

VIVIANE VALQUÍRIA DO NASCIMENTO

CONSTRUÇÃO DE UM DIAGRAMA DE FASES PARA O
COMPLEXO Sso7dC8 + DNA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Física Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

N244c
2016 Nascimento, Viviane Valquíria do, 1989-
Construção de um diagrama de fases para o complexo
Sso7dC8 + DNA / Viviane Valquíria do Nascimento. – Viçosa,
MG, 2016.
vi, 41f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Ésio Bessa Ramos Júnior.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.38-41.

1. Polímeros - Análise. 2. Biopolímero. 3. Proteína.
4. Ácido desoxirribonucléico - Análise. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Física. Programa de Pós-graduação
em Física Aplicada. II. Título.

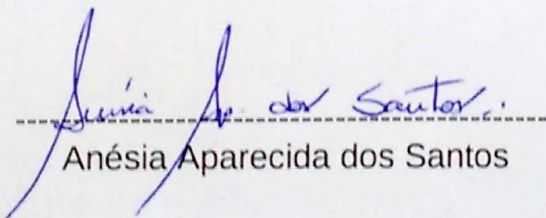
CDD 22 ed. 572.33

VIVIANE VALQUÍRIA DO NASCIMENTO

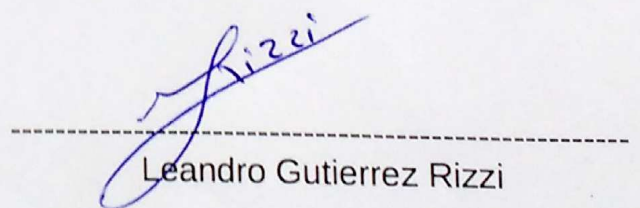
CONSTRUÇÃO DE UM DIAGRAMA DE FASES PARA O COMPLEXO Sso7dC8 +
DNA.

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Física Aplicada,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

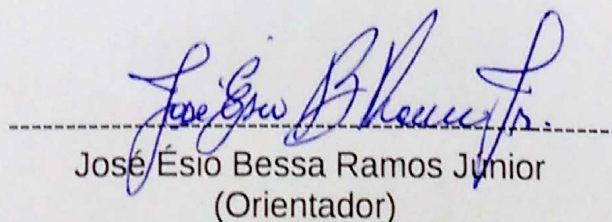
APROVADA: 21 de julho de 2016.



Anésia Aparecida dos Santos



Leandro Gutierrez Rizzi



José Ézio Bessa Ramos Júnior
(Orientador)

Agradecimentos

Agradeço a Deus todas as oportunidades e dons que recebi e pessoas maravilhosas que encontrei em minha caminhada, acima de tudo à luzinha que me guiou em momentos de escolhas difíceis.

Agradeço à minha mãe, Silvana, e ao meu pai, José Martins, por seus ensinamentos, seu amor, sua paciência. Pois foram o meu tudo, a motivação de cada hora que passei sentada estudando durante os últimos doze anos e agradeço por terem me auxiliado financeiramente, pois sempre pensaram primeiramente em suas duas filhas, deixando parte de suas necessidades de lado priorizando nossos estudos e bem-estar.

Tenho muito o que agradecer às minhas irmãs e amigas, Natália, Guelci, Daniele, Josilene, Joice, Emília, Stephanie e Iara e aos amigos, Carlos Henrique, Igor, Julio, Leonel, Olavo, Sylvestre e Tanada. Foram tantos favores, conselhos, risadas e tanto aprendizado que não é possível nominar todos. Agradeço porque me fizeram rir, foram boas companhias pra um bar, uma dança, assistindo séries e filmes, cozinhando, caminhando na reta, vivendo e aprendendo ao meu lado nessa caminhada difícil, mas prazerosa que me trouxe até aqui.

Agradeço ao meu orientador, José Ésio, por sua infinda paciência e intensas discussões. E a todos os colegas de trabalho do laboratório de física biológica da Universidade Federal de Viçosa, em especial meu coorientador Márcio, com quem aprendi muito nesses últimos anos.

Agradeço as agências de fomento que sustentam o desenvolvimento da ciência em nosso país e mantiveram o meu trabalho: FAPEMIG, CAPES e CNPq.

Finalmente agradeço o departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade, que todos os anos oferece aos alunos ingressantes: contemplar a beleza da *Scientiae Naturalis*.

Sumário

Lista de Figuras	iv
Resumo	v
Abstract	vi
1 Introdução	1
2 Polímeros	5
2.1 Breve histórico da física de polímeros	5
2.2 Tipos de cadeias	6
2.2.1 Polímeros de cadeia ramificada	8
2.3 Polímeros em solução	9
2.3.1 Interações entre polímeros	12
2.4 Proteínas	13
3 Força de depleção	15
3.1 Interação entre partículas e macromoléculas em solução	15
3.1.1 Interação entre partículas esféricas e macromoléculas em solução . .	16
3.2 Efeitos de forma em interações de depleção	18
3.3 Interação entre partículas carregadas e macromoléculas	20
4 Materiais e métodos	22
4.1 Complexo DNA+Sso7d-C8	22
4.1.1 DNA	23
4.1.2 Proteína recombinante - Sso7d-C8	25
4.2 Polietilenoglicol - PEG	27
4.3 Eletroforese	29
4.4 Preparação das amostras e procedimento experimental	30
5 Resultados e Discussão	32
5.1 Perspectivas	37
Referências Bibliográficas	38

Lista de Figuras

1.1	Cadeia ramificada imitando a proteína lubricina.	4
2.1	Formas de polimerização.	6
2.2	Tipos de Cadeias Poliméricas	7
2.3	Tipos de cadeias ramificadas.	8
2.4	Configuração de um polímero com cadeia altamente ramificada.	9
2.5	Possíveis regimes de soluções de polímeros.	10
2.6	Distância ponta-à-ponta de um polímero	11
2.7	Raio de giro de um polímero.	11
3.1	Representação da região depletora em torno de uma partícula esférica. . . .	16
3.2	Dimensões relevantes para a interação de depleção.	17
3.3	Separação de partículas de formas diferentes induzida por depleção.	19
3.4	Formação de um rouleux.	20
4.1	Representação do complexo DNA+Sso7d-C8 formando um polímero rami- ficado.	22
4.2	Nucleotídeo: sbunidade da cadeia de DNA.	23
4.3	Bases nitrogenadas presentes na molécula de DNA	24
4.4	Ligação fosfodiéster entre nucleotídeos adjacentes.	24
4.5	Conformações A, B e Z para a molécula de DNA.	25
4.6	A proteína modificada Sso7d-C8.	26
4.7	PEG - Polietilenoglicol	27
4.8	Cuba de Eletroforese.	29
5.1	Imagem de um gel de agarose após eletroforese, contendo DNA e diferentes concentrações de PEG8000.	32
5.2	Migração do polímero ramificado em gel de agarose, para diferentes pro- porções de proteína recombinante por pares de base.	33
5.3	Imagem de um gel contendo DNA recoberto com a proteína recombinante, na proporção 1pt/1bp, para diferentes concentrações de PEG8000, após eletroforese.	33
5.4	Representação de dois seguimentos do polímero ramificado que se aproximam.	34
5.5	Diagrama de fases para o polímero ramificado, complexo DNA+Sso7d-C8, em comparação com o complexo DNA+Sso7d, não ramificado.	35
5.6	Diagrama de fases para o complexo DNA+Sso7d-C8 e PEG de diferentes massas molares.	36

Resumo

NASCIMENTO, Viviane Valquíria do, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **CONSTRUÇÃO DE UM DIAGRAMA DE FASES PARA O COMPLEXO Sso7dC8 + DNA** Orientador: José Ésio Bessa Ramos Júnior. Coorientadores: Márcio Santos Rocha e Marcelo Lobato Martins.

A proposta de estudar o comportamento de polímeros de origem biológica em soluções fisiológicas é de grande interesse para a física de polímeros devido à sua importância em seres vivos. Proteínas, polissacarídeos, o ácido desoxirribonucleico - DNA e ácido ribonucleico - RNA, são exemplos de polímeros biológicos de extrema importância. A partir da necessidade de compreender e ser capaz de manejar tais polímeros, especialmente para um possível tratamento de doenças ou manipulação genética, a física de polímeros tem focado intensamente no estudo do DNA e proteínas celulares. Além de um interesse prático, existe a possibilidade de usar o DNA, que configura um polieletrólito com elevado peso molecular de estrutura bem conhecida, para estudar física de polímeros pura e simplesmente. Polímeros que apresentam cadeias ramificadas, por exemplo, tem propriedades singulares ainda pouco esclarecidas. Neste trabalho é apresentado um estudo do comportamento de fases de um polímero ramificado em função da densidade de ramificações e da quantidade de polímero altamente flexível necessária para condensar o polímero ramificado, ocasionando a separação de fases. O DNA complexado com a proteína modificada Sso7d-C8, configura o polímero ramificado e o polietilenoglicol o polímero altamente flexível utilizado. O diagrama de fase para o complexo Sso7dC8 + DNA foi construído para dois pesos moleculares de polietilenoglicol. A comparação entre a quantidade de polímero flexível de diferentes pesos moleculares necessária para observar a separação de fases condiz com as previsões teóricas. O comportamento de polímeros em solução depende principalmente de interações eletrostáticas, de forças de van der Waals e forças de depleção. Devido principalmente à assimetria entre os componentes da solução estudada nesta dissertação, a separação de fases pode ser entendida em termos da interação de depleção, proposta por Asakura e Oosawa (1954), como manifestação de um efeito entrópico.

Abstract

NASCIMENTO, Viviane Valquíria do, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **CONSTRUÇÃO DE UM DIAGRAMA DE FASES PARA O COMPLEXO Sso7dC8 + DNA** Adviser: José Ésio Bessa Ramos Jr. Co-Advisers: Márcio Santos Rocha and Marcelo Lobato Martins.

The proposal of studying biological polymers behavior in physiological solutions, has great interest to polymer physics due to its plentiful presence in living organisms. Proteins, lipids, deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA), are examples of biological polymers, completely essentials to life. The need to understand and be able to manipulate these polymers, especially for a possible diseases treatment, justify the intensive study of physical properties of biological polymers, mainly the study of DNA and cellular proteins. In addition to this practical interest, the study of macromolecules like DNA, a high molecular weight polyelectrolyte with a very well known structure, provides a broad range of information about the physics of polymers itself. Branched polymers, known as bottle brush polymers, has interesting and singular properties, and exemplifies a little studied polymer class. In the present work a study of phase behavior of a branched polymer, as function of side arms density and the amount of highly flexible polymer necessary to condense the branched polymers, causing the phase segregation, is shown. The branched polymer is configured by the DNA complexed with the modified protein Sso7d-C8, the polyethylene glycol was used as the highly flexible polymer. The phase diagram for the Sso7dC8 + DNA complex was obtained for two different polyethylene glycol molecular weights. Comparing the amount of flexible polymer, of different molecular weights, required to observe the phase separation is consistent with theoretical predictions. The behavior of non adsorbing polymers in solution depends on double layer interactions, van der Waals and depletion forces, mainly. Due to the asymmetry between solution components studied in this work, the phase behavior can be understood as caused by depletion interaction, first proposed by Asakura and Oosawa (1954), as expression of an entropic effect.

Capítulo 1

Introdução

Ter conhecimento do que existe a sua volta nunca foi suficiente para o ser humano, embora ecologicamente o reconhecimento do espaço físico tenha se provado uma necessidade urgente para a sobrevivência de qualquer espécie, os seres humanos vão além, interferindo e buscando insistentemente explicar o meio em que estão inseridos [1]. A humanidade manifesta suas capacidades cognitivas em função de questionamentos cada vez mais essenciais sobre o meio em que se encontra e com respeito ao próprio ser. A pesquisa científica que se faz hoje, resulta portanto de todo questionamento já feito pela humanidade e sua principal finalidade é explicar a natureza de forma que possamos interferir no mundo à nossa volta, garantindo que nossa espécie se estabeleça e continue evoluindo [2].

A física biológica é um dos ramos da ciência que têm se encarregado de buscar explicações cada vez mais fundamentais para sistemas biológicos, construindo modelos para descrever a natureza. Em escala macroscópica por exemplo, procura-se explicar a formação de padrões como em dinâmica de populações e propagação de doenças epidemiológicas. E em escala microscópica por exemplo, procura-se compreender o fenômeno individual de mobilidade celular, a caracterização de estruturas como o maquinário proteico e processos pertinentes à molécula de DNA¹.

Pode se dizer que o funcionamento e a estrutura de todos os sistemas biológicos a nível molecular são definidos pelas propriedades de biopolímeros [3]. Portanto a física de polímeros tem direcionado estudos intensivos para estas estruturas, conhecidas também como polímeros biológicos, o látex, as proteínas, polissacarídeos e o DNA - *deoxyribonucleic acid*, são exemplos dessa classe de polímeros. O DNA é sem dúvida um dos polímeros biológicos mais estudados, pois desempenha o papel principal no funcionamento de toda a vida na Terra [4]. Características importantes e a descrição de alguns tipos de polímeros estão descritas no capítulo 2.

A macromolécula de DNA se apresenta na forma de dupla hélice, estrutura elucidada por James Watson e Francis Crick em 1953. Esta foi considerada uma das descobertas mais importantes do século XX, desde então muito se evoluiu no quesito manipulação e decodificação genética. A aparente simplicidade da estrutura em si, principalmente se comparada a outros polímeros biológicos, como as proteínas, não remete à extrema complexidade dos processos em que atua, além de alta precisão na execução destes. Em pequenas partes da grande molécula de DNA, conhecidas como genes, estão dispostas as instruções para a formação e funcionamento de um indivíduo [5].

Para além de decifrar os mistérios com respeito à origem da vida, atualmente, o estudo, manipulação e compreensão desta molécula tem grande interesse prático para o desenvolvimento de possíveis tratamentos ou prevenção de doenças [4].

¹MARTINS M. L. **Física biológica** - notas de aula. UFV - Viçosa, MG. 2015. Não publicado.

Um gene é basicamente uma sequência específica de nucleotídeos que codifica uma determinada informação, a leitura deste código pode dar origem à construção de uma proteína, macromolécula que desempenha uma determinada função biológica [6]. Para idealizar com simplicidade o papel desempenhado pelo DNA em uma célula, imagine que esta incrível molécula é um grande chefe de cozinha, que detém as receitas de pratos cruciais para a sobrevivência de uma determinada comunidade. A célula, neste caso, representaria a comunidade, os pratos seriam macromoléculas que exercem determinada função biológica dentro ou fora desta comunidade. Quando se faz necessário, o pedido de um prato é feito ao DNA, ele busca em sua memória, por aquela determinada receita, que está armazenada em um gene e com a ajuda de muitas outras proteínas, que seriam a equipe da cozinha, a receita é preparada. Os ingredientes são aminoácidos, que a comunidade é responsável por obter e disponibilizar para os cozinheiros, que confeccionam o prato e o entregam à comunidade, onde cada proteína desempenha sua função específica retroalimentando o processo. A manipulação genética poderia ser vista como uma forma de mudar a memória do DNA, acrescentando ou modificando uma receita.

Uma molécula de DNA é utilizada no presente trabalho como cadeia principal de um polímero ramificado. No capítulo 4 são apresentadas propriedades e uma breve descrição dos biopolímeros utilizados neste trabalho.

Diversos biopolímeros requerem ainda muita atenção para que seu papel biológico seja completamente elucidado e sua atuação *in vivo* possa ser manipulada, por exemplo, para evitar ou tratar doenças [4], [7], [8].

A célula é um meio com altas concentrações de macromoléculas², tal que entre 20 e 30% do volume total de um organismo vivo é constituído por macromoléculas. Estudos de soluções que possam imitar a condição intracelular nos permitem compreender mais claramente a biologia de uma célula, pois o comportamento dinâmico, e mesmo a situação de equilíbrio nesse meio, não podem ser explicados pela observação do comportamento de componentes individuais e em baixas concentrações [9]. O estudo de soluções coloidais tem procurado desenvolver teorias e modelos para a compreensão de meios com altas concentrações moleculares [10].

