



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de
membrana
Modelação e aplicação**

José Carlos Morgado Nunes

Tese para obtenção do Grau de Doutor em
Química
(3º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor António Miguel Morão
Co-orientador: Prof. Doutor João Queiroz

Covilhã, Outubro de 2013

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

Resumo

Com o crescente interesse na utilização de DNA plasmídico para terapia génica e para formulação de vacinas de DNA, surgiu a necessidade de estudar e desenvolver esquemas de purificação desta biomolécula. As tecnologias de separação com membranas são usadas em diversos tipos de processos a nível das aplicações em biotecnologia, tais como esterilização, separação sólido-líquido, concentração, troca de tampão e purificação de diversos tipos de moléculas. As técnicas de filtração com membranas apresentam normalmente vantagens em relação a outras técnicas alternativas como seja o reduzido impacto ambiental e económico, maior facilidade de aumento de escala ("scale-up"), maior produtividade dos equipamentos e maior facilidade de automatização e controlo dos processos. Entre as principais desvantagens contam-se normalmente problemas relacionados com a colmatação das membranas, os custos de substituição periódica das mesmas e a menor seletividade nas separações em certos casos.

No âmbito do presente trabalho foi efetuado um estudo fundamental da transmissão de DNA plasmídico (pDNA), nomeadamente na forma superenrolada, através de membranas de micro e ultrafiltração. O estudo incluiu a modelação do processo, com base na teoria do transporte restringido de macrossolutos através de poros estreitos, tendo sido estabelecido um novo modelo para a permeação de moléculas longas e flexíveis, tais como o pDNA e o RNA.

Estudou-se igualmente a aplicação de membranas ao isolamento de DNA plasmídico a partir de caldos de fermentação. Nomeadamente foi estudada a microfiltração de lisados e a ultrafiltração dos permeados de microfiltração obtidos com vista à concentração e purificação do DNA plasmídico antes da purificação cromatográfica, passo indispensável no processo de recuperação para assegurar o cumprimento dos padrões de qualidade requeridos pelas agências reguladoras do produto final. Efetuou-se também um estudo de otimização da operação de ultrafiltração, baseado na otimização da separação pDNA/RNA.

Os estudos de aplicação realizados permitem perspetivar a utilização da microfiltração e ultrafiltração nos processos industriais de recuperação de pDNA, como alternativas vantajosas às operações de centrifugação dos lisados para remoção dos detritos celulares e a operações alternativas no isolamento intermediário de pDNA, tais como precipitações seletivas com álcoois e sais, extrações líquido-líquido, entre outras. A microfiltração será vantajosa na medida em que permite o processamento dos caldos lisados em condições muito mais suaves do que nas centrífugas industriais onde os fluidos estão sujeitos a fortes tensões de corte que, como é sabido, podem danificar a estrutura dos plasmídeos irreversivelmente. A ultrafiltração permite eliminar o consumo de grandes volumes de álcoois, tais como o isopropanol e de sais, tais como sulfato de amónio ou cloreto de cálcio, o que representa uma enorme vantagem económica e ambiental.

Palavras-chave

Microfiltração, Ultrafiltração, DNA plasmídico, RNA, Modelação matemática

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

Abstract

There has been an increasing interest in plasmid DNA for application on gene therapy and to produce DNA vaccines. This fact led to a substantial effort in the development of purification schemes of this biomolecule. Membrane processes have shown applicability in a great variety of biotechnology processes, namely concentration, buffer exchange, solid-liquid separation, sterilization and purification. Membrane filtration techniques offer important practical advantages when compared to alternative techniques, namely reduced economical and environmental impacts, easier operation and control, easier scale-up and higher productivity. The main disadvantages of membrane filtration processes are generally due to membrane fouling, costs associated with periodic cleaning and replacement of membranes and low selectivity in some separations.

In this work, a fundamental study of supercoiled plasmid DNA (pDNA) transmission through micro and ultrafiltration membranes was carried out. The study included the development of new theoretical models, based on the hindered transport theory of flexible macromolecules through narrow pores. These models were applied to both pDNA and RNA.

The application of microfiltration and ultrafiltration operations, to accomplish pDNA recovery and purification from fermentation broths, was also studied. Namely, the microfiltration of alkaline lysates and a subsequent ultrafiltration of the permeates were used in tandem in order to concentrate and purify the pDNA before chromatography; the latter is still required in order to attain the desired quality standards imposed by the regulatory agencies for the final product.

The results obtained allow to foresee the application of micro and ultrafiltration operations in industrial processes for the primary and intermediate recovery of plasmid DNA, as better alternatives to the centrifugation of cell lysates and precipitation of pDNA with alcohols operations. Microfiltration can introduce important advantages such as the clarification of fermentation broths in milder conditions, specially when compared with industrial centrifuges where fluids are subjected to high shear. As it is well-known, this can cause irreversibly degradation of the pDNA molecules. Ultrafiltration can introduce also important advantages, specially by avoiding the use of large quantities of alcohols, such as propan-2-ol, and salts, such as ammonium sulphate or calcium chloride, which represents an important advantage in terms of the economical and environmental impact.

Keywords

Microfiltration, Ultrafiltration, Plasmid DNA, RNA, Modeling

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

Índice

1	Introdução	1
1.1	Enquadramento do trabalho	1
1.2	Integração de processos de MF e UF na purificação de pDNA	2
1.3	Revisão bibliográfica	4
1.3.1	MF e UF em processos de produção de pDNA	4
1.3.2	Modelação da permeação de DNA plasmídico em membranas	6
1.4	Objetivos e estrutura da tese	9
2	Fundamentos Teóricos	11
2.1	Modelo dos poros cilíndricos	11
2.2	Permeabilidade de membranas de MF e UF	12
2.3	Equações de Maxwell-Stefan	13
2.4	Polarização de concentração e modelo do filme	17
2.5	Polarização de concentração para solutos iónicos	19
2.6	Transporte restringido de solutos esféricos	21
2.7	Partição de moléculas longas e flexíveis	26
2.7.1	Cadeias de ligação livre (FJC)	27
2.7.2	Cadeias fechadas segmentadas (CSC)	29
2.7.3	Cadeias FJC e CSC em três dimensões	31
2.7.4	Coeficiente de partição de moléculas flexíveis	32
3	Fundamentos Práticos	35
3.1	Célula de filtração Amicon 8010	35
3.1.1	Balanço de massa: modo de concentração	36
3.1.2	Balanço de massa: modo de diafiltração a volume constante	37
3.1.3	Coeficiente de transferência de massa	38
3.1.4	Caracterização de membranas e determinação de coeficientes de permeação	39
3.2	Principais solutos em estudo	40
3.2.1	DNA plasmídico	40
3.2.2	RNA	42
3.3	Método de quantificação HIC	43
3.4	Lise alcalina	44
4	Desenvolvimento de um modelo para a filtração de moléculas longas e flexíveis.	47
4.1	Introdução	47
4.2	Desenvolvimento do modelo	48
4.2.1	Definição da estrutura FJC	48
4.2.2	Estimativa das dimensões das moléculas reais	49
4.2.3	Determinação das dimensões das cadeias	51
4.2.4	Coeficientes de partição	53
4.2.5	Estimativa da permeação dos solutos	54
4.3	Materiais e métodos	56
4.4	Resultados e discussão	57
4.5	Conclusões	59

5	Ultrafiltração de DNA plasmídico: Modelação e aplicação	61
5.1	Introdução	61
5.2	Materiais e métodos	62
5.2.1	Desenvolvimento do modelo de transferência de massa	62
5.2.2	Estimativa do coeficiente de partição do plasmídeo, Φ	64
5.2.3	Parte experimental	68
5.3	Resultados e discussão	69
5.4	Conclusões	73
6	Extração de DNA plasmídico de caldos de fermentação por um processo combinado de micro e ultrafiltração	75
6.1	Introdução	75
6.2	Materiais e métodos	76
6.2.1	Fermentação e lise celular	76
6.2.2	Ensaio de filtração com membranas	76
6.2.3	Parte analítica	77
6.2.4	Simulações	78
6.3	Resultados e Discussão	79
6.3.1	Ensaio de microfiltração	79
6.3.2	Ensaio de ultrafiltração	85
6.4	Conclusões	90
7	Modelação e aplicação prática da separação pDNA/RNA por ultrafiltração	91
7.1	Introdução	91
7.2	Materiais e métodos	92
7.2.1	Produção de pDNA e lise celular	92
7.2.2	Clarificação de lisados - Microfiltração	92
7.2.3	Ultrafiltração	93
7.2.4	Isolamento intermediário usando tecnologias de membranas	93
7.2.5	Isolamento intermediário alternativo	94
7.2.6	Parte analítica	95
7.2.7	Simulações	95
7.3	Resultados e discussão	96
7.3.1	Simulações	96
7.3.2	Resultados experimentais - Ultrafiltração	101
7.3.3	Resultados isolamento intermediário	101
7.4	Conclusões	105
8	Conclusão e perspectivas de trabalho futuro	107
	Bibliografia	111
A	Determinação da concentração mássica de células para efetuar a lise	121
B	Caracterização de lisados centrifugados	123

Lista de Figuras

1.1	Esquema genérico de um processo de purificação de DNA plasmídico.	3
2.1	Desvio ao modelo de poros cilíndricos	12
2.2	Equações de Maxwell-Stefan.	13
2.3	Representação de uma solução diluída de dois solutos	15
2.4	Coefficiente de atrito para uma solução de um soluto esférico	16
2.5	Ilustração do modelo do filme	18
2.6	Sistema de 3 componentes iônicos	21
2.7	Polarização de concentração de pDNA considerando-o neutro e com carga.	22
2.8	Soluto esférico no interior de um poro cilíndrico	23
2.9	Variação da seletividade convectiva em função de λ_s	24
2.10	Representação gráfica dos parâmetros K_d e K_c	25
2.11	Trajectoria em duas dimensões de uma cadeia FJC	28
2.12	Código MATLAB®/GNU Octave para gerar uma FJC	29
2.13	Código e representação gráfica de FJC e CSC em 2D	30
2.14	Distância residual em cadeias CSC, em função do número de segmentos	31
2.15	Código e representação gráfica de FJC e CSC em 3D	32
2.16	Condição para entrada no poro (FJC e CSC)	34
3.1	Esquema e modos de operação da célula Amicon 8010	36
3.2	Nomenclatura para balanço de massa na célula Amicon 8010	37
3.3	Identificação dos tipos de RNA na análise de AGE	42
3.4	Cromatograma típico do método de quantificação HIC	44
4.1	Dependência do rácio $\langle h^2 \rangle^{1/2} / r_g$ com L/a para o modelo WLC	51
4.2	Coefficiente de difusão de DNA linear de dupla cadeia	52
4.3	Ajuste aos valores do coeficiente de difusão de dsDNA	52
4.4	Coefficiente de partição, em função de n_k para vários valores de L/r_p	54
4.5	Coefficiente de partição em função de λ_h	55
4.6	Permeação observada do dextrano T2000 nas diferentes membranas testadas	58
4.7	Permeação observada do plasmídeo <i>pUC19</i> na membrana TEPC 0.03 μm	59
5.1	Coefficiente de partição de cadeias CSC e FJC	65
5.2	Coefficiente de partição de cadeias CSC em função de λ_g	66
5.3	Raio de giração (p1868 e SV40) em função da força iónica	67
5.4	Comparação das diferentes abordagens para estimar r_g de plasmídeos	67
5.5	Coefficiente de partição dinâmico de plasmídeos em função de n_{bp}	68
5.6	Permeações observadas do plasmídeo <i>pVAX1-LacZ</i> nas membranas testadas	70
5.7	Fração de cobertura, θ , da área de membrana por pDNA	72
5.8	Carga total das moléculas de plasmídeo adsorvidas na superfície da membrana	72
5.9	Permeação observada do plasmídeo <i>pVAX1-LacZ</i> em função da força iónica	73
5.10	Previsões do modelo para $C_{m,1}/C_{b,1}$, assumindo $Q_x = 0$	74
6.1	Previsão das permeações e da polarização de concentração (MF-A)	81
6.2	Rendimentos de permeação de pDNA e contaminantes (MF-A)	82

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

6.3	Eletroforese em gel de agarose ao longo do processo de diafiltração	82
6.4	Previsão das permeações e da polarização de concentração (MF-B)	83
6.5	Rendimentos de permeação de pDNA e contaminantes (MF-B)	84
6.6	Previsão das permeações e da polarização de concentração (MF-C)	84
6.7	Permeação e da polarização de concentração em função de r_p (MF-C)	85
6.8	Cromatogramas de HIC típicos dos lisados	85
6.9	Rendimentos de permeação de pDNA e contaminantes (MF-C)	86
6.10	Eletroforese horizontal em gel de agarose do processo MF-C/UF-C	86
6.11	Fluxo de permeado em função do fator de concentração volumétrico (UF)	87
6.12	Valores de rendimento, adsorção e remoção (UF)	87
6.13	Eletroforese horizontal em gel de agarose do processo MF-A/UF-A	87
6.14	Permeação e polarização de concentração previstas em função do fluxo	89
7.1	Esquemas dos processos de isolamento intermediário estudados	94
7.2	Valores calculados de S_{obs} do plasmídeo <i>pVAX1-LacZ</i>	98
7.3	Valores calculados de S_{obs} dos plasmídeos <i>pVAX1-LacZ</i> e <i>pCAMBIA-1303</i>	98
7.4	Valores calculados de S_{obs} das várias espécies de RNA	99
7.5	Polarização de concentração estimada para o plasmídeo <i>pVAX1-LacZ</i>	100
7.6	Polarização de concentração estimada para as várias espécies de RNA	100
7.7	Rendimentos de recuperação de pDNA e rendimentos de remoção de RNA (exp.)	102
7.8	Valores calculados de remoção de RNA no processo de ultrafiltração	103
7.9	Análise por eletroforese em gel de agarose dos ensaios de ultrafiltração	104
7.10	Análise de amostras, ao longo do processo B, por eletroforese em gel de agarose	104
7.11	Cromatogramas HIC do produto final dos processos B e C	105
A.1	Densidade ótica de lisados em função do tempo de incubação	121
B.1	Análise do lisado centrifugado com o gel Sephacryl S-1000	124
B.2	Análise do lisado centrifugado com o gel Sephacryl S-100	125

Lista de Tabelas

1.1	Porcentagem de utilização de vetores em terapia génica.	1
2.1	Dados sistema iónico 3 componentes	20
3.1	Propriedades mais relevantes dos plasmídeos estudados	42
3.2	Propriedades mais relevantes das espécies de RNA estudadas	43
5.1	Características principais das membranas usadas.	68
5.2	Coefficiente de partição do plasmídeo <i>pVAX1-LacZ</i> nas membranas usadas	69
6.1	Ácidos nucleicos presentes em maior quantidade nos lisados	79
6.2	Proteína total e DNA genómico (gDNA) nos permeados após diafiltração	82
6.3	Proteína total e DNA genómico (gDNA) nos concentrados (UF)	88
7.1	Condições operatórias utilizadas nos ensaios de isolamento intermediário.	94
7.2	Componentes e suas propriedades relevantes	96
7.3	Resultados obtidos nos processos de isolamento intermediário.	103
B.1	Principais características dos géis Sephacryl S-100 HR e Spehacryl S-1000 SF	123

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

Lista de Símbolos

a	atividade	
a	comprimento de persistência	m
A_m	área de membrana	m ²
C	concentração molar	mol/m ³
C_b	concentração no seio da solução a filtrar	mol/m ³
C_m	concentração junto à superfície da membrana	mol/m ³
C_p	concentração no permeado	mol/m ³
C_T	concentração total de uma solução	mol/m ³
D	coeficiente de difusão	m ² /s
D_∞	coeficiente de difusão numa solução não confinada	m ² /s
De	número de Deborah	
De_{crit}	número de Deborah crítico	
e	carga de um elétron	1.602×10^{-19} C
F	constante de Faraday	96 485 C/mol
G_{config}	energia livre conformacional	J
$\langle h^2 \rangle^{1/2}$	distância média entre as extremidades de uma cadeia FJC	m
I_0	função de Bessel modificada de ordem zero	
I	força iónica	mol/m ³
J	fluxo difusivo	m/s
J_{crit}	fluxo crítico	m/s
J_V	fluxo de filtração ou fluxo de permeado	m/s
j_V	fluxo volumétrico de solvente num poro	m/s
k	coeficiente de transferência de massa	m/s
k_B	constante de Boltzmann	1.381×10^{-23} J/K
kbp	quilo pares de bases	
K_c	fator de impedimento convectivo	
K_d	fator de impedimento difusivo	
L	comprimento do poro	m
l_B	comprimento de Bjerrum da água pura	m
l_k	comprimento dos segmentos de uma cadeia FJC ou CSC	m
l_K	distância de Kuhn	m
L_m	comprimento da camada ativa de uma membrana	m
L_p	permeabilidade hidraulica	m/Pa·s
\vec{r}_{cm}	coordenadas do centro de massa de uma molécula	
\vec{r}	vetor posição	
m	massa	Kg
M_w	massa molecular	kg/mol
N	fluxo molar de soluto ou número átomos	mol/m ² ·s
N_A	número de avogadro	6.022×10^{23} mol ⁻¹
nbp	número de pares de bases	
n_k	número de segmentos de uma cadeia FJC ou CSC	

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

n_p	número de poros	
Pe	número de Peclet	
Q	caudal volumétrico	m^3/s
Q_x	carga superficial na camada de pDNA adsorvido	mol/m^3
R	constante dos gases perfeitos	$8.314 J/K \cdot mol$
r_{cell}	raio das células de filtração	m
R_{DNA}	raio da dupla hélice de DNA	m
Re	número de Reynolds	
r_g	raio de giração	m
r_g^*	raio de giração instantâneo	m
r_H	raio da super-hélice do pDNA	m
r_p	raio do poro da membrana	m
r_s	raio hidrodinâmico ou de Stokes	m
s	coeficiente de sedimentação	s
Sc	Número de Schmidt	
Sh	Número de Sherwood	
S_∞	valor assintótico de permeação intrínseca	
S_m	permeação real ou intrínseca	
S_{obs}	permeação observada	
S	unidades Svedberg	$10^{-13} s$
S_y	função de mínimos quadrados	
V_s	volume parcial específico	m
T	temperatura termodinâmica	K
u	velocidade difusiva	m/s
v	velocidade convectiva ou velocidade do solvente	m/s
V_{DF}	volumes de diafiltração	m^3
V_R	volume de retenção	m^3
w	velocidade total de um soluto	m/s
Z	número efetivo de cargas	
z	valência elétrica	

Letras gregas

α	seletividade convectiva	
β	coordenada radial adimensional	
ε	porosidade	
η	viscosidade dinâmica	Pa·s
κ	inverso do comprimento de Debye	m^{-1}
λ_g	rácio entre raio de giração e raio do poro	
λ_s	rácio entre raio hidrodinâmico e raio do poro	
μ	potencial eletroquímico	J/mol
ω	velocidade de agitação angular	rad/s
Φ	coeficiente de partição	
ψ	potencial zeta	V
Ψ	potencial elétrico	V
ρ	densidade	kg/m^3
τ	tortuosidade	

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

θ	fração da área de membrana coberta com pDNA	
Υ	soma dos potenciais de um soluto	J/mol
ξ	densidade de carga do DNA	
ζ	coeficiente de atrito molar	N·s/mol·m

Subscritos

0	Valor em zero de uma coordenada espacial ou temporal.
b	seio da solução
calc	valor calculado por modelo teórico
cell	referente à célula de filtração
exp	valor determinado experimentalmente
in	referente à solução de entrada na célula
∞	referente a uma propriedade de uma solução não-confinada
m	referente à membrana
med	valor médio
p	permeado, poro, ou permeabilidade

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

Lista de Acrónimos

AE	Cromatografia de permuta aniónica
AFM	Microscopia de força atómica
AGE	Eletroforese horizontal em gel de agarose
APM	Modelo do poro assimétrico
AU	Unidades de absorvância
BMT	“Brownian motion tracking”
bp	pares de bases
BSA	Albumina do soro bovino
CSC	Cadeias fechadas segmentadas
CTAB	Brometo de cetil-tetrametilamónio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de dupla cadeia
EMA	“European Medicines Agency”
FDA	“U.S. Food and Drug Administration”
FJC	Cadeias de ligação livre
gDNA	DNA genómico
HIC	Cromatografia de interação hidrofóbica
HMw RNA	RNA de alto peso molecular
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IMAC	Cromatografia de afinidade com metal imobilizado
kbp	Número de pares de bases dividido por 1000 (Quilo-pares de bases).
LMw RNA	RNA de baixo peso molecular
LS	“Light-scattering”
MF	Microfiltração
MFP	Permeado da operação de microfiltração
MS	Maxwell-Stefan
MWCO	Massa molecular de “cut-off”
NP	Nernst-Planck
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pDNA	DNA plasmídico
pDNA (lin)	DNA plasmídico na isoforma linear
pDNA (oc)	DNA plasmídico na isoforma circular aberta
pDNA (sc)	DNA plasmídico na isoforma super-enrolada
PEG	Polietilenoglicol
PES	Poliéter sulfona
PVDF	Polivinilideno fluorido
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Cromatografia de fase reversa
SEC	Cromatografia de exclusão molecular
SPM	Modelo de poro simétrico
TEPC	Membranas de policarbonato “track-etched”
UBI	Universidade da Beira Interior
UF	Ultrafiltração
UFC	Concentrado da operação de ultrafiltração

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

UFP	Permeado da operação de ultrafiltração
VCF	Fator de concentração volumétrico
VDF	Fator de diluição volumétrico
WLC	Modelo de representação de macromoléculas “worm like chain”

Capítulo 1

Introdução

1.1 Enquadramento do trabalho

O trabalho descrito na presente tese de doutoramento aborda a integração de processos de membranas, nomeadamente a micro e ultrafiltração (MF e UF), em esquemas de purificação de DNA plasmídico (pDNA). Nos últimos anos, tem-se assistido a um enorme esforço de investigação nesta temática, o que se pode comprovar pelo elevado número de publicações científicas e de patentes registadas [1]. A principal motivação surge da possibilidade de utilizar estas biomoléculas em aplicações de terapia génica e na formulação de vacinas de DNA. Em termos simples, a terapia génica consiste no tratamento de uma doença pela introdução de nova informação genética nas células do paciente para compensar a deficiência ou ausência de determinados genes, ou para possibilitar uma nova função [2]. A evolução da terapia génica alcançou no ano transato um importante marco histórico, nomeadamente, a autorização da EMA (“European Medicines Agency”) para a comercialização de um fármaco de terapia génica (Glybera), para o tratamento da deficiência da lipoproteína lipase [3]. Existem inúmeras referências na literatura que se focam neste promissor, e simultaneamente controverso, tema [4, 2, 3, 5], assim como na formulação de vacinas de DNA [6, 7, 8].

Os plasmídeos, juntamente com retrovírus e adenovírus, constituem os três tipos de vetores mais usados atualmente em ensaios clínicos de terapia génica (tabela 1.1). Se por um lado, a utilização de vetores virais permite obter eficiências de transfecção mais elevadas, existem algumas preocupações na comunidade científica quanto às questões da segurança do paciente durante um tratamento com este tipo de vetor [3, 9, 4]. Neste respeito, o DNA plasmídico apresenta uma alternativa mais segura. Este facto terá contribuído para o crescente aumento na utilização de pDNA em ensaios clínicos, como se pode comprovar pelos valores apresentados na tabela 1.1. Apesar de nos últimos dois anos ter ocorrido um decréscimo de utilização dos três principais vetores, o pDNA foi o que registou um decréscimo menor. Por outro lado, é importante notar o aumento significativo na sua utilização comparando com os valores que se verificavam no ano 2000 [4].

A menor eficiência de transfecção conseguida com estas biomoléculas leva à necessidade de administrar elevadas doses deste vetor durante um único tratamento [12, 13]. Por este motivo, surge a necessidade de desenhar processos de produção e purificação de DNA plasmídico que apresentem elevados rendimentos. Por outro lado, uma preparação final de DNA plasmídico deve obedecer de forma

Tabela 1.1: Percentagem de utilização, em ensaios clínicos de terapia génica, dos três vetores mais usados.

Ano	Adenovírus	Retrovírus	pDNA
2000 ^a	19.3	53.0	5.3
2007 ^b	24.9	21.7	18.3
2011 ^c	24.9	20.7	18.7
2013 ^d	23.5	19.1	17.7

^a Valores obtidos em [4]

^b Valores obtidos em [10]

^c Valores obtidos em [11]

^d Valores obtidos em <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>

rigorosa às normas de segurança vigentes, que estabelecem limites mínimos, por regra muito reduzidos, da presença de contaminantes, tal como legislado pelas agências reguladoras do setor, como por exemplo a FDA (“U.S. Food and Drug Administration”) ou a EMA. Este facto leva à necessidade de desenhar esquemas de purificação de pDNA que devem estar essencialmente livres de compostos químicos perigosos, tais como cloreto de céσιο ou brometo de etídio, de solventes tais como isopropanol, fenol ou clorofórmio e de enzimas (por exemplo RNase A, proteinase K ou lisozima), frequentemente usados em protocolos laboratoriais [12, 14, 15, 16, 17, 18, 19]. Como será discutido, os processos de membranas apresentam um enorme potencial de utilização em diferentes fases de um processo de produção e purificação de DNA plasmídico, podendo suprir algumas das limitações referidas durante o desenvolvimento e implementação destes processos. Assim, no presente trabalho de doutoramento procura-se estudar a aplicação de duas operações de membranas (micro e ultrafiltração) em processos de produção de pDNA. O trabalho foi desenvolvido quer de um ponto de vista teórico, quer de um ponto de vista de aplicação prática. Na secção seguinte é feita uma descrição da possível integração destes processos num esquema de purificação de DNA plasmídico.

1.2 Integração de processos de MF e UF na purificação de pDNA

Vários artigos científicos têm vindo a ser publicados, onde os autores referem e discutem as principais etapas de um processo de produção de DNA plasmídico, desde a fase inicial do desenho dos plasmídeos e escolha de hospedeiro, até às fases finais de purificação e formulação do produto final. Destes estudos podem-se destacar as extensas revisões de Prather et al [12], de Prazeres e Ferreira [20] e de Carnes e Williams [1]. Na figura 1.1 encontra-se um esquema do processo de purificação de DNA plasmídico, adaptado das três referências indicadas. Os autores dividem o processo de purificação de pDNA, a seguir à operação de fermentação, em três etapas¹: isolamento primário, isolamento intermediário e purificação final. Como se pode constatar na figura 1.1, as operações de MF e UF podem ser usadas em praticamente todas as fases do processo.

Na grande maioria dos processos de produção de pDNA reportados na literatura, o plasmídeo de interesse é produzido por via fermentativa. A primeira etapa crítica do processo de “downstream” é a lise celular. Esta operação é necessária para abrir as paredes das células e assim libertar o plasmídeo em solução. As principais técnicas usadas são a denominada lise térmica [21, 22, 23, 19] e a lise alcalina [24, 25, 26, 27]. O método de lise mais usado continua a ser o método de lise alcalina, originalmente proposto por Birnboim e Doly [24], sendo igualmente o método escolhido no âmbito do presente trabalho. Após aplicação deste método obtém-se uma elevada quantidade de precipitados, cerca de 100 g/L num procedimento padrão [28], e uma elevada quantidade de contaminantes dissolvidos, sendo o RNA o contaminante presente em maior quantidade. A necessidade de remover o conteúdo sólido formado proporciona a possibilidade de aplicação de operações de microfiltração. Outras técnicas alternativas podem ser consideradas, por exemplo operações de centrifugação [20], de filtração com materiais inertes [26] ou por métodos de flutuação, como recentemente reportado [29].

Numa segunda fase, após remover o conteúdo sólido, é geralmente necessário proceder a uma pré-purificação do plasmídeo, uma fase a que se dá o nome de isolamento intermediário. Nesta etapa são efetuadas operações que visam preparar a corrente do processo para as operações de purificação final. Por exemplo, em regra geral é necessário concentrar o pDNA, trocar de tampão e remover alguns contaminantes. A ultrafiltração, devido às suas características, pode ser usada nesta fase do processo.

¹É comum designar-se o conjunto de operações que se seguem à etapa fermentativa como o processo “downstream”, sendo as operações que a precedem englobadas na fase de “upstream”.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana



Figura 1.1: Esquema genérico de um processo de purificação de DNA plasmídico, adaptado de [12, 20, 1]. Operações de MF e UF podem ser encontrados em praticamente todas as fases do processo. MF - Microfiltração, UF - Ultrafiltração, AE - Cromatografia de permuta aniônica, RP - Cromatografia de fase reversa, HIC - Cromatografia de interação hidrofóbica, SEC - Cromatografia de exclusão molecular, IMAC - Cromatografia de afinidade com metal imobilizado.

Outras técnicas podem ser, no entanto, consideradas como por exemplo operações de precipitação seletiva, de extração líquido-líquido e de cromatografia de leito expandido [20].

Podem ser ainda enumeradas outras aplicações de processos de MF e UF em diferentes fases do processo, como por exemplo na colheita de células após a fermentação, na esterilização do produto final e até mesmo na fase de purificação final [30]. No âmbito do presente trabalho, as operações estudadas dizem respeito à aplicação da microfiltração para a remoção de sólidos formados no decorrer da lise alcalina e à aplicação de ultrafiltração para concentrar, trocar de tampão e pré-purificar o plasmídeo antes da fase final de purificação. Estas duas operações são igualmente abordadas de um ponto de vista teórico. Os resultados obtidos podem também ser úteis no desenvolvimento e otimização de outras operações de MF e UF em diferentes fases do processo. Na secção seguinte é feita uma revisão

bibliográfica dos avanços que têm vindo a ser feitos no contexto da aplicação de operações de MF e UF em processos de produção de pDNA (secção 1.3.1), assim como os avanços alcançados na modelação da permeação destas biomoléculas em membranas (secção 1.3.2).

1.3 Revisão bibliográfica

1.3.1 MF e UF em processos de produção de pDNA

Os processos de separação baseados em tecnologias de membranas são dos processos mais ubíquos em biotecnologia [31]. Este facto deve-se essencialmente à enorme quantidade de operações que podem ser efetuadas segundo esta tecnologia, onde se podem incluir operações de separação sólido-líquido, concentração, troca de tampão, purificação e esterilização. Outras qualidades que tornam estes processos atrativos podem ser enumeradas, como por exemplo o facto destas operações apresentarem custos, quer de investimento inicial quer de funcionamento, regra geral mais reduzidos quando comparados com os custos associados a outros processos alternativos [31]. Pela sua natureza de funcionamento, são igualmente processos com um impacto ambiental reduzido [32]. Pode ainda ser referido que os processos de separação com membranas apresentam, em determinadas aplicações, características que possibilitam um scale-up linear [33], assim como a possibilidade de automatização e funcionamento em modo contínuo, o que de um ponto de vista de produção em larga escala é sempre desejável [34].

Por esse motivo tem vindo a ser estudada a aplicação de tecnologias de membranas em várias etapas de um processo de produção de DNA plasmídico. Num dos primeiros estudos publicados nesta matéria [28], Theodossiou et al avaliaram, em 1997, o desempenho de uma operação de filtração na clarificação de lisados obtidos pelo método da lise alcalina, em que uma grande quantidade de sólidos é formada. Tal como referido pelos autores do estudo, enquanto que por norma, em laboratório, estes sólidos podem ser facilmente removidos com recurso a operações de centrifugação descontínua, na produção à escala industrial a centrifugação de lisados provenientes da lise alcalina levanta sérias considerações de impraticabilidade, o que se deve em parte às elevadas tensões de corte geradas no interior de equipamentos industriais de centrifugação. Este facto foi posteriormente referido por uma série de outros autores [29, 23, 35, 36, 22]. No estudo, foi utilizado um largo conjunto de filtros, de vários materiais e tamanhos de poro, tendo-se verificado a existência de algumas complicações. Por exemplo, devido à natureza deformável dos precipitados formados, a utilização de filtros com poros superiores a 5 µm parece ser desaconselhável, em parte porque não se garante a total retenção dos sólidos presentes, e as tensões de corte geradas durante a intrusão destes sólidos nos poros provoca a re-dissolução de alguns contaminantes, de onde se destaca o DNA genómico. Por outro lado, mesmo com o filtro com poros de menores dimensões (no caso do referido estudo 5 µm) os autores verificaram uma incompleta remoção do material precipitado. Para assegurar uma total remoção de sólidos, os autores recorreram ao uso de terra de diatomáceas. No entanto esta alternativa provoca duas novas desvantagens, nomeadamente o decréscimo do rendimento da operação, provocada em parte pelo aumento da adsorção de moléculas de pDNA, e o aumento de resíduos sólidos formados.

Um pouco mais tarde, no ano 2000, surgiu provavelmente o primeiro estudo sobre a aplicação de uma operação de ultrafiltração na purificação de DNA plasmídico, sendo o trabalho da autoria de Kahn et al [18]. Neste trabalho, Kahn et al [18] conseguiram obter pDNA bastante puro mas somente após submeterem os lisados a extensos períodos de incubação, para assim obterem uma degradação significativa do RNA presente. Neste estudo ficou pela primeira vez evidenciada a dificuldade da separação entre pDNA e RNA com recurso a uma operação de ultrafiltração, e apesar dos extensos períodos de incubação do lisado levarem a uma elevada degradação do RNA, não é claro que o mesmo não venha

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

a acontecer, em parte, às moléculas de pDNA. Por outro lado, extensos períodos de incubação, num ponto de vista de aplicação industrial, podem gerar alguns problemas na automatização e controlo do processo.

Ainda no mesmo ano, Levy et al [37] publicaram um estudo onde membranas de microfiltração de nitrocelulose foram utilizadas para adsorver seletivamente gDNA, reduzindo em algumas experiências o conteúdo deste contaminante de mais de 27% para menos de 1%. Para forças iónicas iguais ou superiores a 1.5 M de NaCl os autores verificaram ainda alguma redução do conteúdo de RNA. A mesma ideia foi explorada por Kendall et al [38] um pouco mais tarde. Nestes estudos existe assim uma tentativa de efetuar duas operações num único passo, nomeadamente obter de forma simultânea uma separação sólido-líquido e uma remoção de contaminantes, sendo esta uma importante vantagem do método. No entanto, deve ser notado que as membranas apresentam por regra uma baixa capacidade para atuar como adsorventes. Por outro lado, a adsorção de contaminantes nas membranas pode levar à alteração físico-química das mesmas, o que pode conduzir a uma colmatação prematura e uma redução da reprodutibilidade entre filtrações.

Em 2003, Eon-Duval et al [16] publicaram um estudo onde abordaram uma operação de ultrafiltração com o intuito de remover a grande maioria dos contaminantes presentes após a lise alcalina, com especial enfoque para o RNA. Novamente, os autores observaram uma reduzida capacidade do processo para separar eficientemente pDNA e RNA. Para superar esta limitação os autores acoplaram à operação de ultrafiltração uma operação de precipitação seletiva com CaCl_2 . Tal como verificado no estudo de Kahn et al [18], após prévia remoção de RNA é possível obter uma elevada remoção de contaminantes com uma única operação de ultrafiltração. O método desenvolvido, apesar de eficiente, tem a clara desvantagem da necessidade de utilização de grandes quantidades de CaCl_2 , o que aumenta significativamente o custo e impacto ambiental do processo.

Em 2004, Kepka et al [39] utilizaram com sucesso uma operação de ultrafiltração para trocar de tampão e concentrar um lisado, proveniente da lise alcalina, antes de o submeterem a um processo de extração líquido-líquido. A boa capacidade de processos de ultrafiltração para efetuar operações de concentração e de troca de tampão/dessalinização foi assim demonstrada. A redução de volume e da força iónica do lisado conseguida no passo de ultrafiltração revelou-se essencial para a exequibilidade do processo proposto pelos autores.

Em 2006 surgiu talvez a primeira publicação referente a uma operação de esterilização com recurso à microfiltração, no âmbito da produção de DNA plasmídico. O trabalho foi desenvolvido por Kong et al [40], onde a filtração de soluções puras de pDNA foi efetuada com membranas de PVDF e PES com $0.22\ \mu\text{m}$ e $0.2\ \mu\text{m}$ de poro, respetivamente. Um novo trabalho sobre esta mesma temática viria a ser publicado mais tarde por parte dos autores [35]. Os referidos estudos vieram comprovar a possibilidade de utilizar uma operação de microfiltração para proceder ao passo final de esterilização da preparação de pDNA. Os autores identificam potenciais problemas nesta operação, em especial à medida que o tamanho das moléculas de pDNA aumenta, o que pode levar a uma excessiva retenção e conseqüente perda de rendimento. Verificou-se igualmente uma dependência quase linear entre a permeação de pDNA e o tamanho das moléculas estudadas, bem como um aumento de permeação com o aumento da força iónica do meio.

Em 2008 [41] e em 2009 [32], Freitas et al publicaram dois estudos sobre a aplicação de uma operação de ultrafiltração, com diafiltração, no isolamento intermediário de DNA plasmídico, procurando esta operação constituir uma alternativa viável a outras operações, nomeadamente operações de precipitação e de extração líquido-líquido. Apesar dos bons rendimentos de recuperação de pDNA e de remoção de proteínas e endotoxinas obtidos, os autores verificaram novamente baixa remoção de RNA no passo de ultrafiltração. Este resultado, em concordância com estudos anteriores [18, 16] apresenta-se assim como principal limitação do método, uma vez que em termos de impacto ambiental e eco-

nômico, o processo de ultrafiltração permitiu obter resultados mais satisfatórios, quando comparado com os processos alternativos estudados.

O trabalho desenvolvido pelos vários autores, sobre a aplicação de tecnologias de separação com membranas num processo de produção de DNA plasmídico, veio comprovar que estes processos podem constituir alternativas atrativas quer nos isolamentos primário e intermediário, quer na fase final de esterilização. No entanto, em 2011, Latulippe e Zydney [30] comprovaram também a possibilidade de se conseguir uma separação de isoformas de pDNA recorrendo à ultrafiltração, operação até aí apenas possível com outras tecnologias de maior resolução (tais como cromatografia, eletroforese em gel de agarose, entre outras). O processo desenvolvido baseia-se na diferença entre os valores de fluxo crítico para as várias isoformas de plasmídeo, sendo o fluxo crítico o valor de fluxo para o qual as moléculas apresentam um aumento súbito de permeação pela membrana, provocado pela deformação induzida pelas tensões de corte geradas à entrada do poro.

Mais recentemente, Sun et al [42] desenvolveram um processo de produção de DNA plasmídico em que utilizam várias operações de membranas: uma primeira filtração do lisado numa membrana com 1.0 μm de poro, uma operação de ultrafiltração para remover RNA de baixo peso molecular, concentrar e trocar de tampão, uma operação de esterilização com uma membrana de 0.2 μm de poro e ainda uma operação de ultrafiltração para efetuar uma concentração final. Este trabalho indica com clareza a utilidade das tecnologias de membranas ao longo de um processo de produção de DNA plasmídico.

Os processos de separação com membranas são parte integrante dos esquemas de purificação de proteínas [33], e o trabalho que tem vindo a ser desenvolvido na última década e meia veio comprovar que para a produção de DNA plasmídico o cenário pode vir a ser o mesmo. Contudo, ainda existe um grande desconhecimento a nível teórico dos processos envolvidos na filtração de moléculas como o DNA plasmídico ou o RNA. Assim no presente trabalho de doutoramento, para além de terem sido investigados os principais aspetos relacionados com a aplicabilidade prática das técnicas de filtração com membranas, nomeadamente ao nível da separação sólido-líquido por microfiltração e purificação intermédia por ultrafiltração, deu-se particular relevância ao estabelecimento de modelos teóricos que permitam melhor compreender os processos de separação estudados.

1.3.2 Modelação da permeação de DNA plasmídico em membranas

O fenómeno da permeação de moléculas em poros de pequenas dimensões é uma matéria de interesse fundamental no estudo de operações de separação com membranas. Uma descrição matemática deste fenómeno é sempre desejável, em primeiro lugar porque um modelo matemático pode ser confrontado com resultados experimentais, podendo assim validar uma teoria ou ideia sobre o modo como as moléculas em estudo se comportam perante um cenário de permeação em poros. Em segundo lugar, a obtenção de um modelo matemático validado experimentalmente pode possibilitar prever, com um certo grau de exatidão, a permeação de solutos num processo de separação com membranas facilitando assim operações de otimização, aumento de escala, automatização e controlo. Alternativamente, a obtenção de previsões teóricas constitui um termo comparativo com os resultados experimentais facilitando assim uma interpretação dos mesmos, o que em última instância pode conduzir a uma melhor compreensão dos fenómenos envolvidos e posterior otimização da operação.

Provavelmente um dos artigos mais citados, sobre o transporte restringido de solutos esféricos através de poros de pequenas dimensões, teoria que serviu de base para os modelos físicos desenvolvidos neste trabalho, seja o de Deen [43], onde o autor faz uma revisão dos resultados obtidos neste âmbito. Mais recentemente, Dechadilok e Deen [44], publicaram uma revisão mais atual sobre esta temática. Apesar dos primeiros avanços na teoria do transporte restringido, que datam do início da década de 50, e do posterior modelo de Deen, terem tido como motivação o estudo do movimento dos

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

componentes do sangue em capilares [45], os resultados obtidos acabaram por se revelar de grande interesse para a área das tecnologias de separação com membranas [46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54].

No entanto, os resultados que se obtêm por este modelo, posteriormente melhorado por vários autores [44, 46, 47, 55, 56], são apenas válidos para situações em que as dimensões do soluto não ultrapassam as dimensões do poro, e o soluto em si pode ser visto como uma esfera rígida (isto é, que não sofre deformação). Dentro desta categoria podem ser englobadas moléculas como proteínas, que possuem um núcleo hidrofóbico denso, originando uma estrutura globular com reduzida flexibilidade molecular [57]. No caso das moléculas de DNA plasmídico, é sabido que estas apresentam valores de permeação significativos através de poros com dimensões bastante inferiores aos seus raios hidrodinâmicos. De facto, tal como mostrado recentemente por Arkhangelsky et al [58], sob suficiente pressão hidrostática observa-se a existência de permeação de plasmídeos em poros com dimensões cerca de 30 vezes inferiores. Naturalmente, tratar uma molécula de pDNA como uma esfera rígida é uma abordagem claramente insuficiente para a obtenção de modelos com boa capacidade de previsão.

Pelo referido, surge a necessidade de abordar o problema de uma diferente forma. Os principais avanços nesta temática foram feitos por Zydney et al numa série de publicações [59, 60, 61, 57, 62, 30]. A primeira tentativa de modelação da permeação de DNA plasmídico em membranas de ultrafiltração surgiu em 2007 [59], com a publicação de um estudo em que os autores começaram por obter dados da permeação de um plasmídeo com 3.0 kbp através de 3 membranas de ultrafiltração com diferentes “cut-offs”. Verificou-se, nesse trabalho, a existência de um valor de fluxo de permeado a partir do qual o plasmídeo começava a permear pela membrana. Com base nesta observação os autores propuseram o conceito de fluxo crítico (J_{crit}) para descrever a permeação de pDNA. Este conceito indica que a partir de um determinado valor de fluxo de filtração (fluxo crítico) as tensões de corte geradas à entrada dos poros provocam a necessária deformação molecular para permitir a ocorrência de permeação. Os autores procuraram assim ajustar, aos valores de J_{crit} determinados experimentalmente, o modelo desenvolvido por Daoudi e Brochard [63]:

$$J_{crit} = \frac{\varepsilon k_B T}{r_p^2 \eta} \quad (1.1)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, η a viscosidade da solução, ε a porosidade da membrana e r_p o raio do poro. No entanto, verificou-se que a previsão do fluxo crítico, dada pela equação 1.1, sobrestimava em mais de 3 ordens de grandeza os resultados experimentais. Os autores propuseram assim uma modificação ao modelo de Daoudi e Brochard que proporcionou um melhor ajuste:

$$J_{crit} = \left(\frac{\pi^2 D}{r_g^2} \right) \left(\frac{\varepsilon r_H^3}{r_p^2} \right) \quad (1.2)$$

onde D é o coeficiente de difusão, r_g é o raio de giração do plasmídeo e r_H é o seu raio da super-hélice. Com este novo modelo obteve-se um ajuste dentro da mesma ordem de grandeza. Os autores verificaram igualmente uma aparente independência das permeações com a velocidade de agitação.

No ano seguinte, os mesmos autores publicaram um estudo sobre a permeação de um plasmídeo com 3.0 kbp, através de membranas de ultrafiltração, em diferentes condições de força iónica [61]. O modelo representado na equação 1.2 prevê variações no valor de J_{crit} com variações na força iónica da solução através das variáveis r_g , r_H e D , sendo que as duas primeiras diminuem e a última aumenta com o aumento da força iónica [61]. Os autores verificaram uma enorme influência da concentração de NaCl na permeação das moléculas de pDNA, tendo verificado uma permeação 80 vezes superior para um aumento da concentração de 1 mM para 150 mM de NaCl. O modelo representado

na equação 1.2 apresentou bons resultados na previsão de J_{crit} , mesmo tendo em conta o efeito do sal na permeação.

Em 2009 [60] o modelo proposto, dado pela equação 1.2, foi corrigido pelos mesmos autores. O novo modelo obtido tem a particularidade de prever uma independência do fluxo crítico em relação ao raio de giração das moléculas de plasmídeo, o que os autores identificaram como uma evidência experimental:

$$J_{\text{crit}} = \frac{\pi}{6} \left(\frac{\varepsilon}{r_p^2} \right) \left(\frac{\beta^3 \text{De}_{\text{crit}}}{\lambda} \right) \left(\frac{k_B T}{\eta} \right) \quad (1.3)$$

onde De_{crit} é o número de Deborah crítico, λ é o rácio entre o raio hidrodinâmico (r_g) e o raio de giração (r_g) do plasmídeo e β um parâmetro empírico. A ausência da forte dependência de r_g no valor de J_{crit} está em melhor concordância com os resultados obtidos, em que a permeação de três plasmídeos de diferentes tamanhos se revelou estatisticamente semelhante. Ainda no mesmo ano [57], um novo estudo sobre a importância da flexibilidade de biopolímeros em processos de ultrafiltração viria a ser publicado pelos mesmos autores. Nesse estudo apresentaram-se resultados obtidos com pDNA e proteínas pegiladas.

