

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

**COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS FÍSICO E QUÍMICO DE
PERMEAÇÃO E DE EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE
(GFP_{UV}) DE CULTURAS DE *ESCHERICHIA COLI* DH5- α**

EB CHIARINI

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra Thereza Christina Vessoni Penna

São Paulo/SP
2002

Eb Chiarini

Comparação entre os métodos físico e químico de permeação e de extração da proteína verde fluorescente (GFPuv) de culturas de *Escherichia coli* DH5- α

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna
orientadora/presidente

Profa. Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata
1º examinador

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
2º examinador

São Paulo, agosto de 2002.

*Nos campos da observação, o acaso
favorece apenas as mentes preparadas.
(Louis Pasteur)*

*Mario ('in memorian') e Edna,
meus maravilhosos pais que dedicaram
suas vidas à formação da minha,
enchendo-a de exemplos de amor e
honestidade;*

*Seila,
minha querida irmã que sem sua confiança,
auxílio e incentivo não teria alcançado
muitos objetivos;*

*Laercio e Marcelo,
amados irmãos sempre presentes com
palavras carinhosas e incentivadoras, e
exemplos de perseverança.*

*Cristian,
companheiro e amigo, sempre atento às
minhas necessidades, que acreditando em
meu potencial muito me apoiou e incentivou
para que obtivesse o sucesso almejado.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Thereza Christina Vessoni Penna, pela oportunidade, incentivo, ensinamentos e orientação ao longo de todo o trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro.

Ao Professor Adalberto Pessoa Junior, pela valiosa colaboração na parte experimental, e por colocar à disposição a estrutura de seu laboratório.

Às Professoras Rosário Dominguez Crespo Hirata (FBC) e Iolanda Nidea Cuccovia (IQ), pela atenção e empréstimo de equipamentos.

Aos amigos Irene Alexeevna Machoshvili, Dante Augusto Moraes, Maria das Graças Baptista dos Santos e Marcelo Marques, pela exaustiva ajuda, sugestões, carinho e incentivo em todos os momentos.

Às amigas Darli e Vera, pela confiança e incansável incentivo.

Aos funcionários do laboratório, Marilene, Ricardo e Gledson, pela amizade e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos dedicados funcionários das secretarias: Juarez, Mirian, Elza, Benê, Elaine e Jorge, que sempre atenderam aos mais variados pedidos da melhor forma possível.

A todos os demais funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, não nomeados, que contribuíram para o andamento deste trabalho.

À aluna de graduação e iniciação científica, Laura de Oliveira Nascimento, pela ajuda na execução da eletroforese.

Aos prestativos bibliotecários e funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas.

Aos professores e funcionários das demais Unidades de ensino que frequentei neste Campus, pela atenção e sorriso sempre presentes.

À Lucy e Eric Balmer, pelo carinho e incentivo constante.

A todos, que ao longo destes meses de convivência, contribuíram para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
NOMENCLATURA	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. JUSTIFICATIVA	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo geral	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1. Propriedades físico-químicas comuns das proteínas	3
3.1.1. Solubilidade das proteínas	4
3.2. Origem da proteína verde fluorescente	6
3.3. Propriedades físico-químicas da GFP e da GFPuv	9
3.4. Aplicações da GFPuv	12
3.5. Conceito de transformação bacteriana induzida	13
3.5.1. Clonagem molecular	14
3.5.2. Plasmídeo pGFPuv	14
3.6. Mecanismo de difusão passiva do DNA na célula bacteriana	15
3.7. Escolha do microrganismo	16
3.8. Expressão e isolamento da GFPuv	17
3.9. Extração e purificação da proteína	18
3.9.1. Extração por partição em três fases	19
3.9.2. Cromatografia de interação hidrofóbica	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Meios de cultura sólidos	23

4.1.1. Agar LB	23
4.1.2. Agar LB/ampicilina	23
4.1.3. Agar LB/ampicilina/IPTG	23
4.2. Meios de cultura líquidos	23
4.2.1. Caldo LB	23
4.2.2. Meio SOC	23
4.2.3. Caldo LB/ampicilina	24
4.3. Soluções	24
4.3.1. Solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) a 0,1 M	24
4.3.2. Tampão de extração (TE)	24
4.3.3. Tampão da amostra (2 vezes concentrado)	24
4.3.4. Tampão de corrida	24
4.4. Microrganismo e condições de crescimento	24
4.5. Obtenção de células de <i>Escherichia coli</i> DH5- α competentes utilizando-se da técnica do cloreto de cálcio	25
4.6. Transformação das células de <i>E. coli</i> com plasmídeo pGFPuv	26
4.7. Expressão da GFPuv	27
4.8. Fluxograma do processo de extração química e purificação da proteína verde fluorescente (GFPuv)	29
4.9. Fluxograma do processo de extração (permeação seletiva associada à extração química) e purificação da proteína verde fluorescente (GFPuv)	30
4.10. Obtenção dos sedimentos de células	31
4.11. Extração da GFPuv	32
4.11.1. Permeação seletiva das células	32
4.11.2. Partição em três fases (TPP – <i>Three Phase Partitioning</i>)	33
4.12. Purificação por cromatografia de interação hidrofóbica (methyl HIC – <i>hydrophobic interaction chromatography</i>)	35
4.13. Quantificação da GFPuv (curva de calibração da GFPuv)	37
4.14. Quantificação das proteínas totais	38
4.15. Caracterização da GFPuv	39
4.15.1. Eletroforese	39
4.15.2. Espectros de excitação e de emissão da GFPuv padrão, extraída e purificada	40

4.15.3. Estabilidade da GFPuv em diferentes valores de pH	41
4.16. Tratamento matemático e estatístico	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. Crescimento das células de <i>Escherichia coli</i> DH5- α transformadas	43
5.2. Isolamento da GFPuv das células de <i>Escherichia coli</i>	43
5.3. Permeação seletiva das células	45
5.4. Extração da GFPuv das células por TPP	50
5.5. Purificação dos permeados e extratos em coluna HIC	52
5.6. Espectro de excitação e de emissão	54
5.7. Estabilidade da GFPuv em diferentes valores de pH	55
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Grupos de cadeias laterais de aminoácidos e princípios para processos de purificação (WHEELWRIGHT, 1994).	4
TABELA 2:	Concentrações de sulfato de amônio e <i>t</i> -butanol utilizados nos experimentos de extração química da GFPuv.	34
TABELA 3:	Determinação da intensidade de fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}}$ 394 nm/ $\lambda_{\text{emissão}}$ 509 nm) a partir de concentrações conhecidas da proteína verde fluorescente (GFPuv).	38
TABELA 4:	Determinação da absorvância ($\lambda_{280 \text{ nm}}$) a partir de concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (BSA).	39
TABELA 5:	Permeação e extração da proteína verde fluorescente (GFPuv) de células de <i>Escherichia coli</i> para cultura 2 (massa seca = 1,40 mg/mL); cultura 3 (massa seca = 0,92 mg/mL) e cultura 4 (massa seca = 1,44 mg/mL).	48
TABELA 6:	Extração da proteína verde fluorescente (GFPuv) das células de <i>Escherichia coli</i> por partição em três fases (TPP). As amostras foram obtidas da mesma cultura 1(massa seca = 1,46 mg/mL).	50
TABELA 7:	Extração por partição em três fases (TPP) e purificação em coluna cromatográfica de interação hidrofóbica (HIC) da proteína verde fluorescente (GFPuv) de células de <i>Escherichia coli</i> e de permeados.	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	<i>Aequorea victoria</i> (http://latin.arizona.edu/~dgalbrai/dginf.html).	7
FIGURA 2:	Estrutura barril β -can da GFP.	8
FIGURA 3:	Reação de ciclização autocatalítica e oxidação para formação do grupo fluoróforo (http://www.biochem.mcw.edu).	9
FIGURA 4:	Plasmídeo pGFPuv.	15
FIGURA 5:	Mecanismo molecular proposto para explicar a transformação da <i>Escherichia coli</i> com uma molécula de DNA exógeno (NASCIMENTO <i>et al.</i> 1999).	16
FIGURA 6:	Ordenação das moléculas de água ao redor dos resíduos na superfície das proteínas (SCOPEs, 1994).	19
FIGURA 7:	Série de Hofmeister (série liotrópica) para a precipitação de proteínas em solução aquosa. Os sais estão dispostos de acordo com a maior ou menor capacidade de promover interação hidrofóbica e precipitação de proteínas.	21
FIGURA 8:	Série crescente de hidrofobicidade de bases de ligantes utilizados em cromatografia de interação hidrofóbica.	21
FIGURA 9:	Placa de Petri contendo agar LB/ampicilina/IPTG com colônias de <i>Escherichia coli</i> transformadas com o plasmídeo pGFPuv, fluorescentes sob luz UV.	27
FIGURA 10:	Suspensões de células de <i>Escherichia coli</i> transformadas com o plasmídeo pGFPuv, cultivadas em caldo LB/ampicilina/IPTG, observadas sob a luz UV após incubação em agitador metabólico (100 rpm/37 °C/24 h).	28

- FIGURA 11:** Sedimentos de células de *Escherichia coli* transformadas, cultivadas em caldo LB/ampicilina/IPTG, observados à luz UV após centrifugação (1000 g/30 minutos/ 4°C). 31
- FIGURA 12:** Célula de *Escherichia coli* expressando GFPuv, observada ao microscópio sob fluorescência (2000 x) após cultivo em agitador metabólico. 32
- FIGURA 13:** Interfaces brancas após a 1ª etapa de extração por TPP, formadas por macromoléculas e fragmentos celulares. 35
- FIGURA 14:** Fases inferiores e interfaces delgadas fluorescentes sob luz UV, após 2ª etapa de extração por TPP. 35
- FIGURA 15:** Colunas para cromatografia de interação hidrofóbica preparadas com tampão de equilíbrio (sulfato de amônio 2M) para a eluição da GFPuv. 37
- FIGURA 16:** Curva padrão da GFPuv ($\lambda_{\text{excitação}}$ 394 nm/ $\lambda_{\text{emissão}}$ 509 nm). 38
- FIGURA 17:** Curva padrão das proteínas totais relacionada a BSA ($\lambda_{280 \text{ nm}}$). 39
- FIGURA 18:** Concentração celular ($\text{DO}_{660 \text{ nm}}$) de *Escherichia coli* DH5- α em função do tempo de cultivo em agitador metabólico (100 rpm/ 37 °C). 43
- FIGURA 19:** Ciclo de congelamento e descongelamento aplicados aos sedimentos das culturas de *Escherichia coli* para a permeação seletiva da GFPuv. Temperatura da placa de congelamento (—), temperatura das culturas 2, 3 e 4 (—, — e —), respectivamente. 44
- FIGURA 20:** Células de *Escherichia coli* transformadas observadas na microscopia (ampliadas 1000 vezes) sob fluorescência (filtro U-MWB) após 1º ciclo de CDS (a), 2º ciclo de CDS (b), 3º ciclo de CDS (c) e 4º ciclo de CDS (d). 45
- FIGURA 21:** Teores da proteína verde fluorescente (GFPuv) para as misturas permeadas seletivamente, extraídas pelo método de partição em três fases e eluídas em coluna cromatográfica de interação hidrofóbica, correspondentes aos dados da Tabela 7. 47

- FIGURA 22:** Produtividade específica, relação entre a proteína verde fluorescente (GFPuv) e a massa seca, para a mistura dos extratos obtidos por partição em três fases (TPP) e eluídos em coluna cromatográfica de interação hidrofóbica (HIC), correspondentes aos dados da Tabela 7. 49
- FIGURA 23:** Teores e produtividade específica da proteína verde fluorescente (GFPuv) das misturas das amostras, após eluição em coluna cromatográfica de interação hidrofóbica (HIC). 52
- FIGURA 24:** Gel de eletroforese em poliacrilamida (SDS-page) da amostra 3. Colunas: 1, padrão de peso (kDa); 2, GFPuv padrão (20,0 µg GFPuv /mL); 3, permeado do 1º ciclo CDS (32,15 µg GFPuv/mL); 4, permeado do 2º ciclo CDS (59,95 µg GFPuv/mL); 5, permeado do 3º ciclo CDS (38,61 µg/mL); 6, permeado do 4º ciclo CDS (45,61 µg GFPuv/mL); 7, mistura dos permeados após extração por TPP (12,77 µg GFPuv/mL); e 8, mistura dos extratos após eluição em coluna methyl HIC (59,80 µg GFPuv/mL). 54
- FIGURA 25:** Espectro excitação da GFPuv medido a $\lambda_{\text{emissão}}$ 509 nm: GFPuv padrão (—), GFPuv extraída (—), GFPuv purificada (—); e espectro de emissão da GFPuv excitada a $\lambda_{\text{excitação}}$ 394 nm: GFPuv padrão (—), GFPuv extraída (—) e GFPuv purificada (—). 55
- FIGURA 26:** Estabilidade da GFPuv medida pela intensidade de fluorescência em função de diferentes valores de pH: GFPuv padrão (—), GFPuv extraída pelo método de TPP (—), GFPuv purificada em coluna HIC (—) e valores mádios dentre as três curvas (—).56 Fluxograma do processo de

NOMENCLATURA

BSA	Albumina de soro bovino
CDS	Congelamento, descongelamento e sonicação
DBO	Demanda biológica de oxigênio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GFP	Proteína verde fluorescente nativa
GFPuv	Proteína verde fluorescente
HIC	Cromatografia de interação hidrofóbica
IC	Intervalo de confiança
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside
kDa	Kilo Dalton, 1 kDa corresponde a massa molar de 1000 átomos de hidrogênio
LB	Meio de cultura Luria Bertani
Massa específica	Relação entre a concentração de GFPuv e a quantidade de proteínas totais ($\mu\text{g GFPuv/ mg proteínas totais}$)
Produtividade específica	Relação entre a concentração de GFPuv e a massa seca da amostra ($\mu\text{g GFPuv/ mg massa seca}$)
pGFPuv	Plasmídeo contendo o gene da proteína verde fluorescente
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
SDS-PAGE	Duodecil sulfato de sódio - gel de poliacrilamida para eletroforese
TE	Tampão de extração
TPP	Partição em três fases (<i>Three Phase Partitioning</i>)
UFC/ mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
UV	Ultravioleta
V	Volts

RESUMO

A proteína verde fluorescente (GFPuv), pelo fato de ter como característica a emissão de luz verde fluorescente brilhante quando exposta à luz ultravioleta, tem sido utilizada como marcador em diversos campos de pesquisa. Células transformadas de *Escherichia coli* DH5- α expressando a GFPuv foram submetidas aos tratamentos: (i) permeação seletiva (congelamento/ descongelamento/ sonicação) associada à extração por partição em três fases (TPP) e posterior purificação em coluna cromatográfica de interação hidrofóbica (HIC), e (ii) extração direta das células por TPP e posterior purificação em coluna HIC. Este trabalho teve por objetivo a extração da GFPuv com a aplicação das metodologias citadas para a extração da proteína, avaliando a influência da permeação seletiva das células de *Escherichia coli* no processo de extração da GFPuv. Na análise dos resultados observou-se que apesar da permeação seletiva ser uma metodologia mais laboriosa, mostrou-se mais eficiente pela obtenção de aproximadamente 9 vezes mais GFPuv em relação à extração direta das células por TPP.

ABSTRACT

The green fluorescent protein (GFPuv), for the fact of having as characteristic the emission of brilliant green fluorescent light when exposed to the ultraviolet light, it has been used as marker in several research fields. Transformed cells of *Escherichia coli* DH5- α expressing GFPuv was subjected to: (i) selective permeation (freezing / thawing/ sonication) associated to the extraction for partition in three phases (TPP) and subsequent purification in hydrophobic interaction chromatography column (HIC), and (ii) direct extraction of the cells for TPP and subsequent purification in HIC column. This work had for objective the extraction of GFPuv with the application of the methodologies mentioned for the extraction of the protein, evaluating the influence of the selective permeation in the cells of *Escherichia coli* in the process of GFPuv extraction. In the analysis of the results was observed that in spite of the selective permeation to be a more laborious methodology, it was shown more efficient for the obtaining of approximately 9 more times GFPuv in relation to the direct extraction of the cells for TPP.

1. INTRODUÇÃO

A proteína verde fluorescente, extraída da *Aequorea victoria*, emite luz verde fluorescente brilhante quando exposta à luz ultravioleta. A forma recombinante desta proteína, GFPuv, tem sido expressa em células procariontes, eucariontes, e, bactérias esporuladas continuam expressando a GFPuv nas células das gerações seguintes. O conhecimento destas características aliadas a outras como, características físico-químicas, aplicabilidade de técnicas de purificação, estabilidade da proteína em diferentes valores de pH, são fundamentais para a aplicação da GFPuv como ferramenta para indicador biológico em controles de processos tecnológicos.

1.1. JUSTIFICATIVA

A proteína verde fluorescente recombinada (GFPuv), por ser marcador fluorescente intrínseco de células procariontes e eucariontes, é uma importante ferramenta para indicador biológico. A transformação da *Escherichia coli* DH5- α com o plasmídeo pGFPuv, construído pela Clontech[®], a capacidade de expressão da GFPuv pela bactéria transformada, o isolamento, a purificação, e a caracterização das propriedades físico-químicas desta proteína recombinada devem ser conhecidas e comparadas com as propriedades da proteína verde fluorescente na forma selvagem (GFP) descritas na literatura. A avaliação do método mais eficaz de recuperação da GFPuv se faz necessário para obtenção do melhor rendimento da proteína de interesse produzida.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Comparar metodologias para a extração da proteína verde fluorescente (GFPuv) a partir de culturas de *Escherichia coli* DH5- α , através de método físico (permeação seletiva), método químico (extração por partição em três fases – TPP), e pela associação dos métodos físico e químico, com posterior eluição em coluna cromatográfica de interação hidrofóbica (HIC).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar qual a influência da permeação seletiva das células de *Escherichia coli* no processo de extração da proteína verde fluorescente;
- Avaliar o espectro de emissão e de excitação da proteína verde fluorescente extraída e eluída na coluna HIC;
- Avaliar a estabilidade da proteína verde fluorescente, frente às variações de pH em função da intensidade de fluorescência.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Propriedades físico-químicas comuns das proteínas

Proteínas são uma série de aminoácidos ligados por ligações peptídicas. Todos os aminoácidos consistem em um carbono central ligado a um grupo amina, um grupo carboxila, um átomo de hidrogênio e um radical – R. Os grupos amina e carboxila estão ligados ao carbono central na posição alpha, são as bases da ligação peptídica. Esta ligação entre o carbono do grupo carboxila e o nitrogênio do grupo amina é covalente. Entretanto a proteína tem duas terminações diferentes. Uma é o resíduo terminal amina livre (N-terminal), e a outra terminação tem um resíduo terminal carboxila livre (C-terminal). Cada aminoácido que compõe a proteína é denominado de resíduo de aminoácido, e o peptídeo pode ser quebrado em vários resíduos de subunidades (WHEELWRIGHT, 1994).

Os aminoácidos são classificados pelas suas cadeias laterais (radical R). É a variação do grupo R, sua ligação à proteína em diferentes posições e a configuração das diversas proteínas que conferirá características distintas. Proteínas pequenas têm entre 50 e 100 resíduos de aminoácido, enquanto que proteínas grandes têm dezenas de centenas de resíduos de aminoácido. O tamanho da proteína também é medido pela massa molar. A unidade da massa molar é o Dalton, e a proteína está numa faixa típica de 1.000 Da (1 kDa) a 100.000 Da (100 kDa) ou maior. Para proteínas globulares, 100 kDa é aproximadamente 6,5 nm (65 Å) de diâmetro (WHEELWRIGHT, 1994). A GFPuv possui monômero de 27 kDa com diâmetro aproximado de 1,75 nm (17,5 Å) (WARD, 1998).

As características conferidas às proteínas pelas cadeias de aminoácidos servem como base para o processo de purificação, e inclui solubilidade, carga, hidrofobicidade e ligação intermolecular. Os aminoácidos podem ser classificados pelas suas cadeias laterais como na Tabela 1. O primeiro grupo

da classificação dos aminoácidos contém as cadeias laterais (R) alifáticas e aromáticas e tendem a aumentar a hidrofobicidade da molécula de proteína e torná-la menos solúvel em água. O segundo grupo contém a cadeia lateral básica, que tem um grupo amino que carrega uma carga e causa a ação do grupo como uma base frágil. O terceiro grupo compreende os de cadeia lateral acídica, que têm um grupo carboxila ligado e agindo como um ácido fraco. O quarto grupo contém enxofre, ou thiol, cadeias laterais que permitem ligação intermolecular. A amina secundária e o grupo hidroxila alifático participam pouco na separação, tendo alguma influência na solubilidade.

TABELA 1. Grupos de cadeias laterais de aminoácidos e princípios para processos de purificação (WHEELWRIGHT, 1994).