Soluções poliméricas, ou dispersão de macromoléculas, são também conhecidas como soluções coloidais e são basicamente misturas em que as partículas dissolvidas apresentam dimensões características variando de alguns nanômetros (10^{-9} m) até alguns micrômetros (10^{-6} m). Observe, portanto, que dispersão coloidal é uma denominação muito geral, assim como grande parte de suas características físicas (no capítulo 2 é feito um breve esclarecimento dessa terminologia). O sangue humano, por exemplo, pode ser considerado uma dispersão coloidal já que as células vermelhas e glóbulos brancos se encaixam nas dimensões características [11].

Descrever e quantificar a dinâmica e a estabilidade de misturas coloidais, tem sido uma grande motivação para estudo de química e física de polímeros. O ponto de partida para este estudo consiste em considerar inicialmente os potenciais eletrostático (W_{el}) e de Van der Waals (W_{vdW}), teoria esta conhecida como DLVO. Estudos posteriores, propostos por Sho Asakura e Fumio Oosawa (1954), consideraram uma interação denominada depleção, em que o conceito de entropia é introduzido no estudo de dispersões de macromoléculas, que obteve sucesso em descrever sistemas que somente a teoria DLVO não explicava [11]. A teoria proposta por Asakura e Oosawa que se aplica ao sistema estudado nesta dissertação é apresentada no capítulo 3.

Interações entre colóides em solução podem ser aplicadas para explicar desde a

²O termo *macromolecular crowding*, ou seja, aglomeração macromolecular, é utilizado para descrever o meio intracelular, onde existem diversas macromoléculas em altas concentrações, interagindo e competindo por espaço [9].

agregação de proteínas do leite, para produção de iogurte por exemplo [11], até a segregação de material genético em organismos procariotos [12].

passando pela utilização de polímeros que possuem carga líquida, chamados polieletrólitos, para precipitar compostos contaminantes no tratamento de água [13].

O sistema considerado no presente trabalho é constituído por uma dispersão de polímeros neutros altamente flexíveis, o polietilenoglicol (PEG), e macromoléculas em uma configuração diferenciada, que consistem em polímeros de cadeia ramificada, denominados "bottle brushes". As macromoléculas em questão serão melhor descritas no capítulo 4. Esta dispersão coloidal foi feita em um solvente inerte em relação aos polímeros e favorável à dissolução de íons, o que caracteriza um bom solvente [11] e foi estudada considerando-se em especial as interações de depleção que ocasionam a separação de fases para os polímeros ramificados.

Modelos computacionais para polímeros de cadeias ramificadas são delimitados pela quantidade de parâmetros relevantes e resultados experimentais a respeito do comportamento desses polímeros, mesmo que qualitativamente, nos trazem informações a respeito dos parâmetros relevantes e como estes devem contribuir para a modelagem e construção de teorias [14]. Enquanto que as dificuldades experimentais em arranjar simetricamente, variar o espaçamento entre as cadeias laterais com precisão e promover variações na extensão da cadeia principal, necessitam ainda de árduo esforço para serem vencidas [15]. Algumas possibilidades para variar tais parâmetros e perspectivas de outras modificações estão expressas no capítulo 5 desta dissertação.

Polímeros de cadeia ramificada desempenham papéis muito importantes no corpo humano, esta é a motivação mais fundamental para estudarmos polímeros ramificados e suas características físicas mais fundamentais. O glicogênio é um exemplo deste tipo de polímero que pode ser localizado principalmente no fígado atuando como repositório de glicose para manter constante os níveis de açúcar no sangue, nos músculos, o glicogênio atua como fonte de energia para a contração das células musculares [6].

Um exemplo particularmente interessante de polímero com cadeia ramificada em sistemas biológicos é uma glicoproteína constituinte do fluido sinovial³ em mamíferos, chamada lubrificina, que atua quando adsorvida nas superfícies das cartilagens. A figura 1.1 é uma representação desta proteína. Os domínios adesivos se aderem à cartilagem e o domínio altamente ramificado fica imerso no fluido sinovial. A função da lubrificina é lubrificar os contatos diretos entre as cartilagens nas articulações [16].

Sabe-se que defeitos nas superfícies das cartilagens devido ao atrito repetitivo ou trauma, acometem grande parte de população mundial e o corpo humano tem uma capacidade muito limitada de regenerar células cartilaginosas, de forma que esse tipo de defeito, mesmo que pequeno, a longo prazo leva a uma enfermidade permanente, como a osteoartrite [17]. Portanto é crucial a compreensão das características físicas mais básicas neste tipo de sistema, onde um polímero ramificado atua como lubrificante e é basicamente responsável por evitar uma doença. Com o intuito de intervir evitando ou resolvendo este tipo de problema Banquy *et. al* [7], estudaram a possibilidade de obter um polímero de cadeia altamente ramificada que imita a lubrificina e suas propriedades, o que indica a possibilidade de se desenvolver fluidos sinoviais artificiais.

Glicoproteínas também são polímeros de cadeia ramificada constituídas por várias moléculas de açúcares. Ao se ligar diversas glicoproteínas em uma cadeia polimérica constituída por um ácido hialurônico forma-se um proteoglicano, que é uma estrutura com ramificações nas ramificações. Em geral, esta macromolécula tem como função conectar o meio extra celular e a membrana, funcionando como um "cimento flexível" entre as células. Em alguns casos tem a função de "âncora" para proteínas extracelulares [6].

³Fluido presente entre as articulações.

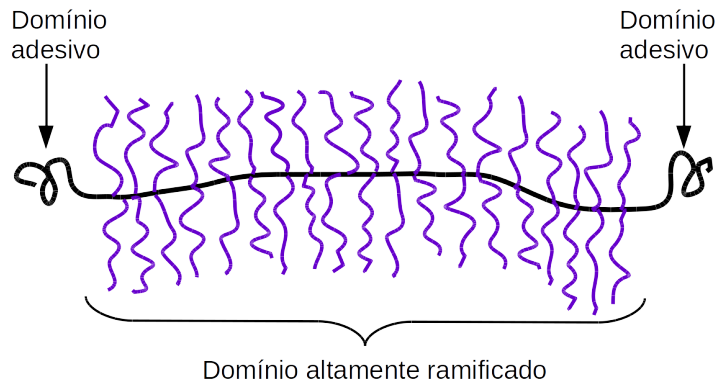


Figura 1.1: Cadeia ramificada imitando a proteína lubrificina. (Figura adaptada de [7])

A resiliência e flexibilidade do tecido cartilaginoso pode ser atribuída principalmente a proteínas do tipo proteoglicanos. O meio que envolve as células nesse tecido contém uma enorme quantidade de proteoglicanos que formam uma matriz gelatinosa na qual se incorporam as fibrilas de colágeno e a elastina [6].

Outro exemplo de polímeros altamente ramificados são os neurofilamentos, presentes em células nervosas, também chamadas de axônios. Os neurofilamentos são classificados como estruturas denominadas filamentos intermediários (FI), estes últimos se originam a partir da associação de várias proteínas e são responsáveis por manter a estabilidade estrutural das células e prover resistência à tensão externa, formando um tipo de rede no meio intracelular [6]. Cada tipo de célula possui filamentos intermediários constituídos por proteínas específicas e em quantidades que diferem entre células. No caso dos neurônios, 85% das proteínas intracelulares são constituintes dos neurofilamentos, enquanto que em outras células apenas 1% do total de proteínas é dedicado aos filamentos intermediários [8]. Essa abundância de neurofilamentos é certamente um indício de sua importância e motivação para seu estudo.

Doenças genéticas relacionadas com neurofilamentos podem advir da desorganização destes, que então, não seriam capazes de intermediar o transporte de componentes importantes através dos axônios. O acúmulo anormal e má organização de neurofilamentos é uma característica dos axônios em portadores de doenças neuro-motoras como a esclerose lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular espinhal infantil e neuropatia sensorial motora hereditária [8]. Algumas propriedades físicas de neurofilamentos em função da salinidade do meio e das características das cadeias laterais têm sido estudadas e os resultados ainda remetem a um desafio para a elaboração de modelos e teorias para polímeros de cadeia ramificada [18, 19].

Diante desta motivação para estudar os polímeros de cadeia ramificada, neste trabalho foi construído um diagrama de fases para um polímero ramificado em condições fisiológicas, cujo resultado se encontra no capítulo 4, estabelecendo uma relação entre a densidades de cadeias laterais e a condensação desse tipo de polímero por depleção, o que propicia uma ideia sobre as condições em que esse tipo de polímero se encontra em uma solução estável.

Capítulo 2

Polímeros

O estudo da física de polímeros é motivado principalmente por sua abundância em nosso cotidiano, pois podemos encontrá-los desde sistemas biológicos até em aplicações na indústria, por exemplo plásticos, impermeabilizantes e lubrificantes. A humanidade fez uso de polímeros naturais, como a seda, o látex e o amido, por séculos sem sequer saber que estavam lidando com macromoléculas [20], espera-se que a compreensão destes componentes nos permita manipulá-los da melhor forma possível.

Essencialmente, um polímero é uma grande molécula formada por muitas subunidades, chamadas monômeros, que se ligam através de reações químicas. Diz-se das subunidades que são moléculas mais simples, pois geralmente apresentam um peso molecular muito inferior ao do polímero como um todo. A molécula de DNA, por exemplo, é um polímero muito grande, constituído por mais de 10^7 subunidades [21].

2.1 Breve histórico da física de polímeros

Hermann Staudinger, foi o responsável por apresentar a atual definição de polímero, ao publicar em 1920 um trabalho no qual propôs que polímeros seriam longas cadeias formadas pela junção de repetidas unidades menores, o que resultava em moléculas de elevado peso molecular [22]. Em 1933 Staudinger usou pela primeira vez a palavra macromolécula para se referir a um polímero de alto peso molecular. Na época ele estudava a viscosidade de soluções de macromoléculas e associou o comportamento dessas moléculas em solução ao comportamento de colóides, acreditando que a formação de micelas, ou seja, o agregado de algumas macromoléculas, na forma de uma partícula, seria o motivo para o aumento da viscosidade [23].

Thomas Graham em 1861 usou pela primeira vez a palavra colóide, enquanto estudava a viscosidade de substâncias como o albumina, dextrina e amido. Graham criou o termo coloidal acreditando que denominava um estado físico da matéria, em que as moléculas se agregavam em micelas, que se mantinham em suspensão no solvente como se não interagissem quimicamente com este, sendo que os agregados se mantinham unidos por algum tipo de força “frágil” [24] (em sua descrição aparentemente não se tratavam de ligações covalentes). A ideia da dispersão coloidal como um estado físico da matéria não se sustentou, pois em alguns casos, inicialmente classificados como solução coloidal, as moléculas somente se separam do agregado, sob processos que não caracterizam uma mudança de estado físico [25].

A palavra colóide foi usada por algum tempo para denominar aglomerados de moléculas, sem se fazer distinção entre moléculas unidas por ligações covalentes, por exemplo na forma de polímeros, e moléculas mantidas juntas por interações não covalentes, na forma de micelas [25]. Atualmente essa terminologia tem sido aplicada de forma

mais geral a partículas, ou macromoléculas, que compartilham propriedades físicas em função das dimensões características que variam de alguns nanômetros (10^{-9} m) até alguns micrômetros (10^{-6} m).

Nos anos que se seguiram ao trabalho de Staudinger (1920), a física de polímeros, também chamada de física estatística de macromoléculas, tomou forma como um ramo da ciência. Um marco para as teorias e modelos que se sucederam foi a observação do fenômeno de alta elasticidade, característica de macromoléculas semelhantes à borracha. Observou-se que ao se distender uma amostra desses polímeros as cadeias passavam da conformação contorcida (ou *coil*)¹, para a conformação estirada. Existem diversas formas de se dispor as moléculas contorcidas enquanto que a forma estirada é única, logo, o processo de esticá-las implicaria em uma diminuição na entropia do sistema e um conseqüente aumento da energia livre. A partir dessa observação os cientistas envolvidos nos experimentos (W. Kuhn, E. Guth e G. Mark) se deram conta de que a estatística da conformação das macromoléculas, seria capaz de determinar as propriedades físicas dos materiais de origem polimérica [3].

Nas décadas que se seguiram a estatística das macromoléculas, ou física de polímeros, recebeu massiva contribuição de nomes como P. J. Flory nos Estados Unidos da América, M. V. Volkenstein e I. M. Lifshitz na antiga União soviética, S. F. Edwards no Reino Unido e P. G. de Gennes na França. Em 1953 com a descoberta da estrutura de dupla hélice da molécula de DNA, por James Watson e Francis Crick, foi dado um impulso ainda maior ao estudo das conformações de macromoléculas [3].

2.2 Tipos de cadeias

A ação de construir um polímero é chamada polimerização. Para se polimerizar uma cadeia é preciso que os monômeros tenham pelo menos dois sítios de ligação. O sítio de ligação é o grupo funcional da molécula que tem disponibilidade para se ligar a outras moléculas [3]. A figura 2.1-a) representa um monômero A com dois sítios de ligação e 2.1-b) representa um monômero com três sítios de ligação.

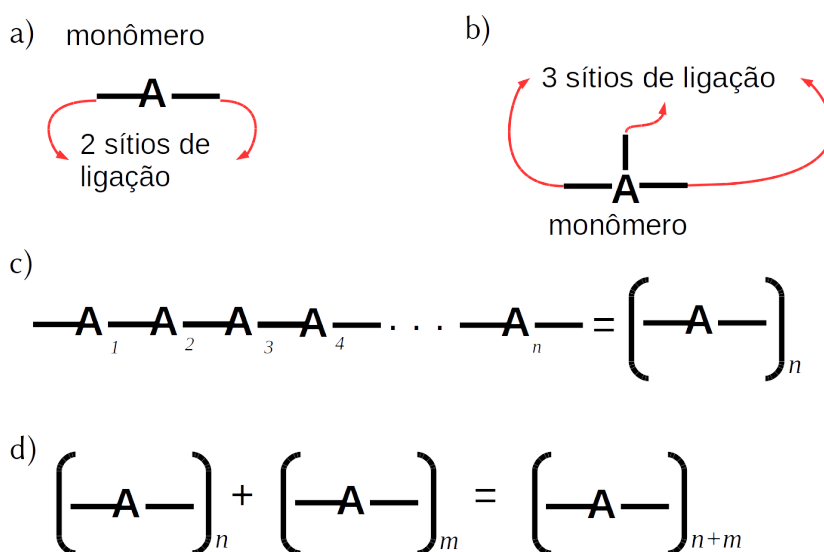


Figura 2.1: Representação de sítios de ligação em um monômero e as formas de polimerização de uma cadeia.

¹A palavra *coil* remete à configuração de um pedaço de barbante deixado cair sobre uma mesa.

As cadeias poliméricas podem se formar de duas formas: pela adição consecutiva de monômeros, (modelo na figura 2.1-c)), ou pela fusão de cadeias com valências livres nas extremidades, (modelo na figura 2.1-d)). As cadeias param de crescer depois da adição de um monômero monovalente, ou seja com um único sítio de ligação, ou pelo esgotamento de monômeros disponíveis na solução [3]. O grau de polimerização, n , quantifica o número de monômeros em uma cadeia e é um fator que influi em importantes propriedades dos polímeros [20].

Os chamados heteropolímeros, são polímeros provenientes da combinação de diferentes tipos de monômeros em uma única cadeia. As propriedades dos heteropolímeros podem depender da proporção de cada monômero e da sequência em que esses monômeros estão alocados ao longo da cadeia. A grande maioria dos biopolímeros são heteropolímeros, por exemplo as proteínas [20]. (Ao longo desta dissertação não se faz essa distinção de terminologia).

Algumas propriedades de materiais poliméricos (ou soluções de polímeros) são provenientes da arquitetura do polímero [20]. Podemos destacar algumas arquiteturas possíveis para as cadeias poliméricas: lineares, figura 2.2-a), que se dão pela associação de monômeros que apresentam um ou dois sítios de ligação, cadeias com ligações cruzadas (*cross-links*) 2.2-b) e cadeias ramificadas, figura 2.2-c).