Ainda o mesmo grupo de investigação viria a publicar nesse ano um estudo sobre a influência da carga das membranas na permeação das moléculas de pDNA [62], que como é bem sabido possuem uma elevada carga negativa. Os autores obtiveram valores de J_{crit} muito superiores aquando da utilização de membranas carregadas negativamente, obtidas por um processo de modificação química, por comparação com os valores obtidos nessas mesmas membranas sem carga (não modificadas). Os autores atribuíram este fenómeno à ocorrência de interações eletrostáticas entre a membrana e o plasmídeo, ideia esta suportada pela atenuação desta diferença durante a filtração de soluções com maior força iónica (150 mM NaCl). O seguinte modelo foi sugerido para o cálculo da permeação observada (S_{obs}) do pDNA:

$$\ln(S_{\text{obs}}) = - \left(\frac{\Delta G_{\text{config}}}{k_B T} \right) - \frac{Z e}{I_0(\kappa r_p)} \psi_0 \quad (1.4)$$

onde ΔG_{config} representa a variação de energia livre associada com a alteração da conformação da molécula quando entra no poro, Z é o seu número efetivo de cargas, e é a carga de um eletrão, I_0 é a função de Bessel modificada de ordem zero, κ é o inverso do comprimento de Debye e ψ_0 é o potencial zeta da membrana. O ajuste deste modelo aos pontos experimentais levou os autores a propor que a partição das moléculas de pDNA é determinada pela entrada apenas de uma pequena parte do plasmídeo no poro (um comprimento de persistência ou aproximadamente 50 nm), com o resto da molécula a ser conduzida para o poro pelo fluxo convectivo do solvente.

A teoria desenvolvida nos artigos descritos em cima teve sempre como base a noção de que a flexibilidade inerente às moléculas de pDNA faz com que a partir de um certo fluxo de filtração os gradientes de velocidade que se formam junto aos poros da membrana são suficientes para provocar uma deformação nas moléculas, o que possibilita a sua permeação em poros com dimensões muito inferiores às dos raios hidrodinâmicos das moléculas. Foi esta ideia que esteve na origem do trabalho, publicado em 2011 por Latulippe e Zydney [30], onde pela primeira vez se demonstrou a separação de isoformas de pDNA numa operação de ultrafiltração. De facto esta separação foi possível porque os autores verificaram experimentalmente que as diferentes isoformas apresentam diferentes valores de J_{crit} , ou seja apresentam diferentes graus de flexibilidade. Neste estudo foi estabelecido um paralelismo com outros dois processos de separação alternativos: a eletroforese horizontal em gel de

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

agarose, onde as isoformas apresentam diferentes mobilidades eletroforéticas, e a cromatografia de exclusão molecular, onde o que difere são os volumes de retenção.

Apesar dos avanços feitos pelo grupo de investigação de Zydney et al terem fornecido um elevado conjunto de novos conceitos e uma nova visão sobre esta temática, pode ser mostrado experimentalmente que o conceito de fluxo crítico não é completamente verificado na prática, ou seja, é possível demonstrar que a permeação de pDNA não aumenta subitamente de valores de permeação reduzidos para a ocorrência de permeação total quando o fluxo de filtração ultrapassa o valor do fluxo crítico. A noção de fluxo crítico prevê que a permeação de pDNA só deve assumir valores ou muito reduzidos ou muito elevados. No entanto, na prática não é incomum obter permeações intermédias de pDNA em membranas de UF, sendo este um resultado que não é previsto pelo conceito de fluxo crítico. Por outro lado, não parece haver uma unificação dos modelos, ou seja, as várias equações não são dedutíveis a partir de um mesmo conceito teórico, e a sua formulação foi sendo feita com algumas noções semi-empíricas, para que as previsões se pudessem aproximar aos resultados experimentais. Este facto leva a que seja difícil estender a análise a outros tipos de moléculas de interesse, como por exemplo o RNA. Na presente tese de doutoramento é feita uma tentativa de superar estas limitações dos modelos de Zydney et al enunciados anteriormente. Para isso, procura-se estabelecer um paralelismo com um dos modelos mais citados e utilizados na área das operações de MF e UF, o denominado modelo do transporte restringido [43, 44], discutido no capítulo 2. É igualmente intenção do presente trabalho procurar formular conceitos teóricos que possam permitir uma melhor adaptação dos modelos desenvolvidos a outros tipos de moléculas, sendo o RNA uma molécula de especial interesse, não só por ser um dos principais contaminantes num processo de produção de pDNA, como também pelo crescente interesse na sua utilização para fins terapêuticos.

1.4 Objetivos e estrutura da tese

O objetivo principal da presente tese de doutoramento foi o de desenvolver o conhecimento na área da aplicação de operações de MF e UF em processos de produção de pDNA. Em especial procurou-se estudar a aplicação de uma operação de microfiltração para efetuar a remoção de sólidos formados na etapa de lise celular, e uma operação de ultrafiltração na fase do isolamento intermediário do DNA plasmídico. O presente trabalho teve também como objetivo desenvolver modelos teóricos com capacidade de prever a permeação de pDNA em membranas de micro e ultrafiltração. Procurou-se que o desenvolvimento teórico pudesse ser efetuado de uma forma abrangente para permitir a sua utilização em diferentes operações de membranas e para diferentes tipos de solutos. Em seguida é apresentado um pequeno resumo dos capítulos que integram a presente tese de doutoramento.

Capítulo 1 Neste presente capítulo é feito o enquadramento do trabalho explicitando as principais motivações e objetivos do mesmo. É feita uma revisão bibliográfica procurando identificar e discutir as principais publicações existentes na área de aplicação da presente tese, nomeadamente, no desenvolvimento de operações de MF e UF para integração em processos de produção de pDNA e modelação da permeação desta biomolécula em membranas.

Capítulo 2 Abordam-se os fundamentos teóricos inerentes à realização do presente trabalho. Procura-se desenvolver o material exposto de forma sequencial e integrada. As principais equações e fundamentos usados são deduzidos, assim como as suas limitações indicadas e discutidas. Os principais tópicos abordam maioritariamente a descrição da transferência de massa em operações de MF e UF. A análise é estendida para o caso de moléculas longas e flexíveis.

Capítulo 3 Discutem-se os aspetos práticos mais relevantes inerentes à realização do presente trabalho. Não se procura neste capítulo fazer uma extensa exposição de todos os métodos e procedimentos laboratoriais usados, mas sim expor os resultados práticos mais relevantes com aplicação transversal. Os detalhes práticos mais específicos referentes a um determinado capítulo são fornecidos nesse mesmo capítulo (capítulos 4–7).

Capítulo 4 Desenvolve-se a modelação da permeação de moléculas longas e flexíveis em poros de pequenas dimensões. É estudada a permeação de duas macromoléculas, o plasmídeo *pUC19* na isoforma linear e o dextrano T2000. É elaborado um modelo de transferência de massa que pela primeira vez complementa os modelos de transporte restringido, possibilitando a sua aplicação para situações em que as dimensões dos solutos são superiores às dimensões dos poros. São utilizados métodos estocásticos para determinar o coeficiente de partição deste tipo de moléculas. O texto exposto foi publicado no *Journal of Membrane Science* [64].

Capítulo 5 Estuda-se a ultrafiltração de DNA plasmídico na isoforma superenrolada, pDNA (sc). O modelo desenvolvido no capítulo 4 é usado para servir de base à construção de um novo modelo de transferência de massa. Este novo modelo permite contabilizar efeitos de carga na permeação de pDNA (sc) em membranas de ultrafiltração, o que tem especial interesse dada a elevada carga elétrica destas moléculas. É igualmente proposto um novo modelo de representação destas macromoléculas circulares (modelo CSC), que permite obter previsões mais exatas das suas dimensões. As previsões do modelo desenvolvido são comparadas com resultados experimentais de permeação de pDNA(sc). O fenómeno frequentemente observado da adsorção de plasmídeo em membranas, e também nos ensaios realizados, é interpretado em termos teóricos. O texto exposto foi publicado no *Journal of Membrane Science* [65]

Capítulo 6 Neste capítulo é desenvolvido um estudo de aplicação de membranas de microfiltração para a remoção dos sólidos originados durante o processo de lise alcalina. É estudada igualmente uma operação de ultrafiltração subsequente para efetuar uma concentração do lisado filtrado. O modelo desenvolvido na capítulo 5 é usado para orientar a escolha das membranas e para interpretar os resultados experimentais. Neste capítulo, é modelada a permeação de diferentes tipos de moléculas de RNA, como cadeias flexíveis, obtendo-se assim uma ampliação do espectro de aplicação do modelo desenvolvido no capítulo 4, para este importante tipo de biomoléculas. O texto exposto foi publicado no *Journal of Membrane Science* [11].

Capítulo 7 Apresenta-se o último estudo desenvolvido no âmbito deste trabalho de doutoramento, que se focou na otimização da separação pDNA/RNA por uma operação de UF. Pela primeira vez, o modelo desenvolvido no capítulo 6 é estendido para ser aplicável a um sistema de 4 componentes iónicos. Este melhoramento introduz a possibilidade de aferir as interações que as moléculas de pDNA e RNA produzem entre si durante processos de UF, e que se refletem nas permeações observadas. É obtida uma elevada seletividade do processo de UF/DF para efetuar a separação pDNA/RNA, com rendimentos comparáveis aos que se obtêm com um procedimento laboratorial alternativo que usa elevadas quantidades de solventes e de sais, e consequentemente com menor aplicabilidade a nível industrial. O texto exposto foi submetido para publicação no *Journal of Membrane Science*.

Capítulo 8 Neste último capítulo são apresentadas as principais conclusões resultantes da realização do trabalho e as perspetivas de trabalho futuro.

Capítulo 2

Fundamentos Teóricos

Neste capítulo são discutidas as equações e fundamentos teóricos inerentes à realização do presente trabalho. A abordagem incide, naturalmente, nos processos de membranas usados, nomeadamente a microfiltração (MF) e a ultrafiltração (UF). Não está no âmbito do presente trabalho fazer uma introdução aos processos de MF e UF, sendo esta uma área de conhecimento em constante expansão e onde existe uma enorme diversidade de aplicações e conseqüentemente de tipo de equipamentos, o que conduziria a uma extensa exposição. Contudo, existem referências bibliográficas onde estes processos são apresentados e amplamente discutidos [66, 31, 33, 67], desde os métodos de síntese de membranas, os vários tipos de aplicações e de equipamentos, denominados módulos de filtração, e os principais avanços científicos que têm vindo a ser efetuados.

2.1 Modelo dos poros cilíndricos

Os processos de MF e UF são muito semelhantes, são ambos processos de membranas em que a principal força motriz é o diferencial de pressão. As membranas são consideradas porosas, o que significa que o transporte de massa se dá, na sua totalidade, através dos poros. As membranas de microfiltração apresentam poros com diâmetros que podem ir dos 0.1 aos 10 μm , na grande maioria dos casos. Por esse motivo, os processos de microfiltração são muito utilizados para proceder a separações sólido-líquido e a operações de esterilização. As membranas de UF, por sua vez, apresentam poros de menores dimensões, por regra entre 2 e 100 nm. Os processos de ultrafiltração podem ser usados num grande número de aplicações, por exemplo operações de concentração, de troca de tampão, e de dessalinização e purificação de soluções de macromoléculas.

Os componentes da mistura a filtrar podem apresentar diferentes permeações consoante os seus tamanhos (exclusão molecular) e/ou as suas características físico-químicas, de onde se destaca a sua carga elétrica. A estrutura da grande maioria das membranas de MF e UF é complexa (ver figura 2.1). Tentar modelar essa mesma estrutura com um elevado grau de precisão é bastante difícil ou mesmo impossível. Por esse motivo, surge a necessidade de elaborar modelos mais simples, sendo o mais utilizado o modelo de poros cilíndricos (figura 2.1). Neste modelo, considera-se que os poros apresentam uma área de secção reta uniforme e perpendicular à superfície da membrana¹. Como se poderá constatar, considerar os poros como cilíndricos permite obter uma interpretação teórica de vários fenómenos durante processos de MF e UF, o que tem utilidade na interpretação de resultados e elaboração de modelos com capacidade de previsão.

O desenvolvimento teórico descrito neste capítulo é assim baseado no modelo dos poros cilíndricos. Considera-se igualmente que os coeficientes de transferência de massa, muito dependentes da geometria do módulo de membranas utilizado, são conhecidos ou podem ser determinados experimentalmente.

¹Dentro do modelo dos poros cilíndricos podem ser considerados alguns melhoramentos que não complicam demasiado a análise (ver [47, 66]).

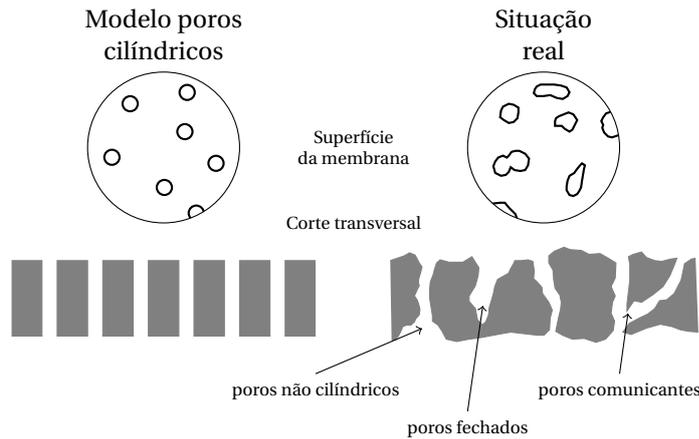


Figura 2.1: Ilustração do desvio ao modelo ideal de poros cilíndricos apresentado por membranas de MF e UF. A estrutura de uma membrana real pode diferir significativamente da situação ideal, por exemplo contendo poros não cilíndricos, poros fechados e poros comunicantes.

2.2 Permeabilidade de membranas de MF e UF

As membranas de MF e UF são consideradas membranas porosas, isto é, na sua estrutura existem poros de pequenas dimensões por onde ocorre, na sua totalidade, o transporte de massa. Excluídos deste processo de transferência de massa estão os solutos cujas dimensões e/ou carga elétrica não lhes permitam permear através desta estrutura porosa. Se os poros forem considerados cilíndricos, o fluxo de líquido pode ser relacionado com o diferencial de pressão ao longo da membrana através de um simples balanço de quantidade de movimento. Se o escoamento através de um poro cilíndrico, perpendicular à superfície da membrana, for laminar (como é geralmente o caso em processos de MF e UF), e estiver completamente desenvolvido, o perfil de velocidade é função da coordenada radial adimensional, $\beta (= r/r_p)$ [68]:

$$v(\beta) = 2j_V(1 - \beta^2) \quad (2.1)$$

onde v é a velocidade do líquido (função de β) e j_V é o fluxo de líquido no poro dado por:

$$j_V = \frac{r_p^2}{8\eta L} \Delta p \quad (2.2)$$

onde Δp representa o diferencial de pressão ao longo do poro, r_p o raio do poro, η a viscosidade e L o comprimento do poro. A equação 2.2 é conhecida como a equação de Hagen-Poiseuille, e um escoamento que obedeça à referida equação é denominado como um escoamento de Poiseuille. Uma quantidade de maior interesse em processos de MF e UF é o caudal de filtração por unidade de área de membrana, J_V , normalmente denominado fluxo de filtração. Considerando que a membrana contém n_p poros cilíndricos paralelos, todos com raio r_p , então J_V é dado por:

$$\begin{aligned} Q &= J_V A_m = j_V n_p \pi r_p^2 \\ J_V &= \varepsilon j_V \end{aligned} \quad (2.3)$$

onde Q é o caudal (volumétrico) de filtração, A_m é a área total da superfície da membrana e ε é a fração da área total de membrana ocupada pelos poros, denominada porosidade ($\varepsilon = n_p \pi r_p^2 / A_m$). Assim,

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

$$\vec{F}_i = \sum_{j \neq i} \zeta_{i,j} x_j (\vec{u}_i - \vec{u}_j)$$

Coeficiente de atrito entre i e j
Velocidade do componente i (difusiva)

Força motriz no componente i
Fração molar do componente j
Velocidade do componente j (difusiva)

Figura 2.2: Equações de Maxwell-Stefan.

pelas equações 2.2 e 2.3, o fluxo de filtração é dado por:

$$J_V = \frac{\varepsilon r_p^2}{8\eta L} \Delta p \quad (2.4)$$

A equação 2.4 pode ainda ser modificada pela inclusão de um parâmetro τ (tortuosidade) que possa contabilizar o afastamento à situação ideal de se terem poros perpendiculares à superfície da membrana [66]. Assim, se o comprimento médio dos poros numa situação não ideal for \bar{L} e a espessura da membrana for L_m , o parâmetro tortuosidade é definido como $\tau = \bar{L}/L_m$, e a equação 2.4 vem assim:

$$J_V = \frac{\varepsilon r_p^2}{8\eta \tau L_m} \Delta p \quad (2.5)$$

É importante notar que o parâmetro τ deve ser visto como um parâmetro empírico, uma vez que a equação 2.1 só é válida para poros paralelos à direção do escoamento. A equação 2.5 indica que o fluxo de líquido através da membrana é diretamente proporcional ao diferencial de pressão. Com exceção da viscosidade, a constante de proporcionalidade é apenas função de características intrínsecas da membrana e é designada por permeabilidade hidráulica (L_p). Assim a equação 2.5 pode ser reescrita da seguinte forma [60]:

$$J_V = L_p \Delta p \quad (2.6)$$

A permeabilidade hidráulica é uma característica específica de cada membrana e a sua determinação permite aferir o grau de colmatação. Importa também salientar que durante a filtração de soluções que contenham solutos que sejam parcialmente (ou totalmente) retidos pela membrana, a relação linear entre o fluxo de filtração e a pressão aplicada não é verificada experimentalmente, o que se deve em parte à ocorrência de um aumento de concentração destes solutos junto à membrana, um fenómeno conhecido como polarização de concentração, discutido na secção 2.4.

2.3 Equações de Maxwell-Stefan

O transporte de massa em processos de MF e UF pode ser descrito segundo várias abordagens. Uma abordagem possível é através das equações de Maxwell-Stefan (MS). Uma descrição pormenorizada destas equações pode ser encontrada na literatura [69, 70, 71, 72]. Em termos qualitativos, as equações de MS indicam que, em condições de estado estacionário, a força motriz aplicada num componente de uma mistura é contrabalançada pela força de atrito provocada pelo movimento relativo deste componente na mistura. Para um dado componente i numa mistura de vários componentes j as equações de MS assumem a seguinte forma (ver igualmente a figura 2.2):

$$\vec{F}_i = \sum_{j \neq i} \zeta_{i,j} x_j (\vec{u}_i - \vec{u}_j) \quad (2.7)$$

onde \vec{F}_i é a força motriz por mole do componente i , $\zeta_{i,j}$ é o coeficiente de atrito molar entre i e j , x_j é a fração molar de j , \vec{u}_i é a velocidade do componente i e \vec{u}_j a velocidade do componente j . As velocidades que figuram na equação 2.7 são velocidades difusivas. Para além da velocidade difusiva, um componente pode ter igualmente uma velocidade convectiva (\vec{v}) provocada pelo movimento da mistura como um todo. Assim, a velocidade total, \vec{w} , de um determinado componente i de uma mistura é dada pela soma destas duas velocidades:

$$\vec{w}_i = \vec{u}_i + \vec{v}_i \quad (2.8)$$

A força motriz \vec{F}_i é dada pelo simétrico do gradiente de um potencial (Υ):

$$-\nabla \Upsilon_i = \sum_{j \neq i} \zeta_{i,j} x_j (\vec{u}_i - \vec{u}_j) \quad (2.9)$$

O potencial que figura na equação 2.9 representa a soma dos vários potenciais referentes ao componente i , como por exemplo o potencial gravítico, centrífugo ou eletroquímico, sendo este último o único com interesse no presente trabalho. O potencial eletroquímico de um dado componente i é dado por [56]:

$$\mu_i = RT \ln a_i + z_i F \Psi + V_i p + \text{constante} \quad (2.10)$$

onde μ_i é o potencial eletroquímico da espécie i , R é a constante dos gases perfeitos, T é a temperatura absoluta, a_i é a atividade, z_i é a valência elétrica, F é a constante de Faraday, Ψ o potencial elétrico, V_i o volume parcial molar e p a pressão. A força motriz é assim dada pelo gradiente espacial do potencial eletroquímico, o que para uma situação de transporte de massa unidimensional, segundo uma coordenada y , resulta em:

$$F_i = -\frac{d\mu_i}{dy} = -\left(RT \frac{d \ln a_i}{dy} + z_i F \frac{d\Psi}{dy} + V_i \frac{dp}{dy} \right) \quad (2.11)$$

A dependência do potencial eletroquímico com a pressão pode ser importante, em especial quando o volume molar do componente é elevado. No entanto é por vezes desprezada tendo em conta a maior dependência com a atividade e potencial elétrico. No presente trabalho opta-se por desprezar o termo referente à pressão para simplificar um pouco a formulação das equações e agilizar os cálculos inerentes.

As equações de MS representadas na equação 2.9 podem ser enormemente simplificadas considerando algumas aproximações. Em primeiro lugar, assumindo que as soluções são diluídas e ideais, as atividades dos componentes são iguais às suas frações molares. Por outro lado, sendo soluções diluídas, assume-se que a força de atrito sobre um soluto i da solução, dada pelo segundo membro da equação 2.9, é aproximadamente igual à força de atrito resultante do seu movimento relativo em relação ao solvente. A justificação para esta aproximação passa por verificar que a força de atrito entre solutos é proporcional à fração molar dos mesmos, frações molares estas, que para o caso de soluções diluídas assumem valores reduzidos (ver figura 2.3). Por fim, assume-se que o transporte de massa pode ser aproximadamente descrito por uma abordagem unidimensional segundo uma coordenada

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

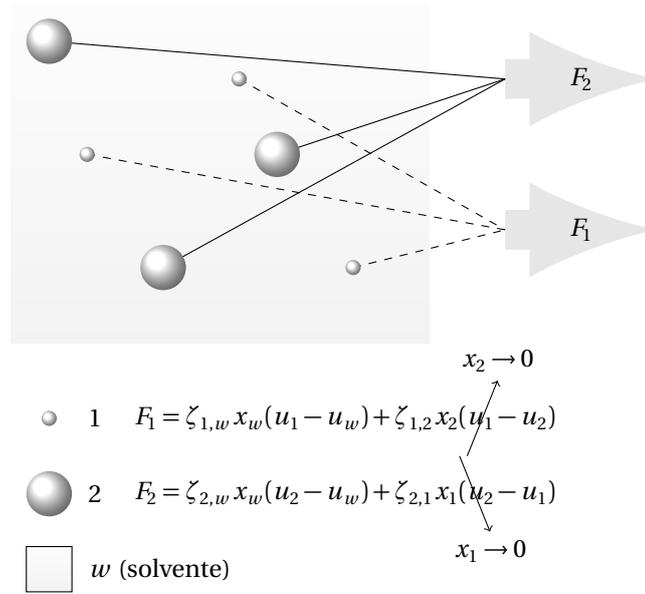


Figura 2.3: Representação de uma solução diluída de dois solutos (1 e 2) num solvente (w). Para soluções diluídas, as forças de atrito entre solutos podem ser desprezadas devido às reduzidas frações molares dos mesmos.

y . Assim, as equações de MS assumem a seguinte forma simplificada:

$$-\left(RT \frac{d \ln x_i}{d y} + z_i F \frac{d \Psi}{d y} \right) = \zeta_{i,w} x_w (u_i - u_w) \quad (2.12)$$

O índice w é usado para indicar que a propriedade se refere ao solvente, que no caso deste trabalho é a água. A equação 2.12 pode ainda ser simplificada considerando que, como as soluções são diluídas, $x_w \approx 1$. Por outro lado, assume-se que a velocidade difusiva do solvente é nula $u_w \approx 0$. Esta suposição está de acordo com a opção de se escolher a velocidade do solvente como velocidade de referência, discutida por Taylor e Krishna [72]. Assim, tendo em conta a equação 2.8, obtém-se por fim:

$$-\left(RT \frac{d \ln x_i}{d y} + z_i F \frac{d \Psi}{d y} \right) = \zeta_{i,w} (w_i - v_i) \quad (2.13)$$

A velocidade convectiva do componente i (v_i) nem sempre assume o mesmo valor da velocidade convectiva do solvente, em especial quando a solução se encontra confinada como é o caso na permeação através de poros de membranas. No entanto as duas velocidades são proporcionais, sendo a constante de proporcionalidade denominada seletividade convectiva (α_i) [71]:

$$v_i = \alpha_i v_w \quad (2.14)$$

Na secção 2.6 será abordada uma situação em que α_i é diferente de 1. Pode-se ainda referir que o coeficiente de atrito, ζ , pode ser facilmente relacionado com o coeficiente de difusão, D , através da seguinte equação [69, 72, 70]²:

$$\zeta = \frac{RT}{D} \quad (2.15)$$

²A grande maioria dos valores do coeficiente de difusão de solutos reportados na literatura são coeficientes de difusão de Fick. Em condições não ideais, o coeficiente de difusão de Fick não é igual ao coeficiente de difusão que figura nas equações de MS [69]. No entanto, no âmbito deste trabalho assume-se que os dois coeficientes são iguais, como resultado de se considerarem as soluções como ideais.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

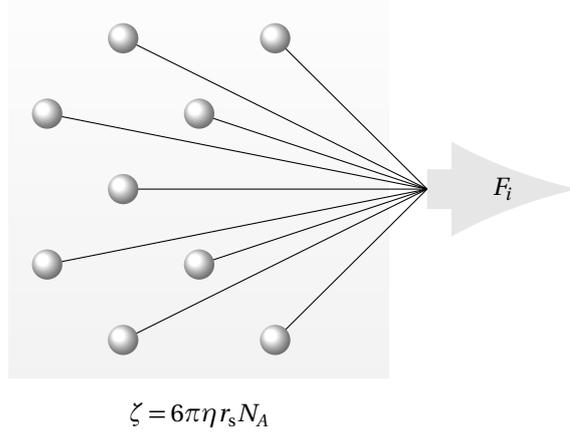


Figura 2.4: Ilustração do coeficiente de atrito para uma solução de um soluto esférico. A força de atrito por mol de soluto é igual à força de atrito de uma molécula (esférica), dada pela lei de Stokes, multiplicada pela número de Avogadro.

Uma primeira aplicação da equação 2.13, que serve simultaneamente como exemplo, é a dedução da equação de Stokes-Einstein. Para isso, considera-se uma solução não confinada, diluída e ideal, de um soluto com dimensões suficientemente superiores às do solvente para que o seja possível tratar como uma partícula hidrodinâmica. Considera-se que existe um gradiente de concentração do soluto, que se assume unidimensional segundo y , e que a solução se encontra em repouso, o que resulta numa velocidade convectiva de soluto nula³. Nestas condições, considerando que o soluto é neutro ($z = 0$), a equação 2.13 pode ser escrita na seguinte forma:

$$-RT \frac{d \ln x}{d y} = \zeta u \quad (2.16)$$

Note-se que como a velocidade convectiva do soluto é nula, a velocidade total é igual à velocidade difusiva. Multiplicando ambos os membros da equação pela concentração do soluto, $x C_T$, em que C_T é a concentração molar total da solução, obtém-se:

$$-RT \frac{d C}{d y} = \zeta J \quad (2.17)$$

onde J é o fluxo difusivo molar de soluto ($J = x C_T u$). Se o soluto for considerado esférico, o coeficiente de atrito pode ser obtido pela lei de Stokes (figura 2.4):

$$\zeta = 6\pi\eta r_s N_A \quad (2.18)$$

onde r_s é o raio do soluto e N_A é o número de Avogadro. Assim, a equação 2.17, após inclusão da equação 2.18, resulta em:

$$\frac{k_B T}{6\pi\eta r_s} = \frac{-J}{d C / d y} \quad (2.19)$$

³Não é necessário supor que o gradiente de concentração do soluto é unidimensional para efetuar a presente dedução. O resultado obtido será o mesmo considerando o gradiente tridimensional.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

O segundo membro da equação anterior não é mais que o coeficiente de difusão do soluto (D) pela primeira lei de Fick, obtendo-se assim a equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_s} \quad (2.20)$$

Esta equação é importante no âmbito do presente trabalho porque permite relacionar o coeficiente de difusão de um soluto com as suas dimensões, representadas por r_s . Para um dado soluto, este parâmetro pode ser visto como o raio de uma esfera com igual difusividade, e é denominado o raio hidrodinâmico. Uma conclusão importante a tirar da equação anterior é o facto do coeficiente de difusão de solutos ser inversamente proporcional às suas dimensões.

O transporte de massa em operações com membranas é muito influenciado pelas condições hidrodinâmicas do escoamento, o que leva à necessidade de formular um modelo hidrodinâmico para permitir a aplicação das equações de MS. Na secção seguinte será abordado o modelo usado neste trabalho, o modelo do filme, sendo também discutido o fenómeno de polarização de concentração.

2.4 Polarização de concentração e modelo do filme

O transporte de massa através de membranas de micro e ultrafiltração pode ser dividido em duas fases: o transporte de componentes até à superfície da membrana e o transporte de componentes através dos poros. No transporte de componentes até à superfície da membrana, a solução não se encontra confinada em espaços pequenos, e o transporte pode ser descrito pelas equações de Maxwell-Stefan (MS) apresentadas na secção 2.3. O mesmo não se passa durante a permeação em poros de membranas, onde o confinamento da mistura produz efeitos quer ao nível da difusão, quer ao nível da convecção, tal como discutido na secção 2.6. Nesta secção será abordada a primeira etapa, em que se procura determinar o perfil de concentração dos vários componentes da solução a ser filtrada, desde o seio da solução até à superfície da membrana. Para isso é preciso aplicar as equações de transporte, o que é apenas possível se for definido um modelo hidrodinâmico. Uma possibilidade é o denominado modelo do filme (ver figura 2.5). Neste modelo, assume-se que desde uma distância da membrana superior a um determinado valor δ existe turbulência no seio do líquido, o que impossibilita o desenvolvimento de gradientes de concentração. Para distâncias inferiores a esse valor (para y entre 0 e δ , ver figura 2.5), assume-se que se forma um filme de líquido onde se localiza toda a resistência ao transporte de massa⁴.

Na ausência de reação química e de adsorção na membrana, o fluxo molar total de soluto ($x_i C_T w_i$), no filme ilustrado na figura 2.5, é constante e dado pelo produto entre o fluxo de filtração e a concentração de soluto no permeado ($J_V C_p$). Multiplicando assim os dois membros da equação 2.13 pela concentração total de soluto, e tendo em conta a equação 2.15, obtém-se:

$$\frac{dC_i}{dy} = \frac{-z_i C_i F}{RT} \frac{d\Psi}{dy} + \frac{J_V}{D_i} (C_i - C_{p,i}) \quad (2.21)$$

A equação anterior é assim uma variante da equação de Nernst-Planck [72], e é denominada equação de Nernst-Planck estendida. Para solutos neutros $z_i = 0$, e a equação 2.21 reduz-se a:

$$\frac{dC_i}{dy} = \frac{J_V}{D_i} (C_i - C_{p,i}) \quad (2.22)$$

⁴Uma descrição elaborada do modelo do filme pode ser encontrada na literatura, por exemplo [73, 74]

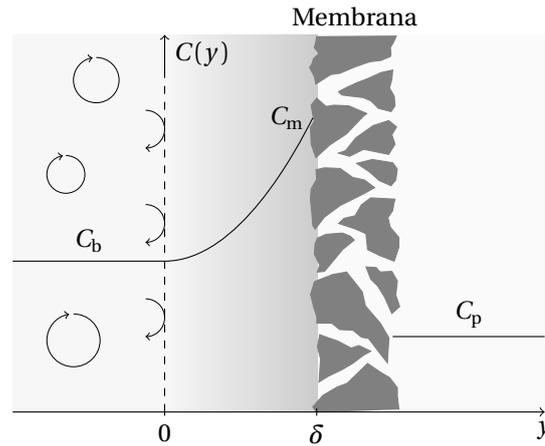


Figura 2.5: Ilustração do modelo do filme. Neste modelo assume-se que se forma um filme de líquido junto à membrana onde se desenvolvem gradientes de concentração. Fora deste filme existe turbulência no seio do líquido o que impossibilita a formação de gradientes de concentração.

A equação 2.22 pode ser usada para ilustrar um fenómeno importante em processos de membranas, nomeadamente o aumento de concentração de solutos junto à membrana em condições de filtração, denominado por polarização de concentração. Considere-se a filtração de uma solução diluída de um soluto, em condições em que seja possível aplicar a equação 2.22 no filme ilustrado na figura 2.5, para y entre 0 e δ . Após integração obtém-se:

$$\frac{C(y) - C_p}{C_b - C_p} = \exp\left(\frac{J_V}{D} y\right) \quad (2.23)$$

Pela análise da equação obtida, verifica-se que a concentração do soluto aumenta exponencialmente na camada de polarização (no filme). A equação indica também que o aumento de concentração (polarização de concentração) é tanto maior quanto maior for o fluxo de filtração e menor o coeficiente de difusão do soluto.

A polarização de concentração é um fenómeno inerente aos processos de membranas, que deve contudo ser minimizado. O aumento da concentração de solutos junto à membrana pode conduzir, entre outros efeitos, à colmatação prematura de membranas, alterando assim quer a produtividade, quer a seletividade destas operações. A concentração máxima que o soluto adquire na camada de polarização é em $y = \delta$, sendo neste ponto a concentração denominada por C_m (ver figura 2.5). O rácio entre este valor de concentração e o valor da concentração do soluto no seio da solução (C_b) é assim um indicador do grau de polarização de concentração. Para $y = \delta$ tem-se assim:

$$\frac{C_m - C_p}{C_b - C_p} = \exp\left(\frac{J_V}{k}\right) \quad (2.24)$$

onde k é o coeficiente de transferência de massa, definido neste modelo por:

$$k = \frac{D}{\delta} \quad (2.25)$$

A equação 2.24 indica que em condições de filtração, a concentração do soluto junto à membrana começa a aumentar de forma rápida à medida que o fluxo de filtração ultrapassa o valor do coeficiente de transferência de massa.

Uma das características mais importantes de qualquer processo de separação é a sua seletividade. A seletividade na separação de dois solutos corresponde à razão dos respetivos coeficientes de perme-

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

ação. O coeficiente de permeação observado (S_{obs}) de um soluto é definido por:

$$S_{\text{obs}} = \frac{C_p}{C_b} \quad (2.26)$$

O coeficiente de permeação real ou intrínseco do um soluto é dado por:

$$S_m = \frac{C_p}{C_m} \quad (2.27)$$

A substituição das equações 2.26 e 2.27 na equação 2.24, permite obter uma relação entre os dois coeficientes de permeação:

$$S_{\text{obs}} = \frac{S_m}{S_m + (1 - S_m) \exp(-J_V/k)} \quad (2.28)$$

Esta equação mostra que a permeação observada de solutos é dependente quer do fluxo de filtração, quer do coeficiente de transferência de massa. Considerando que a permeação intrínseca não depende das condições na camada de polarização, verifica-se que a permeação observada de solutos aumenta com o aumento do rácio J_V/k . Este resultado mostra a importância que as condições hidrodinâmicas (refletidas no valor de k), e o fluxo de filtração, podem ter na seletividade de um processo de membranas.

2.5 Polarização de concentração para solutos iónicos

A análise desenvolvida até aqui assumiu solutos neutros. No entanto, para o caso de iões, a equação 2.21 não pode ser simplificada, tendo que se considerar o termo referente à força elétrica. A determinação do perfil de concentração é feito de forma semelhante, contudo a presença do gradiente do potencial impossibilita uma solução analítica. A cada ião da mistura corresponde uma respetiva equação de MS (equação 2.21), sendo o potencial elétrico igual para todos os componentes. Na ausência de potenciais elétricos externos terá que se verificar a condição de eletroneutralidade:

$$\sum_i z_i C_i = 0 \quad (2.29)$$

Diferenciando a equação anterior em ordem a y , multiplicando a equação 2.21 por z_i e somando para todos os iões obtém-se a seguinte expressão para o gradiente do potencial elétrico:

$$\frac{d\Psi}{dy} = \frac{\sum_i \frac{z_i J_V}{D_i} (C_i - C_{p,i})}{\frac{F}{RT} \sum_i z_i^2 C_i} \quad (2.30)$$

O sistema de equações diferenciais, definido pelas equações 2.21 e pela equação 2.30, pode assim ser resolvido por métodos numéricos, desde que a concentração no permeado (C_p) seja conhecida para cada componente.

Os plasmídeos, sendo moléculas muito carregadas negativamente a valores de pH de interesse, devem ser modelados como iões. Na grande maioria das aplicações práticas, uma solução de plasmídeo contém um sal dissolvido. O sistema mais simples que pode ser considerado para efetuar a referida modelação passa por considerar uma solução com 3 solutos [75]. Os 3 solutos são assim o plasmídeo (componente 1), um co-ião (componente 2) e um contra-ião (componente 3), sendo estes dois últimos componentes os iões de um sal dissolvido. Assumindo que as simplificações impostas para a dedução da equação 2.21 apresentam uma boa aproximação para as características da solução, a equação 2.21

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

Tabela 2.1: Dados para a derivação do perfil de concentrações na camada de polarização, para um sistema iônico de 3 componentes (ver texto).

Componente	C_b [mol/m ³]	C_p [mol/m ³]	z	$D \times 10^9$ [m ² /s]
pDNA	1×10^{-6}	0	-9090	0.005
Cl ⁻	150	150	-1	2.032
Na ⁺	150.0091	150	+1	1.334

$$F = 96485 \text{ C/mol}, R = 8.314 \text{ J/K} \cdot \text{mol}, T = 293.15 \text{ K}$$

$$k = 1 \times 10^{-6} \text{ m/s}, J_v = 2.5 \times 10^{-6} \text{ m/s}$$

representa assim um sistema de 3 equações diferenciais, que juntamente com a equação 2.30 pode ser resolvido através de métodos numéricos (por exemplo o método de Runge-Kutta de 4ª ordem).

Na secção seguinte é feito um exemplo da aplicação das equações 2.21 e 2.30, com objetivo de determinar os perfis de concentração para um sistema de três componentes iônicos (pDNA e os iões de um sal monovalente dissolvido), na camada de polarização, assim como o perfil do potencial elétrico. É igualmente comparado o perfil de concentração de pDNA obtido, com esse mesmo perfil considerando-o como uma molécula neutra, passível de ser determinado com a equação 2.23.

Exemplo: Determinação do perfil de concentração, na camada de polarização, para um sistema de três componentes iônicos

Para ilustrar a aplicação das equações 2.21 e 2.30 na determinação do perfil de concentração na camada de polarização, considera-se nesta secção um pequeno exemplo. Os valores considerados são hipotéticos, contudo dentro da ordem de grandeza esperada. Considera-se uma solução de 3 µg/mL de um plasmídeo com 4545 pb e 3 MDa de massa molecular, em solução aquosa contendo 150 mM de NaCl. Como as concentrações no permeado dos vários componentes figuram nas equações, considera-se como aproximação que o plasmídeo é completamente retido pela membrana ($C_{p,1} = 0$). Considera-se igualmente que o NaCl apresenta uma permeação observada igual a 1 ($C_{p,2} = C_{p,3} = 150 \text{ mM}$)⁵. No seio da solução terá que se verificar a condição de eletroneutralidade (equação 2.29). A concentração do contra-ião será um pouco mais alta que a concentração do co-ião para permitir que a solução seja eletricamente neutra⁶. A sua concentração pode ser determinada notando que neste exemplo $z_1 = -2 \text{ nbp}$, $z_2 = -1$ e $z_3 = 1$, e fazendo uso da equação 2.29. Os restantes dados necessários aos cálculos encontram-se na tabela 2.1. A espessura da camada de polarização (δ) pode ser estimada, a partir do valor do coeficiente de transferência de massa, k , e do coeficiente de difusão do plasmídeo, através da relação:

$$\delta = \frac{D_1}{k} \quad (2.31)$$

Após integração numérica, obtêm-se os perfis representados na figura 2.6⁷. Verifica-se a existência de polarização de concentração do plasmídeo, assim como do contra-ião (Na⁺). No caso do co-ião (Cl⁻), a sua concentração diminui gradualmente na camada de polarização, excluído pela presença das moléculas de pDNA. Observa-se igualmente que se forma uma gradiente negativo de potencial elétrico. Este potencial, apesar de reduzido valor, faz com que o contra-ião polarize juntamente com

⁵Como a concentração de pDNA é consideravelmente menor, esta aproximação não deverá estar muito longe da realidade, assim como, conseqüentemente, os resultados obtidos nos cálculos.

⁶Em termos mais precisos, teria que se considerar um quarto componente iônico constituído pelos contra-íons originais das moléculas de plasmídeo. Contudo, assume-se aqui, como simplificação do modelo, que esses contra-íons são representados pelos iões em excesso de Na⁺.

⁷Foi usado o método de Runge-Kutta de ordem 4, adaptado de [76].

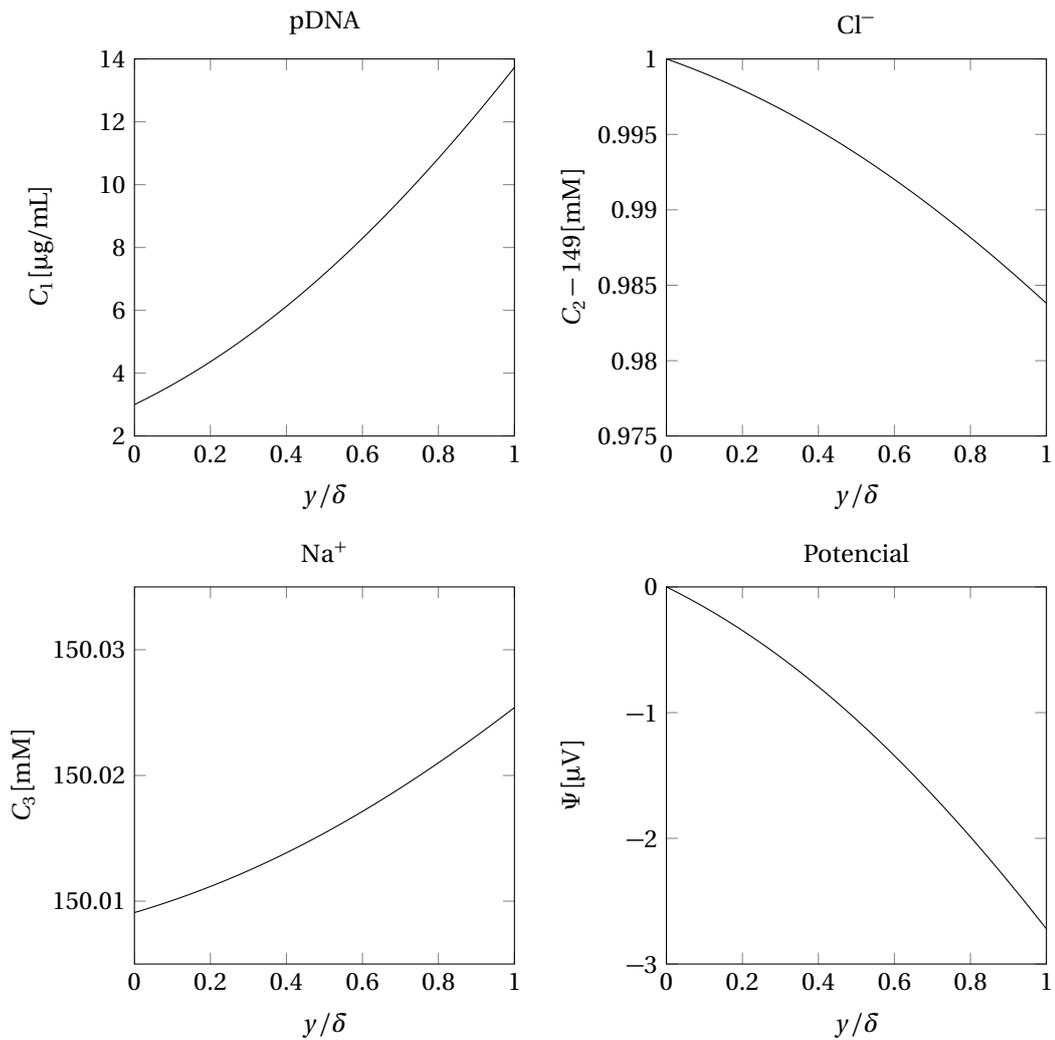


Figura 2.6: Perfis de concentração e potencial elétrico, obtidos por integração do sistema de equações diferenciais definido pela equação 2.21, para um sistema de 3 componentes iônicos (ver texto).

o plasmídeo. Outro efeito do potencial, que não é aparente na figura 2.6, é a redução do grau de polarização no caso do pDNA. Para verificar este efeito, pode-se aplicar a equação 2.23, que calcula assim o perfil de concentração no caso de se considerar o plasmídeo como uma molécula neutra. Os resultados dos dois perfis de concentração, assim como do perfil do potencial elétrico, encontram-se na figura 2.7. Como é possível constatar, a polarização neste último caso é consideravelmente maior. Observa-se igualmente que o potencial assume valores cada vez mais negativos à medida que o fluxo aumenta, resultando assim numa maior divergência entre os dois perfis de concentração.

