

Concentração de glicose acima de 10% foi proporcional aos valores D determinados pela relação:

Valor D (pH 7,0) = $4,5347 + 0,4881 * (\text{glicose, \%})$, $R^2 = 0,90$, a qual apresentou valor D = 32,36 minutos em fosfato pH 7,0, próximo ao valor D = 33,11 minutos em sistema de tris-EDTA em solução de glicose 50%, sendo a estabilidade: (i) três vezes maior nas concentrações de até 20% de glicose em tampão fosfato pH 7,0 e (ii) 6 vezes maior do que em soluções de até 10% de glicose em tris-EDTA pH 8,0.

Em solução de Tris-EDTA pH 8,0, houve aumento do valor D proporcional à glicose adicionada à solução até a concentração de 30%, na qual a inclinação linear

(D - valor (pH 8) = 1,055(%) glicose) - 20,662; $R^2 = 0,88$) mostrou maior vulnerabilidade da GFPuv a temperatura de 85 °C em sistema de Tris-EDTA/glicose do que em tampão fosfato pH 7,0.

Concentração de 50% de glicose em tampão fosfato pH 7,0 e em Tris-EDTA pH 8,0 a 85 °C forneceu estabilidade térmica similar à encontrada em 7% e 10% de glicose, à 80 °C.

A estabilidade térmica da GFPuv, em concentrações de até 20% de glicose em solução fosfato pH 7,0, a 90 °C, variou de valor $D_{0\%} = 3,56$ minutos a $D_{20\%} = 4,33$ minutos, sendo a variação inferior a um minuto.

Em concentrações superiores a 20%, houve aumento gradual dos valores D com a quantidade de glicose, observada através da correlação nas curvas de decaimento.

Soluções de glicose entre 45% e 50% aumentaram em duas vezes o valor D ($D_{45-50\%} = 8,40 (\pm 0,42)$ minutos) e o incremento gradual do valor D para o intervalo entre 20% e 50% de glicose foi representado pela relação:

$$\text{Valor D (minutos)} = 1,3386 + 0,1469 * (\text{glicose, \%}); (R^2 = 0,91).$$

A cada 5% de glicose em solução, houve incremento de 0,73 minutos aos valores D. Inclinações similares de curvas foram apresentadas nas soluções de concentração superiores a 30% de glicose em Tris-EDTA pH 8,0, os quais a relação pode ser representada pela equação:

$$\text{Valor D (minutos)} = (-0,907) + 0,1434 * (\text{glicose, \%}); (R^2 = 0,91).$$

Embora a estabilidade térmica da GFPuv em sistemas de fosfato pH 7,0 e em tris - EDTA pH 8 sejam similares, os valores D determinados para a GFPuv em fosfato pH 7,0 foram 50% maiores do que aqueles em sistemas de tris -EDTA pH 8.

Na solução de 50% de glicose o valor D máximo de 8,40 ($\pm 0,42$) minutos em fosfato pH 7 foi três vezes maior do que em solução tampão acetato pH 5,0 ($D = 2,63 \pm 0,12$ minutos), em fosfato pH 6,0 ($D = 3,86 \pm 0,21$ minuto) e em água Milli-Q ($D = 3,71 \pm 0,11$ minuto). Sistemas de glicose em tampão fosfato pH 7,0 proporcionaram a GFPuv estabilidade térmica maior se comparada com todos os sistemas estudados.

As inclinações das curvas de valor D *versus* a concentração de glicose foram similares até a concentração de 50% em solução tampão acetato pH 5,0 e fosfato pH 6,0, as quais foram relacionadas pela relação:

Valor D (minutos) = $0,0359 \cdot t + 3,7821$; ($R^2 = 0,86$), para GFPuv em tampão acetato pH 5,0 e,

Valor D = $0,0335 \cdot t + 1,7669$, $R^2 = 0,77$ para a GFPuv em tampão fosfato pH 6,0.

A cada 5% de glicose adicionada aos sistemas, houve aumento de 0,16-0,17 minutos aos valores D, o que não foi considerado significativo. Conseqüentemente, a interferência de glicose sobre a estabilidade térmica da GFPuv no intervalo de temperatura entre 85 °C e 95 °C, não foi considerada. Os valores D mostraram ser dependentes da temperatura de tratamento. Embora a estabilidade térmica da GFPuv em tampão acetato pH 5,0 e em tampão fosfato pH 6,0 sejam similares, os valores D para a GFPuv em pH 6,0 foram 1,5 vezes maiores do que em tampão acetato pH 5,0.

A estabilidade da GFPuv, a 90 °C, valor D $\text{médio} = 173 (\pm 0,26)$ minutos independeu da quantidade de glicose adicionada ao meio até a concentração de 40%. Porém, com a adição de 45% e 50% de glicose em solução de acetato houve aumento de 1,5 vezes no valor D, (valor D = $2,63 (\pm 0,12)$ minutos). Entre 1,5% e 50% de glicose, o valor D médio = $1,87 \pm 0,41$ minutos diminuiu 33% a cada 5 °C (de 85 °C para 90 °C) de tratamento.

A estabilidade térmica constante à temperatura de 95 °C, (valor D = $1,63 (\pm 0,23)$ minutos) foi 15% menor do que o valor D obtido a temperatura de 90 °C.

O valor D da GFPuv foi reduzido em três vezes para um aumento de 15 °C (de 80 °C para 95 °C) no tratamento térmico da GFPuv em soluções entre 1,5% e 50% de glicose em sistema de tampão acetato pH 5,0.

A temperatura de 95 °C, a estabilidade térmica da GFPuv nos sistemas de até 50% de glicose em tampão fosfato pH 7,0 (valor D = $3,24 \pm 0,28$ minutos), tampão Tris-EDTA pH 8,0 (valor D = $2,89 \pm 0,44$ minutos) e em água Milli-Q (valor D = $2,64 \pm 0,26$ minutos) foi duas vezes maior do que a estabilidade térmica apresentada em tampão acetato pH 5,0 (D = $1,63 \pm 0,23$ minutos).

Os parâmetros cinéticos de resistência térmica, valor z e coeficientes Q_{10} , os quais refletem a dependência da desnaturação, foram determinados. Quanto maior o valor z , mais estável é a proteína dentro do sistema.

II.3.4. Valor z

No intervalo de temperatura entre 80 °C e 95 °C, para a variação entre 1,5% e 50% de glicose, os valores z variaram de:

(i) $z_{1,5\%} = 21,10$ °C a $z_{50\%} = 17,7$ °C para a GFPuv em solução de glicose preparada em água, sendo o $z_{0\%} = 19,90$ °C;

(ii) $z_{1,5\%} = 32,57$ °C a $z_{50\%} = 22,52$ °C para a GFPuv em solução de glicose preparada em tampão acetato pH 5,0, sendo o $z_{0\%} = 38,17$ °C;

(iii) $z_{1,5\%} = 26,53$ °C a $z_{50\%} = 15,90$ °C para a GFPuv em solução de glicose preparada em tampão fosfato pH 6,0, sendo o $z_{0\%} = 19,49$ °C;

(iv) $z_{1,5\%} = 15,06$ °C a $z_{50\%} = 9,75$ °C para a GFPuv em solução de glicose preparada em tampão fosfato pH 7,0, sendo o $z_{0\%} = 12,82$ °C e,

(v) $z_{1,5\%} = 15,58$ °C a $z_{50\%} = 9,90$ °C para a GFPuv em solução de glicose preparada em solução tris-EDTA, pH 8,0, sendo o $z_{0\%} = 14,37$ °C.

O sistema de glicose em tampão acetato apresentou ser o sistema mais estável para a GFPuv, e a variação de valor z até 15% de glicose foi a maior dentre os sistemas apresentados, decaindo para 22,52 °C (em até 50% de glicose), similar ao valor z em sistemas entre 1,5% e 10% em água e entre 1,5% e 30% em fosfato pH 6,0.

Os valores z determinados nos sistemas compostos por glicose em água e em solução tampão fosfato pH 6,0, indicaram que a glicose proporcionou estabilidade intermediária para a GFPuv.

Os menores valores z foram $z = 9,75$ °C e $z = 9,90$ °C, em soluções de 50% de glicose em fosfato pH 7,0 e tris-EDTA pH 8,0, indicando que a estabilidade dos sistemas (entre temperaturas de 80 °C e 95 °C e concentração de glicose entre 1,5% e 50%) pode ser influenciada por mínimas alterações de energia.

Nos sistemas de água, fosfato pH 6,0 e acetato pH 5,0, a presença de até 15% de glicose em solução proporcionou estabilidade térmica igual ou superior à

oferecida pelas respectivas soluções sem adição de glicose. Valores *z* similares para a GFPuv foram reduzidos em 1,5 vezes no incremento de 20% para 50% de glicose em solução, mostrando influência de altas concentrações de glicose nos sistemas.

O incremento de glicose em solução reduziu a resistência térmica da GFPuv frente ao intervalo de temperatura de tratamento dado pela redução nos valores *z*.

A presença de 50% de glicose em água não afetou significativamente a resistência térmica da proteína frente ao sistema, sendo a variação a do valor *z* de 3,4 °C em relação à solução sem adição de glicose.

Em solução tampão fosfato pH 7,0 e em tris-EDTA pH 8,0, a variação do valor *z* da GFPuv com o aumento de 50% de glicose em solução foi de 5,31 °C e 5,68 °C, respectivamente

Maior variação de valores *z* com a adição de 1,5% a 50% de glicose ocorreu em sistemas de tampão acetato pH 5,0 e tampão fosfato pH 6,0, nos quais os valores *z* foram reduzidos em 10,05 °C e 10,63 °C, respectivamente. Menor variação de 2,2 °C e 3,4 °C foi em solução padrão, sem adição de glicose e de 1,5% e 50% de glicose em água, respectivamente, reforçando a uniformidade da estabilidade da GFPuv em sistemas de glicose em água na faixa de temperatura entre 80 °C e 95 °C.

Em solução tampão fosfato pH 6,0, a presença de até 30% de glicose ofereceu à GFPuv termoestabilidade igual ou superior àquela em solução sem adição de glicose. Concentrações superiores a 30% de glicose reduziram a estabilidade da GFPuv em relação ao valor da solução sem adição de glicose.

Tabela 40. Valores z, coeficiente Q₁₀ e Energia de Ativação determinados para a GFPuv em sistemas de glicose.

Glicose	Água		Acetato 10mM				Fosfato 10mM				Fosfato 10mM				Tris- EDTA 10mM			
	pH 6,0-7,0		pH 5,0		pH 6,0		pH 7,0		pH 8,0									
(%)	valor z (°C)	Q ₁₀	Ea (Kcal/mol)	valor z (°C)	Q ₁₀	Ea (Kcal/mol)	valor z (°C)	Q ₁₀	Ea (Kcal/mol)	valor z (°C)	Q ₁₀	Ea (Kcal/mol)	valor z (°C)	Q ₁₀	Ea (Kcal/mol)	valor z (°C)	Q ₁₀	Ea (Kcal/mol)
0	19,90	3,18	30,10	38,17	1,17	15,80	19,49	3,26	30,70	12,82	6,03	46,53	14,37	4,96	41,52			
1,5	21,10	2,99	28,50	32,57	1,40	18,39	26,53	2,38	22,48	15,06	4,61	39,61	15,58	4,38	38,51			
5	22,20	2,82	26,88	35,59	1,45	16,69	27,70	2,30	21,55	13,05	5,83	45,67	13,74	5,34	43,81			
7	21,80	2,87	27,41	34,25	1,49	17,60	22,22	2,82	26,90	13,60	5,43	43,81	13,12	5,78	45,24			
10	24,40	2,56	24,39	30,49	1,79	19,46	25,58	2,46	23,33	13,60	5,43	43,80	11,84	6,99	50,22			
15	19,90	3,18	30,17	39,68	1,48	14,97	26,67	2,37	22,33	12,64	6,18	47,15	11,44	7,48	52,17			
20	18,40	3,50	32,63	28,41	2,37	20,95	19,61	3,24	30,47	12,61	6,21	47,32	11,13	7,92	53,52			
25	15,30	4,52	39,15	29,24	1,60	20,46	23,87	2,62	25,00	11,80	7,03	50,40	10,89	8,13	54,23			
30	14,70	4,81	40,63	41,15	1,76	14,63	21,23	2,96	28,13	11,65	7,21	51,10	9,90	10,24	60,11			
35	15,90	4,27	37,79	30,67	1,28	19,45	18,66	3,44	32,00	11,20	7,82	53,15	9,92	10,19	60,12			
40	18,70	3,44	31,95	22,68	2,77	26,39	16,39	4,07	36,43	11,85	6,98	50,24	10,04	9,91	59,62			
45	17,80	3,64	33,33	24,10	2,24	24,91	15,63	4,37	38,22	10,66	8,67	55,83	10,10	9,77	58,93			
50	17,70	3,68	33,93	22,52	2,29	26,51	15,90	4,26	37,55	9,75	10,62	61,08	9,90	10,24	60,15			

II.3.5. Coeficiente Q_{10}

No intervalo de temperatura entre 80 °C e 95 °C, para a variação entre 1,5% e 50% de glicose, os valores Q_{10} foram:

(i) $Q_{10\ 1,5\%} = 2,99$ a $Q_{10\ 50\%} = 3,68$ para a GFPuv em solução de glicose em água, sendo o $Q_{10\ 0\%} = 3,18$;

(ii) $Q_{10\ 1,5\%} = 1,40$ a $Q_{10\ 50\%} = 2,29$ para a GFPuv em solução de glicose em tampão acetato pH 5,0, sendo o $Q_{10\ 0\%} = 1,17$;

(iii) $Q_{10\ 1,5\%} = 2,38$ a $Q_{10\ 50\%} = 4,26$ para a GFPuv em solução de glicose em tampão fosfato pH 6,0, sendo o $Q_{10\ 0\%} = 3,26$;

(iv) $Q_{10\ 1,5\%} = 4,61$ a $Q_{10\ 50\%} = 10,62$ para a GFPuv em solução de glicose em tampão fosfato pH 7,0, sendo o $Q_{10\ 0\%} = 6,03$ e,

(v) $Q_{10\ 1,5\%} = 4,38$ a $Q_{10\ 50\%} = 10,24$ para a GFPuv em solução de glicose em solução tris-EDTA, pH 8,0, sendo o $Q_{10\ 0\%} = 4,96$.

O sistema de glicose em solução tampão acetato mostrou ser o uniforme para a GFPuv ($1,0 < Q_{10} < 2,5$); sistema de água para injeção, WFI, e fosfato pH 6,0 mostraram termoestabilidade intermediária ($2,5 < Q_{10} < 4,0$) e o valor Q_{10} próximo a 10,0 nos sistemas de fosfato pH 7,0 e tris-EDTA pH 8,0 mostrou que a GFPuv pode ser influenciada por um mínimo de alterações externas.

II.3.6. Energia de Ativação

Os parâmetros de energia de ativação e valores z são relacionados com a energia intrínseca do sistema e podem ser correlacionados com a estabilidade do sistema durante o tratamento térmico.

Sistemas estáveis têm menor energia do que os sistemas instáveis. Conseqüentemente, sistemas que possuem elevado valor z e reduzido valor de energia de ativação são menos influenciados pela temperatura, do que aqueles que apresentam menor valor z e elevada energia de ativação, são altamente susceptíveis à temperatura (Tabela 40).

A energia de ativação de um sistema representa a energia necessária para manter o sistema estável. Considerando os sistemas avaliados para a GFPuv, a variação da energia de ativação foi de:

(i) $E_{a1,5\%} = 28,50 \text{ kcal.mol}^{-1}$ a $E_{a50\%} = 33,93 \text{ kcal.mol}^{-1}$ nas soluções de glicose em água, sendo o valor de $E_{a0\%} = 30,10 \text{ kcal.mol}^{-1}$;

(ii) $E_{a1,5\%} = 18,39 \text{ kcal.mol}^{-1}$ a $E_{a50\%} = 26,51 \text{ kcal/mol}$ nas soluções de glicose em tampão acetato pH 5,0, sendo o valor de $E_{a0\%} = 15,80 \text{ kcal.mol}^{-1}$;

(iii) $E_{a1,5\%} = 22,48 \text{ kcal.mol}^{-1}$ a $E_{a50\%} = 37,55 \text{ kcal.mol}^{-1}$ em soluções de glicose em tampão fosfato pH 6,0, sendo o valor de $E_{a0\%} = 30,70 \text{ kcal.mol}^{-1}$;

(iv) $E_{a1,5\%} = 39,61 \text{ kcal.mol}^{-1}$ a $E_{a50\%} = 61,08 \text{ kcal.mol}^{-1}$ nas soluções de glicose em tampão fosfato pH 7,0, sendo o valor de $E_{a0\%} = 46,53 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e,

(v) $E_{a1,5\%} = 38,51 \text{ kcal.mol}^{-1}$ a $E_{a50\%} = 60,15 \text{ kcal.mol}^{-1}$ nas soluções de glicose em solução tris-EDTA, pH 8,0, sendo o valor de $E_{a0\%} = 41,52 \text{ kcal.mol}^{-1}$;

O sistema mais estável para a GFPuv no intervalo de temperatura de tratamento entre 80 °C e 95 °C, foi o sistema de tampão acetato, pH 5,0, cuja energia de ativação em solução tampão, sem adição de glicose foi de $E_a = 15,80 \text{ kcal.mol}^{-1}$. O aumento de glicose em solução tampão acetato proporcionou diminuição na estabilidade do sistema em 1,7 vezes, com aumento do valor de E_a .

A adição de 50% de glicose em solução acetato pH 5,0, proporcionou a GFPuv energia de ativação de $26,51 \text{ kcal.mol}^{-1}$, similar à necessária para manutenção do sistema em tampão fosfato pH 6,0, no intervalo de concentração entre 1,5% e 30% de glicose e em sistema de água entre 1,5% e 10% de glicose.

A GFPuv apresentou menor energia em tampão acetato pH 5,0 do que em água e tampão fosfato pH 6,0 (Figura 14 e tabela 40) e maior energia em soluções tampão fosfato pH 7,0 e tris-EDTA pH 8,0 (Figura 15), para manter a estrutura do fluoróforo e a intensidade de fluorescência frente à temperatura.

Os sistemas de glicose em água sofreram menor variação de energia de ativação com o incremento de 50% de glicose em solução, sendo $\Delta E_a = 5,43 \text{ kcal.mol}^{-1}$, seguido por $\Delta E_a = 8,12 \text{ kcal.mol}^{-1}$, em tampão acetato, sendo o dobro em sistema de tampão fosfato pH 6,0 ($\Delta E_a = 15,67 \text{ kcal.mol}^{-1}$) e o triplo em sistemas de tampão fosfato pH 7,0 e tris-EDTA pH 8,0 ($\Delta E_a = 21,55 \text{ kcal.mol}^{-1}$).

Figura 14. Variação da Energia de ativação dos sistemas de GFPuv em soluções entre 1,5% e 50% de glicose, em água, acetato e fosfato 6.0.

Sistemas formados por soluções de glicose em tampão acetato pH 5,0 e em tampão fosfato pH 6,0 tiveram valores e comportamentos similares no intervalo de concentração entre 1,5% e 50% de glicose. Sistemas em água apresentaram o dobro de energia de ativação em relação ao tampão acetato pH 5,0 e valor similar ao tampão fosfato pH 6,0.

Nas soluções de concentração até 25% de glicose, a variação da energia de ativação apresentou a mesma tendência para as soluções em tampão acetato pH 5,0 e fosfato pH 6,0. Valores semelhantes foram observados nas soluções de até 20% de glicose em água e tampão fosfato pH 6,0.

Acima de 25% de glicose, as soluções em tampão acetato tenderam ao aumento da energia de ativação, de valor aproximado $E_a = 26,39 \text{ kcal.mol}^{-1}$ em solução de 40% de glicose, que se manteve até a concentração de 50% de glicose.

Em solução tampão fosfato pH 6,0, a energia de ativação aumentou em proporção à concentração de glicose, até $E_a = 36,43 \text{ kcal.mol}^{-1}$ entre 40% e 50% de glicose em solução.

Em água, houve aumento da energia de ativação nas concentrações entre 25% e 35% de glicose (energia de ativação entre $37,79 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $40,63 \text{ kcal.mol}^{-1}$), alcançando a energia de ativação entre $31,95 \text{ kcal.mol}^{-1}$ a $33,93 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Em sistema de GFPuv com 50% de glicose em tampão fosfato pH 6,0, $E_a = 37,55 \text{ kcal.mol}^{-1}$) a energia de ativação foi similar nos sistemas de 1,5% de glicose em tampão fosfato pH 7,0 e em tris-EDTA, pH 8,0.

Os sistemas de pH 7,0 e pH 8,0, apresentaram intervalos de Energia de ativação similares, sendo a variação: (i) de $39,61 \text{ kcal.mol}^{-1}$ a $61,08 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para a GFPuv em soluções de glicose em tampão fosfato e (ii) de $38,51 \text{ kcal.mol}^{-1}$ a $60,15 \text{ kcal.mol}^{-1}$, para a GFPuv em soluções de glicose em Tris-EDTA, pH 8,0 (tabela 40 e figura 15).

Figura 15. Variação da Energia de ativação dos sistemas de GFPuv em soluções entre 1,5% e 50% de glicose, em água, fosfato pH 7.0 e Tris-EDTA.

Em tampão fosfato pH 7,0 e em tampão tris-EDTA pH 8,0, houve aumento gradual da energia de ativação com o incremento de glicose em solução de até 25%. Em solução de tris-EDTA pH 8,0, o sistema com GFPuv e glicose permaneceu em 60 kcal.mol⁻¹, acima de 30% de glicose e, em pH 7,0, a energia de ativação aumentou gradativamente até a concentração de 50% de glicose, sendo o valor $E_{a50\%} = 61,08$ kcal.mol⁻¹.

II.3.7. Energia Livre de Gibbs, Entalpia e Entropia

Os valores de Energia Livre para a GFPuv em contato com soluções de glicose no intervalo de concentração entre 1,5% e 50% de glicose foram determinados, seguindo variação semelhante à energia de ativação. Os valores próximos a zero indicaram o equilíbrio do sistema.

Tabela 41. Variação dos valores de Energia livre de Gibbs, determinados para a GFPuv em sistemas de glicose

Glicose (%)	Energia Livre de Gibbs (ΔG , kJ.mol ⁻¹)				
	Água Milli-Q	Acetato 10mM pH 5,0	Fosfato 10mM pH 6,0	Fosfato 10mM pH 7,0	Tris-EDTA 10mM pH 8,0
0	0,0014	-0,0014	0,0014	0,0036	0,0031
1,5	0,0009	-0,0007	0,0000	0,0024	0,0027
5	0,0005	-0,0010	-0,0004	0,0035	0,0035
7	0,0008	-0,0008	0,0006	0,0032	0,0039
10	0,0001	-0,0008	0,0000	0,0032	0,0048
15	0,0012	-0,0014	-0,0005	0,0037	0,0046
20	0,0018	-0,0006	0,0013	0,0039	0,0053
25	0,0030	-0,0003	0,0002	0,0041	0,0050
30	0,0033	-0,0015	0,0009	0,0043	0,0062
35	0,0026	-0,0006	0,0015	0,0047	0,0058
40	0,0016	0,0004	0,0024	0,0044	0,0059
45	0,0019	0,0003	0,0026	0,0052	0,0055
50	0,0015	0,0008	0,0026	0,0060	0,0056

^(*) 1J = 0,239 cal

O sistema de glicose em tampão acetato pH 5,0 apresentou valores negativos da Energia de Gibbs ($\Delta G = -0,0015$ kJ.mol⁻¹ a $\Delta G = -0,0006$ kJ.mol⁻¹), (tabela 41) indicando uma reação espontânea, onde menor energia é requerida para a reação ou

menos energia foi necessária para a perda da intensidade de fluorescência, independentemente da temperatura de tratamento térmico. Os sistemas de valores de pH entre 6,0 e 8,0 indicaram reação não espontânea.

A GFPuv em sistema de água Milli-Q e em tampão fosfato pH 6,0 apresentou $\Delta G = 0,0014 \text{ kJ.mol}^{-1}$, energia superior à necessária para o sistema de tampão acetato com 50% de glicose. Com o incremento de 50% glicose, a necessidade de energia foi maior para o sistema de tampão fosfato pH 6,0, sendo o dobro de energia requerida para o sistema em água.

Os sistemas de solução em tampão fosfato pH 7,0 e em tris-EDTA, pH 8,0 apresentaram valores de energia livre similares. Em solução tampão, sem adição de glicose, os valores $\Delta G = 0,0036 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $\Delta G = 0,0031 \text{ kJ.mol}^{-1}$, representaram a mesma energia requerida para a GFPuv em sistema de 50% de glicose em solução tampão fosfato pH 6,0.