Cadeia lateral	Aminoácidos	Bases para purificação
Alifática	Glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina	Hidrofobicidade
Aromática	Fenilalanina, tirosina, triptofano	Hidrofobicidade
Básica	Lisina, arginina, histidina	Carga positiva
Ácida	Aspartato, glutamina	Carga negativa
Thiol	Cisteína, metionina	Solubilidade
Amina secundária	Alanina, prolina	Solubilidade
Hidroxila alifática	Serina, treonina	Solubilidade

3.1.1. Solubilidade das proteínas

A típica proteína globular apresenta na superfície regiões polares com cargas positivas e negativas, regiões polares sem carga ou hidrofílicas, e regiões apolares ou hidrofóbicas, e a distribuição dos resíduos hidrofóbicos ou hidrofílicos na superfície das proteínas é que vai determinar a solubilidade da proteína em diferentes solventes. O caráter polar ou apolar da superfície da proteína é determinado principalmente pela estrutura primária da proteína, ou seja, pelos resíduos aminoácidos que se concentram na superfície (LEHNINGER, 1990). A proteína assume a conformação de acordo com a seqüência de aminoácidos que promove o mínimo contato com os resíduos hidrofóbicos com o solvente aquoso (internalização dos resíduos hidrofóbicos – *foldng*) maximizando as interações entre resíduos polares e carregados com o solvente. De qualquer forma permanecem alguns resíduos hidrofóbicos na

superfície em contato com o solvente. A diminuição da solubilidade de uma proteína globular desnaturada é o resultado da exposição dos resíduos hidrofóbicos internos, que favorece a interação entre as proteínas e conseqüente agregação (ROTHSTEIN, 1994).

Em termos gerais, a solubilidade de um soluto em um solvente é determinada pelo resultado global das interações atrativas e repulsivas entre as moléculas de solvente e de soluto. A solubilidade é favorecida quando as interações entre as moléculas de soluto são repulsivas e as interações do soluto com as moléculas do solvente são atrativas. Com isso uma molécula pode precipitar por qualquer perturbação que resulte em diminuição das forças atrativas com o solvente, ou então, em um aumento das interações atrativas entre as moléculas de soluto.

As interações entre as moléculas de soluto e solvente geralmente são ligações não-covalentes, onde não existe compartilhamento de elétrons e as moléculas mantêm a sua identidade, e podem ser agrupadas em dois tipos: interações eletrostáticas (interações dipolo-dipolo) e forças de van der Waals (interações de polarização ou indução).

As interações eletrostáticas são a base da solubilidade que moléculas polares neutras e com carga apresentam em solventes polares. Moléculas polares neutras são aquelas que resultam de um dipolo permanente devido a uma distribuição assimétrica dos elétrons na estrutura da molécula (momento dipolar). Moléculas com carga são aquelas que possuem grupos ionizáveis localizados em diferentes posições, também chamadas de íons dipolares ou *zwitterions*. Proteínas não isoelétricas possuem um número grande de regiões com carga, em adição ao momento dipolar.

As interações eletrostáticas são ligações fortes e resultam da interação das extremidades polares ou carregadas entre pelo menos duas moléculas. Possuem um componente repulsivo nas interações de cargas de mesmo sinal, e um componente atrativo entre cargas de sinais opostos. O pH tem grande influência na presença ou ausência de cargas, uma vez que o pH do solvente determina o grau de dissociação dos grupamentos ácidos e básicos de uma proteína. Portanto, a carga de uma proteína pode ser experimentalmente manipulada variando-se as propriedades do solvente, especialmente o pH. Moléculas com carga global zero (número de cargas positivas igual ao número

de cargas negativas) terão maior probabilidade de se agregar devido à diminuição da repulsão eletrostática entre as mesmas. Este fenômeno é representado pelos perfis de solubilidade das proteínas em relação a diferentes valores de pH. O ponto de solubilidade mínima geralmente corresponde ao ponto isoelétrico (pI), ou seja, ao valor de pH no qual a proteína possui carga global zero. O valor do pI depende da força iônica e do ânion específico do sal adicionado ao meio (ROTHSTEIN, 1994). A maioria das proteínas é solúvel nas condições semelhantes àquelas do citoplasma das células, isto é, em força iônica baixa, entre 0,15 e 2,0 M, no valor de pH neutro.

A determinação do pI da proteína apresenta fundamental importância na caracterização da mesma durante a extração e nos estágios de purificação, informando igualmente o melhor intervalo de pH na caracterização das propriedades da proteína de interesse (LEHNINGER, 1990).

As forças de van der Waals são ligações frágeis e superficiais que se estabelecem somente com contato íntimo das regiões apolares das moléculas. Ocorrem principalmente entre moléculas apolares que possuem grupos capazes de formar dipolos instantâneos, originados em um dado momento por existir assimetria na distribuição de cargas na molécula. A intensidade de interação depende da distância e da superfície das moléculas (MORRISON & BOYD, 1990).

De um modo geral o solvente é sempre aquoso. As propriedades do meio podem ser alteradas por mudanças na força iônica, pH, adição de solventes orgânicos miscíveis e polímeros orgânicos, combinados com variação na temperatura, que causam alteração na solubilidade das proteínas (SCOPES, 1994). Uma proteína permanece em solução quando é termodinamicamente mais estável do que formar agregados protéicos em uma fase sólida (GLATZ, 1990).

3.2. Origem da proteína verde fluorescente

A bioluminescência é um fenômeno natural observado em diversas espécies de organismos marinhos e terrestres. O vagalume é o representante mais conhecido no ambiente terrestre.

Nos oceanos estas espécies aparecem nas diversas regiões, compreendendo desde zooplâncton (protozoários dinoflagelados), pequenos

hidrozoários como as *Deiopeas* e o *Beroe forshalii*; crustáceos como o camarão *Euphasia pacifica*; e peixes demersais como *Porichthys porosissimus*. Estes animais marinhos utilizam-se da bioluminescência para afastar predadores, para camuflagem mimetizando outras espécies, para atrair suas presas, para atrair seus parceiros no período reprodutivo e como fonte alternativa de energia (BARNES, 1991).

O mecanismo químico de produção de luz nos organismos marinhos difere em cada espécie. A maioria apresenta somente quimioluminescência ou bioluminescência que resulta de uma reação química mediada por fotoproteínas.

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, emitindo um fóton quando retorna para o estado mais estável ou de menor energia.

A *Aequorea victoria* (Figura 1) é um cnidário, uma medusa 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.

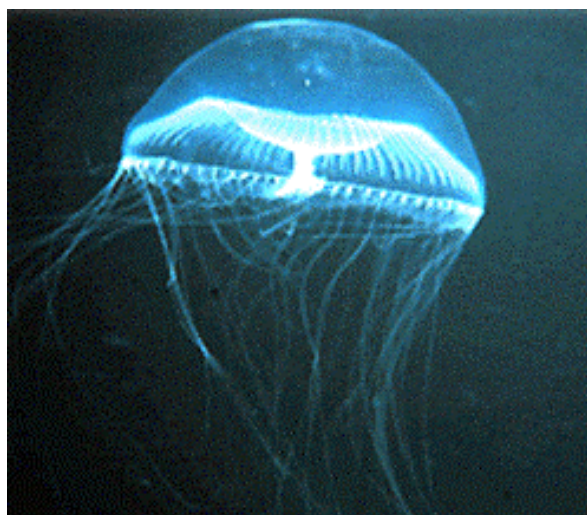


FIGURA 1: *Aequorea victoria*
(<http://latin.arizona.edu/~dgalbrai/dginf.html>).

O grupo fluoróforo da proteína verde fluorescente, GFP, está situado no centro geométrico do cilindro, formando um segmento irregular α -hélice,

formado pela seqüência interna de três aminoácidos Ser⁶⁵ – Tir⁶⁶ – Gli⁶⁷ (PHILIPS, 1998).

A GFP, forma selvagem, tem como estrutura tridimensional, 11 fitas que formam um cilindro simétrico em forma de barril (Figura 2). Estes cilindros possuem um diâmetro de cerca de 30 Å a 40 Å de comprimento. Estudos de densidade dentro dos cilindros revelaram o centro fluorescente da molécula, uma tirosina modificada na cadeia e uma proteína ciclizada como parte mais importante do segmento de α -hélice irregular. Pequenas partes de α -hélices e *loops* formam as extremidades dos cilindros. Esta estrutura contendo uma simples α -hélice dentro de uma estrutura uniforme de folhas β , representa a nova classe de proteínas, chamadas de β -can, estrutura altamente regular. O barril tem como função proteger o grupo fluoróforo dando-lhe estabilidade e resistência ao calor e a desnaturação.

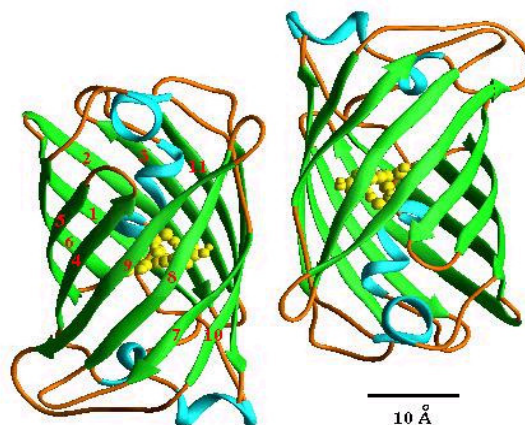


FIGURA 2: Estrutura barril β -can da GFP.

O mecanismo químico de formação do cromóforo não é totalmente compreendido. A GFP nascente não apresenta fluorescência, o grupo fluoróforo forma-se após cerca de 4 horas da ocorrência de duas reações, quais sejam: uma reação de ciclização autocatalítica entre a carbonila da serina⁶⁵ e o grupo amino da glicina⁶⁷ formando um composto intermediário imidazólico através de uma ligação covalente e uma etapa lenta dependente de oxigênio onde a ligação simples entre os carbonos C α - C β da tirosina⁶⁶, é oxidada à dupla ligação (Figura 3). O resultado é a formação de duplas conjugadas a α -hélice com propriedades fluorescentes.

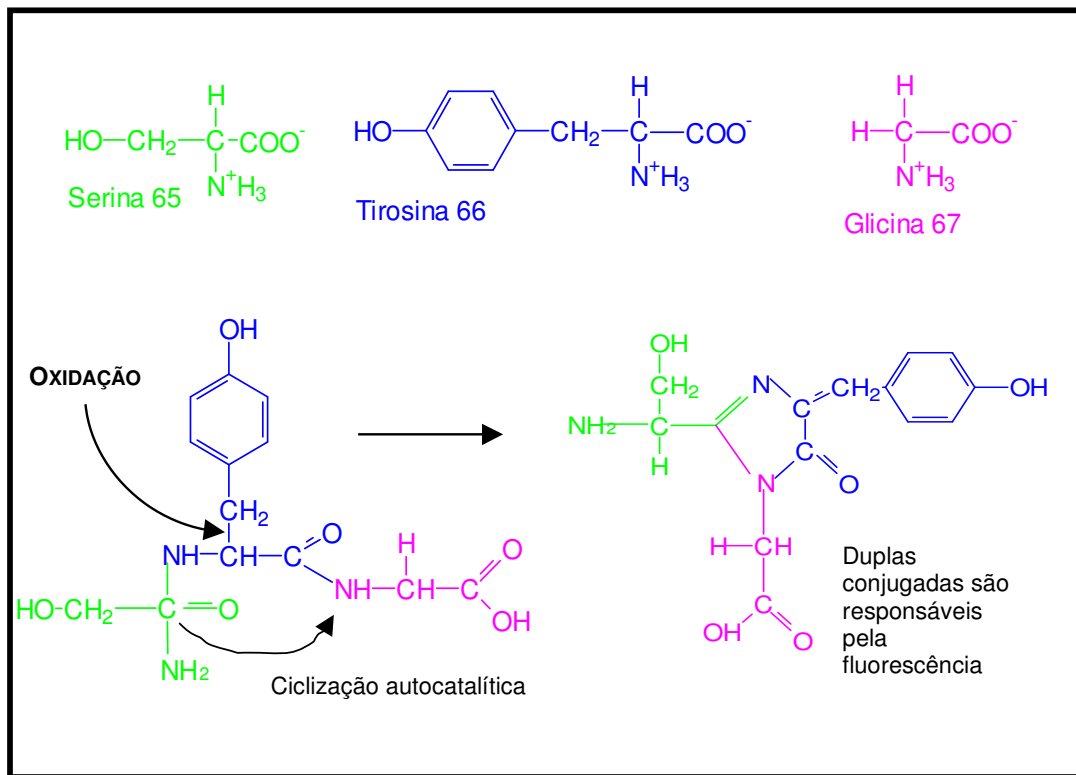


FIGURA 3: Reação de ciclização autocatalítica e oxidação para formação do grupo fluoróforo (<http://www.biochem.mcw.edu>).

Diversos tipos recombinantes de GFP foram produzidos utilizando-se técnicas de clonagem molecular do DNA complementar da proteína verde fluorescente. Estas variantes da GFP proporcionam uma excelente ferramenta de estudos da expressão gênica em uma enorme gama de células (CHALFIE *et al.*, 1994).

3.3. Propriedades físico-químicas da GFP e da GFPuv

A GFP é uma molécula globular, compacta e ácida composta por monômeros de massa molar de 27 kDa, a forma recombinante tem maior propensão a dimerizar do que a forma selvagem (CRAMERI *et al.*, 1996). O polímero tem na estrutura primária 238 aminoácidos com a seqüência do C-terminal composta por His-Gly-Met-Asp-Glu-Tyr-Lys, susceptível ao ataque de carboxipeptidases e proteases não específicas. Durante a permeação seletiva a proteólise da extremidade C-terminal pode ser inibida trabalhando em baixas

temperaturas (0 °C a 4 °C), e na presença de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonida) (WARD, 1980 e PHILIPS, 1998).

A GFP absorve luz UV e luz azul com um pico máximo a 395 nm e um pico menor a 470 nm, emitindo luz verde com um pico máximo de emissão a 509 nm e um pequeno espalhamento em 540 nm (WARD *et al.*, 1980).

A GFPuv, proteína verde fluorescente recombinada, emite uma máxima fluorescência quando excitada por luz ultravioleta, UV (360-400 nm), possui pico de excitação de 394 nm e pico de emissão de 509 nm. A GFPuv foi desenvolvida introduzindo mutações *in vitro* no DNA da GFP trocando três aminoácidos (Phe⁹⁹ para Ser, Met¹⁵³ para Thr e Val¹⁶³ para Ala, baseado na numeração dos aminoácidos na forma selvagem) do sistema TU#58 da GFP, resultando na GFPuv. Esta forma mutante expressa pela *Escherichia coli* apresenta fluorescência 18 vezes mais intensa que a GFP, quando excitada pela luz UV (CRAMERI *et al.*, 1996).

Apesar da recombinação da proteína aumentar a fluorescência da GFPuv pelos efeitos da alteração de aminoácidos e formação do cromóforo, os picos de excitação e emissão permanecem praticamente inalterados em relação a GFP. A GFPuv apresenta menor toxicidade do que a forma selvagem, por isso a *E. coli* contendo a GFPuv cresce duas a três vezes mais rápido do que aquelas que expressam a GFP.

A GFP expressa em *E. coli* apresenta-se insolúvel, pouco fluorescente e precipita-se no citoplasma. A GFPuv expressa nas mesmas condições, apresenta-se solúvel e com fluorescência intensa, porém apresenta-se mais susceptível a sofrer dimerização do que a forma selvagem (CRAMERI *et al.*, 1996).

A fluorescência é muito estável quando estudada em fluorímetro, porém quando estudada em microscópio óptico onde há maior intensidade de iluminação apresenta fotobranqueamento. Este fenômeno ocorre quando a GFP é iluminada próximo ao pico máximo de excitação ao comprimento de onda entre 340-390 nm ou 395-440 nm (CHALFIE *et al.*, 1994).

A GFP na presença de fortes agentes redutores converte-se em GFP não fluorescente, uma vez que a proteína necessita de oxigênio molecular para formação do grupo fluoróforo, onde a etapa limitante da reação é a oxidação da

tirosina⁶⁶, mas o processo é reversível na presença de O₂ (INOUE & TSUJI, 1994b).

A GFP mantém a fluorescência entre pH 5,5 e 12, entretanto a fluorescência decresce em valores de pH inferiores a 5,5, e superiores a 12, sendo o pH ótimo igual a 8,0 (BOKMAN & WARD, 1981). Devido à sensibilidade nestas faixas de pH, a GFP é muito utilizada em estudos de citometria como indicadora do pH intracelular em células livres (KNEEN *et al.*, 1998). O ponto isoelétrico (pI) da GFP está situado entre os valores de pH 4,6 e 5,4. A adição de β-mercaptoetanol (SAMBROOK *et al.*, 1989) e a manutenção do pH em 8,0 aumentam a estabilidade da proteína (WARD, 1998; CHALFIE *et al.*, 1994 e CRAMERI *et al.*, 1996).

A fluorescência da GFP é mantida durante uma desnaturação com 1% de SDS ou 8 M de uréia, na ausência da mesma apresenta reversibilidade, e após fixação com glutaraldeído ou formaldeído. Completamente desnaturada a GFP não fluoresce. A irreversível desnaturação, e posterior não fluorescência, ocorre em etanol 95%, em solução a 1% de H₂O₂ e em elevadas concentrações de solventes orgânicos (CHALFIE *et al.*, 1994).

A GFP, em estudos *in vitro*, apresenta resistência a temperaturas de 70 °C, em pH alcalino (inferior a 12), a alguns solventes orgânicos e detergentes, e de algumas proteases (ROBART & WARD, 1990). Segundo INOUE & TSUJI (1994a), alguma fluorescência é observada quando nanogramas da proteína nativa é aplicada em 1% de SDS em gel de poliacrilamida. *In vivo* a GFP apresenta estabilidade quando expressa em vários organismos (LI *et al.*, 1997).

A GFP é fluorescente em ambas conformações, tanto no monômero quanto no dímero. A proporção das formas monoméricas ou diméricas depende da concentração da proteína no meio. A GFP dimeriza via interações hidrofóbicas em concentrações de proteína de 5 a 10 mg/mL. A dimerização resulta em uma diminuição na absorção a 470 nm e em um concomitante aumento de absorção em 395 nm (WARD, 1998). Na maioria dos estudos experimentais que usam GFP como informação, a forma monomérica predomina, entretanto quando se usa a GFPuv como informação, a dimerização poderá estar presente, mesmo que em níveis de expressão moderados.

3.4. Aplicações da GFPuv

O gene que expressa a GFP pode ser clonado com um gene que expressa outra proteína. Esta clonagem é possível pois em muitos casos as proteínas apresentam semelhanças estruturais com N- ou C-terminal, os quais possibilitam a ligação entre os genes, mantendo sua expressão e a atividade de ambas proteínas (STEARNS, 1995). Estas clonagens possuem inúmeras aplicações.

Nos últimos vinte anos, após a extração da proteína verde fluorescente a partir da *Aequorea victoria*, muitos estudos têm sido feito sobre o uso da GFPuv. Mais recentemente diversos estudos têm-se desenvolvido expressando a GFPuv em diversas espécies de organismos ou células como marcador de proteínas, células e organismos em várias espécies de procariontes e eucariontes, proporcionando uma excelente ferramenta de estudo de expressão gênica em uma enorme gama de células. 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. A GFPuv pode ser expressa com sucesso em bactérias (CHARFIE *et al.*, 1994), leveduras (KAHANA *et al.*, 1995), plantas (CAASPEER & HOLT, 1996), drosófilas (WANF & HAZELRIGG, 1994), peixe zebra (AMSTERDAM *et al.*, 1996) e em células de mamíferos (LUDIN *et al.*, 1996). 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. Por causa desta característica, e de ser marcador fluorescente intrínseco, a GFPuv tem sido considerada um sistema novo de informação genética (CHALFIE *et al.*, 1994).

FLACH *et al.*, (1994) visualizaram o movimento de ida e volta do RNA transportador entre o núcleo e o citoplasma utilizando a proteína histona H2B fluorescente no núcleo de leveduras, servindo para estudos da cinética molecular.

O transporte de proteínas ao longo de membranas secretoras utilizando a proteína verde fluorescente foi visualizado por KAETHER & GERDES, (1995).

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

Em células humanas SULLIVAN *et al.*, (1995) observaram a seqüência *in vivo* da formação do centrômero no DNA humano marcado com EGFP (*Enhanced GFP*).

Estudos na formação do endosporo em *Bacillus subtilis*, fundindo GFP com proteína DacF e SpoIVA do *Bacillus subtilis* para detectar o gene de expressão célula-específica e sua localização subcelular durante a esporulação, foram feitos por WEBB *et al.* (1995).

SHIGA *et al.*, (1996), estudaram a morfogênese das células de drosófilas utilizando como ferramenta uma β -galactosidase fluorescente nuclear.

O crescimento de *Lactococcus lactis* foi avaliado por PALENCIA *et al.* (2000) por meio de estudos moleculares e fisiológicos.

A utilização da GFPuv como uma ferramenta quantitativa através de um método de medição da proteína expressa em células isoladas e a co-variação das propriedades fisiológicas particulares com a proteína expressa foi estudado por HACK *et al.* (2000).