2.6 Transporte restringido de solutos esféricos

A análise do transporte de massa efetuada até aqui incidiu em situações nas quais a solução não se encontra confinada em espaços de pequenas dimensões. No entanto, no interior de poros de membranas de MF e UF a situação é distinta, desde logo a começar pelo perfil de velocidade do solvente, que para escoamentos de Poiseuille é função da coordenada radial adimensional, β , segundo a equação 2.1. Outra importante consequência da presença das paredes dos poros é o facto dos solutos não poderem ocupar a totalidade da área de secção reta do poro. Por exemplo, um soluto esférico terá que

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

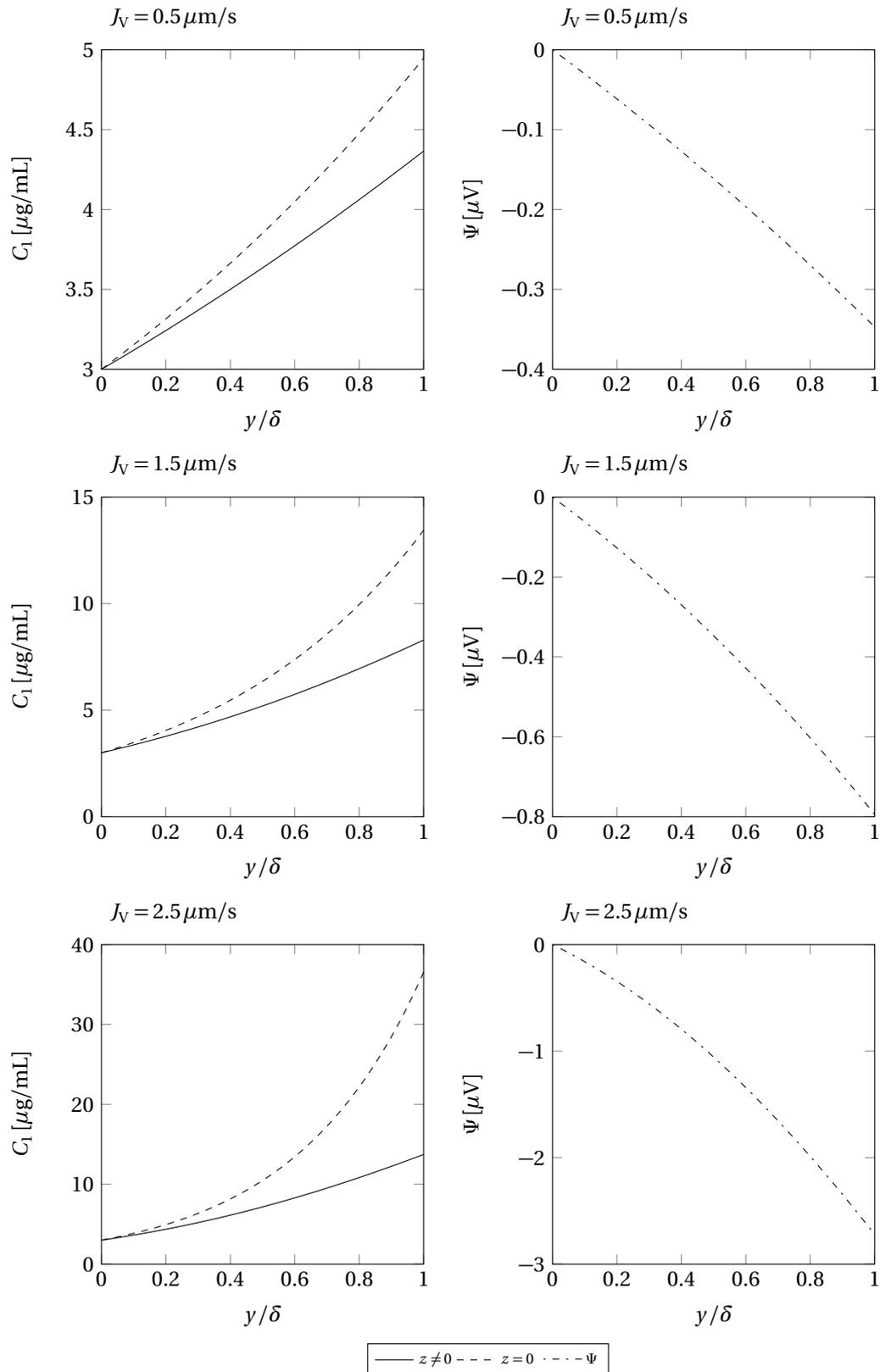


Figura 2.7: Concentração de pDNA na camada de polarização, em função de y/δ , para os fluxos de 0.5, 1.5 e 2.5 $\mu\text{m/s}$, referente aos dados do exemplo de cálculo referido no texto. Na figura encontra-se também o perfil do potencial elétrico na camada de polarização. Observa-se que este potencial, apesar de apresentar um valor reduzido, faz com que o pDNA apresente uma polarização de concentração superior, quando é modelado como um soluto neutro (---), por comparação com a situação em que a sua carga elétrica é tida em conta nos cálculos (—).

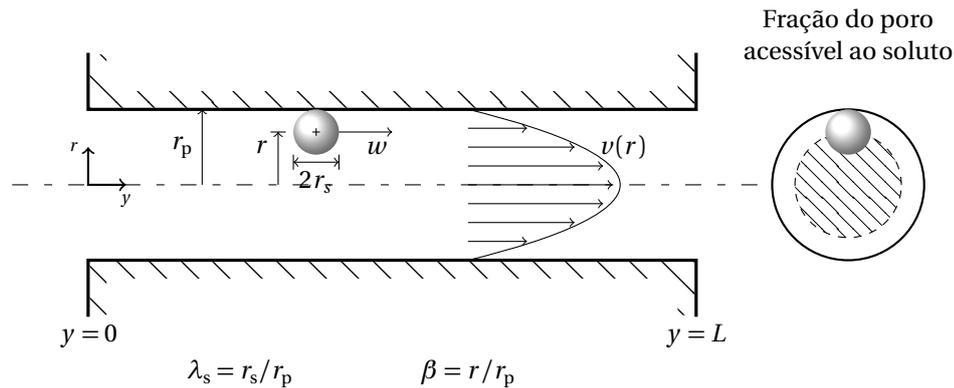


Figura 2.8: Ilustração do movimento de um soluto esférico no interior de um poro cilíndrico. O soluto só poderá ocupar posições no interior do poro que distem das paredes uma distância mínima igual ao seu raio. Na figura está representado o perfil parabólico de velocidade do solvente, considerando escoamento de Poiseuille.

ocupar posições no interior do poro que distem da parede uma distância igual ou superior ao seu raio (figura 2.8). Este mecanismo de exclusão baseado unicamente em fatores geométricos permite, para o caso de se considerarem os solutos como esferas rígidas, calcular coeficientes de partição que relacionam as concentrações de equilíbrio entre o interior e o exterior dos poros. Nestas condições, é fácil verificar que no caso de poros cilíndricos, o coeficiente de partição, Φ , de um dado soluto é função do rácio entre o raio do soluto (esférico) e o raio do poro, λ_s :

$$\Phi = \frac{c_0}{C_m} = \frac{c_L}{C_p} = (1 - \lambda_s)^2 \quad (2.32)$$

$$\lambda_s \in [0, 1]$$

onde c_0 e c_L são as concentrações para $y = 0$ e $y = L$ e $\lambda_s = r_s/r_p$ (ver figura 2.8)⁸. Os principais avanços na teoria do transporte restringido foram feitos através de uma analogia com o movimento hidrodinâmico de esferas em tubos cilíndricos, sendo o artigo de revisão de Deen [43] talvez o mais citado nesta temática. A vantagem desta abordagem está na possibilidade de se calcularem coeficientes hidrodinâmicos que contabilizem o movimento restringido no interior de poros. A análise através das equações de Maxwell-Stefan é também possível, tendo sido já efetuada [71]. No entanto, para além da formulação ser complexa, não existem dados suficientes na literatura que forneçam valores para os vários coeficientes de atrito que figuram necessariamente nas equações. Assim, opta-se aqui por se aplicar a equação 2.13 fazendo uma analogia com o modelo descrito em [43, 77], sendo o resultado obtido igual ao modelo de atrito proposto por Anderson e Queen [77]. Para isso, considera-se a situação descrita na figura 2.8. O soluto é modelado como uma esfera rígida e o poro cilíndrico. A presença das paredes do poro produz dois efeitos. Em primeiro lugar, assume-se que o confinamento da solução produz um aumento do coeficiente de atrito entre o soluto e o solvente. A razão entre estes coeficientes é dada por um parâmetro K :⁹

$$K = \frac{\zeta_p}{\zeta_\infty} \quad (2.33)$$

⁸Para distinguir as variáveis que se referem a posições no interior do poro, opta-se aqui por as representar por letras minúsculas

⁹Este parâmetro K não deve ser confundido com o parâmetro K descrito no artigo de Deen [43]. O primeiro representa uma média radial, enquanto que o de Deen representa o rácio entre os coeficientes de atrito em função da coordenada β .

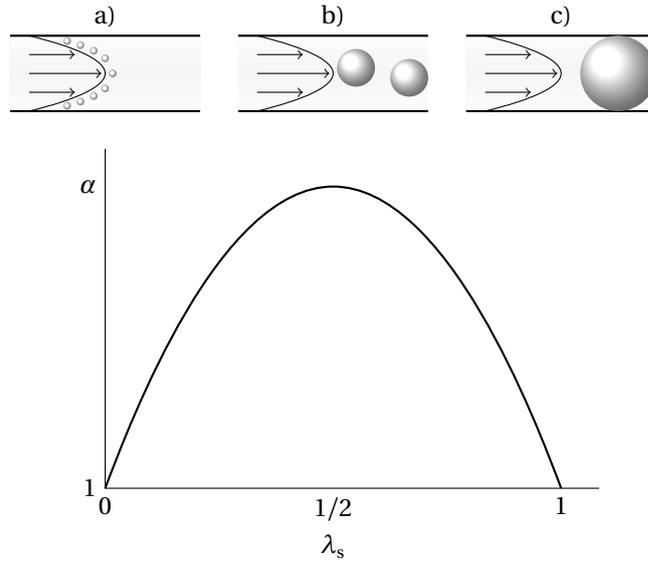


Figura 2.9: Ilustração da variação da seletividade convectiva em função de λ_s . a) Quando o soluto apresenta um tamanho muito inferior ao do poro ($\lambda_s \rightarrow 0$), o soluto pode ocupar praticamente todas as posições radiais e assim adquirir uma velocidade convectiva próxima da do solvente ($\alpha \rightarrow 1$). b) Nesta situação, o soluto tem um raio que é metade do raio do poro ($\lambda_s = 1/2$). Como o soluto só poderá ocupar posições radiais que distem no mínimo $r_p/2$ das paredes, o soluto tende a ocupar posições mais centrais, adquirindo assim uma velocidade convectiva superior à velocidade média do solvente. c) Quando o raio do soluto é igual ao raio do poro, ele move-se como se de um pistão se tratasse, adquirindo novamente uma velocidade convectiva igual à do solvente, sendo a seletividade convectiva de novo igual a 1.

onde ζ_p representa o coeficiente de atrito entre o soluto e o solvente no interior do poro e ζ_∞ esse mesmo coeficiente numa situação não confinada. O segundo efeito é consequência do perfil parabólico de velocidade no interior do poro (equação 2.1) e da restrição geométrica das posições permitíveis ao soluto. A situação está ilustrada na figura 2.9. Para solutos com dimensões muito inferiores às do poro, ou seja para $\lambda_s \rightarrow 0$ (situação a), o soluto pode ocupar praticamente na totalidade todas as posições radiais no poro, adquirindo assim uma velocidade convectiva igual à velocidade do solvente. Na situação b, o soluto tem um raio que é cerca de duas vezes inferior ao raio do poro. Devido à restrição geométrica na sua localização, este soluto tende a circular mais junto ao centro do poro, sendo a sua velocidade convectiva superior à velocidade média do solvente. Na situação c, o soluto tem um raio igual ao do poro e o seu movimento assemelha-se ao de um pistão, movendo-se assim com a velocidade média do solvente. Estes comportamentos distintos são dependentes de λ_s , e são contabilizados na seletividade convectiva, α , referida na secção 2.3. A dependência de α com λ_s está igualmente ilustrada na figura 2.9. Após o referido, a equação 2.13 pode assim ser reescrita para a situação ilustrada na figura 2.8:

$$-RT \frac{d \ln x}{d y} = K \zeta_\infty (w - \alpha j_V) \quad (2.34)$$

onde j_V é o fluxo volumétrico de solvente no interior do poro, dado pela equação 2.2. Multiplicando a equação anterior pela concentração do soluto no interior do poro, c , e rearranjando obtém-se:

$$n = -K^{-1} D_\infty \frac{d c}{d y} + \alpha j_V c \quad (2.35)$$

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

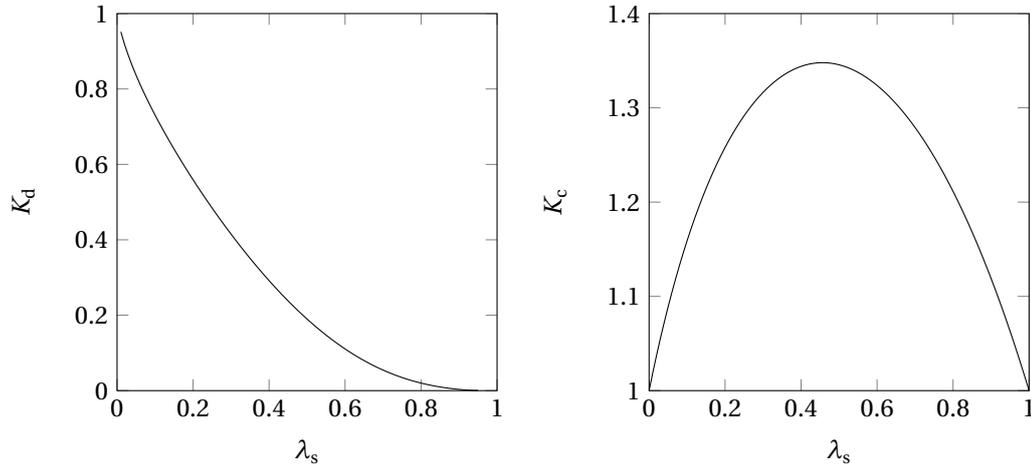


Figura 2.10: Representação gráfica dos parâmetros K_d e K_c , em função de λ_s , obtidos pelas correlações representadas na equação 2.37 [44].

onde n é o fluxo de soluto no poro ($= c w$). Esta equação assume a mesma forma da equação que se obtém pelo modelo hidrodinâmico de Deen, de onde se pode concluir que:

$$\begin{aligned} K^{-1} &= K_d \\ \alpha &= K_c \end{aligned} \quad (2.36)$$

onde K_d e K_c são os parâmetros hidrodinâmicos que contabilizam o efeito do transporte restringido na difusão e na convecção respetivamente. Interessa salientar que todas as variáveis presentes na equação 2.35 são médias radiais, pelo que a concentração de soluto no interior do poro é apenas função de y . Os parâmetros K_d e K_c podem ser determinados por correlações existentes na literatura [44] obtidas pelo modelo hidrodinâmico, para solutos esféricos neutros e em poros cilíndricos:

$$\begin{aligned} K_d &= (1 - \lambda_s)^{-2} \left(1 + \frac{9}{8} \lambda_s \ln \lambda_s - 1.56034 \lambda_s + 0.528255 \lambda_s^2 + 1.91521 \lambda_s^3 - 2.81903 \lambda_s^4 \right. \\ &\quad \left. + 0.270788 \lambda_s^5 + 1.10115 \lambda_s^6 - 0.435933 \lambda_s^7 \right) \\ K_c &= \left(\frac{1 + 3.867 \lambda_s - 1.907 \lambda_s^2 - 0.834 \lambda_s^3}{1 + 1.867 \lambda_s - 0.741 \lambda_s^2} \right) \end{aligned} \quad (2.37)$$

Na figura 2.10 encontra-se a representação gráfica dos parâmetros da equação anterior. O parâmetro K_d tende para zero à medida que λ_s tende para 1. O significado físico deste parâmetro é o rácio entre o coeficiente de atrito numa solução não confinada e esse mesmo coeficiente de atrito no interior do poro (equação 2.33 e equação 2.36), o que significa que à medida que o valor de λ_s aumenta, o coeficiente de atrito no interior do poro é consideravelmente superior ao coeficiente que se obtém na mesma solução não confinada, e tende para infinito à medida que λ_s tende para 1. A variação de K_c reflete o comportamento da seletividade convectiva discutido anteriormente.

Uma das utilizações mais frequentes do modelo enunciado, que foi também utilizada no presente trabalho, é a caracterização de membranas quanto ao seu tamanho de poro [47, 45, 46, 56]. Para isso, são determinadas as permeações observadas de solutos de referência, geralmente neutros e com geometria aproximadamente esférica, e o raio de poro determinado como sendo o valor que minimiza os erros entre os resultados obtidos e as previsões do modelo. A equação 2.35, juntamente com a equação

2.36, pode ser integrada ao longo do poro, obtendo-se após alguma manipulação algébrica:

$$n = K_c j_V c_0 \frac{[1 - (c_L/c_0)e^{-Pe}]}{1 - e^{-Pe}} \quad (2.38)$$

onde Pe é o número de Peclet, dado por:

$$Pe = \frac{K_c j_V L}{K_d D_\infty} \quad (2.39)$$

As concentrações c_0 e c_L podem ser relacionadas com a concentração junto à membrana (C_m) e com a concentração no permeado (C_p), respetivamente, através do coeficiente de partição (equação 2.32). O fluxo molar de soluto no poro, n , pode ser relacionado com o fluxo molar de soluto com base na área total de membrana, N , através da porosidade ($N = \varepsilon n$). Por seu lado, N é dado pelo produto entre o fluxo de filtração, J_V , e a concentração do soluto no permeado ($N = J_V C_p$). Assim, o fluxo molar de soluto no poro pode ser obtido por:

$$n = \frac{N}{\varepsilon} = \frac{J_V C_p}{\varepsilon} = j_V C_p \quad (2.40)$$

Substituindo as equações 2.32 e 2.40 na equação 2.38, obtém-se após alguma manipulação algébrica:

$$S_m = \frac{\Phi K_c}{1 - (1 - \Phi K_c)e^{-Pe}} \quad (2.41)$$

onde S_m é a permeação intrínseca definida pela equação 2.27. O comprimento dos poros, L , que figura na equação 2.39 nem sempre é conhecido com exatidão para uma determinada membrana, sendo a sua determinação por vezes difícil de obter experimentalmente. Este valor pode ser relacionado com outros parâmetros, mais facilmente determináveis, através da equação de Hagen-Poiseuille (equação 2.2). Com o auxílio da equação 2.6, o número de Peclet pode ser definido alternativamente por:

$$Pe = \frac{K_c r_p^2 J_V}{8 K_d D_\infty L_p \eta} \quad (2.42)$$

O coeficiente de difusão do soluto (D_∞) pode ainda ser relacionado com o seu raio hidrodinâmico através da equação de Stokes-Einstein (equação 2.20).¹⁰ Se a polarização de concentração não puder ser desprezada, a permeação observada, S_{obs} , irá assumir um valor diferente de S_m . Neste caso, a equação 2.28 pode ser usada para relacionar estes dois parâmetros. O valor de S_{obs} obtido pode assim ser comparado com os resultados experimentais.

2.7 Partição de moléculas longas e flexíveis

Como discutido na secção 2.6, se os solutos puderem ser considerados rígidos e com geometria esférica, os coeficientes de partição, que relacionam as concentrações adjacentes à interface solução não-confinada-solução no interior do poro, podem ser facilmente calculados pela equação 2.32. Uma consequência imediata da referida equação é a ausência de permeação no caso de solutos para os quais $\lambda_s > 1$. No entanto, observa-se experimentalmente que alguns solutos obedecem relativamente bem à equação 2.32, mas existem outros que exibem consideráveis desvios [44]. Como referido no capítulo 1, os plasmídeos enquadram-se nesta última categoria. Esta observação experimental indica

¹⁰O símbolo ∞ é usado para indicar que o coeficiente de difusão, que figura na equação 2.42, é o coeficiente de difusão numa situação não confinada e não esse mesmo coeficiente no interior do poro.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

com clareza que a equação 2.32 não pode ser usada neste caso. Sendo os plasmídeos moléculas flexíveis e de elevada massa molecular, a determinação exata dos coeficientes de partição, com base numa representação geométrica rigorosa das moléculas revela-se um problema de excessiva complexidade. Uma forma de conseguir a sua determinação aproximada passa por representar essa mesma estrutura por modelos mais simplificados, que possam ainda assim reter as principais características da molécula que determinam a sua partição nos poros de membranas.

Um dos modelos de representação de macromoléculas mais simples consiste em considerar o soluto como um cadeia de ligação livre (FJC). Durante a geração de uma FJC, a única imposição passa por manter constante a distância entre vários pontos, podendo os ângulos de ligação assumir qualquer valor [78]. Uma representação FJC pode assim simular a estrutura e conformação de uma macromolécula linear. Os parâmetros que caracterizam uma cadeia FJC são o comprimento dos segmentos, l_k , que assume um valor constante, e o número total de segmentos, n_k . Estes segmentos, que se consideram ter massa nula, unem $n_k + 1$ massas pontuais. A representação análoga para cadeias circulares, ou fechadas, são as denominadas cadeias segmentadas fechadas (CSC), que podem ser geradas a partir de uma cadeia FJC (secção 2.7.2). Apesar das estruturas simplificadas, FJC e CSC, apresentarem já uma considerável redução da complexidade estrutural das moléculas reais, a determinação do coeficiente de partição é geralmente feita por métodos estocásticos, conhecidos como métodos de Monte-Carlo [79, 80, 81]. Neste tipo de métodos, a estrutura da molécula é gerada e é estabelecida uma condição para a sua entrada no poro. A probabilidade de entrada da molécula no poro é assim determinada testando esta condição um elevado número de vezes.

Nesta secção apresentam-se os métodos usados no presente trabalho para a geração de estruturas FJC e CSC, e para a determinação dos coeficientes de partição, necessários para completar o desenvolvimento teórico.

2.7.1 Cadeias de ligação livre (FJC)

Numa primeira abordagem, e para facilitar o raciocínio, pode-se considerar o problema de gerar uma cadeia FJC em apenas duas dimensões, ficando posteriormente mais facilitada a abordagem para três dimensões, que será discutida na secção 2.7.3. Uma cadeia FJC pode ser gerada por um caminho aleatório em n_k passos. Em cada passo, um novo ponto é gerado, podendo este novo ponto ocupar qualquer posição numa circunferência de raio l_k centrada no ponto anterior. O processo é repetido até que a cadeia gerada possua n_k segmentos. Em duas dimensões, o problema é simplificado se for utilizado o sistema de coordenadas polares, sendo a sua relação com o sistema cartesiano dado pelas seguintes expressões:

$$\begin{aligned}x &= r \cos \theta \\y &= r \sin \theta \\r &= \sqrt{x^2 + y^2} \\ \theta &= \arctan2(y, x)\end{aligned}\tag{2.43}$$

A função $\arctan2$ deve ser usada, por substituição da tradicional função \arctan , para que o ângulo possa ser determinado inequivocamente. Por exemplo, o ângulo θ entre um vetor (x, y) e o eixo positivo dos x pode ser obtido por $\arctan(y/x)$. No entanto, este método não distingue entre vetores diametralmente opostos¹¹. Além disso, vetores com abcissa nula causam problemas pelo facto de y/x não ser um número neste caso. A função $\arctan2$, definida em muitas linguagens de programação pela

¹¹Vetores do tipo $(+x, +y)$ e $(-x, -y)$ não são distinguidos pelo método $\arctan(y/x)$.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

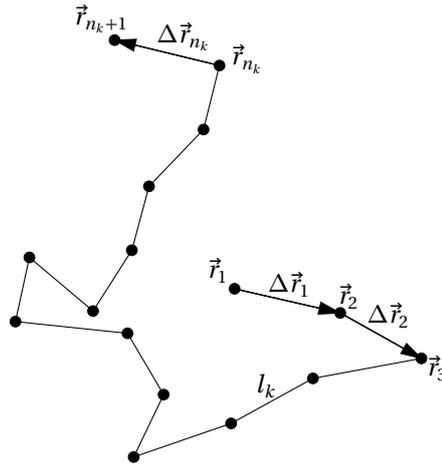


Figura 2.11: Trajetória em duas dimensões de uma cadeia FJC com n_k segmentos com comprimento l_k . Na figura estão igualmente representados os vetores r_i e $\Delta \vec{r}_i$.

função atan2 , permite superar estas limitações. Esta função é definida por:

$$\text{arctan2}(x, y) = \begin{cases} \arctan(y/x) & x > 0 \\ \arctan(y/x) + \pi & y \geq 0, x < 0 \\ \arctan(y/x) - \pi & y \leq 0, x < 0 \\ \pi/2 & y > 0, x = 0 \\ -\pi/2 & y < 0, x = 0 \\ \text{não definido} & x = 0, y = 0 \end{cases} \quad (2.44)$$

Cada ponto i de uma cadeia FJC em duas dimensões é definido pelas suas coordenadas, que representam o seu vetor posição \vec{r}_i (ver figura 2.11). Em cada passo, um novo ponto é gerado segundo o vetor $\Delta \vec{r}_i$, dado por $\vec{r}_{i+1} - \vec{r}_i$. Em coordenadas polares a posição de um novo ponto da cadeia pode assim ser obtida por:

$$\begin{aligned} x_{i+1} &= x_i + l_k \cos \theta_{i+1} \\ y_{i+1} &= y_i + l_k \sin \theta_{i+1} \end{aligned} \quad (2.45)$$

onde x_{i+1} e y_{i+1} representam as coordenadas do novo ponto a ser gerado, x_i e y_i as coordenadas do ponto anterior e θ_{i+1} o ângulo entre $\Delta \vec{r}_i$ e o eixo dos xx . Em coordenadas polares a aleatoriedade do processo resume-se à aleatoriedade no valor que este ângulo toma em cada iteração. O código apresentado na figura 2.12 serve como exemplo. A função rand gera números aleatórios entre 0 e 1. Na quarta de linha de código ($r = \text{rand}(nk, 1)$) são assim gerados n_k números aleatórios entre 0 e 1, que serão posteriormente utilizados dentro do ciclo for para obter um ângulo θ aleatório no intervalo $0 \leq \theta \leq 2\pi$, em cada iteração, construindo assim um caminho aleatório em duas dimensões.

As dimensões de uma cadeia FJC podem ser definidas por duas variáveis: a distância média entre as suas extremidades, $\langle h^2 \rangle^{1/2}$, e o raio de giração médio, normalmente designado apenas por raio de giração, r_g [78]. Devido à aleatoriedade no valor de θ , cada geração de uma cadeia FJC com o código apresentado na figura 2.12 produz uma cadeia com dimensões diferentes. Para estimar uma dimensão média de uma cadeia FJC é assim preciso gera-la um elevado número de vezes, calculando em cada geração a distância entre as suas extremidades, h , e o raio de giração instantâneo, r_g^* :

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

```

nk = 100;
lk = 1;
FJC = zeros(nk+1, 2);
r = rand(nk, 1);
for i = 2:(nk+1)
    FJC(i, 1) = FJC(i-1, 1) + lk * cos(r(i-1) * 2 * pi);
    FJC(i, 2) = FJC(i-1, 2) + lk * sin(r(i-1) * 2 * pi);
end

```

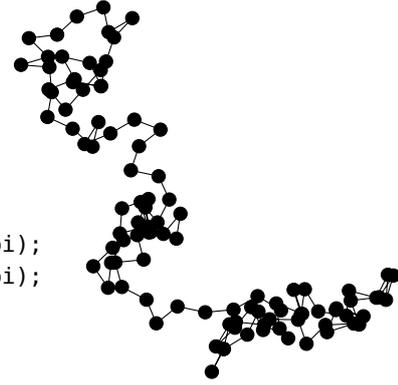


Figura 2.12: Código MATLAB[®]/GNU Octave para gerar uma FJC com $n_k = 100$ e $l_k = 1$, com a respetiva representação gráfica do resultado.

$$\begin{aligned}
 h &= |\vec{r}_{n_k+1} - \vec{r}_1| \\
 (r_g^*)^2 &= \frac{1}{n_k + 1} \sum_{i=1}^{n_k+1} (\vec{r}_i - \vec{r}_{cm})^2 \quad (2.46)
 \end{aligned}$$

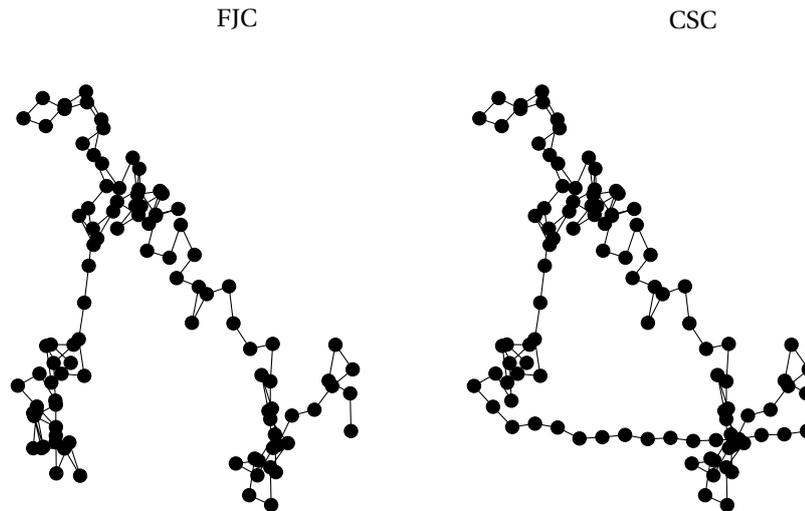
As coordenadas do centro de massa da molécula, \vec{r}_{cm} , considerando todas as massas pontuais com igual massa, podem ser dadas por:

$$\vec{r}_{cm} = \frac{1}{n_k + 1} \sum_{i=1}^{n_k+1} \vec{r}_i \quad (2.47)$$

2.7.2 Cadeias fechadas segmentadas (CSC)

Os plasmídeos, na sua forma nativa, são moléculas circulares, ao contrário de uma cadeia FJC, que é por natureza uma cadeia aberta. Para superar esta limitação, é proposto neste trabalho uma nova estrutura de cadeia fechada, denominada cadeia fechada segmentada (CSC). Esta nova estrutura pode ser considerada a análoga de uma estrutura FJC mas com conformação circular (ou fechada). De facto, para gerar uma CSC é necessário gerar primeiro a FJC correspondente. Utilizando de novo coordenadas polares, o código representado na figura 2.13 pode ser usado para gerar uma cadeia CSC. Como se pode ver na figura, a estrutura CSC obtida é agora uma cadeia aleatória fechada, que ainda assim se assemelha naturalmente à cadeia FJC correspondente.

O algoritmo para gerar uma cadeia CSC, a partir de uma FJC, é o seguinte: após gerar a cadeia FJC o seu vetor \vec{r}_{n_k+1} é feito coincidir com o vetor \vec{r}_1 . Em seguida, o vetor \vec{r}_{n_k} é movido até ficar à distância l_k pretendida, segundo a direção do vetor $\Delta\vec{r}_{n_k}$ ($= \vec{r}_{n_k} - \vec{r}_{n_k+1}$). De seguida, o vetor \vec{r}_{n_k-1} é movido até ficar a uma distância l_k do vetor \vec{r}_{n_k} , segundo a direção do vetor $\Delta\vec{r}_{n_k-1}$, e assim sucessivamente. Uma cadeia CSC partilha assim as mesmas simplificações de uma cadeia FJC, nomeadamente, o facto de não haver restrições na posição dos pontos, com exceção do comprimento dos segmentos, que deverá ser constante. Esta imposição faz com que uma cadeia CSC, gerada com o código simples ilustrado na figura 2.13, apresente um erro residual. Este erro resulta do método de geração, método este que faz com que as extremidades da cadeia FJC, gerada previamente, não coincidam exatamente na mesma coordenada espacial. Ou seja, o mesmo é dizer que uma cadeia CSC, gerada com o código



```

nk = 100;
lk = 1;
FJC = zeros(nk+1, 2);
r = rand(nk, 1);
for i = 2:nk+1
    FJC(i, 1) = FJC(i-1, 1) + lk * cos(r(i-1) * 2 * pi);
    FJC(i, 2) = FJC(i-1, 2) + lk * sin(r(i-1) * 2 * pi);
end
% Determinação da estrutura CSC a partir da FJC gerada
CSC = FJC;
CSC(nk+1, :) = CSC(1, :);
for i = nk:-1:1
    dr = CSC(i, :) - CSC(i+1, :);
    theta = atan2(dr(2), dr(1));
    CSC(i, 1) = CSC(i+1, 1) + lk * cos(theta);
    CSC(i, 2) = CSC(i+1, 2) + lk * sin(theta);
end

```

Figura 2.13: Código MATLAB®/GNU Octave para gerar uma cadeia CSC. Note-se que as primeiras 8 linhas de código geram uma FJC com $l_k = 1$ e $n_k = 100$. Após gerar a FJC, a estrutura da cadeia CSC é assim obtida movendo os pontos segundo a direção dos vetores $\Delta \vec{r}_i$ até ficarem a uma distância l_k entre si. Na figura encontra-se igualmente a representação gráfica do resultado.

da figura 2.13, apresenta uma distância residual, L_{res} , que faz dela uma cadeia que não é perfeitamente fechada. Na figura 2.14, encontra-se a representação gráfica de L_{res} , normalizada por l_k , em função do número de segmentos, para vários valores de l_k . Como se pode verificar, L_{res}/l_k assume um valor reduzido e tende rapidamente para zero à medida que n_k aumenta. Observa-se igualmente que o rácio L_{res}/l_k é independente de l_k , o que permite utilizar o método de geração de CSC descrito, para cadeias FJC com diferentes l_k , obtendo-se assim valores de erro semelhantes¹².

¹²É importante notar que o valor de L_{res} tem que ser obtido gerando a cadeia um elevado número de vezes (tipicamente acima de 10^5 gerações) e calculando assim o seu valor médio.

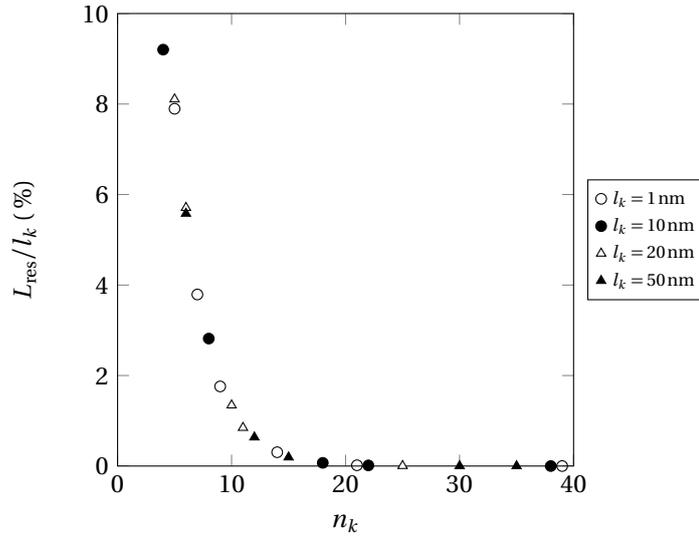


Figura 2.14: Rácio entre a distância residual entre as extremidades de uma cadeia CSC e l_k , em função do número de segmentos, para vários valores de l_k . O erro é independente de l_k , e tende rapidamente para zero à medida que n_k aumenta. Para valores de n_k superiores a 15 o erro já é inferior a 0.2%.

2.7.3 Cadeias FJC e CSC em três dimensões

A geração das estruturas FJC e CSC em três dimensões difere, em relação ao exposto nas secções 2.7.1 e 2.7.2, apenas no sistema de coordenadas a utilizar, que neste caso deve ser o sistema de coordenadas esféricas. Neste sistema de coordenadas, um vetor posição fica definido pelos 3 valores: distância até à origem r , ângulo entre a projeção do vetor posição, no plano xy , e o eixo positivo dos xx , definido aqui como o ângulo θ , e o ângulo entre o vetor posição e o eixo positivo dos zz , definido como o ângulo φ . A relação entre os dois sistemas é dada pelas equações 2.48 e 2.49:

$$\begin{aligned}
 r &= \sqrt{x^2 + y^2 + z^2} \\
 \theta &= \arctan2(y, x) \quad (2.48) \\
 \varphi &= \arccos(z/r)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 x &= r \cos \theta \sin \varphi \\
 y &= r \sin \theta \sin \varphi \quad (2.49) \\
 z &= r \cos \varphi
 \end{aligned}$$

Deve ser usada novamente a função $\arctan2$, pelo mesmo motivo discutido na secção 2.7.1. Com as referidas relações entre os sistemas de coordenadas, a geração das estruturas FJC e CSC é feita como discutido antes para o caso de duas dimensões. No entanto, é incorreto escolher valores dos ângulos θ e φ de forma uniforme nos intervalos $[0, 2\pi]$ e $[0, \pi]$ respetivamente¹³. Na figura 2.15, encontra-se o código para gerar estas estruturas, assim como a representação gráfica de um possível resultado.

As cadeias CSC, geradas com o código proposto na figura 2.15, apresentam igualmente uma distância residual, L_{res} , tal como se verifica nas suas cadeias equivalentes em duas dimensões. No entanto, verifica-se um comportamento semelhante ao nível do erro, ou seja, esta distância residual tende rapidamente para zero à medida que o número de segmentos da cadeia aumenta.

¹³<http://mathworld.wolfram.com/SpherePointPicking.html>

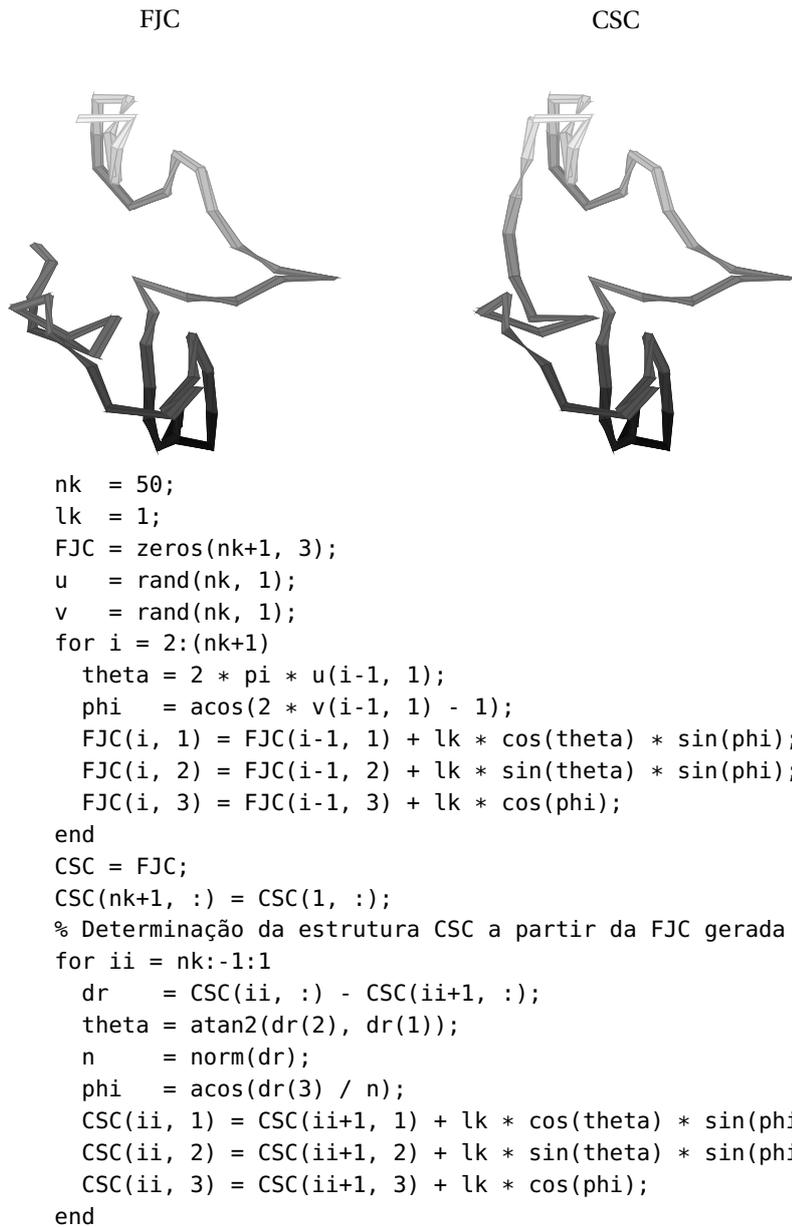


Figura 2.15: Código MATLAB®/GNU Octave para gerar as cadeias FJC e CSC em 3 dimensões, com a respectiva representação gráfica do resultado.

2.7.4 Coeficiente de partição de moléculas flexíveis

O coeficiente de partição estabelece uma relação de equilíbrio entre as concentrações junto à entrada do poro. Este coeficiente é por definição:

$$\Phi = \frac{c_0}{C_m} \quad (2.50)$$

onde C_m é a concentração junto à membrana e c_0 a concentração no interior do poro para $y = 0$ (ver figura 2.8). Como tem vindo a ser considerado, esta última concentração é uma média radial, e pode

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

ser obtida por:

$$c_0 = 2 \int_0^1 c_0^*(\beta) \beta d\beta \quad (2.51)$$

onde c_0^* representa a concentração no interior do poro em função de β . Para o caso de solutos esféricos e com geometria rígida, considerando apenas efeitos de exclusão puramente geométricos, a concentração c_0^* no interior do poro será dada por:

$$c_0^*(\beta) = \begin{cases} C_m & \beta \in [0, 1 - \lambda_s[\\ 0 & \beta \in [1 - \lambda_s, 1] \end{cases} \quad (2.52)$$

Substituindo a equação anterior na equação 2.51, e efetuando a integração, é possível obter a equação 2.32, que representa o coeficiente de partição para solutos modelados como esferas rígidas, considerando apenas efeitos de exclusão puramente geométricos. Um raciocínio semelhante pode ser feito para a outra extremidade do poro (concentrações c_L e C_p), obtendo-se o mesmo resultado.

No caso de moléculas flexíveis, a possibilidade de existência de deformação geométrica das cadeias leva à necessidade de efetuar um cálculo do coeficiente de partição distinto. Considerando novamente apenas efeitos de exclusão geométricos, existe em cada valor de β uma fração de todas as conformações possíveis da molécula que permite a sua entrada no poro. Se a esta fração for $p(\beta)$, função de β , a concentração c_0^* é assim obtida por:

$$c_0^*(\beta) = p(\beta) C_m \quad (2.53)$$

A concentração é inferior no interior do poro porque apenas uma fração $p(\beta)$ de todas as conformações possíveis da molécula permitem a sua entrada no poro. Esta fração pode também ser vista como uma probabilidade de entrada no poro, do mesmo modo que para solutos esféricos essa probabilidade é unitária na região para β entre 0 e $1 - \lambda_s$, e nula para β entre $1 - \lambda_s$ e 1. Substituindo a equação 2.53 na equação 2.51, o coeficiente de partição para moléculas flexíveis pode ser obtido por:

$$\Phi = 2 \int_0^1 p(\beta) \beta d\beta \quad (2.54)$$

Davidson et al [79], fizeram uso da equação 2.54 para determinar o coeficiente de partição de cadeias flexíveis, recorrendo a um método de Monte-Carlo para estimar $p(\beta)$. O método consiste em gerar a estrutura da cadeia um elevado número de vezes e testar em cada geração uma condição necessária de entrada no poro. No caso do referido trabalho, os autores optaram por considerar, como condição de entrada no poro, que todas as massas pontuais da estrutura gerada devam estar projetadas no interior do mesmo. Esta condição, embora aplicável em processos puramente difusivos, não contabiliza possíveis efeitos de deformação induzidos pelo fluxo convectivo de solvente, em condições de filtração. De facto, pode ser mostrado que esta condição conduz à obtenção de previsões de permeação de moléculas flexíveis, em processos de ultrafiltração, que subestimam consideravelmente os resultados experimentais [64]. Assim, opta-se neste trabalho por considerar uma nova condição, ilustrada na figura 2.16. Considera-se que para ocorrer permeação a parte inferior da molécula (a massa pontual mais próxima do poro) deverá estar projetada no interior do poro, sendo posteriormente conduzida pelo fluxo de solvente. Caso contrário, a molécula difunde novamente para o seio da solução. No capítulo 4 este tema será novamente abordado.

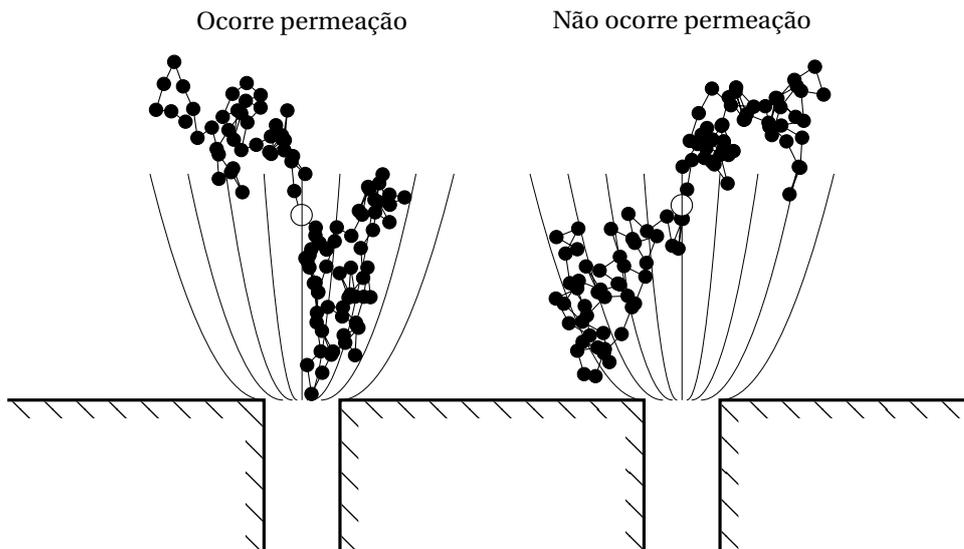


Figura 2.16: Ilustração da condição de entrada no poro em condições de filtração. Assume-se que as tensões de corte à entrada do poro, geradas pelo fluxo de solvente, provocam o alongamento da molécula e conseqüente entrada no poro, desde que a parte inferior da cadeia esteja projetada para o interior do mesmo. Se isso não acontecer, a molécula não permeia e difunde de novo para o seio da solução. Na figura está igualmente representado o centro de massa da molécula, \bigcirc .

Para completar a formulação teórica é ainda necessário relacionar o coeficiente de partição para moléculas flexíveis com o valor da sua permeação intrínseca. Para isso pode-se recorrer à equação 2.41. No entanto, as correlações existentes na literatura para os fatores de impedimento difuso e convectivo, K_d e K_c respectivamente, representados na equação 2.37, são apenas aplicáveis a solutos esféricos e para valores de λ_s inferiores a 1. No entanto, é proposto neste trabalho o seguinte raciocínio: para solutos flexíveis de elevadas dimensões, em especial para $\lambda_s \rightarrow 1$, K_d tende rapidamente para zero. Isto significa que o número de Péclet (equação 2.42) tende rapidamente para infinito e a permeação intrínseca, de acordo com a equação 2.41, tende assim para:

$$S_m = \Phi K_c \quad (2.55)$$

É pois razoável assumir um comportamento semelhante para moléculas flexíveis para as quais $\lambda_s \gg 1$, ou seja, pode assumir-se que estas moléculas uma vez no interior do poro deverão ocupar na totalidade a sua área de secção reta, o que implica que $K_d \rightarrow 0$. Por outro lado, como ilustrado na figura 2.9, se o soluto ocupa a totalidade do poro, a sua velocidade deverá ser igual à velocidade média do solvente, o que implica que $K_c = 1$. Assim, é proposta no presente trabalho a seguinte relação:

$$S_m = \Phi \quad (2.56)$$

A formulação teórica apresentada permite assim estabelecer um paralelismo com o modelo do transporte restringido (secção 2.6), ampliando o seu espectro de aplicação para o caso de solutos em que $\lambda_s \gg 1$. No capítulo seguinte serão abordados os fundamentos práticos inerentes à realização do presente trabalho.