Os valores de $\Delta H = - 0,125 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $\Delta S = - 0,12 \text{ a } 0,13 \text{ kJ.mol}^{-1}$, em todos os sistemas indicaram a estabilidade da GFPuv frente ao intervalo de temperatura de tratamento e, que os sistemas mantêm a estrutura e a intensidade de fluorescência da GFPuv.

O sistema de tampão acetato pH 5,0 foi o mais estável para a GFPuv em concentrações de glicose entre 1,5% e 35%, seguido pelos sistemas de água, fosfato pH 6,0 e pH 7,0 e tris-EDTA pH 8,0.

Tratamentos térmicos (branqueamento, pasteurização, desinfecção e esterilização) são amplamente utilizados com a finalidade de garantir a segurança de uso de um produto e a mínima perda de suas qualidades. A inativação tanto de enzimas quanto microrganismos pelo calor úmido segue a cinética de primeira ordem, onde a estabilidade térmica é descrita principalmente pelos parâmetros valor D e valor z. O interesse em desenvolver bioindicadores para a relação tempo-temperatura na avaliação de processos térmicos requer maiores estudos sobre a inativação de proteínas e microrganismos (MACKEY et al, 2006). A determinação dos parâmetros cinéticos, valores D e z da GFPuv pode demonstrar um modelo cinético para prever a inativação da proteína pela intensidade de fluorescência emitida. Desta forma, estabeleceu-se a comparação da resistência térmica da GFPuv

com a resistência de microrganismos e proteínas que são utilizadas com indicadores biológicos

Pectinesterase (PME), enzima responsável pela hidrólise da pectina presente em sucos cítricos (pH 3,0 a 4,0), é mais estável do que os microrganismos contaminantes que podem estar presentes no produto e desenvolver-se durante a estocagem (BASAK; RAMASWAMY, 1996). Sua inativação é utilizada como indicação do processo de pasteurização adequado, sendo seu valor $D = 3,80$ min determinado em suco de laranja pasteurizado (pH $3,87 \pm 0,02$) a $87,5$ °C (COLLET et al., 2005). Estes valores D foram similares aos valores D para a GFPuv a 90 °C em: (i) 5% de glicose, pH 7,0; (ii) 10% de glicose, pH 8,0; (iii) 30% de glicose em água e, (iv) 45% de glicose a pH 6,0. À 95 °C, os valores D variaram de 3,50 a 3,91 minutos em concentrações superiores a 40% em fosfato pH 7,0 e tris-EDTA pH 8,0 (Tabela 39). A atividade da PME foi determinada em sucos de fruta, sendo o valor $z = 32$ °C no intervalo de 90 °C a 103 °C, próximo ao valor $z = 34,0 (\pm 4,0)$ °C da GFPuv em acetato pH 5,0 até 35% de glicose, quando o valor z decaiu para $25 (\pm 1,0)$ °C com 40% e 50% de glicose em solução.

A estabilidade térmica da lisozima foi avaliada em soluções aquosas (73 °C a 100 °C), valores de pH (4,2 – 9,0), concentrações de glicose (0,5% a 15%) e cloreto de sódio (0,01 a 1M) A lisozima é utilizada para inibir o crescimento de bactérias e apresenta elevada estabilidade térmica. A 75 °C, com valores de pH entre 7,2 e 9,0, os valores D para a lisozima decaíram de 800 min a 33,2 minutos, respectivamente (MAKKI; DURANCE, 1996).

A partir de curvas de inativação da peroxidase (POX) e da lipoxigenase (LOX), em tampão fosfato pH 6,0, os valores D foram determinados variando respectivamente, de 43,13 min a 188,77 min a 60 °C; de 34,63 min a 31,76 min a 65 °C; de 17,16 min a 4,06 min a 70 °C; de 11,69 min a 1,55 min a 75 °C; de 0,59 min a 1,99 min a 80 °C e de 0,79 min para a peroxidase a 90 °C. A GFPuv apresentou valor D superior ao determinado para a POX e similar ao determinado para a LOX, quando em solução de fosfato pH 6,0. Estas três proteínas apresentam resistência térmica maior do que patógenos encontrados em produtos processados. Para *E. faecium* imobilizado em resina, o valor D de 18 min a 65 °C ($z = 6$ °C) foi determinado, equivalente a 0,0012 min a 90 °C (MACKEY et al., 2006).

O valor $D = 8,0 \text{ min } (\pm 0,8) \text{ min}$ para a GFPuv em fosfato pH 7,0 com 40%, 45% e 50% de glicose a 90 °C apresentou termoestabilidade equivalente aos esporos de *Bacillus atrophaeus* ($D = 8,0 (\pm 1,0) \text{ min}$) em solução parenteral com até 50% de glicose em solução (VESSONI PENNA et al., 2002).

Avaliando a estabilidade de ovoalbumina (pH 7,0), lisozima (pH 3,0 e 7,0), convalbumina (pH 7,0) e α -quimotripsinogênio (pH 3,0) em soluções com sacarose, glicose, sorbitol e glicerol, a glicose mostrou ser o melhor estabilizador entre os solutos, em combinação com as interações hidrofóbicas, principal força que atua sobre o conjunto proteína açúcar e moléculas de água, protegendo as moléculas contra a desnaturação. A adição de 50% de glicose em solução de albumina e ovoalbumina (pH 7,0) elevou a temperatura de desnaturação entre 15,5 °C e 17 °C (BACK et al, 1979. Para a GFPuv, a adição de 50% de glicose em solução fosfato pH 7,0 elevou em três vezes o valor D, quando exposta a 80°C e 85 °C e duas vezes a 90 °C, mantendo a mesma estabilidade térmica quando exposta a 95 °C.

II.4. Conclusões Parciais

O aumento da concentração de glicose em solução proporcionou estabilidade térmica à GFPuv. A resistência térmica da GFPuv aumentou linearmente com o aumento da concentração de glicose em solução de Tris-EDTA pH 8.

A exposição da proteína às temperaturas de 90°C e 95°C, mostrou influência predominante da temperatura sobre a estabilidade da GFPuv em relação à concentração de glicose empregada.

Embora a estabilidade térmica da GFPuv em sistemas de fosfato pH 7,0 e em tris - EDTA pH 8 sejam similares, os valores D determinados para a GFPuv em fosfato pH 7,0 foram 50% maiores do que àqueles em sistemas de tris -EDTA pH 8.

Em solução de 50% de glicose o valor D máximo de 8,40 ($\pm 0,42$) minutos em fosfato pH 7 foi três vezes maior do que em solução tampão acetato pH 5,0 ($D = 2,63 \pm 0,12$ minutos), em fosfato pH 6,0 ($D = 3,86 (\pm 0,21)$ minutos) e em água Milli-Q ($D = 3,71 (\pm 0,11)$ minutos). Sistemas de glicose em tampão fosfato pH 7,0 proporcionaram a GFPuv estabilidade térmica maior se comparada com todos os sistemas estudados.

O sistema com a menor energia intrínseca para uma transformação espontânea, independente da temperatura foi o sistema de tampão acetato em concentração de glicose entre 1,5% e 35% de glicose.

Etapa III

Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Estabilidade (25 °C) e Resistência Térmica (entre 80 e 95 °C) da GFPuv em Soluções Parenterais Glicofisiológicas^(*)

*** Capítulo de Livro** VESSONI PENNA, T.C., ISHII, M., KUNIMURA, J.S., Thermal Stability of Recombinant Green Fluorescent Protein (GFPuv) in Glucose, Sodium Chloride and Glucophysiological Solutions at Various pH Ranges, *Trends in Biotechnology Research*, (Ed. Edwin C. Hearn), Nova Science Publishers, NY, 2006.

III.1. Objetivo

Com o intuito de avaliar a estabilidade e a resistência térmica da GFPuv, foram realizados estudos em solução de cloreto de sódio e glicofisiológica contendo 5% de glicose e 0,9% de cloreto de sódio.

III.2. Material e Métodos

A metodologia e análise de dados seguiram a descrição da Etapa I para solução Glicofisiológica (5% glicose + 0,9% de cloreto de sódio) e Fisiológica (0,9% de cloreto de sódio) às temperaturas de 25 °C e entre 80 ° e 95 °C.

Comparou-se a influência da composição da solução Glicofisiológica, com a solução de glicose 5% obtida na Etapa I.

III.3. Resultados e Discussão

III.3.1. Valor de pH

Tabela 42. Valor de pH (a 25 °C) para a GFPuv em água (WFI) e soluções -tampão, sem solutos adicionados (controle) e com 5% de glicose ou 0,9% de NaCl e glicofisiológica (5% de glicose e 0,9% de NaCl, GF)

Solução Parenteral	Solução Tampão 10mM									
	Água para Injeção		Acetato pH 5,0		Fosfato pH 6,0		Fosfato pH 7,0		Tris-EDTA pH 8,0	
	Inicial	24h	Inicial	24h	Inicial	24h	Inicial	24h	Inicial	24h
Controle	6,90	6,60	5,05	5,04	6,22	6,09	7,12	7,12	7,89	8,06
Glicose 5 %	6,65	6,54	5,07	5,07	6,23	6,09	7,00	6,93	7,85	7,87
NaCl 0,9%	7,06	6,57	5,06	5,06	5,66	5,66	6,74	6,73	7,83	7,82
GF^a	6,99	6,72	5,00	5,00	5,80	5,80	6,77	6,78	7,90	7,90
Média	6,90	6,61	5,05	5,04	5,98	5,91	6,91	6,89	7,87	7,91
DP^b	0,18	0,08	0,03	0,04	0,29	0,22	0,08	0,03	0,18	0,10

^a GF= glicofisiológica, ^b DP = desvio padrão

Os valores de pH das soluções de água foram constantes e independentes dos solutos adicionados, variando entre 5,00 ($\pm 0,04$) e 7,91 ($\pm 0,10$) (Tabela 42).

III.3.2. Determinação do tempo de redução decimal, valor D

III.3.2.1. Estabilidade da Proteína Verde Fluorescente, GFPuv, a 25 °C

Tabela 43. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de cloreto de sódio 0,9% e glicofisiológica, em diferentes soluções tampão a 25 °C

Solução		Equação $\text{Log}_{10} \text{ Intensidade} =$	R^2	Valor D (horas)
Cloreto de Sódio 0,9%	WFI	$= -0,0001*t + 2,7832$	0,68	166,7
	Acetato pH 5,0	$= -0,0044*t + 1,9149$	0,87	3,8
	Fosfato pH 6,0	$= -0,0003*t + 2,6645$	0,63	55,5
	Fosfato pH 7,0	$= -0,0001*t + 2,7959$	0,82	166,7
	Tris-EDTA pH 8,0	$= -8E-06*t + 2,8094$	---	---
Glicofisiológica	WFI	$= 0,0003*t + 2,7821$	0,97	55,5
	Acetato pH 5,0	$= -0,0019*t + 2,3367$	0,71	8,8
	Fosfato pH 6,0	$= 0,0001*t + 2,6789$	0,34	166,7
	Fosfato pH 7,0	$= 0,0001*t + 2,7675$	0,79	166,7
	Tris-EDTA pH 8,0	$= 0,0003*t + 2,7853$	0,95	55,5

À temperatura de 25 °C, a GFPuv acondicionada em solução de cloreto de sódio e glicofisiológica apresentou estabilidade reduzida em tampão acetato pH 5,0 de 3,8 horas em solução de cloreto de sódio e de 8,8 horas em solução glicofisiológica.

Nas outras soluções tampão, a GFPuv apresentou valor D entre 55,5 horas e 166 horas (tabela 43). A presença de solutos interferiu na estabilidade da GFP, medida em termos de intensidade de fluorescência, exceto em solução de tris-EDTA onde não houve decaimento.

A associação de glicose e cloreto de sódio em solução parenteral aumentou a estabilidade da GFPuv em solução de pH entre 5,0 e 6,0 e reduziu a estabilidade em solução de água. A composição da solução parenteral não interferiu na estabilidade da GFPuv em solução tampão fosfato pH 7,0.

III.3.2.2. Resistência Térmica da Proteína Verde Fluorescente (GFPuv) as temperaturas entre 80 °C e 95 °C

III.3.2.2.1. Resistência térmica em soluções em água para injeção, WFI

Solução de 5% de glicose em água a 80 °C (valor $D = 12,58$ min) foi similar ao controle, sem adição de solutos (valor $D = 13,85$ min). A adição de 0,9% de cloreto de sódio foi suficiente para aumentar a estabilidade da GFPuv em 45% (valor $D_{\text{NaCl } 0,9\%} = 20,12$ min), efeito que foi mantido com adição de glicose e cloreto de sódio em solução na mesma solução (glicofisiológica, valor $D = 19,23$ min), como indicado na tabela 46.

A temperatura de 85 °C, a resistência térmica da GFPuv em água decaiu em 80% (valor $D_{85\text{C}} = 2,82$ min). Com a adição de solutos, os valores D foram reduzidos em 60% em relação ao tratamento térmico a 80 °C e independentes da composição da solução (com glicose ou NaCl).

A temperatura de 90 °C e 95 °C em água, a resistência térmica da GFPuv foi similar à apresentada a temperatura de 85 °C (valor $D_{\text{WFI } 90\text{C}} = 2,22$ min e $D_{\text{WFI } 95\text{C}} = 2,18$ min). A presença dos solutos aumentou a estabilidade térmica da GFPuv comparada ao controle, sem solutos, sendo os valores D a temperaturas de 90 °C e 95 °C cerca de 60% da resistência apresentada a 85 °C, respectivamente para cada solução: $D_{5\% - 90\text{C}} = 3,35$ min e $D_{5\% - 95\text{C}} = 2,59$ min ($D_{\text{média}} = 2,97$ min); $D_{0,9\% - 90\text{C}} = 5,42$ min e $D_{0,9\% - 95\text{C}} = 4,55$ min ($D_{\text{média}} = 4,98$ min); (onde ' D_{GP} ' seria o valor D para as soluções glicofisiológicas) $D_{\text{GP} - 90\text{C}} = 5,6$ min e $D_{\text{GP} - 95\text{C}} = 4,29$ min ($D_{\text{média}} = 4,94$ min).

III.3.2.2.2. Resistência térmica em soluções em acetato pH 5,0

Em tampão acetato, pH 5,0, a adição de solutos não interferiu na estabilidade da proteína, comparando-se ao tampão, sem adição de glicose. ($D_{0\%} = 4,08$ min; $D_{5\%} = 4,24$ min; $D_{0,9\%} = 3,82$ min e $D_{\text{GP}} = 4,0$ min).

A 85°C, a resistência térmica da GFPuv decaiu em pelo menos 65% em solução de 5% de glicose, e os valores se mantiveram constantes a temperaturas de 90 °C e 95 °C.

Em solução de cloreto de sódio, 0,9%, a GFPuv mostrou a mesma resistência apresentada na faixa de temperatura entre 80 °C e 95 °C ($D_{80^{\circ}\text{C}} = 3,82$ min, $D_{85^{\circ}\text{C}} = 3,44$ min, $D_{90^{\circ}\text{C}} = 3,03$ min e $D_{95^{\circ}\text{C}} = 3,04$ min) e resistência pelo menos duas vezes maior entre 85 °C e 95 °C, em relação ao controle, sem adição de solutos.

A presença de glicose e cloreto de sódio (solução glicofisiológica) aumentou a resistência térmica da GFPuv em relação à solução controle, mas não manteve a estabilidade em todas as temperaturas de tratamento, como o decaimento de 30% na resistência térmica a temperatura de 80 °C.

Tabela 44. Tempos de redução decimal, valores D, para a GFPuv em soluções de cloreto de sódio 0,9%

Temperatura (°C)	Solução	Equação Log_{10} Intensidade =	R ²	Valor D (min)
80	Água	$= -0,0497*t + 2,6015$	0,97	20,12
	Acetato pH 5,0	$= -0,2617*t + 2,6901$	0,93	3,82
	Fosfato pH 6,0	$= -0,1097*t + 2,6754$	0,992	9,12
	Fosfato pH 7,0	$= -0,0283*t + 2,5362$	0,93	35,34
	Tris-EDTA pH 8,0	$= -0,027*t + 2,5481$	0,94	37,04
85	Água	$= -0,1206*t + 2,8132$	0,98	8,29
	Acetato pH 5,0	$= -0,2908*t + 2,6436$	0,92	3,44
	Fosfato pH 6,0	$= -0,1635*t + 2,713$	0,96	6,12
	Fosfato pH 7,0	$= -0,0967*t + 2,721$	0,98	10,34
	Tris-EDTA pH 8,0	$= -0,1012*t + 2,7499$	0,98	9,88
90	Água	$= -0,1844*t + 2,8071$	0,97	5,42
	Acetato pH 5,0	$= -0,3302*t + 2,6237$	0,87	3,03
	Fosfato pH 6,0	$= -0,2302*t + 2,7482$	0,92	4,34
	Fosfato pH 7,0	$= -0,1625*t + 2,7526$	0,98	6,15
	Tris-EDTA pH 8,0	$= -0,1633*t + 2,7795$	0,98	6,12
95	Água	$= -0,2196*t + 2,7653$	0,94	4,55
	Acetato pH 5,0	$= -0,3286*t + 2,593$	0,90	3,04
	Fosfato pH 6,0	$= -0,2452*t + 2,7333$	0,91	4,08
	Fosfato pH 7,0	$= -0,209*t + 2,7817$	0,96	4,78
	Tris-EDTA pH 8,0	$= -0,2077*t + 2,793$	0,96	4,81

t = tempo de exposição

III.3.2.2.3. Resistência térmica em soluções em fosfato pH 6,0

Em solução tampão fosfato pH 6,0, a presença de solutos reduziu a resistência térmica da GFPuv em duas vezes, em relação ao padrão, sem adição de solutos, valor $D = 15,41$ min).

Tabela 45. Tempos de redução decimal, valores D , para a GFPuv em soluções glicofisiológicas

Temperatura (°C)	Solução	Equação Log_{10} Intensidade =	R^2	Valor D (min)
80	Água	$y = -0,052*t + 2,6665$	0,994	19,23
	Acetato pH 5,0	$= -0,2503*t + 2,6023$	0,93	4,00
	Fosfato pH 6,0	$= -0,1194*t + 2,6874$	0,97	8,38
	Fosfato pH 7,0	$= -0,0292*t + 2,6259$	0,97	34,25
	Tris-EDTA pH 8,0	$= -0,0202*t + 2,5597$	0,97	49,50
85	Água	$= -0,1202*t + 2,782$	0,97	8,32
	Acetato pH 5,0	$= -0,2788*t + 2,6349$	0,90	3,59
	Fosfato pH 6,0	$= -0,1912*t + 2,7571$	0,91	5,23
	Fosfato pH 7,0	$= -0,0916*t + 2,5431$	0,994	10,92
	Tris-EDTA pH 8,0	$= -0,094*t + 2,7472$	0,991	10,64
90	Água	$= -0,1787*t + 2,8048$	0,93	5,60
	Acetato pH 5,0	$= -0,3702*t + 2,6732$	0,90	2,70
	Fosfato pH 6,0	$= -0,2337*t + 2,7402$	0,90	4,28
	Fosfato pH 7,0	$= -0,1534*t + 2,73$	0,97	6,52
	Tris-EDTA pH 8,0	$= -0,1534*t + 2,73$	0,97	6,52
95	Água	$= -0,3958*t + 2,9869$	0,79	2,53
	Acetato pH 5,0	$= -0,3958*t + 2,9869$	0,79	2,53
	Fosfato pH 6,0	$= -0,548*t + 2,8803$	0,74	1,82
	Fosfato pH 7,0	$= -0,3428*t + 3,0039$	0,82	2,92
	Tris-EDTA pH 8,0	$= -0,3474*t + 2,9661$	0,81	2,88

t = tempo de exposição

A 85 °C, os valores D decaíram para $D_{0\%} = 3,64$ min, $D_{5\%} = 3,82$ min, $D_{0,9\%} = 6,12$ min e $D_{GP} = 5,23$ min, no tampão, 5% de glicose, cloreto de sódio 0,9% e solução glicofisiológica, respectivamente (Tabela 45).

III.3.2.2.4. Resistência térmica em soluções em fosfato pH 7,0

Em tampão fosfato pH 7,0, a presença de solutos manteve a resistência térmica da GFPuv em relação ao controle, sem adição de solutos, ao contrário do que ocorreu em solução tampão fosfato pH 6,0, onde os valores D decaíram com a adição de solutos às temperaturas de 80 °C e 85 °C. Os valores D a 80 °C decaíram de 3 a 3,5 vezes a 85 °C e, o valor D para a solução padrão, sem adição de solutos foi 3 vezes maior em tampão fosfato pH 7 (D = 40,32 min) do que em pH 6 (D = 15,41 min).

Os valores D a 80 °C em solução de 5% de glicose, cloreto de sódio 0,9%, e glicofisiológica em pH 7 foram 4 vezes maiores do que nas mesmas soluções em pH 6,0.

A 85 °C, os valores D para o tampão com e sem adição de solutos ao valor de pH 7,0 foi de duas a três vezes maiores do que nas mesmas soluções em pH 6,0. O tampão fosfato pH 7,0 manteve melhor a estabilidade da GFPuv no intervalo de temperatura entre 80 °C e 85 °C em relação ao mesmo tampão em pH 6,0.

III.3.2.2.5. Resistência térmica em soluções em tris-EDTA pH 8,0

A 80 °C, a GFPuv apresentou aumento na estabilidade em solução glicofisiológica preparada em solução de Tris-EDTA, 1,5 vezes maior do que em tampão fosfato pH 7,0, 6 vezes maior do que em tampão fosfato pH 6,0, 10 vezes maior do que em tampão acetato pH 5,0 e 2 vezes maior do que em soluções preparadas em água.

O valor D para a GFPuv em solução de Tris-EDTA com 5% de glicose ou 0,9% de cloreto de sódio foi equivalente ao determinado em tampão fosfato pH 7,0.

Às temperaturas de 90 °C e 95 °C, a GFPuv apresentou mesma termoestabilidade em tampão fosfato pH 7,0 e em Tris-EDTA pH 8, indicando que a composição do tampão não foi o principal fator envolvido na resistência térmica.

A presença de cloreto de sódio aumentou a resistência térmica da GFPuv comparada com os mesmos tampões e soluções de glicose, sem cloreto de sódio (Tabela 46). A solução glicofisiológica proporcionou o maior valor D para a GFPuv

em tampão fosfato pH 7,0 ($D_{90^{\circ}\text{C}} = 6,52$ min e $D_{95^{\circ}\text{C}} = 4,93$ min), equivalente a Tris-EDTA pH 8,0 onde $D_{90^{\circ}\text{C}} = 6,64$ min e $D_{95^{\circ}\text{C}} = 5,20$ min, indicou que a adição de glicose e cloreto de sódio favoreceu a estabilidade térmica da GFPuv.

Tabela 46. Valores D para a GFPuv em soluções parenterais

Valor D (min)					
Solução Tampão 10 mM					
Solução Parenteral (%)	Água para Injeção	Acetato pH 5,0	Fosfato pH 6,0	Fosfato pH 7,0	Tris-EDTA pH 8,0
80 °C					
Controle	13,85	4,08	15,41	40,32	27,03
Glicose 5%	12,58	4,24	8,51	41,32	34,25
NaCl 0,9%	20,12	3,82	9,12	35,34	37,04
GF ^a	19,23	4,00	8,38	34,25	49,5
85 °C					
Controle	2,82	1,94	3,64	10,65	6,71
Glicose 5%	5,24	1,84	3,82	11,15	6,65
NaCl 0,9%	8,29	3,44	6,12	10,34	9,88
GF ^a	8,32	3,59	5,23	10,92	10,64
90 °C					
Controle	2,22	1,41	2,78	3,56	3,30
Glicose 5%	3,35	1,64	2,67	3,84	3,45
NaCl 0,9%	5,42	3,03	4,34	6,15	6,12
GF ^a	5,60	2,70	4,28	6,52	6,64
95 °C					
Controle	2,18	1,65	2,35	2,91	2,37
Glicose 5%	2,59	1,51	2,40	3,12	2,55
NaCl 0,9%	4,55	3,04	4,08	4,78	4,81
GF ^a	4,29	2,83	3,60	4,93	5,20

^aGF= solução glicofisiológica

Os parâmetros cinéticos valor z e coeficiente Q_{10} refletem a dependência da temperatura na desnaturação da proteína, medida através do decaimento da intensidade de fluorescência. Quanto maior o valor z, mais estável é a GFPuv no sistema.

III.3.3. Valor z

No intervalo de temperatura entre 80 °C e 95 °C em soluções-tampão com adição de 0,9% de cloreto de sódio, os valores z foram: (i) $z = 23,58$ °C no controle em água, WFI; (ii) $z = 140,85$ °C em acetato pH 5,0; (iii) $z = 41,84$ °C em fosfato pH 6,0; (iv) $z = 17,67$ °C em fosfato pH 7,0 e, (v) $z = 17,42$ °C em Tris-EDTA pH 8,0.