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 esterilização pode ser determinada por espectrofluorimetria, tornando o método rápido e preciso. A análise qualitativa pode ser determinada por microscopia com ultravioleta ou por observação em lâmpada UV de comprimento de onda de 395 nm (CHALFIE *et al.*, 1994).

3.5. Conceito de transformação bacteriana induzida

O processo de transformação constitui um evento de alta importância na técnica de manipulação gênica. Em 1999, NASCIMENTO *et al.* citaram que a *E. coli* tornou-se competente para transformação com DNA exógeno, quando a bactéria foi suspensa em cloreto de cálcio gelado e submetida a um curto

choque térmico a 42 °C. Estes mesmos autores verificaram que as bactérias crescidas até a fase log eram mais competentes do que aquelas isoladas de outros estágios do crescimento.

3.5.1. Clonagem molecular

A clonagem molecular (uma colônia de bactérias é denominada de clone porque os indivíduos são geneticamente idênticos à bactéria inicial) é a técnica central da metodologia do DNA recombinante, a qual consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas. A clonagem molecular compreende pelo menos dois estágios importantes: primeiro o fragmento do DNA de interesse chamado de inserto é ligado a uma outra molécula de DNA chamada de vetor para formar o que se chama de DNA recombinante. Segundo, a molécula do DNA recombinante é introduzida numa célula hospedeira compatível, num processo chamado de transformação. A célula hospedeira que adquiriu a molécula do DNA recombinante é denominada de célula transformada ou transformante (NASCIMENTO *et al.* 1999).

3.5.2. Plasmídeo pGFPuv

O tamanho e a conformação da molécula do DNA afetam o processo de transformação. Plasmídeo pequeno é mais facilmente incorporado pela célula bacteriana competente; DNA linear é pobremente incorporado, talvez pelo fato de sofrer degradação pelas exonucleases presentes no espaço periplasmático (NASCIMENTO *et al.* 1999).

O vetor pGFPuv (Clontech, CA, USA), plasmídeo circular de DNA (Figura 4), é construído a partir de um plasmídeo pUC de alta replicação, possibilitando a formação de várias cópias do mesmo, depois de internalizado na célula bacteriana. O plasmídeo possui o gene que expressa resistência a ampicilina, o que facilita a seleção de cepas de *E. coli* geneticamente modificadas.

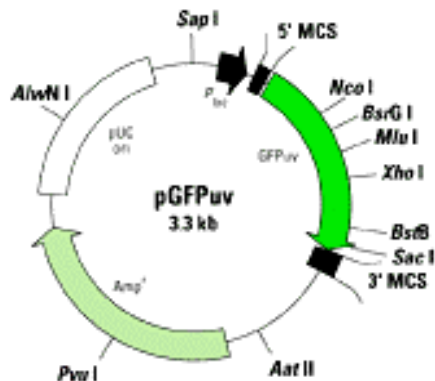


FIGURA 4: Plasmídeo pGFPuv.

Para o preparo da *E. coli* com o vetor pGFPuv que contém grande número de cópias (CHALFIE *et al.*, 1994), foi utilizado o método padrão de cloreto de cálcio por induzir a bactéria a um estado transitório de 'competência' durante o qual ela estará hábil a absorver DNAs de fontes variáveis (SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.6. Mecanismo de difusão passiva do DNA na célula bacteriana

O mecanismo de difusão passiva da molécula do DNA na bactéria competente ainda é desconhecido. Uma hipótese é que as moléculas do DNA passam através de canais situados nas chamadas zonas de adesão, que são locais onde as membranas interna e externa da célula bacteriana se unem formando poros. Estes poros só estão presentes durante o crescimento bacteriano.

Em condições naturais, a difusão passiva do DNA torna-se difícil devido a repulsão eletrostática existente entre as cargas negativas da camada de fosfolípidos da membrana bacteriana com a carga negativa do grupo fosfato da molécula do DNA.

O papel do cálcio é explicado pela hipótese de que a 0 °C a fluidez da membrana celular é cristalizada, estabilizando a distribuição dos fosfatos carregados. Os íons Ca^{+2} formam um complexo com este grupamento, cobrindo as cargas negativas, facilitando a atração eletrostática com as moléculas de DNA na zona de adesão. O choque térmico complementa este

processo de difusão passiva, provavelmente criando um desbalanço térmico entre o interior e o exterior da célula bacteriana, auxiliando o bombeamento do DNA através da zona de adesão, conforme ilustrado na Figura 5 (NASCIMENTO *et al.* 1999).

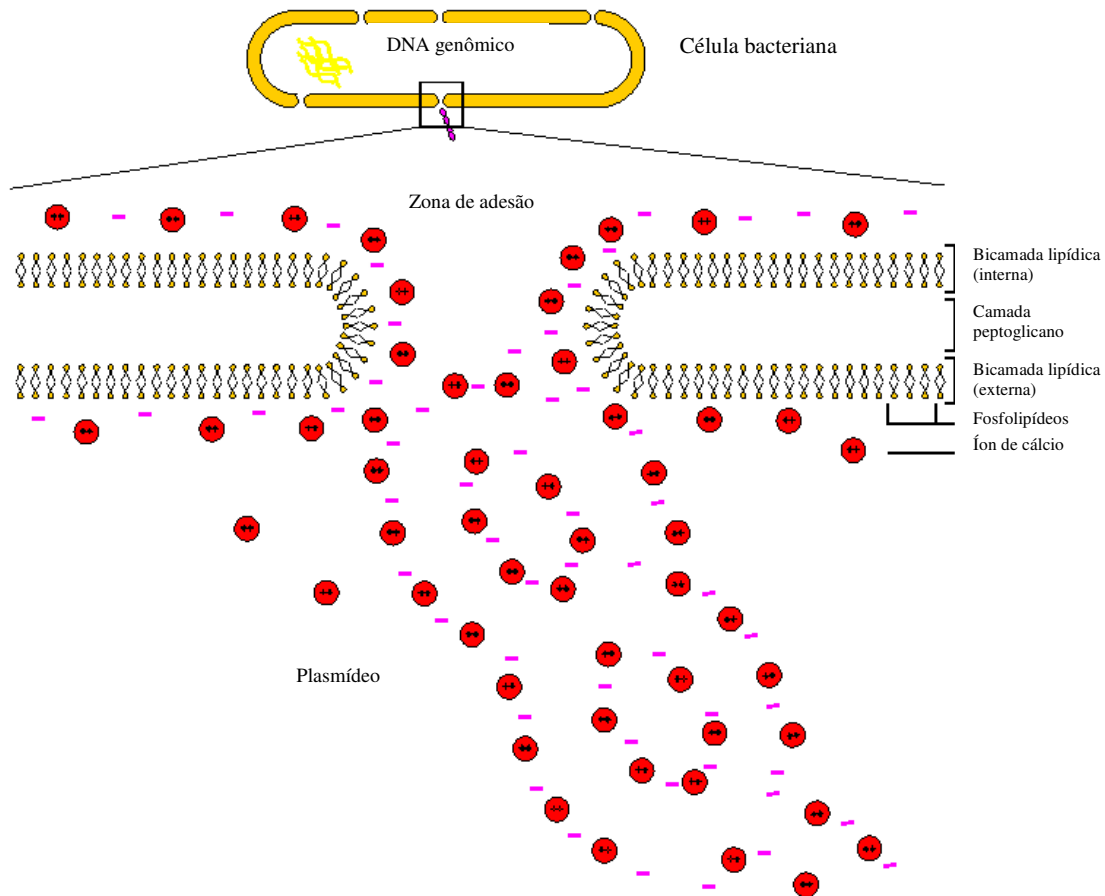


FIGURA 5: Mecanismo molecular proposto para explicar a transformação da *Escherichia coli* com uma molécula de DNA exógeno (NASCIMENTO *et al.* 1999).

3.7. Escolha do microrganismo

A *Escherichia coli* foi o veículo utilizado por ser o microrganismo mais intensamente estudado e provavelmente a célula melhor conhecida de qualquer espécie, tendo o mapa cromossômico definido e bem caracterizado (LEHNINGER, 1990). As células hospedeiras de *Escherichia coli* DH5- α podem tornar-se facilmente competentes, isto é, apresentar permeabilidade a plasmídeos em determinadas condições para a obtenção da GFPuv. A

Escherichia coli é sensível a temperaturas superiores a 45 °C, porém a GFP apresenta fluorescência mesmo quando exposta a temperaturas de até 70 °C. A GFPuv expressa duas a três vezes mais rápido em cepas de *Escherichia coli* do que a forma selvagem (CHALFIE *et al.*, 1994; CRAMERI *et al.*, 1996 e PHILIPS, 1998).

3.8. Expressão e isolamento da GFPuv

A GFPuv expressa no citoplasma de cepas de *Escherichia coli* (DH5- α , JM109 e TB1) pode ser liberada das células por digestão enzimática (lisozima), lise química (*t*-butanol, etanol) ou permeação física (método de congelamento, descongelamento e sonicação) (SAMBROOK *et al.*, 1989; JOHNSON & HECHT, 1994 e YAKHNIN *et al.*, 1998). Células bacterianas podem ser permeadas mecanicamente por ciclos sucessivos de congelamento lento, descongelamento e sonicação (VESSONI PENNA *et al.*, 2002). O tamanho dos cristais de gelo formados depende da velocidade do abaixamento da temperatura. Em congelamento lento há a formação de núcleos de cristalização em número reduzido, porém cristais maiores e irregulares se formam. No descongelamento as arestas dos cristais de gelo perfuram a parede celular, promovendo o aparecimento de poros e conseqüente extravasamento seletivo do conteúdo intracelular (PRISTA *et al.*, 1975). A aplicação do ultra-som produz o fenômeno da cavitação.

Pela permeação seletiva, proteínas de baixa massa molar são liberadas misturadas a ácidos nucléicos e fragmentos celulares facilitando a posterior recuperação e purificação da proteína (NAGLAK *et al.*, 1990).

O congelamento e descongelamento usualmente precedem outros procedimentos de ruptura simplificando a operação de *downstream*, quando em operação de larga escala reduz o custo total de recuperação (WHEELWRIGHT, 1994). Embora o congelamento e descongelamento sejam processos mais lentos do que outros e possibilitam a permeação de proteínas solúveis com um conteúdo de GFPuv variável, este processo previne a ruptura total da célula e a liberação do material citoplasmático de elevada massa molar que torna o meio viscoso, dificultando a extração de proteínas maiores que 60 kDa (JOHNSON &

HECHT, 1994; NAGLAK *et al.*, 1990; WHEELWRIGHT, 1994 e ENDOW & PISTON, 1998).

3.9. Extração e purificação da proteína

O processo de purificação pode ser interpretado como sendo o conjunto de operações que sucedem a etapa de cultivo microbiano utilizando-se de técnicas apropriadas (BELTER *et al.*, 1988). O objetivo global não é apenas a remoção de contaminantes, mas também a concentração da proteína de interesse, e, a sua transferência para o meio onde a estabilidade encontra-se assegurada e a proteína esteja pronta para o uso (QUEIROZ *et al.*, 2001).

3.9.1. Extração por partição em três fases

A extração direta por partição em três fases (TPP – *Three Phase Partioning*) é utilizada para isolar, concentrar e/ou purificar proteínas e enzimas (DENNISON & LOVRIEN, 1997; DENNISON *et al.*, 2000; SHARMA & GUPTA, 2001a; SHARMA & GUPTA, 2001b e YAKHNIN *et al.*, 1998). O método de TPP combina vários princípios de extração, quais sejam: precipitação salina (*salting-out*) convencional, precipitação isoelétrica (atração eletrostática das proteínas próximo ao valor de pI, apresentando solubilidade mínima, BELL *et al.*, 1983); precipitação por co-solvente (precipitação das proteínas por diminuição da constante dielétrica da solução, CONN, 1980); pressão osmótica (fluxo da proteína para regiões de menor concentração, LEHNINGER, 1990) e cosmotropia (estabilização da estrutura molecular das proteínas, SHARMA & GUPTA, 2001a).

O *t*-butanol, que é miscível na água, quando adicionado à solução aquosa concentrada em sulfato de amônio (cerca de 50%), particiona a mistura em duas fases, fase superior *t*-butanol e a fase inferior aquosa. O *t*-butanol se liga às proteínas presentes na solução aquosa, precipitando-as na interface entre a fase inferior aquosa e a fase superior de *t*-butanol (DENNISON & LOVRIEN, 1997). A relação entre *t*-butanol e sulfato de amônio deve ser apropriada para que haja sinergismo entre os dois reagentes na precipitação das proteínas (SHARMA & GUPTA, 2001a). YAKHNIN *et al.* (1998) observaram que solução de sulfato de amônio a 2 M, aproximadamente 50%

de saturação (concentração mínima), proporcionou a melhor recuperação da GFPuv.

A metodologia de TPP descrita por DENNISON & LOVRIENT (1997) está relacionada com o *salting-out* convencional, não simplesmente porque usam o mesmo sal, sulfato de amônio, mas porque a TPP e o *salting-out* têm origens comuns. O efeito sinérgico do *t*-butanol e sulfato de amônio promovem a precipitação cosmotrópica das proteínas, estabilizando a estrutura molecular das mesmas (SHARMA & GUPTA, 2001a e DENNISON & LOVRIENT, 2000). A maioria das proteínas é insolúvel em água pura mas dissolve-se em soluções diluídas de sais (*salting-in*). Entretanto, a elevação da concentração salina pela adição de grande quantidade de sais neutros a uma solução aquosa de proteínas causa a precipitação dessas últimas (Figura 6). Este fenômeno é chamado de precipitação salina (*salting-out*) (LEHNINGER, 1990). A maioria das proteínas é solúvel em sulfato de amônio a 1 M, porém, quando a concentração de sulfato de amônio é aumentada para 3 M elas tornam-se insolúveis e precipitam. Quando o excesso de sulfato de amônio é removido por diálise as proteínas voltam a dissolver-se (SCOPES, 1994).

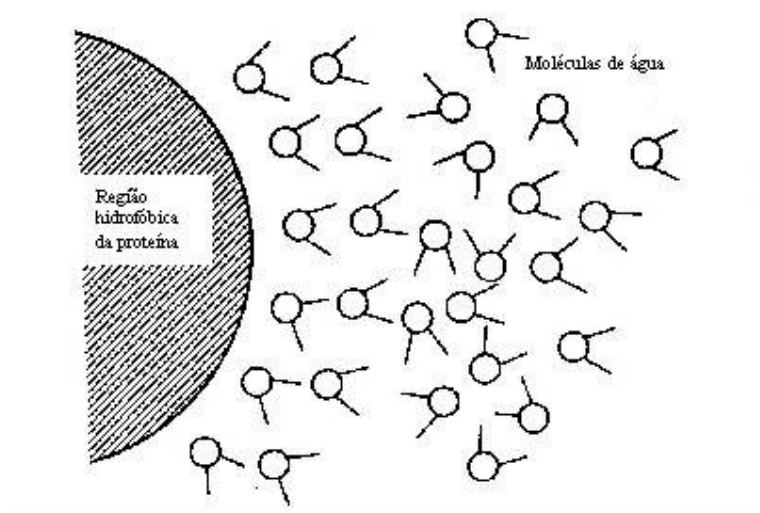


FIGURA 6: Ordenação das moléculas de água ao redor dos resíduos na superfície das proteínas (SCOPES, 1994).

3.9.2. Cromatografia de interação hidrofóbica

Hidrofobicidade da proteína e interação hidrofóbica: a hidrofobicidade é a repulsão entre o componente apolar e um meio polar. A interação hidrofóbica tem grande vantagem no sistema biológico. Esta é a força dominante na estabilização da estrutura biológica da proteína (PRIVALOV & GILL, 1988; MURPHY *et al.*, 1990; MAKHATAFZE & PRIVALOV, 1995) e tem importante papel em outros processos biológicos como reação antígeno-anticorpo (DANDLIKER *et al.*, 1967; VAN OSS *et al.*, 1986), reação substrato-enzima e na manutenção da estrutura da bicamada lipídica da membrana biológica (TANFORD, 1973). Não obstante o fato do núcleo ser hidrofóbico, considera-se um importante fator a determinação da estrutura nativa na proteína, pois KLOTZ, (1970); HOFSTEE, (1975) e MEIROVITCH & SCHERAGA, (1980) mostraram que aminoácidos apolares (fenilalanina, triptofano e valina) estão freqüentemente presentes na superfície de proteínas como a lisozima ou albumina sérica. O grau de hidrofobicidade da proteína depende da soma de componentes hidrofóbicos expostos e escondidos na estrutura. A GFPuv possui muitos aminoácidos hidrofóbicos, resultando em uma proteína de elevada hidrofobicidade (www.bio-rad.com).

Apesar de haverem muitas técnicas de purificação de proteínas, atualmente têm-se utilizado diferentes tipos de cromatografia pelo alto poder de resolução da mesma. A escolha do tipo de cromatografia depende das características biológica e físico-química da proteína: tamanho da molécula (cromatografia de filtração em gel), carga elétrica (cromatografia de troca iônica), características de bioespecificidade (cromatografia por afinidade) e hidrofobicidade (cromatografia de interação hidrofóbica - HIC) (QUEIROZ *et al.*, 2001). A HIC possui vantagens em relação a outros tipos de cromatografia pela hidrofobicidade das proteínas promovendo a separação por meio da interação hidrofóbica entre a região hidrofóbica imóvel do ligante e a região apolar da superfície da proteína. Quanto mais hidrofóbica for a proteína, mais ligada à coluna ela permanecerá. Com a diminuição da concentração de sal das soluções, a estrutura tri-dimensional da proteína é alterada, as regiões hidrofóbicas se movem para a parte interior, e as regiões hidrofílicas se movem para a parte exterior, enquanto que em soluções de elevada concentração de

sal as regiões hidrofóbicas se encontram na parte externa das moléculas. HIC utiliza-se da propriedade hidrofóbica da proteína em meio polar, sem causar a desnaturação da mesma. O desenvolvimento de grande variedade de fases estacionárias para HIC tem proporcionado o aumento da aplicação desta cromatografia na purificação de biomoléculas como: proteínas séricas, proteínas nucleares, hormônios, proteínas recombinantes e enzimas (COMMINGS *et al.*, 1979; HRKAL & REJNKOVÁ, 1982; LEFORT e FERRARA, 1986; ANGELOVA *et al.*, 1997; QUEIROZ *et al.*, 1999).

A diferença do sal influencia na interação hidrofóbica segundo a série de Hofmeister (liotrópica, Figura 7) para a precipitação de proteínas em solução aquosa. Os sais do início da série promovem interações hidrofóbicas e precipitação de proteínas, e são denominados de cosmotrópicos (PÅHLMAN *et al.*, 1977; ROE, 1989).

fosfato>sulfato>acetato>cloreto>brometo>nitrato>perclorato>iodeto>tiocianato

FIGURA 7: Série de Hofmeister (série liotrópica) para a precipitação de proteínas em solução aquosa. Os sais estão dispostos de acordo com a maior ou menor capacidade de promover interação hidrofóbica e precipitação de proteínas.

A fase estacionária e a fase móvel fluida na coluna têm fundamental importância na eficácia da cromatografia. Os ligantes largamente utilizados na constituição da coluna cromatográfica de interação hidrofóbica diferem no tipo, no comprimento da cadeia e na densidade do ligante, como também no tipo de matriz. Os ligantes de baixa interação hidrofóbica utilizados na HIC são formados por alcano de cadeia linear com ou sem o grupo amino terminal. Fenila (e outros grupos aromáticos) é empregado como ligante com bons resultados devido à mistura das interações hidrofóbica e aromática. O tipo de *n*-alcano na matriz origina uma série homóloga na escala de hidrofobicidade, Figura 8 (TANFORD, 1972).

metila < etila < propila < butila < pentila < hexila < heptila < octila

FIGURA 8: Série crescente de hidrofobicidade de bases de ligantes utilizados em cromatografia de interação hidrofóbica.

A hidrofobicidade e a força de interação aumentam com o aumento na cadeia *n*-alcano, mas a adsorção seletiva pode decrescer. As características da fase móvel fluida que interferem nos resultados da cromatografia são: o tipo e a concentração do sal, o pH, a temperatura e os aditivos. O efeito da concentração do sal na retenção da proteína segue a ordem dos sais na série liotrópica descrita anteriormente (MELANDER e HORVÁTH, 1977; MELANDER *et al.*, 1984). Sais como sódio, potássio ou sulfato de amônio são os mais efetivos para promover a interação ligante-proteína, devido ao efeito da precipitação salina ou aumento da tensão superficial molar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Meios de cultura sólidos

4.1.1. Agar LB

Caldo LB (Luria Bertani – USD/México) acrescido de 1,5% de Agar bacteriológico (Isofar/Brasil).