Capítulo 3

Fundamentos Práticos

Neste capítulo são abordados os principais fundamentos, de carácter prático, no âmbito do presente trabalho. Devido à elevada diversidade de materiais e métodos utilizados na realização dos trabalhos experimentais, descritos nos capítulos 4–7, não seria viável fazer a sua exposição no presente capítulo. Assim, os detalhes experimentais específicos de cada trabalho são expostos no seu capítulo correspondente, ficando remetidos para o presente capítulo os detalhes experimentais que possuem uma aplicação mais transversal no âmbito do presente trabalho. Na seguinte secção é descrito o principal equipamento de filtração utilizado, nomeadamente a célula de filtração Amicon 8010.

3.1 Célula de filtração Amicon 8010

Nesta secção descreve-se a principal célula de filtração usada, a célula de filtração Amicon 8010 (*Mil-lipore*). Esta célula, ilustrada na figura 3.1, tem uma geometria “dead-end”, isto é, o fluxo de filtração apresenta uma direção perpendicular à superfície da membrana, membrana esta que é assente num suporte horizontal que contém um orifício por onde é recolhido o permeado. Para melhorar o coeficiente de transferência de massa, a célula dispõe de um agitador magnético que atua perto da superfície da membrana.

A célula pode ser operada de duas formas distintas (figura 3.1). Pode ser conectada a uma fonte de pressão (usualmente azoto ou ar comprimido), pressão esta que força o líquido a permear pela membrana. O fluxo de filtração não é facilmente controlável por este método, apenas o valor do diferencial de pressão através da membrana pode ser estabelecido de forma precisa. Este facto dificulta a tentativa de modelar matematicamente a filtração dado que o fluxo de filtração é um parâmetro crucial na formulação dos modelos teóricos apresentados no capítulo 2. Por outro lado, este método apresenta-se como o mais eficiente para efetuar alguns tipos de procedimentos, como a lavagem de membranas e a determinação das suas permeabilidades hidráulicas. A célula pode também ser operada de uma forma diferente, colocando uma bomba a jusante da membrana, que atua assim por sucção (figura 3.1). Este método permite estabelecer um fluxo de filtração constante e facilmente controlável. No entanto gera algumas limitações de aplicação prática, especialmente para membranas com baixa permeabilidade, causadas pela menor capacidade de estabelecer diferenciais de pressão elevados. Assim, este método é apenas indicado para situações em que os fluxos de filtração pretendidos não são excessivamente elevados e/ou a membrana apresente uma permeabilidade relativamente alta. No presente trabalho, a célula Amicon 8010 é operada pelo método que se revele mais apropriado. Sempre que possível, durante filtrações a célula é operada a fluxo de filtração constante, utilizando uma bomba peristáltica. Para efetuar operações de lavagem de membranas, de determinação de permeabilidades, ou para situações em que o método de fluxo constante não é aplicável, a célula é operada em modo de pressão constante.

O balanço de massa numa dada filtração, dentro da referida célula, pode ser facilmente determinado. Devido à sua geometria, é possível considerar como simplificação que o perfil de escoamento no seu interior é perfeitamente agitado o que implica que, em cada instante de tempo, a concentração dos solutos no seio da solução é uniforme em todas as posições espaciais. O mesmo é dizer que a

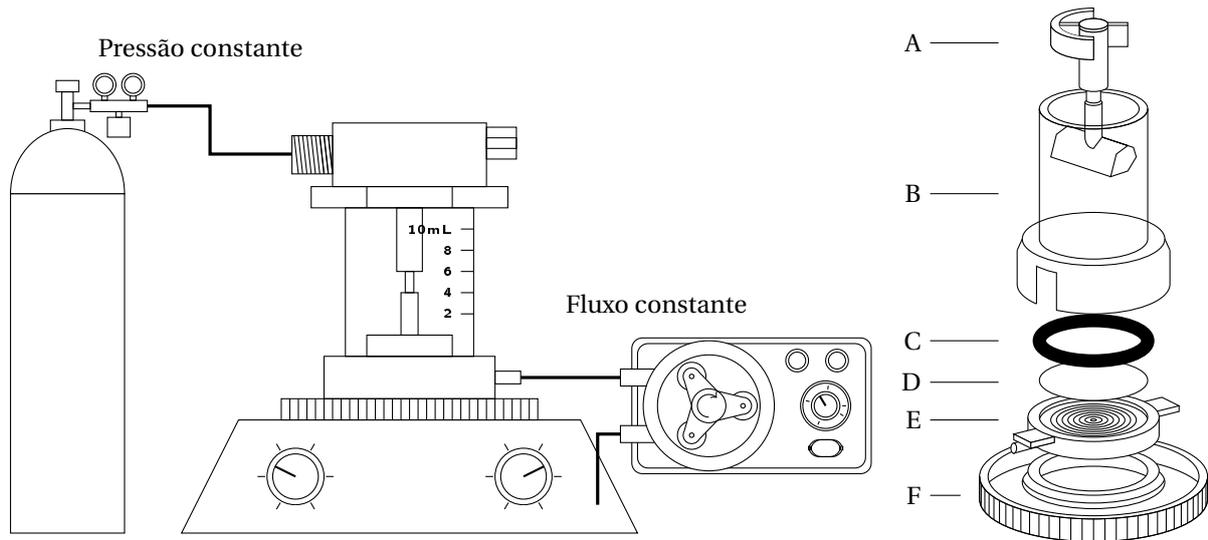


Figura 3.1: Esquema e modos de operação da célula Amicon 8010. A - agitador magnético, B - corpo da célula (10 mL de capacidade), C - "o-ring", D - membrana, E - suporte da membrana e recolha de permeado, F - base. No presente trabalho a célula foi operada de duas formas distintas: mantendo a pressão no interior da célula constante ou mantendo o fluxo de filtração constante por intermédio de uma bomba peristáltica colocada a jusante da membrana.

concentração de solutos no interior da célula é apenas função do tempo. Para a nomenclatura especificada na figura 3.2, o balanço de massa para um determinado soluto é dado por (considerando que não ocorre adsorção na membrana):

$$Q_{in} C_{in} - Q C_p = C_b \frac{dV}{dt} + V \frac{dC_b}{dt} \quad (3.1)$$

No presente trabalho foram considerados dois modos de operação: o modo de concentração, que implica $Q_{in} = 0$, e o modo de diafiltração a volume constante, o que implica $Q_{in} = Q$ e $C_{in} = 0$.

3.1.1 Balanço de massa: modo de concentração

Em modo de concentração, $Q_{in} = 0$ e a equação 3.1 pode ser reescrita da seguinte forma:

$$-Q C_p = C_b \frac{dV}{dt} + V \frac{dC_b}{dt} \quad (3.2)$$

Para integrar a equação é necessário primeiro determinar a taxa temporal de variação do volume no interior da célula (dV/dt). Para isso pode ser feito um balanço de massa à solução. Se for considerado que a densidade da solução se mantém aproximadamente constante durante a filtração, o balanço de massa é dado por:

$$\begin{aligned} dV/dt &= -Q \\ V &= V_0 - Qt \end{aligned} \quad (3.3)$$

Introduzindo o anterior resultado na equação 3.2 e integrando a equação entre 0 e t obtém-se:

$$C_b = C_{b0} \left(1 - \frac{Q}{V_0} t\right)^{S_{obs}-1} \quad (3.4)$$

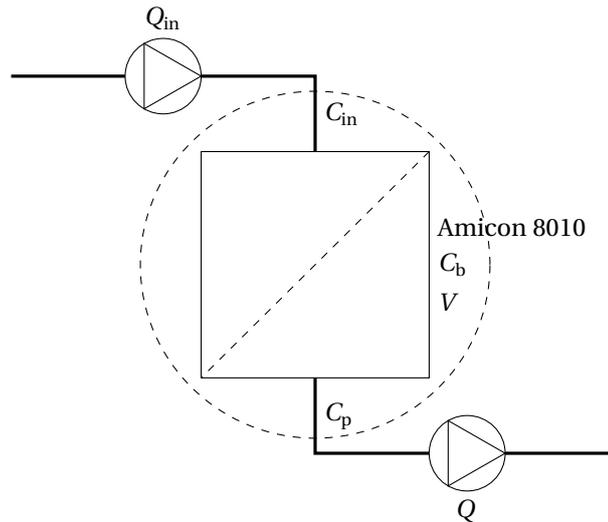


Figura 3.2: Nomenclatura usada para efetuar o balanço de massa durante uma filtração na célula Amicon 8010. Assume-se que não ocorre adsorção na membrana.

em que C_b é a concentração do soluto no interior da célula, para um determinado tempo t , C_{b0} é a concentração inicial do soluto no interior da célula (para $t = 0$), V_0 é o volume inicial de solução a filtrar no interior da célula e S_{obs} é o coeficiente de permeação observado do soluto, que se assume constante ao longo do tempo e que é definido por:

$$S_{obs} = \frac{C_p}{C_b} \quad (3.5)$$

Assim, a equação 3.4 permite determinar S_{obs} a partir de valores experimentais de C_b e C_p . Sublinhe-se que esta equação é somente válida quando S_{obs} é aproximadamente constante, condição que é normalmente verificada na filtração de solutos neutros e na ausência de colmatação significativa. No caso de solutos com carga elétrica, os valores de S_{obs} não são independentes da concentração no meio, C_b , pelo que a equação 3.4 é somente aplicável no caso de pequenas variações de volume, o que é o caso da generalidade das determinações experimentais feitas neste trabalho.

3.1.2 Balanço de massa: modo de diafiltração a volume constante

No modo de diafiltração a volume constante, o volume de solução no interior da célula permanece constante e a concentração do soluto na corrente de entrada (C_{in}) é nula. Este modo de operação é muito usado por exemplo para efetuar trocas de tampão de soluções de macromoléculas, sendo uma alternativa ao processo de diálise. Nestas condições, a equação 3.1 pode ser reescrita da seguinte forma:

$$-Q C_p = V \frac{dC_b}{dt} \quad (3.6)$$

Introduzindo de novo a equação 3.5, e considerando S_{obs} constante ao longo do tempo, obtém-se após integração entre 0 e t :

$$C_b = C_{b0} \exp\left(-S_{obs} \frac{Q}{V} t\right) \quad (3.7)$$

Para solutos que apresentem permeabilidades elevadas, a sua concentração no interior da célula decresce exponencialmente ao longo do tempo. Esta equação é particularmente útil para descrever ope-

rações de troca de tampão, em que a macromolécula é muito rejeitada enquanto os microsolutos permeiam livremente pela membrana.

3.1.3 Coeficiente de transferência de massa

Outro aspeto muito importante de qualquer processo de filtração é o valor do coeficiente de transferência de massa na camada de polarização de concentração, junto à membrana, o qual foi definido na secção 2.4, através da equação 2.25. De facto, muito do esforço de desenvolvimento e investigação na área das tecnologias de membranas é focalizado na modelação teórica dos processos de transferência de massa ao nível da camada de polarização de concentração, recorrendo a métodos computacionais de dinâmica de fluidos. O desenvolvimento de métodos nessa área vai para além dos objetivos propostos para trabalho de doutoramento, sendo usadas aqui correlações semi-empíricas frequentemente utilizadas na literatura para a estimativa de coeficientes de transferência de massa em casos concretos, as quais são válidas para determinados tipos de equipamento. De acordo com o anteriormente exposto, um coeficiente de transferência de massa elevado é desejável porque permite reduzir os fenómenos de polarização de concentração, tal como referido no capítulo 2. Uma polarização de concentração excessiva pode originar uma prematura colmatação das membranas, alterando quer a produtividade quer a seletividade destes processos ao longo do tempo. Conduz ainda a um aumento da periodicidade da lavagem e substituição das membranas, facto que gera um elevado impacto económico e ambiental.

O coeficiente de transferência de massa, k , é fundamentalmente dependente do coeficiente de difusão do soluto, da densidade e viscosidade da solução para além de parâmetros relacionados com o equipamento de filtração, os quais influenciam marcadamente as condições hidrodinâmicas, sendo usualmente determinado por correlações do tipo [66]:

$$Sh = aRe^bSc^c \quad (3.8)$$

onde Sh , Re e Sc são os parâmetros adimensionais número de Sherwood, número de Reynolds e número de Schmidt, respetivamente, e a , b e c constantes empíricas. Para a célula de filtração Amicon 8010 pode ser usada a correlação proposta por Opong e Zydney [48]:

$$Sh = 0.23Re^{0.567}Sc^{0.33} \quad (3.9)$$

em que os parâmetros adimensionais são definidos da seguinte forma:

$$\begin{aligned} Sh &= \frac{kr_{cell}}{D} \\ Re &= \frac{\omega r_{cell}^2 \rho}{\eta} \\ Sc &= \frac{\eta}{\rho D} \end{aligned} \quad (3.10)$$

onde r_{cell} é o raio da célula de filtração (para a célula Amicon 8010 equivale a 12.5 mm), D é o coeficiente de difusão, ω é a velocidade de agitação em rad/s, ρ é a densidade, e η a viscosidade dinâmica. Os parâmetros são todos referentes a uma situação não-confinada da solução.

O coeficiente de transferência de massa pode também ser determinado experimentalmente, a partir de valores de S_{obs} obtidos a diferentes fluxos de permeação, se for considerado o modelo do filme (secção 2.4). A equação 2.28 pode ser usada para determinações diretas. Após alguma manipulação

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

algébrica pode ainda obter-se a seguinte relação, a partir da equação 2.28:

$$\ln\left(\frac{1-S_{\text{obs}}}{S_{\text{obs}}}\right) = \ln\left(\frac{1-S_m}{S_m}\right) - \frac{J_V}{k} \quad (3.11)$$

Esta relação prevê uma variação linear entre $\ln[(1-S_{\text{obs}})/S_{\text{obs}}]$ e o fluxo de filtração, sendo o declive dado por $-k^{-1}$, para o caso de se ter S_m constante.

3.1.4 Caracterização de membranas e determinação de coeficientes de permeação

Devido às suas características, tais como a facilidade de operação e a reduzida área de membrana necessária, a célula Amicon 8010 revela-se bastante útil para proceder à caracterização de membranas quanto ao seu tamanho de poro. Nesta secção é descrito o procedimento efetuado no presente trabalho para efetuar esta tarefa. Este procedimento foi ainda utilizado para a determinação experimental de valores de coeficiente de permeação observada (S_{obs}).

Antes de se iniciar uma filtração devem ser efetuados alguns procedimentos de lavagem, quer da célula quer da membrana. Isto pode ser feito operando a célula em modo de pressão constante. Deve ser usada nas lavagens uma água desmineralizada e microfiltrada, sendo que no presente trabalho foi usada água MilliQ (*Millipore*). Para determinar S_{obs} para um determinado soluto, o procedimento usado foi o seguinte:

1. Colocar a solução a filtrar (mínimo 5 mL na célula Amicon 8010), da qual se recolhe uma amostra para posterior análise.
2. Ajustar a velocidade de agitação pretendida, iniciar a filtração e começar a contagem de tempo.
3. Recolher 0.5–1 mL de permeado para um tubo, conforme o volume inicial da solução a filtrar. O tempo de filtração relativo à recolha desta primeira fração será denotado t_1 .
4. Sem parar a filtração, continuar a recolha para outro tubo. O tempo de filtração relativo à recolha desta primeira fracção será denotado t_2 (contado desde o início da filtração).
5. Pesas as duas frações e calcular o volume correspondente.
6. Analisar as duas frações de permeado, a solução inicial e o concentrado que ficar na célula de filtração, quanto ao conteúdo do soluto em questão e determinar a sua concentração usando o método mais adequado (os vários métodos analíticos são descritos mais à frente).
7. Calcular o valor de S_{obs} .

Usando a equação 3.4, e integrando C_p entre o tempo de recolha da primeira fração (t_1) e o tempo total de filtração (t_2), obtém-se:

$$C_{p,\text{med}} = \frac{V_0 C_{b0}}{Q(t_1 - t_2)} \left[\left(1 - \frac{Q}{V_0} t_1\right)^{S_{\text{obs}}} - \left(1 - \frac{Q}{V_0} t_2\right)^{S_{\text{obs}}} \right] \quad (3.12)$$

O valor de S_{obs} pode assim ser obtido resolvendo numericamente a equação 3.12, a partir dos valores de $C_{p,\text{med}}$ (concentração do soluto na segunda fração) e C_{b0} experimentais. Com a concentração do soluto nas duas frações de permeado e os respetivos volumes de permeado pode ainda determinar-se a quantidade total de soluto permeado, a qual pode ser comparada com a quantidade de soluto na amostra inicial e a quantidade de soluto no concentrado final. Isto possibilita verificar se houve ou não adsorção de soluto na membrana, e quantificar a quantidade adsorvida.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

Para caracterizar uma membrana quanto ao seu tamanho de poro é necessário determinar S_{obs} de solutos cujas dimensões moleculares são conhecidas, os quais serão referidos como solutos de referência, seguindo o procedimento descrito em cima, variando entre ensaios a velocidade de agitação e/ou o fluxo de filtração, conforme se revele mais adequado experimentalmente. Os solutos de referência mais usados para caracterizar membranas de UF são dextrans e polietilenoglicóis (PEG's). Para estes dois polímeros podem ser encontradas na literatura correlações para determinar os seus raios hidrodinâmicos (r_s) em função das suas massas moleculares (M_w). Para dextrans [64]:

$$r_s = 0.0282(M_w)^{0.47752} \quad (3.13)$$

com r_s em nm e M_w em Da. Para PEG's pode ser usada a seguinte correlação [45]:

$$\ln r_s = -23.91 + 0.4648 \ln(M_w) \quad (3.14)$$

com r_s em m e M_w em Da. Estes solutos foram escolhidos porque são neutros e podem ser aproximadamente descritos pelo modelo de esferas rígidas [43, 44, 47], o que permite a aplicação do modelo do transporte restringido descrito na secção 2.6. Desta forma é possível determinar um valor de raio de poro (r_p) que minimiza os erros entre os valores de S_{obs} obtidos experimentalmente e os valores obtidos com o modelo, erros estes que podem ser representados por uma função de mínimos quadrados [56]:

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum_1^n \sum_1^j (S_{\text{obs,exp}} - S_{\text{obs,calc}})^2}{jn - 1}} \quad (3.15)$$

onde $S_{\text{obs,exp}}$ é a permeação observada determinada experimentalmente, $S_{\text{obs,calc}}$ é a permeação observada calculada pelo modelo, n é o número de solutos usados, cada um com j valores de S_{obs} determinados. Assim, o raio de poro da membrana é determinado como sendo o valor que minimiza S_y .

3.2 Principais solutos em estudo

Nesta secção é feita a caracterização dos principais solutos em estudo, nomeadamente DNA plasmídico e RNA. É dada ênfase às suas propriedades mais relevantes no âmbito do presente trabalho, ou seja, as propriedades necessárias para a formulação dos modelos apresentados no capítulo 2. Para além do que é aqui referido, podem ser encontradas na literatura diversas referências que abordam a caracterização pormenorizada destes dois importantes tipos de biomoléculas. De facto, existem revistas científicas totalmente focadas nesta temática, como por exemplo, “*PLASMID, A Journal of Mobile Genes and Genomes*” e “*RNA, A Publication of the RNA Society*”. O texto de Schleef et al [5] discute as propriedades destas biomoléculas mais relevantes no contexto de um processo de purificação de pDNA.

3.2.1 DNA plasmídico

Os plasmídeos são moléculas de DNA circulares, de dupla cadeia, que podem ser encontrados maioritariamente em bactérias, onde desempenham várias funções. Em especial, são responsáveis por conferir funções que possibilitam a adaptação destes organismos unicelulares a diferentes meios, conferindo em alguns casos resistência a determinados compostos que atuam como antibióticos. Sendo moléculas de DNA dupla cadeia, o seu tamanho é quase sempre indicado pelo número de pares de

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

bases (nbp) que o constituem. A valores de pH superiores a 4.00 [5], o grupo fosfato em cada base encontra-se ionizado, o que implica que o pDNA apresenta uma elevada quantidade de cargas negativas, mais especificamente 2 cargas negativas por cada par de bases. A sua massa molecular é dependente não só do número de pares de bases mas também da própria constituição em termos do tipo de bases. Neste trabalho opta-se por se utilizar uma aproximação ao valor real da massa molecular do plasmídeo, considerando uma massa molecular média, por par de bases, igual a 660 Da [82], ou seja:

$$M_w = 660(\text{nbp}) \quad (3.16)$$

onde M_w é a massa molecular do pDNA em Da. A grande maioria dos plasmídeos apresenta um tamanho que pode ir de 1 kbp a 200 kbp. Devido às suas elevadas dimensões, estas moléculas apresentam valores reduzidos de coeficiente de difusão. No presente o trabalho, os coeficientes de difusão das moléculas de pDNA estudadas foram determinados pela correlação proposta por Prazeres [82]:

$$D = A \frac{T}{\eta} (\text{nbp})^{-2/3} \quad (3.17)$$

$$A = 3.31 \times 10^{-15} \text{ N/K}$$

onde T é a temperatura absoluta da solução (K), η a viscosidade (Pa-s), nbp é o número de pares de bases do plasmídeo e A é uma constante empírica determinada pelo autor.

Sendo moléculas carregadas negativamente, os plasmídeos apresentam variações no seu tamanho consoante a força iónica do meio, facto que é causado pela redução da intensidade das forças eletrostáticas repulsivas, entre os seus grupos carregados, na presença de sais. Este efeito, no caso de moléculas de DNA, pode ser contabilizado pela correlação proposta por Manning [83]:

$$a = \left(\frac{\pi a^*}{2} \right)^{2/3} \frac{R_{\text{DNA}}^{4/3}}{z^2 l_B} \left[(2z\xi - 1) \frac{\kappa b e^{-\kappa b}}{1 - e^{-\kappa b}} - 1 - \ln(1 - e^{-\kappa b}) \right] \quad (3.18)$$

onde a é o comprimento de persistência do DNA, contabilizando a presença das suas cargas negativas, a^* é o comprimento de persistência de um isómero da molécula de DNA para o qual os grupos fosfato não estão ionizados (ver [83]), R_{DNA} é o raio da dupla hélice do DNA, z é a valência do catião do sal presente em solução, l_B é o comprimento de Bjerrum da água pura, ξ é a densidade de carga do DNA e b é o espaço entre cargas no DNA. Os valores que podem ser usados para os vários parâmetros são [60, 83]:

$$\begin{aligned} a^* &= 7.5 \text{ nm} \\ R_{\text{DNA}} &= 1 \text{ nm} \\ l_B &= 0.71 \text{ nm} \\ \xi &= 4.2 \\ b &= 0.17 \text{ nm} \end{aligned} \quad (3.19)$$

A variação do comprimento de persistência com a força iónica da solução está implícita no valor do inverso do comprimento de Debye, κ , que pode ser calculado, em unidades SI, por [83]:

$$\kappa = \sqrt{8\pi N_A l_B I} \quad (3.20)$$

onde N_A é o número de Avogadro e I o valor da força iónica da solução. Para determinar o raio de giração das moléculas de pDNA opta-se, no presente trabalho, por as representar como cadeias fechadas segmentadas (capítulo 2). Seguindo esta abordagem, foi possível obter uma relação entre o raio de

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

Tabela 3.1: Propriedades mais relevantes, no âmbito do presente trabalho, dos três plasmídeos estudados.

Plasmídeo	nbp	M_w [MDa]	$D \times 10^{12}$ [m ² /s]	$r_g \times 10^9$ [m]
<i>pUC19</i>	2686	1.77	5.76	53.3
<i>pVAX1-LacZ</i>	6050	3.99	3.35	90.2
<i>pCAMBIA-1303</i>	12361	8.16	2.08	143.3

$$T = 298 \text{ K}, \eta = 8.87 \times 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$$

$$I = 150 \text{ mM (NaCl)}$$

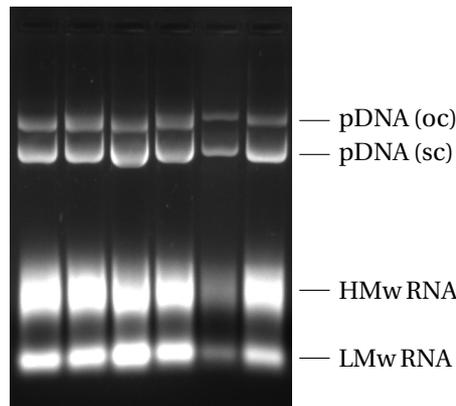


Figura 3.3: Identificação dos dois principais grupos de RNA (HMw e LMw RNA) numa análise de lisados por eletroforese em gel de agarose. Na figura encontra-se várias amostras de um lisado do plasmídeo *pVAX1-LacZ*, obtido por lise alcalina.

giração e o comprimento de persistência e número de pares de bases do plasmídeo, encontrando-se os detalhes inerentes à obtenção da seguinte relação explicitados no capítulo 5:

$$r_g = c_1 a^{c_2} \text{nbp}^{1-c_2} \quad (3.21)$$

$$c_1 = 1.1631 \times 10^{-7}; \quad c_2 = 0.352$$

com r_g e a em m. O comprimento de persistência pode ser calculado com a equação 3.18. Na tabela 3.1 encontram-se os três plasmídeos utilizados no presente trabalho, bem como as suas propriedades mais relevantes, calculadas pelas equações apresentadas.

3.2.2 RNA

Os lisados obtidos pelo procedimento usado de lise alcalina, descrito na secção 3.4, contêm como principal contaminante moléculas de RNA, o que torna premente o estudo desta biomolécula. Analisando o lisado por eletroforese em gel de agarose (figura 3.3), observam-se duas bandas distintas de RNA: uma primeira banda com menor distância de migração, que se refere ao RNA ribossómico da *E. coli* de maior massa molecular (RNA 23 e 16S), e uma segunda banda onde se podem encontrar moléculas de RNA de menor massa molecular. A primeira banda diz assim respeito ao chamado RNA de alto peso molecular (HMw RNA) de que fazem parte o RNA 16S e 23S. A segunda banda contém o denominado RNA de baixo peso molecular (LMw RNA), sendo o RNA 5S o seu principal constituinte [11].

As moléculas de RNA, ao contrário dos plasmídeos, são moléculas de cadeia simples. O seu tamanho pode ser indicado pelo número de nucleótidos (nnt) que o constituem. No entanto, para o caso específico das moléculas de RNA, é mais usual proceder à sua identificação através dos valores dos

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

Tabela 3.2: Propriedades mais relevantes, no âmbito do presente trabalho, das três espécies de RNA estudadas.

RNA	nnt	$s \times 10^{13}$ [s]	M_w [kDa]	$r_s \times 10^9$ [m]	$r_g \times 10^9$ [m]	$D \times 10^{11}$ [m ² /s]
RNA 5S	120	5	40.80	3.39	5.10	7.29
RNA 16S	1541	16	523.94	13.6	20.5	1.82
RNA 23S	2904	23	987.36	17.8	26.8	1.39

$$T = 298 \text{ K}$$

$$\eta = 8.87 \times 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$$

seus coeficientes de sedimentação (s), em operações de ultracentrifugação, avaliados em unidades Svedberg (S). Assim, pela teoria básica da ultracentrifugação, é possível estimar o raio hidrodinâmico em função da massa molecular e do coeficiente de sedimentação [84, 85]:

$$r_s = \frac{1}{6\pi\eta} \left[\frac{M_w (1 - V_s \rho)}{N_A s} \right] \quad (3.22)$$

onde r_s representa o raio hidrodinâmico do RNA, η a viscosidade da solução, M_w a massa molecular do RNA, V_s o volume parcial específico do RNA, ρ a densidade da solução e s o coeficiente de sedimentação do RNA. A massa molecular do RNA pode ser aproximadamente calculada considerando que cada nucleótido tem uma massa molecular média de 340 Da.¹ O volume parcial específico pode ser considerado aproximadamente constante para os vários tipos de RNA, sendo o seu valor médio de 0.53 mL/g [85]. O coeficiente de difusão pode assim ser obtido a partir dos valores do raio hidrodinâmico através da equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_s} \quad (3.23)$$

onde D representa o coeficiente de difusão, k_B a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta e η a viscosidade da solução.

No presente trabalho optou-se por representar as várias moléculas de RNA presentes nos lisados pela abordagem de cadeias de ligação livre (capítulo 6). Segundo esta abordagem, o raio de giração pode ser obtido a partir do raio hidrodinâmico através do modelo de Zimm [78, 86, 87]:

$$r_g = 1.505 r_s \quad (3.24)$$

Na tabela 3.2 encontram-se as propriedades mais relevantes, no âmbito do presente trabalho, das três espécies de RNA consideradas.

3.3 Método de quantificação HIC

Nesta secção são feitas algumas considerações sobre o principal método quantitativo utilizado no presente trabalho. Este método, da autoria de Diogo et al [88], é um método de cromatografia por interação hidrofóbica (HIC) e foi originalmente desenvolvido para quantificar o pDNA presente nas várias amostras ao longo de um processo de purificação. Não há distinção entre as várias isoformas de pDNA, pelo que o valor determinado pelo método corresponde ao valor da concentração total de plasmídeo. Os detalhes específicos da execução experimental do referido método são fornecidos nos capítulos 6 e 7. O princípio de funcionamento do método de HIC assenta nas diferenças de hidrofobicidade entre os vários constituintes do lisado, encontrando-se um cromatograma típico representado

¹<http://www.nordicbiosite.com>

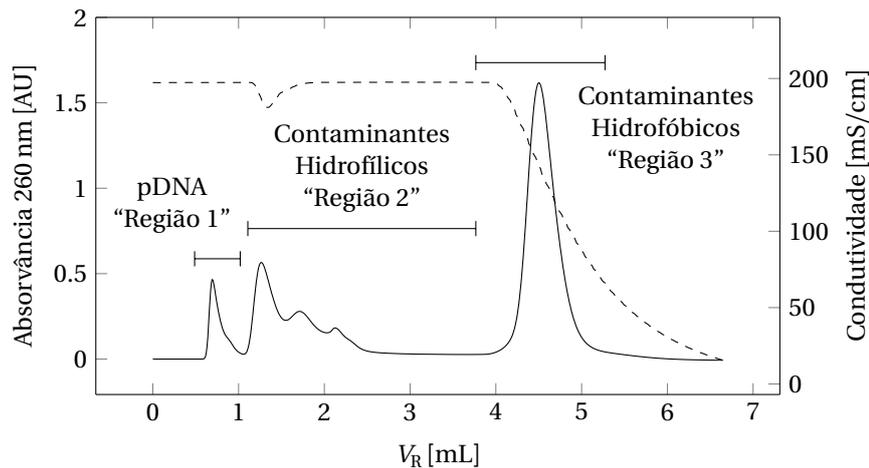


Figura 3.4: Perfil cromatográfico típico de um lisado alcalino, obtido com o método de HIC desenvolvido por Diogo et al [88]. No cromatograma podem ser identificadas três regiões distintas. Uma primeira região (região 1) que corresponde às moléculas de pDNA, uma segunda região (região 2) onde eluem compostos com maior tempo de retenção mas que não ficam permanentemente ligados à coluna (contaminantes hidrofílicos) e uma terceira região onde eluem os compostos mais hidrofóbicos (contaminantes hidrofóbicos), cuja eluição só é conseguido reduzindo a força iónica do eluente. Na figura está também representado, a tracejado, o perfil da condutividade do eluido

na figura 3.4. No momento da injeção, o eluente contém uma elevada quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.5 M) para que seja possível intensificar as interações dos vários componentes do lisado com a matriz hidrofóbica da coluna. Ao fim de um determinado tempo, o eluente é instantaneamente substituído para um novo eluente sem a presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para assim eluir as espécies retidas na coluna. Podem ser identificadas três regiões distintas no cromatograma apresentado na figura 3.4. A primeira região (“região 1”) é constituída por um pico com um máximo de absorvância aos 0.7 mL de volume de retenção, que se atribui exclusivamente às moléculas de pDNA [17, 88, 89], que é uma molécula altamente hidrofílica por natureza. Numa segunda região (“região 2”), elui um grupo de compostos que apresentam um maior tempo de retenção mas que não ficam ligados de forma permanente à coluna. Estes contaminantes são por isso denominados contaminantes hidrofílicos. Finalmente, pode ser identificada uma terceira região (“região 3”) que apresenta um pico com um máximo de absorvância em 4.5 mL de volume de retenção, pico este que é apenas obtido aquando da mudança de eluente. Isto significa que os compostos que eluem nesta região ficam fortemente ligados na coluna e são por isso denominados contaminantes hidrofóbicos². Como discutido no apêndice B, é proposto no presente trabalho identificar estes contaminantes como sendo, na grande maioria, constituídos pelas moléculas de RNA presentes nos lisados, o que possibilita obter por este método a simultânea quantificação do pDNA e do RNA.

3.4 Lise alcalina

Nesta secção descreve-se o procedimento utilizado para efetuar o processo de lise alcalina. Para tentar manter a reprodutibilidade entre ensaios usou-se sempre a mesma concentração mássica de células na suspensão a ser lisada. Esta concentração foi escolhida com base num estudo prévio de estabilidade dos lisados, apresentado no apêndice A.

²É importante notar que a convenção de nomenclatura adotada para os contaminantes presentes no lisado serve apenas o propósito de os identificar, não procurando efetuar uma análise profunda do grau de hidrofobicidade dos mesmos.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

Na realização do presente trabalho efetuou-se o processo de lise alcalina de forma manual³. O procedimento usado é uma modificação do método originalmente proposto por Birnboim e Doly [24], e consiste nos seguintes três passos:

1. Ressuspender o pellet de *E. coli* num volume de tampão de ressuspensão apropriado para obter uma suspensão com uma concentração mássica de 120 g/L (peso húmido). Regra geral, foram ressuspendidas 480 mg de células em 4 mL de tampão de ressuspensão.
2. Adicionar um volume de tampão de lise, agitar de forma suave e incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
3. Adicionar um volume de tampão de neutralização, agitar de forma suave e incubar em gelo durante 15 min.

A constituição dos três tampões enunciados, bem como o modo de preparação e de manutenção dos mesmos, foi a seguinte:

Tampão de ressuspensão Solução de 50 mM de Tris e 10 mM de EDTA. Ajustar pH para 8.00 através da adição de HCl. Conservar a temperatura ambiente. Verificar o pH do tampão antes de utilizar.

Tampão de lise Solução de 0.2 M de NaOH e 1 % (w/w) de SDS. Conservar a temperatura ambiente. Antes de utilizar deve-se verificar a existência de uma possível precipitação de SDS, o que pode acontecer se a temperatura ambiente for reduzida. Em caso de ter ocorrido precipitação deve-se incubar o tampão num banho termostaticado a 37°C até se verificar a completa dissolução de SDS.

Tampão de neutralização Solução de 3 M de acetato de potássio. Ajustar pH para 5.50 através da adição de ácido acético glacial. Conservar a 4°C. Verificar o pH antes de utilizar.

É importante notar que o tampão de ressuspensão não contém RNase, que é por vezes usada para degradar o RNA [91]. Esta opção, como referido no capítulo 1, apresenta algumas limitações do ponto de vista de aplicação industrial e é assim desaconselhável. Para além do estudo prévio anteriormente referido, foi ainda realizado um estudo de caracterização dos lisados centrifugados por cromatografia de exclusão molecular (SEC), eletroforese em gel de agarose (AGE), cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) e de análise ao conteúdo proteico (BCA). Este estudo é descrito apêndice B.

³Naturalmente, de um ponto de vista de aplicação industrial, o processo de lise terá que ser efetuado de forma automática e de preferência em modo contínuo, sendo relevantes os estudos desenvolvidos por Urthaler et al [26], Meacle et al [27] e Chamsart e Karnjanasorn [90] sobre esta matéria.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

Capítulo 4

Desenvolvimento de um modelo para a filtração de moléculas longas e flexíveis.

O trabalho descrito neste capítulo foi publicado na revista *Journal of Membrane Science* [64].

4.1 Introdução

O desenvolvimento de modelos de transporte restringido que descrevem a permeação de solutos através de matrizes porosas tem especial importância na caracterização de membranas e na previsão da seletividade. Modelos em que os solutos são vistos como tendo um comportamento semelhante ao de esferas rígidas (HS), têm vindo a ser utilizados com sucesso para este efeito em operações de microfiltração, ultrafiltração e nanofiltração. A vantagem da abordagem HS é que para poros com geometria cilíndrica, é possível estimar os coeficientes hidrodinâmicos que contabilizam os efeitos da difusão e convecção restringida no interior dos mesmos [43, 56, 44]. Para os casos em que os efeitos de carga podem ser desprezados, isto é, se os solutos forem neutros ou a força iónica da solução for elevada, esta abordagem é suficiente para se obterem previsões satisfatórias das permeações intrínsecas dos solutos, com base unicamente em efeitos de exclusão geométricos. Por este motivo, este tipo de modelos têm vindo a ser muito adotados para obter informação sobre a membrana, nomeadamente o tamanho ou a distribuição de tamanhos de poro [56, 92, 93, 71], e mais recentemente o grau de assimetria [47]. Feita a caracterização da membrana, a abordagem HS permite obter previsões da permeação de solutos a partir dos seus raios hidrodinâmicos. Esta informação é de especial importância para guiar a escolha da membrana a usar em cada aplicação, para interpretar resultados experimentais e para as fases de desenvolvimento, otimização e controlo do processo.

No entanto, a aplicação destes modelos para o estudo da permeação de moléculas lineares de elevada massa molecular apresenta severas limitações devido ao desvio do comportamento deste tipo de moléculas à abordagem de esferas rígidas. De facto, sabe-se que macromoléculas lineares apresentam uma elevada permeação através de poros com dimensões muito inferiores. As dimensões deste tipo de solutos são geralmente representadas quer pelo raio hidrodinâmico, r_s , quer pelo raio de giração, r_g . É importante notar que estas quantidades devem ser vistas como valores médios, uma vez que a estrutura deste tipo de moléculas em solução se encontra em constante variação. Uma revisão recente sobre este assunto pode ser encontrada em [59]. A existência de uma elevada permeação deste tipo de solutos em poros com menores dimensões indica com clareza que a abordagem HS é insuficiente para descrever com exatidão as suas permeações em matrizes porosas, o que é especialmente verdade para massas moleculares superiores a ~ 1 MDa, e r_g na ordem dos 10 nm. Assim, é necessário desenvolver modelos mais adequados que possam incluir a possibilidade do soluto adotar diferentes conformações ao longo do tempo, e se necessário, os efeitos da deformação molecular induzida pelo fluxo convectivo do solvente através dos poros.

No procedimento convencional para modelar a permeação de moléculas longas e flexíveis, podem ser distinguidas três situações: a permeação na ausência de convecção (transporte exclusivamente por difusão), permeação a fluxos moderados sem existência de deformação molecular e permeação a fluxos elevados, onde a deformação molecular pode ser significativa [43]. De entre os estudos publicados

nesta temática, é igualmente importante distinguir aqueles em que o rácio entre o raio do soluto e o raio do poro (λ_s) é inferior a 1, dos estudos em que $\lambda_s > 1$. Para o caso de moléculas lineares, para valores de λ_s até 0.87 existem modelos teóricos disponíveis para prever o transporte restringido de macromoléculas lineares em poros [94]. No entanto, para valores superiores de λ_s a modelação das permeações é mais difícil, especialmente para o caso em que $\lambda_s > 1$ onde a deformação molecular tem que ser considerada.

Para além do desenvolvimento do modelo de transporte de massa, é necessário igualmente estimar os coeficientes de partição à entrada do poro. Para isso, foram desenvolvidos métodos estocásticos, envolvendo simulações computacionais [79, 81, 80], para evitar a excessiva complexidade de obter uma solução analítica. Nestes algoritmos é estimada a probabilidade de um determinado evento ocorrer, por exemplo, a probabilidade de uma molécula entrar no interior de um poro, testando esse evento um elevado número de vezes (tipicamente, pelo menos 10^5 simulações são necessárias para obter uma aproximação satisfatória da probabilidade real do evento). A forma como o evento é testado pode ser variada, dependendo do método usado, assim como a estrutura da molécula pode ser representada com um maior ou menor grau de realismo, com importantes consequências em termos do tempo computacional. Para evitar excessivos esforços computacionais, para a representação da estrutura de moléculas flexíveis, podem ser considerados protótipos moleculares que imitam essa mesma estrutura, retendo as características essenciais que determinam a sua permeação através de poros.

A abordagem mais simples para representar a estrutura de uma molécula linear flexível é a representação de cadeias de ligação livre (FJC) [78, 95, 96]. Esta abordagem, assim como outras mais sofisticadas, têm vindo a ser usadas para estudar a possibilidade de macromoléculas adotarem conformações que lhes permitem entrar em regiões confinadas [79, 81, 80], no entanto nunca para $\lambda_s \gg 1$. Coeficientes de partição podem ser determinados estimando a probabilidade da molécula adotar tais conformações, assumindo que não ocorre deformação induzida pelo fluxo de solvente. No entanto, em processos de membranas onde a força motriz é a pressão, esta abordagem não deve ser utilizada e é possível provar que as estimativas dela resultantes não estão de acordo com os resultados experimentais. De facto, na área da tecnologia de membranas, esta abordagem tem vindo apenas a ser aplicada no estudo de processos de difusão restringida. No presente capítulo considera-se que os coeficientes de partição são influenciados pelo fluxo convectivo, sendo a sucção à entrada do poro e a conformação espacial da molécula os fatores que determinam a permeação.

Assim, o objetivo neste capítulo passa por desenvolver um modelo simples, baseado em modelos prévios de transporte restringido em membranas porosas, e por estimar os coeficientes de partição para o caso em que $\lambda_s \gg 1$. O modelo desenvolvido pode assim ser aplicado para a previsão das permeações de macromoléculas lineares, representadas por FJCs. A validade do modelo foi testada pelo estudo da permeação de duas moléculas longas através de diferentes membranas. Os solutos testados foram o dextrano T2000 (que tem uma massa molecular de cerca de 2 MDa) e o plasmídeo *pUC19* (que tem 2686 pares de bases, e uma correspondente massa molecular de 1.773 MDa) tratado com uma enzima de restrição, que corta a dupla cadeia originando um plasmídeo na isoforma linear.

4.2 Desenvolvimento do modelo

4.2.1 Definição da estrutura FJC

Uma FJC pode ser definida com uma série de n_k segmentos, com orientações aleatórias todos com o mesmo comprimento, l_k , que ligam $n_k + 1$ massas pontuais [78, 96, 95]. Os valores de n_k e l_k são definidos para que se obtenha o mesmo comprimento do contorno da molécula real, L ; l_k corresponde

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

à distância mínima para que se tenha um segmento com orientação independente do anterior, e para o caso de uma FJC equivale à distância de Kuhn, l_K . Desta forma, o rácio l_k/L é um indicador da flexibilidade da cadeia. Esta estrutura pode ser gerada como um caminho aleatório em três dimensões com n_k passos com comprimento l_k [78]. Neste tipo de estrutura, não é tido em conta possíveis interações entre monómeros, e uma FJC definida desta maneira é igualmente denominada de cadeia ideal. Assim, uma representação FJC é o modelo mais simples que pode ser considerado para representar moléculas longas e flexíveis, sendo particularmente indicado para valores reduzidos de l_k/L . Considerando o esforço computacional necessário para representar com maior realismo a estrutura e conformação de moléculas de grandes dimensões, e tendo em conta que é necessário gerar estas estruturas e conformações um elevado número de vezes, a abordagem FJC foi assim com naturalidade escolhida para representar as moléculas estudadas neste capítulo.

Para uma FJC, a distância média entre as extremidades da cadeia, $\langle h^2 \rangle^{1/2}$, é a forma mais simples de definir as suas dimensões, e pode ser demonstrado que é dada por $n_k^{1/2} l_k$ [78, 95]. O valor de $\langle h^2 \rangle^{1/2}$ pode ser relacionado com o raio de giração da molécula, r_g , que pode ser determinado experimentalmente. Para uma molécula, contendo N átomos cada um com uma massa m_i , e posicionados a uma distância $(\vec{r}_i - \vec{r}_{cm})$ do centro de massa da molécula, o raio de giração instantâneo, r_g^* , é dado por:

$$(r_g^*)^2 = \frac{\sum_{i=1}^N m_i (\vec{r}_i - \vec{r}_{cm})^2}{\sum_{i=1}^N m_i} \quad (4.1)$$

onde \vec{r}_i representa as coordenadas do ponto i , \vec{r}_{cm} representa as coordenadas do centro de massa da molécula.