No intervalo de temperatura entre 80 °C e 95 °C em soluções-tampão com adição de 5% de glicose e 0,9% de cloreto de sódio, os valores z foram: (i) $z = 23,53$ °C no controle em água, WFI; (ii) $z = 86,96$ °C em acetato pH 5,0; (iii) $z = 42,02$ °C em fosfato pH 6,0; (iv) $z = 18,18$ °C em fosfato pH 7,0 e, (v) $z = 15,92$ °C em Tris-EDTA pH 8,0.

Solução de cloreto de sódio 0,9% e glicofisiológica em tampão fosfato pH 6,0 forneceram maior estabilidade térmica para a GFPuv, com valores $z = 41,84$ °C e $z = 42,02$ °C, respectivamente.

Os valores z para a GFPuv em solução de cloreto de sódio 0,9% e glicofisiológica foram similares em todas soluções tampão, indicando que a presença de cloreto de sódio, associada ao valor de pH proporcionou igual ou maior estabilidade térmica, em relação ao controle, sem adição de solutos.

III.3.4. Coeficiente Q_{10}

No intervalo de temperatura entre 80 °C e 95 °C, os coeficientes Q_{10} foram de: (i) $Q_{10 \text{ NaCl } 0,9\%} = 2,65$ e $Q_{10 \text{ GP}} = 2,66$ em soluções de água para injeção; (ii) $Q_{10 \text{ NaCl } 0,9\%} = 1,18$ e $Q_{10 \text{ GP}} = 1,30$ em tampão acetato pH 5,0, (iii) $Q_{10 \text{ NaCl } 0,9\%} = 1,73$ e $Q_{10 \text{ GP}} = 1,73$ em tampão fosfato pH 6,0; (iv) $Q_{10 \text{ NaCl } 0,9\%} = 3,68$ e $Q_{10 \text{ GP}} = 3,55$ em tampão fosfato pH 7,0 e, (v) $Q_{10 \text{ NaCl } 0,9\%} = 3,75$ e $Q_{10 \text{ GP}} = 4,25$ em tampão Tris-EDTA pH 8,0.

Sistema de tampão acetato foi mais uniforme para a GFPuv ($Q_{10} < 1,5$), sendo a estabilidade intermediária fornecida pelos sistemas de água para injeção e fosfato pH 6,0 ($1,5 < Q_{10} < 3,5$) e fosfato pH 7,0 e Tris-EDTA pH 8,0 indicaram que a GFPuv pode ser influenciada por mínimas influências externas ($3,5 < Q_{10} < 6,0$).

Tabela 47. Valores z, coeficiente Q_{10} e Energia de Ativação dos sistemas de solução tampão, glicose 5%, cloreto de sódio e glicofisiológica, no intervalo de temperatura entre 80°C e 95 °C

Solução	Água para Injeção			Acetato 10mM			Fosfato 10mM			Fosfato 10mM			Tris-EDTA 10mM		
	pH 5,0			pH 6,0			pH 7,0			pH 8,0					
Parenteral	Valor z	Ea	Valor z	Ea	Valor z	Ea	Valor z	Ea	Valor z	Ea	Valor z	Ea	Valor z	Ea	Valor z
	(°C)	Q_{10}	(kcal/mol)	(°C)	Q_{10}	(kcal/mol)	(°C)	Q_{10}	(kcal/mol)	(°C)	Q_{10}	(kcal/mol)	(°C)	Q_{10}	(kcal/mol)
Controle	19,90	3,18	30,10	38,17	1,17	15,80	19,49	3,26	30,70	12,82	6,03	46,53	14,37	4,96	41,52
Glicose 5%	22,20	2,82	26,88	35,59	1,45	16,69	27,70	2,30	21,55	13,05	5,83	45,67	13,74	5,34	43,81
NaCl 0,9%	23,58	2,65	25,32	140,85	1,18	4,21	41,84	1,73	14,28	17,67	3,68	33,81	17,42	3,75	34,24
GF ^a	23,53	2,66	25,36	86,96	1,30	6,85	42,02	1,73	14,16	18,18	3,55	32,81	15,92	4,25	37,52

^a GF = glicofisiológica

III.3.5. Energia de Ativação, E_a

Sistemas que exibem alto valor z e menor E_a são menos influenciados pela temperatura e sistemas com maior z e menor energia de ativação tem maior susceptibilidade à temperatura, como indicado na Tabela 47.

A estabilidade térmica em termos de energia de ativação foi de:

- (i) $E_a = 25,32 \text{ kcal.mol}^{-1}$ em solução de 0,9% de NaCl e $E_a = 25,36 \text{ kcal.mol}^{-1}$ em solução glicofisiológica, em água para injeção;
- (ii) em fosfato pH 6,0, similar à água para injeção, sendo $E_a = 14,28 \text{ kcal.mol}^{-1}$ em solução de 0,9% de NaCl e $E_a = 14,16 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para solução glicofisiológica, confirmando o aumento de duas vezes na estabilidade térmica da GFPuv com a adição de NaCl e glicose na solução;
- (iii) em tampão fosfato pH 7,0, a $E_a = 33,81 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $32,81 \text{ kcal.mol}^{-1}$ em solução de 0,9% de NaCl e glicofisiológica, respectivamente, sendo duas vezes maior do que os valores em solução tampão fosfato pH 6,0;
- (iv) em Tris-EDTA, a energia intrínseca e estabilidade da GFPuv foi similar em fosfato pH 7,0, com $E_a = 34,24 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (0,9% de NaCl) e $E_a = 37,52 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (glicofisiológica);
- (v) em acetato pH 5,0, o menor valor de $E_a = 4,21 \text{ kcal.mol}^{-1}$ foi observado para GFPuv em solução de NaCl 0,9%, representando o sistema mais estável para o intervalo entre 80°C e 95°C

A presença de cloreto de sódio associado com os íons que permanecem no tampão proporcionou influência positiva na estabilidade da molécula, em comparação à solução somente com glicose.

Os sistemas com menor energia intrínseca para a transformação espontânea independente da temperatura foram as soluções de cloreto de sódio 0,9% e glicofisiológica em tampão acetato pH 5,0.

III. 4. Conclusões Parciais

A temperatura de 25 °C, a GFPuv acondicionada em solução de cloreto de sódio e glicofisiológica apresentou menor estabilidade em tampão acetato pH 5,0 de 3,8 horas em solução de cloreto de sódio e de 8,8 horas em solução glicofisiológica.

A presença de solutos interferiu na estabilidade da GFPuv, medida em termos de intensidade de fluorescência, exceto em solução de tris-EDTA pH 8 que favoreceu conformação e estabilidade da GFPuv não apresentando decaimento na fluorescência.

A associação de glicose e cloreto de sódio em solução parenteral aumentou a estabilidade da GFPuv em solução de pH entre 5,0 e 6,0 e reduziu a estabilidade em solução de água. A composição da solução parenteral não interferiu na estabilidade da GFPuv em solução tampão fosfato pH 7,0.

A GFPuv confirmou sua potencialidade para utilização como indicador biológico com uso de múltiplas aplicações, quais sejam por exemplo: (i) descontaminação de sistemas de solução parenteral, sendo o sistema estável ao intervalo de pH entre 5,0 e 7,0 (solvente água), sendo os valores mais comumente observados nos produtos manufaturados, podendo ser inserida ao produto; (ii) em processo de desinfecção e pasteurização, bem como indicador de possível interação entre medicamentos diluídos em soluções parenterais.

Mostrou-se também eficaz para a utilização em processos de esterilização carreadas em dispositivos, acondicionadas em solução tampão fosfato pH 7,0 e tris-EDTA pH 8,0, onde a pequena variação de valores z em associação com ambos solutos, indicam a alta estabilidade nestas condições.

Etapa IV

Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Resistência Térmica (entre 80 e 95 °C) da GFPuv em Soluções Parenterais de Cloreto de Sódio (*)

*** Artigo submetido a Publicação:** VESSONI PENNA, T.C., ISHII, M., KUNIMURA, JENG, H. T., CHOLEWA, O., Evaluation of the Resistance Parameters for the Recombinant Green Fluorescent Protein (GFP) Exposed to Sodium Chloride Solutions at Different Concentrations, pH Values and Temperature Conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2006.

IV.1. Introdução

A Proteína Verde Fluorescente, GFPuv, é uma proteína globular e ácida (pI 4,9-5,1) e termoestável que pode ser expressa em grande variedade de organismos, *in vivo* ou em cultura de células. Trata-se de ferramenta que pode ser utilizada no monitoramento de processos biológicos e como biossensor de processos industriais e da área médica hospitalar de forma a garantir a qualidade do produto e a eficácia do processo.

A Atividade de água (Aa) presente no produto é fator determinante da estabilidade de alimentos, pois mede o potencial de crescimento microbiano, e, assim como a temperatura e o pH, é um dos principais parâmetros que influenciam no crescimento bacteriano e a sua sobrevivência. A atividade de água está relacionada com os solutos e sua concentração em solução, e, também pelo seu efeito sobre o crescimento microbiano e a estabilidade de proteínas. (KETS, DE BONT; HEIPIEPER, 1996).

Interações eletrostáticas entre os grupos carregados presentes na superfície das proteínas são alterados pela presença de sais em solução. Os íons dos sais possuem mobilidade, são unidades compactas de carga comparadas às cadeias de aminoácidos competindo efetivamente com os sítios carregados da proteína. Desta maneira, interações eletrostáticas entre os resíduos de aminoácidos da superfície de proteínas podem ser modificadas por alta concentração de sais, impactando sobre sua estabilidade.

A atividade de água foi avaliada com glicerol ou cloreto de sódio adicionado aos meios contendo microrganismos (CHIRIFE, 1994). Cloreto de sódio apresentou-se menos inibitório do que o glicerol no caso de *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* é conhecido por ser um microrganismo halo-tolerante o qual cresce a valores de Aa < 0,86 (WIJNKER; KOOP; LIPMAN, 2006) devido ao seu eficiente sistema de transporte. A adição de glicose ou cloreto de sódio afeta o crescimento microbiano, não somente pela redução da atividade de água, mas também pelas interações moleculares e iônicas.

O efeito antimicrobiano de soluções salinas concentradas na sobrevivência de bactérias não formadoras de esporos em Aa entre 0,90 e 0,75 foi avaliado. Bactérias Gram-positivas foram menos sensíveis à baixas Aa, como observado em outros estudos: (i) houve um decréscimo de um log em população de *Salmonella ssp.* Após 3 dias a Aa = 0,75; (ii) decréscimo de 0,14 log₁₀ UFC.g⁻¹.dia⁻¹ a 20 °C e Aa = 0,90 Aw em salames e redução de 4.40 log₁₀ UFC .g⁻¹.dia⁻¹ da população de *E. coli* O157:H7 em amido e (iii) redução de 5 ciclos logarítmicos em 7 dias, Aa = 0,91 para *L. monocytogenes* cultivada em TSB com extrato de levedura e adicionada de cloreto de sódio (CHIRIFE, 1994).

A estabilidade térmica da termolisina, uma metalloproteínase produzida por *Bacillus thermoproteolyticus* foi aumentada na presença de cloreto de sódio, que dependendo da concentração empregada elevou a atividade catalítica, fato que pode ser relacionado com a interação eletrostática entre a termolisina e os íons do meio. Houve aumento de 13 a 15 vezes na atividade com a adição de 4 M de cloreto de sódio a 25 °C, pH 7 ((INOUE; KAZUYA; TONOMURA 1998).

IV.2. Objetivo

O objetivo desta parte do trabalho foi determinar a estabilidade térmica da GFPuv em soluções de cloreto de sódio em concentrações entre 0,9% (condição fisiológica) e 30%, avaliando sua potencialidade como biossensor principalmente de tratamentos térmicos por calor úmido (autoclavação de soluções parenterais).

IV.3. Material e Métodos

A metodologia de análise de dados, segue descrição da Etapa I para Soluções de concentração entre 0,9% e 30% de Cloreto de Sódio, nas temperaturas entre 80 °C e 95 °C.

IV.4. Resultados de Discussão

IV.4.1. Valor de pH

O valor de pH das soluções tamponadas (10 mM) e água foram determinadas a temperatura de 25 °C, sendo os valores médios: (i) pH 7,65 ($\pm 0,17$) em Tris-EDTA pH 8,0; (ii) pH 6,08 ($\pm 0,60$) em fosfato pH 7,0; (iii) pH 4,84 ($\pm 0,12$) em acetato pH 5,0 e (iv) pH 5,88 ($\pm 0,49$) em água para injeção, WFI (Tabela 48).

A extensão da desnaturação da GFPuv foi expressa em termos do parâmetro cinético de tempo de redução decimal, valor D, intervalo de tempo requerido para redução de 90% ou um ciclo logarítmico da intensidade de fluorescência inicial da GFPuv. A desnaturação da GFPuv em soluções de cloreto de sódio (NaCl), medida pela perda de intensidade de fluorescência, foi expressa pelo logaritmo decimal da intensidade inicial da GFPuv *versus* o tempo de exposição à temperatura constante. Para estimar o valor D a temperatura de aquecimento e pH constante, a concentração inicial de GFPuv foi de cerca de 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e de 2,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a concentração final, o qual corresponde a porção linear da curva de decaimento, ($\log_{10}$ intensidade de fluorescência da GFPuv.mL⁻¹ *versus* tempo de exposição à temperatura constante).

Os valores D obtidos para a GFPuv diluída em água para injeção (*water for injection*, WFI, pH 6-7), acetato (pH 4-5), fosfato (pH 6-7), e Tris EDTA (pH 8) exposta às temperaturas de exposição de 80°C, 85°C, 90°C e 95°C, são indicados na tabela 48.

Tabela 48. Valores D para a GFPuv em soluções de NaCl a 80°C, 85°C, 90 °C e 95 °C.

	NaCl (%)	^a Aa	pH		Valor D (min)			
			Inicial	24h	80°C	85°C	90°C	95°C
IGIS-EDJA	0	0,99	7,89	8,07	24,88	8,7	5,02	3,82
	0,9	0,99	7,90	7,90	37,04	9,88	6,12	4,81
	5	0,98	7,73	7,79	40	11,61	6,54	4,83
	10	0,918	7,63	7,62	49,26	9,73	7,17	5,14
	15	0,885	7,54	7,54	65,79	14,71	6,75	5,12
	20	0,845	7,50	7,48	52,63	18,12	6,78	5,26
	25	0,795	7,51	7,49	46,95	15,22	7,96	5,45
	30	0,759	7,48	7,48	33,78	13,3	7,26	5,08
	Média		7,65	7,67			6,94	5,10
	DP		0,17	0,23			0,59	0,23
Água para injeção, WFI	NaCl (%)	Aa	Inicial	24h	80°C	85°C	90°C	95°C
	0	0,99	6,63	6,47	13,85	4,64	3,46	3,21
	0,9	0,99	6,99	6,72	20,12	8,29	5,42	4,55
	5	0,98	6,12	6,10	8,26	5,67	3,49	3,19
	10	0,918	5,86	5,75	5,74	4,34	2,46	5,48
	15	0,885	5,66	5,63	4,75	3,78	2,76	2,44
	20	0,845	5,53	5,54	4,21	3,56	2,59	2,3
	25	0,795	5,42	5,46	3,58	3,21	2,43	2,14
	30	0,759	5,30	5,40	3,44	2,91	2,32	2,37
	Média		5,94	5,88				
FOSIATO 100MVI	NaCl (%)	Aa	Inicial	24h	80°C	85°C	90°C	95°C
	0	0,99	7,08	7,05	40,32	9,28	5,52	4,38
	0,9	0,99	6,77	6,81	35,34	10,34	6,15	4,78
	5	0,98	6,33	6,29	21,19	10,39	5,41	4,64
	10	0,918	6,01	6,01	14,25	9,46	5,55	4,82
	15	0,885	5,80	5,81	11,57	8,49	4,87	4,21
	20	0,845	5,69	5,68	8,79	7,45	5,13	4,14
	25	0,795	5,49	5,45	6,99	6,84	4,5	4,02
	30	0,759	5,43	5,38	6,1	6,51	4,49	4,03
	Média		6,08	6,06			5,16	4,38
ACETATO 100MVI	NaCl (%)	Aa	Inicial	24h	80°C	85°C	90°C	95°C
	0	0,99	5,05	5,05	4,08	3,12	2,42	2,68
	0,9	0,99	5,00	5,00	3,82	3,44	3,03	3,04
	5	0,98	4,89	4,87	3,72	2,9	2,52	2,11
	10	0,918	4,82	4,80	3,47	3,38	2,12	1,83
	15	0,885	4,80	4,78	3,08	2,5	2,51	2,17
	20	0,845	4,76	4,75	*	*	3,32	3,3
	25	0,795	4,75	4,74	*	*	*	*
	30	0,759	4,71	4,69	*	*	*	*
	Média		4,84	4,83				
	DP		0,12	0,13				

^aAa = atividade de água; ^bDP = desvio padrão (p<0,05); (*) não determinado

IV.4.2. Perda de Fluorescência da GFPuv ao contato com as soluções de NaCl

A perda de intensidade de fluorescência inicial da GFPuv a temperatura de 25°C imediatamente após a diluição nas soluções imediatamente após diluição foi dependente da concentração de NaCl e da composição da solução. A perda máxima da fluorescência foi observada para a solução com 30% de NaCl em acetato (redução de 94,5% na intensidade de fluorescência). Soluções preparadas em Tris-EDTA proporcionaram as melhores condições para a estabilidade da GFPuv, com máximo decaimento de 25% na intensidade de fluorescência da em solução com até 30% de NaCl. Em WFI ou em tampão fosfato, com até 30% de NaCl, houve um decaimento de 70% na intensidade de fluorescência. Estes resultados confirmam que a presença de sais em solução pode afetar a estabilidade da GFPuv, alterando tanto a sua estrutura quanto a sua propensão à agregação, a qual não foi visível.

IV.4.3. Estabilidade térmica da GFPuv

IV.4.3.1. Estabilidade térmica da GFPuv em Tris-EDTA 10mM

O valor de pH das soluções em Tris-EDTA foi constante ($\text{pH} = 7,65 \pm 0,17$) e independente da quantidade de soluto adicionado (até 30% de NaCl, Tabela 48). A 80 °C, a GFPuv apresentou aumento da estabilidade em soluções de NaCl (Figura 16) com o valor D máximo de 65,79 min em 15% de NaCl, 2,5 maior do que na solução controle, sem NaCl ($D = 24,88$ min) e 2 vezes maior do que em solução de 0,9% de NaCl ($D = 37,04$ min) e 30% de NaCl ($D = 33,78$ min).

Figura 16. Tempo de Redução Decimal para GFPuv em Tris-EDTA 10 mM a 80°C

Os valores D da GFPuv em Tris-EDTA com 0,9% de NaCl a 80 °C ($D = 37,04$ min) foram similares aos apresentados em tampão fosfato pH 6, 1,8 vezes maior do que em água para injeção, WFI e 10 vezes maior do que em acetato com valor $D = 3,82$ min, à mesma concentração de sal (0,9% NaCl),

A 85 °C, concentrações superiores a 10% de NaCl proporcionaram estabilidade térmica similares (valor D médio = 10,40 min) em relação ao controle ($D = 8,70$ min). A maior estabilidade foi alcançada em concentração de 20% de NaCl ($D = 8,12$ min) (Figura 17).

Figura 17. Tempos de Redução Decimal para GFPuv em Tris-EDTA 10mM a 85°C, 90 °C e 95 °C

A 90 °C e 95 °C, a estabilidade térmica da GFPuv foi independente da concentração de soluto presente em solução, mas relacionada com a temperatura, proporcionando valores $D_{90^{\circ}\text{C}} = 6,94 (\pm 0,59)$ min e $D_{95^{\circ}\text{C}} = 5,10 (\pm 0,23)$ min, respectivamente para a mesma solução.

A estabilidade térmica da GFPuv melhorou com a adição de 15-20% de NaCl, onde os maiores valores D a 80 °C (65,79 min) decaíram 3,6 vezes a 85 °C (18,12 min). Ao contrário, o valor D médio decaiu 9,5 vezes a 90 °C (media D = 6,94 min) e 13 vezes a 95 °C (media = 5,10 min), acentuando a dependência a altas temperaturas.

A 90 °C e 95 °C, a GFPuv apresentou a mesma estabilidade térmica do que em fosfato e Tris-EDTA, mostrando que a composição do tampão não foi o principal fator envolvido com a estabilidade térmica.

Em análise prévia, a presença de cloreto de sódio em solução aumentou a resistência térmica da GFPuv comparada com as mesmas soluções tampão e na presença de glicose. As soluções glicofisiológicas proporcionaram os maiores valores D em fosfato pH 7 ($D_{90^{\circ}\text{C}} = 6,52$ min e $D_{95^{\circ}\text{C}} = 4,93$ min), equivalente para Tris-EDTA (pH 8) onde $D_{90^{\circ}\text{C}} = 6,64$ min e $D_{95^{\circ}\text{C}} = 5,20$ min, na mesma solução, indicando que a adição de glicose e cloreto de sódio influenciou a termoestabilidade da GFPuv favoravelmente.

IV.4.3.2. Estabilidade térmica da GFPuv em Fosfato 10mM

Em tampão fosfato a 80 °C, os valores D para a GFP em solução sem adição de NaCl ($D = 40,32$ min) decaíram 14% em 0,9% de NaCl, e duas vezes com 5% de NaCl ($D = 21,19$ min). O valor D variou linearmente com o valor de pH das soluções de fosfato de acordo com a equação:

$$\text{Valor D (min)} = 21,578 * \text{pH} - 113,05; \quad (R^2 = 0,98)$$

Nas soluções com 0,9% de NaCl em fosfato (pH 6,77) e Tris-EDTA (pH 7,90), os valores D a 80°C foram similares, sendo $D = 35,34$ min e $D = 37,04$ min, respectivamente.

A 80°C, os valores D variaram exponencialmente com a concentração de NaCl, relacionados pela equação (Figura 03):

$$\text{Log}_{10} \text{ valor D} = -0,0271 * (\text{NaCl, \%}) + 1,5172; \quad (R^2 = 0,95)$$

Esta relação exponencial entre o valor D e a concentração de NaCl mostra que para cada intervalo de concentração de NaCl, o valor D aumentará 10 vezes. Por exemplo, a adição de 30 % de NaCl (redução na atividade de água de 1,00 para 0,759) a qual mostra menor quantidade de água disponível na superfície da GFPuv induz à agregação de moléculas e a perda da intensidade de fluorescência.

A 85°C e 90°C, os valores D são relacionados diretamente com a concentração de NaCl, pelas equações:

$$\text{Log}_{10} \text{ valor D (85°C)} = -0,1617 * (\text{NaCl, \%}) + 11,02; \quad (R^2 = 0,97)$$

$$\text{Log}_{10} \text{ valor D (90°C)} = -0,0523 * (\text{NaCl, \%}) + 5,95; \quad (R^2 = 0,94)$$

Para cada aumento de 5% de NaCl, os valores D decaem 10% a 85°C e 5% a 90°C,

A 90 °C e 95 °C, os valores D médios determinados foram 5,16 ($\pm 0,60$) min e 4,38 ($\pm 0,36$) min, respectivamente, ambos independentes da concentração de NaCl e pH e equivalente aos valores D a 80°C para a faixa de concentração entre 25% (5,41 min) e 30% (4,12 min) de NaCl. O valor D médio a 90°C para a GFPuv em fosfato, pH=6,08($\pm 0,60$) foi compatível ao valor D médio = 5,10 ($\pm 0,23$ min) em Tris-EDTA, pH 7,65 ($\pm 0,17$).

Em tampão fosfato, pH 6,08 ($\pm 0,60$), embora o pH diminua com o aumento da concentração de NaCl, este sistema tampão favoreceu a estabilidade térmica da GFPuv comparada às soluções de WFI, onde os valores D foram reduzidos pela metade.

IV.4.3.3. Estabilidade térmica da GFPuv em água para injeção, WFI

O valor inicial de pH das soluções preparadas em água para injeção, WFI decaíram de pH 6,99 a pH 5,30 com até 30% de NaCl em solução, para um valor médio de pH 5,94 ($\pm 0,60$), o qual se manteve em cerca de pH 5,88 ($\pm 0,49$) após 24 h de armazenamento a 4°C. Variações similares de pH foram observadas em soluções fosfato, reforçando o fato que a composição do tampão não é o principal fator responsável pelo decaimento do valor de pH com a adição de NaCl em solução.