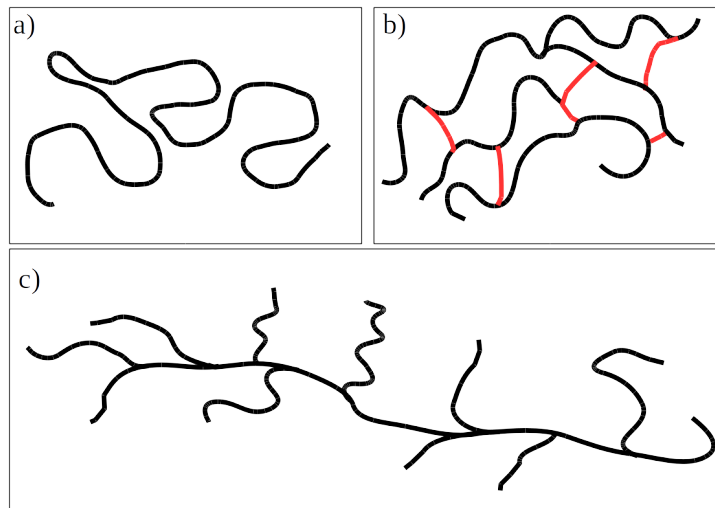


Figura 2.2: a) Cadeia linear, b) cadeia com ligações cruzadas, ou *cross-links*, destacadas em vermelho, e c) cadeia ramificada.

Polímeros que apresentam conexões entre segmentos da cadeia, chamadas *cross-links*, como o representado na figura 2.2-b), podem se originar a partir de um monômero com mais de dois sítios de ligação em um segmento da cadeia que portanto, pode se ligar a outro segmento da mesma cadeia ou a uma cadeia próxima [3].

Muitas conexões entre cadeias geram um tipo de macromolécula que pode ser chamada rede polimérica, apresentando especificidades bastante interessantes. Por exemplo, um alto grau de ligações cruzadas entre os polímeros em uma solução pode levar à solidificação dessa solução, ou à constituição de um gel. Ao se preparar uma gelatina em casa, o que propicia a mudança do líquido aquecido para um sólido gelatinoso é a intensa conexão entre as cadeias poliméricas das fibrilas de colágeno que se estabelecem na solução após a diminuição da temperatura [20].

2.2.1 Polímeros de cadeia ramificada

Os polímeros ramificados, que são objeto de interesse neste trabalho, podem se manifestar de diversas formas, principalmente em função das muitas possíveis associações de monômeros que disponibilizam três ou mais sítios de ligação. Inicialmente as cadeias ramificadas podem ser classificadas como tipo pente - *comb-like*, tipo estrela - *star-like* e randomicamente ramificada [3]. Esses tipos de polímeros estão esquematizados na figura 2.3.

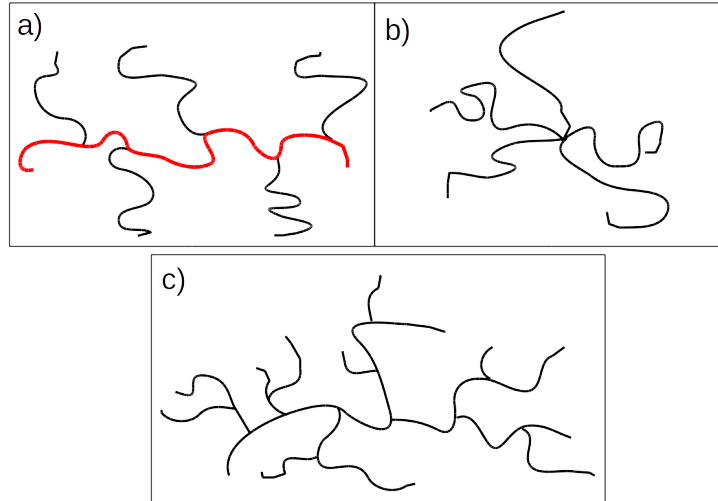


Figura 2.3: a) Polímero tipo pente, b) polímero tipo estrela e c) cadeia randomicamente ramificada.

Uma propriedade interessante dos polímeros de cadeia ramificada é que estes apresentam um tamanho médio menor que cadeias lineares com o mesmo grau de polimerização. Pode se esperar a partir dessa característica que os efeitos de exclusão de volume em cadeias ramificadas sejam mais fortes que em cadeias lineares [3].

Se for possível determinar uma cadeia a partir da qual as ramificações despontam, esta será chamada cadeia principal, ou coluna do polímero ramificado [20], a cadeia representada em vermelho na figura 2.3-a) seria considerada a coluna desse polímero. Em uma cadeia randomicamente ramificada é menos provável que se faça essa identificação, enquanto em um polímero tipo pente, ou tipo escova, a cadeia principal é bem determinada. O ato de acondicionar uma cadeia lateral à cadeia principal é geralmente denominado enxerto.

A definição de um polímero altamente ramificado se deve ao fato de que as cadeias laterais são enxertadas ao longo da cadeia principal relativamente próximas umas das outras, isso quando essa distância é comparada ao tamanho total do polímero. Nessa conformação os polímeros apresentam propriedades diferentes de polímeros fracamente ramificados [26]. Por exemplo, polímeros altamente ramificados possibilitam o estiramento da cadeia principal somente com base nas interações de exclusão de volume entre as cadeias laterais densamente enxertadas [15]. Um polímero de cadeia altamente ramificada em sua configuração tridimensional se assemelha a uma escova cilíndrica, por esse motivo podem ser chamados de “*bottle brushes*” moleculares, a figura 2.4 representa um polímero do tipo “*bottle brush*”.

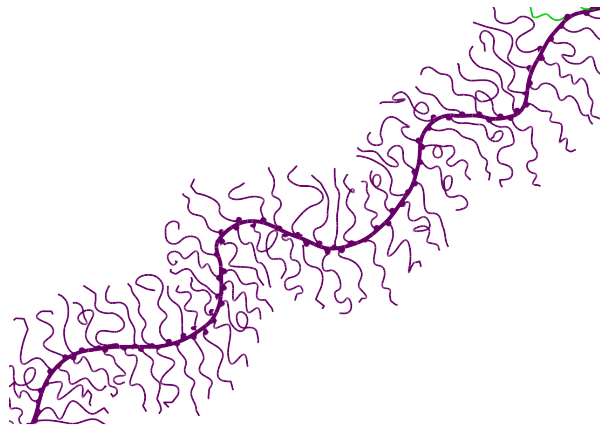


Figura 2.4: Configuração de um polímero com a cadeia altamente ramificada.

2.3 Polímeros em solução

Soluções de polímeros podem ser encontradas em dois regimes, são eles: diluído e semi-diluído. Para categorizar uma solução polimérica em um desses regimes é preciso analisar a concentração em massa do polímero c , dada pela razão entre a massa total de polímero em solução e o volume da solução [20].

Uma alternativa à medida da concentração é definir a fração do volume ϕ , obtida pela razão entre o volume ocupado pelo polímero e o volume da solução, que pode ser dada também em termos da porcentagem em massa w . É possível ainda relacionar a fração do volume e a concentração com a densidade do polímero, ρ , da seguinte forma:

$$\phi = \frac{c}{\rho} = c \frac{v_{mon} N}{M_{mon}}, \quad (2.1)$$

onde N é o número de Avogadro, v_{mon} é o volume e M_{mon} é a massa molar do monômero [20].

A extensão que uma única molécula ocupa no volume da solução é o que chamamos de volume preenchido, V . Observando a figura 2.5 é possível ter uma ideia do volume preenchido pelas moléculas representado por circunferências em torno das cadeias. O volume preenchido por uma cadeia do polímero em solução é maior que o volume ocupado de fato pela cadeia polimérica [20].

O volume real de uma cadeia com n monômeros é dado por nv_{mon} . A fração ocupada por uma única molécula no volume preenchido é chamado fração de sobreposição, ou *overlap* ϕ^* , equação 2.2, e a concentração correspondente é chamada concentração de sobreposição c^* , equação 2.3, [20].

$$\phi^* = \frac{nv_{mon}}{V} \quad (2.2)$$

$$c^* = \frac{\rho nv_{mon}}{V} \quad (2.3)$$

Para uma solução em que a fração do volume de polímero é menor que a fração de sobreposição ($\phi < \phi^*$), diz-se que esta se encontra em regime diluído, figura 2.5-a), as cadeias estão longe umas das outras e as moléculas do polímero se movem livremente pelo solvente, de forma que praticamente não interagem. A maioria das propriedades de soluções de polímeros diluídas são parecidas com as propriedades do solvente [20].

Em uma solução em que a fração do volume de polímero é igual à fração de sobreposição ($\phi = \phi^*$), o volume preenchido (V), pelo total de cadeias ocupa toda a extensão da solução [20], situação representada na figura 2.5-b).

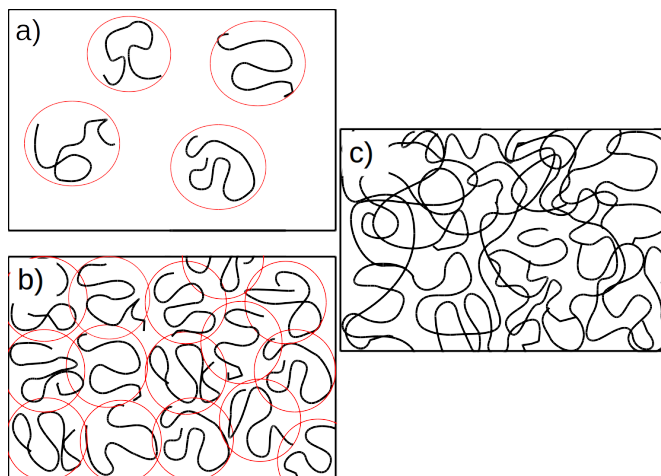


Figura 2.5: Possíveis regimes de soluções de polímeros: a) diluído $\phi < \phi^*$. b) sobreposição - $\phi = \phi^*$. c) semi-diluído $\phi > \phi^*$. Figura adaptada de [20]

Para soluções em que a fração do volume de polímero é maior que a fração de sobreposição ($\phi > \phi^*$), a solução é dita semi-diluída, nessas condições as cadeias se encontram menos contorcidas e se superpõem, com isso o solvente ocupa a maior parte do volume da solução. No entanto as moléculas do polímero são responsáveis por ditar a maior parte das propriedades físicas das soluções semi-diluídas, por exemplo a viscosidade [20].

O volume preenchido por uma cadeia (V) pode mudar em função da concentração de polímero, pois o tamanho da cadeia dispersa na solução deve mudar, essa recorrência pode fazer com que as definições dadas para V , e conseqüentemente para ϕ^* , pareçam vagas, no entanto esta se faz necessária já que a sobreposição de cadeias ocorre para uma gama de concentrações, em função de outros parâmetros da solução [20].

Como dito anteriormente, uma cadeia ramificada define um volume preenchido menor que uma cadeia linear de mesmo peso molecular, portanto a fração de sobreposição para o polímero ramificado é maior que a fração de sobreposição para a cadeia linear $(\phi^*)_{ramificado} > (\phi^*)_{linear}$. Uma consequência dessa propriedade no presente trabalho é que de acordo com que os polímeros ramificados são montados, ou seja, o complexo DNA+Sso7d-C8 vai se formando, as macromoléculas resultantes interagem menos entre elas, efetivando a atuação do polímero neutro como agente depletante.

Uma cadeia polimérica em solução adquire uma conformação tridimensional que pode ser caracterizada pela distância quadrática média entre suas extremidades, ou distância ponta-à-ponta quadrática média, R_{ee} , representado na figura 2.6, pelo raio de giro da cadeia R_g , representado na figura 2.7, e pelo comprimento de persistência da cadeia, l_p .

É possível obter um valor para a distância ponta-à-ponta quadrática média de um polímero R_{ee} , em função das posições do monômero inicial (\vec{r}_0) e final \vec{r}_f ²:

$$R_{ee} = \sqrt{\langle (\vec{r}_f - \vec{r}_0)^2 \rangle}. \quad (2.4)$$

O raio de giro de um polímero em solução R_g , figura 2.7, consiste em uma abstração, caso tivesse a forma de uma esfera o polímero ocuparia um volume igual a $\frac{4}{3}\pi(R_g)^3$. Podemos equacionar o raio de giro do polímero em função da posição de seu centro geométrico \vec{r}_g da seguinte forma²:

²ROCHA, M. S. Introdução à mecânica de polímeros. In: ROCHA, M. S. **Interações DNA-ligantes: uma introdução**. Viçosa, MG, 2014. Não publicado

²Idem.

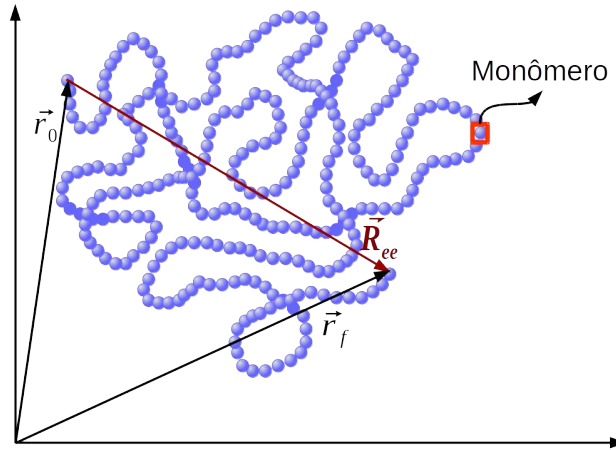


Figura 2.6: Em vermelho o vetor que representa a distância ponta-à-ponta de um polímero. Em destaque um monômero, a subunidade constituinte de um polímero.

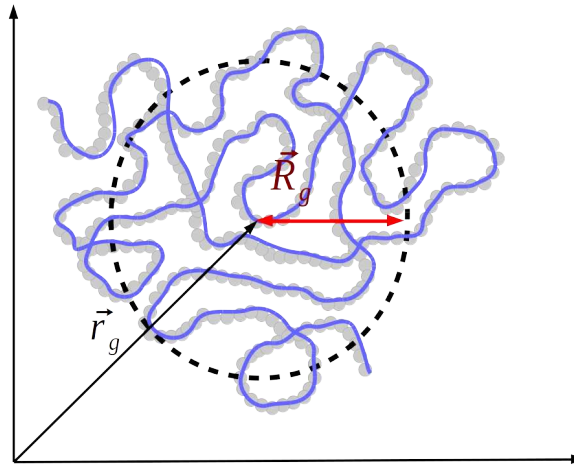


Figura 2.7: A seta em vermelho representa o raio de giro de um polímero. A linha em azul é uma representação em linha do polímero.

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{L} \int_0^L (\vec{r} - \vec{r}_g)^2 dl}, \quad (2.5)$$

onde \vec{r} é o vetor que localiza cada ponto na linha que representa o polímero, (isso é uma idealização no espaço contínuo que remete a cada monômero do polímero real). O comprimento total da cadeia polimérica estirada é chamado comprimento de contorno L e dl é um elemento de comprimento ao longo da cadeia polimérica. A definição para o centro geométrico é dada por²,

$$\vec{r}_g = \frac{1}{L} \int_0^L \vec{r} dl. \quad (2.6)$$

A propriedade que caracteriza a flexibilidade, ou rigidez, de um polímero é seu comprimento de persistência, l_p . Quanto maior seu comprimento de persistência menor sua flexibilidade e vice-versa. Essa propriedade é função da quantidade de dobras que

²ROCHA, M. S. Introdução à mecânica de polímeros. In: ROCHA, M. S. **Interações DNA-ligantes: uma introdução**. Viçosa, MG, 2014. Não publicado

possui o polímero. Em geral, a ligação entre dois monômeros permite que se movimentem em relação um ao outro. A variação do ângulo de torção, φ , entre os monômeros concede a característica de flexibilidade ao polímero. Para ter uma ideia do ângulo de torção, imagine que se o ângulo φ for nulo para todos os monômeros, a cadeia estaria em um mesmo plano. Além do ângulo de torção, é preciso se considerar o ângulo de ligação, θ , entre os átomos que constituem cada monômero da macromolécula. Se o ângulo de ligação, θ é fixo e o ângulo de torção é nulo, a cadeia se encontra totalmente estirada [20].

Os possíveis ângulos de torção e de ligação são determinados pela estrutura química dos polímeros. Alguns polímeros, por exemplo o polietilenoglicol, são altamente flexíveis, isso significa que o polímero é flexível mesmo em pequenas escalas de comprimento, ou seja a movimentação entre os monômeros é facilitada, tanto θ quanto φ assumem valores muito maiores que a unidade [20].