Para o caso de uma representação FJC equivalente, as várias massas atómicas são substituídas por $n_k + 1$ massas pontuais iguais, e dado que a estrutura da molécula se encontra em constante alteração, é o raio de giração médio, obtido a partir de um elevado número de simulações, a quantidade que se relaciona com os valores experimentais de r_g . Essa média é dada por:

$$r_g^2 = \langle r_g^* \rangle^2 = \frac{1}{n_k + 1} \sum_{i=1}^{n_k+1} \langle (\vec{r}_i - \vec{r}_{cm})^2 \rangle \quad (4.2)$$

Independentemente do número de segmentos, uma FJC apresenta um raio de giração, r_g , dado por [78]:

$$r_g = l_k \sqrt{\frac{n_k(n_k + 2)}{6(n_k + 1)}} \quad (4.3)$$

Para o caso limite de um elevado número de segmentos, n_k , uma FJC é chamada de cadeia Gaussiana e o raio de giração é obtido por:

$$r_g = \frac{n_k^{1/2} l_k}{\sqrt{6}} = \frac{\langle h^2 \rangle^{1/2}}{\sqrt{6}} \quad (4.4)$$

4.2.2 Estimativa das dimensões das moléculas reais

Para especificar as dimensões da cadeia FJC é necessário determinar as dimensões das moléculas reais. Apesar da distância entre as extremidades das cadeias, $\langle h^2 \rangle^{1/2}$, ter já sido determinadas por AFM [97], existe pouca informação na literatura sobre esta quantidade. Dados experimentais para o raio de giração, obtidos por “light scattering”, ou por quantidades que podem ser relacionadas com r_g , nomeadamente coeficientes de difusão e valores de comprimento de persistência, são a principal fonte de informação. Os principais desenvolvimentos na temática da modelação molecular têm como um

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

dos principais objetivos estabelecer relações entre r_g e o raio hidrodinâmico, r_s , permitindo assim o cálculo de r_g a partir de r_s ou de coeficientes de difusão, D_∞ , que se podem relacionar com r_s através da equação de Stokes-Einstein:

$$D_\infty = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_s} \quad (4.5)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e η é a viscosidade do solvente. Valores experimentais para D_∞ estão em regra disponíveis na literatura. Para o caso de uma cadeia Gaussiana, num solvente “theta” (que é um solvente onde os efeitos do volume excluído são contrabalançados pelas interações entre os monómeros e o solvente), o raio de giração pode ser calculado a partir do raio hidrodinâmico, através do modelo de Zimm [78, 86, 87]:

$$D_\infty = \frac{8}{3\sqrt{6}\pi^3} \frac{k_B T}{\eta l_k n_k^{1/2}} \Rightarrow \frac{r_g}{r_s} = \frac{8}{3\sqrt{\pi}} = 1.505 \quad (4.6)$$

Num bom solvente, estima-se igualmente que [78, 98]:

$$D_\infty = 0.0829 \frac{k_B T}{\eta r_g} \Rightarrow \frac{r_g}{r_s} = 6\pi(0.0829) = 1.563 \quad (4.7)$$

Como se pode ver a diferença entre os valores do rácio r_g/r_s calculados pelas equações 4.6 e 4.7 é pequena (< 5%), e assim as duas equações podem ser usadas para estimar r_g . No entanto, deve ser realçado que estas equações são apenas válidas para cadeias Gaussianas. Quando o número de segmentos é pequeno, ou mais precisamente, quando o rácio entre o comprimento dos segmentos e o comprimento do contorno, l_k/L , não é pequeno o suficiente para que se possa considerar a cadeia como uma cadeia Gaussiana, o modelo de cadeias “worm-like” (WLC) [78, 99] é preferível. Uma cadeia WLC é representada por uma linha espacial com curvatura constante, sendo assim portanto distinta da abordagem FJC, que é formada por segmentos retilíneos. A rigidez deste tipo de cadeias é dada pelo chamado comprimento de persistência, a . Quando o contorno da cadeia é igual a este valor, uma cadeia WLC é semelhante a uma linha quase reta, mas quando L é suficientemente grande a cadeia tem a conformação de uma cadeia Gaussiana, em que $l_k = 2a$ [96, 78, 100]. O modelo WLC foi originalmente proposto por Kratky e Porod [101]. A distância média entre as extremidades e o raio de giração de uma cadeia WLC são funções do contorno do polímero e do comprimento de persistência [78]:

$$\langle h^2 \rangle^{1/2} = (2a)^{1/2} [L + a(e^{-L/a} - 1)]^{1/2} \quad (4.8)$$

e o raio de giração:

$$r_g = a \left[\frac{L}{3a} - 1 + \frac{2a}{L} - 2 \left(\frac{a}{L} \right)^2 (1 - e^{-L/a}) \right]^{1/2} \quad (4.9)$$

A dependência do rácio $\langle h^2 \rangle^{1/2}/r_g$ com L/a está indicada na figura 4.1. Como se pode verificar, para $L/a = 10$ a diferença entre o rácio e o valor assintótico dado pela equação 4.4 é de apenas 10%. Pode-se assim concluir que existe uma clara semelhança entre os modelos WLC e FJC para L/a superior a ~ 10 . Apesar de em regra os valores que se encontram na literatura serem obtidos a partir de valores experimentais de r_g , o comprimento de persistência pode ser obtido independentemente por medições de “force-extension” [97, 102].

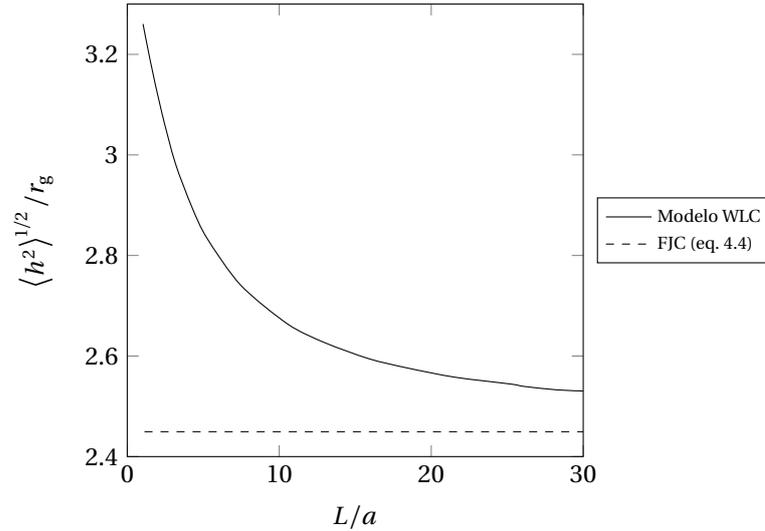


Figura 4.1: Dependência teórica do rácio $\langle h^2 \rangle^{1/2} / r_g$ com L/a para o modelo WLC. Comparação com o modelo FJC.

4.2.3 Determinação das dimensões das cadeias

Para o tipo de moléculas estudadas neste capítulo, dextranos e DNA linear de dupla cadeia, a principal fonte de informação para determinar as suas dimensões resulta dos seus coeficientes de difusão, que podem ser relacionados com r_s através da equação 4.5. Para dextranos pode-se usar a seguinte equação, que relaciona r_s com a massa molecular, M_w [92]:

$$r_s = 0.0282(M_w)^{0.47752} \quad (4.10)$$

com r_s em nm e M_w em Da. Assim, para o dextrano T2000, que tem uma massa molecular de 2×10^6 Da, $r_s = 28.8$ nm, $r_g = 45$ nm (pela equação 4.7) e $\langle h^2 \rangle^{1/2} = 110$ nm (pela equação 4.4).

Para o caso do DNA linear de dupla cadeia, a dependência de D_∞ com o número de pares de bases é analisada na figura 4.2. Duas técnicas distintas foram usadas para obter os valores encontrados na literatura, “light scattering” (LS) [103, 104, 105, 106, 107] e “Brownian motion tracking” (BMT) de moléculas marcadas por fluorescência [87, 108, 109, 110]. Contudo, os valores experimentais não são equivalentes, tal como referido por Smith et al [108], que propuseram um fator de $(1.75)^{2/5}$ para corrigir os valores obtidos por BMT. De facto, tal como pode ser visto na figura 4.2, os valores obtidos por BMT têm uma clara tendência para serem inferiores aos que se obtêm por LS, o que provavelmente reflete um efeito da ligação do corante, usado neste técnica, às moléculas de DNA [108]. Usando os valores obtidos por LS e corrigindo os valores obtidos por BMT, a seguinte equação pode ser obtida pelo ajuste aos pontos na figura 4.3.

$$D_\infty = 3.94 \times 10^{-10}(\text{nbp})^{-0.611} \quad (4.11)$$

Usando a equação de Stokes-Einstein obtém-se:

$$r_s = 6.27 \times 10^{-10}(\text{nbp})^{0.611} \quad (4.12)$$

Para o plasmídeo *pUC19*, $\text{nbp} = 2686$, e assim $r_s = 77.9$ nm, $r_g = 122$ nm e $\langle h^2 \rangle^{1/2} = 298$ nm. Estes valores podem ser comparados com os que se obtêm por uma abordagem diferente, usando o modelo WLC, que é regularmente aplicado ao DNA (uma vez que é uma molécula com alguma rigidez). Para

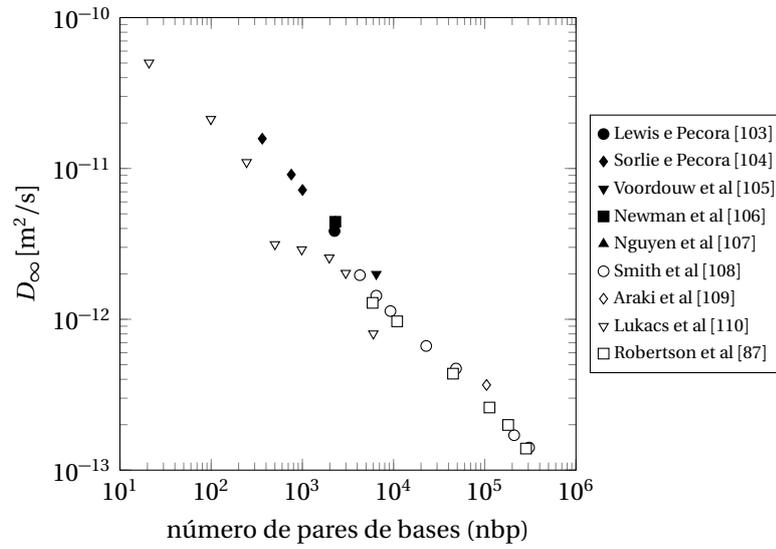


Figura 4.2: Valores, encontrados na literatura, para o coeficiente de difusão de DNA linear de dupla cadeia em função do número de pares de bases, obtidos por “light scattering”, LS, (a preto) e por “Brownian motion tracking”, BMT, (a branco).

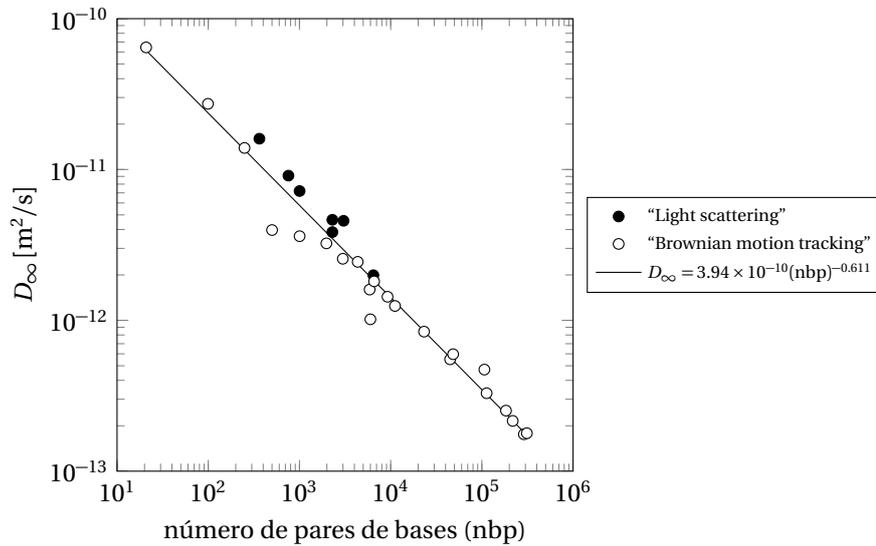


Figura 4.3: Ajuste da equação 4.11 aos valores do coeficiente de difusão de DNA linear de dupla cadeia (ver figura 4.2), encontrados na literatura. Os valores obtidos por “Brownian motion tracking” (BMT) já se apresentam corrigidos segundo a recomendação de Smith et al [108] (ver texto).

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

isso é necessário estimar o comprimento do contorno e o comprimento de persistência. O comprimento de persistência do DNA linear de dupla cadeia não é constante; varia consideravelmente com a força iônica. Podem ser distinguidas duas zonas de variação [100]: para valores até 10 mM, verifica-se uma acentuada diminuição do comprimento de persistência com o aumento da força iônica (soluções contendo Na^+) com valores na ordem dos 80–100 nm a serem indicados nesta zona. No entanto, acima de 10 mM a taxa de decréscimo abranda, sendo encontrados na literatura valores entre 45 e 50 nm para uma gama alargada de forças iônicas [59, 100, 102, 111, 112]. Este efeito pode estar relacionado com a repulsão eletrostática entre os grupos fosfato na cadeia de DNA. De acordo com esta ideia, verifica-se que íons Mg^{2+} produzem um efeito muito maior na redução do comprimento de persistência do DNA [100]. Em relação ao comprimento do contorno, ele pode ser facilmente estimado a partir do valor da altura da dupla hélice do B-DNA por par de bases, igual a 0.34 nm [84], multiplicado pelo número de pares de bases da molécula, que no caso do plasmídeo *pUC19* resulta num comprimento do contorno igual 913 nm, uma vez que este plasmídeo tem 2686 bp. Assim, usando o valor aproximado $a = 50$ nm obtém-se, usando as equações 4.8 e 4.9, $r_g = 114$ nm e $\langle h^2 \rangle^{1/2} = 294$ nm para o *pUC19* linear. Estes valores estão em boa concordância com os valores obtidos pela abordagem FJC.

4.2.4 Coeficientes de partição

O passo seguinte no desenvolvimento do modelo passa por estimar os coeficientes de partição à entrada dos poros. Para simular a partição, desenvolve-se neste capítulo um método de Monte-Carlo baseado no método descrito por Davidson et al [79]. O método consiste na determinação da distribuição radial da probabilidade da molécula entrar no interior do poro, com essa distribuição a ser obtida através de simulações estocásticas em 10 posições radiais diferentes, mais o centro do poro. Assim, após gerar a molécula, o centro de massa é colocado numa determinada posição radial, e é testado se a projeção de todos os pontos (massas pontuais) no plano da superfície da membrana, se encontra no interior do poro. Apenas nessa situação é assumido que a molécula entra no poro. Neste capítulo o procedimento é ligeiramente alterado para permitir ter em conta a flexibilidade das cadeias e a possibilidade de ocorrência de deformação imposta pelo efeito de sucção à entrada dos poros. Assim, após a geração da estrutura tridimensional da molécula, a única obrigatoriedade para que haja permeação é que a projeção da parte inferior da molécula (isto é, a massa pontual mais próxima da membrana) esteja dentro do poro. Isto significa que se a parte inferior da molécula tem acesso ao poro, toda a molécula será forçada a entrar no mesmo devido aos efeitos de sucção. Caso contrário a molécula difunde de novo para o seio da solução. Após realizar um elevado número de testes, obtém-se uma distribuição de probabilidade radial, e o coeficiente de partição, Φ , é calculado por integração radial, de acordo com [79], pela seguinte expressão:

$$\Phi = 2 \int_0^1 p(\beta) \beta d\beta \quad (4.13)$$

onde β é a coordenada radial adimensional (r/r_p), e r_p é o raio do poro. Os resultados das simulações estão representados na figura 4.4, pela representação dos valores obtidos de Φ em função de n_k para vários valores de L/r_p . Uma vez que o raio de giração pode ser calculado a partir de n_k e l_k , com este último a ser obtido a partir de L e n_k , podem-se representar os resultados das simulações colocando $\ln \Phi$ em função de $\ln(\lambda_h)$, sendo λ_h definido pelo rácio $\langle h^2 \rangle^{1/2} / r_p$ (ver figura 4.5). Como se pode constatar, existe uma evidente correlação entre $\ln(\lambda_h)$ e $\ln(\Phi)$. Dado que λ_h pode ser relacionado com λ_g ou com λ_s (r_g/r_p e r_s/r_p respetivamente) através das equações 4.7 e 4.9, é possível assim relacionar Φ com λ_g ou λ_s . Para obter um ajuste aos valores apresentados na fig 4.5, usou-se o software *SPSS/TableCurve2D v.5.0*. Uma função cumulativa SDS (dupla sigmoideal simétrica) foi a que revelou ser a

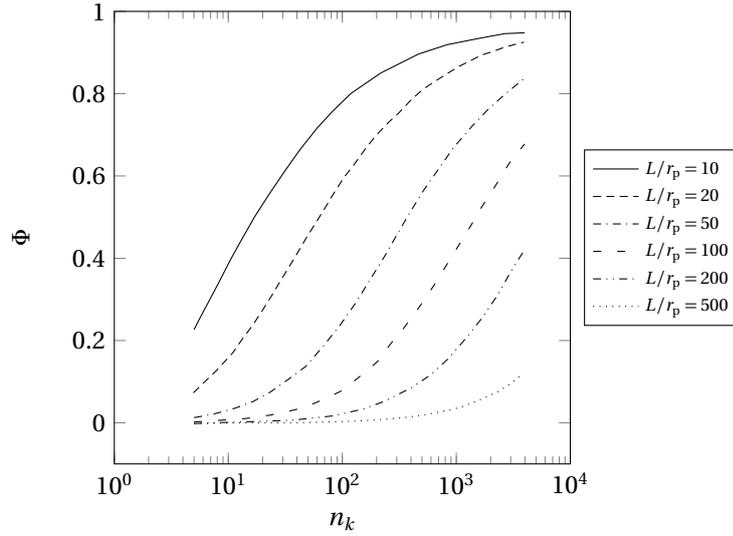


Figura 4.4: Coeficiente de partição, em condições de filtração, em função de n_k para vários valores de L/r_p .

mais apropriada para este fim (equação 4.14), tendo-se obtido um coeficiente de correlação de 0.998. A equação obtida permite assim relacionar Φ com as dimensões da cadeia representadas por $\langle h^2 \rangle^{1/2}$:

$$\ln(\Phi) = a_0 + \frac{a_1}{2a_3} \left\{ 2a_4 \ln \left[\exp \left(\frac{x + a_3/2}{a_4} \right) + \exp \left(\frac{a_2}{a_4} \right) \right] - 2a_4 \ln \left[\exp \left(\frac{a_2 + a_3/2}{a_4} \right) + \exp \left(\frac{x}{a_4} \right) \right] + a_3 \right\} \quad (4.14)$$

$$a_0 = -11.60; a_1 = 11.53; a_2 = 3.955; a_3 = -5.520; a_4 = -0.613$$

$$x = \ln(\lambda_h); \lambda_h = \frac{\langle h^2 \rangle^{1/2}}{r_p}$$

A equação 4.14 pode ser comparada com dois casos limites da permeação de moléculas lineares sem o efeito de sucção; o de uma cadeia Gaussiana com segmentos infinitesimalmente pequenos [113], e o caso de uma cadeia retilínea fina [114]. A comparação com os resultados obtidos está representada na figura 4.5, onde é bem visível o efeito da sucção nos coeficientes de partição.

Um procedimento distinto foi proposto anteriormente [63], em que se assume uma condição diferente para a entrada de uma molécula flexível num poro, considerando que ocorre deformação induzida pelo fluxo. É considerado que a molécula segue de forma exata a deformação induzida pelo fluxo se as tensões de corte excederem um determinado valor. Este princípio foi desenvolvido mais recentemente [59, 60, 30] para prever o fluxo crítico, a partir do qual a permeação de moléculas de plasmídeo aumenta de valores pouco significativos para valores consideráveis, tal como referido na secção 1.3.2.

4.2.5 Estimativa da permeação dos solutos

Após concluída a determinação dos coeficientes de partição, a próxima fase no desenvolvimento do modelo passa por estimar as permeações intrínsecas. Esta determinação pode constituir um problema complexo caso λ_s (ou λ_h) tenham valores pequenos. No entanto, para moléculas flexíveis com tamanhos muito superiores ao do poro, o problema pode ser consideravelmente simplificado assumindo que durante a passagem pelo poro estas moléculas ocupam na totalidade a sua área de secção

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

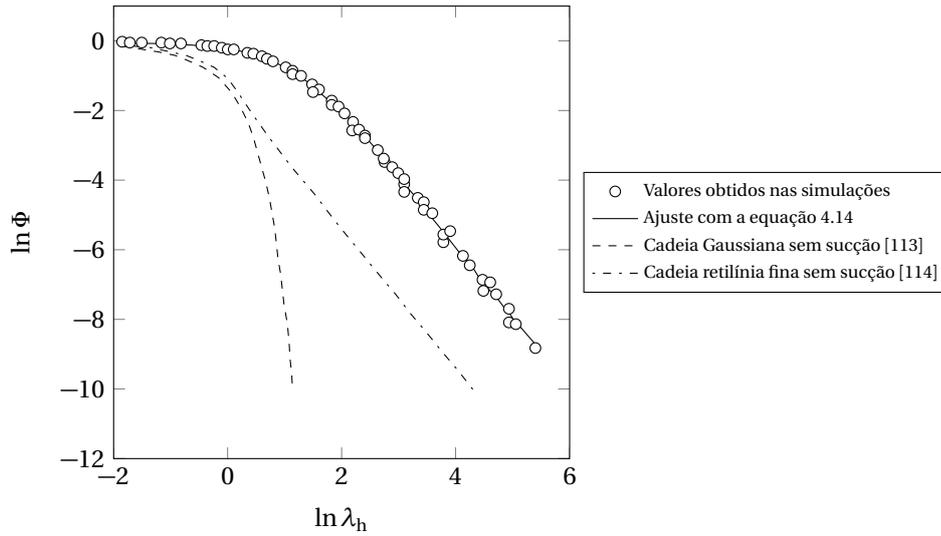


Figura 4.5: Coeficiente de partição em função de λ_h (está representado o logaritmo de ambas as quantidades). Comparação com os valores que se obtêm para uma cadeia Gaussiana com segmentos infinitesimalmente pequenos [113] e para uma cadeia retilínea fina [114].

reta. Isto significa que a difusão é muito restringida, o que implica que o transporte de massa se dê exclusivamente por convecção. Na ausência de difusão, a permeação intrínseca é independente do fluxo e dada por (ver capítulo 2):

$$S_m = \Phi K_c \quad (4.15)$$

onde S_m é a permeação intrínseca, Φ é o coeficiente de partição e K_c é o fator de impedimento convectivo [43]. No entanto, como a molécula ocupa toda a área de secção reta do poro, a velocidade do soluto deverá ser igual à velocidade média do solvente, o que implica que $K_c \rightarrow 1$. Assim, apenas para o caso de moléculas flexíveis com dimensões muito superiores às do poro, obtém-se:

$$S_m = \Phi \quad (4.16)$$

Uma vez que esta quantidade é uma permeação intrínseca, ela pode ser relacionada com a concentração do soluto no permeado, C_p , e com a concentração de soluto junto à membrana, C_m :

$$S_m = \frac{C_p}{C_m} \quad (4.17)$$

Para estimar a permeação observada, que é dada por:

$$S_{\text{obs}} = \frac{C_p}{C_b} \quad (4.18)$$

onde C_b é a concentração do soluto no seio da solução, pode-se usar a seguinte relação, que se obtém a partir do modelo do filme [115] (secção 2.4):

$$S_{\text{obs}} = \frac{S_m}{S_m + (1 - S_m) \exp(-J_V/k)} \quad (4.19)$$

onde J_V representa o fluxo de permeado e k é o coeficiente de transferência de massa, que pode ser estimado pelo método desenvolvido na próxima secção.

4.3 Materiais e métodos

O dextrano T2000 foi adquirido da *Pharmacia*, atualmente comercializado pela empresa *Pharmacosmos*. Este dextrano apresenta um grau de ramificação inferior a 5%, de acordo com o fabricante. O plasmídeo *pUC19* foi obtido por fermentação, e foi isolado e purificado de acordo com o método descrito em [17]. O plasmídeo obtido, na isoforma super-enrolada, foi linearizado pela ação da enzima *SmaI* (*Takara Bio Inc.*). Após digestão com a enzima, a qualidade da preparação de plasmídeo foi analisada por eletroforese em gel de agarose (AGE). A enzima foi removida, antes de se iniciarem os ensaios, por cromatografia de exclusão molecular (SEC), em que se usou o gel *Sephacryl HR-S100* da *GE Healthcare*, numa coluna com 1.5 cm × 20 cm, a um caudal de 1 mL/min e a 25°C. A fase móvel utilizada foi tampão Tris/HCl 10 mM, a pH 8.00. Antes dos ensaios de filtração, adicionaram-se 0.15 M de NaCl às soluções de plasmídeo, para minimizar eventuais efeitos de carga. Uma solução semelhante foi usada no caso do dextrano T2000. A concentração dos solutos nas soluções testadas foi 1 g/L para o caso do dextrano e 20 mg/L no caso do plasmídeo.

Os ensaios de filtração foram realizados na célula de filtração Amicon 8010 (*Millipore*), que tem uma geometria “dead-end” e 10 mL de capacidade. A velocidade de agitação foi ajustada com calibração prévia. O fluxo de permeado foi controlado pela ação de uma bomba peristáltica da *ISMATEC*, modelo *ISM444*, que tem 8 cilindros rotativos o que assegura um fluxo praticamente não pulsado. Com esta bomba e com um tubo apropriado, conseguem-se obter caudais muito reduzidos, o que possibilita minimizar os efeitos de polarização de concentração, que caso contrário poderiam dificultar a análise dos resultados experimentais, especialmente tendo em conta os reduzidos coeficientes de difusão dos solutos testados.

As membranas usadas foram duas membranas “track-etched” de policarbonato (TEPC) da *Sterlitech*, com raios de poro de 15 e 40 nm (valores nominais), uma membrana de poliacrilonitrilo da *Millipore*, com “cut-off” de 300 kDa (XM300) e uma membrana de PVDF da *DSS/Alfa-Laval*, com 100 kDa de “cut-off” (FS40PP). As membranas XM300 e FS40PP foram previamente caracterizadas com solutos de referência pelo modelo dos poros simétricos (SPM), descrito em [47], tendo-se obtido, respetivamente, os valores de 10.5 e 4.1 nm para os raios de poro.

Para estimar os coeficientes de transferência de massa, k , usou-se a seguinte relação, válida para a célula de filtração usada [48, 55]:

$$\frac{k r_{\text{cell}}}{D_{\infty}} = 0.23 \left(\frac{\omega r_{\text{cell}}^2 \rho}{\eta} \right)^{0.567} \left(\frac{\eta}{\rho D_{\infty}} \right)^{0.33} \quad (4.20)$$

onde D_{∞} é o coeficiente de difusão, ω é a velocidade de agitação (rad/s), ρ é a densidade, η é a viscosidade e r_{cell} é o raio da célula de filtração. Para evitar ter que determinar a viscosidade e a densidade das soluções assume-se que:

$$k = A\omega^{0.567} \quad (4.21)$$

onde A é uma constante para uma dada solução. Assim, usando a equação 4.19 na forma:

$$\ln\left(\frac{1-S_{\text{obs}}}{S_{\text{obs}}}\right) = \ln\left(\frac{1-S_{\text{m}}}{S_{\text{m}}}\right) - \frac{J_V}{k} \quad (4.22)$$

a constante de proporcionalidade “ A ” pode ser obtida, para as soluções de plasmídeo e de dextrano, através do gráfico de $\ln\left(\frac{1-S_{\text{obs}}}{S_{\text{obs}}}\right)$ vs $\omega^{-0.567}$.

As permeações do dextrano T2000 (e dos solutos de referência usados para efetuar a caracterização das membranas) foram determinadas usando um detetor de índice de refração da *Shodex*, modelo *RI-*

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

71, injetando diretamente as amostras. O detetor foi previamente calibrado para cada soluto. Obtém-se uma excelente seletividade e reprodutibilidade com este método. As permeações do plasmídeo foram determinadas por medição da absorvância a 260 nm, usando um espectrofotômetro da *Pharmacia Biotech*, modelo *Ultrospec 3000*. Cada amostra de permeado foi obtida pela filtração de 10 mL da solução inicial; os primeiros 0.5 mL de filtrado foram recolhidos para um primeiro eppendorf para serem descartados, e o seguinte 1 mL recolhido para outro eppendorf para ser analisado (resultando assim num volume total de permeado de 1.5 mL). O número de replicados para cada conjunto de condições experimentais variou consoante o grau de dispersão dos resultados. As várias repetições resultaram na obtenção de valores médios de S_{obs} com uma precisão de no mínimo ± 0.1 , com 95% de confiança.

Deve ser notado que as membranas foram escolhidas de acordo com as simulações feitas previamente, estimando S_m pelo modelo e por estimativa dos parâmetros da equação 4.20 para obter k . No entanto, só após determinação experimental da constante “A” na equação 4.21, se obtiveram previsões satisfatórias de S_{obs} .

4.4 Resultados e discussão

Os valores experimentais da constante “A” (equação 4.21), necessários para efetuar o cálculo dos coeficientes de transferência de massa no caso do dextrano T2000 e do plasmídeo *pUC19* linear, foram determinados variando a velocidade de agitação entre 60 e 300 min^{-1} . Para o dextrano obteve-se $A = 1.04 \times 10^{-7} (\text{rad/s})^{-0.567}$, e para o plasmídeo $A = 6.87 \times 10^{-8} (\text{rad/s})^{-0.567}$. Estes valores foram assim usados para a determinação de S_{obs} , a partir dos valores de S_m , de acordo com a equação 4.19. A estimativa dos valores de S_m foi feita com a equação 4.16, a partir dos valores de Φ obtidos pela equação 4.14.

Para as membranas de ultrafiltração, FS40PP e XM300, o tamanho médio do poro foi obtido pela determinação das permeações de solutos de referência, tal como referido na secção anterior. Para as membranas TEPC, a caracterização não foi necessária uma vez que a distribuição de tamanhos de poro é aproximadamente conhecida [116]. Esta informação foi usada nos cálculos, assumindo uma distribuição log-normal de tamanho de poro.

Os resultados dos ensaios de filtração para o dextrano nas diferentes membranas testadas, a 60 e a 100 min^{-1} , estão representados na figura 4.6. No mesmo gráfico estão também representadas as previsões teóricas obtidas pelo modelo desenvolvido. Apesar dos resultados mostrarem alguma tendência para sobrestimar as permeações, o modelo prevê com algum sucesso o tamanho de poro para o qual ocorrem permeações intermédias. As permeações reduzidas obtidas com a membrana FS40PP ($r_p = 4.1 \text{ nm}$) a baixas velocidades de agitação e as permeações elevadas no caso da membrana TEPC 0.08 μm ($r_p = 40 \text{ nm}$) foram satisfatoriamente previstas pelo modelo. Para o plasmídeo, as previsões estão em melhor concordância com os resultados experimentais (figura 4.7). Este facto pode estar relacionado com o melhor conhecimento das propriedades físicas desta molécula, como por exemplo a massa molecular, que está melhor definida quando em comparação com o dextrano. Sabe-se que, em regra, os dextransos apresentam alguma polidispersividade. Para investigar melhor esta possibilidade, e para o caso da membrana XM300, foi simulada a polidispersividade assumindo uma mistura de dextransos com massas moleculares entre 600 e 3400 kDa, com distribuição log-normal, o que resulta numa polidispersividade de 1.3 e massa molecular média (em peso) de 2000 kDa, que se podem considerar valores típicos para dextransos lineares, de acordo com os dados apresentados em [117]. Como se pode ver na figura 4.6, um possível efeito da polidispersividade não parece ser responsável pelos desvios observados. Pode-se observar também que as permeações não aumentam de forma substancial, da forma como seria esperado, com o aumento do fluxo. Esta tendência sistemática sugere que

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

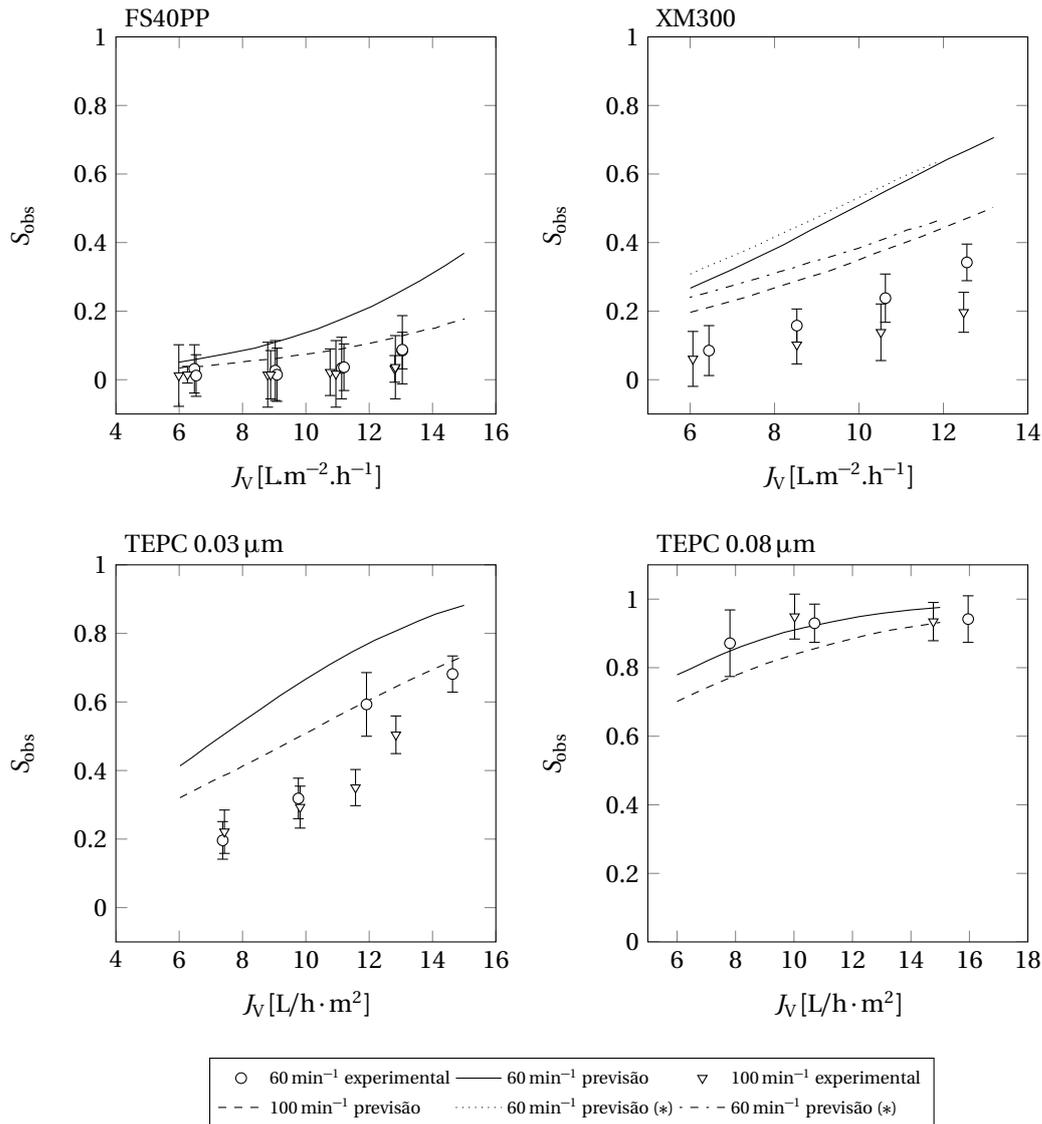


Figura 4.6: Resultados experimentais e previsões teóricas da permeação observada (S_{obs}) do dextrano T2000 nas diferentes membranas testadas. (*) Previsão contabilizando o efeito da polidispersividade (ver texto).

possam ocorrer outros efeitos, com influência nas permeações, que não são contabilizados no modelo desenvolvido. Ainda assim, pelos resultados obtidos, é possível afirmar que o modelo proposto para a estimativa das permeações, para o caso de moléculas longas e flexíveis, é relativamente preciso, confirmando assim a possibilidade de se usar a equação 4.16. A ideia de que, para as condições estudadas, a convecção será o mecanismo de transferência de massa dominante, fica igualmente confirmada. Este importante resultado está de acordo com os resultados obtidos por Stein et al [118] no estudo do transporte de moléculas individuais de DNA através de canais nanofluídicos. Os autores determinaram a velocidade de moléculas de DNA com 8.8, 20.3 e 48.5 kbp através de canais com dimensões comparáveis (em termos de ordem de grandeza; 175–3800 nm) quando sujeitas a um fluxo convectivo. Os resultados mostram claramente uma dependência linear entre a velocidade das moléculas e o gradiente de pressão ao longo do canal, e que para canais estreitos não existe dependência da velocidade com o tamanho molecular. Adicionalmente, só acima de uma certa altura dos canais é que começam a aparecer diferenças nas velocidades das moléculas, e para moléculas maiores observaram-se velocidades mais elevadas. Estes resultados mostram que deverá ser aceitável considerar que moléculas grandes e flexíveis, ao permearem em poros de pequenas dimensões como os que se verificam em

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

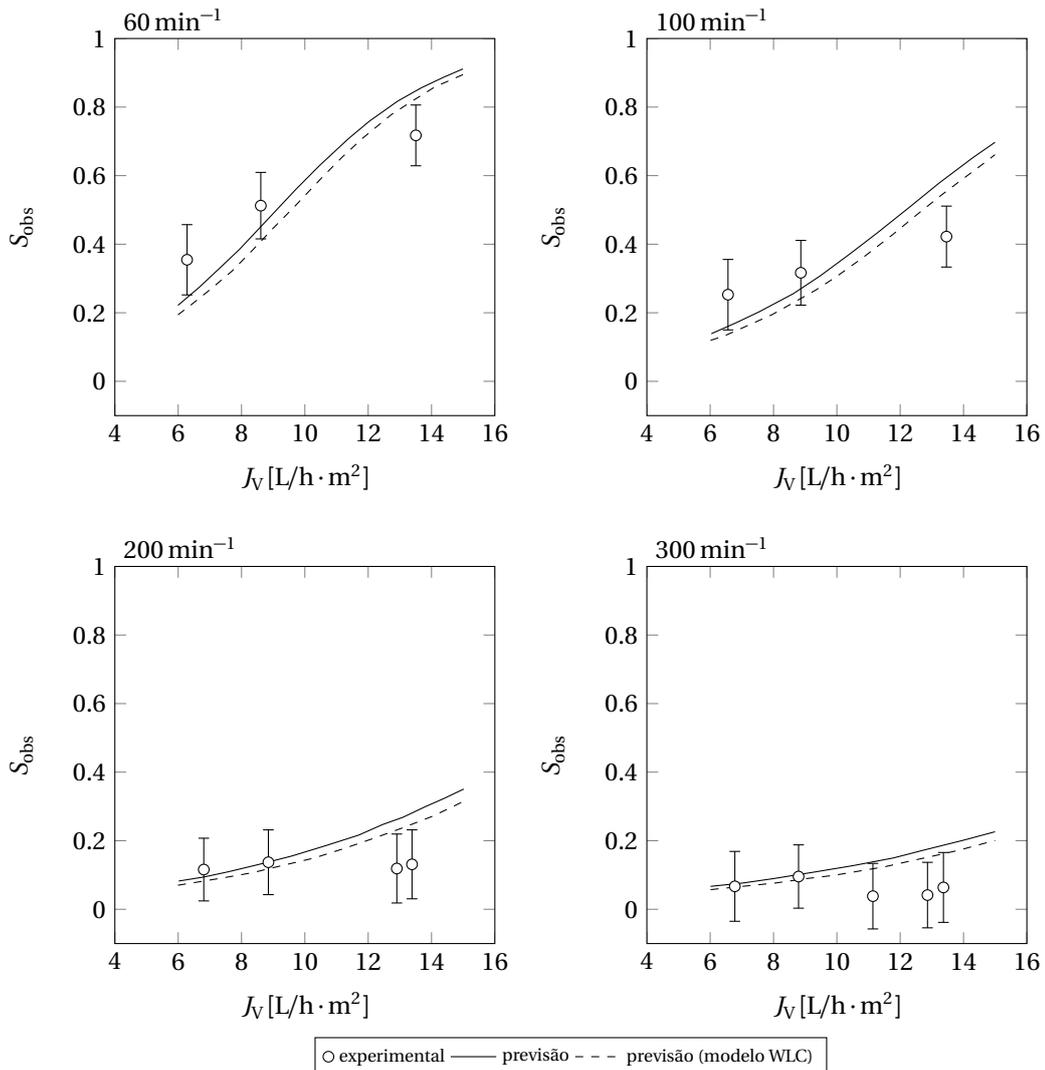


Figura 4.7: Resultados experimentais e previsões teóricas da permeação observada (S_{obs}) do plasmídeo *pUC19* na membrana TEPC 0.03 μm , para diferentes velocidades de agitação. É feita uma comparação entre as previsões feitas com diferentes estimativas de $\langle h^2 \rangle^{1/2}$: através de valores de coeficiente de difusão ($\langle h^2 \rangle^{1/2} = 270$ nm) e através do modelo WLC ($\langle h^2 \rangle^{1/2} = 294$ nm).

membranas, deverão ocupar a totalidade da área de secção reta dos mesmos, e assim moverem-se com a velocidade média do solvente. Isto significa que o fator de impedimento convectivo é igual a 1, e a permeação intrínseca para solutos flexíveis pode ser identificada com o coeficiente de partição.

4.5 Conclusões

Neste capítulo foi desenvolvido um modelo simples para prever a permeação de duas moléculas lineares de elevada massa molecular, o dextrano T2000 e o plasmídeo *pUC19*, assumindo que o mecanismo de transporte dominante é a convecção. Para a aplicação do modelo, foram estimados coeficientes de partição usando um método de Monte-Carlo, em que se inclui o efeito de sucção à entrada do poro. Para gerar as moléculas foi utilizado o modelo de cadeias de ligação livre (FJC).

Os coeficientes de partição foram obtidos em função do rácio da distância média entre as extremidades da cadeia ($\langle h^2 \rangle^{1/2}$) e o raio do poro. Para estimar $\langle h^2 \rangle^{1/2}$, os coeficientes de difusão (ou os raios hidrodinâmicos) das moléculas têm que ser conhecidos. Para o caso de plasmídeos lineares propôs-se

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

uma correlação a partir de dados recolhidos na literatura. Tal como previsto pelo modelo, observou-se que ambas as moléculas estudadas permeiam através de poros com dimensões muito inferiores aos seus raios de giração, tendo-se obtido excelentes previsões no caso do plasmídeo. Os coeficientes de transferência de massa dos solutos foram calculados pela relação $k = A\omega^{0.567}$, com os valores da constante “A” a serem determinados experimentalmente para cada soluto. Para o caso do dextrano, as permeações determinadas experimentalmente são em regra mais baixas que as previstas pelo modelo, especialmente a fluxos mais elevados. Esta mesma tendência pode ser observada também para o plasmídeo, sendo no entanto os desvios menores e dentro do erro experimental. Assim, tendo em conta a simplicidade do modelo desenvolvido, e o facto de este poder ser facilmente aplicado na prática, uma vez que não é necessário saber *a priori* nenhum parâmetro difícil de obter experimentalmente, pode-se considerar positiva a sua aplicação.

Capítulo 5

Ultrafiltração de DNA plasmídico: Modelação e aplicação

O trabalho descrito neste capítulo foi publicado na revista *Journal of Membrane Science* [65].

5.1 Introdução

Tal como referido no capítulo 1, os processos de separação com membranas têm vindo a ser estudados no âmbito da purificação de DNA plasmídico. Dado o elevado número de possíveis aplicações destes processos [31], é desejável entender melhor a forma como estas biomoléculas permeiam através de matrizes porosas. A formulação de modelos matemáticos com capacidade de previsão da seletividade e desempenho deste tipo de processos são uma mais valia nas fases de desenvolvimento, otimização e controlo. Em termos de geometria molecular, os plasmídeos são moléculas circulares, longas e flexíveis, capazes de adotar estruturas super-enroladas, dependendo das propriedades do meio. Sendo moléculas longas e flexíveis, os plasmídeos apresentam um comportamento de permeação, através de poros de pequenas dimensões, completamente distinto do que se verifica com moléculas de maior rigidez molecular, cuja permeação se assemelha ao comportamento de esferas rígidas (isto é, não passíveis de sofrer deformação).

A teoria do transporte restringido de solutos através de poros de pequenas dimensões permitiu obter modelos, especialmente no caso em que os solutos são modelados como esferas rígidas, com excelente capacidade de previsão de resultados experimentais [43, 44, 47]. No entanto, estes modelos não podem ser utilizados para prever a permeação de moléculas de pDNA. De facto a possibilidade de deformação da geometria destas moléculas faz com que permeiem de forma significativa em poros cujas dimensões são consideravelmente inferiores aos seus raios hidrodinâmicos [35, 59, 60, 58]. A aplicação dos modelos de esferas rígidas neste caso produz o natural resultado de ausência de permeação. Tal como referenciado na secção 1.3.2, existem vários modelos na literatura com o intuito de prever o fluxo máximo a partir do qual a deformação das moléculas de plasmídeo é suficientemente alta para que estas permeiem através de poros de menores dimensões [59, 60, 62, 63].

Sendo moléculas altamente carregadas, os plasmídeos apresentam também variações na sua permeação com a força iónica do meio [61, 62]. Nestes estudos observou-se um aumento da permeação com o aumento da força iónica, mesmo utilizando membranas essencialmente sem carga. Este fenómeno foi atribuído a alterações conformacionais das moléculas de pDNA provocadas pela redução das interações eletrostáticas entre os seus grupos fosfato, com o aumento da força iónica, levando assim à obtenção de moléculas mais compactas [61].

O método desenvolvido no Capítulo 4 segue uma abordagem diferente, na qual para além da existência de deformação induzida pelo fluxo, é necessário que a molécula possua uma conformação e orientação, adequadas quando se aproxima do poro. Um método de Monte-Carlo foi desenvolvido para estimar a probabilidade da ocorrência de permeação, em condições de filtração, probabilidade essa que pode ser identificada com o coeficiente de partição à superfície da membrana (Φ). Para obter os valores de Φ , as moléculas foram modeladas como cadeias de ligação livre (FJC), tendo-se obtido uma relação entre Φ e λ_h , onde λ_h é o rácio da distância entre as extremidades da cadeia e o raio do

poro, $\langle h^2 \rangle^{1/2}/r_p$. Alternativamente pode-se calcular Φ em função de λ_g , onde λ_g representa o rácio entre o raio de giração e o raio do poro, r_g/r_p . A aplicabilidade do modelo foi testada com dois polímeros lineares: um dextrano e uma molécula de DNA plasmídico na isoforma linear, obtida pela ação de uma enzima de restrição [64].