O valor D para a GFPuv a 80°C pode ser considerado linearmente dependente do valor de pH pela equação (Figura 18):

$$\text{Valor D} = 9,6865 \cdot \text{pH} - 49,52; \quad (R^2 = 0,95)$$

Através da análise dos coeficientes angulares (Θ), a dependência das soluções de água sobre o pH foi duas vezes menor do que a determinada ($\Theta = 21,578$) para GFPuv em soluções de fosfato com até 30% de NaCl. Os valores D também apresentaram decréscimo exponencial com o aumento de até 30% de NaCl em WFI, devido a redução do valor de pH das soluções. A influência do pH sobre a resistência térmica da GFPuv a 80 °C pode ser representada pela equação:

$$\log D = 0,47 \cdot \text{pH} - 1,96; \quad (R^2 = 0,997)$$

Figura 18. Valores D para a GFPuv relacionadas com o valor de pH da solução em água para injeção, [Valor D = 9,6865*pH - 49,52, $R^2 = 0,95$] e Fosfato 10 mM [Valor D = 21,578*pH - 113,05, $R^2 = 0,98$]

O valor D para a solução controle, sem NaCl ($D = 6,31$ min) aumentou 3 vezes com 0,9% de NaCl ($D = 20,12$ min), e decaiu pela metade com 5% de NaCl ($D = 8,26$ min) e 5 vezes na presença de 25% - 30% de NaCl em WFI (D médio = 3,51 min), de acordo com a Tabela 48.

A 85 °C, 90 °C e 95 °C, a presença de 0,9% NaCl em WFI favoreceu a estabilidade térmica da GFPuv, com valores D de 8,29 min, 5,42 min e 4,55 min, respectivamente. Os valores D para a GFPuv em concentrações maiores de 10% de NaCl foram similares a solução controle.

IV.4.3.4. Estabilidade térmica da GFPuv em acetato 10 mM

Em soluções de acetato, o valor de pH médio de pH 4,84 ($\pm 0,12$) foi próximo ao pI da GFPuv (entre 4,9-5,1) e reduziu a estabilidade térmica da GFPuv, independente da concentração de NaCl ou da temperatura de tratamento.

Figura 19. Valores D para GFPuv em Acetato 10mM a 80°C, 85°C, 90°C e 95°C

Neste caso, a adição de solutos não influenciou na termoestabilidade da GFPuv se comparada a GFPuv em solução controle, em todas as temperaturas de tratamento avaliadas até 15% de NaCl entre 80°-85°C e até 20% da NaCl entre 90°-95°C.

Houve tendência de decaimento dos valores D até a concentração de 15% de NaCl (a 80°C, $D_{\text{controle}} = 4,08$ min; $D_{15\%} = 3,08$ min; e a 85°C, $D_{\text{controle}} = 3,12$ min; $D_{15\%} = 2,5$ min) (Figura 19). Entretanto, entre 90° e 95°C, o decaimento nos valores D de 0,9% NaCl ($D = 3,03$ e $D = 3,04$ min, respectivamente) a 10% de NaCl ($D =$

2,12 e $D = 1,83$ min) aumentou para valor médio de $D = 3,3$ min em até 20% de NaCl, correspondendo a atividade de água de $A_w = 0,845$.

Os parâmetros cinéticos, valor z e o coeficiente Q_{10} ($Q_{10} = 10^{10/z}$), refletem a dependência da desnaturação da GFPuv (como medida do decaimento da intensidade de fluorescência) submetida ao aquecimento das soluções de diferentes composições. Quanto maior o valor z , mais estável é a GFPuv no sistema.

IV.4.4. Valor z

Na faixa de temperatura entre 80 °C e 95 °C os valores z variaram: (i) $z = 24,63$ °C em WFI; (ii) $z = 75,76$ °C em acetato; (iii) $z = 16,03$ °C em fosfato e (iv) $z = 18,66$ °C em Tris-EDTA, para o controle, sem NaCl (Tabela 49).

Na mesma faixa de temperatura e o intervalo de concentração de NaCl entre 0,9 % e 30% de NaCl, os valores z variaram de: (i) $z = 25,32$ °C a 6,97 °C para soluções em água pra injeção, WFI; (ii) $z = 142,86$ °C a 109,89 °C em acetato; (iii) $z = 17,67$ °C a 71,43 °C em fosfato e (iv) $z = 17,45$ °C a 18,32 °C em soluções de NaCl em Tris-EDTA.

Considerando o comportamento dos valores z dos sistemas para a GFPuv no intervalo de temperatura entre 80 °C e 95 °C, o sistema de Tris-EDTA foi o menos influenciado pela adição de NaCl, com valor z médio de 16,16 ($\pm 1,6$) °C não variando com a adição de até 30% de NaCl. Sistemas de água para injeção e fosfato mostraram influência positiva do NaCl na estabilidade térmica da GFPuv. Os valores z foram linearmente dependentes do aumento da concentração de NaCl em WFI e fosfato pelas relações: (i) valor z (°C) = $1,7962 * (\text{NaCl, \%}) + 24,288$, $R^2 = 0,93$ e (ii) valor z (°C) = $1,7028 * (\text{NaCl, \%}) + 13,535$, $R^2 = 0,95$, respectivamente.

Tabela 49. Valores z , coeficiente Q_{10} e energia de ativação, E_a , da GFPuv em sistemas de solução de cloreto de sódio

NaCl (%)	Tris-EDTA 10 mM pH 8,0			Água para Injeção 10 mM			Acetato 10 mM pH 5,0			Fosfato 10 mM pH 7,0		
	E_a (*)	Valor z (°C)	Q_{10}	E_a (*)	Valor z (°C)	Q_{10}	E_a (*)	Valor z (°C)	Q_{10}	E_a (*)	Valor z (°C)	Q_{10}
0	31,97	18,66	3,44	24,31	24,63	2,55	7,87	75,76	1,36	37,24	16,03	4,21
0,9	34,23	17,45	3,74	25,32	23,58	2,65	4,20	142,86	1,17	33,79	17,67	3,68
5	35,84	16,64	3,99	17,28	34,48	1,95	9,52	62,50	1,45	26,97	22,12	2,83
10	36,77	16,26	4,12	12,15	49,26	1,20	12,30	48,31	1,61	19,58	30,40	2,13
15	43,74	13,64	5,41	11,96	49,75	1,59	5,41	109,89	1,23	18,55	32,05	2,05
20	40,86	14,58	4,85	11,01	54,05	1,53				13,58	43,67	1,69
25	36,81	16,21	4,14	9,40	63,29	1,44				10,72	55,25	1,52
30	32,55	18,32	3,52	6,97	85,47	1,31				8,31	71,43	1,38

(*) E_a , kcal.mol⁻¹

IV.4.5. Coeficiente Q_{10}

Na faixa de temperatura entre 80 °C e 95 °C, os coeficientes Q_{10} determinados foram: (i) $Q_{10} = 2,55$, $Q_{10} = 1,36$, $Q_{10} = 4,21$ e $Q_{10} = 3,44$ em WFI, acetato, fosfato e Tris-EDTA, respectivamente nas soluções controle sem adição de NaCl (Tabela 49).

Com a adição de NaCl, a GFPuv em sistemas de acetato mostrou menos influencia das condições externas, um sistema estável com Q_{10} variando de 1,36 a 1,23 para o intervalo de até 15% de NaCl.

O sistema de Tris-EDTA proporcionou as melhores condições para a estabilidade da GFPuv no intervalo de temperatura avaliado, com os coeficientes Q_{10} variando de 3,44 a 5,41, em solução sem NaCl e 15% de NaCl (Figura 20).

Figura 20. Valor z (°C) e coeficiente para a GFPuv em sistemas de cloreto de sódio diluído Água para Injeção, Fosfato 10mM e Tris-EDTA 10mM no intervalo de temperatura entre 80°C e 95°C

Comparando os valores z, o tampão acetato foi o sistema mais uniforme para a GFPuv ($Q_{10} < 1,5$), bem como os sistemas de WFI em concentrações superiores a 10% e fosfato em concentrações superiores a 20% de NaCl. Água para Injeção e fosfato até 5% e entre 5% e 15% de NaCl respectivamente, proporcionaram estabilidade intermediária ($1,5 < Q_{10} < 3,5$). Sistemas de Tris-EDTA ($3,5 < Q_{10} < 6,0$) mostrou que a GFPuv foi menos afetada por influências externas.

IV.4.6. Energia de Ativação, E_a

O parâmetro de energia de ativação, E_a , é relacionado com a energia intrínseca do sistema e correlacionado com sua estabilidade durante o aquecimento. Desta forma, sistemas estáveis têm menor energia do que os sistemas instáveis. Conseqüentemente, sistemas que exibem menor energia de ativação são menos influenciados pela temperatura, como mostra a tabela 49. Diferenças na cinética da energia de ativação da GFPuv resultam das diferentes composições das soluções.

A quantidade de água presente em um meio é um parâmetro importante para a atividade de enzimas, a qual é melhor quantificada em termos de atividade de água, A_w . A água aumenta a flexibilidade interna da enzima e conseqüentemente, sua atividade catalítica. Atividade de água é importante para a estabilidade de uma proteína, uma vez que é envolvida em uma série de mecanismos de desnaturação (PERSSON et al., 2002).

Entre 80 °C e 95 °C, a estabilidade térmica da GFPuv foi maior em acetato devido a agregação das moléculas, promovida pelo valor de pH próximo ao pI. Em pH 5, o acetato de sódio está totalmente dissociado, e os íons competem por moléculas de água, as quais têm interação preferencial com os íons da solução, promovendo a agregação da GFPuv. Em acetato, a agregação influenciou a estabilidade térmica da GFPuv, com a menor energia intrínseca para a transformação espontânea, independente da temperatura e da concentração de NaCl em solução.

A inativação térmica de polifenoloxidase em abacaxi, quando aquecida a temperaturas entre 70 °C e 90 °C, com valores D variando de 91,3 min e 11,4 min, corresponderam a valor z de 21,5 °C e E_a (kJ/mol) = 82,8 kJ (1 caloria = 4,18 J; ou 19,81 Kcal.mol⁻¹) (CHUTINTRASRI; NOOMHORM, 2006). A GFPuv apresentou maior estabilidade do que a polifenoloxidase nos sistemas compostos por água (>5% NaCl), fosfato (>10% NaCl) e acetato (até 10 % NaCl).

A energia de ativação da termolisina aumentou até 30 e 33 kcal. mol⁻¹ com a adição de 0,5 a 1,5 M de NaCl (5% a 15% NaCl), decaindo a 15 Kcal.mol⁻¹, na presença de 4 M de NaCl (25% de NaCl). Neste estudo, a energia de ativação da GFPuv decaiu na presença de até 30% de NaCl nos sistemas de água para injeção, acetato e fosfato. Entretanto, para a GFPuv em sistema de Tris-EDTA com 30% de NaCl, a energia de ativação (E_a = 31.97 kcal. mol⁻¹) foi próxima ao valor determinado para a proteína na solução controle, sem adição de NaCl (E_a = 32,55 kcal. mol⁻¹), sendo o comportamento similar ao observado para a termolisina no intervalo entre 0 M e 4 M de NaCl, pH 7 (INOUE; KAZUYA; TONOMURA 1998).

A estabilidade de transglutaminases (TGases) na presença de sais neutros (pH próximo a 7) mostrou que a presença de cloreto de sódio potencializa a atividade de TGases, a qual ocorreu instantaneamente e reversivelmente, sugerindo pequenas

variações conformacionais na estrutura da TGase (NOZAWA; MAMEGOSHI;SEKI, 1999). A GFPuv não apresentou recuperação da intensidade de fluorescência em todas as condições estudadas.

A solubilidade de lisozima em soluções aquosas de cloreto de sódio (pH 4,5 e 7,0), em solução de acetato de sódio (pH 8,3) e em solução aquosa de cloreto de magnésio (pH 4,1), foi observada e relacionada com a solvatação preferencial da proteína em solução aquosa (SHULGIN; RUCKENSTEIN, 2005).

Figura 21. Energia de Ativação (kcal/mol) para a GFPuv em sistemas de Água para Injeção, Fosfato 10mM e Tris-EDTA 10mM no intervalo de temperatura entre 80°C e 95°C

Considerando os sistemas onde a estabilidade térmica da GFPuv foi avaliada, a energia de ativação (E_a) variou (Tabela 49, Figura 21):

(i) em água para injeção, WFI, a $E_a = 24,31 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para GFPuv na solução controle (WFI), aumentou para $E_a = 25,32 \text{ kcal.mol}^{-1}$ com 0,9% de cloreto de sódio, decaindo até $E_a = 6,97 \text{ kcal.mol}^{-1}$ com 30% NaCl;

(ii) Em acetato (pH 5), o menor valor E_a de $4,20 \text{ kcal.mol}^{-1}$ foi observado para a GFPuv em soluções de 0,9% de NaCl, menores do que $E_a = 7,87 \text{ kcal.mol}^{-1}$

para a solução controle, aumentando para 12,30 kcal.mol⁻¹ em solução de 10% de NaCl.

(iii) Em fosfato (pH 7), a energia de ativação decresceu de 33,79 kcal.mol⁻¹ a 8,31 kcal.mol⁻¹ para solução de NaCl em concentração entre 0,9% e 30%, mostrando que a adição de 30% de NaCl em solução reduziu a energia de ativação em até 4,5 vezes comparada a solução controle, $E_a = 37,24$ kcal.mol⁻¹.

(iv) Em Tris-EDTA, a energia intrínseca e variação na estabilidade da GFPuv foi maior do que em WFI, com $E_a = 31,97$ kcal.mol⁻¹ (controle), aumentando para $E_a = 34,23$ kcal.mol⁻¹ alcançando um valor máximo de $E_a = 43,74$ kcal.mol⁻¹ a 15% de NaCl, equivalente a GFPuv em solução de 5% de glicose ($E_a = 43,81$ kcal.mol⁻¹) obtidos em estudos na análise de glicose (VESSONI PENNA, 2006), decaindo para $E_a = 32,55$ kcal.mol⁻¹ (30% de NaCl), ao intervalo entre 0,9% e 30% NaCl.

Os valores D foram dependentes do pH das soluções sendo: D em acetato < D em WFI < D em fosfato < D em Tris-EDTA e a concentração de NaCl.

Entre 80 °C e 95 °C, a quantidade de energia de ativação que desestabiliza a molécula foi dependente do valor de pH do tampão: E_a acetato < E_a fosfato < E_a WFI < E_a Tris-EDTA. Em pH entre 7 e 8, a GFPuv está na sua conformação nativa e, nestes sistemas o desdobramento requer maior energia do que a energia requerida para os sistemas de água para injeção.

Soluções de NaCl preparadas em fosfato e em WFI exibiram variações similares no valor de pH, mas estes sistemas influenciaram a estabilidade térmica da GFPuv de maneiras diferentes.

Em acetato, a GFPuv tendeu à agregação, o valor de pH foi próximo ao ponto isoelétrico, pI, da proteína, entre 4,9 e 5,1. A agregação promove um aumento da estabilidade térmica da proteína neste sistema.

A presença de cloreto de sódio associado aos íons dos sistemas tampão proporcionou influência positiva sobre a estabilidade da molécula nos sistemas e temperaturas avaliadas.

IV.5. Conclusões Parciais

Cloreto de sódio associado aos sistemas tampões proporcionaram influência positiva na estabilidade da GFPuv, considerando o intervalo de temperatura avaliado.

Em soluções preparadas em Tris-EDTA, a estabilidade térmica da GFPuv melhorou com a adição de 15-20% de NaCl, onde os maiores valores D a 80 °C (65,79 min) decaíram 3,6 vezes a 85 °C (18,12 min). Ao contrário, o valor D médio decaiu 9,5 vezes a 90 °C (média D = 6,94 min) e 13 vezes a 95 °C (média = 5,10 min), acentuando a dependência a altas temperaturas.

Soluções de NaCl preparadas em fosfato e em WFI exibiram variações similares no valor de pH, mas estes sistemas influenciaram a estabilidade térmica da GFPuv de maneiras diferentes.

Em acetato, a GFPuv tendeu à agregação, o valor de pH foi próximo ao ponto isoelétrico, pI, da proteína, entre 4,9 e 5,1. Houve tendência de decaimento dos valores D até a concentração de 15% de NaCl (a 80°C, $D_{\text{controle}} = 4,08$ min; $D_{15\%} = 3,08$ min; e a 85°C, $D_{\text{controle}} = 3,12$ min; $D_{15\%} = 2,5$ min).

A presença de cloreto de sódio associado aos íons dos sistemas tampão proporcionou influência positiva sobre a estabilidade da molécula nos sistemas e temperaturas avaliadas.

A alta estabilidade térmica da GFPuv confirmou seu potencial uso como indicador biológico e eficiente marcador em sistemas com até 30% de NaCl em solução, dependente da temperatura de processamento como observado pelos valores z, Q_{10} e energia de ativação destes sistemas.

Etapa V

Aplicação da GFPuv como Potencial Indicador Biológico em Processos de Esterilização por Óxido de Etileno

V.1. Introdução

O óxido de etileno, EtO, tem sido frequentemente utilizado como gás esterilizante no processo de esterilização a baixa temperatura, no processamento da esterilização de produtos médico-hospitalares termosensíveis. Produto tóxico, na forma de gás, promove a alquilação de proteínas, do DNA e RNA do microrganismo, impedindo sua reprodução, prevenindo o metabolismo celular normal e a replicação microbiana (ISO 11135, 1994, BRASIL, 1999).

Oxigenadores de Membrana, Cânulas e Tubos de PVC são utilizados em perfusões com circulação extracorpórea e em cirurgias cardíacas, possibilitando a circulação sanguínea com trocas gasosas. Estes itens são manufaturados em sala limpa classe 100.000, embalados individualmente e esterilizados por EtO, utilizando-se esporos de *Bacillus atrophaeus*, denominado anteriormente, *B. subtilis var niger*. (BURKE et al., 2004) como indicadores biológicos (ISO 11135, 1994, BRASIL, 1999).

V.2. Objetivo

Esta etapa do projeto avaliou a estabilidade da GFPuv frente ao agente esterilizante químico, EtO, para ser utilizada como potencial indicador biológico em processos a temperatura inferior a 100°C e na presença de umidade.

V.3. Material e Métodos

V.3.1. Processo de Esterilização

A esterilização por óxido de etileno, EtO (470 ± 30 mg/l) foi realizada em autoclave de dimensões internas de 1,4 m x 4,2 m x 2,0 m - volume útil = 11,76 m³, (Anton Pfaf Ltda, São Paulo, SP, Brasil), instalada na empresa Edwards Lifesciences Comércio e Indústria de Produtos Médico-Cirúrgicos Ltda., utilizando-se mistura de 10% de EtO e 90% de CO₂.

Os ciclos de esterilização foram de 2 horas (ciclo curto), 4 horas (ciclo médio) e 8 horas (ciclo longo) de exposição ao EtO.

Cada ciclo compreendeu cinco fases distintas conforme descrito (Tabela 50):

- a) etapa 01: elevação da temperatura de tratamento, a $50 (\pm 5) ^\circ\text{C}$;
- b) etapa 02: evacuação inicial ($6 (\pm 2)$ kPa, por tempo inferior a 60 minutos), o que fornece melhor condição de umidificação e aquecimento;
- c) etapa 03: umidificação, realizada a $12 (\pm 2)$ kPa, por tempo dependente do volume de carga;
- d) etapa 04: injeção de gás a pressão de $285 (\pm 10)$ kPa e tempo de injeção de 30 minutos;
- e) etapa 05: exposição ao gás, dependente da quantidade e carga do material, feita sob pressão e umidade,
- f) etapa 06: aeração com ciclos alternados de reevacuação ($6 (\pm 2)$ kPa) e injeção de ar ($80 (\pm 4)$ kPa). Período necessário para que o resíduo de óxido de etileno seja reduzido a níveis que não represente danos à saúde dos usuários dos artigos esterilizados.

Tabela 50. Parâmetros dos ciclos de esterilização realizados.

ETAPAS DO CICLO		PARÂMETROS DO CICLO			FAIXA DE CONTROLE
Temperatura da Câmara		50°C			45 °C à 55°C
Evacuação Inicial	Pressão de Evacuação	6 kPa			4 a 8 kPa
	Tempo de Evacuação	N/A			Menor que 61 minutos
Umidificação/ Estática	Pressão	12 kPa			10 a 14 kPa
	Tempo	60 minutos			Mín de 60 minutos
Injeção de Gás	Pressão	285 kPa			275 a 295 kPa
	Tempo	30 minutos			20 - 60 minutos
Exposição Ao Gás	Pressão	285 kPa			275 a 295 kPa
	Tempo de exposição	120 min. (2 h)	240 min (4 h)	480 min (8 h)	120 a 490 minutos
Lavagem com ar	1ª a 5ª Reevacuação	6 kPa			4 a 8 kPa
	Injeção de Ar	80 kPa			76 a 84 kPa

V.3.2. Proteína Verde Fluorescente recombinante, GFPuv

Alíquotas de 1 mL de GFPuv (concentração de 5µg de GFPuv/mL) diluída em solução de tris-EDTA pH 8,0, foram liofilizadas (FTS Systems, Stone Ridge, NY, Estados Unidos) em frascos com tampa de rosca e septo de papel grau cirúrgico que permitisse o contato do gás EtO com a proteína contida no interior.

Na esterilização dos Oxigenadores de Membrana (ciclo curto) e Tubos PVC (ciclos longo e médio), a GFPuv liofilizada foi acondicionada em embalagens Tyvek, e dispostas na posição superior das embalagens (Figura 22).

Figura 22. Sequência de acondicionamento dos Indicadores Biológicos. Proteína GFPuv liofilizada e armazenada na parte superior das caixas.

Na esterilização das cânulas de perfusão (ciclo curto) a GFPuv liofilizada foi inserida no interior de cânulas de perfusão e submetida a tratamento por óxido de etileno por período de 2 horas (Figura 23).

Figura 23. Disposição da GFPuv no interior das cânulas de perfusão: (A) GFPuv liofilizada; (B) Cânula com GFPuv inserida; (C) Cânula com frasco contendo GFPuv embalados para esterilização por ETO.

A intensidade de fluorescência remanescente da GFPuv após o processo, foi convertida em concentração, determinada pela curva padrão (Figura 24):

$$(I) = 134,64 + 103,61 * (\mu\text{g GFPuv} / \text{mL}); R^2 = 0,98,$$

Figura 24. Curva padrão da concentração de GFPuv (mg/mL) em função da intensidade de fluorescência ($\lambda_{exc} = 394$ nm e $\lambda_{em} = 509$ nm)

V.3.3. Esporos de *Bacillus atrophaeus*

Foram utilizados esporos de *Bacillus atrophaeus* (denominado anteriormente *Bacillus subtilis var niger*, ATCC 9372), como indicadores biológicos (IB) do processo, sendo introduzidos junto ao produto e no interior das caixas de papelão. O “produto inoculado” foi acondicionado na carga de esterilização e processado. Após o processamento, os IBs foram retirados e inoculados em meio de cultivo “Soybean Casein Digest Medium” (TSB), incubados a temperatura de 30° - 35 °C por sete dias.

V.3.4. Disposição dos Indicadores Biológicos

Cada caixa contendo os itens a serem esterilizados foi disposta em *pallets* de configuração variada de acordo com o produto a ser esterilizado. A carga total da autoclave compreendeu 3 *pallets* completos, sendo os esporos de *Bacillus atrophaeus* e a GFPuv distribuídos no interior dos *pallets* de acordo com a Figura 25.

Figura 25. Disposição das amostras de GFPuv e esporos de *B.atrophaeus* dentro dos pallets e no interior da autoclave (NOGAROTO; VESSONI PENNA, 2006).

Após exposição ao gás, os produtos permaneceram em sala climatizada ($40^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$) com aeração forçada, até a dissipação do gás óxido de etileno (EtO) e resíduos etilenocloridrina (EtC) e etilenoglicol (EtG) aos limites aceitáveis pela legislação.

Após determinação da quantidade de resíduos no produtos por cromatografia gasosa (cromatógrafo HP, modelo HP6890, Hewlett-Packard, Wilmington, DE, Estados Unidos) (dados não descritos), os indicadores biológicos foram retirados e avaliados.

V.4. Resultados e Discussão

Embora houvesse circulação interna para homogeneização do gás e da umidade no interior da câmara, a concentração remanescente de GFPuv indicou áreas distintas, com ação mais intensa do gás na parte central da autoclave, correspondente ao pallet 2 (Tabela 51).

Figura 26. Perda da Intensidade de Fluorescência da GFPuv das amostras expostas à esterilização por óxido de etileno.

Houve variação da intensidade de fluorescência da GFPuv dentro de um mesmo pallet devido possivelmente à distribuição não homogênea do gás na parte inferior, correspondente aos pares de posições (1 e 2); (7 e 8); e (12 e 13), na parte central correspondente as posições 4, 9 e 15 e na parte superior dos pallets, correspondentes aos pares (5 e 6), (10 e 11) e (16 e 17).