Outros são considerados semi-flexíveis, isso quer dizer que o polímero tem grande limitação de movimento em pequenas escalas. O movimento relativo entre os monômeros adjacentes é pequeno, mas quando observado em grandes escalas de comprimento o polímero apresenta flexibilidade. Os ângulos de ligação θ , assumem valores menores que a unidade para um polímero semi-flexível.

A dupla hélice de DNA, por exemplo, é considerada um polímero semi-flexível. Para se ter uma ideia das escalas de comprimento em questão: o comprimento de persistência, l_p , da dupla hélice do DNA é aproximadamente 50nm, [20], enquanto o espaçamento entre monômeros é 0,34nm. Ou seja, seria preciso olhar uma sequência de pelo menos 150 pares de base na dupla fita de DNA para se perceber uma dobra na molécula.

2.3.1 Interações entre polímeros

Ao considerarmos as interação entre colóides, ou polímeros, em solução, entende-se que forças iônicas e de Van der Waals, além da força de depleção, atuam entre as partículas em solução. A força iônica, ou interação eletrostática, depende não só da carga efetiva das partículas em suspensão mas também da existência de íons dispersos na solução. Essa interação é mediada pelo potencial eletrostático (W_{el}) que decai exponencialmente com o afastamento entre os objetos carregados, para uma solução em que íons se encontram dispersos esse potencial é repulsivo. A interação eletrostática é bem conhecida e existem vários modelos para estudar polieletrólitos em solução, uma vasta complementação teórica a respeito de polieletrólitos pode ser encontrada em *Polyelectrolytes* [27].

Para uma grande aproximação entre as macromoléculas se manifestam forças de Van der Waals, a atração devido a esta interação é muito forte para distâncias de separação muito pequenas. O potencial W_{vdW} , que media a interação, se deve à oscilação cooperativa entre as nuvens eletrônicas dos átomos quando as moléculas estão muito próximas [11].

Na década de 40, a teoria DLVO definiu um potencial total para a interação entre colóides. Proposta simultaneamente por Derjaguin e Landau, na antiga USSR, e Verwey e Overbeek, na Holanda, a teoria adota a aditividade dos potenciais estabelecidos para as forças iônicas e de Van der Waals:

$$W_{DLVO} = W_{el} + W_{vdW}. \quad (2.7)$$

Dessa expressão é possível inferir que o comportamento de fase das dispersões coloidais advém da concorrência entre as interações eletrostáticas repulsivas de longo alcance e as interações atrativas de curto alcance de van der Waals. Havendo uma estabilidade no potencial total, isto é, um equilíbrio entre as interações eletrostáticas e de van der Waals, a dispersão se mantém [11].

O excesso de íons em solução, por exemplo, ocasiona uma blindagem na repulsão eletrostática e as moléculas podem se agregar, formando-se condensados que caracterizam a existência de duas fases na solução. Contudo a teoria DLVO não explica todas as situações de condensação, como ocorre por exemplo com a molécula de DNA em células procariotas e, em maior escala, a forma como as células vermelhas do sangue de um paciente enfermo coalescem [11], para estes sistemas a força de depleção é capaz de fornecer uma explicação. Boström *et al.* (2001) [28], afirma que para condições fisiológicas a teoria DLVO, sem as devidas complementações, é falha.

2.4 Proteínas

As proteínas são polímeros (heteropolímeros) cujos monômeros constituintes são aminoácidos, que por sua vez são pequenas moléculas orgânicas. Cada aminoácido apresenta em sua estrutura um carbono α , um átomo de hidrogênio (H), um grupo amina, um grupo carboxil e finalmente um radical (R). O radical é a porção que difere os tipos aminoácidos, (algumas vezes o radical pode ser chamado de cadeia lateral do aminoácido). Existem 20 aminoácidos, ou seja 20 possíveis subunidades, para se construir as proteínas (existem outros 40 aminoácidos na natureza que em geral não aparecem na constituição funcional das proteínas) [6].

Ao se polimerizar aminoácidos o carbono (C) de um grupo carboxil se liga covalentemente ao nitrogênio (N) do grupo amina no aminoácido seguinte, liberando uma molécula de água, a ligação covalente C-N é conhecida como ligação peptídica, por esse motivo as proteínas também são chamadas peptídeo, ou ainda polipeptídeo. À sequência específica de aminoácidos que configura uma proteína dá-se o nome de estrutura primária [6].

O resultado das interações entre os monômeros em polímeros biológicos é que estes adquirem uma conformação tridimensional característica, tal que essas macromoléculas mantêm seu raio de giro, (R_g), e distância ponta a ponta, R_{ee} , aproximadamente constantes (existe uma flutuação persistente nas posições dos monômeros devido aos choques com moléculas do solvente, por esse motivo as grandezas relevantes devem ser definidas em termos de médias). Para que uma proteína seja capaz de exercer sua atividade biológica, ou seja, se torne funcional, a cadeia linear (ou possivelmente as cadeias), deve estar arranjada em um forma tridimensional precisa, única, predeterminada para assumir um papel específico [6].

Para as macromoléculas biológicas, por exemplo as proteínas, diz-se que sua conformação funcional (ou forma nativa) em uma solução fisiológica se mantém estável. Isto significa dizer que em uma solução onde a força iônica, pH e temperatura (T) se mantêm dentro de uma faixa, que é característica para cada proteína, no interior de uma célula por exemplo, as posições dos aminoácidos que constituem essa macromolécula (principalmente em relação à posição de suas cadeias laterais) são mantidas aproximadamente constantes [6].

Quando ocorre interação entre aminoácidos não adjacentes na cadeia linear de um peptídeo originam-se as chamadas estruturas secundárias que podem se apresentar como hélices, chamadas α -hélices ou como associações coplanares entre seguimentos do polímero, denominadas folhas- β . Por exemplo leucina, metionina e glutamato são aminoácidos comumente encontrados em estruturas do tipo α -hélices [6].

As interações de van de Waals, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, mas principalmente as ligações de hidrogênio, são responsáveis por estabilizar a estrutura das proteínas, atuando entre partes de uma mesma cadeia e mantendo uma ordenação local, ou seja, a organização de uma dada porção do polímero em forma de folhas- β ou α -hélices, (em al-

Em algumas situações ligações covalentes podem unir dois segmentos do polímero - pontes de dissulfeto). A interação entre duas estruturas secundárias (por exemplo, duas α -hélices), permitindo que estas permaneçam juntas, dá origem à chamada estrutura terciária, que é basicamente um grau de organização mais global envolvendo partes do polímero ou o polímero como um todo. Diz-se que a proteína encontra-se desnaturada no caso de ter perdido a sua forma funcional, que pode ocorrer caso as estruturas secundárias e terciárias sejam desfeitas [6].

Capítulo 3

Força de depleção

Primeiramente estudada por Sho Asakura e Fumio Oosawa em 1954, a interação entre corpos imersos em soluções de macromoléculas, conhecida como interação de depleção, exprime o efeito entrópico experimentado por estes corpos em função da exclusão de volume que sofre a solução de macromoléculas [29].

De um ponto de vista da física mais fundamental, pode se dizer que a força de depleção que atua entre corpúsculos que se encontram dispersos em soluções poliméricas (ou em meio a pequenas partículas), é uma força ocasionada pela pressão da solução, portanto possui características em comum com outros sistemas [11]. Antes de explicitar as características e efeitos da interação de depleção observemos no experimento de Von Guericke, um exemplo clássico da força em função da pressão exercida pelo meio.

O experimento de Von Guericke

Para exprimir sua visão a respeito do vácuo, em 1657 Otto Von Guericke juntou dois hemisférios ociosos feitos de cobre, e retirou o ar de seu interior originando entre eles um vácuo parcial. Os hemisférios foram preparados para serem puxados por cavalos com a intenção de separá-los. Apesar de exercerem grande força sobre os hemisférios, os cavalos não foram capazes de separá-los. Há alguma força atuando sobre os hemisférios que os mantém unidos, embora nada exista entre eles. O experimento de Von Guericke mostrou que as moléculas de ar em torno dos hemisférios os empurravam de alguma forma contra a força exercida pelos cavalos, atualmente atribuímos esse efeito à pressão atmosférica. A pressão osmótica em uma solução é capaz de desempenhar um papel semelhante à pressão atmosférica neste experimento. (Adaptado de *Colloids and the Depletion Interaction*, [11]).

3.1 Interação entre partículas e macromoléculas em solução

Consideremos duas placas paralelas imersas em uma solução de macromoléculas, Asakura e Oosawa [29], definiram que para a situação em que a distância, h , entre estas placas se faz menor que o diâmetro, d , das moléculas em solução, nenhuma destas pode permear a região entre as placas. Com isso passa a existir entre as placas uma fase de solvente puro, enquanto a solução ao redor das placas está permeada por macromoléculas.

Estabelece-se então uma diferença de pressão entre a região que entremeia as duas placas e seu entorno. Portanto passa a atuar de fora pra dentro na superfície de cada placa,

uma força associada à diferença entre a pressão osmótica da solução de macromoléculas, Π_0 , e a pressão osmótica do solvente puro, Π_s .

Sob a luz desse raciocínio, Asakura e Oosawa definiram que a força, F , atuando entre duas partículas imersas em uma solução de macromoléculas, (de uma única espécie e consideravelmente diluída) pode ser obtida da seguinte forma:

$$F = kTN \frac{\partial \ln Q}{\partial h}, \quad (3.1)$$

$$Q = \int_V e^{-\frac{v(x,h)}{kT}} dx, \quad (3.2)$$

onde N denota o número total de macromoléculas do soluto, k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura da solução. V é o volume total da solução e $v(x,h)$ é a energia potencial de uma macromolécula posicionada em x em virtude de sua interação com as partículas em suspensão, quando estas estão separadas por uma distância h [29].

3.1.1 Interação entre partículas esféricas e macromoléculas em solução

Para se aplicar a teoria a um sistema real, fazendo a consideração mais simples possível, idealizemos uma dispersão de partículas esféricas, impenetráveis, cujo diâmetro é D , (esferas maiores representadas na figura 3.1) em uma solução de macromoléculas, que em solução assumem uma conformação aproximadamente esférica, representadas pelas esferas menores na figura 3.1, com diâmetro d .

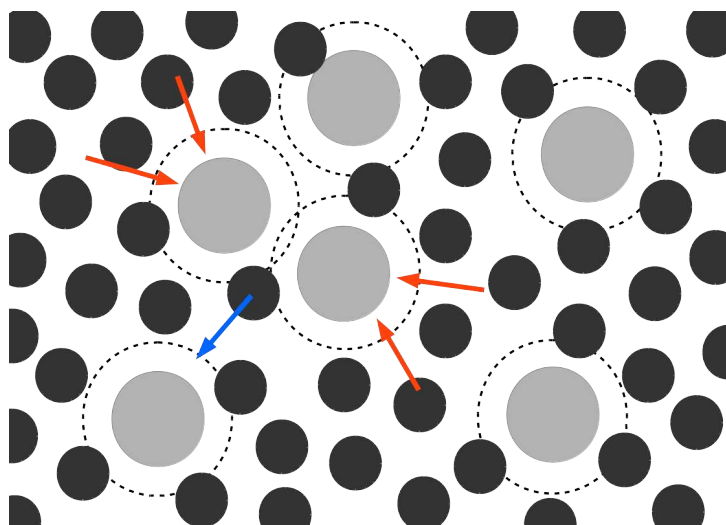


Figura 3.1: A região depletora é delimitada pela linha pontilhada. As setas na cor laranja indicam a atuação da pressão osmótica sobre as partículas maiores.

A maioria das suspensões coloidais consiste em uma mistura de partículas que podem ser consideradas rígidas, entre as quais a interação de exclusão de volume, ou repulsão estérica, é bastante relevante. Isto quer dizer simplesmente que duas partículas não ocupam o mesmo lugar simultaneamente [10].

Caso as partículas esféricas em suspensão não interajam com as macromoléculas, a função Q na equação 3.2 deve ser interpretada simplesmente como o volume disponível para cada macromolécula se mover livremente pela solução. Portanto, é possível obter-se Q subtraindo do volume total da solução o volume em que as macromoléculas não podem adentrar impedidas pelas partículas maiores [30].

É preciso considerar aqui a exclusão de todas as configurações para as macromoléculas que as levariam a adentrar a região delimitada pelas partículas maiores, efeito de exclusão de volume, também chamada repulsão estérica. Devido a essa exclusão de configurações a probabilidade de encontrar macromoléculas em torno das partículas é menor, dando origem ao que se denomina camada de depleção (ou região depletora) em volta das partículas. Esta limitação para a configuração das macromoléculas implica uma diminuição na entropia [11].

Veja na figura 3.1 a representação da região depletora delimitada pela linha pontilhada em torno das partículas maiores, em uma solução de macromoléculas aproximadamente esféricas e menores. A pressão osmótica da solução de macromoléculas tende a aproximar duas regiões depletoras expulsando as macromoléculas da região entre as partículas maiores.

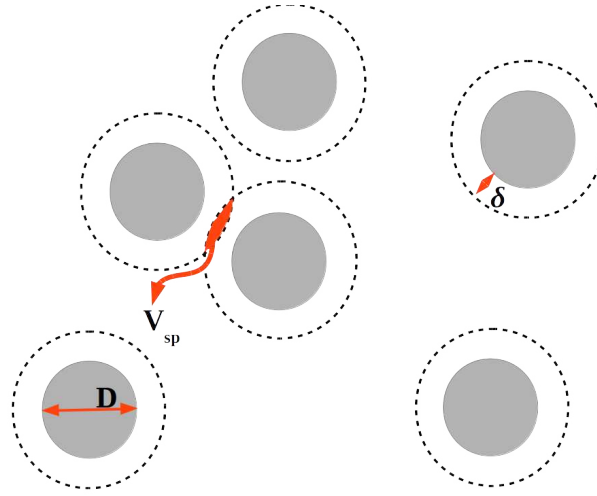


Figura 3.2: Representação das dimensões relevantes para a interação de depleção.

Em geral a espessura δ da região depletora, representada na figura 3.2, deve ser definida para cada sistema considerando-se a flexibilidade da macromolécula e a rigidez da partícula, assim como suas respectivas dimensões. No caso mais simples, aqui considerado, a espessura da região depletora é igual ao raio das partículas menores: $\delta = \frac{d}{2}$ [11].

O volume delimitado pela interseção entre as regiões de depleção, é denominado volume de sobreposição, V_{sp} , e está representado na figura 3.2 pela porção na cor laranja. Observe que, de acordo com que as partículas maiores se aproximam, ou seja, a distância entre seus centros (h) diminui, o volume de sobreposição V_{sp} aumenta, portanto o volume disponível para as macromoléculas na solução aumenta.

A pressão osmótica devido à solução de macromoléculas atua igualmente sobre a superfície das partículas, com exceção de uma área A na região entre as duas partículas, que está em contato apenas com o solvente puro. Nesse caso obtemos a seguinte equação para a força de depleção que atua sobre cada partícula esférica:

$$F = -\Pi_0 A, \quad (3.3)$$

$$A = \frac{\pi}{4}[(D + d)^2 - h^2], \quad D \leq h < D + d \quad (3.4)$$

$$A = 0, \quad h \geq D + d.$$

A corresponde à área de seção circular que corta o volume de sobreposição V_{sp} exatamente no meio da distância entre as duas partículas $\frac{h}{2}$, Π_0 é a pressão osmótica ideal da solução de macromoléculas, ou corpo da solução [30].

O potencial devido a essa força F pode então ser escrito da seguinte forma:

$$W(h) = -\Pi_0 V_{sp}, \quad (3.5)$$

ou então em termos das distâncias relevantes,

$$\begin{aligned} W(h) &= -\Pi_0 \frac{\pi}{12} [2(D+d)^3 - 3h(D+d)^2 + h^3], & D \leq h \leq D+d \\ W(h) &= 0, & h \geq D+d. \end{aligned} \quad (3.6)$$

Da expressão para o potencial de interação $W(h)$, obtém-se a confirmação de que a força é atrativa, cujo alcance é igual a d , ou seja, 2δ , e nesse caso portanto, as esferas tendem a se aproximar [11].