No estudo desenvolvido neste capítulo, pretende-se obter um modelo para a previsão da permeação de DNA plasmídico, na sua isoforma super-enrolada. Dois modelos básicos de representação da estrutura destas moléculas são aqui discutidos: o modelo de cadeias fechadas segmentadas (CSC) e o de cadeias FJC. Para além disso, é demonstrado que a equação obtida no capítulo 4, escrita em termos de λ_g pode ser usada para obter Φ no caso da representação CSC. A partir dos valores de Φ estimados, é possível prever as permeações observadas (S_{obs}) através de um modelo de transporte de massa igualmente desenvolvido neste capítulo, no qual os plasmídeos são modelados como poli-eletrólitos. Com o referido modelo é ainda possível prever as variações na permeação com o efeito da força iónica.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Desenvolvimento do modelo de transferência de massa

Para estimar a permeação de um plasmídeo através de uma membrana, na presença de um sal, tem que se considerar um modelo de transporte com, no mínimo, três componentes: o plasmídeo em si, que se considera o componente “1”, sendo ele um poli-anião com carga $-2nbp$, onde nbp representa o número de pares de bases, um anião como Cl^- , considerado o componente “2” e um catião como Na^+ , considerado o componente “3”. As concentrações dos componentes 1 e 2 são normalmente conhecidas no seio da solução a filtrar, $C_{b,1}$ e $C_{b,2}$, e se o componente 3 for considerado o contra-íon de ambos os componentes 1 e 2, a sua concentração pode ser obtida por um simples balanço de cargas. Um balanço semelhante pode ser feito à solução perto da superfície da membrana, considerando que não ocorre adsorção, onde as concentrações das espécies são $C_{m,i}$. Estas concentrações diferem das que se verificam no seio da solução devido à ocorrência de efeitos de polarização de concentração (secção 2.4).

Considera-se que à superfície da membrana os solutos estão distribuídos, entre os poros e a solução, segundo os seus coeficientes de partição. Para o cálculo do coeficiente de partição do plasmídeo, Φ_1 , utiliza-se a equação 4.14 (capítulo 4), com os coeficientes modificados para se obter uma relação entre Φ e λ_g :

$$\ln(\Phi) = a_0 + \frac{a_1}{2a_3} \left\{ 2a_4 \ln \left[\exp \left(\frac{x + a_3/2}{a_4} \right) + \exp \left(\frac{a_2}{a_4} \right) \right] - 2a_4 \ln \left[\exp \left(\frac{a_2 + a_3/2}{a_4} \right) + \exp \left(\frac{x}{a_4} \right) \right] + a_3 \right\} \quad (5.1)$$

$$a_0 = -11.60; a_1 = 11.53; a_2 = 3.955; a_3 = -5.520; a_4 = -0.613$$

$$x = \ln(\lambda_g) + 0.896; \lambda_g = \frac{r_g}{r_p}$$

Todas as membranas usadas neste trabalho foram previamente caracterizadas, quanto aos seus raios de poro, pelo modelo dos poros simétricos (SPM) descrito em Morão et al [47]. Se puder ser considerado que não existem efeitos de carga à superfície da membrana, isto é, se a membrana for essencialmente neutra, o coeficiente de partição do plasmídeo, Φ_1 , pode ser dado pela equação 5.1.

Como discutido no capítulo 4, o mecanismo de transporte dominante, para o caso da permeação de uma molécula de plasmídeo em poros estreitos, deverá ser a convecção (a difusão será desprezável). Considera-se igualmente que durante a passagem do plasmídeo em poros com $r_p < r_s$, estes deverão

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

ocupar a totalidade da área de secção reta dos mesmos. Nestas condições, Φ_1 pode ser identificado com a permeação intrínseca, $S_{m,1}$, que por definição é dada para as várias espécies como:

$$S_{m,i} = \frac{C_{p,i}}{C_{m,i}} \quad (5.2)$$

onde $C_{p,i}$ são as concentrações das espécies no permeado. Os valores de $S_{m,2}$ e $S_{m,3}$ são aqui aproximados a 1, assumindo que os sais considerados não são retidos pela membrana; assim $C_{p,i} = C_{m,i}$ para $i = 2$ e 3 . Para completar o desenvolvimento do modelo matemático a ser usado nos cálculos, podem-se obter uma série de relações entre as concentrações $C_{p,i}$, $C_{m,i}$ e $C_{b,i}$ através da integração numérica da equação estendida de Nernst-Planck (NP) no filme onde ocorre a polarização de concentração [56]:

$$\frac{dC_{y,i}}{dy} = \frac{-z_i C_{y,i} F}{RT} \frac{d\Psi}{dy} + \frac{J_V}{D_i} (C_{y,i} - C_{p,i}) \quad (5.3)$$

onde Ψ é o potencial elétrico e $C_{y,i}$ as concentrações a uma distância $(\delta - y)$ da membrana, sendo δ a espessura da camada de polarização de concentração (secção 2.4). A integração deverá ser feita em condições de eletroneutralidade, o que implica que:

$$\sum_{i=1}^3 z_i \frac{dC_{y,i}}{dy} = 0 \quad (5.4)$$

5.2.1.1 Algoritmo para o cálculo de $C_{p,i}$, $C_{b,i}$ e das propriedades da membrana

O primeiro passo do algoritmo aqui proposto para o cálculo numérico de $C_{p,i}$, consiste em estimar os valores de $C_{m,1}$ e $C_{m,2}$, e calcular o respetivo valor de $C_{m,3}$. A partir destes valores, que se denotam por $C_{m,i}^0$, podem-se estimar as concentrações no permeado: para o caso do plasmídeo, como $\Phi_{C_{m,1}}^0$, e para os componentes 2 e 3, como $C_{m,2}^0$ e $C_{m,3}^0$, respetivamente. Com estes valores de $C_{p,i}$ o sistema de equações diferenciais definido pela equação estendida de Nernst-Planck, juntamente com a equação 5.4, pode ser integrado usando $C_{b,i}$ como condições iniciais ao longo da distância δ , que corresponde à espessura da camada de polarização de concentração. Esta espessura pode ser calculada através da equação:

$$\delta \simeq \frac{D_1}{k_1} \quad (5.5)$$

onde k_1 é o coeficiente de transferência de massa do plasmídeo, que se pode obter através da seguinte correlação válida para as células de filtração usadas neste trabalho [48, 55]:

$$\frac{k r_{\text{cell}}}{D_\infty} = 0.23 \left(\frac{\omega r_{\text{cell}}^2 \rho}{\eta} \right)^{0.567} \left(\frac{\eta}{\rho D_\infty} \right)^{0.33} \quad (5.6)$$

Pode ser então calculada uma nova estimativa para os valores de $C_{m,i}$, que se denotam como $C_{m,i}^1$, e estes valores comparados com os valores estimados anteriormente $C_{m,i}^0$. Usa-se a seguinte função de erro para comparar os dois conjuntos de valores:

$$f(C_{m,i}^0, C_{m,i}^1) = \sum_{i=1}^3 \frac{|C_{m,i}^0 - C_{m,i}^1|}{C_{b,i}} \quad (5.7)$$

O erro absoluto é dividido pela respetiva $C_{b,i}$ uma vez que as concentrações do plasmídeo neste trabalho são sempre muito inferiores às do sal. Para obter os valores corretos de $C_{m,i}$, as estimativas iniciais

para $C_{m,1}$ e $C_{m,2}$ podem ser variadas ao longo de intervalos pré-estabelecidos para permitir encontrar o mínimo de f .

Após obtenção dos valores de $C_{p,i}$, a permeação observada, $S_{obs,i}$, pode assim ser determinada e comparada com os resultados experimentais para o caso do plasmídeo:

$$S_{obs,i} = \frac{C_{p,i}}{C_{b,i}} \quad (5.8)$$

5.2.2 Estimativa do coeficiente de partição do plasmídeo, Φ

Para aplicar o modelo de transferência de massa definido em cima, o coeficiente de partição do plasmídeo tem que ser estimado, e para isso tem que se definir um modelo estrutural para a representação desta molécula. Sendo os plasmídeos moléculas com uma estrutura complexa, é desejável considerar uma forma simplificada de os representar durante a simulação da sua permeação através de membranas. Para isso, duas representações são propostas: a primeira considerando os plasmídeos como cadeias segmentadas fechadas (CSC), e a segunda considerando os plasmídeos como moléculas lineares, usando a abordagem FJC.

5.2.2.1 Abordagem de cadeias segmentadas fechadas (CSC)

O modelo mais simples para representar polímeros circulares é o de cadeias segmentadas fechadas. Uma representação de uma molécula circular pelo modelo CSC pode ser obtido através da geração de uma FJC da molécula linear correspondente com n_k segmentos de comprimento l_k , como descrito no Capítulo 2. Para cada conformação gerada, a possibilidade de permeação é então testada segundo o método descrito no Capítulo 4 para FJC. O processo consiste em alinhar o centro de massa da estrutura com o centro do poro, e mais outras 10 posições radiais. Em seguida, para cada posição radial, se a massa pontual da molécula mais próxima da superfície da membrana ficar projetada no interior do poro, considera-se que ocorre permeação. Repetindo este procedimento um elevado número de vezes, tipicamente acima de 10^5 simulações, pode-se obter uma distribuição radial da probabilidade de permeação, e integrando essa função obtém-se a probabilidade total de permeação, que representa o coeficiente de partição, Φ , do soluto entre a solução junto à membrana e o interior dos poros [79]. Este coeficiente de partição tem que ser visto como um coeficiente de partição dinâmico uma vez que ele é apenas válido em condições de filtração.

O raio de giração de uma molécula modelada como CSC pode ser também diretamente determinado das simulações computacionais previamente descritas. Para isso, em cada geração da molécula calcula-se o raio de giração instantâneo, r_g^* , dado por:

$$(r_g^*)^2 = \frac{1}{n_k + 1} \sum_{i=1}^{n_k+1} (\vec{r}_i - \vec{r}_{cm})^2 \quad (5.9)$$

onde \vec{r}_i representa as coordenadas do ponto i e \vec{r}_{cm} as coordenadas do centro de massa da estrutura. A equação 5.9 é válida para uma cadeia com massas pontuais todas iguais (isto é, com a mesma massa). Após um elevado número de simulações, acima de 10^5 , o valor médio do raio de giração, r_g , pode assim ser calculado.

Valores obtidos de Φ para uma representação CSC, estão representados na figura 5.1 em função de n_k para diferentes valores de L/r_p , onde L é o comprimento do contorno da cadeia ($L = n_k l_k$) e r_p é o raio do poro da membrana. Os valores obtidos são comparados com os que se obtêm com uma representação FJC, calculados previamente no capítulo 4. Como se pode verificar, os valores de Φ para CSC são ligeiramente superiores aos valores correspondentes para a representação FJC, em especial

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

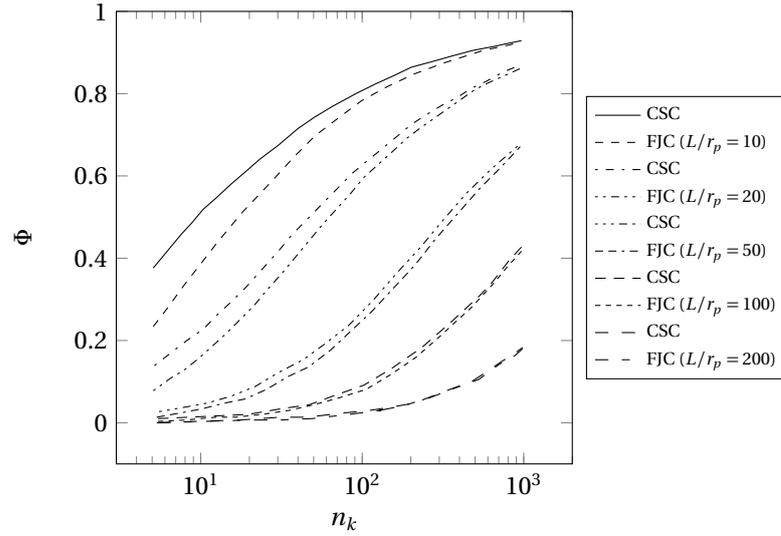


Figura 5.1: Coeficiente de partição de cadeias CSC e FJC, em condições de filtração, em função de n_k para vários valores de L/r_p .

quando o número de segmentos da cadeia é pequeno. No entanto a dependência de Φ com r_g é a mesma quer para a representação CSC, quer para a representação FJC (ver figura 5.2). Assim pode-se concluir que a equação 5.1, obtida originalmente para FJC, é igualmente válida para uma abordagem CSC. A partir das simulações foi igualmente possível obter a seguinte equação que relaciona r_g para uma CSC, com n_k e L :

$$r_g = 0.221 n_k^{-0.352} L \quad (5.10)$$

Para uma molécula de DNA de dupla cadeia linear o valor de L pode ser estimado pelo aumento de comprimento axial por par de bases, igual a 0.34 nm, multiplicado pelo número total de pares de bases. Este valor deverá ser semelhante para cadeias fechadas, como é o caso do DNA plasmídico. Para estimar o valor de n_k é necessário saber l_k . Como primeira estimativa pode-se considerar que l_k é dado pela distância de Kuhn, l_K , da molécula linear correspondente (FJC). Os valores da distância de Kuhn para moléculas lineares correspondem aproximadamente ao dobro do comprimento de persistência, a , o que é uma boa aproximação para $L/a > 10$. O comprimento de persistência do DNA linear é dependente da força iónica da solução, I , através do inverso do comprimento de Debye, κ , e pode ser estimado pela seguinte equação [60, 83]:

$$a = \left(\frac{\pi a^*}{2} \right)^{2/3} \frac{R_{\text{DNA}}^{4/3}}{z^2 l_B} \left[(2z\xi - 1) \frac{\kappa b e^{-\kappa b}}{1 - e^{-\kappa b}} - 1 - \ln(1 - e^{-\kappa b}) \right] \quad (5.11)$$

onde a^* é o comprimento de persistência de DNA sem carga, R_{DNA} é o raio da dupla hélice do DNA, z é a valência do catião (componente 3), l_B é o comprimento de Bjerrum da água pura, ξ é a densidade de carga do DNA e b é o espaço entre cargas no DNA. No entanto, é esperado que l_k para uma CSC deva ser inferior a l_K , tendo em conta que a tensão molecular numa CSC deverá ser superior que no caso de uma FJC. Considerando, numa primeira abordagem, que o rácio entre n_k e l_K é independente do comprimento de contorno, é aqui proposto a introdução de um parâmetro, α , que relaciona estas duas quantidades:

$$l_k = \alpha l_K \quad (5.12)$$

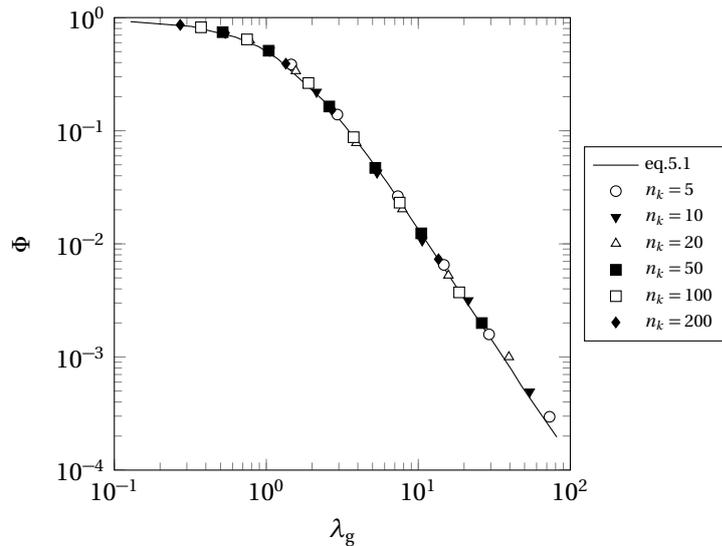


Figura 5.2: Coeficiente de partição de cadeias CSC, em condições de filtração, em função de λ_g para vários valores de n_k .

Um método adequado para obter α para DNA circular passa por considerar os valores de r_g disponíveis na literatura, e usar as equações 5.10 e 5.12. Um valor ótimo de $\alpha = 0.196$ foi estimado, usando um método de mínimos quadrados, a partir de dados obtidos para diferentes plasmídeos a diferentes valores de força iônica (ver figura 5.3). Sabendo o valor de α , o cálculo de n_k a partir de l_k é assim possível para outro plasmídeo através da equação 5.12. Os valores de r_g obtidos por este método podem ser comparados com valores existentes na literatura para o raio de giração de três plasmídeos com 5.76, 9.80 e 16.8 kbp, medidos por “static light scattering” [119]. Os valores encontrados são 102 ± 2 , 117 ± 3 e 169 ± 4 nm, respetivamente, que estão em boa concordância com os valores de 86, 121 e 171 nm obtidos pelo método aqui desenvolvido.

5.2.2.2 Abordagem de cadeias de ligação livre (FJC)

Apesar de não serem moléculas lineares, os plasmídeos podem também ser modelados como cadeias FJC, mas somente em condições de elevada força iônica. Os plasmídeos, quando apresentam uma estrutura altamente super-enrolada, encontram-se numa conformação que se assemelha a uma molécula linear, como pode ser comprovado por imagens de AFM obtidas a elevadas forças iônicas (160 mM) [121]. Considerando este facto, a equação 5.1 pode ser usada com os valores de r_g calculados a partir do modelo de cadeias “worm-like”, WLC, através da seguinte equação [59, 61, 60]:

$$r_g = a_s \left[\frac{L_s}{3a_s} - 1 + \frac{2a_s}{L_s} - 2 \left(\frac{a_s}{L_s} \right)^2 (1 - e^{-L_s/a_s}) \right]^{1/2} \quad (5.13)$$

Os subscritos “s” usados na equação 5.13 servem para indicar que os valores do comprimento de persistência, a_s , e do comprimento do contorno, L_s , referem-se à super-hélice e não à dupla cadeia de DNA (dsDNA).

Valores de L_s e a_s não são conhecidos *a priori*, no entanto L_s , numa primeira abordagem, pode ser estimado como $0.5L$, onde L representa o comprimento do contorno do dsDNA (ou seja, L é dado por 0.34 nm multiplicado pelo número de pares de bases e L_s representa assim a máxima extensão possível de uma molécula de pDNA). Assim, a_s pode ser estimado a partir de valores conhecidos de r_g através da equação 5.13. Latulippe et al [119] propuseram uma outra forma de abordar o problema,

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

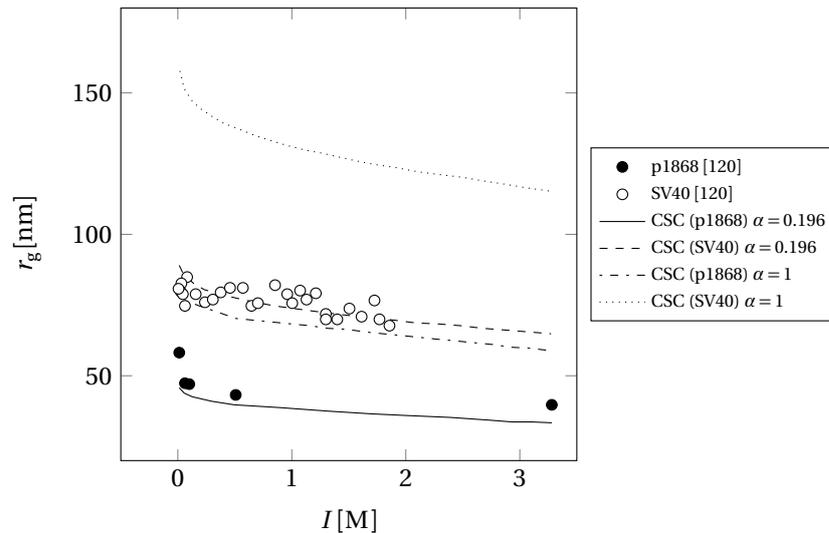


Figura 5.3: Raio de giração para o plasmídeo p1868 (1868 bp) e para o vírus SV40 (5243 bp) em função da força iônica [120]. Na figura está igualmente representado o ajuste, através das equações 5.10 e 5.12, com $\alpha = 0.196$ e $\alpha = 1$.

considerando para os plasmídeos um comprimento de contorno efetivo de $0.4L$, quando $a_s = 46$ nm, que está em melhor concordância com o valor de $L_s/L = 0.41$ obtido por Boles et al [122].

5.2.2.3 Comparação entre as duas abordagens

As abordagens CSC e FJC para modelar a estrutura de pDNA, em condições de elevada força iônica, são comparadas na figura 5.4. Como se pode verificar, a melhor abordagem é claramente a de CSC, que produz um erro médio no valor de r_g inferior a 4%. Por este motivo, este foi o modelo escolhido para efetuar os cálculos. Através desta abordagem é possível estimar o coeficiente de partição dinâmico de plasmídeos em função do seu número de pares de bases e do raio do poro da membrana (ver figura 5.5).

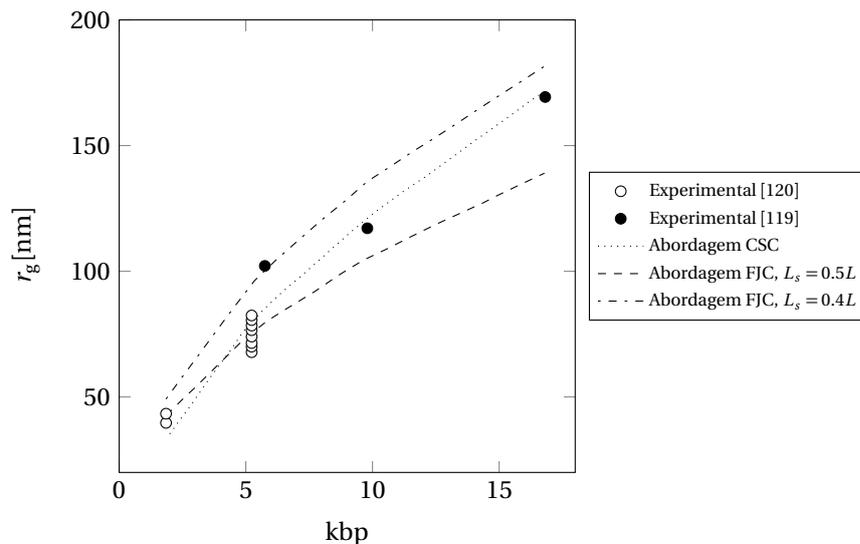


Figura 5.4: Comparação das diferentes abordagens para estimar o raio de giração de plasmídeos. Foram usados os seguintes valores de a_s no caso da abordagem FJC: 20.8 nm (valor de ajuste) para o caso em que $L_s = 0.5L$ e 46 nm, segundo [119], no caso de $L_s = 0.4L$. Valores experimentais para r_g foram obtidos por Latulippe et al [119] e por Hammermann et al [120].

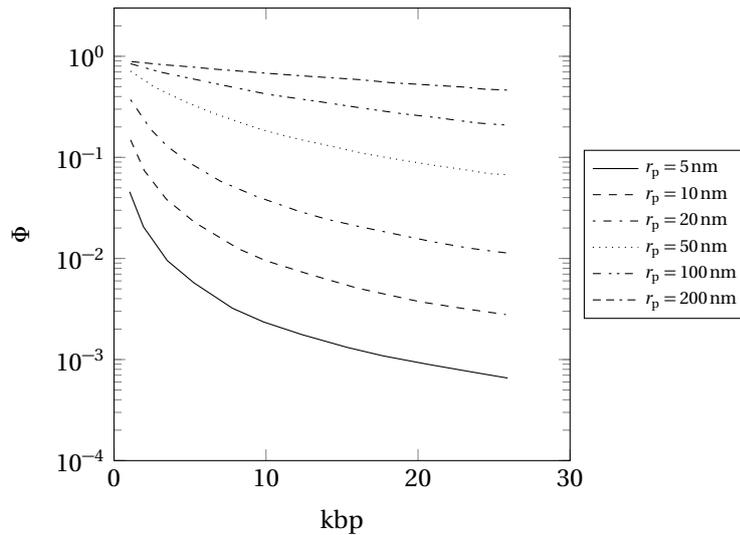


Figura 5.5: Coeficiente de partição dinâmico de plasmídeos em função do número de pares de bases para diferentes tamanhos de poro.

Tabela 5.1: Características principais das membranas usadas.

Membrana	Material	Fabricante	r_p [nm]	ϵ	L [μm]
TEPC 0.03 μm	Policarbonato “track-etched”	Sterlitech	15 ^a ; 14.5 ^b	4.2×10^{-3c}	6 ^c
XM300	Poliacrilonitrilo	Millipore	10.5 ^d	—	—
YM100	Celulose regenerada	Millipore	10.0 ^e	—	—
Nylon 0.2 μm	Nylon	Millipore	100 ^a	—	—

^a Valor nominal.

^b Calculado a partir da distribuição de tamanhos de poro.

^c Fornecido pelo fabricante.

^d Obtido em [64].

5.2.3 Parte experimental

Foi usado o plasmídeo *pVAX1-LacZ*, com 6050bp, nos ensaios experimentais. O plasmídeo foi produzido por fermentação com a bactéria *E. coli DH5 α* , e posteriormente purificado como descrito em Sousa et al [17]. O grau de purificação da preparação final de plasmídeo foi avaliado por eletroforese horizontal em gel de agarose (AGE). Todas as soluções de plasmídeo usadas nos ensaios foram preparadas num tampão contendo 10mM de Tris/HCl a pH 8.00, com adição de 0.45 M de NaCl, com exceção dos ensaios em que se investigou o efeito da força iônica da solução na permeação. Nesses testes, foram adicionadas quantidades pré-determinadas de NaCl ao tampão Tris para obter diferentes valores de força iônica.

As membranas usadas, assim como as suas principais características, estão indicadas na tabela 5.1. Todas as membranas têm tamanhos de poro semelhantes mas são feitas de diferentes materiais. No caso das membranas “track-etched” de policarbonato (TECP), a distribuição de tamanho de poro é conhecida através de Kim et al [116]. Para as membranas XM300 e YM100, o raio de poro médio foi obtido pela determinação das permeações de solutos neutros, usando o modelo do poro simétrico (SPM) descrito em Morão et al [47]. Os valores obtidos de r_p estão indicados na tabela 5.1.

Os ensaios de filtração foram efetuados num célula de filtração da *Amicon/Millipore*, modelo 8010, com uma área efetiva de filtração de $4.1 \times 10^{-4} \text{ m}^2$. Antes de serem utilizadas nos ensaios, as membranas foram mantidas em água durante a noite e em seguida lavadas com a passagem de pelo menos 20 mL de tampão para assegurar a completa remoção de agentes conservantes, inicialmente presen-

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

tes nas membranas. O tampão foi então removido da célula e substituído por 10 mL da solução de plasmídeo a ser filtrada. Recolheu-se logo em seguida, do interior da célula, uma amostra da solução inicial. A velocidade de agitação, ω , foi ajustada para 100 e para 800 min^{-1} (com calibração prévia). A temperatura em todos os ensaios foi de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. O caudal de permeado foi controlado em todos os ensaios através de uma bomba peristáltica *Watson-Marlow 403 U*, colocada a jusante da membrana (atuando assim por sucção). Antes de se recolher a amostra de permeado para ser analisada, o primeiro 1.0 mL filtrado foi recolhido num Eppendorf para ser descartado. Este procedimento tem com objetivo evitar a diluição da amostra de permeado devido ao líquido presente inicialmente no tubo da bomba peristáltica, como verificado experimentalmente. O volume de permeado recolhido em seguida foi 0.6 mL (filtrando-se assim no total 1.6 mL da solução inicial). As concentrações de plasmídeo, quer no permeado quer na solução inicial, foram determinadas medindo a absorvância a 260 nm, num espectrofotómetro da *Pharmacia Biotech*, modelo *Ultrospect 3000*.

5.3 Resultados e discussão

Usando a abordagem CSC, o raio de giração do plasmídeo foi estimado em 85.6 nm a uma força iónica de 0.46 M, que representa o valor escolhido para realizar as experiências (com exceção dos ensaios em que se variou a força iónica). Com este valor e com os tamanhos de poro dados na tabela 5.1, os coeficientes de partição dinâmicos puderam ser calculados através da equação 5.1. Os valores obtidos estão indicados na tabela 5.2. Com estes valores, a permeação observada pode assim ser estimada resolvendo numericamente o sistema de equações 5.1—5.8, com δ estimado pela equação 5.5 e k_1 estimado pela equação 5.6. O coeficiente de difusão do plasmídeo *pVAX1-LacZ* foi estimado em $2.97 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ utilizando a correlação proposta por Prazeres et al [82].

As permeações observadas do plasmídeo *pVAX1-LacZ* nas membranas TEPC 0.03 μm , XM300 e YM100, para diferentes velocidades de agitação, em função do fluxo estão representadas na figura 5.6, comparadas também com as correspondentes previsões teóricas. Como é visível na figura 5.6, as previsões do modelo proposto (p.) estão de acordo com a observação experimental da existência de permeações intermédias do plasmídeo na gama de fluxos testados, e para a velocidade de agitação mais elevada aproximam-se claramente dos resultados experimentais. As permeações observadas são, no entanto, geralmente mais baixas que o previsto pelo modelo. Este facto sugere a ocorrência de uma excessiva acumulação de plasmídeo na superfície da membrana (adsorção), que deverá ser mais pronunciada à velocidade de agitação mais reduzida. Para investigar esta possibilidade, pode-se colocar a hipótese da ocorrência de adsorção do plasmídeo na superfície da membrana, o que faz com que a membrana adquira carga negativa devido ao facto dos plasmídeos serem moléculas altamente carregadas negativamente, o que poderá explicar a diferença entre os resultados experimentais e as

Tabela 5.2: Coeficiente de partição dinâmico do plasmídeo *pVAX1-LacZ* nas membranas usadas com força iónica igual a 0.46 mol/L.

Membrana	Φ
TEPC 0.03 μm	0.0409 ^a ; 0.0418 ^b
XM300	0.0205
YM100	0.0187
Nylon 0.2 μm	0.57

^a Usando o valor nominal de tamanho de poro.

^b Usando a distribuição de tamanho de poro.

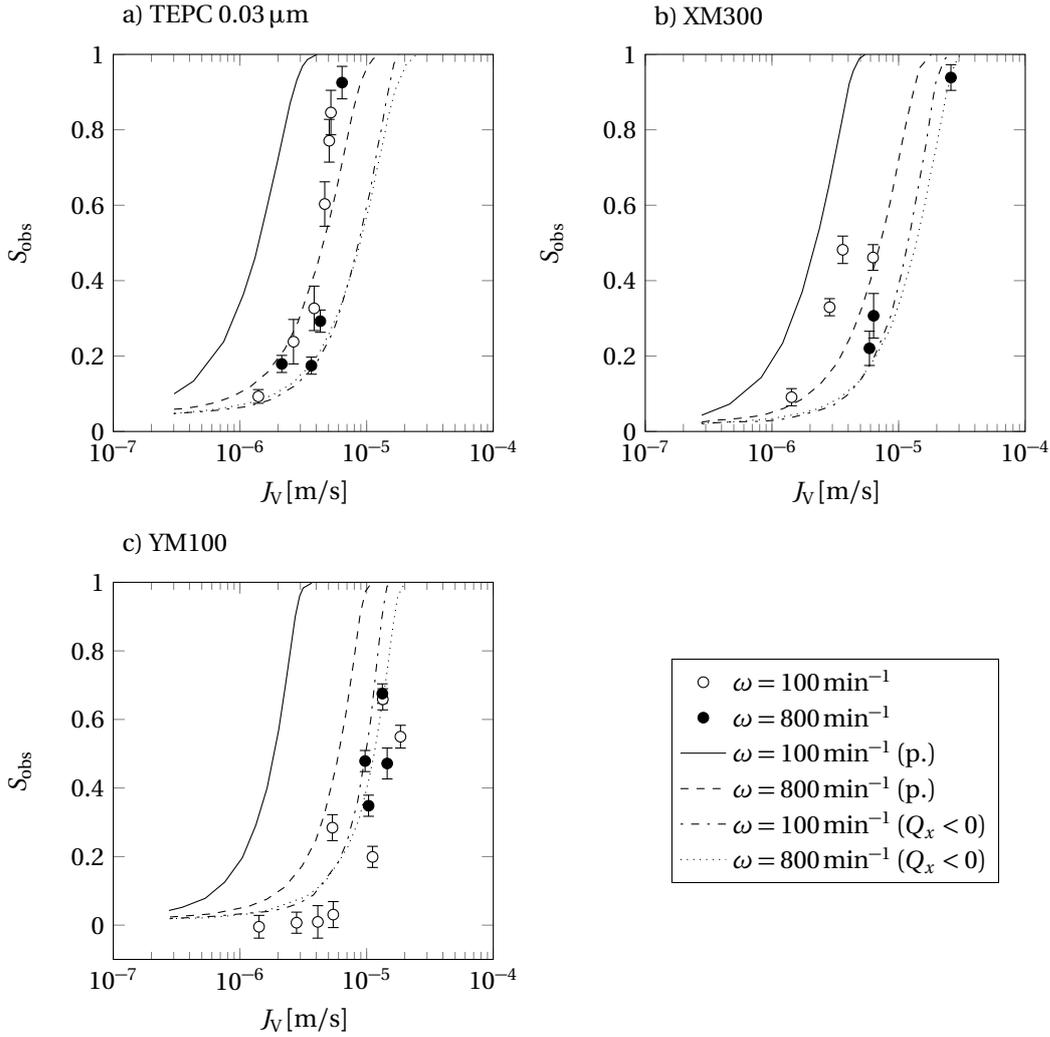


Figura 5.6: Valores experimentais e previstos (p.) das permeações observadas do plasmídeo *pVAX1-LacZ* nas membranas TEPC 0.03 nm (a), XM300 (b) e YM100 (c), em função do fluxo de permeado para diferentes valores de velocidade de agitação. Estão também representadas as previsões corrigidas considerando carga negativa à superfície da membrana ($Q_x < 0$) devido à ocorrência de adsorção.

previsões do modelo. Assim, o algoritmo desenvolvido para a estimar S_{obs} pode ser alterado para possibilitar uma estimativa da carga da membrana, Q_x , a partir dos resultados experimentais. Com os valores obtidos de Q_x , a fração da superfície da membrana coberta com moléculas de plasmídeo, θ , pode assim ser calculada.

Para efetuar os cálculos pode-se considerar um método iterativo no qual é feita uma aproximação inicial, $C_{p,2} \approx C_{b,2}$, e a partir de valores conhecidos de $C_{p,1}$, calcular assim $C_{p,3}$. Com os valores obtidos de $C_{b,i}$ e $C_{p,i}$, a equação 5.3 pode ser resolvida, como descrito anteriormente, obtendo-se assim os valores de $C_{m,i}$. Considerando que algumas moléculas de plasmídeo estão adsorvidas à superfície da membrana, formando um filme com carga negativa, todos os componentes em solução estarão envolvidos num equilíbrio de partição, com a concentração das espécies não-adsorvidas, $C_{M,i}$, dada por:

$$C_{M,i} = C_{m,i} \exp\left(\frac{z_i F}{RT} \Delta\Psi_D\right) \quad (5.14)$$

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

onde $\Delta\Psi_D$ representa a diferença entre o potencial elétrico na solução perto do filme e potencial elétrico no filme. Dado que $C_{M,1} = C_{p,1}/\Phi$, com os valores de $C_{m,1}$ pode-se calcular a diferença de potencial elétrico, $\Delta\Psi_D$, usando a equação 5.14 na forma:

$$\Delta\Psi_D = \frac{RT}{z_1 F} \ln\left(\frac{C_{M,1}}{C_{m,1}}\right) \quad (5.15)$$

Os valores de $C_{M,2}$ e $C_{M,3}$ podem ser calculados pela equação 5.14. Com o novo valor obtido de $C_{M,2}$ obtém-se assim uma nova estimativa para $C_{p,2}$ e os cálculos deverão ser assim feitos de forma cíclica até que se obtenha convergência. Com os valores finais obtidos de $C_{M,i}$, Q_x pode ser calculada pelo balanço de cargas na filme adsorvido à superfície da membrana:

$$Q_x = -\sum_{i=1}^3 z_i C_{M,i} \quad (5.16)$$

Assumindo que apenas se adsorve uma camada de moléculas de plasmídeo à superfície da membrana, a fração de cobertura, θ , pode ser determinada através de Q_x . Em primeiro lugar calcula-se o número de moléculas de plasmídeo adsorvidas por unidade de volume da mono-camada:

$$N_{\text{ads}} = -\frac{Q_x N_A}{2\text{nbp}} \quad (5.17)$$

onde N_A é o número de Avogadro, tendo em conta que cada molécula de pDNA tem (2 nbp) grupos carregados. Multiplicando N_{ads} por uma distância igual a duas vezes o raio de giração do plasmídeo, $2r_g$, obtém-se aproximadamente o número de moléculas de pDNA adsorvidas por unidade de área. Uma vez que cada molécula de plasmídeo ocupa uma área de aproximadamente πr_g^2 , a fração da superfície da membrana coberta é dada por:

$$\theta = -\frac{Q_x N_A}{\text{nbp}} \pi r_g^3 \quad (5.18)$$

Os valores obtidos para Q_x e θ , estão representados na figura 5.7, em função do fluxo de permeado. Como se pode observar, valores bastante razoáveis de θ se obtêm assumindo a formação de uma mono-camada de moléculas de plasmídeo adsorvidas na superfície da membrana. Para cada membrana, θ é claramente superior para a velocidade de agitação mais baixa e para a membrana YM100 obtêm-se os valores mais altos de θ , o que reflete o maior desvio entre os resultados experimentais e as previsões teóricas encontradas para esta membrana. Para os valores de Q_x verificou-se uma dependência linear com J_V , sendo esta dependência aparentemente independente da membrana usada. Com o auxílio das correlações indicadas na figura 5.8, pode-se formular um melhor modelo para a dependência de S_{obs} com J_V e ω , considerando o efeito da carga da superfície da membrana nos cálculos, em vez de se assumir $Q_x = 0$ (figura 5.6).

Para além da influência do tamanho de poro, fluxo e velocidade de agitação na permeação do plasmídeo, S_{obs} , é igualmente importante investigar o efeito da força iónica, que se sabe ter grande importância. As permeações observadas do plasmídeo, obtidas a diferentes valores de força iónica, nas membranas TEPC 0.03 μm e na membrana de Nylon 0.2 μm , estão representadas na figura 5.9, onde se encontram comparadas com as previsões teóricas assumindo adsorção desprezável, ou seja $Q_x = 0$. Como é possível constatar, para valores elevados de força iónica o plasmídeo apresenta elevados valores de permeação, e à medida que a força iónica diminui observa-se uma transição marcada para valores reduzidos de S_{obs} , por volta de 50 mM para a membrana TEPC 0.03 μm , tal como previsto pelo modelo. Para a membrana de Nylon 0.2 μm , que tem poros de maiores dimensões, o valor de força

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

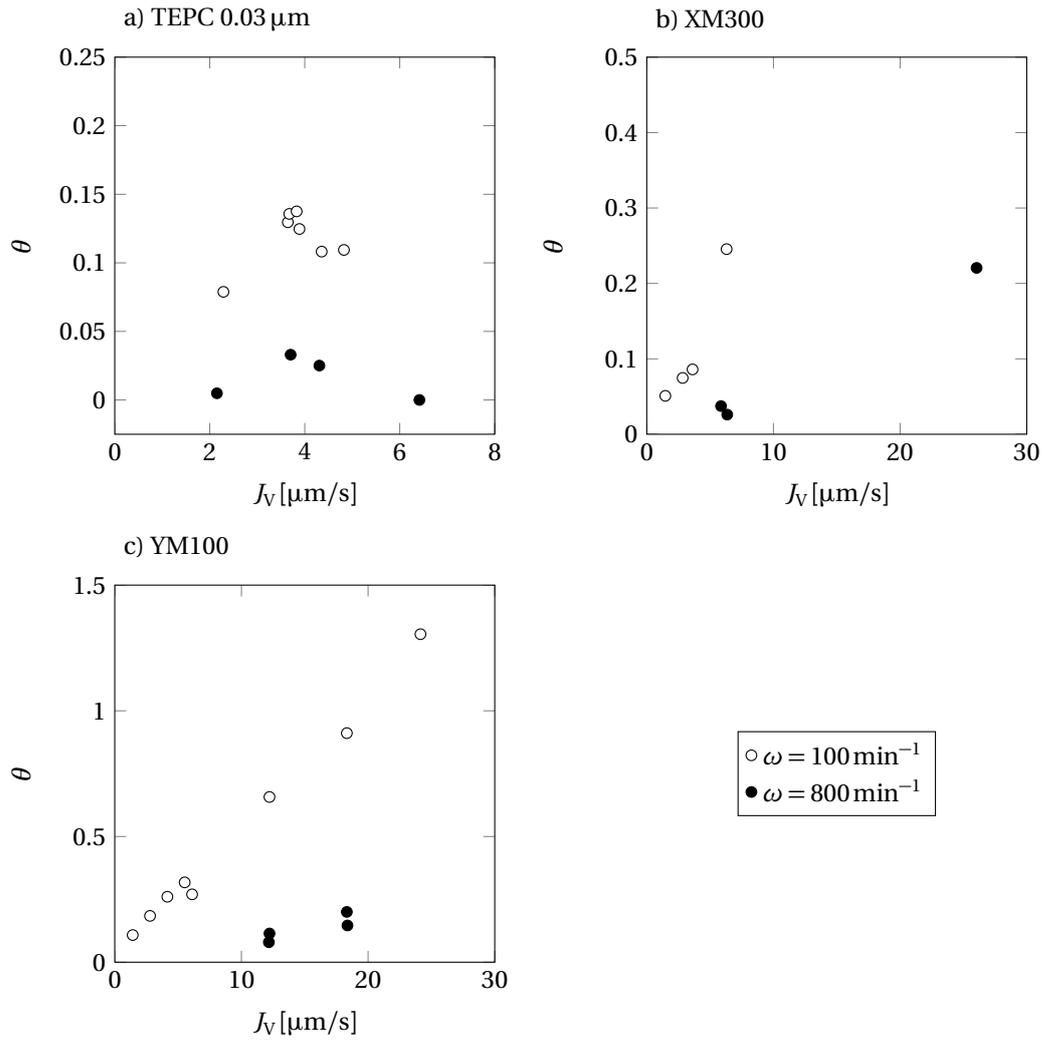


Figura 5.7: Fração de cobrimento da área da membrana por adsorção de moléculas de plasmídeo, θ , em função do fluxo de permeado, para as duas velocidades de agitação testadas. Os valores foram obtidos a partir dos dados representados na figura 5.6.

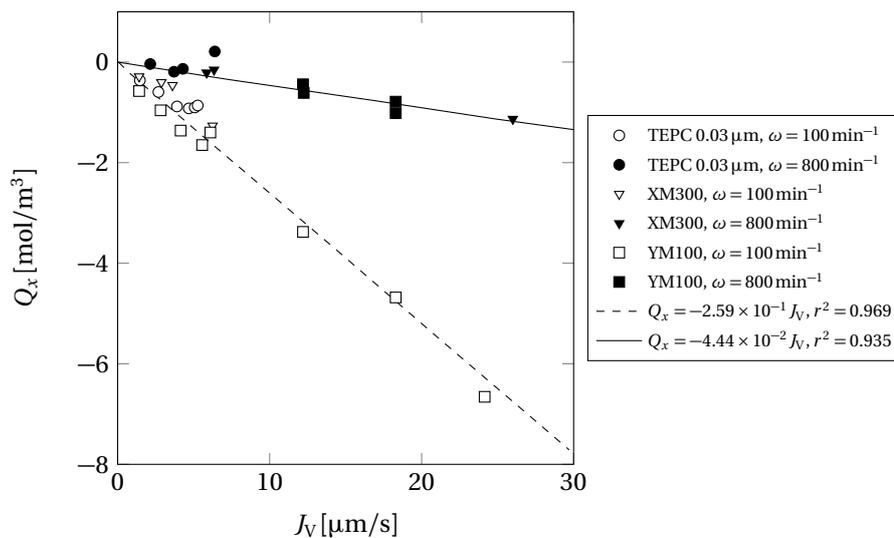


Figura 5.8: Carga total das moléculas de plasmídeo adsorvidas na superfície da membrana em função do fluxo de permeado, para as duas velocidades de agitação testadas. Os valores foram obtidos a partir dos dados representados nas figura 5.6.

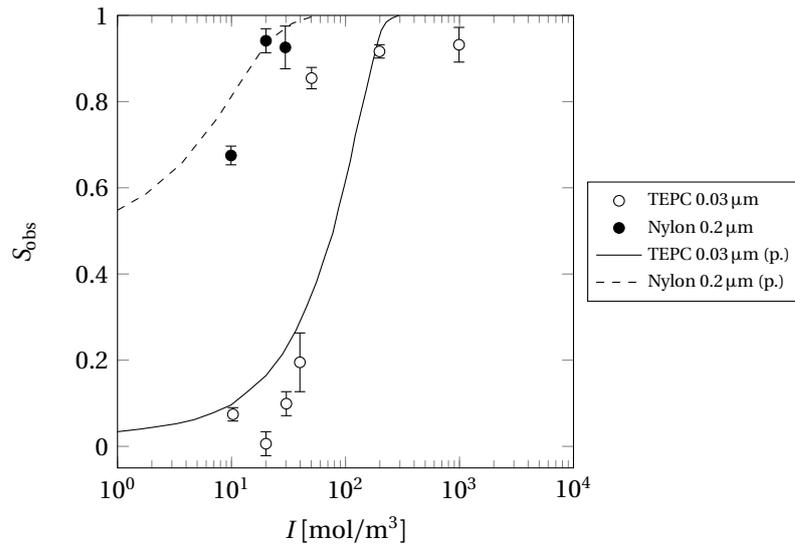


Figura 5.9: Permeação observada experimental e prevista (p.) do plasmídeo *pVAX1-LacZ* na membrana TEPC 0.03 μm com $J_V = 5.0 \times 10^{-6}$ m/s e na membrana Nylon 0.2 μm com $J_V = 4.2 \times 10^{-6}$ m/s, em função da força iônica, para $\omega = 100 \text{ min}^{-1}$.

iônica para o qual se observa a transição é aparentemente mais baixo, cerca de 10mM, igualmente como previsto pelo modelo. O fator dominante que leva à diminuição no valor de S_{obs} é o decréscimo da concentração de plasmídeo junto à superfície da membrana, $C_{m,1}$ (ver figura 5.9). Este facto é consequência da maior repulsão que ocorre entre as moléculas de plasmídeo à superfície da membrana, à medida que a concentração de sal diminui, o que pode ser visto pelo aumento do valor absoluto do gradiente do potencial elétrico junto à membrana, $(d\Psi/dy)_m$ (ver figura 5.10).