Tabela 51. Intensidade de Fluorescência remanescente da GFPuv após 2, 4 e 8 horas de exposição ao EtO

	Concentração			2 horas			4 horas			8 horas		
	Inicial (µg/mL)	Concentração (µg/mL)	Perda (%)	Concentração (µg/mL)	Perda (%)	Concentração (µg/mL)	Concentração (µg/mL)	Perda (%)	Concentração (µg/mL)	Perda (%)	Concentração (µg/mL)	Perda (%)
pallet 1	1	5,44	5,26	3,41	18,23	4,39	4,45	18,23	4,39	19,45	4,56	16,34
	2	5,44	5,17	5,08	22,87	4,07	4,20	22,87	4,07	25,32	4,06	25,48
	3	5,44	5,20	4,51	15,26	4,07	4,62	15,26	4,07	25,78	4,04	28,74
	4	5,44	5,48	-0,54	16,05	4,24	4,57	16,05	4,24	22,12	4,19	23,02
	5	5,44	5,05	7,33	14,38	4,46	4,66	14,38	4,46	18,04	4,23	22,29
	6	5,44	5,59	-2,53	17,79	3,98	4,48	17,79	3,98	26,98	3,88	29,62
pallet 2	média			2,88	17,43			17,43		22,49		23,52
	7	5,44	5,22	4,19	16,09	4,24	4,57	16,09	4,24	22,12	4,19	23,02
	8	5,44	5,46	-0,15	17,53	4,46	4,49	17,53	4,46	18,04	4,23	22,29
	9	5,44	5,03	7,72	16,09	4,46	4,57	16,09	4,46	18,04	4,23	22,29
	10	5,44	4,89	10,19	28,34	4,23	3,90	28,34	4,23	22,29	3,98	26,98
	11	5,44	5,02	7,81	29,62	3,98	3,83	29,62	3,98	26,98		
pallet 3	média			5,95	21,53			21,53		22,49		23,52
	12	5,44	5,06	7,22	19,62	4,34	4,38	19,62	4,34	20,28	4,34	20,30
	13	5,44	5,15	5,41	25,26	4,34	4,07	25,26	4,34	20,30	4,30	21,06
	14	5,44	5,85	-7,33	8,69	4,30	4,97	8,69	4,30	21,06	3,85	29,41
	15	5,44	5,11	6,29	11,39	4,09	4,83	11,39	4,09	24,90	3,96	27,38
	16	5,44	5,52	-1,40	18,25	4,09	4,45	18,25	4,09	24,90	3,96	27,38
	17	5,44	5,44	0,17	24,19	3,96	4,13	24,19	3,96	27,38		
	média			1,73	17,90			17,90		23,89		23,89

No ciclo de 2 horas de exposição do Oxigenador de Membrana ao gás, a perda da concentração de GFPuv variou de 0,17% para o ponto 17 até 10,19% para o ponto 10. O tempo de exposição ao gás de 2 horas, não afetou a concentração da proteína nos pontos 4, 6, 8, 14 e 16, que não apresentaram perda de fluorescência.

O ciclo de 4 horas de exposição dos tubos de PVC ao gás proporcionou queda na concentração de GFPuv em todos os pontos monitorados dentro da autoclave, variando de 8,69% a 29,62%, respectivamente nos pontos 14 e 11 da autoclave.

Após 8 horas de exposição dos tubos de PVC ao gás houve queda semelhante na concentração de GFPuv comparada ao ciclo de 4 horas, indicando a estabilidade da proteína frente ao agente químico. As perdas de concentração da GFPuv variaram de 16,34% a 29,41% nos pontos 2 e 15, respectivamente.

Maior redução na concentração de GFPuv ocorreu na parte central da autoclave (pallet 2), correspondendo aos pontos 10 e 11, posicionados na parte superior, onde se encontra a ventilação da câmara, para homogeneização do gás. Isto ocorre porque o gás tende a não permanecer depositado na parte inferior, e sim se expandir para a parte superior da autoclave.

Quanto maior o tempo de exposição da carga ao gás, mais homogênea foi a redução na concentração de GFPuv, devido ao tempo de contato e estabilização das condições internas na câmara.

A ação do gás sobre a GFPuv foi semelhante nos pallets 01 e 03 que correspondem à entrada e saída da câmara, sendo a ação mais intensa no pallet central, nos ciclos de 2 e 4 horas.

O processamento por 2 horas proporcionou a redução média de concentração de GFPuv de 2,88% e de 1,73% nos pallets 01 e 03 respectivamente e de 5,95% no pallet 2. No período de 4 horas de exposição, a perda média de concentração de GFPuv foi de 17,43% e de 17,90% nos pallets 01 e 03 e de 21,53% no pallet 02.

Quando o sistema foi exposto por 8 horas, ocorreu homogeneização das condições internas na câmara, apresentando perda igual para os três segmentos da autoclave, sendo as perdas médias de 23,52%, 22,49% e de 23,89% nos pallets 01, 02 e 03, respectivamente.

Tabela 52. Concentração de GFPuv após 2 horas de exposição ao EtO

		Concentração Inicial ($\mu\text{g/mL}$)	2 horas Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Perda (%)
pallet 1	1	2,29	0,97	57,8
	2	2,29	0,52	77,3
	3	2,29	1,59	30,6
	4	2,29	1,27	44,6
	5	2,29	0,72	68,3
	6	2,29	0,95	58,5
pallet 2	7	2,29	0,95	58,5
	8	2,29	0,90	60,6
	9	2,29	0,95	58,2
	10	2,29	0,60	73,7
	11	2,29	0,62	72,8
	12	2,29	0,51	77,9
pallet 3	13	2,29	0,96	58,0
	14	2,29	0,45	80,4
	15	2,29	1,11	51,5
	16	2,29	0,90	60,8
	17	2,29	0,57	75,0

O processamento de cânulas de perfusão por óxido de etileno por período de 2 horas (Tabela 52) indicou que a penetração do gás na embalagem e no material foi eficiente, ocasionando redução entre 30,6 % e 80,4% nos pontos da câmara avaliados. Os pontos de menor penetração do gás corresponderam aos pontos 3 e 4, pallet 01 (próximo à saída da câmara) e ao ponto 15, pallet 3 (próximo à entrada da câmara). Esta diferença na penetração do gás indicou melhor atuação do gás na câmara no pallet 2, posição intermediária, a qual se encontra entre os dois pontos de entrada do gás na parte inferior da câmara (Tabela 52, Figura 26).

V.5. Conclusões Parciais

A GFPuv liofilizada confirmou sua potencialidade como indicador biológico da penetração do gás óxido de etileno e sua distribuição durante o processamento de artigos médico-hospitalares termolábeis, indicando diferenças de atuação do gás no interior da câmara e sobre o material, quando utilizada a metade da concentração (2,29 µg/mL) aplicada em oxigenadores de membrana e tubos de PVC (5,44 µg/mL).

A câmara esterilizadora avaliada apresentou distribuição de calor no seu interior adequada ao processo, e que combinada com os demais parâmetros de umidificação, concentração do gás e tempo de exposição proporcionou desempenho satisfatório da esterilização.

Etapa VI

Aplicação da GFPuv como Indicador Biológico em Processos de Esterilização por Calor Úmido

VI.1. Introdução

Soluções Parenterais de Grande Volume, SPGV, são submetidas a autoclavação em temperaturas dependentes do tipo de frasco em que são envasadas. Nas operações de esterilização terminal, SPGV envasadas em embalagens de polietileno são termicamente processadas a temperaturas inferiores a 110 °C e, quando envasadas em embalagem de polipropileno podem ser submetidas às temperaturas superiores, geralmente 121 °C (VESSONI PENNA et al., 2002). Outras relações tempo-temperatura podem ser estabelecidas desde que sejam demonstrados estudos adequados e reprodutivos do nível de letalidade, quando operações de rotina são definidas.

VI.1.1. Validação de Processo de Autoclavação de Soluções Parenterais

O processo de esterilização, parte integrante de programa de controle de infecção, deve ser avaliado antes, durante e após a execução do mesmo. Normas e regulamentos (ISO 11134, 1995) são estabelecidos para definir as exigências necessárias para validação e monitoramento das etapas que envolvem o processo de esterilização, dos quais aqueles mais comumente utilizados são: calor úmido saturado, óxido de etileno e radiação ionizante. Baseando-se nestas normas, guias são elaboradas para os fabricantes de artigos médico-hospitalares para assegurar o sucesso da validação do processo de esterilização.

Uma das vantagens da validação do processo de esterilização é a elevada exigência no monitoramento das diferentes etapas da qualificação do processo térmico. O histórico documentado do controle validado do processo de esterilização justifica a possível aplicação dos procedimentos de liberação paramétrica em relação aos indicadores biológicos convencionais indispensáveis para assegurar o nível de esterilidade dos materiais processados. Desta forma, a liberação destes materiais basear-se-ia nos registros do controle físico de validação do processo de esterilização em preferência ou substituição aos indicadores biológicos e químicos utilizados para assegurar o nível de esterilidade e o máximo patamar de temperatura atingido. (SCHNEIDER et al., 2003).

VI.1.2. Validação *versus* Qualificação

Os termos validação e qualificação não são idênticos. Equipamentos são qualificados e processos validados. A qualificação garante que a autoclave apresente capacidade operacional que assegure o nível de esterilidade de 10^{-6} para as condições estabelecidas, respeitando o produto a ser submetido à esterilização. A validação de um ciclo de esterilização para atingir ao nível de segurança de esterilidade de 10^{-6} na inativação da biocarga de um produto, para uma determinada configuração de carga pré-estabelecida é realizada por análise dos parâmetros físicos registrados (tempo, temperatura e pressão) e da eficácia microbiológica por intermédio do uso dos indicadores biológicos.

O monitoramento de rotina deve manter os padrões de garantia de esterilidade nas condições validadas.

Como recomendado pelo Instituto Nacional Americano de Normas (ANSI), a qualificação-validação de um processo de esterilização por calor úmido envolve: (a) a qualificação da autoclave verificando a operacionalidade da mesma; (b) a validação do processo por estabelecimento da efetividade e reprodutibilidade do ciclo em relação ao produto e configuração da carga e, (c) avaliação de possíveis alterações que possam ocorrer no produto durante o processo de esterilização.

O histórico destes dados certificaria a liberação paramétrica do produto, independentemente da avaliação do indicador biológico.

O FDA define validação como “*evidência estabelecida e documentada a qual proporciona nível de garantia da consistência operacional do processo atribuído na produção de produto com especificações e qualidades definidas*”.

De acordo com a RDC 210 de 04 de Agosto de 2003, a validação é “*um ato documentado o qual atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema garante os resultados esperados. A validação é um procedimento complementar às Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos*”.

Um estudo de validação é baseado em monitoramento mais intensivo e detalhado em relação aquele realizado na rotina, de forma a garantir que todas as

etapas de produção são confiáveis e que atendem aos critérios de qualidade definidos pela legislação vigente (ISO 11134, 1994).

Para soluções parenterais submetidas a autoclavação por vapor úmido, a solução envasada deve apresentar baixa carga (biocarga) microbiana em células vegetativas (< 10 UFC/100 mL) e ausência de endotoxinas ou pirogênios ($< 0,25$ EU/mL). É importante ressaltar que os ambientes da preparação, do envase e do fechamento sejam de elevada qualidade de assepsia, minimizando o risco de contaminação cruzada do produto, auxiliando a garantir o sucesso da esterilização. A solução envasada em seu recipiente selado é então submetida à esterilização por calor úmido, para atingir nível de esterilidade (SAL) de 10^{-6} quanto ao indicador biológico escolhido (USP 28, ISO 11134, 1994).

O princípio básico da garantia de qualidade tem como objetivo a produção de soluções que estejam em conformidade com o uso pretendido. A validação de processo é um elemento chave para garantir a qualidade do produto final.

A validação deve compreender as etapas de Qualificação de Instalação, Qualificação Operacional e Qualificação de Processo.

A Qualificação de Instalação envolve a qualificação dos equipamentos e instrumentos que tornam a autoclave operacionável. Um programa de qualificação da autoclave deve ser estabelecido para demonstrar que o equipamento é capaz de ser operado rotineiramente, nos padrões especificados. Dependendo do tipo de equipamento e seu histórico de utilização, a qualificação deve ser repetida periodicamente.

A Qualificação Operacional refere-se a uma certificação da operacionalização do equipamento conforme as especificações do fabricante e quanto às condições de operações aplicadas ao produto específico. Estas condições referem-se à distribuição de calor na câmara vazia e da pressão na câmara interna além do controle das variáveis do processo. Inclui ainda procedimentos operacionais escritos e treinamento de pessoal. O objetivo é avaliar se o equipamento e sistema estão prontos para operar o produto.

A Qualificação de Performance / Validação de Processo ocorre após a instalação e operação estarem qualificadas. O equipamento ou sistema é testado com o produto para determinar se o processo é efetivo e reprodutível, atendendo as especificações e os requisitos de qualidade estabelecidos para o produto.

Os parâmetros físicos de cada ciclo (variação de temperatura durante a exposição do produto às etapas do ciclo de esterilização, quais sejam: aquecimento, patamar de temperatura e resfriamento) são documentados e devem estar dentro de limites aceitáveis. Pelo fato destes parâmetros físicos fornecerem a confiabilidade do processo, os sistemas de monitoramento devem ser calibrados em relação a padrões definidos.

A validação de um processo de esterilização deve incluir a distribuição de temperatura na câmara e a penetração de calor no produto, confirmados pelo controle biológico. A configuração da carga avaliada retrata aquela regularmente autoclavada, sendo realizada com pelo menos três lotes sucessivos, tendo como resposta a uniformidade dos parâmetros analisados em relação ao lote teste, confirmando os critérios de aceitação. O procedimento de validação periódica pode servir para aperfeiçoar as variáveis do processo (por exemplo, adequação do tempo total de autoclavação ao nível de esterilidade estabelecido) e reduzir os custos finais do mesmo.

O estudo de *Distribuição de Calor na Câmara* mostra se o calor gerado é distribuído de forma uniforme e reprodutível em todos os pontos da câmara vazia, estabelecendo áreas frias e quentes, que devem ser confirmadas no estudo de distribuição de calor da câmara, considerando as configurações de carga máxima e mínima. Cada estudo deve empregar no mínimo dez sensores, calibrados (variação inferior a $\pm 0,5$ °C), dispostos de forma geométrica de modo a abranger todas as áreas verticais e horizontais da câmara. Um dos sensores de temperatura deve estar próximo ao sensor de temperatura do registrador da autoclave, acoplado ao programa de comando do equipamento. Cada sensor deve ser posicionado em pontos geometricamente definidos e fixos, sem entrar em contato direto com produtos ou superfícies internas da autoclave.

O estudo de *Penetração de Calor* é realizado para assegurar que a exposição ao calor úmido das áreas frias (menor taxa de aquecimento) e quentes (maior taxa de aquecimento) na configuração de carga máxima e mínima, resulta na letalidade térmica estabelecida. Os sensores de temperatura devem ser inseridos no ponto geométrico de cada frasco, os quais podem estar inoculados com o indicador biológico (IB), para o controle biológico.

VI.1.3. Análise da eficácia do ciclo de esterilização

A validação por processos térmicos pode ser conduzida pelo método do *Bioburden* ou biocarga, ou pelo método do *Overkill* ou sobremorte. No método do *Bioburden*, as características da carga microbiana (biocarga) no produto a ser esterilizado são conhecidas quanto à população e resistência ao calor úmido, visando ajustar o tempo de exposição do produto ao calor, minimizando a degradação do mesmo e garantindo nível de esterilidade adequado. No método do *Overkill*, a biocarga não é caracterizada, e considera-se como referência um microrganismo (Indicador Biológico, IB) em concentração populacional maior do que aquela presente no produto e, que apresenta resistência ao processo superior àquela inerente à biocarga. O controle biológico do processo é realizado através da análise de sobrevida do Indicador Biológico.

Indicadores biológicos convencionais são dispositivos formados por carreadores inoculados com esporos bacterianos resistentes ao processo de esterilização e proporcionam informação sobre o ciclo de esterilização, quando associados aos registros físicos do processo. Dependendo do carreador (ou suporte), a penetração ao agente esterilizante e contacto com o microrganismo determina os parâmetros de cinética de morte microbiana, como o tempo de redução decimal (valores D) e o valor z que mensuram a resistência do IB ao processo de esterilização.

O IB pode ser constituído de esporos bacterianos suspensos em solução ou impregnados em fita de papel de filtro, ou em material da mesma composição do produto a ser esterilizado. O IB deve ser atestado quanto à população de esporos inicialmente viáveis (biocarga) e presentes no carreador assim como sua resistência,

aferida em termos de valor D, determinada em relação ao agente esterilizante e às condições que definem o processo de esterilização.

Após o uso de IB convencionais, faz-se necessário um período de incubação em média de 24 a 72 horas às condições ideais (carreador imerso em meio de cultivo e temperatura apropriados), que estimulam o crescimento de esporos sobreviventes. O período de incubação exigido para averiguar a possível sobrevivência de esporos no IB após o processo de esterilização limita o emprego de IB na monitoração diária dos processos, havendo a tendência por se optar por “liberação paramétrica” do material esterilizado em questão.

Os esporos bacterianos dos gêneros de *Clostridium* (*C. sporogenes*) e de *Bacillus* (*B. stearothermophilus* e *B. subtilis*), por exemplo, são empregados na preparação de indicadores biológicos (IB) utilizados para monitorar e validar processos de esterilização por calor úmido, ao qual apresentam resistência superior à biocarga (USP 28, 2004).

Com o intuito da redução do tempo de incubação, foi desenvolvido sistemas de indicadores biológicos nos quais se utilizam esporos de *Bacillus stearothermophilus*. Utilizando-se de meio de cultura apropriado, o crescimento de esporos de *B. stearothermophilus* após o processo de esterilização pode ser avaliado através da produção da enzima alfa-glucosidase, liberada durante a multiplicação da célula germinada (proveniente do esporo ativado), que necessita entre 1 a 3 horas de incubação (60°C) para desenvolver coloração fluorescente no meio, registrada por lâmpada acoplada à incubadora (3M, Informações técnicas, <http://products3.3m.com/catalog>).

Esporos sobreviventes podem ser igualmente avaliados após incubação e desenvolvimento da célula germinada em meio de cultivo contendo corante sensível à alteração do valor de pH do meio (3M, Informações técnicas, <http://products3.3m.com/catalog>).

Indicadores químicos e biológicos utilizados para validar e monitorar processos de esterilização por vapor úmido são avaliados em relação aos métodos de referência de Normas Internacionais (ISO 11138, Partes 1 a 3).

Em alternativa aos métodos tradicionais, foi avaliada a resistência térmica de esporos de *B. subtilis* W 1012, modificado geneticamente de modo a expressar a proteína verde fluorescente, para ser empregado como indicador biológico de processos térmicos. A principal vantagem está na leitura imediata da fluorescência emitida pela proteína, visualizada com o auxílio de lâmpada UV ou por microscopia de fluorescência, com a lâmina a fresco.

Para se estabelecer um novo conceito de análise, é necessária a avaliação e comparação de resultados, com o Indicador Biológico convencional, no caso, esporos de *B. atrophaeus*, anteriormente denominado *B. subtilis* ATCC 9372 (BURKE et al., 2004).

O valor de F_{Tr} (tempo equivalente à temperatura de referência) para assegurar o SAL em condições críticas é calculado em relação ao microrganismo escolhido para validar biologicamente o sistema de esterilização.

VI. 2. Objetivos

Esta parte do trabalho teve por objetivo avaliar a operacionalidade das autoclaves, através de parâmetros físicos, quanto à eficiência microbiológica dos ciclos de esterilização para Soluções Parenterais de Grande Volume e, desta forma, determinar o nível de esterilidade atingido para os processos validados.

Avaliar o potencial da GFPuv como Indicador Biológico de processos térmicos no monitoramento de ciclos de autoclavação de rotina.

VI.3. Material e Métodos

VI.3.1. Suspensão de Esporos de *Bacillus atrophaeus* e *Bacillus subtilis* W 1012

A suspensão de esporos de *B. atrophaeus* (VESSONI PENNA et al., 2002) e *B. subtilis* W 1012 (KALTWASSER; WIEGERT; SCHUMANN, 2002) foi preparada a partir de cultura liofilizada, armazenada a -18°C , reidratadas em 3 mL de solução fisiológica 0,9% peptonada 0,1% (SFP). Esta suspensão foi transferida para 5 mL de caldo de soja tripticaseína (TSB, Merck, Darmstadt, Alemanha) e incubada a 35°C por 24 horas em estufa incubadora para B.O.D. (modelo 347, FANEM, São Paulo, SP, Brasil). Após crescimento, foi realizada a ativação térmica dos esporos em banho de água (Fanem, São Paulo, SP, Brasil) a 80°C por 10 min. Após resfriamento, a suspensão foi transferida para superfície de meio de ágar *Plate Count Agar* (PCA, Merck, Darmstadt, Alemanha) em garrafa de Roux e incubada a 37°C / 6 dias. A cultura de cada garrafa foi suspensa com auxílio de pérolas de vidro e 80 mL de solução 0,02 M de acetato de cálcio (Synth, São Paulo, Brasil) ajustado ao valor de pH 9,7 com solução de 0,14% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Synth São Paulo, Brasil) saturada. A suspensão foi filtrada através de gaze adaptada a um funil e recebida em frasco de vidro contendo pérolas de vidro e barra magnética.

Para determinação da viabilidade de esporos, 5 mL da suspensão foi ativada (80°C / 10 min) e homogeneizada sob agitação a 1050 rpm/ 30 min (FISATON, modelo 706, São Paulo, SP, Brasil). Diluições decimais sucessivas em Solução Fisiológica 0,9% e semeadura em profundidade em PCA precederam a incubação a 37°C / 48 horas. As placas que apresentam de 10 a 300 colônias foram contabilizadas (contador de colônias, Mässgerat WMT - modelo BZG24, Alemanha) e a contagem de esporos expressa através do logaritmo decimal do número de unidades formadoras de colônia [Log_{10} (UFC)]. Procedeu-se a liofilização dos esporos até o momento de uso (liofilizador modelo FTS-SYSTEMS, Stone Ridge, NY, Estados Unidos).

VI.3.2. Autoclaves

VI.3.2.1. Validação das Autoclaves

As validações foram realizadas em duas autoclaves marca TREU, cilíndricas, estáticas (dimensão interna: 1,7 x 6,15 m) e horizontais, de capacidade de 17.000 L cada uma, instaladas na empresa Aster Produtos Médicos Ltda (Sorocaba, São Paulo). O aquecimento e o resfriamento de cada autoclave é realizado por chuveiro d'água, com sistema de recirculação de água (bomba de 380 m³/h e pressão de 1.8 bar) e trocador de calor (150.000 kg/h) da APV, modelo SR98B, com 32 placas e área total de troca de 24.22 m². A câmara tem capacidade para 6 carrinhos com 4 ou 5 bandejas dependendo do produto a ser validado.

A autoclave é ligada a uma caldeira (modelo Tenge 2000, Tenge Industrial S.A., São Paulo, SP) com capacidade de vapor de 4000 kg/h à pressão de 9 bar, a qual fornece o vapor e a água de aquecimento e de resfriamento. Os sensores de temperatura e pressão são calibrados com periodicidade de 3 meses (Leboc Instrumentações, São Paulo, SP), rastreado pelo INMETRO.

O ciclo operacional da autoclave compreendeu tempo de aquecimento que variou de 10 a 15 min; tempo de processo a 102 °C de 60 minutos e resfriamento de 8 a 10 minutos.

Programa de validação. Cada autoclave foi validada uma vez por ano e não revalidada, sendo as composições das soluções parenterais distintas. Foram realizados 3 estudos em anos consecutivos.

Calibração dos termopares. Nos estudos de distribuição e penetração de calor foram utilizados sensores de temperatura do tipo “T” (cobre-constantan, KAYE Instruments, cabo de extensão, bitola 22 AWG, revestimento Teflon/Teflon).

A calibração dos sensores de temperatura (KAYE) foi realizada antes e após o término do ciclo com auxílio de banho térmico a 80 °C por 20 minutos, após estabilização de todos os termopares a serem utilizados. A diferença máxima entre as leituras de cada ponto não excedeu 0.5 °C (BRASIL, 1997).

Ciclos de autoclavagem. A câmara foi dividida geometricamente em 3 partes (cada uma correspondendo a 2 carrinhos) tanto horizontal quanto verticalmente, para a disposição dos termopares (Figura 27). Cada ciclo foi realizado em triplicata.

(A) no interior da câmara

Carinho	Câmara Vazia	Carga Máxima	Carga Mínima
6	19 18 17	8-18 10	
5	16 15 14	7-17	
4	13 12 11	6 -16 5-15	
3	10 9 8	4-14	
2	7 6 5	3-13 9-19	7-17 9-19 5-15
1	4 3 2	2-12 1-11	3-13 10 2-12 4 -14 6-16

(B) na superfície das bandejas

Carga	Vazia	Máxima	Mínima
Bandejas	1,4,7,10,13,16,19	5, 15, 10 2,12,7,17	5,15, 6,16 2,12 10
	3,6,9,12,15,18	9, 19 ,6,16	8,18 4,14 9,19
	2,5,8,11,14,17	1,11,4,1 3,13,8,18	1,117,17 3,13

Figura 27. Distribuição dos sensores no interior dos autoclaves: (A) no interior da câmara (B) nas bandejas. Na carga máxima e mínima em vermelho sensores internos.