3.2 Efeitos de forma em interações de depleção

A interação de depleção depende do volume de sobreposição, que por sua vez depende da região depletora definida em torno das partículas, que se define em função de características mecânicas das macromoléculas depletantes, como flexibilidade e raio de giro.

A flexibilidade e as interações entre seguimentos afastados de uma cadeia polimérica definem a forma das macromoléculas interagentes em solução, tanto depletadas quanto depletantes. A concentração do agente depletante também é um fator que influencia a interação, através da pressão osmótica da solução. No entanto para uma dada concentração do agente depletante a força de depleção depende apenas do volume de sobreposição [11].

O alcance da força e o potencial de depleção experimentam um aumento de acordo com que se aumenta a assimetria entre os constituintes da solução [30], pois o volume de sobreposição, V_{sp} , depende do tamanho e formato dos colóides em suspensão. Para cada formato geométrico dos corpúsculos interagentes o potencial de depleção assume uma forma diferente, embora dependa sempre da pressão osmótica da solução, Π_0 . O livro *Colloids and the Depletion Interaction*, [11], apresenta os cálculos para o potencial de depleção que atua em dispersões coloidais para algumas geometrias de partículas interagentes.

Como dito anteriormente, a rigidez das partículas dá origem à região depletora que implica uma diminuição na entropia, S , das macromoléculas. Sob o ponto de vista entrópico (vamos desconsiderar por hora as demais interações possíveis entre partículas), o comportamento de fase de uma suspensão coloidal é obtido maximizando-se a entropia, o que irá minimizar a energia livre $\mathcal{F} = U - TS$. A energia de interação, U , é nula para as partículas consideradas nesse caso [10].

O volume livre de uma suspensão composta por uma mistura de macromoléculas é maximizado quando os componentes se separam. Isso ocasiona um aumento na entropia translacional das macromoléculas, ao custo de uma diminuição na entropia da mistura como um todo, podemos chamar esse fenômeno de ordenação entropicamente dirigida [10].

Em uma mistura de componentes acentuadamente assimétricos portanto, a interação de depleção é intensificada, tornando-se possível separar partículas de diferentes tamanhos e formatos [30], para uma certa concentração dos componentes nessa mistura.

A separação dentre partículas esféricas e cilíndricas induzida por polímeros está esquematizada na figura 3.3, nesse caso dizemos que os polímeros (curvas representadas em preto na figura abaixo) são agentes depletados. A separação é um fenômeno reversível,

pois ocorre para algumas concentrações do agente depletante, acima, ou abaixo, das quais a mistura é mantida [11]. Esta característica permite a elaboração de um diagrama de fases para misturas coloidais.

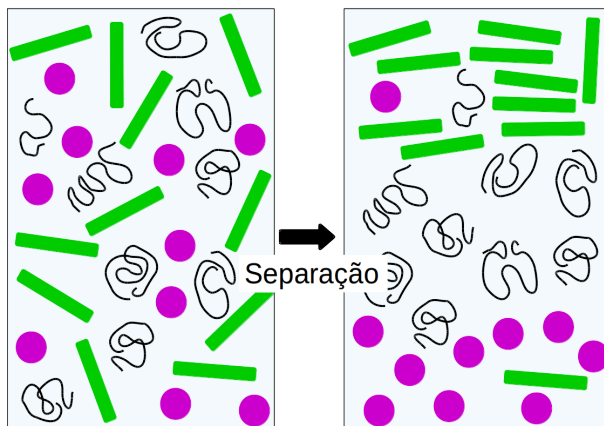


Figura 3.3: As partículas de diferentes formatos são induzidas a se separar sob a influência de polímeros, representados pelas curvas pretas. (Adaptado de [11]).

A separação de partículas coloidais em função de sua forma tem ganhado atenção devido às várias aplicações nanotecnológicas, como por exemplo em dispositivos óptico-eletrônicos, um vislumbre de tais aplicações e esclarecimentos sobre os procedimentos experimentais podem ser encontrados em [11, 31, 32].

Há a formação de fases condensadas devido à interação entre partículas e macromoléculas, para situações em que a força de depleção é suficientemente grande para vencer possíveis repulsões entre as partículas. A fase condensada ocorre somente sob certas concentrações de macromoléculas, à este processo costuma-se dar o nome de condensação macromolecular. Uma mudança nessas concentrações pode fazer com que fases adjacentes se tornem homogêneas ou que soluções homogêneas separem-se em fases [33].

Uma interessante possibilidade, a ser mais estudada, é que o meio intracelular, onde existe uma grande diversidade de macromoléculas, seja regido por interações de depleção, juntamente com outras interações já bastante conhecidas. Por exemplo, dentre toda sorte de polímeros que existem no meio intracelular entidades com características parecidas tendem a se aproximar, enquanto ocorre a segregação de corpúsculos com características muito diferentes. Esta separação dá origem a uma questão biológica conhecida como microcompartimentalização celular que se refere à observação de que as macromoléculas em uma célula não se distribuem uniformemente, mas tendem a se separar sem a necessidade de qualquer membrana [10].

Uma manifestação qualitativa dos efeitos de forma em interações de depleção entre colóides pode ser vista também em trabalhos experimentais [10] como entre o vírus Mosaico do Tabaco (TMV) que pode ser aproximado por um cilindro, e a proteína BSA (bovine serum albumin), que pode ser aproximada por uma pequena esfera. Neste trabalho fez-se a comparação entre a condensação pela BSA e a condensação devido ao Polietilenoglicol de peso molecular 100000g/mol (PEG 100000): para baixas concentrações de BSA os vírus formam pequenos agregados com forma cilíndrica, com um alinhamento bastante organizado, (essa organização é característica da atuação da depleção, pois significa que mais espaço está sendo disponibilizado para as moléculas depletadas [11]). Um aumento na concentração dessa proteína faz com que os agregados percam a forma cilíndrica apresentando-se como glóbulos em solução, o que indica uma separação de fases [10].

A interação entre polímero neutro (PEG) e os vírus leva à formação de agregados, que em altas concentrações de PEG 100000, apresentam uma organização estrutural

denominada fase nemática, basicamente, os vírus que apresentam a forma de bastões, se alinham em uma mesma direção. Para moléculas de PEG com massa molar inferior a 100000 g/mol não se observa essa organização, nem mesmo a formação de agregados é pertinente. Elevando-se a massa molar do polímero a fase de agregados de vírus se apresenta completamente livre de moléculas do polímero, ou seja, o polímero neutro é totalmente depletado da região onde se encontram os vírus [10] a a separação de fases na solução é mais evidente.

Um outro exemplo da interação entre colóides em suspensão pode ser observado na coalescência de células vermelhas do sangue, denominadas eritrócitos, figura 3.4-a, que pode ser explicada em termos da força de depleção. No sangue de uma mulher grávida ou de uma pessoa com doença infecciosa grave, observa-se que a concentração de certas proteínas do plasma¹ aumenta consideravelmente [34], o que contribui para o aumento da pressão osmótica do plasma onde os eritrócitos atuam como depletantes [30].

A indicação da atuação da força de depleção deve-se principalmente à forma como estas células se agregam, em uma estrutura bem organizada, conhecida como *rouleaux* figura 3.4-b, onde as células que são aproximadamente pequenos discos se agrupam face a face, o que aumenta o volume de sobreposição, V_{sp} , depletando quaisquer partículas da região que as entremeia [30].

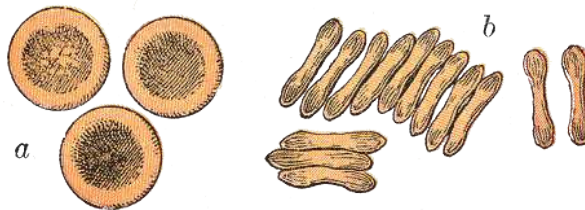


Figura 3.4: *a*- Célula vermelha do sangue, ou eritrócito e *b*- a formação denominada *rouleaux*. (Figura obtida em [35].)

Conhecer intimamente a interação que leva à agregação de células sanguíneas é interessante principalmente porque a taxa de sedimentação de eritrócitos é um processo simples e rápido que pode ser usada como um indicador de doenças infecciosas [34], [36].

3.3 Interação entre partículas carregadas e macromoléculas

Além do efeito de assimetria entre os componentes da solução, um aumento considerável na força de depleção ocorre se as moléculas interagentes possuírem cargas. Para considerarmos a interação de depleção entre macromoléculas carregadas façamos uma analogia ao caso mais simples, partículas esféricas com diâmetro D , carregadas e mergulhadas em uma solução de macromoléculas, com diâmetro d ($d \ll D$), também carregadas. A pressão osmótica da solução de macromoléculas carregadas Π é maior que a pressão osmótica para uma solução na mesma concentração quando descarregada Π_0 [30].

A adição de sal ocasiona uma blindagem das cargas efetivas nas entidades em solução, no entanto não é capaz de igualar à situação de neutralidade, por hora não considere a adição de sal. Quaisquer duas partículas dispersas em uma solução de macromoléculas, ao se aproximarem por uma distância menor ou igual a d , criam entre elas uma região onde não é permitido encontrar macromoléculas, região de depleção. A área de seção transversal desta região (A) à meia distância entre as partículas ($h/2$) é dada por [30]:

¹Solução na qual as células do sangue estão suspensas.

$$A = 4\pi\left(\frac{D'}{2}\right)^2 = \pi((D + d)^2 - h^2), \quad (3.7)$$

onde D' é o diâmetro da área onde não se encontram macromoléculas, no centro da região de depleção se estendendo em direção à solução de macromoléculas. A força de depleção devido somente às macromoléculas é dada então pela seguinte equação,

$$F = -\Pi A, \quad (3.8)$$

em que a pressão osmótica da solução carregada agora é dada por Π .

Alguns contra-íons podem ser encontrados na região delimitada pela área A , enquanto os outros dispersos na solução tentam se aproximar dessa região e são retirados daí pela ação das macromoléculas, existe, portanto uma região em torno da área A onde contra-íons estão se movendo. Diminuindo-se a distância h entre as partículas, D' fica maior, e a região onde se encontravam os contra-íons se dispõem entre as partículas, fazendo com que uma pressão correspondente aos contra-íons comece a atuar sobre as macromoléculas, na direção da solução [30].

Como nessa situação as macromoléculas sofrem, além de uma limitação de espaço ocasionada pelas partículas, uma contribuição da pressão osmótica dos contra-íons próximos às partículas, o efeito resultante em aproximá-las, liberando espaço na solução para as macromoléculas, é intensificado.

Na ausência de sal a quantidade de contra-íons é pequena e sua contribuição para a pressão osmótica também o é. A adição de sal no entanto ocasiona um aumento relevante na quantidade de contra-íons em solução que contribuem para um aumento na força de depleção [30].

Capítulo 4

Materiais e métodos

4.1 Complexo DNA+Sso7d-C8

O complexo DNA+Sso7d-C8 dá origem a um polímero ramificado cuja cadeia principal, ou coluna da estrutura, é uma molécula de DNA com três mil pares de base (3kbp) e as cadeias laterais são sequências de aminoácidos (C8) provenientes da proteína recombinante Sso7d-C8. Cada parte do complexo é descrita a seguir. A figura 4.1 representa um seguimento do polímero de cadeia ramificada resultante desse complexo.

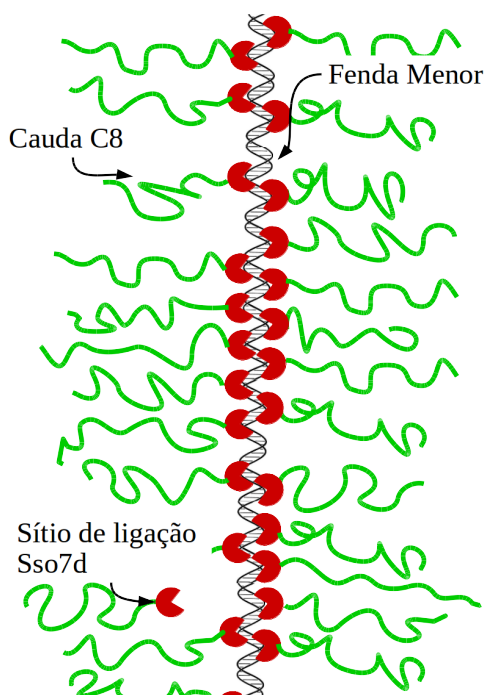


Figura 4.1: Representação de um seguimento da molécula de DNA, estrutura na cor preta, recoberto pela proteína recombinante Sso7d-C8.

A proposta deste trabalho é o estudo da separação de fases para este polímero de cadeia ramificada. Os polímeros ramificados formam um condensado devido à força de depleção estabelecida a custa de polímeros neutros e altamente flexíveis, utilizou-se para tanto o polietilenoglicol (PEG) em dois pesos moleculares: PEG 8000 e PEG 20000g/mol.

O diagrama de fases foi construído como função da densidade de ramificações enxertadas e a quantidade crítica de PEG para qual se observa a separação de fases entre o polímero ramificado e a solução de PEG. A densidade de ramificações ρ é o mesmo que a proporção em cada amostra entre proteínas modificadas e pares de base da molécula de

DNA:

$$\rho = \frac{\text{concentração de proteína recombinante}}{\text{concentração de pares de base}}(pt/bp). \quad (4.1)$$

A condensação é verificada através da separação entre a fase condensada e a solução restante, por meio de centrifugação. Em posterior eletroforese das amostras defini-se a quantidade crítica de polietilenoglicol necessária para tanto, estes processos são descritos a seguir.

4.1.1 DNA

O DNA é uma cadeia polimérica onde cada unidade constituinte é um nucleosídeo monofosfatado, ou nucleotídeo. A macromolécula de DNA naturalmente se apresenta como uma dupla hélice, à qual nos referimos por dupla fita (dsDNA), que se forma a partir da associação complementar de duas fitas únicas de DNA. Comumente identificamos cada dois nucleotídeos associados de forma complementar na dupla fita como par de base. Por ser uma molécula carregada, apresentando duas cargas elementares a cada 0,34 nm na dupla fita, a macromolécula de DNA é denominada polieletrólito [6].

Um nucleotídeo é composto por um grupo fosfato, um açúcar (2-desoxirribose) e uma base nitrogenada, como mostra a figura 4.2. A molécula de DNA apresenta quatro possíveis bases nitrogenadas, duas bases purinas, adenina (A) e guanina (G) e duas bases pirimidinas, timina (T) e citosina (C), estas bases são complementares e se associam por meio de ligações de hidrogênio na dupla fita de DNA [5]. Veja uma representação da associação das bases na figura 4.3.

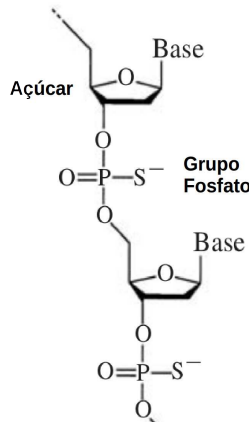


Figura 4.2: Sequência de dois nucleotídeos que são as subunidades, ou monômeros em uma cadeia de DNA. (Figura adaptada de [4].)

A cadeia do DNA é feita adicionando-se um nucleotídeo a outro pela ligação fosfodiéster entre os carbonos 3' do açúcar de um nucleotídeo ao fosfato ligado ao carbono 5' do próximo nucleotídeo, esta cadeia polinucleotídica constitui o que se denomina fita simples, veja a figura 4.4.

O açúcar e o grupo fosfato são hidrofílicos, enquanto as bases nitrogenadas são hidrofóbicas, e portanto, tendem a se manter próximas e em oposição à presença de água, graças a esta característica e aos ângulos específicos possíveis entre as ligações fosfodiéster o resultados final estável é uma molécula de DNA na forma de uma dupla hélice [37]. Esta estrutura se sustenta em função das ligações de hidrogênio entre as bases complementares em duas fitas adjacentes [5]

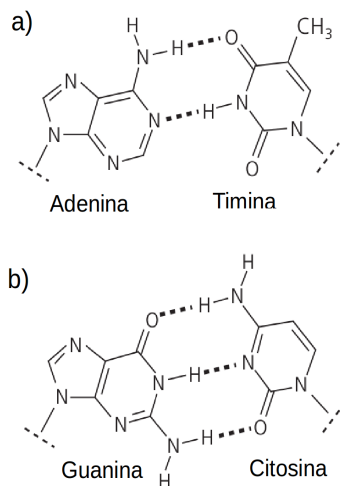


Figura 4.3: Estruturas das quatro bases nitrogenadas existentes na molécula de DNA e suas associações através de ligações de hidrogênio. (Figura adaptada de [5].)