4.1.2. Agar LB/ampicilina

Agar LB acrescido de 100 µg/mL de ampicilina (Boehringer, Alemanha). Adicionar a ampicilina no meio previamente estéril à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

4.1.3. Agar LB/ampicilina/IPTG

Agar LB/ampicilina acrescido de IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside) na concentração final de 0,1 mM. Adicionar o IPTG no meio contendo a ampicilina.

4.2. Meios de cultura líquidos

4.2.1. Caldo LB

Caldo Luria Bertani (USD/México)

4.2.2. Meio SOC

Composição: 2,0 g de triptona bacteriológica, 0,5 g de extrato de levedura bacteriológica, 0,05 g de NaCl e água deionizada q.s.p. 100 mL.

Dissolver os solutos em 90 mL de água deionizada. Adicionar 1 mL de solução 250 mM de KCl (1,86 g de KCl dissolvidos em 100 mL de água deionizada). Ajustar o pH para 7,0 com solução NaOH a 5 N. Completar o volume para 100 mL com água deionizada. Autoclavar à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Esfriar o meio até 60 °C e acrescentar 2 mL de glicose 1 M (concentração final 20 mM). A solução de glicose é preparada dissolvendo-se 18 g em 100 mL de água deionizada estéril (SAMBROOK, 1989).

4.2.3. Caldo LB/ampicilina

Caldo LB acrescido de 100 µg/mL de ampicilina (Boehringer, Alemanha). Adicionar a ampicilina no meio previamente estéril à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

4.3. Soluções

4.3.1. Solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) a 0,1 M

Diluir a solução estoque (19,469 g de CaCl₂ em 100 mL de água deionizada, estocar alíquotas de 1 mL a -20 °C), 1 mL, em 10 mL de água deionizada estéril utilizando balão volumétrico.

4.3.2. Tampão de extração (TE)

Tris-HCl 25 mM pH 8,0 acrescido de 1 mM β-mercaptoetanol (β-ME/ Pharmacia Biotech, Suécia) e 0,1 mM PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila/ USB, Suíça).

4.3.3. Tampão da amostra (2 vezes concentrado)

Composição: 2,5 mL de Tris-HCl 0,05 M pH 6,8; 2,0 mL de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 10%; 0,2 mL de β-mercaptoetanol a 2%; 2,0 g de sacarose 2,0 g e água deionizada q.s.p. 10 mL.

Dissolver a sacarose em 3,0 mL de água e tampão, acrescentar o SDS e o β-mercaptoetanol, completar o volume. Adicionar 0,1 mL de azul de bromofenol a 0,1%.

4.3.4. Tampão de corrida

Composição: 3,08 g de Tris (base); 14,4 g de glicina; 1,0 g de SDS e água deionizada q.s.p. 1000 mL.

4.4. Microrganismo e condições de crescimento

O microrganismo utilizado foi a *Escherichia coli* DH5-α, adquirido da Life Technologies, USA. As células foram cultivadas em caldo LB (item 4.2.1),

incubadas em estufa DBO (modelo 347, Fanem, Brasil) a 37 °C por 24 horas. Após o cultivo alíquotas de 500 µL da suspensão foram distribuídas em micro tubos (Eppendorf com capacidade para 1,5 mL), acrescidas de crioprotetor, glicerol (Sigma Chemical Co., USA), na proporção de 1:1, e estocados a (- 70 °C) (Ultrafreezer Series 100 – Kelvinator, USA).

Para a obtenção dos parâmetros de crescimento em agitador metabólico (100 rpm/ 37 °C) das células transformadas de *E. coli* DH5- α , foi realizado o acompanhamento da absorvância ($DO_{660\text{ nm}}$) e plaqueamento em profundidade em Agar LB/ampicilina (item 4.1.2), retirando-se uma alíquota da suspensão a cada 30 minutos, no período entre 90 e 420 minutos.

4.5. Obtenção de células de *Escherichia coli* DH5- α competentes utilizando-se da técnica do cloreto de cálcio

Para a obtenção de células competentes, uma alçada da cepa estoque congelada a (- 70 °C) de *Escherichia coli* DH5- α foi repicada na superfície de placas de Petri contendo ágar LB (item 4.1.1) e colocadas em estufa incubadora DBO a 37 °C por 12 horas. Uma colônia pequena (1-2 mm de diâmetro) foi selecionada e inoculada em 150 mL de caldo LB (item 4.2.1), permanecendo em agitador metabólico (modelo TE- 420, Tecnal, Brasil) a 37 °C com agitação de 250 rpm durante 5 horas. Segundo SAMBROOK *et al.* (1989), para uma transformação eficiente é fundamental que o número de células viáveis não ultrapasse 10^8 UFC/ mL, isto sendo monitorado através da densidade ótica ($DO_{660\text{ nm}} = 0,8$), que apresenta estreita relação com o número de células.

Após este crescimento a cultura foi resfriada a 10 °C, em refrigerador, durante aproximadamente 15 minutos. Alíquotas de 50 mL foram transferidas para tubos de centrífuga com capacidade para 50 mL (Corning, USA) previamente resfriados e mantidos em banho de gelo por 10 minutos. Após foram submetidos à centrifugação (1000 g /10 minutos/ 4 °C) sob refrigeração (marca Jouan, modelo BR4i, França). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi cuidadosamente ressuspenso em 10 mL de solução resfriada de CaCl_2 a 0,1 M (item 4.3.1). Os tubos permaneceram em banho de gelo por 30 minutos, quando foram centrifugados (1000 g/ 10 minutos/ 4 °C). O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se delicadamente em cada tubo,

homogeneizando com o auxílio de uma pipeta, 2 mL de solução gelada de CaCl_2 a 0,1 M (item 4.3.1). Nesta etapa as células tornaram-se competentes sendo estocadas a ($-70\text{ }^\circ\text{C}$) acrescidas de crioprotetor (glicerol, 1:1).

4.6. Transformação das células de *Escherichia coli* com plasmídeo pGFPuv

Alíquotas de 200 μL das células competentes foram colocados em micro tubos (capacidade para 1,5 mL) previamente gelados, adicionados de 50 ng do plasmídeo pGFPuv, contido em um volume que não ultrapassasse 10 μL para cada tubo, e mantidos em banho de gelo por 30 minutos. Decorrido este período foram colocados em banho-maria (Unitemp[®] com controlador de temperatura constante, marca Fanem, Brasil) a $42\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 minutos e transferidos rapidamente, sem agitação dos tubos, para banho de gelo por mais 2 minutos. Foram adicionados em cada tubo 800 μL de meio SOC (item 4.2.2) e incubados em agitador metabólico a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos sem agitação e 1 hora com agitação de 200 rpm; nesta etapa a agitação não deve ser vigorosa para a obtenção de alto rendimento da cultura.

Placas de Petri com ágar LB/ampicilina (item 4.1.2) foram inoculadas na superfície com 150 μL da suspensão de bactérias, espalhado com o auxílio de alça de Drigalski estéril, e incubadas em estufa incubadora para DBO a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 16 horas.

A suspensão de células recombinadas a ser inoculada na placa deve apresentar baixa densidade e não deve ser incubada por mais de 20 horas a $37\text{ }^\circ\text{C}$. A β -lactamase, secretada no meio a partir das células recombinadas resistentes a ampicilina, rapidamente inativa o antibiótico na região ao redor das colônias. Deste modo, se inocular uma suspensão com alta densidade ou incubar por longo período o resultado será uma aparência de colônias satélites sensíveis a ampicilina (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Micro tubos contendo 1 mL de caldo LB acrescido de ampicilina foram inoculados com 1 colônia de células desta placa, incubados a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 16 horas. Após este período acrescentou-se 1 mL de crioprotetor (glicerol, 1:1), conservando-os a ($-70\text{ }^\circ\text{C}$). Para confirmar a fluorescência, antes deste congelamento, uma colônia desta placa foi selecionada e repicada em placa de

Petri com ágar LB/ampicilina/IPTG (item 4.1.3), incubada a 37 °C por 16 horas e observada sob luz ultravioleta ($\lambda = 395 \text{ nm}$).

4.7. Expressão da GFPuv

Uma cultura de *E. coli* (37 °C/ 24 h) em caldo LB/ampicilina (item 4.2.3) foi transferida para a superfície de placas de Petri contendo agar LB/ampicilina/ IPTG (item 4.1.3), e incubada (37 °C/ 24 h). Com o auxílio de lâmpada UV ($\lambda = 395 \text{ nm}$) quatro colônias fluorescentes brilhantes (Figura 9) foram selecionadas e transferidas, uma para cada tubo de ensaio contendo caldo LB/ampicilina (item 4.2.3) e incubadas (37 °C/ 24 h).

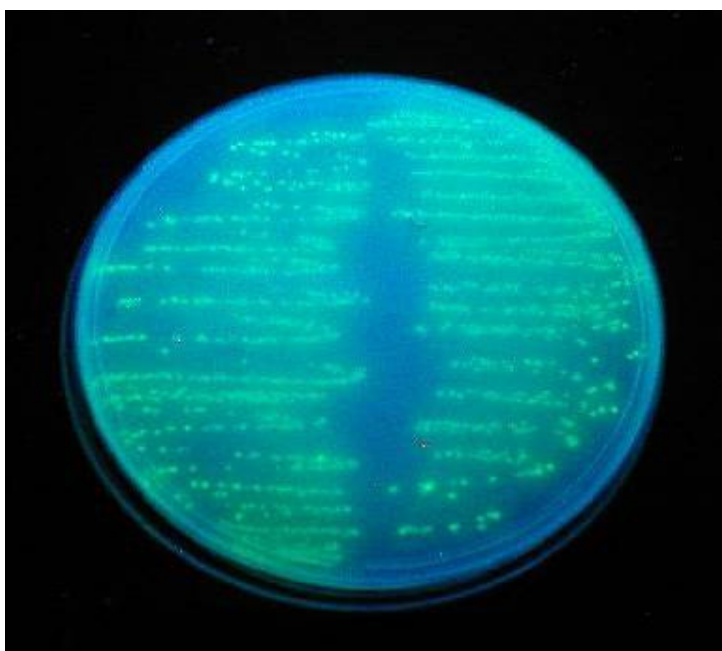


FIGURA 9: Placa de Petri contendo agar LB/ampicilina/IPTG com colônias de *Escherichia coli* transformadas com o plasmídeo pGFPuv, fluorescentes sob luz UV.

Estas suspensões foram colocadas em 200 mL de caldo LB/ampicilina (item 4.2.3), homogeneizada, dividida em quatro alíquotas (cultura celular 1, 2, 3 e 4) de 50 mL, foram transferidas para frasco Erlenmeyer com capacidade para 250 mL, e incubadas em agitador metabólico (100 rpm/ 37 °C/ 3 h). Decorrido este período acrescentou-se IPTG (concentração 0,5 mM) e permaneceu sob agitação nas mesmas condições por mais 21 horas. A partir

desta etapa a proteína verde expressou a fluorescência, tendo sido observada durante o processo sob a luz UV (Figura 10).

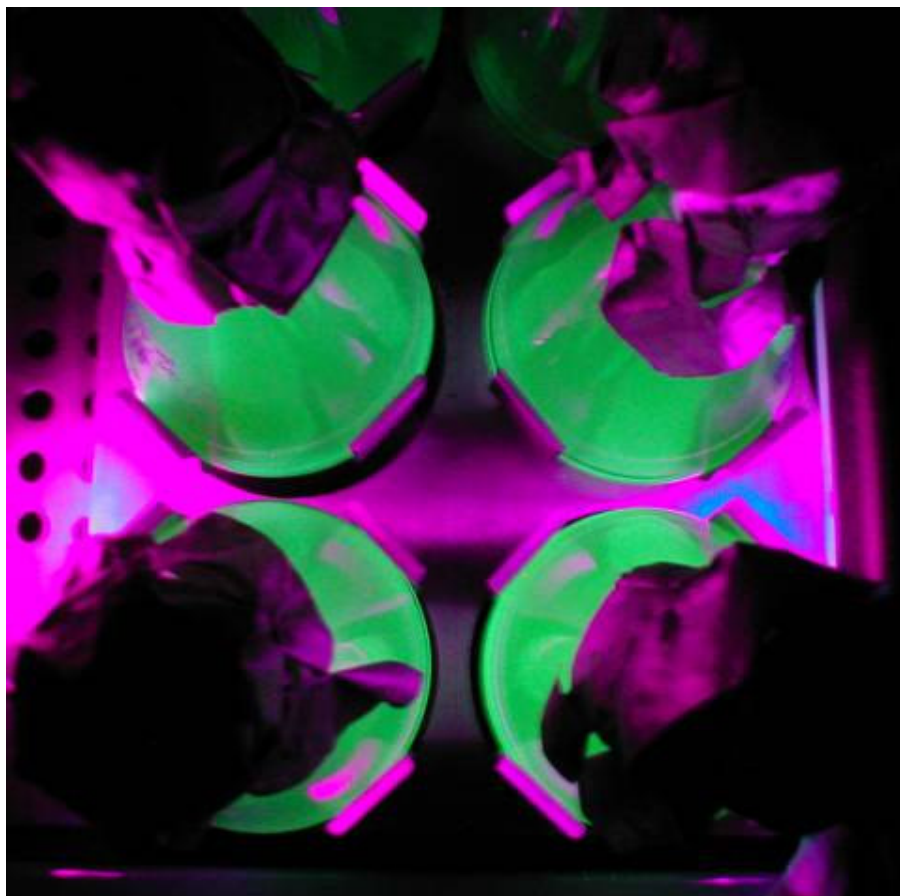
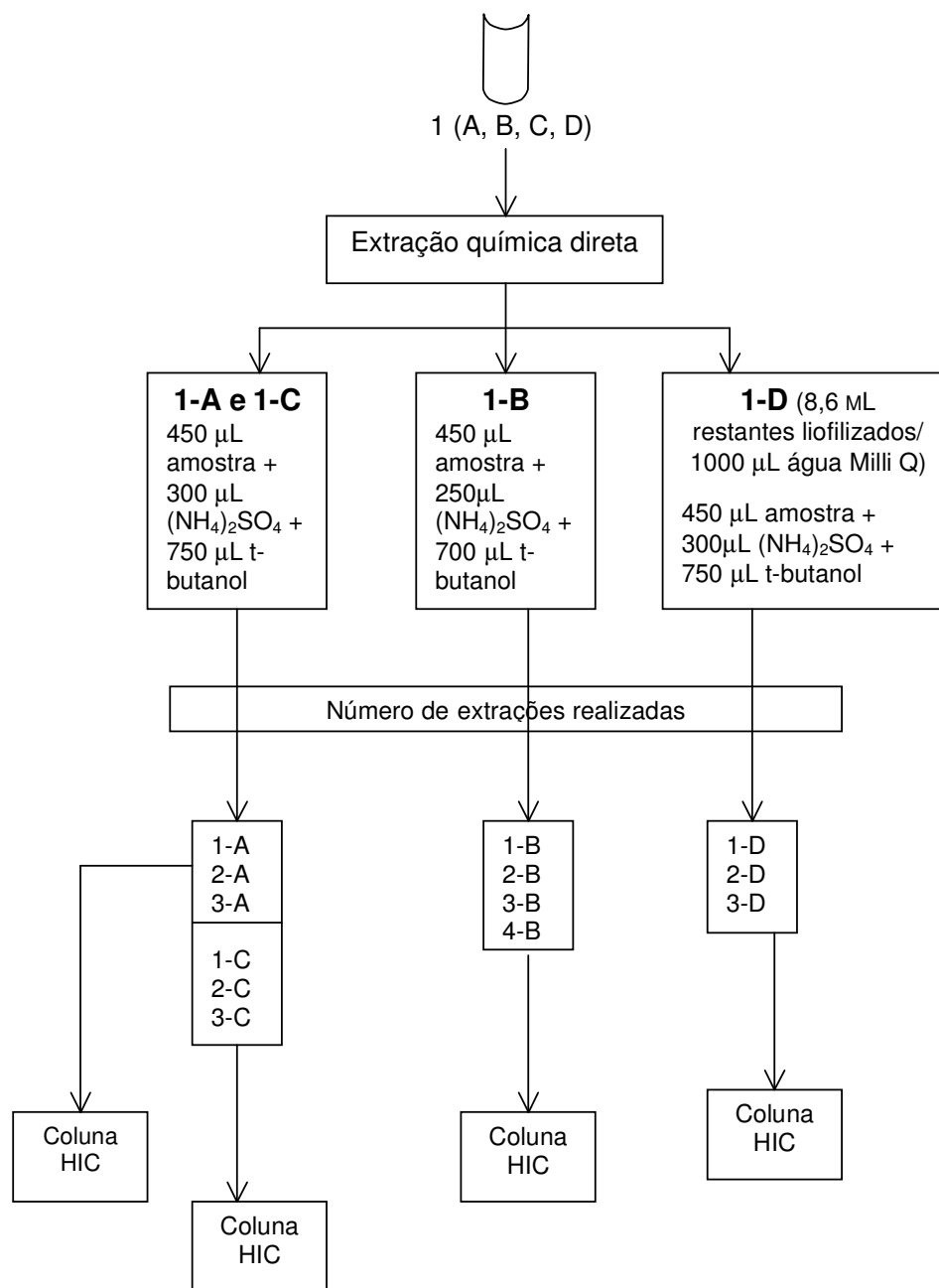
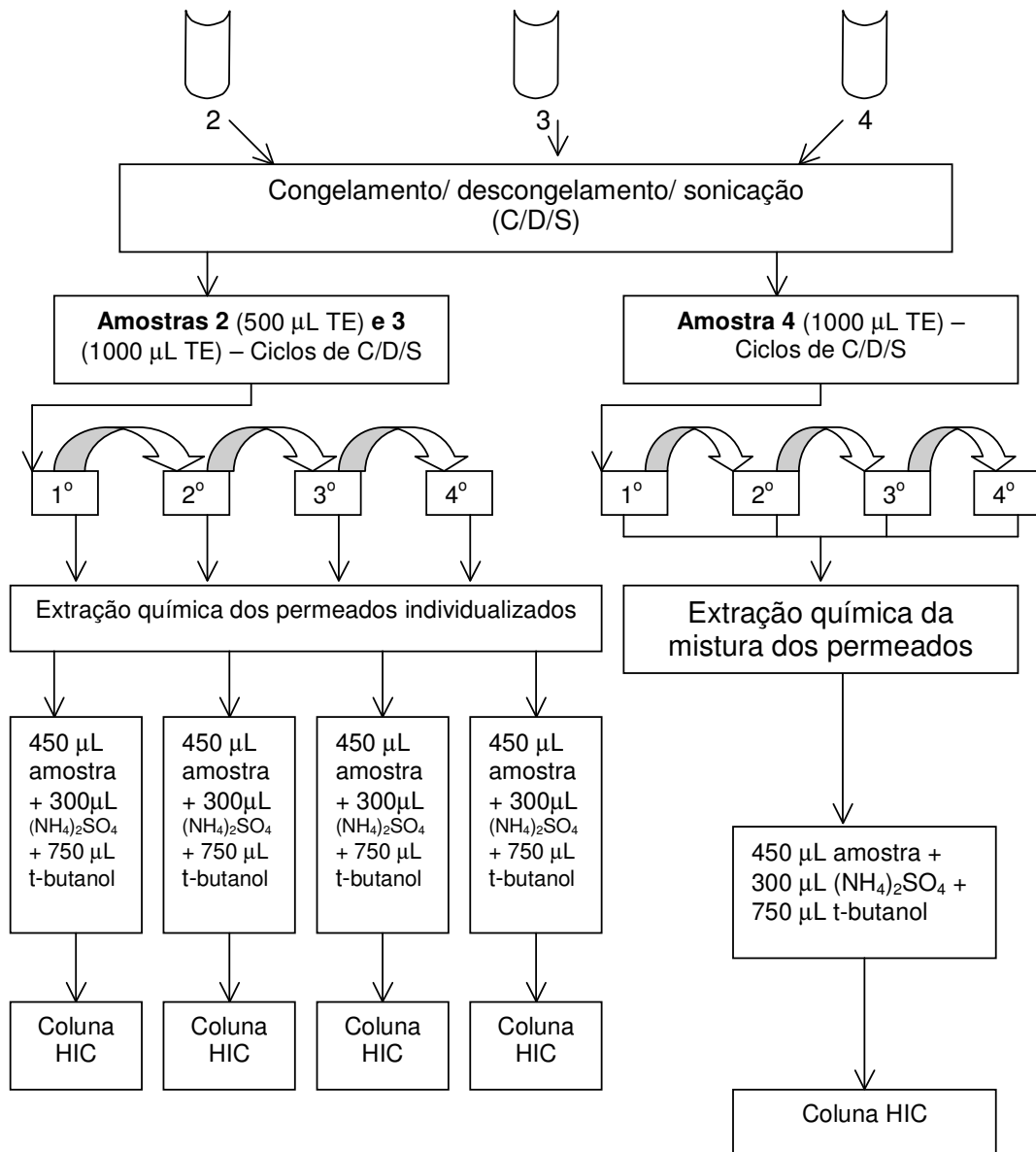


FIGURA 10: Suspensões de células de *Escherichia coli* transformadas com o plasmídeo pGFPuv, cultivadas em caldo LB/ampicilina/IPTG, observadas sob a luz UV após incubação em agitador metabólico (100 rpm/37 °C/24 h).