Câmara vazia. Dezenove termopares foram distribuídos geometricamente de modo a compreender toda área interna da autoclave e os sensores fixados com auxílio de arame e barbante de forma a não entrar em contato com a parede da autoclave. A variação de pressão foi monitorada com sensor interno.

Cargas mínima e máxima. Nos ciclos com carga foram utilizados 20 termopares, considerando que os termopares de 1 a 10 avaliaram a distribuição de calor e os termopares de 11 a 20 avaliaram a penetração do calor, configurando 10 pontos de análise. Os ciclos foram iniciados e a variação de temperatura e pressão monitorados. Após alcançar o patamar de 102 °C, o ciclo foi mantido por 60 minutos.

Indicador Biológico. No controle biológico do processo de esterilização, esporos de *Bacillus atrophaeus* foram inoculados nas SPGV de forma a conter 10⁶ esporos/mL de solução. Os frascos inoculados foram posicionados justapostos aos termopares dentro da câmara com a carga mínima e máxima e, após a autoclavação, removidos e alíquota da solução inoculada em meio de cultura apropriado (TSB) e incubado a 35 °C por no mínimo 72 horas para verificação de crescimento bacteriano.

Solução Parenteral. Foram avaliados ciclos de esterilização das SPGV de Ringer com Lactato (frascos de 500 mL), Glicose 5% (frascos de 1000 mL) e Glicose 10% (frascos de 1000 mL).

A capacidade de carga da autoclave variou de acordo com o produto e a configuração relacionada na Tabela 52.

Tabela 52. Configurações de carga na produção industrial

Volume do Frasco	Composição	Total de Bandejas	Total de Frascos
100	6 blocos x 5 altura	30	15.540
125	6 blocos x 5 altura	30	15.400
250	6 blocos x 5 altura	30	11.700
500	6 blocos x 5 altura	30	6.540
1000	6 blocos x 4 altura	24	3.708
5000	6 blocos x 2 altura	12	480

VI.3.2.2. Validação das Autoclaves Quiminox

A validação física da autoclave (capacidade total de 6000 L) instaladas na empresa Aster Produtos Médicos Ltda (Sorocaba, São Paulo), foi realizada com a câmara vazia, com a carga máxima (1800 frascos de 1000 mL, com volume total de 1800 Litros) e a carga mista (2000 frascos de 10mL, 1000 frascos de 20mL, 636 frascos de 125 mL, 1066 frascos de 250 mL, 1152 frascos de 500 mL e 600 frascos de 1000mL, volume total de 1562 Litros). A solução parenteral em teste foi de cloreto de sódio 0,9%.

A validação microbiológica foi realizada com a autoclave com carga máxima e com carga mista de acordo com as configurações (Figuras 28 a 30). Para validação microbiológica, suspensão de esporos de *Bacillus subtilis* W 1012 expressando a GFPuv foi submetida a tratamento térmico a temperatura de 102 °C e submetidos a contagem por semeadura em profundidade.

Figura 28. Distribuição de termopares para a validação do equipamento, considerando a câmara da autoclave vazia

A validação microbiológica foi realizada com a carga máxima (figura 29) e a carga mista (figura 30).

Figura 29. Distribuição de termopares para a validação do equipamento, considerando a carga máxima da autoclave

	N1	N2	N3	N4	
1000mL		TP08 TP14	TP13 TP03	TP11	C1
500mL	TP06 TP04	TP19		TP28	C2
250mL	TP29 TP21	TP24	TP27	TP30	C3
	20mL TP25	10mL TP22	125 mL TP20	125 mL TP18	C4
500mL	TP26 TP18	TP07	TP02 TP12 TP17	TP05	C5
1000mL		TP10	TP16	TP09	C6

Figura 30. Distribuição de termopares para a validação do equipamento, considerando a carga mista da autoclave

VI.3.3. Proteína Verde Fluorescente, GFPuv, em Autoclave de Vaso de Bier

A avaliação da potencialidade da GFPuv como indicador biológico da eficácia de tratamentos térmicos foi avaliada em Vaso de Bier (Sercon, São Paulo, SP, Brasil) a temperatura de 100 °C. Foram preparadas amostras de 5 mL de cada solução de glicose, de concentração variando entre 1,5% e 50% nas diferentes soluções-tampão, contendo GFPuv na concentração final de 8,0µg de GFPuv/mL.

As amostras foram submetidas a aquecimento em autoclave a temperatura de 100 °C, considerando aquecimento e resfriamento instantâneos. O registro da temperatura das amostras pelo tempo de exposição ao calor foi realizado por termopares. Após o tratamento, a concentração remanescente de GFPuv foi quantificada em fluorímetro e os valores F determinados.

VI.4. Análise dos resultados (VESSONI PENNA, 1997)

A destruição térmica de uma população homogênea de microrganismos é considerada logarítmica, equivalente à cinética química de uma reação de 1ª ordem. O fenômeno de destruição térmica pode ser representado pelo modelo de curva linearizada, semi-logarítmica de sobreviventes. A representação gráfica do logaritmo decimal de sobreviventes, em relação ao tempo de exposição à temperatura constante resulta em curva linearizada decrescente.

Para o modelo de curva semi-logarítmica de sobreviventes, o tempo necessário para a destruição de 90% da população de esporos é o intervalo de tempo exigido para a curva percorrer 1 (um) ciclo logarítmico. O valor D ou Tempo de Redução Decimal é o intervalo de tempo à temperatura constante de tratamento para uma redução de 90% da população microbiana homogênea, inicialmente presente no produto. Este valor D depende do tipo de microrganismo, do meio em que se encontra e da temperatura de trabalho. Sendo o valor D função da temperatura, o parâmetro valor z é definido como a elevação da temperatura necessária para reduzir em 90% o tempo do tratamento térmico ou seja quanto menor o valor z, tanto maior a variação da velocidade de destruição com a temperatura de exposição.

O nível de destruição térmica (n) é o número de ciclos logarítmicos reduzidos na população microbiana. Se o nível de destruição térmica corresponder a um ciclo reduzido ($n=1$), então o tempo total de processo (t) é equivalente ao tempo de redução decimal valor D . Logo, o tempo de processo à temperatura de referência (T_r) é um múltiplo do tempo de redução decimal: $t_{Tr} = n * D_{Tr}$.

Na determinação dos parâmetros de resistência térmica de microrganismos, o tempo de aquecimento e de resfriamento são desprezados, e a temperatura de tratamento é mantida constante. Na prática, os tratamentos a temperaturas constantes são raros devido à inércia térmica dos materiais.

Para avaliar o efeito do tratamento em termos de número de ciclos reduzidos na população microbiana, as temperaturas variáveis do produto em relação ao tempo de processo, o valor F_{Tr} ou o tempo equivalente, à temperatura de referência deve ser determinado.

Valor F_{Tr} é o intervalo de tempo de aquecimento necessário, à temperatura de referência constante, para se obter o nível de destruição pré-estabelecido. O valor F_{Tr} é o tempo equivalente, em minutos, à temperatura de referência que o produto permaneceria, considerando aquecimento e resfriamento instantâneos. O nível de destruição térmica ou letalidade do processo pode ser calculado a partir da multiplicação do número de reduções logarítmicas (n) pelo valor D específico à temperatura de referência ($F_{Tr} = n * D$).

A temperatura de referência depende do tratamento térmico empregado, assim como do indicador biológico escolhido.

Para calcular o valor F_{Tr} é necessário conhecer a variação da temperatura do produto com o tempo de processo. A equação que relaciona o valor F e a variação da temperatura do produto com o tempo de processo é dada pela relação: $F_{Tr} = (10^{(T-Tr)/z})$, onde, a taxa letal (L) é representada por: $L = 10^{(T-Tr)/z}$. O valor F_{Tr} representa a área sob a curva da relação da taxa letal com o tempo de tratamento. O método mais utilizado para estimar a área sob a curva e determinar o valor F_{Tr} é aquele proposto por PATASHNIK, denominado método trapezoidal. Sendo a taxa letal (L) adimensional, o produto da sua multiplicação com o tempo de tratamento tem unidade de tempo, e é equacionado por: $F_{Tr} = \Sigma (L_1 + L_2 + L_3 + L_4 \dots L_{(n-1)}) * \Delta t$, onde Δt é o intervalo de tempo entre duas medidas sucessivas de temperatura.

O método trapezoidal de PATASHNIK só pode ser utilizado quando o intervalo de tempo entre duas leituras sucessivas de temperatura for constante, inferior ou igual a dois minutos. Para este método o número de medidas de temperatura do tempo de tratamento deverá ser o máximo conseguido, para que o valor F seja muito próximo ao real (VESSONI PENNA; MACHOSHVILI, 1997, VESSONI PENNA et al., 1997, 2002).

VI.5. Resultados e Discussão

Os valores D para os esporos de *B. atrophaeus* e *B. subtilis* W 1012 nas soluções parenterais foram determinados para a temperatura de 102 °C (Tabela 53).

Tabela 53. Valores D_{100°C} determinados para esporos de *Bacillus* em soluções parenterais de diferentes composições.

Solução Parenteral	Valor D(min)	
	<i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372	<i>B. subtilis</i> W (GFP) ^a
Água para Injeção	2,66	1,74
Glicose 5%	2,36	
Glicose 10%	2,33	
Glicose 25%		1,58
Glicose 50%		1,91
Cloreto de Sódio 0,9%	2,65	3,81
Cloreto de Sódio 10%	---	3,90
Cloreto de Sódio 20%	---	3,73
Cloreto de Potássio 10%	---	3,51
Cloreto de Potássio 19,1%	---	3,80
Glicofisiológica	2,40	
Manitol 20%	3,11	
Ringer	3,00	
Ringer com Lactato	2,74	

^a cepa de *Bacillus subtilis* W 1012, geneticamente modificada para expressão da GFP, gentilmente cedida pelo Dr. Wolfgang Schumann, Universidade de Bayreuth, Bayreuth, Alemanha

VI.5.1. Esporos de *Bacillus atrophaeus*

Através dos parâmetros físicos dos ciclos validados, valores F foram calculados para cada configuração de carga e utilizados para determinar o nível de esterilidade das SPGV submetidas ao tratamento térmico.

As duas autoclaves TREU validadas apresentaram variação de até 20% no tempo total de processo, entre os três ciclos de autoclavação de cada carga (mínima e máxima) e variação similar para a mesma autoclave em anos consecutivos (2003 e 2004), confirmando a necessidade de monitoramento contínuo dos ciclos e manutenção preventiva do equipamento.

A Anvisa (BRASIL, 1997, 2003) preconiza a utilização de no mínimo 20 termopares, sendo 10 destes distribuídos na câmara e outros 10 termopares no interior da unidade de carga. Em todos os estudos realizados, houve perda de registro em cinco termopares, em média. No entanto, a uniformidade dos tempos de processo dos pontos monitorados não descartou as validações realizadas.

A avaliação da distribuição de calor na câmara vazia à temperatura de 102 °C, apresentou valores F médios de 67,6 ($\pm 5,41$) min, 81,85 ($\pm 7,94$) min e de 87,31 ($\pm 9,21$) min, para o 1º, 2º e 3º ciclos respectivamente, o que correspondeu a uma redução de 23 a 30 ciclos logarítmicos de esporos de *Bacillus atrophaeus*.

No ano consecutivo, a avaliação da distribuição de calor na câmara vazia da mesma autoclave apresentou valores F médios de 83,91 ($\pm 5,00$) min, 92,99 ($\pm 3,75$) min e de 103,50 ($\pm 4,49$) min, para o 1º, 2º e 3º ciclos respectivamente, o que correspondeu a uma redução de 35 a 43 ciclos logarítmicos.

Duas autoclaves idênticas, com a mesma configuração apresentaram variação de 24 %, 30% e 45% nos tempos totais de processo nos três ciclos consecutivos, respectivamente, indicando a necessidade de validação de cada equipamento individualmente.

Figura 31. Variação do valor F à temperatura de 102 °C de duas autoclaves de configuração idêntica, considerando mesma carga e produto processado.

Nos ciclos com carga mínima (solução de Ringer com Lactato, frascos de 500 mL), os valores F determinados na distribuição de calor foram 68,03 ($\pm 6,84$) min, 56,91 ($\pm 6,73$) min e 69,17 ($\pm 10,0$) min, e, na penetração de calor, foram 71,64 ($\pm 15,26$) min, 59,31 ($\pm 12,74$) min e 75,10 ($\pm 16,38$) min, no 1º, 2º e 3º ciclos, respectivamente, correspondendo a variação de valores F de 5%, 4,2% e 8,5% entre a distribuição e a penetração de calor na câmara e carga. A diferença de 5% entre os valores F de distribuição e penetração na carga mínima justifica o monitoramento constante com o uso de indicadores biológicos.

O tempo de processo foi equivalente a redução média de 25 ciclos logarítmicos de esporos de *B. atrophaeus*, o que assegura a esterilidade do produto porém indicou o dobro de tempo de exposição do produto ao agente esterilizante, em relação ao descrito pela Legislação (BRASIL, 1997).

Para a autoclave TREU 2, operacionalizada nas mesmas condições a 102°C/60 min, com carga mínima, os valores F para a distribuição de calor foram de 87,17 ($\pm 5,42$) min, 87,98 ($\pm 5,16$) min e 89,17 ($\pm 4,84$) min, e, para penetração de calor, os valores F foram de 91,88 ($\pm 4,07$) min, 98,05 ($\pm 10,60$) min e 98,29 ($\pm 8,94$) min, no 1º, 2º e 3º ciclos, respectivamente, correspondendo à variação média de

11% entre valores F de distribuição e de penetração de calor. Os ciclos foram mais longos, comparativamente àqueles processados na TREU 1, pois a temperatura no decorrer do tempo de aquecimento demorou para atingir o patamar de 102 °C (etapa de esterilização), elevando o número de ciclos logarítmicos decaídos do indicador biológico entre 28 e 31 na distribuição de calor e entre 32 e 35 na penetração de calor na carga, representando processamento até 3 vezes superior ao necessário de 12 ciclos logarítmicos reduzidos na população do Indicador Biológico.

Entre as duas autoclaves analisadas, com a carga mínima, observou-se variação entre 10% e 20% nos valores F determinados nos casos de distribuição de calor. A penetração de calor na carga se mostra fator agravante no processamento de soluções parenterais, visto ser a diferença de valores F cerca de 30% maior para a TREU 2.

Para a TREU 1, nos ciclos com carga máxima, os valores F na distribuição de calor foram 60,28 ($\pm 7,81$) min, 62,29 ($\pm 6,19$) min e 68,99 ($\pm 5,76$) min, e, na penetração de calor, foram 67,24 ($\pm 5,83$) min, 72,13 ($\pm 8,16$) min e 76,99 ($\pm 4,28$) min, no 1º, 2º e 3º ciclos, respectivamente, correspondendo a variação média de valores F de 11,2% entre a distribuição e a penetração de calor na câmara e na carga.

Na TREU 2, a mesma configuração de carga máxima apresentou aumento nos valores F em cerca de 50% no primeiro ciclo, e de 20% a 30%, nos 2º e 3º ciclos, em relação à TREU 1, indicando a necessidade de validação individual para cada equipamento e não somente a transposição de parâmetros (Tabela 54).

Tabela 54. Valores F determinados para os ciclos de esterilização das SPGV de Ringer com Lactato, com configuração de carga máxima e o número de ciclos logarítmicos reduzidos de esporos de *Bacillus atrophaeus*

(A) Autoclave TREU 1, Ringer com lactato

termopar	1º ciclo	n	2º ciclo	n	3º ciclo	n	
DISTRIBUIÇÃO DE CALOR	1	66,85	23,21	68,60	23,82	75,97	---
	2	61,35	21,30	67,63	23,48	71,04	24,67
	3	57,43	19,94	61,89	21,49	67,13	23,31
	4	78,15	---	79,57	---	81,00	---
	5	56,06	19,46	61,24	21,26	64,86	22,52
	6	57,00	19,79	59,33	20,60	67,11	23,30
	7	56,18	19,51	60,55	21,03	60,61	---
	8	48,85	---	60,03	20,84	67,58	23,47
	9	59,61	20,70	68,58	23,81	67,44	23,42
	10	61,32	21,29	65,51	22,74	67,15	23,32
média	60,28	20,65	65,29	22,12	68,99	23,43	
DP	7,81	1,27	6,19	1,34	5,76	0,63	
mínimo	52,47	19,38	59,10	20,78	63,22	22,80	
máximo	68,09	21,92	71,48	23,46	74,75	24,06	
PENETRAÇÃO DE CALOR	11	61,37	---	73,93	25,67	79,74	27,69
	12	61,42	21,33	57,76	---	71,47	---
	13	66,79	23,19	72,31	25,11	77,89	27,04
	14	65,34	22,69	71,15	24,70	77,85	27,03
	15	70,52	24,48	89,23	---	86,31	---
	16	65,12	22,61	67,86	23,56	72,54	---
	17	78,30	---	79,14	27,48	76,88	26,69
	18	60,16	20,89	67,42	23,41	72,83	25,29
	19	73,45	---	72,74	25,26	77,99	27,08
	20	69,93	24,28	69,76	24,22	76,37	26,52
média	67,24	22,78	72,13	24,93	76,99	26,76	
DP	5,83	1,36	8,16	1,30	4,28	0,75	
mínimo	61,41	21,42	63,97	23,62	72,71	26,02	
máximo	73,07	24,14	80,29	26,23	81,27	27,51	

Tabela 54. Valores F determinados para os ciclos de esterilização das SPGV de Ringer com Lactato, com configuração de carga máxima e o número de ciclos logarítmicos reduzidos de esporos de *Bacillus atrophaeus*(continuação)

(B) Autoclave TREU 2, Ringer com lactato

termopar	1º ciclo	n	2º ciclo	n	3º ciclo	n	
DISTRIBUIÇÃO DE CALOR	1	91,13	31,64	81,43	28,28	91,46	31,76
	2	91,02	31,60	81,48	28,29	95,78	---
	3	90,64	31,47	79,96	---	91,77	31,87
	4	89,23	30,98	82,05	28,49	91,42	31,74
	5	83,30	---	88,50	---	85,00	---
	6	94,28	32,74	82,98	28,81	89,56	31,10
	7	95,37	---	85,20	29,58	91,24	31,68
	8	93,50	32,46	85,10	29,55	97,68	---
	9	89,20	30,97	79,88	---	91,56	31,79
	10	94,32	32,75	84,20	29,24	92,56	32,14
média	91,20	31,83	83,08	28,89	91,80	31,72	
DP	3,53	0,73	2,70	0,57	3,38	0,31	
mínimo	87,66	31,10	80,38	28,32	88,42	31,41	
máximo	94,73	32,56	85,78	29,46	95,18	32,04	
PENETRAÇÃO DE CALOR	11	101,40	35,21	89,74	31,16	101,96	35,40
	12	81,94	---	71,95	---	90,06	---
	13	110,22	---	95,93	---	108,72	37,75
	14	101,26	35,16	90,72	31,50	100,71	34,97
	15	100,26	34,81	86,99	30,20	100,37	34,85
	16	101,13	35,12	91,17	31,66	101,98	35,41
	17	100,30	34,83	89,87	31,20	100,69	34,96
	18	116,30	---	90,67	31,48	103,34	35,88
	19	99,01	34,38	90,08	31,28	100,83	35,01
	20	99,71	34,62	88,70	30,80	100,55	34,91
média	101,15	34,87	88,58	31,16	100,92	35,46	
DP	8,75	0,31	6,27	0,47	4,56	0,92	
mínimo	92,40	34,57	82,31	30,69	96,36	34,54	
máximo	109,90	35,18	94,85	31,63	105,48	36,38	

--- não determinados devido ao termopar descalibrado ou fora da média de valores.

n = número de ciclos logarítmicos reduzidos

DP = desvio padrão

A autoclave TREU 1 no ano consecutivo (Tabela 55), foi validada com variação de carga (5% de glicose, frascos de 1000 mL), estabelecendo-se valores F de 65,39 ($\pm 2,56$) min, 72,92 ($\pm 4,38$) min e 82,54 ($\pm 6,06$) min, no 1º, 2º e 3º ciclos, na distribuição de carga e de 74,67 ($\pm 10,20$) min, 77,94 ($\pm 6,78$) min e 88,66 ($\pm 8,91$) min, no 1º, 2º e 3º ciclos, na penetração de carga, o que correspondeu a variação de até 15% no valor F entre a distribuição e a penetração de calor e diferença de até 13 minutos no tempo total de processo, em relação a carga mínima de frascos de solução de Ringer com lactato.

Tabela 55. Valores F determinados para os ciclos de esterilização das SPGV de 5% de glicose, com configuração de carga mínima e o número de ciclos logarítmicos reduzidos (n) de esporos de *Bacillus atrophaeus*, para a autoclave TREU 1

	termopar	1º ciclo	n	2º ciclo	n	3º ciclo	n
DISTRIBUIÇÃO DE CALOR	1	66,57	28,21	71,16	30,15	78,71	33,35
	2	64,31	27,25	73,46	31,13	80,14	33,96
	3	66,00	27,97	78,80	---	86,38	36,60
	4	63,78	27,03	69,40	29,41	76,42	32,38
	5	66,39	28,13	69,80	29,58	79,89	33,85
	6	59,64	---	77,80	---	86,24	36,54
	7	67,73	28,70	65,49	---	73,40	---
	8	66,56	28,20	70,31	29,79	75,11	31,83
	9	64,16	27,19	77,25	32,73	86,02	36,45
	10	68,72	---	75,74	32,09	103,13	---
	média	65,39	27,83	72,92	30,70	82,54	34,37
	DP	2,56	0,60	4,38	1,31	8,62	1,92
	mínimo	62,82	27,23	68,54	29,39	73,93	32,45
	máximo	67,95	28,44	77,30	32,01	91,16	36,29
PENETRAÇÃO DE CALOR	11	71,50	30,30	71,69	30,38	---	0,00
	12	71,61	30,34	75,28	31,90	83,58	35,42
	13	85,01	---	90,31	---	106,94	---
	14	97,68	---	77,23	32,72	95,61	40,51
	15	72,61	30,77	81,83	34,67	91,99	38,98
	16	75,18	31,86	78,94	33,45	88,90	37,67
	17	73,91	31,32	86,16		87,49	37,07
	18	72,59	30,76	78,21	33,14	86,58	36,69
	19	60,75	---	70,18	---	78,87	33,42
	20	65,83	27,89	69,56	---	77,95	---
	média	74,67	30,46	77,94	32,71	88,66	32,47
	DP	10,20	1,26	6,78	1,46	8,91	13,29
	mínimo	64,46	29,20	71,16	31,25	79,74	19,18
	máximo	84,87	31,72	84,72	34,17	97,57	45,76

n = número de ciclos logarítmicos reduzidos

DP = desvio padrão

Em termos de configuração de carga máxima, a variação dos valores F foi em média de 64,85 ($\pm 4,14$) min na distribuição de calor e de 72,12 ($\pm 4,87$) min na penetração de calor para a solução de ringer com lactato, frascos de 500 mL e de F = 68,05 ($\pm 2,5$) min na distribuição de calor e de F = 72,50 ($\pm 6,6$) min na penetração de calor para solução de 5% de glicose em frascos de 1000 mL. Para soluções parenterais de composições e volumes distintos, considerando a carga máxima, os ciclos de esterilização resultaram em valores F semelhantes.

Figura 32. Variação do Valor F e do número de ciclos logarítmicos pelo tempo de processo para a carga máxima de Ringer com lactato

A relação entre valor F acumulado e o número de ciclos logarítmicos reduzidos na população do IB no decorrer do tempo de processo, permitiu prever a esterilidade do produto, avaliar o processo, estabelecer os limites e excessos de processamento

Para SAL de 10^{-6} , considerando a carga máxima da SPGV de Ringer com lactato, o valor F a 102 °C equivale a 35 minutos para tempo total de processo de 58 min (Figura 32).

VI.5.2. Esporos de *Bacillus subtilis* W 1012

Após processo de autoclavação a temperatura de 102 °C/25 minutos, os valores F foram determinados considerando o patamar de temperatura do processo. Para a câmara vazia, os valores F variaram de 31,6 a 39,6 minutos e na carga homogênea (frascos de 1000mL de cloreto de sódio 0,9%) variaram de 17,9 a 45,6 minutos (Tabela 56).