5.4 Conclusões

Neste capítulo desenvolveu-se um modelo de transferência de massa para prever as permeações observadas de plasmídeos em membranas com poros de pequenas dimensões. Nestas circunstâncias, considera-se que a permeação só ocorre devido ao efeito de sucção do fluxo convectivo de solvente e que os plasmídeos durante a passagem pelos poros ocupam a totalidade da secção reta do mesmo, sendo assim a convecção o único mecanismo de transporte. As moléculas de plasmídeo tendem a acumular-se junto à superfície da membrana devido à ocorrência de polarização de concentração. No entanto, esta acumulação é contrabalançada pela existência de repulsão eletrostática entre as moléculas de plasmídeo, que são altamente carregadas negativamente.

A precisão das previsões do modelo aqui desenvolvido revelou-se ser bastante dependente das condições hidrodinâmicas usadas, especialmente da velocidade de agitação assim como do fluxo de permeado imposto. No entanto, estes desvios podem ser interpretados com o modelo desenvolvido, considerando a ocorrência de adsorção de moléculas de plasmídeo na superfície da membrana. Foi assim proposta a existência da formação de uma mono-camada de moléculas de plasmídeo, o que confere carga negativa à membrana. Nesta situação, as moléculas de plasmídeo serão parcialmente excluídas da região perto dos poros, o que leva à diminuição da permeação observada em comparação com as previsões do modelo.

Para além de efeitos hidrodinâmicos, a acumulação de plasmídeos à superfície da membrana pode ser contrabalançada também pela diminuição da força iônica da solução, uma vez que os plasmídeos são altamente carregados negativamente e assim a repulsão entre eles é intensificada. Com o modelo

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

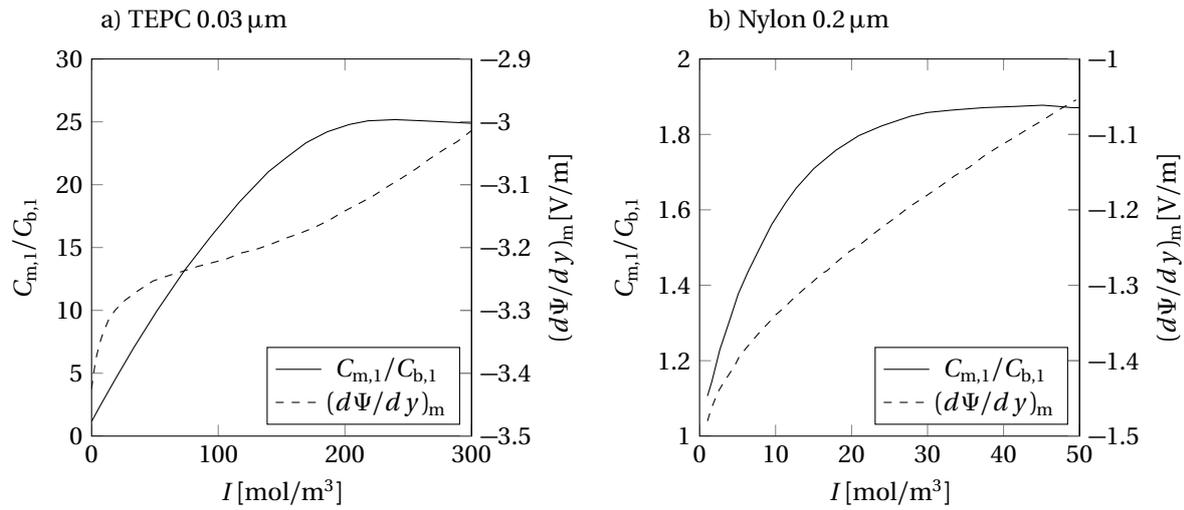


Figura 5.10: Previsões do modelo, assumindo $Q_x = 0$, para o rácio entre a concentração de plasmídeo à superfície da membrana e a concentração de plasmídeo no seio da solução, $C_{m,1}/C_{b,1}$, e para o valor do gradiente de potencial elétrico à superfície da membrana, em função da força iónica, para as membranas TEPC $0.03 \mu\text{m}$ (a) e Nylon $0.2 \mu\text{m}$ (b).

desenvolvido conseguem-se obter boas previsões deste efeito. O modelo tem ainda a capacidade de considerar a presença de carga na superfície da membrana, facto que pode ser importante no âmbito da purificação de DNA plasmídico.

Capítulo 6

Extração de DNA plasmídico de caldos de fermentação por um processo combinado de micro e ultrafiltração

O trabalho descrito neste capítulo foi publicado na revista Journal of Membrane Science [11].

6.1 Introdução

Desde a última década, um grande número de estudos têm vindo a ser publicados sobre a possível aplicação de DNA plasmídico em terapia génica e na produção de vacinas de DNA. No que à terapia génica diz respeito, cerca de 18.7 % de todos os ensaios clínicos efetuados em 2011 usaram DNA plasmídico como vetor, sendo a sua utilização apenas ligeiramente inferior aos dois vetores virais adenovírus (24.2 %) e retrovírus (20.7 %) ¹. Comparando estes valores com os que se verificavam em 2007 [10] e em 2000 [4], é possível verificar um aumento significativo da utilização deste tipo de vetor, em parte devido aos possíveis problemas de segurança associados com a utilização de vetores virais. Em termos de vacinas, vários ensaios clínicos e pré-clínicos demonstram grande potencial para a aplicação deste tipo de moléculas [123, 6, 7, 8].

Para produzir DNA plasmídico em grande escala é necessário desenvolver processos eficientes em termos de rendimento e essencialmente livres de químicos perigosos, tais como cloreto de céσιο ou brometo de etídio, solventes orgânicos tais como isopropanol, fenol ou clorofórmio e enzimas (tais como RNase A, proteinase K ou lisozima), que geralmente são usados em procedimentos laboratoriais [12, 14, 15, 16, 17, 18, 19]. DNA plasmídico (pDNA) é geralmente produzido por fermentação com a bactéria *E. coli*. A primeira etapa de isolamento é a lise celular. Apesar de terem sido estudados outros métodos de lise, nomeadamente lise mecânica [124] e lise térmica [21, 22], a lise alcalina, originalmente proposta por Birnboim e Doly [24], continua a ser o procedimento mais utilizado. Com este método consegue-se, para além de abrir as paredes celulares libertando assim as moléculas de plasmídeo, remover quantidades consideráveis de detritos celulares, DNA genómico (gDNA) e proteínas, que precipitam na fase de neutralização, ficando o RNA como principal contaminante [15, 125, 28]. O método de lise alcalina tira partido do ciclo de renaturação das moléculas de pDNA [126]. Após a neutralização do lisado com uma solução salina concentrada, forma-se uma elevada quantidade de precipitados. Por cada grama (peso húmido) de células formam-se tipicamente 2.4 g de precipitados, o que em métodos convencionais de lise leva à obtenção de uma concentração de sólidos de aproximadamente 100 g/L [28]. Este material precipitado é altamente “gelatinoso” e tende a flutuar. Em princípio, qualquer operação sólido líquido pode ser usada para remover este material do lisado. À escala laboratorial a operação mais utilizada é a centrifugação descontínua. No entanto, para a produção em larga escala é mais aconselhável a utilização de operações de filtração [12, 28, 25, 37].

Theodossiou et al [28] estudaram vários filtros, de diferentes materiais e tamanhos de poro, e também a aplicação de “filter aids”, para obter a remoção do conteúdo precipitado obtido após uma operação de lise alcalina. Mesmo o filtro estudado com menor tamanho de poro (5 µm) foi incapaz de reter completamente o material precipitado. Observou-se igualmente alguma degradação provocada pelas tensões de corte durante a passagem pelos poros. Com a adição de “filter aids” (terra de diac-

¹<http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>

tomáceas) conseguiu-se remoção completa de sólidos mas à custa de uma redução de capacidade e de rendimento (devida em parte ao aumento da adsorção do plasmídeo). Para além disso, a utilização de “filter aids” levanta problemas na sua aplicação em larga escala, principalmente devido à enorme quantidade de resíduos sólidos que se formam. A necessidade de “filter aids” pode ser combatida recorrendo à utilização de membranas de microfiltração, com tamanhos de poro mais reduzidos, podendo-se esperar elevados rendimentos, desde que se assegure uma reduzida adsorção do plasmídeo nas membranas. Kendall et al estudaram a aplicação de uma membrana de nitrocelulose com um poro de 0.45 μm para purificar lisados alcalinos previamente clarificados por filtração por gravidade. A utilização de um material altamente hidrofóbico, tal como a nitrocelulose, levou a uma redução considerável dos vários contaminantes hidrofóbicos, nomeadamente RNA, gDNA e algum conteúdo proteico, mas à custa de uma elevada colmatção das membranas.

No presente capítulo, estuda-se a aplicação de dois passos sequenciais de membranas, usando membranas hidrofílicas para tentar evitar ao máximo os fenómenos de adsorção e colmatção. Usou-se uma membrana de microfiltração para remover o conteúdo sólido dos lisados e uma membrana de ultrafiltração para concentrar o filtrado e obter alguma purificação do pDNA. É igualmente feita a modelação da permeação das moléculas de plasmídeo nos dois passos de membranas com o modelo desenvolvido no capítulo 5. É utilizado o modelo proposto no capítulo 4 para moléculas lineares flexíveis, com a inclusão dos efeitos de carga discutidos no capítulo 5. Este modelo é usado para modelar a permeação dos diferentes tipos de RNA presentes no lisado. Estuda-se igualmente o efeito da força iónica na permeação de pDNA, gDNA, RNA e proteínas, nos dois passos de membranas, tal como o efeito da adição de CaCl_2 aos lisados antes da filtração, uma vez que este sal tem a capacidade de remover uma grande fração do RNA presente [16].

6.2 Materiais e métodos

6.2.1 Fermentação e lise celular

A produção de pDNA foi efetuada por fermentação com a bactéria *E. coli DH5 α* , contendo o plasmídeo *pVAX1-LacZ*, com 6050 bp, tal como descrito em [17]. A 4 mL de uma suspensão de bactérias a 120 g/L (peso húmido) em tampão $T_{50}E_{10}$ (50 mM Tris, *Fischer BioReagents*, e 10 mM EDTA, *Sigma*, a pH 8.00), foram adicionados 4 mL de uma solução contendo 0.2 M de NaOH (*Panreac*) e 1% de SDS (*Himedia*) para proceder à lise celular. A mistura foi incubada a temperatura ambiente durante 5 min, adicionando em seguida 4 mL de uma solução 3 M de acetato de potássio (*Sigma-Aldrich*) a pH 5.00, com o pH ajustado por ácido acético (*Panreac*). Formou-se uma elevada quantidade de precipitados, e a suspensão obtida foi incubada em gelo durante 15 min. O método de lise aqui descrito é assim uma modificação do método de lise alcalina originalmente desenvolvido por Birnboim e Doly [24].

6.2.2 Ensaios de filtração com membranas

Todos os ensaios de filtração com membranas foram efetuados na célula Amicon 8010 (*Millipore*). Foi usada uma membrana de microfiltração, com um poro nominal de 0.2 μm (*Pall Corporation*). Em cada ensaio, uma membrana nova foi inicialmente lavada com água MilliQ para assegurar a remoção completa dos conservantes presentes. No fim da lavagem inicial, a água foi removida do interior da célula e substituída por 10 mL de lisado. Efetuou-se em todos os ensaios uma diafiltração contínua até se obter um fator de diluição aproximadamente igual a 3. Para uma permeação total de plasmídeo (isto é, para $S_{\text{obs}} = 1$) este procedimento assegura um rendimento de recuperação de pDNA de aproximadamente 95%, fazendo uso da equação do balanço de massa para o modo de operação de diafiltração

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

a volume constante (equação 3.7, capítulo 3). As experiências foram realizadas a fluxo de permeado constante e igual a 0.5 mL/min, imposto por uma bomba peristáltica da *Watson-Marlow*, modelo 403 U, colocada a jusante da membrana (operando assim por sucção). Esta bomba possui 10 cilindros rotativos que asseguram um caudal praticamente não-pulsado. A área de membrana efetiva nesta célula de filtração é de $4.1 \times 10^{-4} \text{ m}^2$. A velocidade de agitação foi mantida em todos os ensaios a 760 min^{-1} (com calibração prévia). Foram usadas três soluções de diafiltração diferentes: (A) 10 mM Tris/HCl a pH 8.00; (B) 1 M CH_3COOK em tampão Tris/HCl 10 mM pH 8.00 e (C) 1 M CaCl_2 (*Sigma-Aldrich*) em tampão Tris/HCl 10 mM pH 8.00. Os permeados obtidos após este primeiro passo de filtração foram sujeitos a uma operação de ultrafiltração, em que se usou uma membrana com 100 kDa de “cut-off” de PVDF, modelo *FS40PP*, fabricada pela empresa *DSS/Alfa-Laval*. Esta segunda filtração foi realizada numa célula de filtração idêntica à primeira. Devido à reduzida permeabilidade hidráulica da membrana de ultrafiltração, estes ensaios foram realizados aplicando pressão constante (1 bar, com N_2 pressurizado), em vez de se usar um fluxo constante.

6.2.3 Parte analítica

6.2.3.1 Quantificação do DNA plasmídico

A concentração de plasmídeo foi determinada por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), usando a técnica desenvolvida por Diogo et al [88]. Conectou-se uma coluna HIC *source* 15PHE PE da *Amersham Biosciences (GE Healthcare)* a um sistema de HPLC da *Waters*. A coluna foi inicialmente equilibrada com 1.5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (*Pronalab*) em tampão Tris/HCl 10 mM (pH 8.00). As amostras (20 μL) foram injetadas e eluídas a um caudal constante de 1 mL/min. Após 2 min da injeção, o eluente foi instantaneamente mudado para tampão Tris/HCl 10 mM (pH 8.00) para eluir as espécies ligadas na coluna. Este eluente foi mantido por mais 5 min antes de re-equilibrar a coluna para a próxima análise. A concentração de pDNA em cada amostra foi calculada com o auxílio de uma reta de calibração, construída a partir de padrões de pDNA. Estes padrões foram preparados com o maxi kit de purificação da *Qiagen*.

6.2.3.2 Quantificação de proteínas

A concentração do conteúdo proteico total nas amostras foi determinada pelo kit *Pierce* micro-BCA (*Thermo-Scientific*), tal como descrito em [17]. A 50 μL de amostra foram adicionados 200 μL de reagente BCA numa micro placa, sendo a mistura incubada a 60°C. A placa foi arrefecida a temperatura ambiente durante 15 min e a absorvância das amostras medida a 595 nm num leitor de microplacas. Prepararam-se curvas de calibração com padrões de BSA na gama de concentrações 25–500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para evitar interferências provocadas pela presença de sais, as amostras foram dessalinizadas previamente por cromatografia de exclusão molecular em colunas PD-10 da *Amersham Biosciences (GE Healthcare)*, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, usando NaCl (*Panreac*) 0.15 M em tampão Tris/HCl 10 mM (pH 8.00) como eluente.

6.2.3.3 Quantificação de DNA genómico

Para determinar as concentrações de gDNA nas amostras, usou-se o método de PCR em tempo real, adaptado de [127]. Foram usados os primers (5'-ACACGGTCCAGAACTCCTACG-3') e (5'-GCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCA-3') para amplificar um fragmento de 181 bp do gene rRNA 16 S da *E. coli*. Às amostras (1 μL) foram adicionados 19 μL do reagente SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2 \times) da *Fermentas*. A amplificação foi efetuada num termociclador *Bio-Rad IQ5* e monitorizada pelo aumento da fluorescência do corante de ligação ao DNA. Foi preparada uma curva de calibração por diluição

consecutiva de padrões de DNA genômico de *E. coli DH5 α* , preparados com um kit de purificação Wizard da Promega. Obtiveram-se coeficientes de correlação superiores a 0.90.

6.2.3.4 Eletroforese em gel de agarose

As amostras foram analisadas por eletroforese horizontal, usando géis de agarose a 1.0% em tampão TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA, pH 8.00) na presença de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de brometo de etídio (*Amresco*, solução “stock” 10 mg/mL). A eletroforese foi conduzida a 110 V durante 40 min, em tampão TAE, numa célula da *Bio-Rad*. Os géis foram visualizados num transiluminador da *Uvitec*, modelo *Essential V2*. Para evitar interferências produzidas por sais, algumas amostras foram previamente dessalinizadas por precipitação com isopropanol (*Fisher*). Em termos resumidos, 1 volume de isopropanol foi adicionado às amostras a temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 16 000 g durante 15 min a 4°C. Após remoção do sobrenadante, o “pellet” foi dissolvido no volume apropriado de tampão Tris/HCl 10 mM (pH 8.00).

6.2.4 Simulações

O modelo desenvolvido no capítulo 5 é, neste capítulo, usado para estimar as permeações observadas, S_{obs} , do plasmídeo nas membranas testadas, assumindo que este existe nos lisados na sua totalidade, na isoforma super-enrolada. O plasmídeo foi modelado como uma cadeia segmentada fechada (CSC), com o seu raio de giração, r_g , estimado para uma determinada força iónica através da equação 5.10 do capítulo 5. Com os valores de r_g e do raio do poro da membrana, r_p , é possível estimar o valor da permeação intrínseca do plasmídeo, S_m , através da equação 5.1. Dado que os plasmídeos são moléculas altamente carregadas negativamente, os sais presentes na solução afetam a sua polarização de concentração, influenciando assim os valores de S_{obs} . Este efeito pode ser tido em conta utilizando a equação estendida de Nernst-Planck (NP) para descrever a transferência de massa de cada componente iónico do sistema na camada de polarização de concentração. O número mínimo de componentes necessários para simular o efeito da presença de sais na permeação de moléculas de plasmídeo são 3: o plasmídeo em si (componente 1), um co-ião (componente 2) e um contra-ião (componente 3). As concentrações dos componentes 2 e 3 são ajustadas para obter a força iónica desejada e ao mesmo tempo obter eletroneutralidade. Este método é descrito em pormenor no capítulo 5. Podem ser introduzidos mais componentes iónicos no sistema, no entanto, isto leva a um considerável aumento da complexidade dos cálculos. Para além disso, não existem métodos disponíveis para estimar r_g de plasmídeos em misturas de eletrólitos. Assim, para as simulações da diafiltração dos lisados com os tampões “A” e “B”, os componentes 2 e 3 foram considerados como sendo CH_3COO^- e K^+ respetivamente, com concentrações iniciais de 1 M, uma vez que são os iões presentes em larga maioria nos lisados. No caso da diafiltração com o tampão C, contendo CaCl_2 , o componente 2 é o anião Cl^- e o componente 3 o catião Ca^{2+} , com concentrações iniciais de 2 M e 1 M (de notar que antes da filtração foi adicionado CaCl_2 aos lisados). Uma vez que os iões K^+ e CH_3COO^- estão igualmente presentes em quantidades significativas nos lisados para além do CaCl_2 , o efeito dos sais é subestimado neste caso. Como se verá, este facto não afeta significativamente os resultados obtidos nas simulações uma vez que a força iónica é já consideravelmente elevada (3 M) considerando apenas os iões Ca^{2+} e Cl^- .

Uma vez que o RNA é o contaminante presente em maior quantidade [16, 128], é igualmente de especial interesse procurar prever as permeações destas moléculas nas operações de membranas estudadas. Os três tipos de RNA presente na *E. coli*, que constituem a grande maioria do RNA presente nos lisados, são o RNA 23 S (2904 nucleótidos; 9.87×10^5 Da), o RNA 16 S (1541 nucleótidos; 5.24×10^5 Da) e o RNA 5 S (120 nucleótidos; 4.08×10^4 Da). Os primeiros dois constituem a principal parte do que se denomina como RNA de alto peso molecular (HMw RNA) e o último é o principal componente do que

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

Tabela 6.1: Ácidos nucleicos presentes em maior quantidade nos lisados e suas propriedades mais relevantes para a modelação proposta.

Composto	$s \times 10^{13}$ [s]	M_w [Da]	$r_s \times 10^9$ [m]	$D \times 10^{11}$ [m ² /s]
RNA 5 S	5	40800	3.39	7.29
RNA 16 S	16	523940	13.6	1.82
RNA 23 S	23	987360	17.8	1.39
<i>pVAX1-LacZ</i>		3993000	83.2	0.297

se considera o RNA de baixo peso molecular (LMw RNA), que identificam as duas principais bandas referentes ao RNA que se podem observar nas eletroforeses dos lisados. A partir dos coeficientes de sedimentação destas espécies, os seus raios hidrodinâmicos podem ser estimados usando a seguinte relação, resultante da teoria da ultracentrifugação [84]:

$$r_s = \frac{1}{6\pi\eta} \left[\frac{M_w (1 - V_s \rho)}{N_A s} \right] \quad (6.1)$$

onde η é a viscosidade, M_w a massa molecular, N_A o número de Avogadro, ρ é a densidade, V_s é o volume parcial específico e s é o coeficiente de sedimentação.

Os valores estimados de r_s para os diferentes tipos de RNA estão indicados na tabela 6.1, onde se encontram comparados com os valores de r_s estimados para o plasmídeo estudado neste capítulo. Ao contrário das moléculas de pDNA, que são de dupla cadeia e circulares, as moléculas de RNA são de cadeia simples e linear. Apesar das suas bases terem alguma tendência para se ligar, o modelo de cadeias de ligação livre é uma possível representação da sua estrutura, modelo esse que é aqui considerado. Com esta abordagem, estas moléculas são consideradas como sendo lineares e altamente flexíveis, sendo estas propriedades justificativas da sua permeação em poros com dimensões inferiores, tal como para o caso do pDNA. Usando o modelo FJC, o raio de giração dos diferentes tipos de RNA pode ser estimado em cerca de 1.5 vezes o seu valor de r_s (ver capítulo 4). Com os valores de r_g e com os tamanhos de poro das membranas estudadas, podem-se estimar as permeações observadas, S_{obs} , através da equação 5.1 do capítulo 5. Dado que as moléculas de RNA são carregadas negativamente, a sua polarização de concentração é também muito dependente dos sais presentes em solução. Assim, um método de cálculo numérico, semelhante ao usado para prever a permeação do plasmídeo, é também usado para prever S_{obs} das moléculas de RNA.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Ensaios de microfiltração

Foram realizados três conjuntos de ensaios com o tampão A (MF-A), tampão B (MF-B) e tampão C (MF-C), como especificado na secção 6.2.2. Foram efetuadas simulações prévias para escolher o tamanho de poro mais apropriado.

6.3.1.1 Simulações

As previsões das permeações das moléculas de pDNA e dos diferentes tipos de RNA, obtidas com os modelos CSC e FJC respetivamente, em função do raio do poro e considerando a concentração de 1 M de CH₃COOK como a concentração inicial de sais, estão representadas na figura 6.1. Foram escolhidas condições operatórias típicas da célula de filtração utilizada Amicon 8010 para efetuar as simulações, nomeadamente um caudal de permeado moderado, 0.5 mL/min, (73 L/h · m²), e uma velocidade de

agitação igualmente moderada, 760 min^{-1} . Como é possível verificar na figura 6.1(a), é necessário um poro com um raio de pelo menos 30 nm para obter permeação total do plasmídeo, nestas condições operatórias. No entanto a utilização de um poro maior pode reduzir consideravelmente a polarização de concentração do plasmídeo, que se sabe levar à ocorrência de adsorção (ver capítulo 5). Como se pode ver na figura 6.1(b), à medida que o valor de r_p se aproxima de 100 nm, o valor previsto de C_m/C_b aproxima-se de 1. Assim, pode-se concluir que deve ser usada uma membrana com um diâmetro de poro de $0.2 \mu\text{m}$ ($r_p \sim 100 \text{ nm}$). A utilização de membranas com poros de tamanhos superiores não fará aumentar a permeação do plasmídeo e é provável que se verifique a ocorrência de uma maior colmatção por obstrução dos poros com detritos celulares. Para estas condições não se prevê retenção das moléculas de RNA, tal como se pode ver na figura 6.1(a). Para conseguir obter uma separação entre o RNA e o plasmídeo, as simulações indicam que será necessário uma membrana de ultrafiltração com um raio de poro entre 2 e 5 nm, numa segunda operação, para reter o plasmídeo e permitir a permeação das espécies de RNA, de acordo com as suas massas moleculares.

Para o poro escolhido de 100 nm, foram feitas simulações para o processo completo de diafiltração, considerando o tampão Tris/HCl 10 mM a pH 8.00 como solução de diafiltração (ver secção 6.2.2). Estes testes são aqui denominados como “MF-A”. As simulações indicam que o pDNA e as várias espécies de RNA devem permear livremente através da membrana durante o processo de diafiltração e a polarização de concentração deverá permanecer aproximadamente constante, como é possível verificar na figura 6.1(c) e (d).

6.3.1.2 Ensaios MF-A

Os valores experimentais do rendimento de permeação de pDNA em função do fator de diluição volumétrico, VDF, para os ensaios MF-A estão representado na figura 6.2(a), onde se encontram comparados com os valores teóricos considerando permeação total. O rendimento de permeação é aqui definido como o rácio entre a quantidade do composto em questão no permeado e na solução inicial (solução a ser filtrada). Considerando que nesta operação de microfiltração o objetivo é obter permeação total do plasmídeo, este rendimento é também o rendimento de recuperação. Todos os ensaios foram efetuados em quadruplicado. Como se pode ver, o rendimento de recuperação do plasmídeo para $VDF = 3$ foi elevado, $(86 \pm 1)\%$ em média, mas não atingiu o rendimento teórico de 95%. Apenas $(3.8 \pm 0.1)\%$ do pDNA total foi retido pela membrana e analisado no concentrado, o que sugere que cerca de 10% do plasmídeo ficou adsorvido na membrana. A técnica analítica de HIC utilizada para quantificar o DNA plasmídico (secção 6.2.3.1) foi igualmente usada para obter informação sobre o conteúdo de contaminantes e conseqüentemente a sua remoção (ver capítulo 3). De particular importância é a possibilidade de relacionar a permeação do RNA com a remoção dos contaminantes hidrofóbicos (ver apêndice B). Como é possível ver na figura 6.2, o rendimento de permeação dos contaminantes hidrofóbicos é por regra elevado na primeira operação de membranas, o que indica uma reduzida remoção do RNA presente. A análise por eletroforese, mostrada na figura 6.3, confirma a ideia que o RNA permeia através da membrana juntamente com o pDNA.

Proteínas e gDNA foram quantificados com os métodos descritos na secção 6.2.3. Os dados para a remoção de gDNA e de proteína total, obtidos respetivamente por PCR em tempo real e pelo método do BCA, são indicados na tabela 6.2. Observou-se baixa remoção de proteínas durante a diafiltração dos lisados (ver testes MF-A), em concordância com o baixo rendimento de contaminantes hidrofílicos verificado na análise de HIC. Os resultados mostram que existe uma tendência para o gDNA se re-dissolver, a partir do conteúdo sólido suspenso, tal como os valores negativos de remoção indicam. Uma vez que é necessário que os sólidos suspensos contactem com o tampão de diafiltração durante o processo de filtração (para obter rendimentos de recuperação elevados de pDNA), durante a otimiza-

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

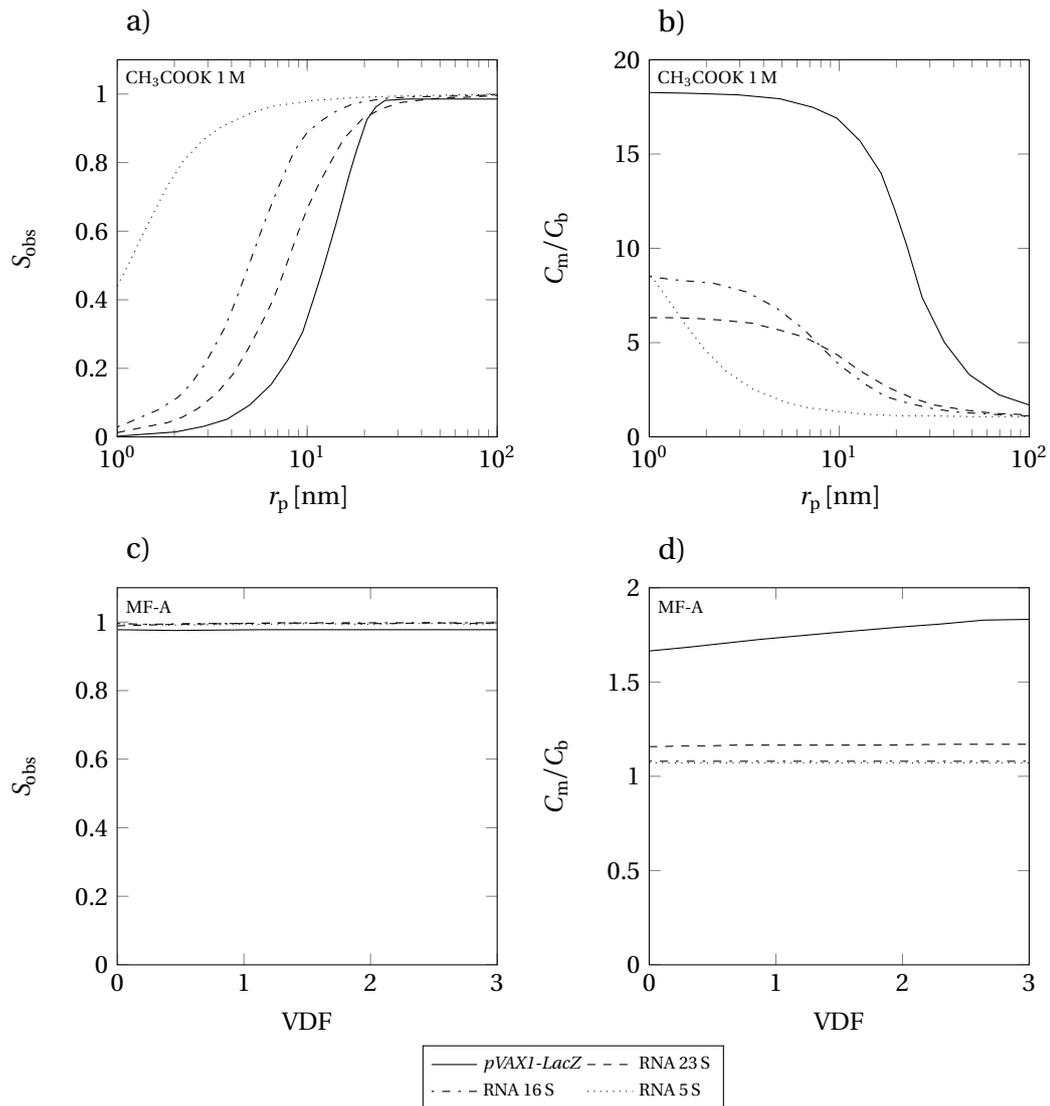


Figura 6.1: Previsão das permeações e da polarização de concentração pela abordagem CSC (aplicada ao plasmídeo) e FJC (aplicada ao RNA). (a) Permeação observada em função do raio do poro da membrana. (b) Polarização de concentração das espécies em função do raio do poro da membrana. (c) Previsão da permeação observada ao longo do processo de diafiltração para $r_p = 100$ nm. (d) Previsão da polarização de concentração para as várias espécies ao longo do processo de diafiltração para $r_p = 100$ nm. Condições: $J_V = 20 \times 10^{-6}$ m/s (0.5 mL/min), $\omega = 760$ min⁻¹, $T = 25$ °C.

ção de um sistema de filtração para aplicações em larga escala este resultado mostra que é necessário controlar as tensões de corte que atuam no material sólido para minimizar a degradação mecânica do gDNA precipitado e para evitar assim a sua re-solubilização. É importante realçar que este aspeto não deve ser visto como uma desvantagem inerente aos processos de membranas quando comparados com a centrifugação. Na realidade são esperadas tensões de corte superiores, neste último processo, em centrífugas industriais [12, 28, 25, 37].

6.3.1.3 Ensaios MF-B

Para tentar evitar a excessiva re-solubilização do gDNA investigou-se a possibilidade de manter a força iónica aproximadamente constante durante o processo de diafiltração, usando CH₃COOK 1 M em Tris/HCl 10 mM a pH 8.00 (tampão “B”, secção 6.2.2). Estes ensaios foram denominados ensaios MF-

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

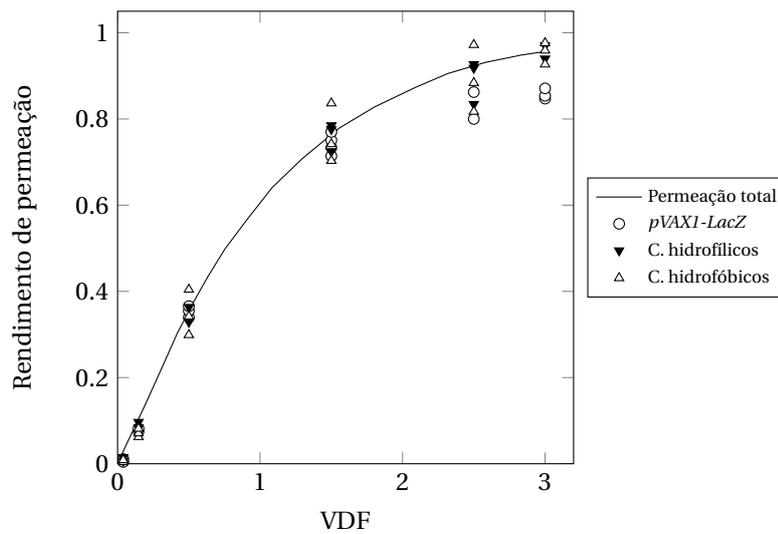


Figura 6.2: Rendimentos de permeação do pDNA, contaminantes hidrofílicos e contaminantes hidrofóbicos em função do fator de diluição volumétrica, para os ensaios MF-A.

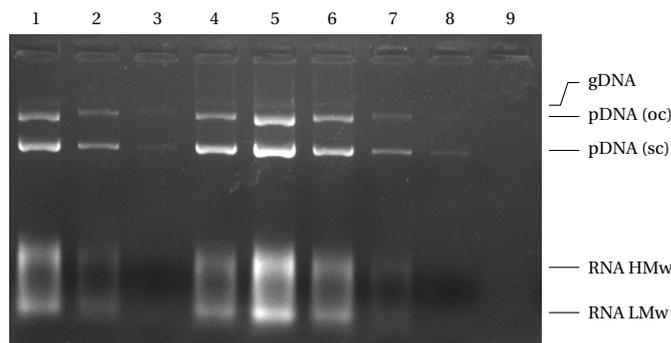


Figura 6.3: Eletroforese em gel de agarose das amostras ao longo do processo de diafiltração: (1) Solução inicial (lisado); (2) permeado total recolhido; (3) concentrado após diafiltração; (4-8) amostras de permeado para VDF de 0.04, 0.15, 0.5, 1.5 e 2.5 respectivamente. (oc) indica a isoforma circular-aberta; (sc) indica a isoforma super-enrolada.

Tabela 6.2: Proteína total e DNA genômico (gDNA) nos permeados após diafiltração (microfiltração) com diferentes tampões e as suas remoções (R_1) na operação de difiltração (testes MF-A, MF-B e MF-C). Valores iniciais medidos nos lisados: 200 $\mu\text{g/mL}$ de proteína total e 13.4 μg de gDNA.

Ensaio	Proteína [$\mu\text{g/mL}$]	R_1 (%)	gDNA [$\mu\text{g/mL}$]	R_1 (%)
MF-A	61	7.7	43.0	-865
MF-B	71	-6.3	18.1	-306
MF-C	172 ^a /45	14 ^a /33	2.4 ^a /5.5	71 ^a /-44

^a Imediatamente após precipitação com CaCl_2 .

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

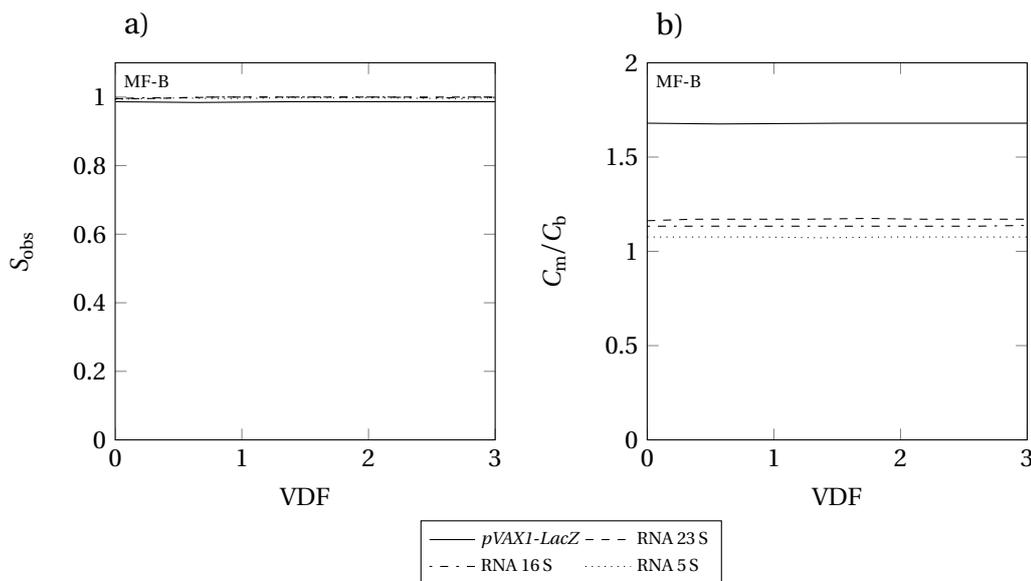


Figura 6.4: Permeações observadas (a) e polarização de concentração (b), para as várias espécies, em função do fator de diluição volumétrico (VDF) para os ensaios MF-B.

B. Teoricamente, não é previsível que as permeações de pDNA e RNA, ou mesmo as suas polarizações de concentração se alterem, tal como indicado na figura 6.4.

Os resultados experimentais, apresentados na figura 6.5, confirmam que a permeação de pDNA e dos contaminantes permanece elevada, com um ligeiro aumento no rendimento de recuperação do DNA plasmídico, que se observou ser (92.4 ± 0.4) % nestas condições. A retenção do pDNA foi de (4.4 ± 0.1) %, sugerindo assim um decréscimo na adsorção, o que conduz a uma melhor aproximação entre os resultados experimentais e as previsões teóricas. Como é possível verificar na tabela 6.2, a remoção de proteínas permaneceu baixa, mas observou-se uma variação significativa no conteúdo de gDNA nos permeados, obtendo-se uma redução de cerca de 60%. Este resultado sugere que a re-dissolução de gDNA pode de facto ser reduzida aumentando a força iónica do tampão de diafiltração. É possível que este aumento da força iónica possa ter dado origem a menores valores de re-dissolução de outros contaminantes, o que pode ter conduzido a uma menor adsorção do plasmídeo na membrana.

6.3.1.4 Ensaios MF-C

Estudou-se um novo aumento da força iónica da solução pela adição de 1 M de CaCl_2 aos lisados, antes da diafiltração, e pelo uso do tampão “C” (ver secção 6.2.2). A utilização do CaCl_2 teve também como finalidade precipitar o RNA presente. Estes ensaios são denominados ensaios MF-C. A adição de CaCl_2 aos lisados foi estudada previamente por Eon-Duval et al [16, 36] onde se demonstrou a eficácia deste sal na remoção de RNA por precipitação. Pela aplicação do modelo, é esperado que a adição de 1 M de CaCl_2 aos lisados não afete as permeações e polarização de concentração do plasmídeo e das várias espécies de RNA, tal como se pode verificar na figura 6.6. Só é esperado uma alteração para um poro com um raio inferior a 10 nm, tal como se pode ver comparando a figura 6.1 (a) com a figura 6.7 (a), e a figura 6.1 (b) com a figura 6.7 (b), respetivamente. Os cromatogramas de HIC dos lisados, antes e depois da adição de CaCl_2 , mostrados na figura 6.8, indicam que a concentração de pDNA não é afetada pela adição de CaCl_2 , ao mesmo tempo que mostram a elevada remoção dos contaminantes hidrofóbicos, tal como esperado. Durante o processo de diafiltração, a concentração destes compostos manteve-se muito reduzida, tal como se pode verificar a partir dos valores de remoção mostrados

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

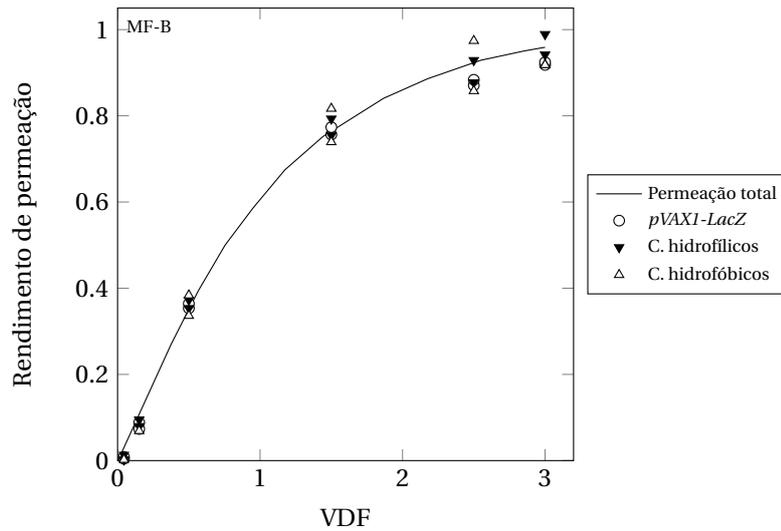


Figura 6.5: Rendimentos de permeação do pDNA, contaminantes hidrofílicos e contaminantes hidrofóbicos em função do fator de diluição volumétrico, para os ensaios MF-B.

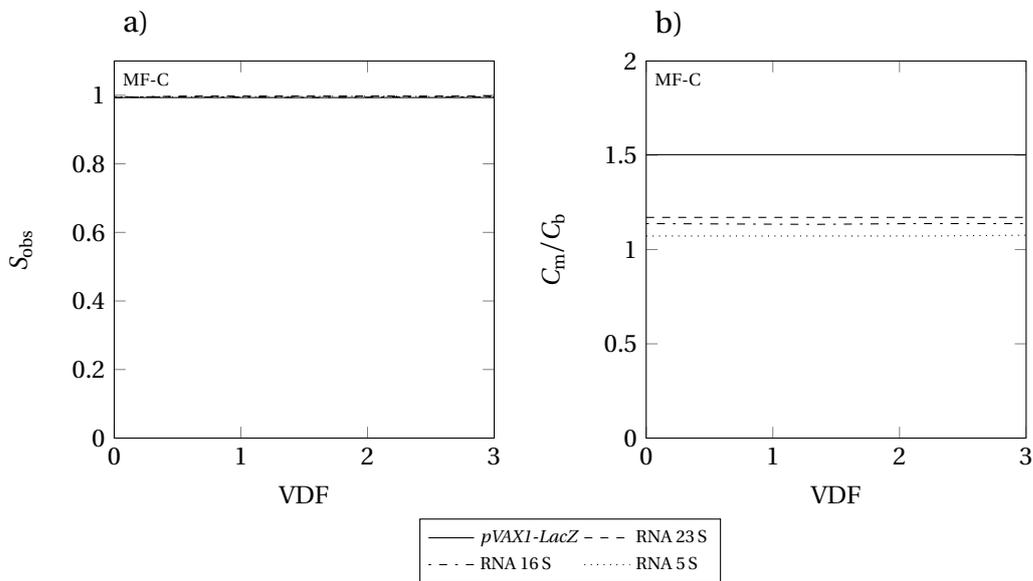


Figura 6.6: Permeações observadas (a) e polarização de concentração (b), para as várias espécies, em função do fator de diluição volumétrico (VDF) para os ensaios MF-C.

na figura 6.9. Obteve-se um rendimento de remoção destes contaminantes de 91% no final da diafiltração. A análise por eletroforese, mostrada na figura 6.10, confirma a elevada remoção do RNA conseguida com a adição de CaCl_2 , onde se pode constatar que praticamente todo o RNA de alto peso molecular (HMw RNA) e a maior parte do RNA de baixo peso molecular (LMw RNA), presente inicialmente nos lisados, é removido antes da diafiltração. Os contaminantes que não precipitam com a adição de CaCl_2 permeiam livremente pela membrana, tal como se pode verificar pelos valores de remoção obtidos exclusivamente para o passo de filtração, estando estes valores indicados na figura 6.9, onde são denominados por “apenas filtração”. Para além da elevada remoção de RNA obtida com a adição de CaCl_2 aos lisados, verificou-se também alguma precipitação de proteínas e especialmente gDNA (ver tabela 6.2). No entanto observou-se também uma maior adsorção de pDNA em comparação com os ensaios anteriores, cerca de 15%, como indicam os valores de rendimento de permeação, $(84 \pm 1)\%$, e de retenção, $(0.3 \pm 0.1)\%$.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

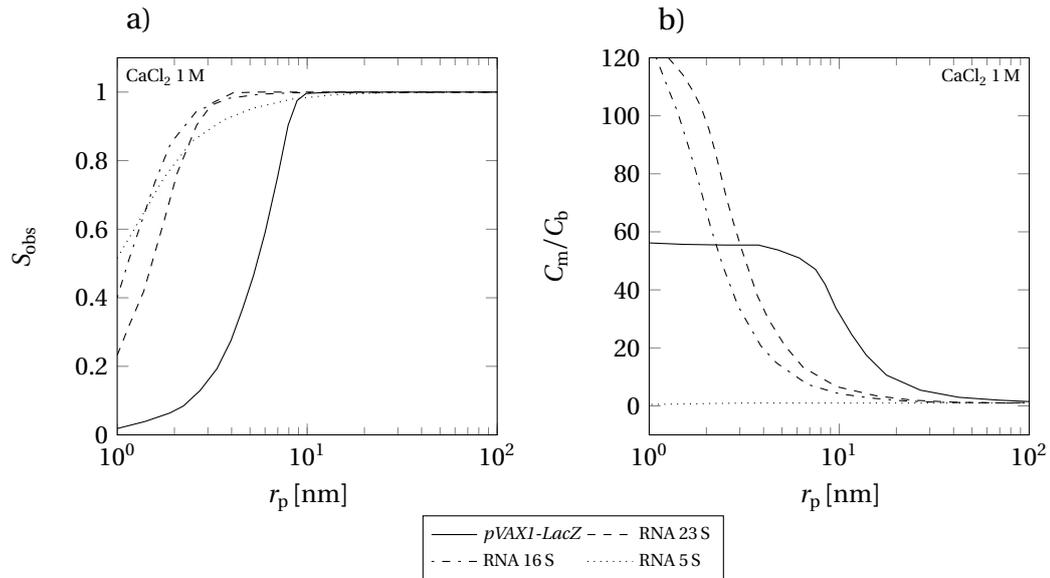


Figura 6.7: Previsão das permeações observadas (a) e da polarização de concentração (b) para o plasmídeo (usando o modelo CSC) e para as várias espécies de RNA (usando o modelo FJC), para as condições experimentais dos ensaios MF-C.