4.8. Fluxograma do processo de extração química e purificação da proteína verde fluorescente (GFPuv)



4.9. Fluxograma do processo de extração (permeação seletiva associada a extração química) e purificação da proteína verde fluorescente (GFPuv)



4.10. Obtenção dos sedimentos de células

Para a obtenção das culturas de células as suspensões foram transferidas para tubos de centrifuga e submetidas a 1000 g/ 30 minutos/ 4 °C. Os sobrenadantes foram desprezados e cada sedimento foi ressuspenso em 10 mL de tampão (Tris-HCl 10 mM pH 8,0), novamente centrifugados (1000 g/ 30 minutos/ 4 °C), e observados sob a luz UV. Os sedimentos apresentaram intensa fluorescência (Figura 11).

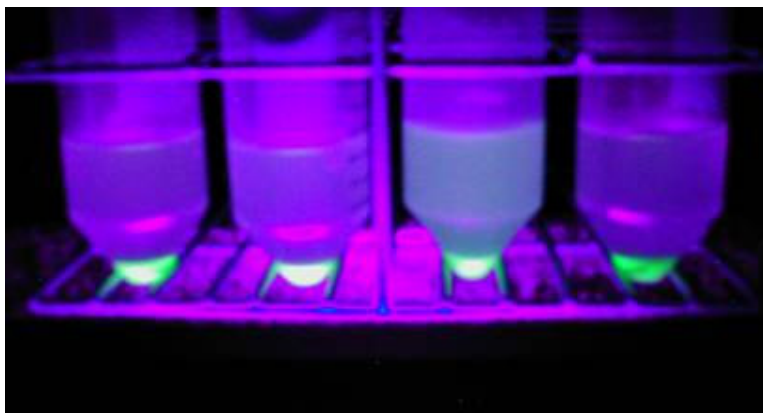


FIGURA 11: Sedimentos de células de *Escherichia coli* transformadas, cultivadas em caldo LB/ampicilina/IPTG, observados à luz UV após centrifugação (1000 g/30 minutos/ 4°C).

Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos submetidos aos tratamentos de extração direta por partição em três fases (cultura 1) e permeação seletiva (culturas 2, 3 e 4). Antes dos tratamentos foi feita lâmina dos sedimentos para observação na microscopia sob fluorescência (microscópio Olympus BX-60 System Attachment Model BX-FLA Filtro U-MWB, USA), onde as células expressaram a GFPuv (Figura 12), sendo possível observar os contornos bem definidos das mesmas.



FIGURA 12: Célula de *Escherichia coli* expressando GFPuv, observada ao microscópio sob fluorescência (2000 x) após cultivo em agitador metabólico.

4.11. Extração da GFPuv

4.11.1. Permeação seletiva das células

Permeação seletiva por congelamento (-20 °C) lento (0,83 °C/ min)/ descongelamento (20 °C)/ sonicação (3 pulsos/ 6 segundos/ 25 de amplitude) – CDS. Este procedimento foi realizado na câmara de congelamento (Dura Stop™ MP) do liofilizador LTF Systems™ (USA). Termopares (modelo PT-100) foram introduzidos nas amostras, e as temperaturas de congelamento e descongelamento foram registradas a cada minuto em um programa específico (Lyphoware for Windows). Entre cada ciclo de congelamento e descongelamento as amostras foram submetidas a um processador ultrassônico Vibra Cell 100 W (Sonics & Materials, USA), provido de uma sonda de 3 mm que emitiu vibrações (25 de amplitude) em 3 pulsos com duração de 6 segundos e intervalo de 1 minuto, perfazendo um total de 23 segundos com as amostras submersas em banho de gelo.

O sedimento celular da cultura 2 (massa seca de 1,40 mg/mL) foi ressuspense em 500 µL de TE (item 4.3.2) e submetido a quatro ciclos (1º, 2º, 3º e 4º) alternados de CDS. Após cada ciclo o permeado foi separado por centrifugação (6000 g/ 30 minutos/ 4 °C). Os sedimentos celulares das culturas 03 (massa seca de 0,92 mg/mL) e 04 (massa seca de 1,44 mg/mL) foram ressuspensos em 1000 µL de TE (item 4.3.2) e submetidos a quatro ciclos alternados de CDS.

A fluorescência obtida nos permeados foi quantificada em espectrofluorímetro ($\lambda_{\text{excitação}}$ 394 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 509 nm/ Shimadzu RF-5301 PC, Japão) e as proteínas totais (usando como padrão a albumina de soro bovino – BSA) foram quantificadas em espectrofotômetro ($\lambda_{280 \text{ nm}}$ / Beckman DU-600, USA).

4.11.2. Partição em três fases (TPP – *Three Phase Partitioning*)

O princípio desta técnica de extração/ purificação de proteínas é realizado em duas etapas básicas a saber. Primeira – a amostra dissolvida em solução aquosa é adicionada sulfato de amônio (4 M – USB, USA) e *t*-butanol (Reagen, Brasil). A mistura é submetida a 1 minuto de agitação vigorosa em vórtice e centrifugação (6000 g/ 2 minutos/ temperatura ambiente) promovendo a separação de macromoléculas e fragmentos celulares, havendo a formação de uma interface densa e branca. Na segunda etapa a fase inferior aquosa formada na etapa anterior contendo a proteína de interesse, é coletada e adicionada de *t*-butanol sendo submetida à nova agitação em vórtice (1 minuto) e centrifugação (6000 g/ 2 minutos/ temperatura ambiente). No final deste procedimento há a formação de interface delgada fluorescente contendo a GFPuv. No entanto, enquanto a fase inferior apresentar fluorescência, novas extrações são realizadas.

O sedimento celular da cultura 1 (massa seca de 1,46 mg/mL) foi ressuspenso em 10 mL de TE (item 4.3.2). A cultura foi subdividida em quatro amostras de células sendo três alíquotas de 450 μ L (1-A, 1-B e 1-C) retiradas da suspensão de 10 mL, e, os 8,6 mL restantes foram liofilizados, ressuspenso em 1 mL de água deionizada e retirada uma alíquota de 450 μ L (1-D).

Objetivando obter o maior rendimento da GFPuv com esta metodologia, estudou-se a variação da concentração final do sulfato de amônio (1,4 e 1,6 M), Tabela 2.

TABELA 2: Concentrações de sulfato de amônio e *t*-butanol utilizados nos experimentos de extração química da GFPuv.

Amostra	Volume (μL) amostra	Volume (μL) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Volume (μL) <i>t</i> -butanol	Concentração final $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (M)
1-A	450	300	750	1,6
1-B	450	250	700	1,4
1-C	450	300	750	1,6
1-D	450	300	750	1,6

As interfaces brancas das amostras 1-A, 1-C e 1-D foram dissolvidas isoladamente em 450 μL de TE (item 4.3.2), adicionada de 300 μL de sulfato de amônio e 750 μL de *t*-butanol. Após agitação e centrifugação (6000 g/ 2 minutos/ temperatura ambiente), nova interface branca foi formada e desprezada por ser insolúvel em TE (item 4.3.2) (Figura 13). A fase inferior não apresentou fluorescência quando observada à luz UV. A fase inferior fluorescente (Figura 14) da primeira etapa da extração foi submetida à segunda etapa de extração havendo a formação de uma interface delgada bastante fluorescente (primeira extração). As interfaces fluorescentes foram redissolvidas em 450 μL de TE (item 4.3.2), a fluorescência quantificada em espectrofluorímetro ($\lambda_{\text{excitação}}$ 394 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 509 nm) e as proteínas totais (usando a curva padrão da albumina de soro bovino – BSA) foram quantificadas em espectrofotômetro ($\lambda_{280 \text{ nm}}$). As fases inferiores foram submetidas à segunda extração obtendo-se novas interfaces delgadas e fluorescentes que foram dissolvidas em 450 μL de TE (item 4.3.2). As fases inferiores ainda fluorescentes passaram pela terceira extração, havendo a formação da interface delgada fluorescente. Após a terceira extração as fases inferiores não apresentaram mais fluorescência à luz UV.

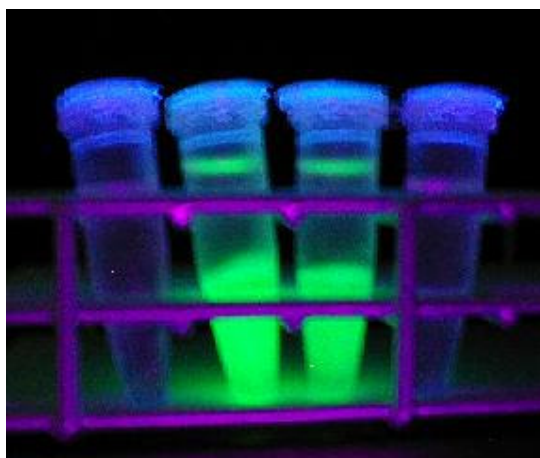
A interface branca da amostra 1-B foi dissolvida em 450 μL de TE (item 4.3.2), adicionada de 250 μL de sulfato de amônio e 700 μL de *t*-butanol. Após agitação em vórtice e centrifugação (6000 g/ 2 minutos/ temperatura ambiente), uma interface branca foi formada e apesar de apresentar intensa fluorescência foi desprezada por ser insolúvel em TE (item 4.3.2). A fase inferior foi extraída com 700 μL de *t*-butanol, havendo a formação de interface delgada bastante fluorescente (primeira extração). A fase inferior foi submetida novamente a

segunda extração por TPP. A extração com *t*-butanol foi realizada até que a fase inferior não apresentasse mais fluorescência à luz UV.



FIGURA 13: Interfaces brancas após a 1ª etapa de extração por TPP, formadas por macromoléculas e fragmentos celulares.

FIGURA 14: Fases inferiores e interfaces delgadas fluorescentes sob luz UV, após 2ª etapa de extração por TPP.



À permeação seletiva seguiu-se a extração por TPP. Os permeados das culturas celulares 2 e 3, foram individualmente submetidos à extração por TPP. A extração da cultura celular 4 foi realizada a partir da mistura dos quatro permeados. Para a extração da GFPuv das amostras 2, 3 e 4 utilizou-se sulfato de amônio na concentração final de 1,6 M.

4.12. Purificação por cromatografia de interação hidrofóbica (methyl HIC – *hydrophobic interaction chromatography*)

Foram utilizadas colunas cromatográficas de interação hidrofóbica de polipropileno, de 9,0 cm de altura, cônicas de 0,8 x 4,0 cm (Poly-Prep Columns, Bio-Rad, USA), com capacidade para 2,0 mL de leito empacotadas com a

matriz metila (Macro-Prep HIC *supports*, Bio-Rad, USA), e capacidade para 10 ml de eluente.

As colunas HIC tiveram a salinidade das matrizes equilibradas adicionando cuidadosamente 2 mL do tampão de equilíbrio (2 M sulfato de amônio), após ter escorrido todo o conteúdo líquido do leito. Metade do tampão adicionado foi eliminado da coluna, e as mesmas permaneceram em repouso por 16 horas com as duas extremidades tampadas (Figura 15). Decorrido este período, através do gotejamento todo o conteúdo líquido da coluna foi desprezado. As amostras de GFPuv (250 μ L) foram adicionadas de igual volume do tampão de ligação (4 M sulfato de amônio). A concentração de sal das amostras ficou igual à concentração de sal do leito das colunas, tornando possível à interação das regiões hidrofóbicas da GFPuv com as regiões hidrofóbicas da coluna.

O tampão de lavagem (1,3 M sulfato de amônio) foi adicionado nas colunas após deixar escorrer o volume adicionado anteriormente. Devido a menor salinidade do tampão, as proteínas de menor hidrofobicidade, ou hidrofílicas, presentes, passaram através da coluna HIC, permitindo a separação da GFPuv.

Para eluir a GFPuv 750 μ L de Tris-HCl/ EDTA 10 mM pH 8,0 foi adicionado na coluna. Com a diminuição da concentração de sal do tampão, as regiões hidrofílicas da GFPuv ficaram mais expostas na molécula promovendo maior afinidade da GFPuv com a solução, sendo eluída da coluna.

O percurso da proteína no leito da coluna pôde ser acompanhado por meio da luz UV, bem como a confirmação da eluição.

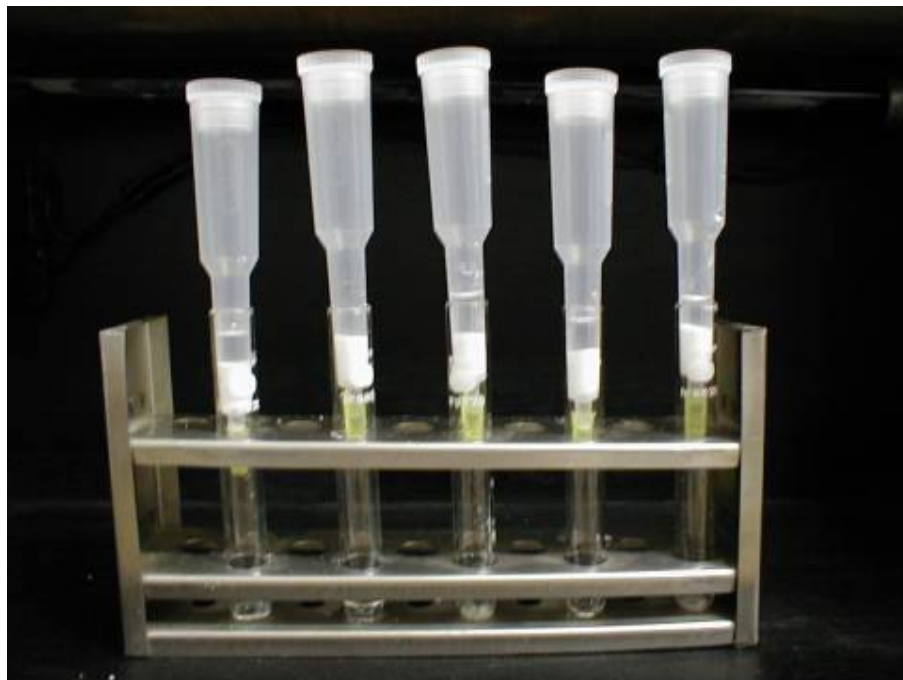


FIGURA 15: Colunas para cromatografia de interação hidrofóbica, preparadas com tampão de equilíbrio (sulfato de amônio 2M) para a eluição da GFPuv.

4.13. Quantificação da GFPuv (curva de calibração da GFPuv)

Teores de GFPuv permeada, extraída e purificada foram determinados indiretamente da curva de calibração relacionando concentrações conhecidas da GFPuv padrão e a intensidade de fluorescência respectiva (Tabela 3), medida no espectrofluorímetro ($\lambda_{\text{excitação}}$ 394 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 509 nm), Figura 16. A faixa de concentração de GFPuv utilizada para a determinação da curva de calibração foi entre 1,52 e 10 $\mu\text{g/mL}$, sendo as concentrações intermediárias de 2,44; 3,90 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$. As amostras foram diluídas em tampão 10 mM Tris-HCl pH 8,0. A equação da reta obtida foi: teor de GFPuv ($\mu\text{g/mL}$) = 0,8576 + 0,0256 x (intensidade de fluorescência), tendo $R^2 = 0,997$.

TABELA 3: Determinação da intensidade de fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}} 394 \text{ nm} / \lambda_{\text{emissão}} 509 \text{ nm}$) a partir de concentrações conhecidas da proteína verde fluorescente (GFPuv).

GFPuv ($\mu\text{g/mL}$)	Intensidade de fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}} 394 \text{ nm} / \lambda_{\text{emissão}} 509 \text{ nm}$)
1,52	33,612
2,44	59,593
3,90	115,505
6,25	203,460
10,00	361,355

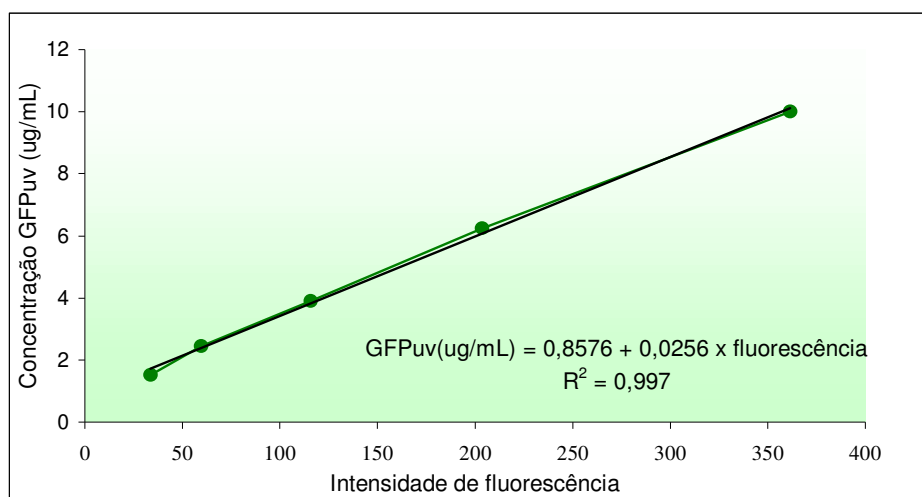


FIGURA 16: Curva padrão da GFPuv ($\lambda_{\text{excitação}} 394 \text{ nm} / \lambda_{\text{emissão}} 509 \text{ nm}$).

4.14. Quantificação das proteínas totais

A quantificação das proteínas totais obtidas da *E. coli* durante as várias etapas da permeação, extração e purificação foi realizada por meio da curva de calibração da BSA (Sigma Chemical Co., USA), em espectrofotômetro ($\lambda_{280 \text{ nm}}$), Figura 17.

A faixa de concentração protéica utilizada para a determinação da curva foi entre 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, sendo as concentrações intermediárias de 200, 300, 400, 600 e 800 $\mu\text{g/mL}$, Tabela 4. As amostras foram diluídas em solução tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,5. Tendo como equação resultante: proteínas totais ($\mu\text{g/mL}$) = $-26,863 + 1727,2 (A_{280 \text{ nm}})$, $R^2 = 0,994$.

Para verificar a pureza da proteína padrão utilizada preparou-se uma solução de BSA a 1000 $\mu\text{g/mL}$, onde pode-se verificar através da absorvância

em comprimento de onda de 280 nm valor aproximado a 0,615; havendo confirmação com a literatura.

TABELA 4: Determinação da absorvância ($\lambda_{280\text{ nm}}$) a partir de concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (BSA).

Proteína BSA ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância ($\lambda_{280\text{ nm}}$)
100	0,0939
200	0,1185
300	0,1823
400	0,2429
600	0,3561
800	0,4995
1000	0,5842

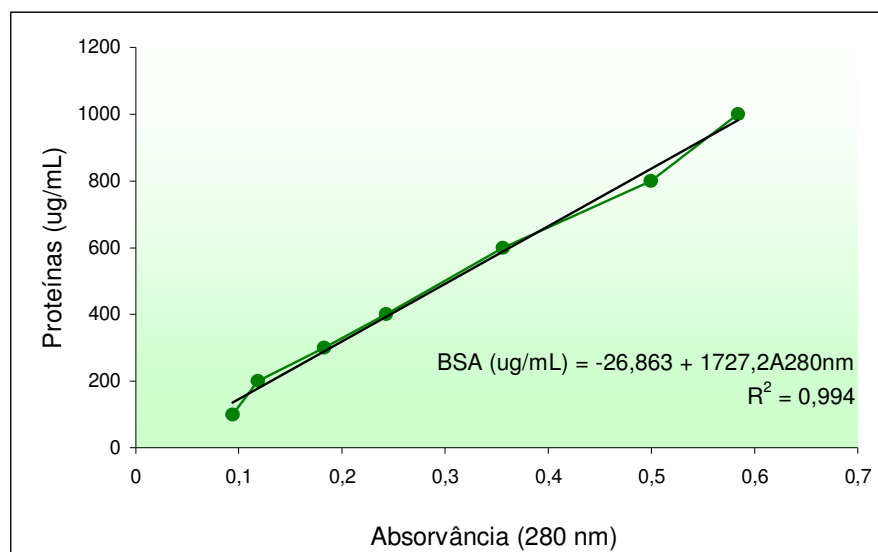


FIGURA 17: Curva padrão das proteínas totais relacionada a BSA ($\lambda_{280\text{ nm}}$).

4.15. Caracterização da GFPuv

4.15.1. Eletroforese

Preparou-se o gel de poliacrilamida a 12% a partir de uma solução concentrada de acrilamida a 30%, bisacrilamida 0,8%, Tri-HCl 1,5 M, persulfato de amônio 10% e TEMED, pronto para uso (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Após mistura dos reagentes, o gel ainda líquido foi colocado entre as placas de vidro para ocorrer a polimerização final. Este sistema foi colocado na cuba eletroforética vertical e preenchido com tampão de corrida (item 4.3.4).