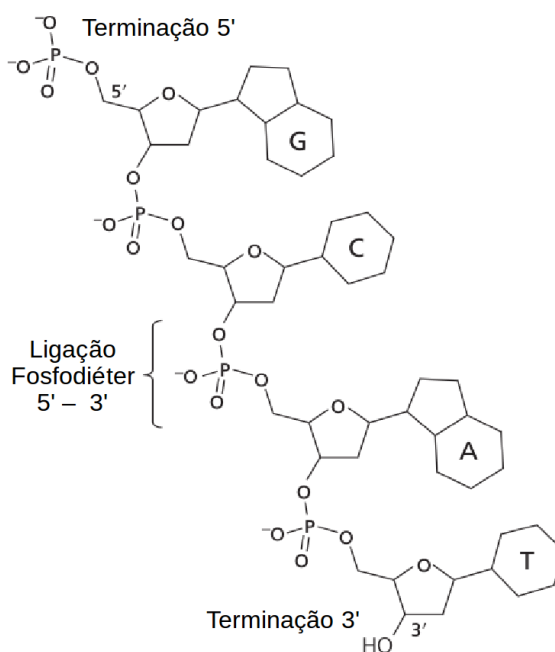


Figura 4.4: Ligação fosfodiéster entre nucleotídeos adjacentes. Figura retirada do livro DNA Topology [5].

Embora altamente estável a estrutura do DNA não é singular, técnicas como difração de raios-X em estudos da cristalinidade do DNA revelam que a dupla hélice pode adotar uma variedade de conformações devido a variação em parâmetros específicos da estrutura. Algumas dessas variações originam conformações já bastante estudadas, chamadas A, B e Z-DNA [5]. A figura 4.5 mostra estas três estruturas mais conhecidas.

Por ser encontrada em maior quantidade no meio intracelular a conformação B é largamente estudada [5], o que nos motivou a utilizá-la neste trabalho. Os anéis das bases

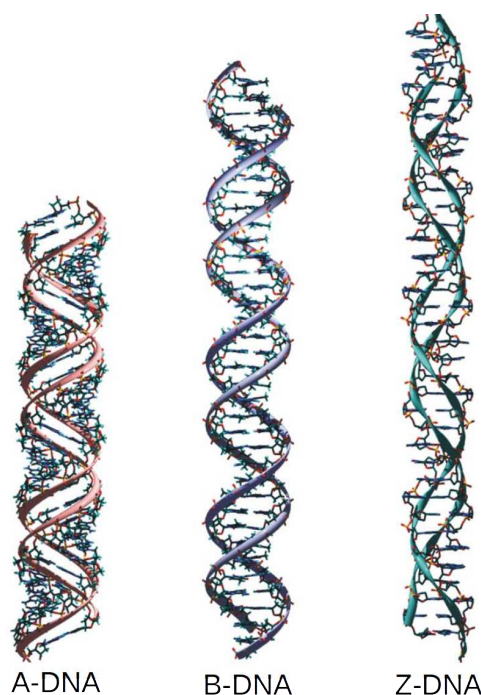


Figura 4.5: Conformações A, B e Z para a molécula de DNA. (Figura adaptada de [38])

nitrogenadas nessa conformação são perpendiculares ao eixo da dupla hélice e a cada volta em torno desse eixo são acrescentados 10,4 pares de base. A distância entre as voltas sucessivas é 3,4 nm (34 Å) e a espessura da dupla hélice é aproximadamente 2 nm [4].

A dupla hélice do DNA é uma estrutura estável, contudo temperatura e pH elevados provocam sua separação em duas fitas simples, processo conhecido como desnaturação. A desnaturação ocorre pela quebra das ligações de hidrogênio, não obstante, este é um processo intrínseco às funções do DNA *in vivo*, neste caso, a separação da dupla fita se deve à intervenção de proteínas intracelulares que atuam sobre o DNA com o objetivo de replicação ou transcrição de novas proteínas [5].

O DNA utilizado no presente trabalho é um DNA produzido por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que consiste em uma forma de obter várias moléculas praticamente idênticas de DNA através da replicação controlada de fragmentos de DNA. Este processo permite por exemplo controlar o número de pares de base (bp) polimerizadas ou até a sequência de nucleotídeos [4], no caso deste trabalho utilizamos moléculas com 3000 pares de base (3kbp) sem uma sequência específica de nucleotídeos.

4.1.2 Proteína recombinante - Sso7d-C8

A proteína Sso7d constitui o sítio de ligação entre a cadeia lateral e a coluna de um polímero ramificado estudado neste trabalho. Esta proteína foi polimerizada através da técnica de DNA-recombinante, [39], na sequência de uma cadeia de aminoácidos, denominada C8, dando origem à proteína recombinante Sso7d-C8.

A cadeia de aminoácidos C8 se apresenta na forma de uma longa cauda hidrofílica. Essencialmente, a sequência C8 é uma proteína polimérica semi-flexível na qual os monômeros são aminoácidos [40]. A figura 4.6 é um modelo desta proteína modificada resultante da associação de duas moléculas com características substancialmente distintas.

O raio hidrodinâmico da proteína recombinante Sso7d-C8 é aproximadamente 7,9nm, determinado por espalhamento de luz no laboratório de Físico-química e Matéria Mole da Universidade de Wageningen. Onde verificou-se também que a proteína recom-

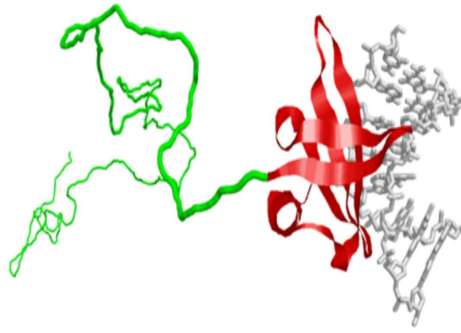


Figura 4.6: Proteína modificada ligada a fenda menor do DNA: em vermelho o sítio de ligação Sso7d e em verde a cauda polimérica C8. Figura retirada de [42].

binante é capaz de recobrir moléculas de DNA em diversas conformações [40], a saber: fita simples, fita dupla, DNA circular com ou sem enrolamento e o DNA do bacteriófago T4.

A proteína DNA-ligante empregada nesta associação, Sso7d, é bastante compacta, sendo constituída por 63 aminoácidos. Esta proteína é encontrada no nucleóide da arqueobactéria *Sulfolobus solfataricus*. Esse gênero foi isolado, em sua maioria, a partir de *habitats* no Parque Nacional de Yellowstone, no fim da década de 60 [41].

Arqueobactérias geralmente são organismos termoacidófilicos e seu *habitat* com características muito extremas chamou atenção para o estudo desse tipo de organismo. Atualmente as arqueobactérias constituem um de três domínios dentre os seres vivos, distinguem-se seres eucariotos, procariotos e arquea [43].

Arqueobactérias do gênero *sulfolobus* dispõem de algumas famílias de proteínas nucleoides DNA-ligantes, a Sso7d faz parte da família Sul7 e é o membro mais estudado desta família de proteínas. Dada a abundância de proteínas do tipo Sul7 no meio intracelular, acredita-se que essas proteínas mantenham uma estreita conexão com o material genético desses organismos, a partir dessa observação têm se estudado a relação dessa proteína com a molécula de DNA *in vitro* e a proteína Sso7d mostrou-se capaz de compactar DNA circular com enrolamento [43].

A proteína que desempenha o papel de sítio de ligação no presente trabalho, Sso7d, foi também estudada em termos de sua ação condensante por Ramos Jr. [44], na tentativa de explicar a condensação do material genético em organismos procariotos. Os resultados mostraram que em uma solução fisiológica essa proteína por si só não é capaz de condensar a macromolécula de DNA linear.

No entanto, ao se ligar à molécula de DNA, a proteína Sso7d aumenta seu diâmetro efetivo, fazendo com que o alcance do potencial de depleção aumente. Portanto, ao recobrir o DNA, a proteína contribui para uma diminuição na quantidade de polímero neutro necessária para efetivamente condensá-la [44].

A temperatura de desnaturação para a proteína Sso7d está entre 370.8 e 371.9 K e sua conformação tem máxima estabilidade entre os pH 4,5 e 7,0 [45]. Esta é uma proteína DNA-ligante não específica, isso significa que a proteína Sso7d tem a capacidade de se acoplar à dupla hélice ou a uma fita simples de DNA independentemente da sequência de nucleotídeos local. A proteína apresenta uma carga total igual a 6+, [43], o que facilita sua interação à distância com o a molécula de DNA que possui carga negativa.

O número de ocupação, ou seja, a porção do DNA que a proteína efetivamente cobre ao se acomodar, é de quatro pares de base. A proteína Sso7d se liga à dupla hélice alocando uma folha- β de cadeia tripla através da fenda menor do DNA [46]. Ao se ligar a proteína ocasiona uma dobra de 60° na dupla hélice, resultado da intercalação de uma

cadeia lateral hidrofóbica específica entre os pares de base [47].

Devido a sua alta afinidade pela molécula de DNA (seja fita simples ou fita dupla), a proteína Sso7d tem sido usada para estabilizar processos de q-PCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*), para tanto a proteína Sso7d é polimerizada em associação com a DNA-polimerase. Este composto está disponível no mercado pela PhusionTM (Bio-Rad laboratórios) [43].

A cauda polimérica C8 é constituída por cerca de 800 aminoácidos, oito repetições de 100 sequências, contendo principalmente aminoácidos hidrofílicos. O peso molecular dessa cauda polimérica é aproximadamente 73kDa e não apresenta estruturas secundárias ou terciárias, atuando como um polímero bastante flexível em solução [40].

Conhecendo-se a sucessão de nucleotídeos que codifica a proteína Sso7d, é possível agregar a ela dois fragmentos de DNA correspondente à sequência de aminoácidos conhecida como C4, que deverá origina a cauda C8. À esta técnica em que se associam fragmentos de DNA com o intuito de modificar uma informação genética dá-se o nome de DNA recombinante, a proteína resultante é denominada proteína recombinante [39].

A sequência de DNA contendo a informação necessária para dar origem à proteína modificada é integrada ao genoma de uma espécie de levedura, *Pichia pastoris*, através de recombinação homóloga. Esta técnica consiste em retirar-se um gene do código genético da levedura e colocar a informação desejada em seu lugar, com isso a levedura produz a proteína recombinante Sso7d-C8 [40].

Esta proteína recombinante e as informações referentes à sua produção, foram concedidas ao grupo de pesquisa em física biológica da Universidade Federal de Viçosa pelo grupo de físico-química e matéria mole da Universidade de Wageningen - Holanda, através do professor e colaborador Renko de Vries.

4.2 Polietilenoglicol - PEG

O polietilenoglicol - PEG, é um dos polímeros sintéticos solúveis em água mais estudados, tanto por sua ampla variedade de aplicações como pela busca da compreensão fundamental do comportamento de soluções poliméricas. O PEG é um polímero neutro altamente flexível e hidrofílico, bastante solúvel em metanol e água, o que dificulta a formação de agregados nesses solventes [48].

O monômero que constitui este polímero é um óxido de etileno diidroxilado denominado etilenoglicol. Em sua forma não polimerizada é especialmente usado como solvente. PEG de vários pesos moleculares têm ampla aplicação no meio industrial como estabilizante em diversos tipos de suspensões, umectantes, lubrificantes, dentre outras [49].

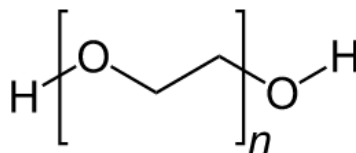


Figura 4.7: Representação da fórmula estrutural do PEG [50].

A fórmula estrutural para o polietilenoglicol é apresentada na figura 4.7 e a denominação oficial segundo a IUPAC é poly(ethylene oxide) - PEO ou poly(oxyethylene). A massa molar do polímero pode ser calculada em função de seu grau de polimerização (n): $M = 44n + 18$. Variando-se o grau de polimerização, podem ser obtidos produtos líquidos ou sólidos, dentro de uma ampla faixa de viscosidade, consistência e ponto de fusão.

Uma das vantagens em utilizar-se o PEG para interagir com outras macromoléculas é a disponibilidade de massas moleculares no mercado a preços acessíveis [49].

Ainda por volta de 1986 Parsegian [51], fez um estudo a respeito da pressão osmótica de diversos polímeros em solução aquosa. Dentre suas conclusões destaca-se que a pressão osmótica da solução de um polímero, Π , depende basicamente de sua massa molecular, à temperatura ambiente. Para o PEG, definiu-se a seguinte equação:

$$\log[\Pi_0(w)] = \mu_0 + \mu_1 w^{0,21}, \quad (4.2)$$

onde w é a massa molecular do polietilenoglicol. Os coeficientes μ_0 e μ_1 são fatores que dependem da temperatura, principalmente. Não foi feita a análise quantitativa destes parâmetros, pois a construção de um diagrama de fases, à qual se propõe esta dissertação, inicialmente não a requer.

O uso de PEG no presente trabalho se motiva pela sua vasta aplicação como agente condensante no estudo de dispersões de macromoléculas. Como exemplo, podemos citar os seguintes estudos de condensação de DNA induzida por este polímero: [10], [52], [53], [54], [55], [56].

A principal razão de se utilizar o PEG é que este polímero não interage com as macromoléculas em solução, apresentando-se como um polímero quimicamente neutro. De forma que o efeito do polietilenoglicol é simplesmente ocupar volume na solução, o que de fato, é interessante para a interação de depleção que é considerada como motivadora da separação de fases nos ensaios realizados.

Se a interação $v(x, h)$ entre as moléculas em solução, no caso o PEG, e as partículas suspensas (polímero ramificado) puder ser descartada, o potencial de depleção deve ser o mais simples possível. Observe a equação que expressa o volume disponível para as moléculas:

$$Q = \int_V e^{-\frac{v(x,h)}{kT}} dx, \quad (4.3)$$

sob essa aproximação, a função Q passa a depender, apenas do volume de sobreposição V_{sp} e da pressão osmótica da solução. Com isso a equação para a interação de depleção é simplificada.

Quaisquer outros polímeros, por exemplo o polivinilpirrolidona (PVP), possuindo propriedades tais quais o polietilenoglicol, podem ser usados como agente condensante sem perda de generalidade.

Embora partículas de origem biológica sejam claramente de maior interesse como agentes condensantes de DNA, seu estudo se torna um tanto mais complexo, pois em geral a interação entre as moléculas, $v(x, h)$, não pode ser descartada e passam a atuar outras interações além de depleção.

Yoshikawa *et. al* [57], por exemplo, realizou um estudo de condensação de DNA utilizando como agente condensante a proteína BSA (*bovine serum albumin*) que é uma proteína de formato globular com carga negativa. Nesse caso a interação eletrostática não pode ser deixada de lado ao se estudar a condensação. Levando isso em consideração, Yoshikawa *et. al*, construiu um diagrama de fase para o DNA em função do acréscimo de sal e da concentração de proteína. Os resultados de Yoshikawa *et. al*, indicam que um aumento na concentração de sal retarda a ação condensante da proteína BSA.

Portanto, para simplificar as interações de depleção, a concentração de sal nas amostras, experimentadas no presente trabalho, foi mantida constante e igual a 150mM. Inclusive ao solubilizar-se o polietilenoglicol.

4.3 Eletroforese

A penetração de moléculas carregadas em um gel sob a influência de um campo elétrico é chamada eletroforese em gel, e tem se mostrado um poderoso método experimental para separar moléculas de ácidos nucleicos (DNA e RNA). Como a mobilidade das moléculas depende de seu tamanho (dentre outras propriedades, como as cargas das moléculas e os poros do gel), uma mistura de moléculas de DNA, depois de passar por eletroforese, pode ser separada e localizada em diferentes regiões do gel, em função de seus tamanhos [3]. A eletroforese em gel de agarose é um método muito utilizado em pesquisas que requerem a manipulação de fragmentos de DNA [58].