Tabela 56. Valores F e ciclos logarítmicos decaídos (n) determinados para cada termopar para: (i) câmara vazia e (ii) carga máxima homogênea

Termopar	Câmara Vazia		Carga Máxima	
	F acumulado (minutos)	n acumulado (ciclos)	F acumulado (minutos)	n acumulado (ciclos)
1	36,2	9,5	45,6	12,0
2	37,0	9,7	19,8	5,2
3	36,7	9,7	20,5	5,4
4	38,0	10	23,3	6,1
5	36,1	9,5	16,6	4,4
6	37,7	9,9	30,1	7,9
7	39,2	10,3	26,2	6,9
8	37,3	9,8	21,5	5,6
9	35,5	9,3	25,0	6,6
10	36,5	9,6	19,0	5,0
11	36,3	9,5	22,8	6,0
12	37,1	9,7	40,5	10,6
13	34,8	9,1	22,4	5,9
14	38,4	10,1	23,8	6,2
15	38,2	10,0	26,5	6,9
16	31,6	8,3	22,4	5,9
17	39,6	10,4	23,7	6,2
18	39,5	10,4	21,3	5,6
19	36,1	9,5	22,6	5,9
20	36,6	9,6	26,1	6,8
21	38,5	10,1	22,2	5,8
22	37,9	9,9	27,1	7,1
23	37,3	9,8	21,8	5,7
24	38,0	10,0	20,0	5,3
25	37,4	9,8	25,3	6,6
26	37,1	9,7	20,7	5,4
27	37,3	9,8	17,9	4,7
28	37,1	9,7	22,6	5,9
29	37,6	9,9	22,4	5,9
30	37,5	9,9	27,0	7,1

Os Valores F correspondentes à câmara vazia e à configuração de carga máxima mostraram-se capazes de reduzir cerca de 10 ciclos logarítmicos de esporos do IB *Bacillus subtilis* W 1012, demonstrando homogeneidade de distribuição de calor da autoclave. Para configuração da carga máxima, o valor F variou entre 16,6 e 45,6 minutos, correspondendo ao intervalo de 4,4 a 12,0 ciclos logarítmicos de decaimento do IB.

A validação da autoclave com carga mista apresentou variação de F de acordo com o volume de carga e o volume dos frascos de solução parenteral (tabela 57).

Tabela 57. Carga Mista. Valores F e ciclos logarítmicos decaídos (n) determinados para cada termopar

Carrinho	Carga (Frascos)	Termopar	F acumulado (minutos)	n acumulado (ciclos)
1	1000mL	3	27,1	7,1
		8	18,6	4,9
		11	20,5	5,4
		13	23,9	6,3
		14	21,1	5,5
2	500mL	4	28,5	7,5
		6	27,9	7,3
		19	26,9	7,1
		28	26,0	6,8
3	250mL	21	33,8	8,9
		24	35,6	9,3
		27	32,1	8,4
		29	35,4	9,3
		30	35,7	9,4
4	10 – 20 mL	22	44,9	11,8
		25	42,1	11,0
4	125mL	18	44,9	11,8
		20	36,7	9,6
5	500mL	2	35,1	9,2
		5	30,4	8,0
		7	30,5	8,0
		12	31,7	8,3
		17	47	12,3
		26	28,1	7,4
6	1000mL	9	27,7	7,3
		10	22,6	5,9
		16	23,8	6,2

n = número de ciclos logarítmicos reduzidos

De acordo com a posição dos frascos de solução parenteral no interior da autoclave, considerou-se o valor F médio acumulado como parâmetro da validação microbiológica do equipamento, variando entre 22,44 e 43,45 minutos (Tabela 58).

Tabela 58. Carga Mista. Valores F e ciclos logarítmicos decaídos (n) na população de *Bacillus subtilis* W (valor D = 3,81 min), determinados para cada termopar

Carrinho	Volume (mL)	Valor F (min)	n (ciclos)
4	10 - 20	43,45	11,40
4	125	40,49	10,63
3	250	34,39	9,03
2	500	26,96	7,08
5	500	31,74	8,33
1	1000	21,92	5,75
6	1000	24,55	6,44
Carga Máxima	1000	22,44	5,89
Câmara Vazia	-----	37,09	9,74

n = número de ciclos logarítmicos reduzidos

Na carga mista, o valor F para solução de cloreto de sódio de 43,45 minutos, reduziu em até 11,40 ciclos logarítmicos de esporos de *B. subtilis* W 1012. (Tabela 58)

Nos ciclos de esterilização estudados e para os valores F calculados, a redução mínima de 12 ciclos logarítmicos do IB, sugerida pela Farmacopéia (USP 28, 2004), não foi atingida.

Para o mesmo valor F de 45,6 minutos, a redução de 17 ciclos logarítmicos da população da cepa padrão de *B. atrophaeus* (Valor D = 2,65 min) foi superior ao mínimo exigido de 12 ciclos logarítmicos do IB, mostrando que a escolha do indicador biológico calibrado e validado determina o tempo de processo de autoclavação das soluções parenterais, garantindo a esterilidade estabelecida.

A validação microbiológica considerando os parâmetros de resistência do IB proporciona confiabilidade na avaliação do nível de esterilidade da solução parenteral.

VI.5.3. Proteína Verde Fluorescente, GFPuv

Após processamento da GFP em autoclave de Vaso de Bier, os valores F do processo foram determinados (Tabela 59).

Tabela 59. Valores F (min) determinados para cada solução de glicose contendo GFPuv

Glicose (%)	Valor F (min)				
	Água	Acetato pH 5,0	Fosfato pH 6,0	Fosfato pH 7,0	Tris-EDTA pH 8,0
0	4,99	3,40	4,44	2,57	4,09
1,5	5,07	3,08	4,83	2,75	4,18
5	5,14	3,26	4,89	2,59	4,04
7	5,11	3,18	4,60	2,64	3,99
10	5,26	2,95	4,78	2,64	3,88
15	4,99	3,48	4,84	2,56	3,84
20	4,89	2,81	4,44	2,56	3,81
25	4,66	2,87	4,69	2,48	3,79
30	4,61	3,55	4,54	2,47	3,69
35	4,66	2,96	4,38	2,43	3,69
40	4,91	2,39	4,23	2,49	3,70
45	4,85	2,50	4,18	2,38	3,71
50	4,84	2,37	4,20	2,28	3,69
média	4,92	2,98	4,54	2,53	3,85
DP	0,20	0,39	0,25	0,12	0,17

DP = desvio padrão

Os valores F variaram de 2,53 min ($\pm 0,12$ min) a 4,92 ($\pm 0,20$) min. A variação do tempo de processo e para os sistemas de GFP em solução tampão, indica que a composição das soluções tampão influencia o tempo de exposição à temperatura de tratamento.

Tabela 60. Concentração ($\mu\text{g/mL}$) e Intensidade de Fluorescência da GFPuv em soluções de 1,5% a 50% de glicose em água à temperatura de 100 °C em autoclave

Glicose (%)	pH		GFPuv					
	inicial	final	Inicial		Final		24h	
			IF	($\mu\text{g/mL}$)	IF	($\mu\text{g/mL}$)	IF	($\mu\text{g/mL}$)
0	7,15	6,71	758,13	8,6	72,392	2,0	104,57	2,3
1,5	7,31	6,90	690,01	8,0	120,36	2,5	128,26	2,5
5	6,53	6,75	686,54	7,9	116,03	2,4	121,24	2,5
7	7,30	6,93	705,94	8,1	147,77	2,7	176,87	3,0
10	7,19	6,88	668,54	7,8	190,99	3,1	212,11	3,3
15	7,14	7,00	704,54	8,1	185,64	3,1	192,99	3,2
20	7,04	6,98	647,13	7,5	378,21	4,9	391,37	5,1
25	7,49	7,10	630,03	7,4	366,32	4,8	385,5	5,0
30	7,36	7,12	698,34	8,0	586,91	7,0	663,93	7,7
35	7,11	6,88	689,11	8,0	448,59	5,6	446,90	5,6
40	6,89	6,66	703,07	8,1	317,27	4,4	300,84	4,2
45	6,79	6,51	718,70	8,2	511,8	6,2	515,99	6,3
50	6,74	6,33	668,11	7,7	94,96	2,2	92,11	2,2
Média	7,08	6,83	689,86	7,95	---	---	---	---
DP	0,28	0,23	32,30	0,31	---	---	---	---

DP = desvio padrão, --- não determinado

O valores de pH das soluções de GFPuv em água submetidas ao aquecimento a 100 °C variaram de 6,53 a 7,49 ao preparo das amostras e de pH 6,51 a 7,12 após 24 horas (Tabela 60).

A intensidade de fluorescência da GFPuv ao preparo das amostras apresentou valor médio de 689,86 ($\pm 32,30$) unidades de intensidade de fluorescência ou seja com variação de 5% na intensidade de fluorescência.

Ao final do aquecimento e, 24 horas após, a concentração remanescente de GFPuv foi dependente da concentração de glicose presente na solução. O aumento da concentração de glicose proporcionou maior estabilidade à GFPuv até a concentração de 30% de glicose, com redução de 8 μg de GFPuv/mL para 7,0 μg de GFPuv/mL (Figura 33).

Figura 33. Variação da intensidade de fluorescência da GFPuv e valor de pH em soluções de glicose em água e submetidas à temperatura de 100 °C em autoclave

Após 24 horas do tratamento térmico, a concentração remanescente de GFPuv foi determinada novamente, e observou-se a mesma concentração de GFPuv logo após o tratamento térmico, não ocorrendo recuperação da concentração, quando armazenada 4 °C por 24 horas.

Tabela 61. Concentração ($\mu\text{g/mL}$) e Intensidade de Fluorescência da GFPuv em soluções de 1,5% a 50% de glicose em tampão acetato 10mM pH 5,0 à 100 °C em autoclave

Glicose (%)	pH		GFPuv					
	inicial	final	Inicial		Final		24h	
			IF	($\mu\text{g/mL}$)	IF	($\mu\text{g/mL}$)	IF	($\mu\text{g/mL}$)
0	5,17	5,18	599,17	7,1	0,89	1,3	0,43	1,3
1,5	5,11	5,15	539,68	6,5	1,28	1,3	0,92	1,3
5	5,02	5,05	514,65	6,3	1,20	1,3	0,57	1,3
7	4,94	4,99	512,13	6,2	0,98	1,3	0,47	1,3
10	5,03	5,12	464,36	5,8	0,98	1,3	0,63	1,3
15	4,91	4,97	469,32	5,8	1,47	1,3	1,05	1,3
20	4,88	4,95	548,59	5,8	1,43	1,3	1,02	1,3
25	4,89	4,97	467,86	7,3	1,27	1,3	0,74	1,3
30	5,25	5,3	504,97	5,8	1,57	1,3	1,15	1,3
35	4,89	4,9	510,71	6,1	1,32	1,3	1,34	1,3
40	4,82	4,91	377,36	6,2	1,58	1,3	1,18	1,3
45	5,24	5,25	559,76	4,9	3,85	1,3	2,81	1,3
50	5,06	5,12	486,08	6,7	2,29	1,3	1,89	1,3
Média	5,02	5,07	504,20	6,19	---	---	---	---
DP	0,14	0,13	54,84	0,63	---	---	---	---

DP = desvio padrão; --- não determinado

O pH das Soluções de glicose em acetato pH 5,0, variou de pH 4,82 a 5,25 ao preparo das amostras e entre 4,90 a 5,30 após 24 horas (tabela 61).

Figura 34. Variação da intensidade de fluorescência da GFPuv e do pH em soluções de glicose em tampão acetato pH 5,0 e submetidas à temperatura de 100 °C em autoclave

A concentração de GFPuv ao início do aquecimento apresentou valor médio de 504,2 ($\pm 54,8$) unidades de fluorescência (Figura 34). Ao final do aquecimento à temperatura de 100 °C, e 24 horas após, não houve presença de fluorescência nas amostras independente da concentração de glicose utilizada. O valor F de 4,92 ($\pm 0,20$ min) reduziu a concentração de GFPuv em solução, que não foi recuperada após 24 horas de armazenamento a 4 °C

Tabela 62. Concentração ($\mu\text{g/mL}$) e Intensidade de Fluorescência da GFPuv em soluções de 1,5% a 50% de glicose em tampão fosfato 10mM pH 6,0 à 100 °C em autoclave

Glicose (%)	pH		Intensidade de Fluorescência					
	inicial	final	Inicial		Final		24h	
			IF	($\mu\text{g/mL}$)	IF	($\mu\text{g/mL}$)	IF	($\mu\text{g/mL}$)
0	6,12	6,17	950,58	10,5	2,88	1,3	3,849	1,3
1,5	6,09	6,16	802,26	9,0	1,29	1,3	1,958	1,3
5	6,06	6,14	797,22	9,0	3,38	1,3	3,671	1,3
7	6,04	6,12	876,75	9,8	1,58	1,3	2,766	1,3
10	6,03	6,04	711,04	8,2	3,62	1,3	5,389	1,4
15	5,97	5,98	701,99	8,0	5,38	1,4	5,42	1,4
20	6,00	6,06	701,36	8,1	5,17	1,3	6,537	1,4
25	5,85	5,91	762,57	8,7	4,71	1,3	4,432	1,3
30	5,88	5,94	713,13	8,2	3,31	1,3	3,548	1,3
35	5,77	5,78	632,08	7,4	6,15	1,4	8,138	1,4
40	5,75	5,75	622,87	7,3	4,13	1,3	4,593	1,3
45	5,86	5,82	733,30	8,4	7,49	1,4	7,682	1,4
50	5,67	5,67	596,43	7,1	2,80	1,3	2,759	1,3
Média	5,94	5,96	---	8,44	---	---	---	---
DP	0,15	0,17	---	0,97	---	---	---	---

DP = desvio padrão

Soluções de glicose em tampão fosfato pH 6,0 tiveram variação no valor de pH entre 5,67 e 6,12 (tabela 62).

Figura 35. Variação da intensidade de fluorescência da GFPuv e valor de pH em soluções de glicose em tampão fosfato pH 6,0 e submetidas à 100 °C em autoclave

A intensidade de fluorescência inicial da GFPuv decaiu com o aumento de glicose em solução e associado ao valor de pH (Tabela 62 e Figura 35). Similar ao comportamento da GFPuv em tampão acetato pH 5,0, não houve recuperação da concentração de GFPuv após o aquecimento a 100 °C (valor $F = 4,54 (\pm 0,25)$ min) e após 24 horas do tratamento.

Tabela 63. Concentração ($\mu\text{g/mL}$) e Intensidade de Fluorescência da GFPuv em soluções de 1,5% a 50% de glicose tampão fosfato 10mM pH 7,0 à 100 °C em autoclave

Glicose (%)	pH		Intensidade de Fluorescência					
	inicial	final	Inicial		Final		24h	
			IF	($\mu\text{g/mL}$)	IF	($\mu\text{g/mL}$)	IF	($\mu\text{g/mL}$)
0	7,19	7,21	554,63	6,7	473,12	5,9	572,95	6,8
1,5	7,03	7,06	652,71	7,6	541,48	6,5	583,41	6,9
5	7,00	7,02	574,02	6,8	529,18	6,4	581,15	6,9
7	6,97	7,02	658,51	7,7	626,27	7,3	591,86	7,1
10	6,96	6,98	614,93	7,2	640,53	7,5	567,44	6,8
15	6,89	6,89	624,09	7,3	585,23	6,9	600,60	7,1
20	6,85	6,83	588,40	7,0	567,62	6,8	653,39	7,6
25	6,73	6,76	602,45	7,1	602,13	7,1	491,05	6,0
30	6,74	6,75	567,48	6,8	486,47	6,0	467,57	5,8
35	6,68	6,67	584,99	6,9	594,92	7,0	555,05	6,7
40	6,63	6,63	571,11	6,8	609,00	7,2	547,74	6,6
45	6,61	6,61	581,23	6,9	622,95	7,3	513,35	6,3
50	6,62	6,58	623,79	7,3	643,95	7,5	664,18	7,7
Média	6,84	6,85	599,87	7,08	578,68	6,88	568,44	6,79
DP	0,19	0,20	32,80	0,32	56,04	0,53	56,41	0,55

DP = desvio padrão

O valor de pH das soluções de glicose em tampão fosfato pH 7,0 variou de 6,62 e 7,19 ao preparo das amostras e entre 6,63 a 7,21 após 24 horas do preparo (tabela 63).

A intensidade de fluorescência média para as amostras submetidas a aquecimento a temperatura de 100 °C foi de 559,87 ($\pm 32,8$) unidades de fluorescência, não havendo influência da concentração de glicose presente no meio.

Figura 36. Variação da intensidade de fluorescência da GFPuv e pH em soluções de glicose em solução tampão fosfato pH 7,0 e submetidas à 100 °C em autoclave

Ao contrário do comportamento da GFPuv em tampão acetato pH 5,0 e fosfato pH 6,0, a intensidade de fluorescência remanescente de GFPuv após o aquecimento foi a mesma determinada logo após o preparo da amostra e após 24 horas do aquecimento. Em tampão fosfato pH 7,0, a estrutura da GFPuv se manteve quando submetida ao aquecimento à temperatura de 100 °C (valor $F = 2,53 (\pm 0,12)$ min), independente da concentração de glicose empregada e do valor de pH da solução (Tabela 63 e Figura 36)

Tabela 64. Concentração ($\mu\text{g/mL}$) e Intensidade de Fluorescência da GFPuv em soluções de 1,5% a 50% de glicose em tampão tris-EDTA 10mM pH 8,0 à 100 °C em autoclave

Glicose (%)	pH		Intensidade de Fluorescência					
	inicial	final	Inicial		Final		24h	
			IF	($\mu\text{g/mL}$)	IF	($\mu\text{g/mL}$)	IF	($\mu\text{g/mL}$)
0	8,03	8,04	773,15	8,8	172,18	3,0	236,12	3,6
1,5	8,04	8,04	748,32	8,5	7,04	1,4	13,78	1,4
5	7,72	7,77	759,04	8,6	24,08	1,5	29,83	1,6
7	7,74	7,77	812,82	9,1	65,57	1,9	74,19	2,0
10	7,66	7,73	764,04	8,7	49,57	1,8	57,83	1,9
15	8,14	8,17	729,19	8,3	29,78	1,6	38,56	1,7
20	7,64	7,66	741,21	8,5	96,00	2,2	104,36	2,3
25	8,06	8,06	767,48	8,7	52,19	1,8	76,59	2,0
30	7,54	7,52	918,78	10,2	74,44	2,0	74,58	2,0
35	7,63	7,62	723,16	8,3	67,82	2,0	69,27	2,0
40	7,71	7,70	765,75	8,7	96,19	2,2	103,71	2,3
45	7,86	7,81	790,8	8,9	126,22	2,5	136,55	2,6
50	7,78	7,70	740,82	8,4	118,07	2,4	120,12	2,5
Média	7,81	7,81	771,89	8,7	---	---	---	---
DP	0,19	0,20	50,46	0,5	---	---	---	---

DP = desvio padrão

O valor de pH das soluções de glicose em tris-EDTA pH 8,0 adicionadas de GFPuv, variou de 7,52 a 8,17 após 24 horas do preparo (tabela 64). A intensidade de fluorescência média para as amostras de GFPuv foi de 771,89 ($\pm 50,46$) unidades de fluorescência.

Figura 37. Variação da intensidade de fluorescência da GFPuv e valor de pH em soluções de glicose preparadas em solução tampão Tris-EDTA pH 8,0 e submetidas à temperatura de 100°C em autoclave

A intensidade de fluorescência inicial da GFPuv não foi influenciada pela concentração de glicose presente em solução (Figura 37). Após o aquecimento, não ocorreu recuperação da intensidade de fluorescência após 24 horas, como observado em tampão fosfato pH 7,0, exceto em solução padrão, sem adição de glicose.

A GFPuv mostrou-se estável quando submetida a aquecimento a temperatura de 100°C, acondicionada em soluções de glicose preparadas em tampão fosfato pH 7,0, não apresentando o mesmo comportamento em sistemas de água.

VI. 6. Conclusões Parciais

A GFPuv mostrou-se estável quando submetida a aquecimento a temperatura de 100°C, acondicionada em soluções de glicose preparadas em tampão fosfato pH 7,0, não ocorrendo decaimento após tratamento em autoclave.

Esporos de *B. subtilis* W expressando a GFP exibiram resistência aos processos térmicos em autoclave, indicando seu potencial para serem utilizados como Indicadores Biológicos. A intensidade de fluorescência emitida se manteve após tratamento térmico.

A validação das autoclaves se faz necessária para garantir ao consumidor final, um produto seguro para uso. O controle de rotina deve ser estabelecido com indicadores biológicos que atestem os parâmetros do processo.

A avaliação da GFPuv como potencial indicador biológico em processos de autoclavação, tanto na forma de solução de proteína quanto expressa por esporos de *Bacillus subtilis*, mostrou ser viável, para aplicação.

5. CONCLUSÕES

A estabilidade da GFPuv, em solução tamponada às temperaturas de 25 °C, 80 °C, 85 °C, 90°C e 95 °C foi influenciada pelo valor de pH das soluções e pela presença de glicose, cloreto de sódio e a combinação de ambos (solução glicofisiológica).

A 25 °C, a estabilidade da GFPuv foi maior em soluções de glicose preparadas em tampão fosfato pH 6,0. Sistemas de glicose em tampão fosfato pH 7,0 proporcionaram à GFPuv estabilidade de duas a quatro vezes superior em comparação aos sistemas em água. A variação dos valores D entre 69,40 min e 9,26 min para solução de 1,5% e 50% de glicose em água, respectivamente, em relação aos valores $D_{1,5\%} = 69,40$ min e $D_{50\%} = 41,67$ min nos sistemas de fosfato pH 7,0.

Em soluções entre 1,5% e 50% de glicose, para temperaturas de tratamento $\geq 80^\circ\text{C}$, GFPuv apresentou maior estabilidade em sistemas de fosfato pH 7,0. Às temperaturas de 90 °C e 95 °C, a estabilidade térmica da GFPuv foi independente da concentração de solutos empregada, sendo influenciada pelas temperaturas de tratamento.

A GFPuv apresentou menor estabilidade quando inserida em tampão acetato pH 5,0, em todas as temperaturas de tratamento e composições de soluções avaliadas. A presença de íons H^+ no meio interage com os aminoácidos presentes na superfície da molécula, alterando sua conformação e, conseqüentemente, reduzindo a intensidade de fluorescência emitida. A proximidade do valor de pH da solução ao seu ponto isoelétrico, pI 5,1, no qual a proteína tende a agregar-se, diminui sua estabilidade à 25 °C, e no intervalo de temperatura entre 80 °C e 100 °C

A GFPuv liofilizada confirmou sua potencialidade como indicador biológico da penetração do gás óxido de etileno e sua distribuição na câmara, durante o processamento de artigos médico-hospitalares termolábeis. A concentração remanescente da GFPuv após processamento indicou diferenças de atuação do gás no interior da câmara e sobre o material, reforçando a necessidade de controle de rotina com o uso de Indicadores Biológicos.

A GFPuv mostrou-se estável quando à temperatura de 100°C, acondicionada em soluções de glicose preparadas em tampão fosfato pH 7,0, não ocorrendo decaimento após tratamento em autoclave.

Esporos de *B. subtilis* W expressando a GFPuv exibiram resistência aos processos térmicos em autoclave, indicando seu potencial para serem utilizados como indicadores biológicos.

A GFPuv mostrou potencialidade para uso como indicador biológico em processos de autoclavação de formulações aquosas e no monitoramento da distribuição de gás em processos de esterilização por EtO.

A avaliação da potencialidade da GFPuv para ser utilizada como indicador biológico, resultou em depósito de Patente sob o título “*Kit ou Dispositivo Empregado na Validação de Processos de Esterilização e Processo de Validação de Processos de Esterilização*”, nº P.I. 0.600.522-5 de 13.02.2006.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRASP, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE SOLUÇÕES PARENTERAIS, disponível em: <<http://www.abrasp.org.br/abrasp.htm>>, Acesso em 05 jan. 2006.
- ALBERT, H., DAVIES, D.J., WOODSON, L.P., SOPER, C.J., Biological indicators for steam sterilization: characterization of a rapid biological indicator utilizing *Bacillus stearothermophilus* spore-associated alpha-glucosidase enzyme. *J Appl Microbiol.*, 85, p. 865–874, 1998.
- ALFA, M. J., DEGAGNE, P., OLSON, N., PUCHALSKI, T., Comparison of ion plasma, vaporized hydrogen peroxide, and 100% ethylene oxide sterilizers to the 12/88 ethylene oxide gas sterilizer. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v. 17, n.2, p. 92-100, 1996.
- AMSTERDAM, A., LIN, S., HOPKINS, N. The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Devel. Biol.* v.171, p.123-129, 1995.
- ARAKAWA, T.,TIMASHEFF,S. N., Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry*, v.21, p. 6536 – 6544, 1982.
- ASHBY, M. C.; IBARAKI, K.; HENLEY, J. M., It's green outside: tracking cell surface proteins with pH-sensitive GFP. *Trends Neurosci.*, v. 27, n. 5, p. 257-261, 2004
- AVIS, K.; LEVCHUCK, J. W., 2000. Parenteral Preparations in: Remington: the science and practice of pharmacy /Alfonso R. Gennaro, chairman of the editorial board and editor. 20th ed. Baltimore, Md.; Lippincott Williams & Wilkins. p. 780- 806.