As amostras da GFPuv permeada, extraída e purificada foram diluídas com o tampão da amostra (item 4.3.3) na proporção de 2:1. Após homogeneização, as amostras foram incubadas por 5 minutos em banho de água fervente. No gel polimerizado foram aplicados 10 μ L das amostras preparadas e 1 μ L do padrão de peso de 14.300 a 200.000 Da (*High range* da Gibco BRL[®] Products), diluído 1:5 em tampão da amostra (item 4.3.3). A corrida foi realizada a temperatura ambiente por 30 minutos em 50 V e 50 minutos em 200 V (SAMBROOK *et al.*, 1989). A coloração foi feita imergindo o gel em solução corante por 10 minutos, e depois em solução descorante por 2 dias, havendo a troca da solução a cada 24 horas, até que as bandas estivessem bem visíveis. O gel foi colocado entre folhas de celofane e deixado a temperatura ambiente para secar.

4.15.2. Espectros de excitação e de emissão da GFPuv padrão, extraída e purificada

Uma alíquota de GFPuv padrão (10 μ g em 100 μ L – Clontech[®]) foi diluída em 400 μ L de tampão 10mM Tris-HCl pH 8,0, transferida para cubeta de quartzo e submetida à varredura no espectro de excitação na faixa de comprimento de onda entre 300 e 450 nm ($\lambda_{\text{emissão}}$ fixado em 509 nm). A maior intensidade de fluorescência (44,433) foi obtida no comprimento de onda de 394 nm.

Para a pesquisa do espectro de emissão a amostra foi submetida à varredura na faixa de comprimento de onda entre 450 e 550 nm, e em função dos resultados obtidos na varredura do espectro de excitação fixou-se a excitação em 394 nm. A maior intensidade de fluorescência (44,320) foi obtida no comprimento de onda de 508,8 nm.

Uma alíquota da GFPuv extraída pelo método de permeação e posterior partição em três fases (concentração aproximada de 8,6801 μ g GFPuv/mL), e outra alíquota da amostra purificada na coluna HIC (concentração de 8,8409 μ g GFPuv/mL), foram colocadas no espectrofluorímetro e realizadas as varreduras para determinação do pico de emissão na faixa de comprimento de onda compreendida entre 450 e 550 nm ($\lambda_{\text{excitação}}$ 394 nm). Em ambas amostras o pico de emissão ficou próximo a 509 nm.

As mesmas amostras foram utilizadas para determinar o pico de excitação, tendo-se fixado o $\lambda_{\text{emissão}}$ em 509 nm. A faixa para a varredura foi fixada entre 300 e 450 nm. O pico de excitação em ambas amostras ficou próximo a 394 nm.

4.15.3. Estabilidade da GFPuv em diferentes valores de pH

Amostras de GFPuv extraída e purificada foram utilizadas para determinar a estabilidade da proteína em diferentes valores de pH. Os tampões utilizados foram: acetato (pH 3,4 a 5,6), fosfato (pH 5,8 a 7,0) e Tris (pH 7,2 a 9,8), preparados a partir da mistura das soluções: (i) 10 mM acetato de sódio e 10 mM ácido acético; (ii) 10 mM fosfato de potássio monobásico e 10 mM fosfato de potássio dibásico; (iii) 10 mM Tris e 10 N ácido clorídrico. O intervalo de pH entre 3,2 e 9,8, com variação aproximada de 0,2 foi escolhido para determinar o pI da GFPuv. O potenciômetro AR-20 (Fisher Scientific, USA) foi calibrado previamente com tampões padrões (Synth, Brasil) de valores de pH conhecidos: 4,0, 7,0 e 9,0.

Os tampões foram distribuídos em micro tubos identificados, adicionados da amostra de GFPuv em concentração aproximada de 5 $\mu\text{g/mL}$, concentração intermediária aquelas utilizadas para estabelecer a curva de calibração da GFPuv padrão. As amostras foram homogeneizadas em vórtice, mantidas sob refrigeração por 24 horas; e expostas à temperatura ambiente por 60 minutos. Os valores de pH foram novamente determinados, os micro tubos foram centrifugados a 6000 g/ 30 minutos/ temperatura ambiente. Em nenhuma amostra observou-se precipitação. As intensidades de fluorescência relativas a GFPuv foram obtidas em comprimentos de onda de excitação a 394 nm e de emissão a 509 nm, e convertidos para teores correspondentes, na equação da curva padrão.

Alíquotas da GFPuv padrão com concentração aproximada de 5 $\mu\text{g/mL}$ foram expostas aos tampões acetato (pH 4,0 e 5,0), fosfato (pH 5,5; 6,0 e 7,0) e Tris (pH 8,0) pelo período de 24 horas sob refrigeração. Após este período as amostras foram colocadas na temperatura ambiente por 60 minutos, os valores de pH foram medidos, e, em leitura no espectrofluorímetro os valores obtidos foram associados aos correspondentes teores de GFPuv padrão.

4.16. Tratamento matemático e estatístico

Os dados obtidos das três repetições dos experimentos realizados foram lançados em planilha eletrônica, *software* Microsoft® Excel versão 7.0, e realizados os cálculos de média aritmética dos três experimentos realizados, desvio padrão e intervalo de confiança (IC) de 95%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Crescimento das células de *Escherichia coli* DH5- α transformadas

Na Figura 18 está apresentada a curva de crescimento obtida no acompanhamento do crescimento em agitador metabólico das células transformadas de *Escherichia coli* DH5- α . Observa-se que aos 180 minutos de cultivo a suspensão atingiu absorvância próxima a 0,8 e concentração celular de $5,1 \times 10^8$ UFC/mL. Esta densidade celular, recomendada por SAMBROOK *et al.* (1989) para obtenção de uma expressão eficaz, representa o momento ideal para acrescentar o IPTG e obter bons rendimentos de expressão da GFPuv.

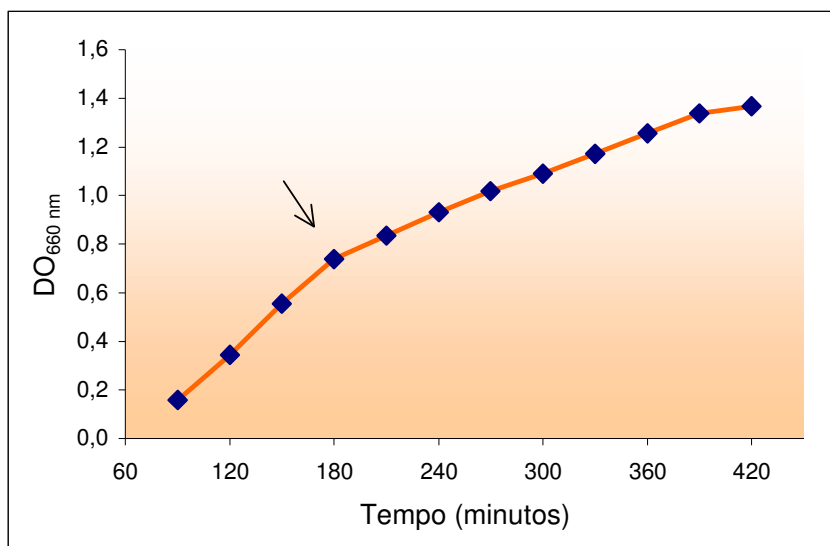


FIGURA 18: Concentração celular (DO_{660 nm}) de *Escherichia coli* DH5- α em função do tempo de cultivo em agitador metabólico (100 rpm/ 37 °C).

5.2. Isolamento da GFPuv das células de *Escherichia coli*

Na câmara de congelamento do liofilizador a temperatura da placa de congelamento decresceu até a temperatura de (-40 °C), e aumentou até 20 °C de forma linear. A temperatura das amostras decresceu linearmente até a

temperatura aproximada de (-13 °C), tendo havido neste ponto uma elevação abrupta da temperatura (-2 °C), e estabilização por aproximadamente 10 minutos com posterior abaixamento acentuado até atingir a temperatura estabelecida (-20 °C), conforme se observa na Figura 19. A elevação da temperatura ocorreu gradativamente com ligeira estabilização ao redor de (-3 °C).

Durante o processo de congelamento pôde-se observar o fenômeno de sobre-fusão; quando as amostras atingiram as temperaturas na faixa entre (-11 °C e -14 °C) houve um re-arranjo estrutural das moléculas com a liberação da energia latente (ainda presente no sistema para o meio), havendo elevação da temperatura até aproximadamente -2 °C. O ponto crioscópico da suspensão de células de *Escherichia coli* ficou demonstrado que está situado ao redor de (-3 °C), temperatura onde o grau de liberdade das moléculas de água da suspensão é igual a zero.

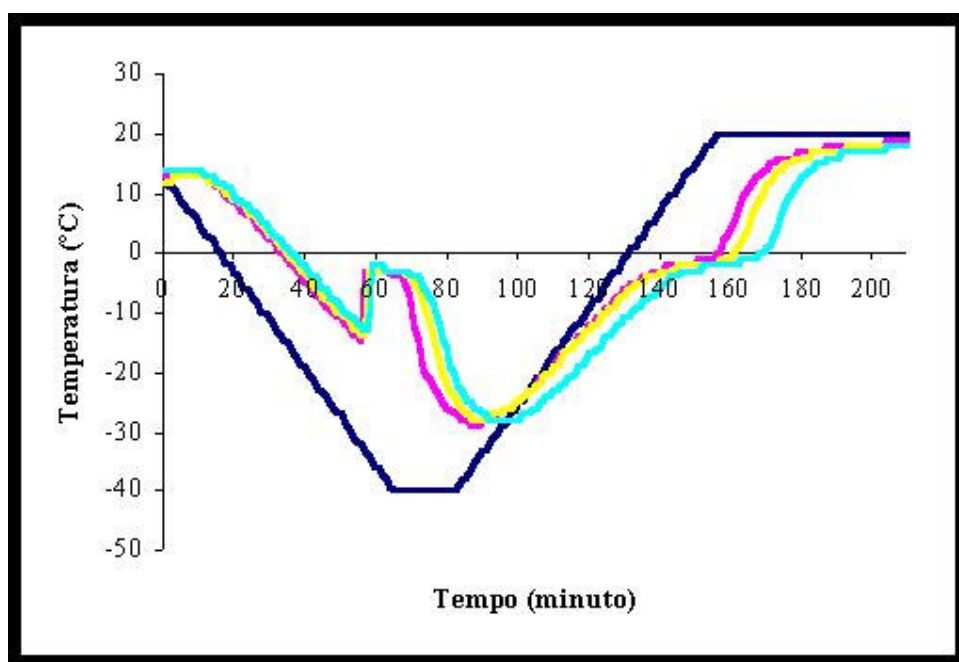


FIGURA 19: Ciclo de congelamento e descongelamento aplicados aos sedimentos das culturas de *Escherichia coli* para a permeação seletiva da GFPuv. Temperatura da placa de congelamento (—), temperatura das culturas 2, 3 e 4 (—, — e —), respectivamente.

5.3. Permeação seletiva das células

Dos sedimentos foi retirada uma alçada, colocada entre lâmina e lamínula para observação em microscopia sob fluorescência. Pela progressiva falta de definição da parede celular e pelo aumento da fluorescência do meio no decorrer da aplicação dos ciclos de CDS, observou-se que houve o aumento da liberação da GFPuv para o meio (Figura 20).

A *análise dos resultados* ocorreu a partir dos teores de GFPuv/mL obtidos pela leitura direta das amostras no espectrofluorímetro. A quantificação das proteínas totais foi utilizada para determinar a massa específica que foi expressa em μg GFPuv/mg BSA. A produtividade específica foi obtida pela relação entre a concentração de GFPuv e a massa seca da amostra, μg GFPuv/mg de massa seca.

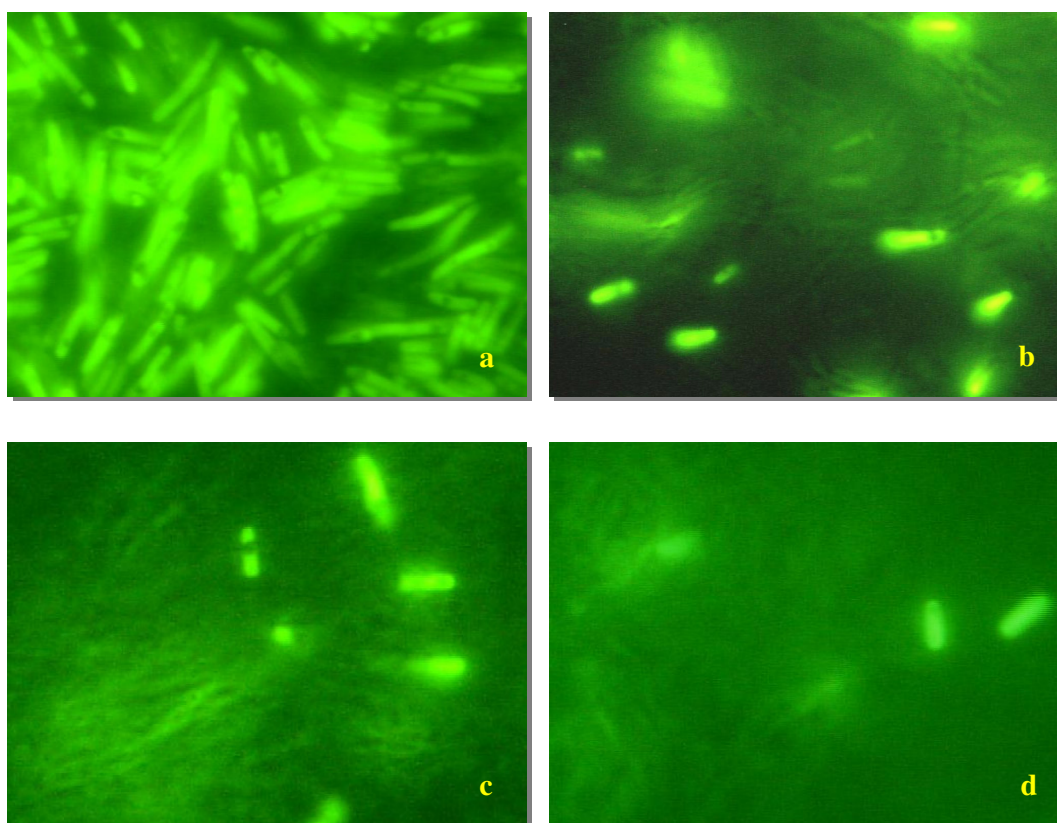


FIGURA 20: Células de *Escherichia coli* transformadas observadas na microscopia (ampliadas 1000 vezes) sob fluorescência (filtro U-MWB) após 1º ciclo de CDS (a), 2º ciclo de CDS (b), 3º ciclo de CDS (c) e 4º ciclo de CDS (d).

Os teores de GFPuv obtidos das culturas celulares através da permeação seletiva com a aplicação de método físico e posterior extração por TPP estão apresentados na Tabela 5. Da amostra 2 obteve-se maior teor de GFPuv (218,06 µg GFPuv/mL) em relação aos teores obtidos das amostras 3 (196,27 µg GFPuv/mL) e 4 (43,19 µg GFPuv/mL). A amostra 2 foi ressuspensa em 500 µL de tampão, enquanto que as demais o foram em 1000 µL, porém os valores estão corrigidos para o mesmo volume de tampão, 1000 µL. Considerando o processo associado de permeação (1º, 2º, 3º e 4º ciclos de CDS) seguido da extração por TPP, o rendimento em GFPuv desta amostra foi em média 30% nas extrações (29,0%; 34,3% e 27,8%), respectivamente para os permeados do 1º, 2º e 3º ciclos. No entanto, a massa específica aumentou gradualmente de 10,65 µg GFPuv/mg (1º CDS/TPP) para 18,36 µg GFPuv/mg (2º CDS/TPP), para 42,61 µg GFPuv/mg (3º CDS/TPP) estabilizando em 32,36 µg GFPuv/mg (4º CDS/TPP). Pôde-se observar que a permeação sucessiva por CDS permitiu a liberação seletiva da GFPuv. Grande parte das macromoléculas e fragmentos celulares foi separado da GFPuv na primeira etapa da extração por TPP, precipitaram na interface branca.

Dos permeados da amostra 3, ressuspensa em 1000 µL de TE (item 4.3.2), foram coletadas duas alíquotas de 450 µL para a extração da GFPuv por TPP. Para efeito de cálculos foi considerada a média dos resultados obtidos. A extração por TPP possibilitou a eliminação da maioria das macromoléculas e fragmentos celulares presentes nos permeados, havendo a confirmação através da quantificação das proteínas totais e na eletroforese (Figura 21), onde observou-se aumento progressivo da presença de proteínas indesejáveis do 1º CDS para o 4º CDS, devido ao rompimento da parede celular provocada na associação do congelamento, descongelamento e sonicação, permitindo a permeação de moléculas de tamanho superior a 60 kDa (JOHNSON & HECHT, 1994; NAGLAK *et al.*, 1990; WHEELWRIGHT, 1994 e ENDOW & PISTON, 1998). Porém, para a mistura de extratos obtidos por TPP (amostra 3), antes e após eluição por coluna HIC, observou-se considerável remoção de impurezas na amostra. Pode-se observar uma única banda de coloração mais intensa na região entre 27 kDa (GFPuv padrão) e 29 kDa (massa molar padrão).

Nesta amostra observou-se a diminuição de contaminantes, proteínas totais, em 51 vezes do 1º ciclo CDS para a extração por TPP (87,32 mg/mL para 1,70 mg/mL), 24 vezes do 2º ciclo CDS para a extração por TPP (136,16 mg/mL para 5,65 mg/mL), 7 vezes do 3º ciclo CDS para a extração por TPP (31,65 mg/mL para 4,63 mg/mL) e 12 vezes do 4º ciclo CDS para a extração por TPP (12,54 mg/mL para 1,02 mg/mL). No entanto, nos teores de GFPuv desta mesma amostra houve diminuição média de 1,4 vez nos três primeiros ciclos CDS/TPP e 4,6 vezes no 4º CDS/TPP. Em consequência obteve-se valores satisfatórios na massa específica de 149,58 µg GFPuv/mg (1º CDS/TPP), havendo gradativo decréscimo nos demais ciclos: 45,37 µg GFPuv/mg (2º CDS/TPP), 20,74 µg GFPuv/mg (3º CDS/TPP) e 17,40 µg GFPuv/mg (4º CDS/TPP).

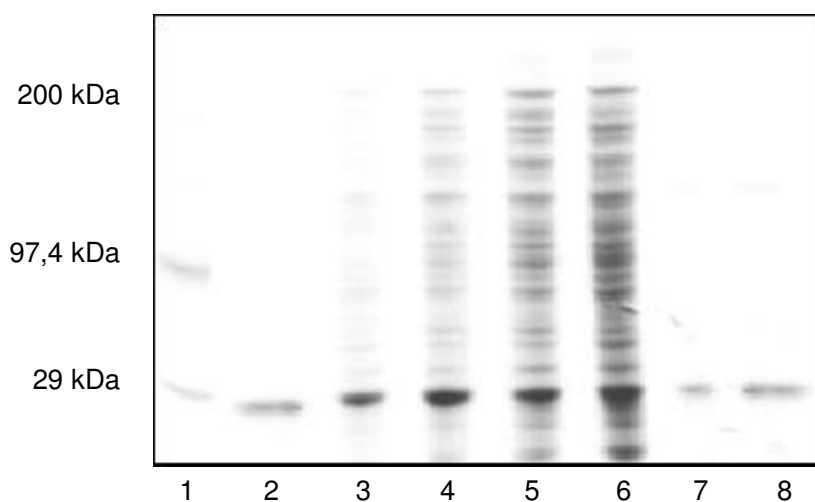


FIGURA 21: Gel de eletroforese em poliacrilamida (SDS-page) da amostra 3. Colunas: 1, padrão de peso (kDa); 2, GFPuv padrão (20,0 µg GFPuv/mL); 3, permeado do 1º ciclo CDS (32,15 µg GFPuv/mL); 4, permeado do 2º ciclo CDS (59,95 µg GFPuv/mL); 5, permeado do 3º ciclo CDS (38,61 µg GFPuv/mL); 6, permeado do 4º ciclo CDS (45,61 µg GFPuv/mL); 7, mistura dos permeados após extração por TPP (12,77 µg GFPuv/mL); e 8, mistura dos extratos após eluição em coluna methyl HIC (59,80 µg GFPuv/mL).

TABELA 5: Permeação e extração da proteína verde fluorescente (GFPuv) de células de *Escherichia coli* para cultura 2 (massa seca = 1,40 mg/mL); cultura 3 (massa seca = 0,92 mg/mL) e cultura 4 (massa seca = 1,44 mg/mL).