O procedimento experimental se dá da seguinte forma: o gel de agarose contendo as amostras é alocado em uma cuba de material acrílico, contendo uma solução eletrolítica, onde se estabelece um campo elétrico. No presente trabalho utilizou-se o TAE, diluído dez vezes, como solução eletrolítica.

A figura 4.8 mostra a cuba utilizada nos ensaios realizados. Entre as extremidades da cuba estabelece-se uma diferença de potencial de cerca de 70V, originando-se um campo elétrico através do gel, o que faz com que as moléculas carregadas aí presentes se movam [58]. Os ensaios de eletroforese foram realizados utilizando-se um gel em 1% de agarose.

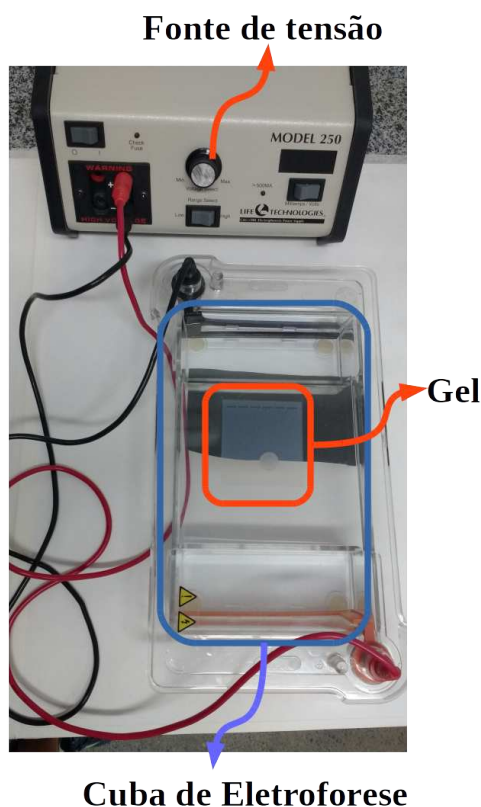


Figura 4.8: Cuba de eletroforese, associada a uma fonte de tensão, contendo um gel com capacidade para alocar 6 amostras.

A função do gel é basicamente alocar as moléculas para que não se dispersem na solução. Em técnicas de manipulação genética, o DNA fragmentado é separado por tamanhos através da eletroforese e o gel permite recuperá-los para posterior utilização [58].

4.4 Preparação das amostras e procedimento experimental

Em todas as soluções usadas na preparação das amostras nesse trabalho, foi usado um tampão (pH 7,4) de TRIS+HCl(10mM) a 150mM de NaCl. Essas condições para as soluções foram escolhidas, por imitar condições *in vivo*, o que chamamos de solução fisiológica. Todo o processo experimental foi realizado à temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Inicialmente o DNA 3kbp, fornecido pela Thermo SCIENTIFIC na concentração nominal de $0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ é diluído para a concentração de $40\text{ng}/\mu\text{l}$, a partir dessa alíquota de DNA extrai-se $1\mu\text{l}$ para cada amostra. Dessa forma a massa de DNA presente em cada amostra é 40ng, portanto a concentração em pares de base é constante e igual a $2\mu\text{M}$ em um volume total de $30\mu\text{l}$ ao final da preparação de cada amostra. As amostras são alocadas em tubos plásticos de 1,5ml, onde permanecem até que sejam centrifugadas.

O polietilenoglicol, fornecido pela Sigma-Aldrich em forma de flocos, é inicialmente dissolvido em uma concentração de 20% em massa, na solução tampão de TRIS+HCl(10mM) a 150mM de NaCl. Como a solução de PEG tem viscosidade bastante significativa, o processo de solubilizá-lo requer um breve aumento na temperatura, não acima de 50°C .

Em cada ensaio, para fins comparativos, uma amostra necessariamente apresenta DNA puro. Às amostras que se seguem, a proteína Sso7d-C8 é adicionada ao DNA de forma a se obter a proporção desejada entre pares de base e proteína. Nesse estágio o complexo DNA+Sso7d-C8 se apresenta como um polímero de cadeia ramificada e a proporção entre proteína e pares de base é o que se denomina densidade de cadeias laterais.

Depois de uma hora em repouso, o polietilenoglicol (PEG) é adicionado às amostras de forma a se obter a porcentagem em massa pré-determinada para cada amostra. Nessa etapa da preparação é preciso que a amostra sofra uma leve agitação para garantir a interação dos polímeros ramificados com o polietilenoglicol, dada a viscosidade da solução de PEG, em seguida as amostras descansam durante mais uma hora.

Espera-se que para alguma massa de PEG, devido à pressão osmótica que este exerce em solução, ocorra a agregação das moléculas de polímero ramificado, na ocasião em que isso ocorre o agregado passa a ter uma densidade maior que a solução de polímeros neutros ao seu redor. Portanto depois de um período de uma hora de interação entre os polímeros de cadeia ramificada e os polímeros neutros, as amostras são centrifugadas durante 50 minutos, processo através do qual a parte mais densa da solução, o polímero condensado, é compelida para o fundo.

Após a centrifugação, são retirados, cuidadosamente, $15\mu\text{l}$ do sobrenadante da solução em cada amostra. A parte inferior, contendo possivelmente o material condensado, é adequadamente descartada, enquanto as alíquotas retiradas do sobrenadante são colocadas em pequenos sulcos num gel de agarose em 1%. O gel é então alocado na cuba de eletroforese, (veja a figura 4.8), onde permanece 50 minutos sob uma diferença de potencial de 70V.

Ao ser retirado da eletroforese, o gel contendo as alíquotas do sobrenadante é mergulhado em uma solução de brometo de etídio (BrEt), na concentração de $2\mu\text{g}/\text{ml}$. O brometo de etídio é uma substância que fluoresce em rosa avermelhado, quando iluminado por luz ultravioleta (UV). A emissão aumenta quando a molécula de BrEt se encontra intercalada entre os pares de base na dupla fita de DNA, situação em que atinge seu máximo de emissão em 590nm [59].

A molécula do brometo de etídio tem aproximadamente a dimensão de um par de bases e é altamente hidrofóbica, portanto se alocar entre os pares de base do DNA é muito favorável para sua estrutura [4]. Dessa forma essa substância se tornou o que chamamos de marcador de DNA.

O gel embebido em brometo de etídio é então iluminado com luz UV em um Transluminador, onde podemos identificar em cada uma das alíquotas a presença, ou não, de DNA e fazer imagens do gel, algumas das quais são apresentadas no capítulo 5.

Capítulo 5

Resultados e Discussão

O ensaio para o DNA não complexado com a proteína modificada é tomado como base para a construção do diagrama de fases e para a análise dos demais experimentos. Diz-se sobre o DNA não complexado, ou seja, o DNA puro, que a densidade de cadeias laterais é nula.

A figura 5.1 mostra uma imagem obtida em um Transluminador, de um gel de agarose, com amostras contendo apenas DNA e PEG8000 em concentrações que variam em uma unidade de 15 a 22%. Observe que a partir de 20% em massa do polímero neutro, o DNA não aparece nas amostras, esta é a indicação que o DNA foi condensado e precipitou.

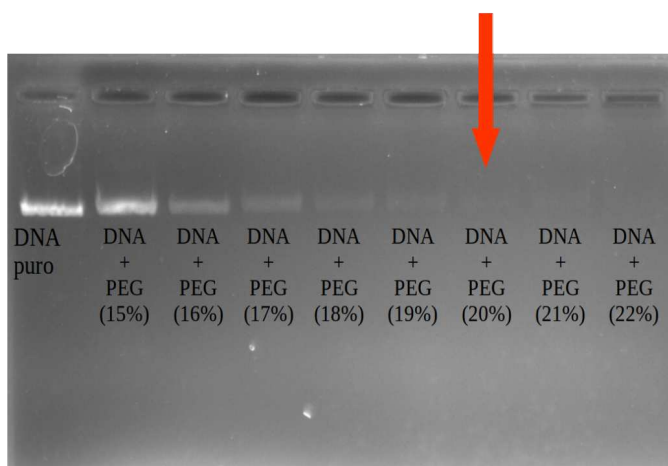


Figura 5.1: Imagem de um gel de agarose após eletroforese, contendo DNA e diferentes concentrações de PEG8000, a seta na figura indica a partir de que concentração o DNA precipitou.

Outro ensaio que tem relevância para a análise dos resultados é feito para o complexo, DNA+Sso7d-C8, com diferentes densidades de cadeias laterais. A partir da imagem do gel na figura 5.2 é possível comparar a migração das moléculas de DNA recobertas com diferentes proporções de proteína recombinante por pares de base.

Observe na figura 5.2, que os polímeros altamente ramificados, ou seja, para altas proporções da proteína recombinante por pares de base, quase não se deslocam no gel de agarose se comparados com o DNA não complexado, ou DNA puro. Já para baixas densidades de ramificações, o complexo, DNA+Sso7d-C8, se move comparativamente ao DNA puro, ou seja, o polímero menos ramificado sofre um deslocamento maior através do gel. Isso se explica pelo fato de cargas negativas da molécula de DNA serem blindadas

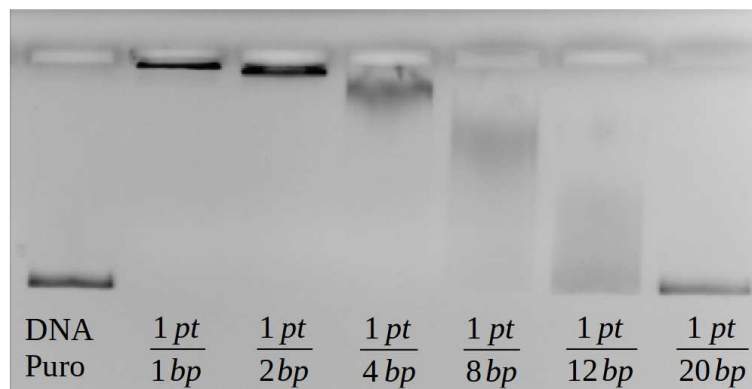


Figura 5.2: A figura apresenta migração do polímero ramificado em gel de agarose, para diferentes proporções de proteína recombinante por pares de base.

pela interação com o sítio de ligação Sso7d, que é carregado com carga positiva. Na eletroforese tanto menor é o deslocamento quanto menor a carga da macromolécula.

A incerteza para os resultados apresentados nesta dissertação, que dão origem aos desvios expressos nos diagramas de fase, reside na impossibilidade de se afirmar que o polímero ramificado precipita completa e imediatamente para uma quantidade exata de polietilenoglicol.

A imagem do gel apresentada na figura 5.3 foi feita para um ensaio em que o polímero altamente ramificado, na proporção de uma proteína para cada par de base, interage com o polietilenoglicol 8000g/mol em concentrações de 6 a 10%. Observe que a presença do polímero ramificado, ou seja, do complexo de DNA+Sso7d-C8, indicada pelas manchas escuras na figura 5.3, diminui gradativamente entre 7 e 8% desaparecendo em 9%, o desaparecimento indica que todo polímero ramificado precipitou, ou seja, foi condensado.

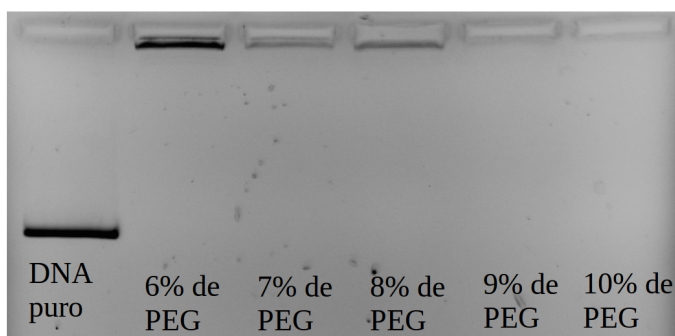


Figura 5.3: Imagem de um gel, após eletroforese, contendo DNA recoberto com a proteína recombinante na proporção 1pt/1bp para diferentes concentrações de PEG8000.

Essa diminuição gradativa de DNA+Sso7d-C8 na alíquota sobrenadante indica que parte do complexo foi condensado e precipitou, enquanto parte ainda resiste em dispersão. A diminuição na quantidade de polímero ramificado no sobrenadante configura uma incerteza de pelo menos 1% no resultado, tomado como 9% para este ensaio.

Mesmo que os polímeros ramificados estejam associados formando agregados para uma dada concentração de polímero, esse agregado pode manter uma densidade próxima à da solução de polímeros, de forma que a centrifugação ainda não é capaz de forçá-lo para o fundo do tubo plástico. Ramos Jr. [44] fez um estudo da condensação do complexo DNA+Sso7d, induzida por PEG 20000, utilizando-se da mesma técnica experimental empregada no presente trabalho, onde explicita também essa característica da condensação. No ensaio para o DNA não complexado mostrado na figura 5.1, pode-se observar da mesma forma uma diminuição gradativa na quantidade de DNA no sobrenadante.

Esperava-se que segmentos de DNA com diâmetro efetivo maior, fossem mais susceptíveis à condensação [44], ou seja, uma menor massa de PEG deveria ser capaz de condensar o DNA na configuração de polímero altamente ramificado. Isso porque com um aumento no diâmetro efetivo do polímero, a interação de depleção, que depende o diâmetro das moléculas, aumentaria e portanto a condensação seria facilitada.

O aumento no diâmetro da molécula de DNA ramificada pode ser entendido observando-se uma idealização de dois seguimentos do polímero ramificado que se aproximam, representados na figura 5.4, onde as setas azuis representam diâmetro efetivo do polímero ramificado e as setas pretas indicam o diâmetro da cadeia principal. As ramificações estabelecem um limite para a interação entre seguimentos do polímero ramificado, o que pode se manifestar como um aumento no diâmetro efetivo da cadeia principal.

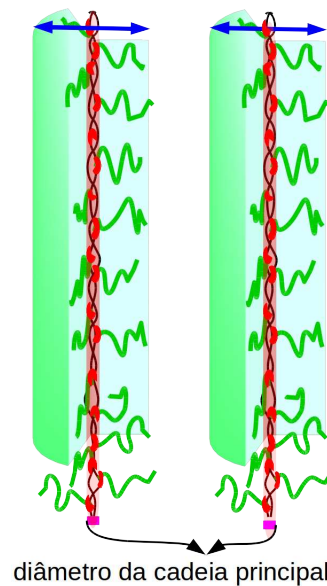


Figura 5.4: Representação de dois seguimentos do polímero ramificado que se aproximam. As setas azuis representam o diâmetro efetivo do polímero ramificado.

O diagrama de fase obtido para o polímero ramificado, configurado pelo complexo de DNA+Sso7d, em comparação com o complexo DNA+Sso7d, que configura um polímero de menor diâmetro, não condiz com a expectativa de que o polímero com maior diâmetro é condensado mais facilmente. A curva em vermelho na figura 5.5 apresenta os resultados das concentrações de PEG20000 necessárias para condensar o DNA recoberto com proteína modificada Sso7d-C8. A curva verde, que se estende sempre abaixo da curva vermelha, deixa claro que a porcentagem de PEG20000 necessária para condensar

o DNA recoberto apenas pelo sítio de ligação Sso7d, é menor. Este resultado indica que o polímero ramificado, com diâmetro efetivo maior necessita de um pressão osmótica maior para se condensar.

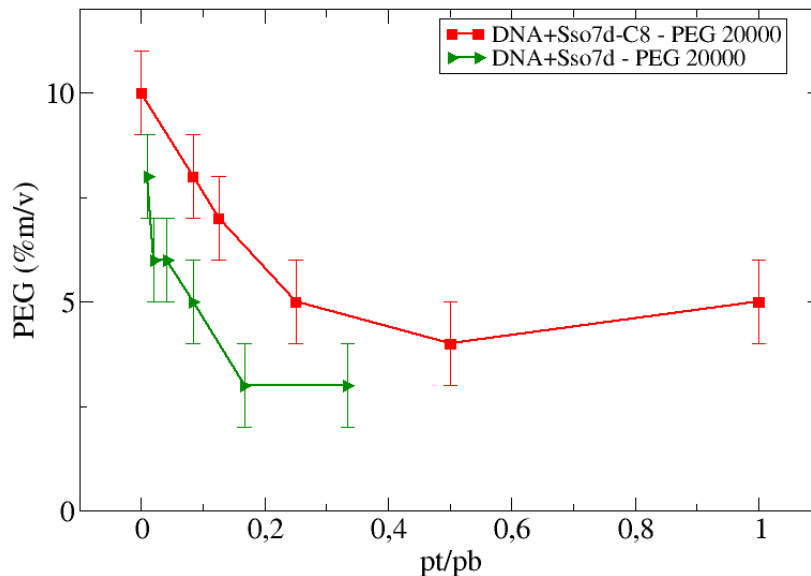


Figura 5.5: Diagrama de fases para o polímero ramificado, complexo DNA+Sso7d-C8, curva apresentada em vermelho, em comparação com o diagrama de fases obtido por Ramos Jr. [44], para o complexo DNA+Sso7d, não ramificado, representado pela curva verde.