- BACK, J. F., OAKENFULL, D., SMITH, M. B., Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry*, v. 18, p. 5191-5196, 1979.
- BAIER, S., MCCLEMENTS, D. J., Impact of preferential interactions on thermal stability and gelation of bovine serum albumin in aqueous sucrose solution. *J. Agric. Food Chem.*, 49, p. 2600-2608, 2001.
- BARNES, R. S. K., **An introduction to marine ecology**. 2nd. Ed. Oxford. Blackwell Scientific Plub., 351p., 1991
- BASAK, S., RAMASWAMY, H.S., Ultra high pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase. *Food Res. Intern.*, v. 29, p. 601-607, 1996.
- BASS, S., YANG, M., in: CREIGTON, J. E., Protein Function - A practical approach, 2^a. Edição. Oxford University Press, Nova York, 1997. p. 29-55.
- BERGER, T. J., NELSON, P., The effect of formulation of parenteral solutions on microbial growth – measurement of D and z values. *J. Parenter. Sci. Technol.*, v. 41, p. 32-41, 1994.
- BOLEN, D. W., Effects of naturally occurring osmolytes: on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization. *Methods*, v. 34, p. 312-322. 2004.
- BOSTÖM, M., TAVARES, F.W., FINET, S., SKOURI-PANET, F., TARDIEU, A., NINHAM, B.W., Why forces between proteins follow different Hofmeister series for pH above and below pI. *Biophys. Chem.*, v. 117, 217-224.
- BOKMAN, S. H., WARD, W. W., Renaturation of *Aequorea* Green Fluorescent Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 111, v. 4, p. 1372 – 1380, 1981.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Regulamento técnico de soluções parenterais de grande volume – SPGV e seus anexos. Portaria n.500, de 9 de out. 1997. Diário Oficial da União, Brasília, n. 227, 13 de out. 1997.

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Regulamento Técnico – Procedimentos de instalação e uso do gás óxido de etileno e suas misturas em unidades de esterilização. Portaria Interministerial n. 482, MS, de 16 de abril de 1999. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de abril de 1999.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos. Resolução RDC nº 210, MS, de 04 de agosto de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, 04 de agosto de 2003.
- BURKE, S. A., WRIGHT, J. D., ROBINSON, M. K., BRONK, B. V., WARREN, R. L., Detection of molecular diversity in *Bacillus atrophaeus* by amplified fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, n. 5, p. 2786-2790, 2004.
- CHALFIE, M., KAIN, S., **Green Fluorescent Protein, Properties, Applications and Protocols, Ed.** Wiley-liss, NY, 1998.
- CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W. W., PRASHER, D. C., Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, v. 263, p. 802-805, 1994.
- CHIRIFE, J. Specific solute effects with special reference to *Staphylococcus aureus*, *J. Food Eng.*, v. 22, p. 409- 419, 1994.
- CHUTINTRASRIA, B., NOOMHORM, A., Thermal inactivation of polyphenoloxidase in pineapple puree. *Lebensm. Wiss. Technol.*, v. 39, p. 492–495, 2006.
- CODY, C. W., PRASHER, D. C., WESTHER, W. M., PREDERGAST, F. G., WARD, W. W., Chemical structure of the hexapeptide chromophore of *Aequorea* reen-fluorescent protein. *Biochemistry*, v. 32, p.1212-1218, 1993.
- COLLINS, K.D., Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods*, v. 34, p. 300-331, 2004

- GÖKMEN, V., BAHÇECİ, K.S., SERPEN, A., ACAR, J., Study of lipoxygenase and peroxidase as blanching indicator enzymes in peas: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage, *Lebensm. Wiss. Technol.*, v. 38, p. 903-908, 2005.
- COLLET, L. S. F. C. A., SHIGEOKA, D. S., BADOLATO, G. G., TADINI, C. C., A kinetic study on pectinesterase inactivation during continuous pasteurization of orange juice, *J. Food Eng.*, v. 69, p. 125-129, 2005.
- CRAMERI, A., WHITEHORN, E. A., TATE, E., STEMMER, W. P. C. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling, *Nature Biotechnol.*, 14, p. 315-319, 1996.
- ERRAMPALI, D., LEUNG, K., CASSIDY, M. B., KOSTRZYNSKA, M., BLEARS, M., LEE, H., TREVORS, J. T., Applications of the Green Fluorescent Protein as a molecular marker in environmental microorganisms. *J. Microbiol. Methods*, v. 35, p. 187-189, 1999.
- FÁGÁIN, C. Ó. Understanding and increasing protein stability. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1252, p. 1-14, 1995.
- FLACH, J., BOSSIE, M., VOGEL, J., CORBETT, A., JINKS, T., WILLINS, D. A., SILVER, P. A., A yeast RNA-binding protein shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Mol. Cell. Biol.*, v. 14, p. 8399-8407, 1994.
- GARRET, D., McDONALD, C., Clinical sepsis and death in a newborn nursery associated with contaminated parenteral medications, **CDC-National Centers for Infectious Diseases**, v.47, n.29, p.610-612, 1998.
- GAVA, A. J., **Princípios de Tecnologia de Alimentos**, 6^a.ed. São Paulo: Nobel, 1984. p. 155 – 156.
- HEIM, R., CUBITT, A. B., TSIEN, R. Y., Improved green fluorescence. *Nature*, v. 373, p. 663-664, 1995.

- HEINLEIN, M., EPEL, B. L., PADGETT, H. S., BEACHY, R. N., Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science*, v. 270 p. 1983-1985, 1995.
- HUCKER, G., MACHMERTH, R., KRAMER, A., Validation of sterilization processes with ethylene oxide, according to DIN 550. in Healthcare Establishments, *Zentral Sterilization*, v. 9, n. 5, p. 335-345, 2001.
- HUGBO, P. G., MENDIE, U. E., NASIPURI, R. N., Kinetics of growth characteristics of micro-organisms in dextrose infusion solutions. *Int. J. Pharm.*, v. 167, p. 1 - 6, 1998.
- INOUE, S., TSUJI, F. I., *Aequorea* green fluorescent protein: expression of the gene and fluorescent characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.*, 341, p. 277-280, 1994.
- INOUE, K., KUZUYA, K., TONOMURA, B., Sodium chloride enhances markedly the thermal stability of thermolysin as well as its catalytic activity. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1388, p. 209-214.
- ISHII, M., **“Determinação dos parâmetros cinéticos de resistência térmica da Proteína Verde Fluorescente recombinante (GFPuv)”** [Dissertação de Mestrado, Departamento de Tecnologia Bioquímica Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo], 2003., 82 p.
- ISO 11134 – International Organization for Standardization - Sterilization of Health Care Products – Requirements for Validation and Routine Control – Industrial Moist Heat Sterilization. 1994.
- ISO 11135 – International Organization for Standardization - Medical devices – Validation and routine control of ethylene oxide sterilization, 1994, 24p.
- ISO 11138 – Parte 1 - International Organization for Standardization - Sterilization of Health Care Products – Biological Indicators, General Requirements, 2006, 48 p..

- ISO 11138 – Parte 2 - International Organization for Standardization - Sterilization of Health Care Products – Biological Indicators, Biological indicators for ethylene oxide sterilization processes, 2006, 12 p..
- ISO 11138 – Parte 3 - International Organization for Standardization - Sterilization of Health Care Products – Biological Indicators, Biological indicators for moist heat sterilization processes, 2006, 16 p..
- KAETHER, C., GERDES, H. H., Visualization of protein transport along the secretory pathway using green fluorescent protein. *FEBS Lett.*, v. 369, p. 267-271, 1995.
- KAHANA, J. A., SCHNAPP, B. J. and SILVER, P. A., Kinetics of spindle pole body separation in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 92, n. 21, p. 9707-9711, 1995.
- KALTWASSER, M., WIEGERT, T., SCHUMANN, W. Construction and application of epitope- and green fluorescent protein- tagging integration vectors for *Bacillus subtilis*. *Appl. Env. Microbiol.*, v. 68, n. 5, p. 2624 -2628, 2002.
- KAUSHIK, J. K., BHAT, R., A mechanistic analysis of the increase in the thermalstability of proteins in aqueous carboxylic acid salt solutions, *Protein Sci.*, 8, p. 222-233, 1999.
- KETS, E. P. W., DE BONT, J. A. M., HEIPIEPER, H. J., Physiological response of *Pseudomonas putida* S12 subjected to reduced water activity *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 139, p. 133-137, 1996.
- KREBS, M.C., BECASSE, P., VERJAT, D., DARBORD, J.C., Gas-plasma sterilization: relative efficacy of the hydrogen peroxide phase compared with that on the plasma phase, *Int. J. Pharm.*, v. 160, p.75-81, 1998.
- KULMYRZAEV, A., BRYANT, C., McCLEMENTS, D. J., Influence of sucrose on the thermal denaturation, gelation and emulsion stabilization of whey proteins. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, p. 1593 –1597, 2000.

- LEE, J. C., TIMASHEFF, S. N., The stabilization of proteins by sucrose. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 256, n. 14, p. 7193-7201, 1981.
- LEWIS, P. J., ERRINGTON, J., Use of green fluorescent protein for detection of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, v. 142, p.733-740, 1996.
- MACKEY, B.M., KELLY, A.F., COLVIN, J.A. ROBBINS, P.T., FRYER P.J., Predicting the thermal inactivation of bacteria in a solid matrix: Simulation studies on the relative effects of microbial thermal resistance parameters and process conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 107, p. 295-303. 2006.
- MAKKI, F., DURANCE, T.D., Thermal inactivation of lysozyme as influenced by pH, sucrose and sodium chloride and inactivation and preservative effect in beer, *Food Res. Intern.*, v. 29, p. 635-645, 1996.
- McCLEMENTS, D. J., Estimation of steric exclusion and differential interaction contributions to protein transfer free energies in aqueous cosolvent solutions. *Food Hydrocolloids*, 15, p. 355-363, 2001.
- MCCORMICK, P., FINOCCHARIO, C., MANCHESTER, R., GLASGOW, L., CONSTANZO, S., Qualification of a rapid readout biological indicator with moist heat sterilization. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, v. 57, 25-31, 2003.
- MIDDAUGH C. R. AND VOLKIN, D. B., "Protein Solubility" in *Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A. Chemical and Chemical Pathways of Protein Degradation*, vol. 2, Ahern, T. J. and Manning, M. C., ed., Plenum Press, New York, pp. 109-111, 1992.
- MOREIRA, J.C.M., Sociedade brasileira de nefrologia e o episódio de Caruaru, *Medicina on line*, v.1, n.3, 1998. disponível em: <http://www.medonline.com.br/medonline3/moreira.htm>, acesso em 18 jun. 2000.

- MORITA, T. E ASSUMPÇÃO, R. M. V., **Manual de Soluções Reagentes e Solventes – Padronização – Preparação – Purificação**, 11 ed., 2001. São Paulo, Editora Edgard Blucher Ltda., p. 67-68.
- NOGAROTO, S. L.; VESSONI PENNA, T. C. Desinfecção e Esterilização. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p. 1-36, 338 p.
- NOZAWA, H., MAMEGOSHI, S., SEKI, N. Effect of neutral salts on activity and stability of transglutaminase from scallop adductor muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, v. 124, p. 181–186, 1999.
- OESP, O ESTADO DE SÃO PAULO, Editorial do Caderno Geral de 04 mar. 2001, disponível em: <<http://www.estadao.com.br/editorias/2001/03/04/ger881.html>>, Acesso em 08 mar. 2001.
- PALM J. G., WLODAWER, A., Spectral variants of Green Fluorescent Protein. In: **Methods in Enzimology**, Abelson, J. N., Simon, M. I. eds. Academic Press: New York, v. 302, p.379-395.
- PERSSON, M., COSTES, D., WEHTJE, E., ADLERCREUTZ, P., Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 30, p. 916-923, 2002.
- PFLUG, I.J., ODLAUG, T.E., Biological indicators in the pharmaceutical and the medical device industry. *J. Parenter. Sci. Technol.*, v.40, n.5, p. 242-248, 1986.
- PHILLIPS, G.B., **Sterilization**. Remington's Pharmaceutical Sciences. 15.ed. Pennsylvania: Mack, 1975. p.1389-1404.
- RESOLUÇÃO - RDC 210, Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos, de 04/08/2003, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil.
- ROBART, F. D., WARD, W. W., Solvent perturbations of *Aequorea* green fluorescent protein. *Photochem. Photobiol.*, v. 51, 92s., 1990.

- SAMBROOK, J. FRITSCH, E. F., MANIATIS, T., **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, NY, 1989, v., pg. 1.74.
- SEMENOVA, M. G. ANTIPOVA, A. S., BELYAKOVA, L. E., Food protein interactions in sugar solutions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* , v. 7, p. 438-444, 2002.
- SHIGA, Y., TANAKA, M. M., HAYASHI, S., A nuclear GFP/beta-galactosidase fusion protein as a marker for morphogenesis in living *Drosophila*. *Develop. Growth Differ.*, v. 38, p. 99-106, 1996.
- SCHNEIDER, P. M., REICH, R. R., KIRCHOF, S. S., FOLTZ, W. G. Performance of various steam sterilization indicators under optimum and sub-optimum exposure conditions, *AJIC*, vol. 33, n. 5 Supplement 2.
- SHULGIN, I. L., RUCKENSTEIN, E., Relationship between preferential interaction of a protein in an aqueous mixed solvent and its solubility. *Biophys. Chem.*, v. 118, p. 128-134, 2005.
- SPICHER, G., PETERS, J., NÜRNBERG, M., SCHWEBKE, I. Microbicidal efficacy of superheated steam. II. Studies involving *E. faecium* and spores of *B. xerothermodurans* and *B. coagulans*. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 204, p. 309-316, 2002.
- STEARNS, T., The green revolution. *Curr. Biol.*, 5, p. 262-264, 1995.
- SULLIVAN, K. F., HAHN, K., SHELBY, R. D., Bioluminescent labeling of human centromere DNA sequences *in vivo*. Poster presentation at Fluorescent Proteins and Applications Meeting, Palo Alto, CA. (CENP-B in human cells), 1995.
- TIMASHEFF, S. N., “Stabilization of Protein Structure by Solvents additives”, in ***Stability of Protein Pharmaceuticals,. Part B. In Vivo Pathways of degradation and Strategies for Protein Stabilization***, vol. 3, Ahern, T. J. and Manning, M. C., , ed., Plenum Press, New York, pp. 265-285, 1992.

- TURCO, S. J., 2000. "Intravenous Admixtures" in: **Remington: the science and practice of pharmacy** /Alfonso R. Gennaro, chairman of the editorial board and editor. 20th ed. Baltimore, Md. ; Lippincott Williams & Wilkins. p. 808-809.
- UNITED States Pharmacopeia. 24.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.945-946.
- UNITED States Pharmacopeia. 28.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2004. 2537 -2540.
- UNITED States Pharmacopeia. 29.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006. 3539 p. Disponível em <http://www.usp.org>. Acesso em 10 de Agosto de 2006
- VESSONI PENNA, T. C., MACHOSHVILI, I. A., Esterilização térmica: conceitos básicos da cinética de morte microbiana. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.33, supl.1, p.1-5, 1997.
- VESSONI PENNA T. C., ISHII M., Selective permeation and organic extraction of recombinant Green Fluorescent Protein (GFPuv) from *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*, <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/2/7/qc>, 2, 7, 2002.
- VESSONI PENNA, T. C, MAZZOLA P. G., MARTINS, A. M. S., The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. *BMC Infectious Diseases*. 2001, 1:16. [http:// www.biomedcentral.com/1471-2334/1/16](http://www.biomedcentral.com/1471-2334/1/16).
- VESSONI PENNA, T.C., MARQUES, M., MACHOSHVILI, I.A, ISHII, M., The effect of composition of parenteral solution on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis* spores. *App. Biochem. Biotechnol.*, v. 98-100, p. 539-551, 2002.
- VESSONI PENNA, T. C, MAZZOLA P. G., MARTINS, A. M. S., Identification of bacteria in drinking water and purified water during the monitoring of a typical water purification system. *BMC Infectious Diseases*, 2002, 2:13.Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1678004946959396>.

- VESSONI PENNA, T. C., ISHII, M., CHOLEWA, O., DE SOUZA, L. C., Thermal characteristics of recombinant Green Fluorescent Protein (GFPuv) extracted from *Escherichia coli*, *Lett. Appl. Microbiol.*, v.38, p. 135-139, 2004.
- VESSONI PENNA, T. C., TAQUEDA, M. E. S., MACHOSHVILI, I. A., ISHII, M., The effect of media composition on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. *PDA – J. Pharm. Sc. Technol.*, v. 54 (5), p. 398-412, 2000.
- VESSONI PENNA, T. C., CHIARINI E., MACHOSHVILI, I. A. ISHII M., PESSOA JR, A., “ Intracellular release of recombinant Green Fluorescent protein (GFPuv) from *Escherichia coli*”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 98-100, p. 791-802, 2002.
- VOJDANI, F. (1996), “Solubility” in *Methods of testing protein functionality*, Hall, G. M., ed., Blackie Academic & Professional, New York, pp. 11-59
- WANG, S., HAZELRIGG, T., Implications for bcd mRNA localization from spacial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature*, 369, p. 400-403, 1994
- WARD W. W., CODY, C. W., HART, R. C., CORMIER, M. J., Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in *Renilla* and *Aequorea* green-fluorescent proteins. *Photochem. Photobiol.*, v.31, p. 611-615, 1980.
- WEBB, C. D., DECATUR, A., TELEMAN, A., LOSICK, R., Using of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcelular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, v. 177, p. 5906-5911, 1995.
- WIJNKER, J. J., KOOPB, G., LIPMAN, L. J. A. Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings, *Food Microbiol.*, 23, p. 657-662, 2006.
- YANG, F., MOSS, L. G., PHILIPS, G. N., The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.*, v. 14, p. 1246 – 1251, 1996.

ZIMMER, M., Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem. Rev.*, v. 102, p.759-781, 2002.

Anexo 01 - Soluções Tampão (MORITA; ASSUMPÇÃO, 2001).

Soluções Tampão (MORITA; ASSUMPÇÃO, 2001).

Para avaliar a estabilidade da GFP em diferentes valores de pH, soluções-tampão de diferentes valores de pH foram preparadas:

1. Solução-tampão acetato de sódio/ácido acético 10 mM, pH 5,0

Solução de Ácido Acético. Diluiu-se 0,58mL de ácido acético glacial (Synth[®]) em 900mL de água MILLI-Q, completando o volume para 1000 mL. Esta solução apresentou pH em torno de 3,4.

Solução de Acetato de Sódio. 10mM: Dissolveu-se 1,3608g de acetato de sódio trihidratado (Synth[®], Brasil) em 900mL de água MILLI-Q, completando o volume para 1000 mL. Esta solução apresentou pH em torno de 7,4.

Adicionou-se a solução de ácido acético sobre a solução de acetato de sódio, homogeneizando e medindo o pH, com auxílio de pHmetro (Accumet AR20, pH/mV/conductivity meter, Fisher Scientific, Estados Unidos), até atingir o valor de pH 5,0.

2. Solução tampão de fosfato de potássio monobásico/ fosfato de potássio dibásico 10 mM (pH 6,0 e pH 7,0)

Solução de Fosfato de Potássio Monobásico 10mM. Dissolveu-se 1,3609g de fosfato de potássio monobásico (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) em 900mL de água MILLI-Q, completando o volume para 1000 mL. Esta solução apresentou pH 4,5.

Solução de Fosfato de Potássio Dibásico 10mM Dissolveu-se 1,7418 g de fosfato de potássio dibásico (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) em 900mL de água MILLI-Q, completando o volume para 1000 mL. Esta solução apresentou pH 8,7.

Adicionou-se a solução de fosfato de potássio monobásico sobre a solução de fosfato de potássio dibásico, homogeneizando e medindo o pH, com auxílio de pHmetro (Accumet AR20, pH/mV/conductivity meter, Fisher Scientific, Estados Unidos), até o valor de pH 6,0 e 7,0.

3. Solução de Tris-EDTA 10mM (pH 8,0)

Solução de Tris 10mM: Dissolveu-se 1,211g de tris (Serva[®], São Paulo, Brasil) em 900 de água MILLI-Q, completando o volume para 1000 mL. Esta solução apresentou pH em torno de 10,14.

Solução de EDTA 10mM: Dissolveu-se 3,72g de EDTA (Serva[®], São Paulo, Brasil) em 900 de água MILLI-Q, completando o volume para 1000 mL. Adicionou-se a solução de hidróxido de sódio sobre a solução de tris, homogeneizando e medindo o pH, com auxílio de pHmetro, até o ajuste de pH 8,0.

As soluções-tampão foram preparadas e acondicionadas à temperatura de 4 °C até a estabilização dos sistemas por período de 24 horas.

Anexo 02 - Determinação das Propriedades Físicas das Soluções de Glicose

Determinação das Propriedades Físicas das Soluções de Glicose

1. pH

O valor de pH das soluções parenterais preparadas em laboratório foi determinado através de pHmetro digital (Accumet AR20, pH/mV/conduvímeter, Fisher Scientific, NJ, Estados Unidos), a temperatura de 25 °C, logo após o preparo e 24 horas depois (a solução foi armazenada a 4 °C durante o intervalo das medições). Na calibração do pHmetro foram utilizadas soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 (Merck®, Darmstadt, Alemanha).

2. Condutividade

A condutividade das soluções parenterais preparadas em laboratório foi determinada através de condutivímeter digital (Accumet AR20, pH/mV/conduvímeter, meter, Fisher Scientific, NJ, Estados Unidos), a temperatura de 25°C, após 24 horas de preparo da solução (soluções foram armazenadas a 4°C). O condutivímeter foi calibrado com solução de cloreto de potássio com cloreto de prata de condutividade 146,9µS a 25°C.

3. Osmolaridade

A osmolaridade das soluções parenterais preparadas em laboratório foi determinada através de osmômetro (Osmomat 030, Gonotec, Berlim, Alemanha), a 25 °C, 24 horas após o preparo da solução.

A determinação da osmolaridade total das soluções foi realizada por medida comparativa do ponto de congelamento da água pura e da solução a ser analisada. Solução de cloreto de sódio de 300 mOsmol/kg H₂O (9,463g NaCl/kg H₂O), foi utilizada para calibração do equipamento. O ponto de congelamento de cada solução foi determinado utilizando-se alíquota de 50µL, tendo como referência a água (1,84 µS/cm).

4. Viscosidade

A viscosidade das soluções parenterais preparadas em laboratório foi determinada através de viscosímetro REOTHEST® LK 2.2 (Ottendorf-Okrilla,

Alemanha), a temperatura ambiente, 24 horas após o preparo da solução, utilizando o capilar 1/2C (capilar 1, calibrado com duas constantes) e ajustado para medir a viscosidade na faixa entre 1 e 20 mPa.s. (mPa.s = Mille Pascal * segundo = 1 centipoise). Foram realizadas cinco medições de cada amostra e apresenta a média dessas medições convertida à temperatura de 25°C (conversão calculada a partir dos coeficientes de temperatura).

5. Densidade

A densidade das soluções parenterais foram medidas através de picnômetro com o bulbo de capacidade de 50mL a temperatura de 25 (±0,1) °C.

A determinação da densidade das soluções foi realizada por diferença de peso entre o picnômetro vazio (incluindo a tampa e o termômetro). A densidade da solução (ρ) foi obtida através da relação:

$$\rho = \left(\frac{m_2 - m_1}{v} \right)$$

onde:

m_1 = massa do picnômetro vazio;

m_2 = massa do picnômetro com a solução (m_2);

v = volume do picnômetro

Anexo 03 – Artigo Publicado

VESSONI PENNA, T.C., ISHII, M., KUNIMURA, J.S., CHOLEWA, O., Stability of recombinant Green Fluorescent Protein (GFPuv) in glucose solutions at different concentrations and pH values, *Appl Biochem Biotechnol.*, v. 121-124, p.501-528, 2005.

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO

Anexo 04 – Declaração de Dispensa do Comitê de Ética em Pesquisa

DECLARAÇÃO DE DISPENSA DE ANÁLISE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 04 de Outubro de 2006.

DECLARAÇÃO

Eu, **Marina Ishii**, número USP 1344295, matriculada no curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, no programa de Pós-Graduação de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, em concordância com minha orientadora, **Prof. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna**, declaramos, para dos devidos fins, que o Projeto de Doutorado intitulado: *Aplicação da Proteína Verde Fluorescente (GFPuv) como Indicador Biológico na Validação da Autoclavação de Soluções Parenterais e da Esterilização por Óxido de Etileno de Itens Termolábeis. Comparação com esporos de Bacillus subtilis* dispensou análise do Comitê de Ética em Pesquisa e/ou do Comitê de Ética em Experimentação Animal desta Instituição.

Atenciosamente,

Marina Ishii

Doutoranda

Prof. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna

Orientadora