Tratamento	GFPuv ($\mu\text{g/mL}$) \pm desvio padrão	IC ⁻ (95%)	Rendi- mento (%)	Proteínas totais(mg/mL) \pm desvio padrão	IC ⁻ (95%)	Massa específica **	Produtividade específica ***	
Amostra 2 – massa seca 1,40 mg/mL								
Permeação	1° CDS	832,57 \pm 33,89	38,35	42,0	94,65 \pm 3,16	3,58	8,80	594,69
	2° CDS	504,49 \pm 20,39	23,08	25,4	76,97 \pm 2,22	2,51	6,55	360,35
	3° CDS	351,21 \pm 12,65	14,32	17,7	40,14 \pm 1,50	1,70	8,75	250,87
	4° CDS	174,01 \pm 7,05	7,98	8,8	24,79 \pm 0,81	0,92	7,02	124,29
	Mistura	198,06 \pm 7,60	8,60	-	-	-	-	-
Extração TPP	1° CDS	374,13 \pm 14,52	16,43	29,0	35,12 \pm 1,22	1,38	10,65	267,24
	2° CDS	443,33 \pm 13,68	15,49	34,3	24,15 \pm 0,98	1,10	18,36	316,66
	3° CDS	359,21 \pm 10,23	11,57	27,8	8,43 \pm 0,39	0,44	42,61	256,58
	4° CDS	115,21 \pm 5,11	5,78	8,9	3,56 \pm 0,18	0,20	32,36	82,30
	Mistura	218,06 \pm 8,25	9,33	-	23,25 \pm 1,18	1,34	9,38	155,76
Amostra 3 – massa seca 0,92 mg/mL								
Permeação	1° CDS	315,13 \pm 11,10	12,56	33,3	87,32 \pm 3,07	3,47	3,61	342,53
	2° CDS	410,82 \pm 17,28	19,55	43,5	136,16 \pm 6,83	7,72	3,02	446,54
	3° CDS	136,38 \pm 3,30	3,73	14,5	31,65 \pm 1,26	1,43	4,31	148,24
	4° CDS	82,19 \pm 2,38	2,69	8,7	12,54 \pm 0,53	0,60	6,55	89,34
	Mistura	938,83 \pm 387,08	438,01	-	94,29 \pm 3,37	3,81	7,16	1020,46
Extração TPP	1° CDS	254,78 \pm 11,96	13,53	40,8	1,70 \pm 0,07	0,07	149,58	276,93
	2° CDS	256,48 \pm 9,28	10,50	41,1	5,65 \pm 0,19	0,21	45,37	278,78
	3° CDS	96,02 \pm 3,55	4,01	15,4	4,63 \pm 0,21	0,24	20,74	104,37
	4° CDS	17,81 \pm 0,45	0,51	2,8	1,02 \pm 0,05	0,05	17,40	19,36
	Mistura	196,27 \pm 9,02	10,21	-	2,38 \pm 0,13	0,14	82,35	213,34
Amostra 4 – massa seca 1,44 mg/mL								
Permeação	1° CDS	429,40 \pm 15,00	16,97	66,0	61,82 \pm 2,40	2,72	6,95	298,19
	2° CDS	174,44 \pm 5,59	6,33	26,8	28,40 \pm 1,28	1,45	6,14	121,14
	3° CDS	39,10 \pm 1,65	1,87	6,0	8,61 \pm 0,27	0,31	4,54	27,15
	4° CDS	7,78 \pm 0,30	0,34	1,2	4,58 \pm 0,09	0,10	1,70	5,40
	Mistura	233,44 \pm 7,44	8,42	-	24,28 \pm 0,46	0,52	9,61	162,11
Extração mistura dos	1ª extração	20,47 \pm 0,82	0,93	14,0	2,23 \pm 0,07	0,08	9,18	14,21
	2ª extração	93,40 \pm 1,96	2,22	64,1	1,04 \pm 0,03	0,03	89,81	64,86
	3ª extração	31,90 \pm 0,60	0,68	21,9	1,55 \pm 0,05	0,06	20,58	22,15
	Mistura	43,19 \pm 1,23	1,39	-	2,43 \pm 0,10	0,11	17,80	29,99

IC = Intervalo de confiança, n=3.

** Massa específica ($\mu\text{g GFPuv/ mg proteínas totais}$) = relação entre a concentração de GFPuv e a quantidade de proteínas totais.

*** Produtividade específica ($\mu\text{g GFPuv/ mg massa seca}$) = relação entre a concentração de GFPuv e a massa seca da amostra.

Na amostra 4, da mistura dos permeados que foi submetida à extração por TPP obteve-se quantidade de proteínas totais 10 vezes menor (2,43 mg/mL) e massa específica aproximadamente 2 vezes maior (17,80 $\mu\text{g GFPuv/mL}$) em relação à amostra 2 (23,25 mg/mL; 9,38 $\mu\text{g GFPuv/mL}$) em consequência da redução dos contaminantes presentes nos permeados. A quantidade de proteínas totais obtidas na mistura das porções extraídas (2,43

mg/mL) foi 10 vezes menor em relação à mistura dos permeados (24,28 mg/mL). A grande eliminação de contaminantes indesejáveis presentes nos permeados, uma pré-purificação, ocorrida na amostra 3 confirmou-se também na amostra 4. A massa específica foi maior (89,81 μg GFPuv/mg) na segunda extração. Houve uma diminuição de 5,4 vezes na produtividade específica obtida da mistura dos permeados para a mistura das porções extraídas, tendo reduzido de 162,11 μg GFPuv/mg para 29,99 μg GFPuv/mg.

As amostras 3 e 4 apresentaram rendimentos maiores na permeação dos dois primeiros ciclos de CDS, amostra 3 – 76,8% (33,3% + 43,5%) e amostra 4 – 92,8% (66,0% + 26,8%).

Na Figura 22 observa-se maior homogeneidade de GFPuv extraída por TPP de permeados individualizados, amostras 2 e 3, do que a GFPuv extraída a partir da mistura dos permeados, amostra 4. Após eluição pela coluna HIC observa-se aumento dos teores de GFPuv, possivelmente pela remoção de interferentes que estavam presentes nas amostras.

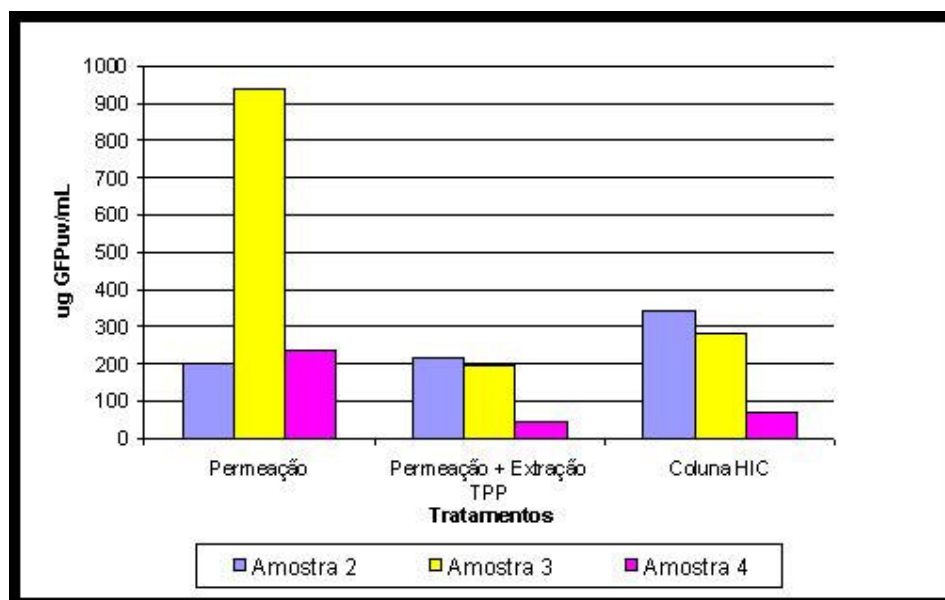


Figura 22: Teores da proteína verde fluorescente (GFPuv) para as misturas permeadas seletivamente, extraídas pelo método de partição em três fases e eluídas em coluna cromatográfica de interação hidrofóbica, correspondentes aos dados da Tabela 7.

5.4. Extração da GFPuv das células por TPP

Estão apresentadas na Tabela 6 os teores de GFPuv ($\mu\text{g GFPuv/mL}$) e respectivas massas específicas ($\mu\text{g GFPuv/mg}$), obtidas a partir da aplicação direta do método de extração por TPP nas culturas celulares.

TABELA 6: Extração da proteína verde fluorescente (GFPuv) das células de *Escherichia coli* por partição em três fases (TPP). As amostras foram obtidas da mesma cultura 1 (massa seca = 1,46 mg/mL).

Amostra	Extrações TPP	Sulfato amônio (M)	GFPuv ($\mu\text{g/mL}$) \pm desvio padrão	IC [*] (95%)	(%)	Proteínas totais (mg/mL) \pm desvio padrão	IC [*] (95%)	Massa específica	Produtividade específica ^{***}
1 - A	1 ^a	1,6	33,16 \pm 1,08	1,22	15,4	8,33 \pm 0,27	0,31	3,98	22,71
	2 ^a	1,6	91,17 \pm 4,10	4,64	42,2	7,08 \pm 0,29	0,33	12,88	62,45
	3 ^a	1,6	91,67 \pm 3,06	3,46	42,4	5,21 \pm 0,21	0,24	17,60	62,79
	Mistura		84,73 \pm 2,45	2,77	-	5,53 \pm 0,14	0,16	15,32	58,03
1 - B	1 ^a	1,4	44,83 \pm 0,64	1,85	16,4	-	-	-	30,71
	2 ^a	1,4	81,82 \pm 4,67	5,28	29,8	10,10 \pm 0,17	0,19	8,26	56,04
	3 ^a	1,4	53,67 \pm 2,28	2,58	19,6	16,04 \pm 0,34	0,38	3,37	36,76
	4 ^a	1,4	93,75 \pm 5,38	6,09	34,2	5,57 \pm 0,94	1,06	18,03	64,21
	Mistura		97,80 \pm 2,42	2,73	-	13,17 \pm 0,45	0,51	7,43	66,99
1 - C	1 ^a	1,6	20,25 \pm 4,37	4,95	33,3	0,65 \pm 0,02	0,03	34,69	13,87
	2 ^a	1,6	33,32 \pm 0,86	0,98	54,9	0,85 \pm 0,02	0,02	39,20	22,82
	3 ^a	1,6	7,16 \pm 0,25	0,28	11,8	0,25 \pm 0,01	0,01	28,64	4,90
	Mistura		25,72 \pm 2,05	2,33	-	0,63 \pm 0,03	0,03	39,62	17,62
1 - D	1 ^a	1,6	54,25 \pm 1,72	1,94	36,4	5,98 \pm 0,19	0,22	9,07	37,16
	2 ^a	1,6	77,32 \pm 3,48	3,94	51,9	2,58 \pm 0,11	0,12	29,97	52,96
	3 ^a	1,6	17,42 \pm 0,64	0,72	11,7	1,98 \pm 0,06	0,07	8,80	11,93
	Mistura		30,70 \pm 1,73	1,01	-	3,57 \pm 0,14	0,16	13,08	21,03

IC = Intervalo de confiança, n=3.

^{**} Massa específica ($\mu\text{g GFPuv/ mg proteínas totais}$) = relação entre a concentração de GFPuv e a quantidade de proteínas totais.

^{***} Produtividade específica ($\mu\text{g GFPuv/ mg massa seca}$) = relação entre a concentração de GFPuv e a massa seca da amostra.

Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 6 observou-se que para a mesma cultura e concentração final de 1,6 M de sulfato de amônio adicionados à fase aquosa, a amostra 1-A apresentou três vezes mais GFPuv extraída (84,73 $\mu\text{g/mL}$), e conseqüentemente maior produtividade específica, em relação à amostra 1-C (17,62 $\mu\text{g/mg}$). No entanto, a massa específica da amostra 1-C (39,62 $\mu\text{g/mg}$) superou 2,6 vezes aquela apresentada na amostra 1-A (15,32 $\mu\text{g/mg}$). A presença de macromoléculas e fragmentos celulares na fase aquosa que formaram a interface branca na primeira etapa da extração por TPP, podem ter arrastado moléculas de GFPuv, interferido no rendimento da

extração da amostra 1-C. A presença de fluorescência na interface branca foi observada à luz UV.

A concentração de 97,80 μg de GFPuv/mL na mistura 1-B foi superior cerca de 1,2 vez; 3,8 vezes e 3,2 vezes, respectivamente àquelas obtidas para as misturas das amostras 1-A (84,73 μg de GFPuv/mL); 1-C (25,72 μg de GFPuv/mL) e 1-D (30,70 μg de GFPuv/mL). Porém a massa específica para a mistura 1-B (7,43 μg GFPuv/mg) foi inferior àquelas obtidas para as demais amostras, devido à elevada concentração de contaminantes (3-20 vezes maior) presente na mistura de extração de GFPuv. Portanto, observou-se que concentrações de sulfato de amônio maiores ou iguais a 1,6 M favoreceram o rendimento de GFPuv durante as etapas de extração. A metodologia por TPP deve apresentar uma limitação na massa específica máxima de GFPuv obtida para menor quantidade das proteínas totais impregnadas, que merece ser validada.

Na amostra 1-D a interface branca formada na primeira etapa da extração apresentou-se visualmente mais espessa em relação as demais amostras, com a fase inferior não muito translúcida. Porém, os teores de proteínas totais na extração da GFPuv foram semelhantes àqueles obtidos na amostra 1-A. Na Figura 23 observa-se o aumento da produtividade específica da GFPuv na amostra 1-D após a purificação na coluna HIC.

As melhores massas específicas foram observadas para a mistura da amostra 1-C, de 39,62 μg GFPuv/mg (Tabela 6). A fase aquosa contendo sulfato de amônio à concentração final de 1,6 M mostrou maior eficácia nas etapas de extração da GFPuv em relação às impurezas presentes, que apresentou 0,63 mg BSA/mL de proteínas totais na mistura da amostra 1-C, e quantidades entre 0,25 e 0,85 mg BSA/mL, nas três etapas da extração; enquanto que a amostra 1-B, com a concentração final do sulfato de amônio de 1,4 M na fase aquosa, apresentou proteínas totais entre 5,57 e 16,04 mg BSA/mL.

Conforme se observa na Figura 23, dos extratos das amostras 1-A e 1-B obteve-se maiores produtividades específicas de GFPuv em relação às amostras 1-C e 1-D. A explicação pode estar no fato de os extratos apresentarem contaminantes que emitem fluorescência no mesmo

comprimento de onda da GFPuv, tendo sido removidos quando eluídos na coluna, contribuindo para a purificação da GFPuv.

Dentre as amostras da cultura 1, da mistura dos extratos da amostra 1-C obteve-se os maiores resultados de massa específica, 39,62 μg GFPuv/mg (Tabela 6), e a obtenção de GFPuv com menos contaminantes na fase da extração por TPP (Figura 23). Talvez a explicação esteja no fato da primeira interface formada, de macromoléculas e fragmentos celulares, ter sido espessa, ter apresentado baixa intensidade de fluorescência quando observada sob a luz UV, e ter uma fase inferior fluorescente e bastante translúcida. Isto foi confirmado após a eluição da GFPuv na coluna HIC, com valores de produtividade específica semelhantes, representando que havia pouca quantidade de contaminantes no extrato.

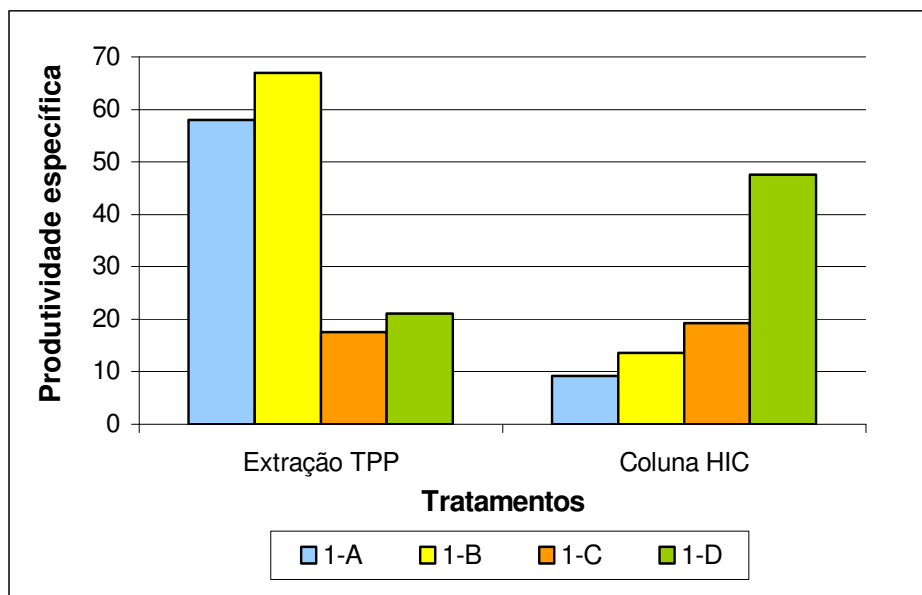


Figura 23: Produtividade específica, relação entre a proteína verde fluorescente (GFPuv) e a massa seca, para a mistura dos extratos obtidos por partição em três fases (TPP) e eluídos em coluna cromatográfica de interação hidrofóbica (HIC), correspondentes aos dados da Tabela 7.

5.5. Purificação dos permeados e extratos em coluna HIC

A GFPuv possui característica hidrofóbica e o sulfato de amônio é um sal que possui grande capacidade de promover a interação hidrofóbica e a precipitação cosmotrópica de proteínas hidrofóbicas (PÅHLMAN *et al.*, 1977;

ROE, 1989). Os resultados da purificação da GFPuv através da eluição em coluna cromatográfica de interação hidrofóbica (HIC) pode ser observado na Tabela 7 e estão ilustrados na Figura 24. Observa-se que a produtividade específica da média das amostras 2, 3 e 4 (198,09 μg GFPuv/mg), após eluição em coluna HIC, foi aproximadamente 9 vezes maiores àquelas apresentadas na média das amostras 1-A, 1-B, 1-C e 1-D (22,40 μg GFPuv/mg).

Tabela 7: Extração por partição em três fases (TPP) e purificação em coluna cromatográfica de interação hidrofóbica (HIC) da proteína verde fluorescente (GFPuv) de células de *Escherichia coli* e de permeados

Amostras	Tratamentos	GFPuv ($\mu\text{g}/\text{mL}$) \pm desvio padrão	IC (95%)	Proteínas totais (mg/mL) \pm desvio padrão	IC [†] (95%)	Massa específica ^{**}	Produtividade específica ^{***}
1-A	Mistura	84,73 \pm 2,45	2,77	5,53 \pm 0,14	0,16	15,32	58,03
	HIC ^{****}	13,39 \pm 0,48	0,54	8,21 \pm 0,31	0,35	1,63	9,17
1-B	Mistura	97,80 \pm 2,42	2,73	13,17 \pm 0,45	0,51	7,43	66,99
	HIC	19,87 \pm 0,61	0,68	6,48 \pm 0,21	0,24	3,07	13,61
1-C	Mistura	25,72 \pm 2,05	2,33	0,63 \pm 0,03	0,03	39,62	17,62
	HIC	28,04 \pm 0,84	0,95	1,78 \pm 0,06	0,07	15,73	19,20
1-D	Mistura	30,70 \pm 1,73	1,01	3,57 \pm 0,14	0,16	13,08	21,03
	HIC	69,54 \pm 1,73	1,96	14,47 \pm 0,29	0,32	4,81	47,63
2	Mistura	218,06 \pm 8,25	9,33	23,25 \pm 1,18	1,34	9,38	155,76
	HIC	339,88 \pm 12,70	14,37	19,09 \pm 0,70	0,79	17,81	242,77
3	Mistura	196,27 \pm 9,02	10,21	2,38 \pm 0,13	0,14	82,35	213,34
	HIC	279,62 \pm 9,85	11,15	170,40 \pm 7,33	8,29	1,64	303,93
4	Mistura	43,19 \pm 1,23	1,39	2,43 \pm 0,10	0,11	17,80	29,99
	HIC	68,53 \pm 2,65	3,00	18,39 \pm 0,60	0,68	3,73	47,59

† IC = Intervalo de confiança, n=3.

** Massa específica (μg GFPuv/ mg proteínas totais) = relação entre a concentração de GFPuv e a quantidade de proteínas totais.

*** Produtividade específica (μg GFPuv/ mg massa seca) = relação entre a concentração de GFPuv e a massa seca da amostra.