Ao conceber os seguimentos do polímero ramificado simplesmente como cilindros com maior diâmetro, deixamos de considerar as interações entre as cadeias laterais. Sob o ponto de vista em que seguimentos adjacentes do polímero ramificado interagem, considerando a exclusão de volume, ou repulsão estérica, entre as cadeias laterais, um potencial desfavorável à condensação pode vir a surgir entre polímeros ramificados. Logo, a força de depleção induzida pelos polímeros neutros precisa ser aumentada para se atingir a condensação. Portanto é possível que para os polímeros ramificados a força de depleção apenas não seja capaz de explicar o comportamento dos sistemas.

As porcentagens em massa estão ligadas à pressão osmótica exercida pela solução de polímeros neutros, equação 5.1, espera-se que ocorra um aumento na porcentagem em massa, quanto mais dificultada for a depleção dos polímeros ramificados.

$$\log[\Pi_0(w)] = \mu_0 + \mu_1 w^{0,21} \quad (5.1)$$

O diagrama de fases obtido para o polímero de cadeia ramificada e diferentes tamanhos de polímero neutro (PEG), apresentado na figura 5.6, corrobora com o resultado esperado. A quantidade de PEG necessária para induzir a condensação aumenta de acordo com que a massa molecular do PEG diminui [53].

Como o potencial da força de depleção depende diretamente do volume das macromoléculas depletantes, no caso o PEG. Podemos afirmar que polímeros flexíveis com mais alto grau de polimerização, PEG20000, possuindo maior raio de giro e portanto ocasionando maior depleção, demandem menor porcentagem em massa para condensar as macromoléculas. Comparando-se as curvas do diagrama de fases na figura 5.6, fica clara esta característica para os polímeros depletantes de diferentes massas moleculares, ao condensar o polímero ramificado, configurado pelo complexo DNA+Sso7d-C8.

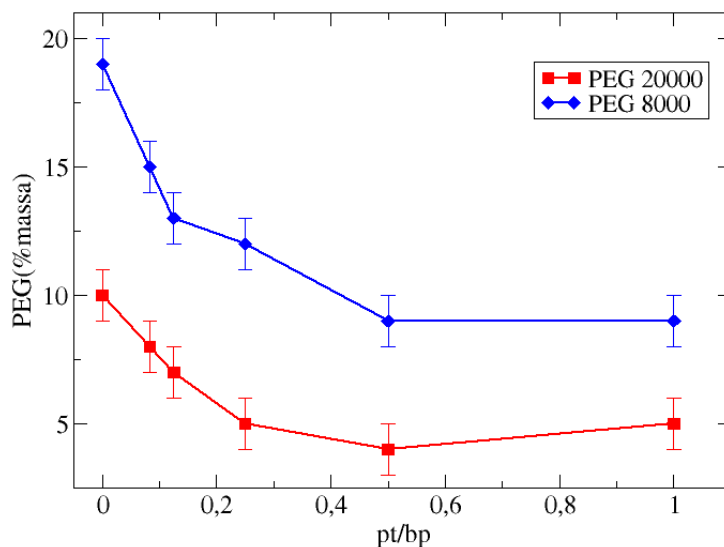


Figura 5.6: Diagrama de fases para o complexo DNA+Sso7d-C8 e PEG de diferentes massas molares.

O polímero ramificado estudado nesta dissertação também foi estudado por Storm [60], que observou experimentalmente um enrijecimento da cadeia principal, devido ao enxerto de novas cadeias laterais, até que em certo ponto, quando a concentração de cadeias laterais em solução atinge o regime semi-diluído, a cadeia principal se torna flexível.

Devido à essa transição de regimes de flexibilidade para a cadeia principal, limitamos portanto à concentração máxima de uma cadeia lateral por par de base em solução, com o intuito de evitar o regime semi-diluído.

Os resultados expressos na figura 5.6 mostram que para uma proporção de proteínas recombinantes por pares de base maior que 0,25, ou seja, 1pt/4bp, não se observa mudança de comportamento do polímero ramificado, indicando que este é um valor limitante.

Esta estabilização foi interpretada como sendo em razão do número limitante de proteínas ligadas à cadeia principal, que é uma função dos sítios de ligação disponíveis na molécula de DNA para a Proteína Sso7d, que é condizente com a literatura, 1pt/4bp.

5.1 Perspectivas

Fez-se uma reflexão a respeito da própria técnica experimental, talvez haja uma sutileza na agregação das macromoléculas, de forma que os agregados de imediato não estejam suficientemente condensados a ponto de sua densidade compelir a precipitação nas condições em que analisamos. Isso implica que é preciso modificar alguns parâmetros na metodologia experimental para conclusões mais precisas. Um aumento no tempo de interação e na força da centrifugação, utilizar-se espalhamento de luz para identificar a formação de agregados e suas possíveis distribuições de tamanho, devem incrementar as observações para o sistema estudado.

O trabalho de Storm [60] indica que uma variação na concentração de sal influencia o enxerto de cadeias laterais, portanto a avaliação da condensação em função da concentração de sal forneceria um diagrama de fase de grande interesse.

Existe a possibilidade de se variar com alguma facilidade um parâmetro muito importante para os sistemas de polímeros com cadeias altamente ramificadas que é o tamanho da cadeia principal e construindo-se um diagrama de fases para a quantidade de agente depletante necessária para a condensação em função da extensão da cadeia principal.

Referências Bibliográficas

- [1] BEGON, M.; HARPER, J. L.; TOWNSEND, C. R. **Ecology: Individuals, Populations and Communities**, 3rd ed. Black-well Science. 1996.
- [2] PIRES, A. S. T. **Evolução das Idéias da Física**. Editora Livraria da Física, 2008.
- [3] KHOKHLOV, A. R.; GROSBERG, A.Y. **Statistical physics of macromolecules**. Amer Institute of Physics, 1994.
- [4] CALLADINE, C. R.; DREW, H. **Understanding DNA: the molecule and how it works**. Academic press, 1997.
- [5] BATES, A. D.; MAXWELL, A. **DNA topology**. Oxford University Press, USA, 2005.
- [6] HARDIN, J.; BERTONI, G. P.; KLEINSMITH, L. J. **Becker's World of the Cell**. Pearson Higher Ed, 2013.
- [7] BANQUY, Xavier et al. Bioinspired bottle-brush polymer exhibits low friction and Amontons-like behavior. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 17, p. 6199-6202, 2014.
- [8] FUCHS, E.; CLEVELAND, D. W. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. **Science**, v. 279, n. 5350, p. 514-519, 1998.
- [9] MINTON, Allen P. Macromolecular crowding: a foreword. **Biophysical chemistry**, v. 57, n. 1, p. 1-2, 1995.
- [10] ADAMS, M.; FRADEN, S. Phase behavior of mixtures of rods (tobacco mosaic virus) and spheres (polyethylene oxide, bovine serum albumin). **Biophysical journal**, v. 74, n. 1, p. 669-677, 1998.
- [11] LEKKERKERKER, H. N. W.; TUINIER, R. **Colloids and the depletion interaction**. Springer, 2011.
- [12] ODIJK, T. Osmotic compaction of supercoiled DNA into a bacterial nucleoid. **Biophysical chemistry**, v. 73, n. 1, p. 23-29, 1998.
- [13] BOLTO, B.; GREGORY, J. Organic polyelectrolytes in water treatment. **Water research**, v. 41, n. 11, p. 2301-2324, 2007.
- [14] GAUGER, A.; PAKULA, T. Static properties of noninteracting comb polymers in dense and dilute media. A Monte Carlo study. **Macromolecules**, v. 28, n. 1, p. 190-196, 1995.
- [15] ZHANG, M.; MÜLLER, A. H. E. Cylindrical polymer brushes. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 43, n. 16, p. 3461-3481, 2005.

- [16] SWANN, D. A. *et al.* The molecular structure and lubricating activity of lubricin isolated from bovine and human synovial fluids. **Biochemical Journal**, v. 225, n. 1, p. 195-201, 1985.
- [17] HUNZIKER, E. B. Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable?. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 7, n. 1, p. 15-28, 1999.
- [18] BECK, R. *et al.* Unconventional salt trend from soft to stiff in single neurofilament biopolymers. **Langmuir**, v. 26, n. 24, p. 18595-18599, 2010.
- [19] BECK, R.; DEEK, J.; SAFINYA, C. R. Structures and interactions in "bottle-brush" neurofilaments: the role of charged disordered proteins in forming hydrogel networks. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, n. 5, p. 1027-1031, 2012.
- [20] RUBINSTEIN, M.; COLBY, R. H. **Polymer physics**. 2003. New York: Oxford University.
- [21] DOI, M. **Introduction to polymer physics**. Oxford university press, 1996.
- [22] STAUDINGER, H. Über polymerisation. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, v. 53, n. 6, p. 1073-1085, 1920.
- [23] STAUDINGER, H. Viscosity investigations for the examination of the constitution of natural products of high molecular weight and of rubber and cellulose. **Transactions of the Faraday Society**, v. 29, n. 140, p. 18-32, 1933.
- [24] GRAHAM, Thomas. Liquid diffusion applied to analysis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 151, p. 183-224, 1861.
- [25] FLORY, P. J. **Principles of polymer chemistry**. Cornell University Press, 1953.
- [26] PLATÉ, N. A.; SHIBAEV, V. P. **Comb-shaped polymers and liquid crystals**. Plenum Press, New York, 1987.
- [27] OOSAWA, F. **Polyelectrolytes**. In: Polyelectrolytes. Marcel Dekker, 1971.
- [28] BOSTRÖM, M.; WILLIAMS, D. R. M.; NINHAM, B. W. Specific ion effects: why DLVO theory fails for biology and colloid systems. **Physical Review Letters**, v. 87, n. 16, p. 168103, 2001.
- [29] ASAKURA, S.; OOSAWA, F. On interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 22, n. 7, p. 1255-1256, 1954.
- [30] ASAKURA, S.; OOSAWA, F. Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules. **Journal of polymer science**, v. 33, n. 126, p. 183-192, 1958.
- [31] PARK, K.; KOERNER, H.; VAIA, R. A. Depletion-induced shape and size selection of gold nanoparticles. **Nano letters**, v. 10, n. 4, p. 1433-1439, 2010.
- [32] MASON, T. G. Osmotically driven shape-dependent colloidal separations. **Physical Review E**, v. 66, n. 6, p. 060402, 2002.

- [33] WALTER, H.; BROOKS, D. E. Phase separation in cytoplasm, due to macromolecular crowding, is the basis for microcompartmentation. **FEBS letters**, v. 361, n. 2-3, p. 135-139, 1995.
- [34] FÅHRÆUS, R. The suspension stability of the blood. **Physiological Reviews**, v. 9, n. 2, p. 241-274, 1929.
- [35] GRAY, H. **Human red blood cells**. 1918. Disponível em: <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gray453-ab.png>>. Acesso em: 20 Out. 2016.
- [36] BEDELL, S. E.; BUSH, B. T. Erythrocyte sedimentation rate. From folklore to facts. **The American journal of medicine**, v. 78, n. 6, p. 1001-1009, 1985.
- [37] USSERY, D. W. DNA Structure: A-, B- and Z-DNA: Helix Families. **eLS**, 2002.
- [38] RICCI, C. G. **A, B e Z-DNA: caracterização conformacional e importância biológica**. 2007. (Trabalho para conclusão de disciplina)
- [39] WERTEN, Marc WT et al. Secreted production of a custom-designed, highly hydrophilic gelatin in *Pichia pastoris*. **Protein engineering**, v. 14, n. 6, p. 447-454, 2001.
- [40] GARCIA, A. H. **Protein-based polymers that bond to DNA: design of virus-like particles and supramolecular nanostructures**. 2014. Tese de Doutorado. Wageningen University.
- [41] BROCK, Thomas D. et al. Sulfolobus: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archiv für Mikrobiologie*, v. 84, n. 1, p. 54-68, 1972.
- [42] De VRIES, R. **Stretching single-stranded DNA**. Disponível em: <<http://www.wur.nl/en/article/Stretching-singlestranded-DNA.htm>>. Acesso em: 20 Out. 2016.
- [43] GARRETT, R. A.; KLENK, H. P. (Ed.). **Archaea: evolution, physiology, and molecular biology**. John Wiley & Sons, 2008.
- [44] RAMOS JÚNIOR, J. É. B. et al. Synergy of DNA-bending nucleoid proteins and macromolecular crowding in condensing DNA. **Biophysical Reviews and Letters**, v. 2, n. 03n04, p. 259-265, 2007.
- [45] KNAPP, S. et al. Thermal Unfolding of the DNA-binding Protein Sso7d from the Hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus*. **Journal of molecular biology**, v. 264, n. 5, p. 1132-1144, 1996.
- [46] AGBACK, P. et al. Architecture of nonspecific protein-DNA interactions in the Sso7d-DNA complex. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 5, n. 7, p. 579-584, 1998.
- [47] GAO, Y. G. et al. The crystal structure of the hyperthermophile chromosomal protein Sso7d bound to DNA. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 5, n. 9, p. 782-786, 1998.
- [48] DEVANAND, K.; SELSER, J. C. Polyethylene oxide does not necessarily aggregate in water. **Nature**, v. 343, n. 6260, p. 739-741, 1990.

- [49] *CARBOWAX_{TM}* and *CARBOWAX SENTRY_{TM}*. **Technical Information:** Polyethylene Glycol. Disponível em: <<http://www.dow.com/polyglycols/polyethylene/products/sentryp.htm>>. Acesso em 16 Out, 2016.
- [50] JÜ, O. **PEG StructuralFormula.** Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PEG_Structural_Formula_V1.svg>. Acesso em 02 Jul, 2016.
- [51] PARSEGIAN, V. A. et al. [29] Osmotic stress for the direct measurement of intermolecular forces. **Methods in enzymology**, v. 127, p. 400-416, 1986.
- [52] RAMOS JÚNIOR, J. É. B.; RUGGIERO NETO, J.; DE VRIES, R. Polymer induced condensation of DNA supercoils. **The Journal of chemical physics**, v. 129, n. 18, p. 185102, 2008.
- [53] RAMOS JÚNIOR, J. É. B.; DE VRIES, R.; RUGGIERO NETO, J. DNA psi-condensation and reentrant decondensation: effect of the PEG degree of polymerization. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 49, p. 23661-23665, 2005.
- [54] VASILEVSKAYA, V. V. et al. Collapse of single DNA molecule in poly (ethylene glycol) solutions. **The Journal of chemical physics**, v. 102, n. 16, p. 6595-6602, 1995.
- [55] LERMAN, L. S. A transition to a compact form of DNA in polymer solutions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 8, p. 1886-1890, 1971.
- [56] DE VRIES, R. Flexible polymer-induced condensation and bundle formation of DNA and F-actin filaments. **Biophysical journal**, v. 80, n. 3, p. 1186-1194, 2001.
- [57] YOSHIKAWA, K. et al. Compaction of DNA induced by like-charge protein: opposite salt-effect against the polymer-salt-induced condensation with neutral polymer. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 1, n. 12, p. 1763-1766, 2010.
- [58] OGDEN, R. C.; ADAMS, Deborah A. Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. **Methods in enzymology**, v. 152, p. 61, 1987.
- [59] LEPECQ, J. B.; PAOLETTI, C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: physical-chemical characterization. **Journal of molecular biology**, v. 27, n. 1, p. 87-106, 1967.
- [60] STORM, I. M. **Co-assembled DNA-protein polymer bottlebrushes.** 2016. Tese de Doutorado. Wageningen University.