**** HIC = Coluna cromatográfica de interação hidrofóbica.

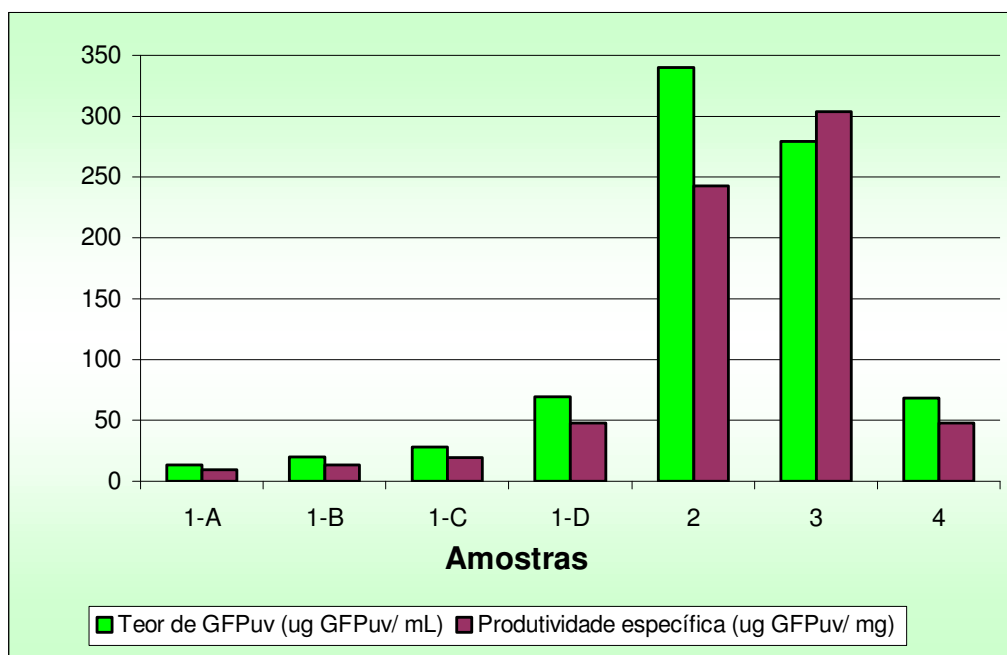


Figura 24: Teores e produtividade específica da proteína verde fluorescente (GFPuv) das misturas das amostras, após eluição em coluna cromatográfica de interação hidrofóbica (HIC).

5.6. Espectro de excitação e de emissão

A GFPuv extraída por TPP e a purificada em coluna HIC foram submetidas a varredura dos espectros de excitação e de emissão no espectrofluorímetro. Os espectros de fluorescência de excitação e de emissão obtidos destas amostras de GFPuv, demonstrados na Figura 25, foram semelhantes àqueles obtidos para a GFPuv padrão; picos máximos em $\lambda_{\text{excitação}}$ 394 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 509 nm.

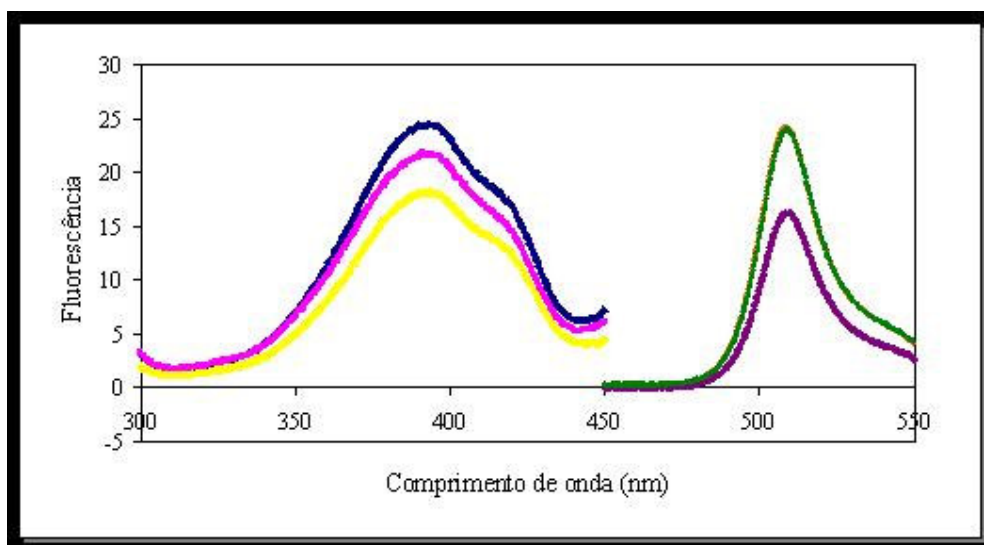


FIGURA 25: Espectro excitação da GFPuv medido a $\lambda_{\text{emissão}}$ 509 nm: GFPuv padrão (—), GFPuv extraída (—), GFPuv purificada (—); e espectro de emissão da GFPuv excitada a $\lambda_{\text{excitação}}$ 394 nm: GFPuv padrão (—), GFPuv extraída (—) e GFPuv purificada (—).

5.7. Estabilidade da GFPuv em diferentes valores de pH

No estudo da estabilidade da GFPuv em diferentes valores de pH verificou-se a região de inflexão das curvas (Figura 26), para GFPuv padrão, extraída e purificada, situada no intervalo entre valores de pH 5,0 e 5,2, indicando que o ponto isoelétrico (pI) pode estar situado entre estes valores. Nesta faixa de valor de pH a proteína encontra-se na forma dipolar isoelétrica, sem carga elétrica líquida. Para valores de pH superiores ao pI, a superfície da GFPuv apresenta-se carregada negativamente, e para valores de pH inferiores ao pI, a superfície da proteína apresenta carga positiva. Apesar das proteínas apresentarem maior probabilidade de se agregarem próximo ao pI, devido à diminuição da repulsão eletrostática entre as moléculas, não foi observada precipitação da GFPuv nos tubos após as 24 horas de estabilização da GFPuv nos tampões. WARD (1998) verificou que o pI para a GFP situava-se na faixa de valor de pH entre 4,7 – 5,1. Segundo SCOPES (1994), os valores de pI para a maioria das proteínas das plantas e das bactérias são caracterizadas entre pH 4,5 e 5,0; enquanto os valores de pI da maioria das proteínas animal situam-se entre pH 5,5 e 6,0.

Na faixa de pH entre 6,0 e 9,8 a intensidade de fluorescência da GFPuv mostrou-se máxima e estável; decaindo para valores de pH entre 5,5 e 4,5.

Para os valores menores que pH 4,5, a intensidade de fluorescência é mínima (Figura 26). BOKMAN & WARD, (1981) constataram que a GFP apresentou estabilidade na intensidade de fluorescência na faixa entre pH 5,5 e 12,0; entretanto, decaiu entre os valores de pH 5,5 e 4,4, havendo abrupto decréscimo da intensidade de fluorescência para valores de pH superiores a 12,0.

Observa-se nas Figuras 25 e 26 que os tratamentos de permeação, extração e purificação não alteraram a estrutura da proteína, pois a GFPuv permeada, extraída e purificada, se comparada a GFPuv padrão, apresentaram o mesmo perfil na variação da intensidade de fluorescência em relação ao valor de pH.

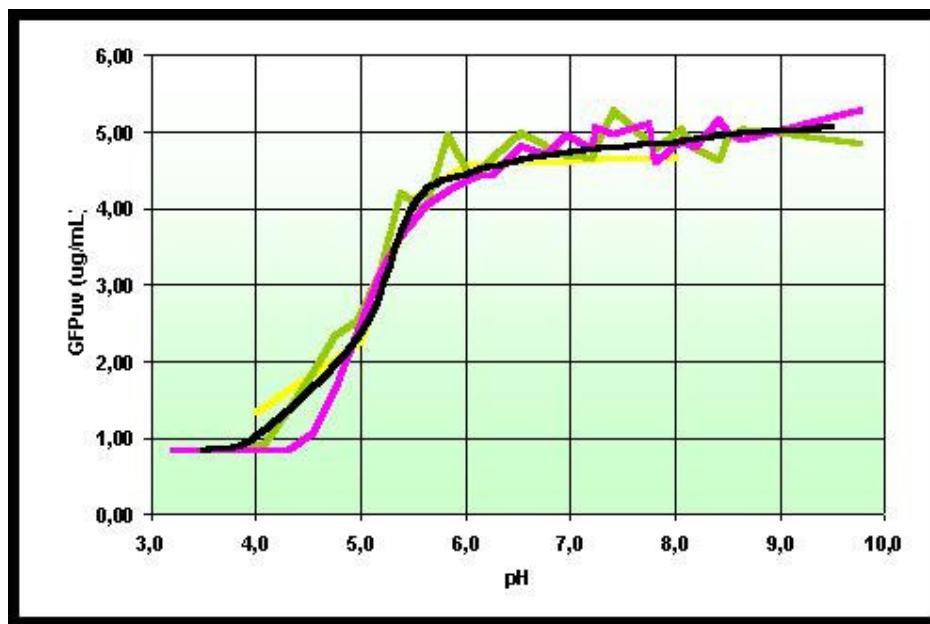


FIGURA 26: Estabilidade da GFPuv medida pela intensidade de fluorescência em função de diferentes valores de pH: GFPuv padrão (—), GFPuv extraída pelo método de TPP (—); GFPuv purificada em coluna HIC (—) e valores médios dentre as três curvas (—).

6. CONCLUSÕES

- A permeação seletiva permitiu a liberação seletiva de moléculas intracelulares, obtendo-se a GFPuv com poucos contaminantes nos primeiros ciclos de permeação;
- A produtividade específica da GFPuv obtida através da aplicação associada de método físico (permeação seletiva) e método químico (partição em três fases - TPP) em células de *Escherichia coli*, e purificadas em coluna HIC, apresentou maior eficácia em relação àquela obtida na aplicação direta do método químico;
- As estruturas moleculares da GFPuv extraída e purificada mostraram-se inalteradas em valores de pH entre 6,0 e 9,8; confirmada também na varredura dos espectros de emissão e de excitação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, 1996.
- ANGELOVA, M.K., DIMOV, N.P., NACHEV, N.D., TSVETKOV, A.B. Preparative hydrophobic interaction chromatography as effective stage in the purification of glucagon and insulin. **Bulg. Chem. Commun.**, Sofia, v.29, p.90-100, 1997.
- BARNES, R.S., **An introduction to marine ecology**. 2. Ed. Oxford. Blackwell Scientific Publ. 351p., 1991.
- BELL, D.J., HOARE, M., DUNNILL, P. The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery. **Adv. Biochem. Eng.**, Berlin, v.26, p.1-72, 1983.
- BELTER, P.A., CUSSLER, V.E.L., HU, W.S. **Bioseparations**. New York: Interscience, 1988. p.99.
- BIO-RAD. Biotechnology Explorer[®] Green Fluorescent Protein (GFP) Purification Kit: Catalog Number 166-0005-EDU. Disponível em www.bio-rad.com. Acesso em: 03abr.2001.
- BOKMAN, S.H., WARD, W.W. Renaturation of *Aequorea* green fluorescent protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.101, p.1372-1380, 1981.
- CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN G., WARD, W.W., PRASHER, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, Washington, v.263, p.802-805, 1994.
- COMMINGS, D.E., MIGUEL, A.G., LESSER, B.H. Nuclear proteins. VI. Fractionation of chromosomal non-histone proteins using hydrophobic

- chromatography. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.563, p.253-260, 1979.
- CONN, E.E., STUMPF, P.K. **Introdução à bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1980. p.500.
- CRAMERI, A., WHITEHORN, E.A., TATE E., STEMMER, W.P.C. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. **Nat. Biotechnol.**, Brentwood, v.14, p.315-319, 1996.
- DANDLIKER, W.B., ALONSO, R., SAUSSURE, V.A., KIERSZENBAUM, F., LEVINSON, S.A., SCHAPIRO, H.C. The effect of chaotropic ions on the dissociation on antigen-antibody complexes. **Biochemistry**, Columbus, v.6, p.1460-1467, 1967.
- DENNISON, C., LOVRIENT, R. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. **Protein Expression Purif.**, Orlando, v.11, p.149-161, 1997.
- DENNISON, C., MOOLMAN, L., PILLARY, C.S., MEINESZ, R.E. *t*-Butanol: nature's gift for protein isolation. **S. Afr. J. Sci.**, Pretoria, v.96, p.159-160, 2000.
- ENDOW, S.A., PISTON, D.W. Methods and Protocols. In: CHALFIE, M., KAIN, S., eds. **Green fluorescent protein: properties, applications and protocols**. New York: Wiley-Liss, 1998. p.271-294.
- FLACH, J., BOSSIE, M., VOGELI, 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.
- HACK, N.J., BILLUPS, B., GUTHRIE, J.H.R., MUIR, E.M., PARKS, T.M., KATER, S.B. green fluorescent protein as a quantitative tool. **J. Neurosci. Methods**, Amsterdam, v. 95, p.177-184, 2000.
- 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.
- HOFSTEE, B.H.J. Accessible hydrophobic groups of native proteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.63, p.618-624, 1975.

- HRKAL, Z., REJNKOVÁ, L. Hydrophobic interaction chromatography of serum proteins on Phenyl-Sepharose CL-4B. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.242, p.385-388, 1982.
- INOUE, S., TSUJI, F.I. *Aequorea* green fluorescent protein: expression of the gene and fluorescent characteristics of the recombinant protein. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.341, p.277-280, 1994a.
- INOUE, S., TSUJI, F.I. Evidence for redox forms of *Aequorea* green fluorescent protein. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.351, p.211-214, 1994b.
- JOHNSON, B.H., HECHT, M.H. Recombinant Proteins Can Be Isolated from *E. coli* Cells by Repeated Cycles of Freezing and Thawing. **Bio/Technology**, New York, v.12, p.1357-1360, 1994.
- KAETHER, C., GERDES, H.H. Visualization of protein transport along the secretory pathway using green fluorescent protein. **FEBS Letters**, v.369, p.267-271, 1995.
- KAHANA, J.A., SCHNAPP, B.J., SILVER, P.A. Kinetics of spindle pole body separation in budding yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v.92, n.21, p.9707-9711, 1995.
- KNEEN, M., FARINAS, J., LI, Y., VERKMAN, A.S. green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. **J. Biophys.**, Tokyo, v. 74, p.1591-1599, 1998.
- KLOTZ, I.M. Comparison of molecular structures of proteins: helix content, distribution of apolar residues. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.138, p.704-706, 1970.
- LEFORT, S., FERRARA, P. Hydrophobic adsorbents for the isolation and purification of biosynthetic human growth hormone from crude fermentation mixture. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.361, p.209-216, 1986.
- LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1990. p.57, p.108, p.127-152.
- LI, X., ZHANG, G., NGO, N., ZHAO, X., KAIN, S.R., HUANG, C.C. Deletions of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein define the minimal domain

- required for fluorescence. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.242, n.45, p.28545-28549, 1997.
- MAKHATAFZE, G.I., PRIVALOV, P.I. Energetics of protein structure. **Adv. Protein Chem.**, San Diego, v.47, p.307-325, 1995.
- MEIROVITCH, H., SCHERAGA, H.A. Empirical studies of hydrophobicity. 2. Distribution of the hydrophobic, hydrophilic, neutral and ambivalent amino acids in the interior and exterior layers of native proteins. **Macromolecules**, Columbus, v.13, p.1406-1414, 1980.
- MELANDER, W., HORVÁTH, C. Salt effects on hydrophobic interaction in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of lyotropic series. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.183, p.200-215, 1977.
- MELANDER, W., CORRADINI, D., HORVÁTH, C. Salt mediated retention of proteins in hydrophobic interaction chromatography: application of solvophobic theory. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.317, p.67-85, 1984.
- MURPHY, K.P., PRIVALOV, P.L., GILL, S.J. Common features of protein unfolding and dissolution of hydrophobic compounds. **Science**, Washington, v.247, p.559-561, 1990.
- NAGLAK, T.J., HETTWER, D.J., WANG, H.Y. Enzymatic Cell Lysis for Product Release. In: ASENJO, J.A., ed. Separation process in biotechnology. New York: Marcel Dekker, 1990. p.143-175. (Bioprocess technology, 9).
- PATTERSON, G.H., KNOBEL, S.M., SHARIF, W.D., KAIN, S.R., PISTON, D.W. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescent microscopy. **J. Biophys.**, Tokyo, v.73, p.2782-2790, 1997.
- NASCIMENTO, A.C., ESPERAFICO, E.M., LARSON, M.L.P., MONESI, N., ROSSI, N.M.M., RODRIGUES, V. Tecnologia do DNA recombinante. Rib. Preto: FMRP/USP, 1999. Disponível em: <http://morpheus.fmrp.usp.br/td/aulas/>. Acesso em: 14mar.2001.
- PALENCIA, P.F., NIETO, C., ACEBO, P., ESPINOSA, M., LÓPEZ, P. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 183, p.229-234, 2000.
- PÅHLMAN, S., ROSENGREN, J., HJERTÉN, S. Hydrophobic interaction chromatography on uncharged Sepharose[®] derivatives: effects of neutral

- salts on the adsorption of proteins. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.131, p.99-108, 1977.
- PHILIPS, G.N. The Three-Dimensional Structure of Green Fluorescent Protein and Its Implications for Function and Design. In: CHALFIE, M., KAIN, S., eds. **Green fluorescent protein: properties, applications and protocols**. New York: Wiley-Liss, 1998. p.77-96.
- PRISTA, L.N., MORGANO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 2.ed. Lisboa: Fundação Gulbenkian, 1975. v.1, p.239-288.
- PRIVALOV, P.L., GILL, S.J. Stability of protein structure and hydrophobic interaction. **Adv. Protein Chem.**, San Diego, v.39, p.191-234, 1988.
- QUEIROZ, J.A., GARCIA, F.A.P., CABRAL, J.M.S. Purification of *Chromobacterium viscosum* lipase by hydrophobic interaction chromatography. **Isol. Purif.**, Jersey, v.3, p.1-7, 1999.
- QUEIROZ, J.A., TOMAZ, C.T., CABRAL, J.M.S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. **J. Biotechnol.**, Oxford, v.87, p.143-159, 2001.
- ROBART, F.D., WARD, W.W. Solvent perturbations of *Aequorea* green fluorescent protein. **Photochem.**, v.51, 92s., 1990.
- ROE, S. Purification of hydrophobicity. In: HARRIS, E.L.V., ANGAL, S., eds. **Protein purification methods: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1989. p.221-232.
- ROTHSTEIN, F. Differential precipitation of proteins. In: HARRISON, R.G., ed. **Protein purification process engineering**. New York: Marcell Dekker, 1994. p.115-208. (Bioprocess technology, v.18).
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SCOPES, R.K. **Protein purification: principles and practices**. 3.ed. New York: Springer Verlag, 1994. 380p. (Springer advanced texts in chemistry).
- SHARMA, A., GUPTA, M.N. Three phase partitioning as a large-scale separation method for purification of a wheat germ bifunctional

- protease/amylase inhibitor. **Process Biochem.**, Oxford, v.37, p.193-196, 2001a.
- SHARMA, S.; GUPTA, M.N. Purification of phospholipase D from *Dacus carota* by three-phase partitioning and its characterization. **Protein Expression Purif.**, Orlando, v.21, p.310-316, 2001b.
- SHIGA, Y., TANAKA-MATAKATSU, 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.
- STEARNS, T. The green revolution. **Curr. Biol.**, v.5, p.262-264, 1995.
- SULLIVAN, K.F., HAHN, K., SHELBY, R.D. Bioluminescence labeling of human centromere DNA sequences in vivo. Poster presentation at Fluorescent Proteins and Applications Meeting, Palo Alto, CA. (CENP-B in humans cells).
- TANFORD, C. Hydrophobic free energy micelle formation and the association of protein with amphiphiles. **J. Mol. Biol.**, Sidcup, v.67, p.59-74, 1972.
- TANFORD, C. The hydrophobic effects: formation of micelles and biological membranes. New York: Wiley, 1973.
- VAN OSS, C.J., GOOD, R.J., CHAUDHURY, M.K. Nature of the antigen-antibody interaction. Primary and secondary bonds: optimal conditions for association and dissociation. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.376, p.111-119, 1986.
- VESSONI PENNA, T.C., FERRAZ, C.A., ISHISAKI, E.T. Esterilização de artigos medico-hospitalares por plasma de peróxido de hidrogênio. **Laes Haes**, São Paulo, v.6, p.88-100, 1997.
- VESSONI PENNA, T.C., CHIARINI, E., MACHOSHVILI, I.A., PESSOA Jr., A. Extraction of recombinant green fluorescent protein (GFPuv) from *Escherichia coli*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Colorado, v.98-100, p.791-802, 2002.
- WARD, W.W., CODY, C.W., HART, R.C., CORMIER, M.J. Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in *Renilla* e *Aequorea* green

fluorescent protein. **Photochem. Photobiol.**, Lawrence, v.31, p.611-615, 1980.

WARD, W.W. Biochemical and Physical Properties of Green Fluorescent Protein. In: . CHALFIE, M., KAIN, S., eds. **Green fluorescent protein: properties, applications and protocols** New York: Wiley-Liss, 1998. p.45-75.

WEBB, C.D., DECATUR, A., TELEMAN, A., LOSICK, R. Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, Oxford, v.177, p.5906-5911, 1995.

WHEELWRIGHT, S.M. **Protein purification: design and scale up of downstream processing**. New York : Wiley, 1994. p.62-65.

YAKHNIN, A.V., VINOKUROV, L.M., SURIN, A.K., ALALHOV, Y.B. Green fluorescent protein purification by organic extraction. **Protein Expression Purif.**, Orlando, v.14, p.382-386, 1998.