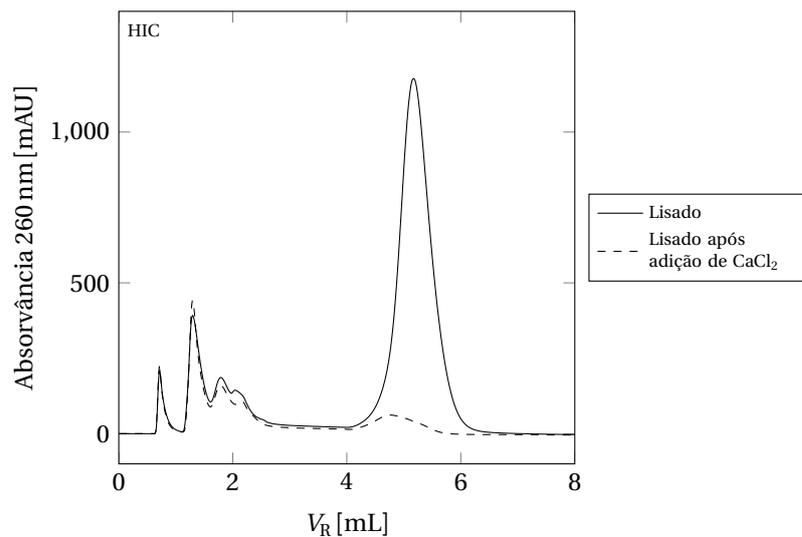


Figura 6.8: Cromatogramas de HIC típicos dos lisados, antes e após adição de CaCl₂.

6.3.2 Ensaios de ultrafiltração

Após concluída a operação de diafiltração sólido/líquido, testou-se uma segunda operação de membranas para concentrar, e ao mesmo tempo, purificar o plasmídeo. Para isso, utilizou-se uma membrana de ultrafiltração com um "cut-off" de 100 kDa, feita de um polímero fluorado, modelo *FS40PP* da *Alpha-Laval*, que tem um poro com um raio de 4.1 nm [64]. A concentração dos permeados provenientes dos testes MF-A, MF-B e MF-C foi efetuada à pressão constante de 1 bar e a um fator de concentração volumétrico (VCF) de 3.0. Estes ensaios são denominados UF-A, UF-B e UF-C. Obtiveram-se fluxos consideravelmente mais altos nos ensaios UF-C quando comparados com os valores obtidos nos restantes dois ensaios, o que provavelmente se ficou a dever à remoção prévia dos contaminantes hidrofóbicos, tal como se pode verificar na figura 6.11. No entanto, os rendimentos de recuperação mais altos registaram-se nos ensaios UF-A (97±2%) como indicado na figura 6.12. Nos ensaios UF-B

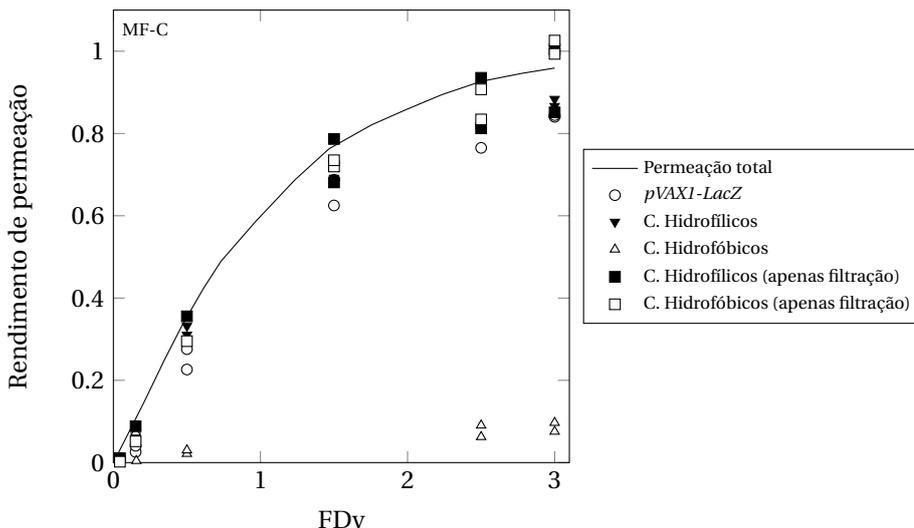


Figura 6.9: Rendimentos de permeação do pDNA, contaminantes hidrofílicos e contaminantes hidrofóbicos (ver secção 3.3) em função do fator de diluição volumétrico, para os ensaios MF-C.

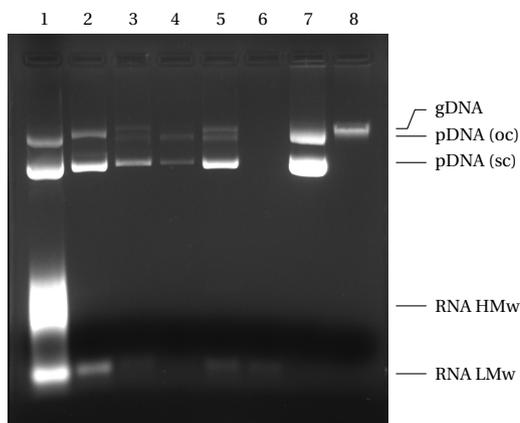


Figura 6.10: Análise por eletroforese horizontal em gel de agarose (1%) do processo MF-C/UF-C: (1) lisado antes da adição de CaCl_2 1 M; (2) lisado após adição de CaCl_2 1 M; (3) permeado da microfiltração; (4) concentrado da microfiltração; (5) concentrado da ultrafiltração; (6) permeado da ultrafiltração; (7) amostra purificada de *pVAX1-LacZ* pelo kit comercial da Qiagen; (8) Amostra de gDNA de *E. coli DH5 α* , purificado com o kit da Promega.

e UF-C, os rendimentos obtidos foram ($93\pm 2\%$) e ($89\pm 3\%$), respetivamente, tal como se pode verificar na mesma figura. Uma vez que a concentração de pDNA medida nos permeados foi consistentemente muito reduzida para os testes UF-B e UF-C, observaram-se valores significativos de adsorção, ~ 7 e $\sim 11\%$ respetivamente. Nos ensaios UF-A verificou-se uma menor ocorrência de adsorção ($\sim 3\%$). Observou-se permeação de contaminantes em todos os ensaios de ultrafiltração, o que levou a um significativo grau de purificação, dado que o plasmídeo foi sempre muito retido pela membrana. Para o caso dos contaminantes hidrofílicos, a sua remoção corresponde praticamente ao valor teórico considerando permeação total, que é igual a 66% para um fator de concentração volumétrico de 3.0. Para os contaminantes hidrofóbicos verificou-se uma remoção de 20–40 %, o que indica uma permeação observada de cerca de 0.5.

Considerando os valores experimentais de fluxo de permeado, as permeações observadas teóricas para o pDNA, e para as várias espécies de RNA, podem ser estimadas ao longo dos diferentes processos de concentração para interpretar as diferenças entre o comportamento do plasmídeo e dos contaminantes (ver figura 6.14). Como se pode observar na figura 6.14(a), são esperados valores reduzidos de

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

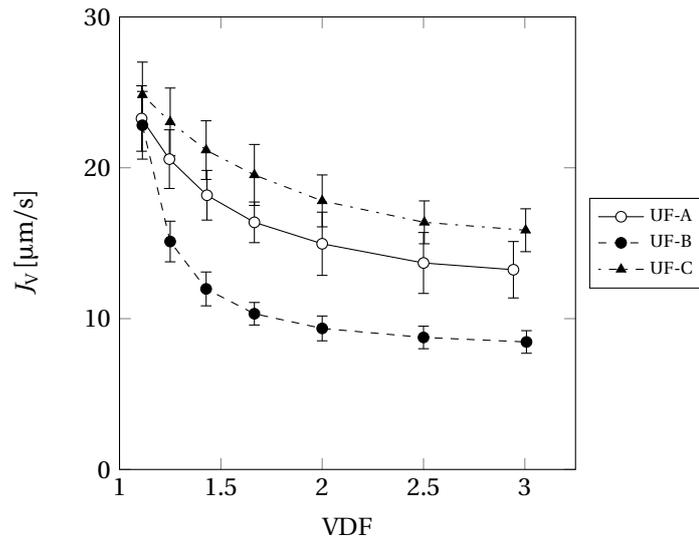


Figura 6.11: Fluxo de permeado em função do fator de concentração volumétrico (VCF) para os ensaios de ultrafiltração. Condições operatórias: $p = 1 \text{ bar}$, $\omega = 760 \text{ min}^{-1}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

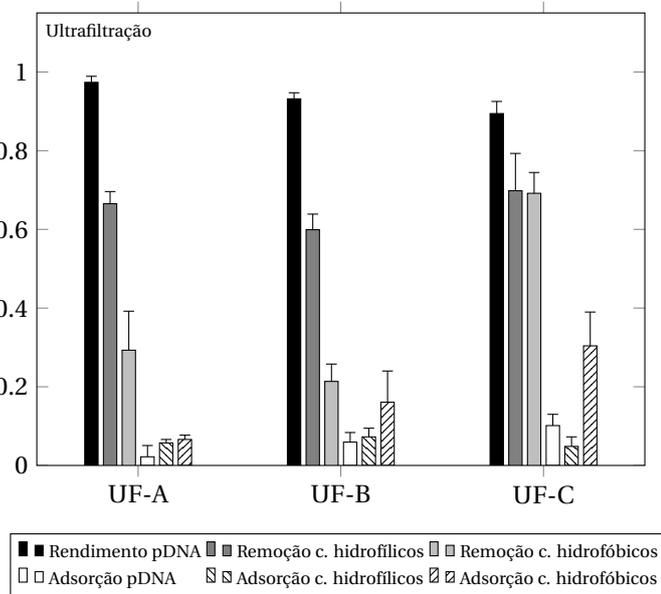


Figura 6.12: Valores experimentais, obtidos nos testes de ultrafiltração, de adsorção e de rendimento de recuperação de pDNA e de adsorção e rendimentos de remoção de contaminantes hidrofílicos e de contaminantes hidrofóbicos.

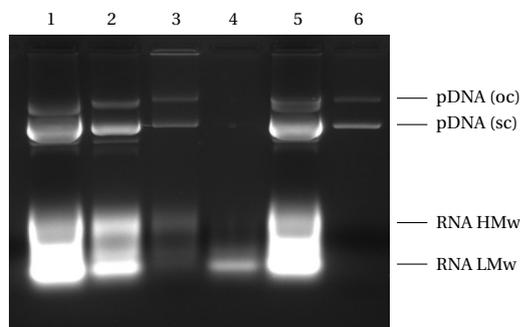


Figura 6.13: Análise por eletroforese horizontal em gel de agarose (1%) do processo MF-A/UF-A: (1) Lisado; (2) permeado da microfiltração; (3) concentrado da microfiltração; (4) permeado da ultrafiltração; (5) concentrado da ultrafiltração; (6) amostra purificada de *pVAX1-LacZ*.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

Tabela 6.3: Proteína total e DNA genómico (gDNA) nos concentrados dos ensaios de ultrafiltração e os seus rendimentos de remoção (R_2) na operação de ultrafiltração

Tampão	Proteínas [$\mu\text{g/mL}$]	R_2 (%)	gDNA [$\mu\text{g/mL}$]	R_2 (%)
“A”	64	65	92	28
“B”	166	22	44	20
“C”	55	59	17	-5

S_{obs} , ao longo do processo de ultrafiltração, um resultado que está de acordo com as reduzidas permeações observadas obtidas experimentalmente. Na mesma figura é ainda possível verificar que o modelo teórico prevê valores consideravelmente reduzidos de S_{obs} , quer para o RNA 23 S quer para o RNA 16 S. No entanto o mesmo não se verifica para o RNA 5 S, o que provavelmente explica os valores intermédios de permeação observada de RNA total, como mencionado anteriormente. Os resultados da análise por eletroforese, mostrados na figura 6.13, confirmam esta ideia. Pode-se observar, na mesma figura, que ambas as isoformas do plasmídeo são retidas pela membrana.

A polarização de concentração não foi excessiva durante os ensaios UF-A, como se pode observar a partir das simulações representadas na figura 6.14(b), o que provavelmente explica a menor adsorção do plasmídeo verificada nestes ensaios. Para os outros ensaios, o modelo prevê um aumento da polarização de concentração, devido ao aumento da força iónica, tal como se pode verificar nas figuras 6.14(d) e (f). Uma elevada polarização de concentração pode levar ou a uma maior permeação do plasmídeo (e RNA) ou a uma maior adsorção nos ensaios UF-B e UF-C, quando comparados com os ensaios UF-A. Tal como se pode concluir pela análise dos resultados experimentais, mostrados na figura 6.12, o aumento de polarização de concentração conduziu essencialmente a um aumento do valor da adsorção. Assim, as permeações observadas previstas, indicadas na figura 6.14(c) e (e), não são corretas devido à ocorrência de adsorção. A elevada tendência do pDNA para se adsorver em membranas, em condições de elevada polarização de concentração, foi previamente identificada no capítulo 5. Foi observada uma elevada permeação de proteínas através da membrana de ultrafiltração, com exceção dos ensaios com o tampão “B”, tal como se pode observar na tabela 6.3. Pela análise de lisados por SEC, discutida no capítulo 3, pode-se concluir que o material proteico presente nos lisados tem uma menor massa molecular que o LMw RNA, o que indica que deve permear pela membrana. No caso dos ensaios com o tampão “B”, a permeação de proteínas deverá ter sido influenciada pelo maior grau de colmatção da membrana, tal como se pode observar na figura 6.11.

Observou-se uma permeação significativa de gDNA para os tampões “A” e “B”, o que indica a presença de fragmentos de gDNA de menores dimensões que o plasmídeo, que por sua vez é retido. A maior remoção de gDNA foi verificada nos ensaios UF-A, seguidos dos ensaios UF-B e por fim dos ensaios UF-C, onde não se observou remoção de gDNA. Assim, quando a re-dissolução de gDNA é alta no passo de microfiltração a remoção é igualmente alta no passo de ultrafiltração (ver tabelas 6.2 e 6.3), o que sugere que a re-dissolução do gDNA é provocada pela quebra das cadeias. A partir dos dados de remoção de gDNA obtidos nos ensaios UF-A e UF-B (indicados na tabela 6.3) a massa molecular média dos fragmentos de gDNA que chegam à operação de ultrafiltração pode ser estimada como descrito em [11]. Considerando que estes fragmentos são compostos por DNA linear de dupla cadeia (dsDNA) o número de pares de bases deverá ser, de acordo com os cálculos efetuados em [11], 205 no caso do tampão “A” e 1700 no caso do tampão “B”. Estes valores correspondem a raios hidrodinâmicos de 16 nm e 59 nm, respetivamente, o que indica que estes fragmentos são consideravelmente menores que o plasmídeo usado, cujo raio hidrodinâmico é de 83 nm. Pode-se assim concluir que apesar do gDNA se re-dissolver no passo de microfiltração, os fragmentos resultantes podem ser removidos no passo de ultrafiltração. O grau de remoção pode ser assim melhorado com recurso a uma

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

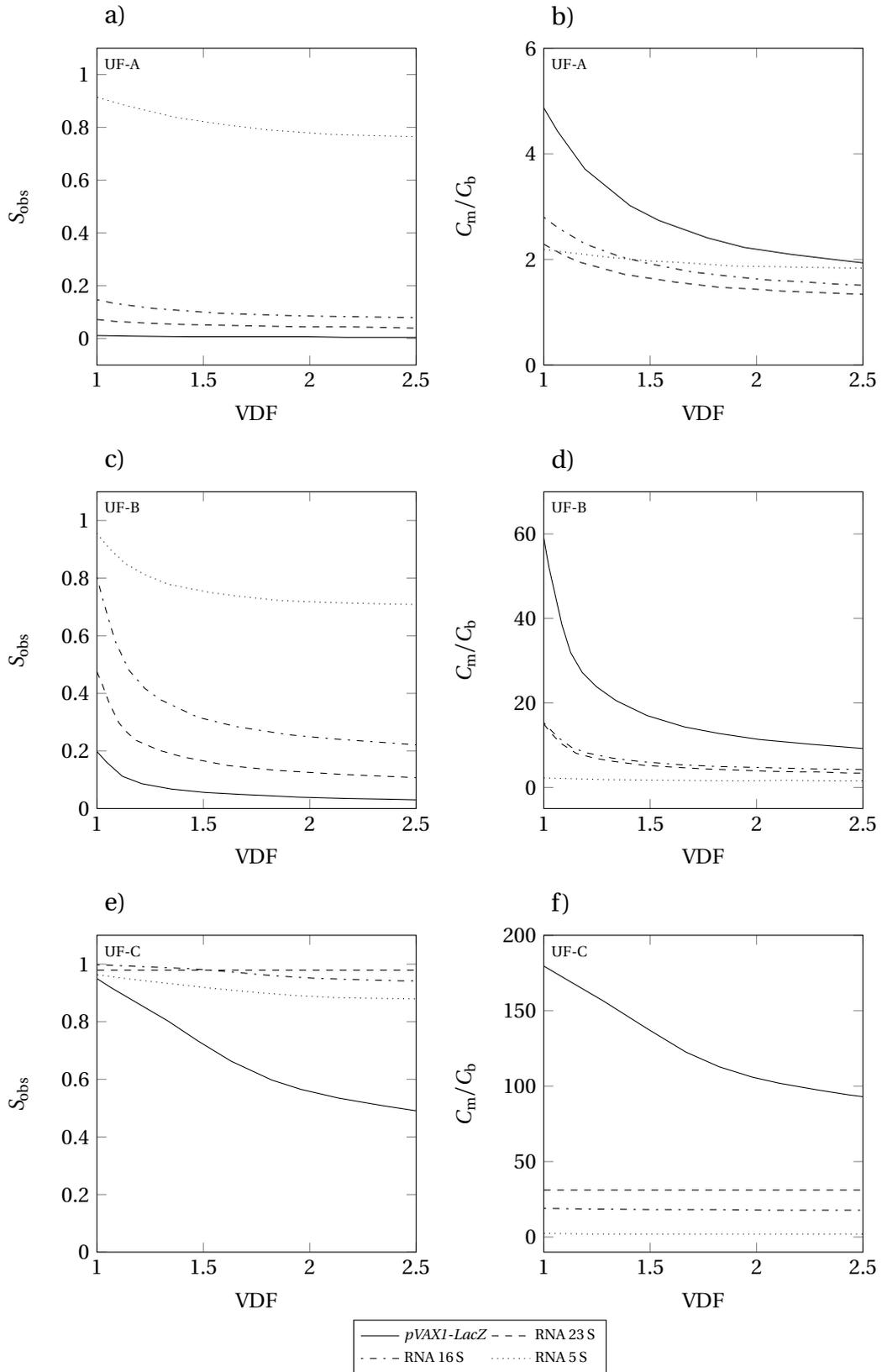


Figura 6.14: Permeação observada e polarização de concentração previstas em função do fluxo, para as espécies indicadas, ao longo dos ensaios de ultrafiltração (UF-A, UF-B e UF-C). Utilizaram-se os modelos CSC e FJC, considerando efeitos de carga, para $r_p = 4.1$ nm. Condições: J_V como indicado na figura 6.11, $\omega = 760 \text{ min}^{-1}$, $T = 25^\circ\text{C}$.

diafiltração neste segundo passo, uma vez que o plasmídeo é retido pela membrana. No entanto, e em especial para o caso do RNA de alto peso molecular (HMw RNA), não é esperado que se venham a obter rendimentos de remoção muito elevados, dado os reduzidos valores verificados da permeação desta biomolécula. No capítulo 7 a separação pDNA/RNA é estudada em melhor detalhe.

6.4 Conclusões

Os modelos teóricos desenvolvidos de transferência de massa para cadeias CSC e FJC, usados para prever a permeação de pDNA e RNA na microfiltração de lisados, e subsequente concentração, foram aplicados com sucesso, uma vez que os resultados obtidos nos dois passos de membranas podem ser explicados com base neste desenvolvimento teórico.

A recuperação de um plasmídeo com 6050 bp, a partir de lisados, foi efetuada de forma eficiente por uma operação de microfiltração, usando uma membrana hidrofílica de Nylon, com um tamanho de poro nominal de 0.2 μm . Este tamanho de poro, bem como as condições operacionais, foi selecionado com base nas previsões teóricas para que se evite, quer uma excessiva polarização de concentração do plasmídeo, quer a adsorção do mesmo na superfície da membrana. Verificou-se que outros contaminantes, nomeadamente RNA, proteínas e gDNA, permeiam através da membrana de microfiltração juntamente com o plasmídeo. A adição de CaCl_2 1 M aos lisados conduziu à remoção quase completa do RNA, tal como esperado pelos resultados encontrados na literatura. Verificou-se igualmente que a adição deste sal reduziu significativamente o conteúdo de gDNA nos lisados, gDNA esse que tende a se re-dissolver durante a operação de microfiltração, o que se observou em todos os ensaios. Um aumento da força iónica da solução de diafiltração pode reduzir esta tendência, no entanto não a elimina por completo.

Estudou-se uma operação de ultrafiltração para purificar e concentrar o plasmídeo após a microfiltração. Apesar do RNA de alto peso molecular ser completamente retido pela membrana, observou-se alguma permeação de RNA de baixo peso molecular, tal como previsto pelo modelo. Proteínas e gDNA podem ser consideravelmente removidos por ultrafiltração. A elevada permeabilidade dos fragmentos de gDNA na operação de ultrafiltração pode ser explicada pelos seus reduzidos tamanhos, que se estimou serem consideravelmente inferiores ao plasmídeo usado. Assim, apesar de se verificar uma significativa re-dissolução de gDNA no passo de microfiltração, os fragmentos presentes em solução são de tamanho reduzido e podem ser separados do plasmídeo num passo de ultrafiltração.

Capítulo 7

Modelação e aplicação prática da separação pDNA/RNA por ultrafiltração

7.1 Introdução

Como referido no capítulo 1, na última década tem sido efetuado um enorme esforço de investigação na área da recuperação e purificação de DNA plasmídico (pDNA) a partir de caldos de fermentação, com o objetivo de facilitar a sua produção em larga-escala, para aplicações em terapia génica e para a formulação de vacinas de DNA [12, 1, 65]. Os processos de separação com membranas estão presentes em praticamente todas as áreas da biotecnologia, numa grande variedade de aplicações [31, 33], e revelam o mesmo potencial de aplicação em processos de produção de DNA plasmídico [1, 12, 20].

A recuperação e posterior purificação de pDNA a partir de caldos de fermentação, que pode ser efetuada por variadas técnicas, tipicamente envolve um passo de lise celular seguido por uma operação de separação sólido-líquido, subsequente precipitação de pDNA com álcoois tais como etanol ou isopropanol (ou mesmo outros agentes precipitantes), ressuspensão do concentrado de pDNA e sua posterior separação de RNA e outros contaminantes por técnicas de adsorção, que tipicamente são técnicas cromatográficas. Estas técnicas cromatográficas são igualmente necessárias, num grande número de esquemas de purificação, para obter a isoforma super-enrolada do plasmídeo, pDNA(sc), com os requisitos de qualidade do produto final, impostos pelas entidades reguladoras, tais como a FDA (U.S. Food and Drug Administration) e a EMA (“European Medicines Agency”) [12, 1, 17].

Operações de membranas foram utilizadas com sucesso para obter a colheita de células, a partir de caldos de fermentação, não só em processos de produção de pDNA como também em processos similares que envolvem suspensões celulares [12, 129, 130, 131] e igualmente para a seletiva retenção de detritos celulares, resultantes do processo de lise, permitindo a permeação de moléculas de pDNA [16, 11, 32]. Estas operações foram já igualmente utilizadas na concentração de pDNA, com simultânea troca de tampão e remoção de micro-solutos, a seguir a operações de purificação cromatográfica, assim como para a esterilização do produto final [12, 40, 35]. Para além destas aplicações, as operações de membranas podem ser uma alternativa viável na fase da concentração e pré-purificação do pDNA antes da cromatografia, substituindo o uso de solventes e outros agentes precipitantes.

A aplicação da ultrafiltração para efetuar a separação entre pDNA e RNA, assim como outros contaminantes, tem vindo a ser estudada por vários autores independentes. Kendall et al [38] estudaram a purificação de pDNA através da adsorção seletiva de contaminantes em membranas de nitrocelulose. O procedimento desenvolvido permitiu remover quantidades significativas de RNA, DNA genómico e outros contaminantes hidrofóbicos. No entanto, os problemas relacionados com a colmatação e a reduzida capacidade de membranas para atuarem como materiais adsorventes, podem ser sérias limitações da aplicação prática deste método. Eon-Duvall et al [16] adicionaram cloreto de cálcio aos lisados e efetuaram uma subsequente operação de ultrafiltração para obter uma quase completa remoção de RNA. O facto de ser necessário utilizar uma elevada quantidade de CaCl_2 é assim uma desvantagem do método. Kahn et al [18] estudaram a aplicação da ultrafiltração de diferentes plasmídeos para obter a concentração de pDNA, e a sua separação do RNA, após um processo modificado de lise alcalina. Este método contempla um aumento do tempo de incubação (24 horas) durante a lise para obter uma degradação do RNA presente e assim obter elevados graus de purificação de pDNA com

uma única operação de ultrafiltração. No entanto, o processo desenvolvido tem a desvantagem de conter elevados tempos de incubação para ser possível efetuar a separação, e não é claro que o pDNA não possa igualmente sofrer alguma degradação nestas condições. Freitas et al [32] utilizaram um processo de ultrafiltração para efetuar uma recuperação intermediária de pDNA antes de um passo final de purificação. Apesar de obterem rendimentos de recuperação de pDNA elevados, o rendimento de remoção de RNA revelou-se ser modesto.

Tendo em conta o estudo prévio, descrito no capítulo anterior, neste capítulo é investigada a possibilidade de otimizar a operação de ultrafiltração, procurando obter uma elevada retenção de pDNA e uma permeação alta dos principais contaminantes, com especial enfoque no RNA. A purificação de dois plasmídeos diferentes, *pVAX1-LacZ* e *pCAMBIA-1303*, com 6050 bp e 12361 bp respetivamente, usando duas membranas de ultrafiltração distintas, é estudada numa célula de filtração agitada. Os efeitos do tamanho do poro das membranas, da velocidade de agitação e do fluxo de filtração na separação entre pDNA e RNA, bem como no grau de colmatção das membranas, são interpretados com base no modelo desenvolvido para a permeação de macrosolutos flexíveis em membranas com poros de menores dimensões (capítulos 4–6). Para obter um termo comparativo, é avaliada a performance de um processo de isolamento intermediário alternativo, com base em duas operações de precipitação seletiva, usado com regularidade em laboratório e com o qual se obtêm resultados satisfatórios no âmbito do isolamento intermediário de pDNA [17, 32].

7.2 Materiais e métodos

7.2.1 Produção de pDNA e lise celular

Bactérias *E. coli* DH5 α , contendo um plasmídeo de 6050 bp (*pVAX1-LacZ*), e bactérias *E. coli* XL1 blue, contendo um plasmídeo de 12361 bp (*pCAMBIA-1303*) foram produzidas por fermentação, usando as mesmas condições de crescimento descritas em [132]. As bactérias com o plasmídeo *pVAX1-LacZ* foram cultivadas no meio Terrific broth (12 g/L de triptona (*Sigma*), 24 g/L de extrato de leveduras (*Fluka*), 4 mL/L de glicerol (*Himedia*), 0.017 M de KH_2PO_4 (*Panreac*) e 0.072 M de K_2HPO_4 (*Panreac*), e as bactérias contendo o plasmídeo *pCAMBIA-1303* cultivadas em meio Luria Bertani (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de leveduras, 10 g/L de NaCl (*Panreac*), pH 7.00). A lise celular foi obtida por um método modificado de lise alcalina, originalmente desenvolvido por Birnboim e Doly [24]. Resumidamente, a 4 mL de uma suspensão de bactérias a 120 g/L (peso húmido), em tampão T₅₀E₁₀ (50 mM Tris (*Fisher BioReagents*) e 10 mM EDTA (*Sigma*), pH 8.00), foram adicionados 4 mL de uma solução de 0.2 M de NaOH (*Panreac*) e 1% SDS (*Himedia*). Após 5 min de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados 4 mL de uma solução previamente arrefecida (4°C) de 3 M de acetato de potássio (*Sigma-Aldrich*) a pH 5.00, com o pH ajustado com ácido acético (*Panreac*). Após agitação suave, a suspensão obtida foi incubada em gelo durante 15 min antes de ser processada por microfiltração.

7.2.2 Clarificação de lisados - Microfiltração

O lisado alcalino obtido, contendo uma grande quantidade de sólidos em suspensão, foi filtrado por microfiltração usando uma membrana hidrofílica de Nylon (Nylaflo, *Pall*), com um tamanho de poro nominal de 0.2 μm . Foi efetuada uma diafiltração continua numa célula de filtração agitada, com geometria “dead-end”, com 50 mL de capacidade (modelo 8050, *Millipore*). A velocidade de agitação foi mantida a 100 min^{-1} e o caudal de permeado ajustado, e mantido, em 1 mL/min através de uma bomba peristáltica (modelo 403U/VM2, *Watson Marlow*) colocada a jusante da membrana, operando assim por sucção. O volume de lisado processado em cada ensaio foi de 10 mL. O volume da sus-

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

pensão no interior da célula de filtração foi mantido constante através da contínua adição de Tris/HCl 10 mM a pH 8.00 (tampão Tris), que foi alimentado à célula de filtração através de uma segunda bomba peristáltica (modelo 101U/R, *Watson Marlow*), ao mesmo caudal. A filtração foi concluída após a recolha de um total de 30 mL de permeado. Nestas condições espera-se um rendimento de recuperação de plasmídeo no permeado de cerca de 95%, considerando que o plasmídeo não é retido pela membrana, fazendo uso da equação do balanço de massa para o modo de diafiltração a volume constante (equação 3.7, capítulo 3).

7.2.3 Ultrafiltração

Os ensaios de ultrafiltração foram efetuados numa célula de filtração Amicon 8010, com geometria “dead-end” (*Millipore*). Em todos os ensaios, o volume inicial de lisado alcalino microfiltrado foi de 10 mL, tendo-se recolhido 9 mL de permeado, o que equivale a um fator de concentração volumétrico (VCF) igual a 10. Testaram-se duas membranas distintas: uma membrana de 100 kDa de “cut-off” de polímero fluorado (FS40PP, *DSS/Alfa-laval*) e uma membrana de 300 kDa de “cut-off” de polietersulfona (Biomax 300, *Millipore*). Estas membranas foram previamente caracterizadas, em relação ao tamanho de poro, através do modelo de poros simétricos (SPM) desenvolvido por Morão et al [47]. O caudal de permeado foi mantido constante através do uso de uma bomba peristáltica (modelo 101U/R, *Watson Marlow*), colocada a jusante da membrana. A velocidade de agitação foi ajustada a 100 ou a 760 min⁻¹, com calibração prévia.

7.2.4 Isolamento intermediário usando tecnologias de membranas

Foram efetuados três conjuntos de ensaios, para o isolamento intermediário de pDNA, com o objetivo de melhorar os valores de remoção de RNA, recorrendo a uma operação de diafiltração. Os ensaios foram todos efetuados em triplicado, tendo-se obtido uma boa reprodutibilidade entre os mesmos. O esquema dos ensaios efetuados, bem como as principais condições operatórias utilizadas, estão representados na figura 7.1 e tabela 7.1, respetivamente. As experiências foram conduzidas numa célula de filtração agitada, com 10 mL de capacidade, com geometria “dead-end” (Amicon 8010, *Millipore*). A agitação foi mantida a 760 min⁻¹ em todos os ensaios. O caudal de permeado foi imposto através de uma bomba peristáltica (WM101U/R, *Watson Marlow*). Foram usadas novamente as membranas FS40PP e Biomax 300. Antes de se iniciar a filtração, as membranas foram lavadas com a filtração de pelo menos 30 mL de água MilliQ (*Millipore*). Após lavagem das membranas, as suas permeabilidades hidráulicas foram medidas através da determinação do fluxo de água em função da pressão transmembranar, pressão esta imposta pela ligação da célula de filtração a uma garrafa de azoto pressurizado. Foram colocados inicialmente na célula 10 mL de permeado proveniente da microfiltração do lisado. O permeado foi concentrado a um fator de concentração volumétrico (VCF) predefinido (ver tabela 7.1), segundo o método descrito na secção 7.2.3. Após concluída a concentração, foi efetuada uma diafiltração com aproximadamente 4 volumes de diafiltração (V_{DF}) de Tris/HCl 10 mM a pH 8.00 (tampão Tris), ao mesmo caudal, e utilizando uma segunda bomba peristáltica (WM403U/R, *Watson Marlow*). Foram recolhidas amostras da solução inicial antes da concentração (permeado da microfiltração), do concentrado após diafiltração e do permeado conjunto da fase de concentração e da fase de diafiltração, para posterior análise. Para aferir o grau de colmatção irreversível das membranas usadas, no fim dos ensaios a célula foi lavada com água MilliQ, com agitação suave e breve, e a permeabilidade hidráulica novamente determinada.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

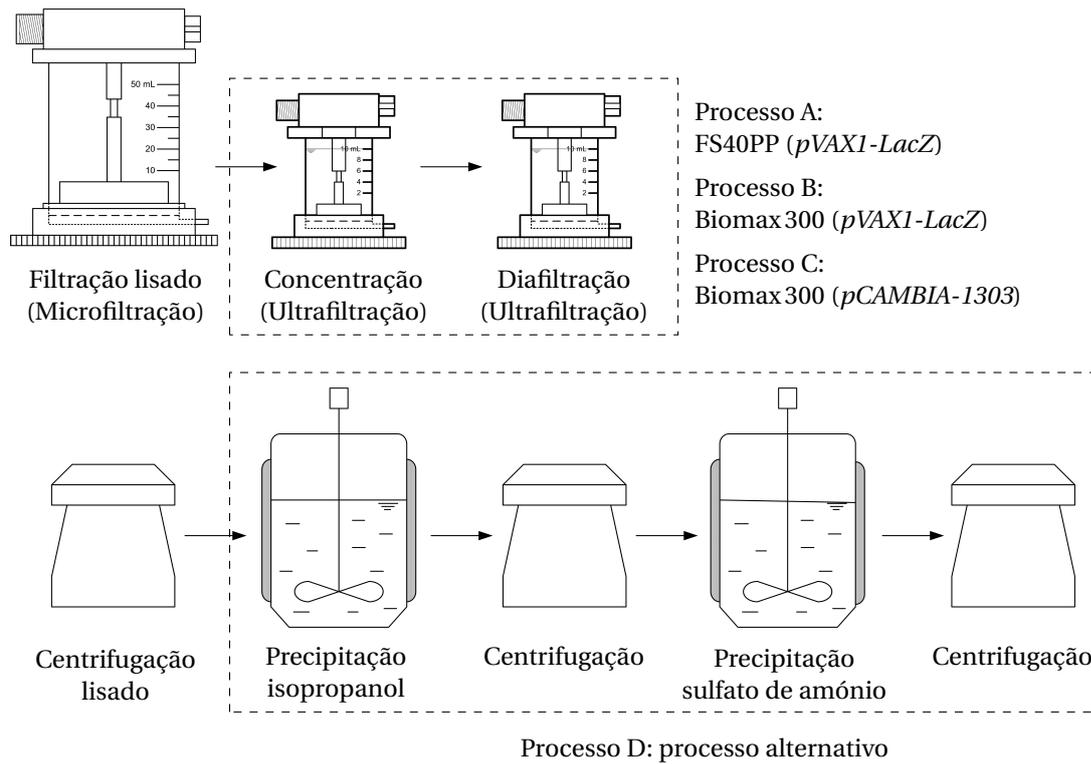


Figura 7.1: Esquema dos processos estudados de isolamento intermediário de pDNA. A tracejado encontram-se as operações consideradas nos cálculos. Os processos A–C usam exclusivamente operações de membranas. O processo D consiste no procedimento de isolamento intermediário alternativo, descrito em [17]. As condições operatórias para os processos A–C estão especificadas na tabela 7.1.

7.2.5 Isolamento intermediário alternativo

Para se obter um termo comparativo, em relação aos resultados obtidos com os ensaios de ultrafiltração/diafiltração, foi igualmente estudado um processo de isolamento intermediário alternativo (Processo D, figura 7.1), regularmente usado em laboratório [17, 32]. Foi efetuado o procedimento descrito em [17]. O lisado, proveniente da lise alcalina, foi centrifugado duas vezes a 19 000 g, durante 30 min e a 4°C, numa centrífuga Allegra 25R (*Beckman Coulter*). Ao sobrenadante obtido (8 mL) foram adicionados 0.7 volumes de isopropanol (*Fischer*). Após 30 min de incubação em gelo, a suspensão foi centrifugada durante 30 min, a 16 000 g e 4°C, na mesma centrífuga. Após remoção do sobrenadante, o “pellet” foi dissolvido em 2.5 mL de tampão Tris. Foi adicionado sulfato de amônio (*Prolabo, VWR*) até perfazer uma concentração de 2.5 M. Após incubação durante 15 min em gelo, a suspensão foi centrifugada a 16 000 g, durante 20 min e 4°C, numa centrífuga Mikro 200R (*Hettich*). Foram recolhidas amostras ao longo do processo para posterior análise.

Tabela 7.1: Condições operatórias, utilizadas nos processos com base em tecnologias de membrana, para efetuar o isolamento intermediário de pDNA.

Processo	Membrana	pDNA	$J_V \times 10^6$ [m/s]	ω [min^{-1}]	VCF	V_{DF} [mL]
“A”	FS40PP	<i>pVAX1-LacZ</i>	4.2	760	8	3.8
“B”	Biomax 300	<i>pVAX1-LacZ</i>	2.4	760	8.4	4
“C”	Biomax 300	<i>pCAMBIA-1303</i>	2.4	760	8.4	4

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

7.2.6 Parte analítica

7.2.6.1 Quantificação de pDNA e RNA

A concentração de plasmídeo nas várias amostras foi determinada pelo método desenvolvido por Diogo et al [88]. Resumidamente, uma coluna HIC *source 15 PHE*, da *Amersham Biosciences (GE Healthcare)* foi conectada a um sistema de FPLC (*Åkta purifier*) da *GE Healthcare*. A coluna foi inicialmente equilibrada com 1.5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em tampão tris. As amostras (20 μL) foram injetadas e eluídas a um caudal constante de 1 mL/min. Ao fim de 2 min após a injeção, o eluente foi instantaneamente mudado para tampão Tris para eluir as espécies adsorvidas. Este tampão foi mantido por mais 4 min antes de se re-equilibrar a coluna para a preparar para a próxima injeção. A absorvância do eluído foi registada a 260 nm. A concentração de pDNA em cada amostra foi calculada por intermédio de uma reta de calibração, preparada com padrões de pDNA obtidos com um kit de purificação (*Maxi kit, Qia-gen*). Este método está descrito em detalhe no capítulo 3, onde se propõe que a concentração de RNA pode igualmente ser estimada.

7.2.6.2 Eletroforese em gel de agarose

As amostras foram analisadas por eletroforese horizontal, em gel de 1.0% de agarose (*Grisp*), preparado em tampão TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético e 1 mM de EDTA, pH 8.00), complementado com o corante *GreenSafe (NZYTech)*. As análises decorreram a 110 V, durante 40 min, numa célula da *BioRad*. Os géis foram visualizados num transiluminador da *Uvitec*, modelo *Essential V2*. Para concentrar, e/ou evitar possíveis interferências provocadas pelos sais presentes, algumas amostras foram dessalinizadas, através de precipitação com isopropanol, tal como descrito no capítulo 6.

7.2.7 Simulações

Para efetuar uma otimização da operação de ultrafiltração, com o intuito de obter uma elevada retenção de pDNA e uma elevada permeação de RNA, efetuaram-se simulações, quer para um sistema de 3 componentes contendo a macromolécula de interesse (pDNA ou RNA, componente 1), ião acetato (componente 2) e ião potássio (componente 3), quer para um sistema de 4 componentes contendo o plasmídeo, uma espécie de RNA (23S, 16S ou 5S), o ião acetato e o ião potássio. Nas simulações utilizou-se o método descrito nos capítulos 2, 5 e 6. Apesar de nos lisados microfiltrados existirem outros sais presentes em solução, os iões CH_3COO^- e K^+ são, por larga margem, os que se encontram em maior quantidade, sendo os principais responsáveis pelos efeitos de carga que afetam em grande medida a polarização de concentração de macrosolutos (pDNA e RNA) que são altamente carregados negativamente.

O modelo de transferência de massa anteriormente desenvolvido permite estimar a permeação de macrosolutos em membranas com poros de reduzidas dimensões, ou seja, poros com um raio médio inferior ao raio de giração do macrosoluto, sendo que este último deverá apresentar alguma flexibilidade. Este modelo foi originalmente desenvolvido para moléculas lineares, que foram modeladas como cadeias de ligação livre (FJC), nomeadamente para pDNA linear e para polissacáridos lineares (capítulo 4). O modelo foi estendido ao caso de macrosolutos de cadeia fechada, através da sua representação pelo modelo de cadeias fechadas segmentadas (CSC), discutido nos capítulos 2 e 5. De facto, verificou-se que a equação obtida, que relaciona o rácio entre o raio de giração da molécula e o raio do poro com o coeficiente de partição, pode ser usada quer para cadeias FJC quer para cadeias CSC (capítulo 5). Apesar de uma molécula de pDNA poder ser modelada como uma FJC, a representação CSC é, aparentemente, uma melhor aproximação por permitir obter valores de raio de giração em melhor concordância com os valores encontrados na literatura. O modelo desenvolvido pode igualmente ser

Tabela 7.2: Principais componentes do lisado microfiltrado e as suas propriedades mais relevantes para fins de modelação.

Componente	C_b [mol/m ³]	M_w [Da]	$r_s \times 10^9$ [m]	$r_g \times 10^9$ [m]	$D \times 10^{12}$ [m ² /s]
CH ₃ COO ⁻	3.17×10^2	59	0.227		1089
K ⁺	3.17×10^2	39	0.125		1950
RNA 5S	2.26×10^{-3a} 8.45×10^{-4b}	40800	3.39	5.10	72.9 ^c
RNA 16S	1.06×10^{-4a} 8.99×10^{-5b}	523940	13.6	20.5	18.2 ^c
RNA 23S	5.63×10^{-5a} 4.77×10^{-5b}	987360	17.8	26.8	13.9 ^c
<i>pVAX1-LacZ</i>	4.47×10^{-6a}	3993000	83.1	87.3	2.97 ^d
<i>pCAMBIA-1303</i>	6.39×10^{-7b}	8158260	134	138.7	1.85 ^d

^a Lisados provenientes da produção de *pVAX1-LacZ*

^b Lisados provenientes da produção de *pCAMBIA-1303*

^c Valores obtidos no capítulo 6

^d Valores obtidos em [82]

usado para prever a permeação de RNA, considerando-o uma molécula linear, ou seja, utilizando o modelo FJC, tal como indicado no capítulo 6, onde se aplicou o modelo de 3 componentes para prever a permeação das principais espécies de RNA presentes nos lisados, nomeadamente os RNA's 23S, 16S e 5S, de forma individual.

Neste capítulo investiga-se a possível mútua interferência entre pDNA e RNA nas suas permeações, considerando um sistema de 4 componentes. A inclusão de um maior número de componentes no modelo representa uma interpretação mais realista do fenómeno mas aumenta consideravelmente a complexidade dos cálculos e o esforço computacional necessário. Para além disso, tal como mostrado mais à frente, a principal interferência é o efeito do pDNA na permeação do RNA e não o contrário, sendo que este último efeito pode ser simulado com um sistema de 4 componentes.

As simulações do processo de ultrafiltração foram levadas a cabo considerando um cenário de filtração numa célula agitada, com 10 mL de solução inicial (permeado da microfiltração), em condições de fluxo e velocidade de agitação constantes e em modo de concentração, cenário este consistente com o procedimento experimental descrito na secção 7.2.3. As concentrações iniciais das macromoléculas e sais usados nas simulações, assim como as suas propriedades mais relevantes, estão indicadas na tabela 7.2. As várias propriedades das moléculas foram determinadas pelos métodos discutidos na secção 3.2.

7.3 Resultados e discussão

7.3.1 Simulações

Para proceder à otimização de uma operação de ultrafiltração, com o objetivo de concentrar o pDNA e simultaneamente proceder à sua separação do RNA presente, o raio do poro da membrana, r_p , e o fluxo de filtração, J_V , devem ser os primeiros parâmetros a considerar. Em seguida, deve-se testar o material da membrana, nomeadamente em termos da sua suscetibilidade à colmatação e adsorção de plasmídeo, que deve ser o mais reduzida possível. Assim, os efeitos de r_p e J_V nas permeações das moléculas indicadas na tabela 7.2 foram estimados antes dos ensaios experimentais. As previsões foram efetuadas considerando quer o modelo de 3 componentes, quer o modelo de 4 componentes, descritos na secção 7.2.7, em condições ideais de ausência de colmatação e adsorção de pDNA e RNA.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

O efeito previsto das diferentes moléculas de RNA na permeação observada, S_{obs} , do plasmídeo *pVAX1-LacZ*, calculada pelos dois modelos propostos, é analisado na figura 7.2. Obtiveram-se resultados semelhantes para o plasmídeo *pCAMBIA-1303* (resultados não mostrados). Como é possível constatar, observa-se apenas um ligeiro decréscimo de S_{obs} , o que leva a concluir que este efeito pode ser desprezado (pelo menos para as concentrações consideradas nos cálculos). Apesar da presença das moléculas de RNA não interferirem significativamente na permeação de pDNA, a presença de pDNA influencia consideravelmente a permeação das moléculas de RNA. Como se pode observar na figura 7.4, um significativo decréscimo de S_{obs} é previsto, especialmente a altos valores de fluxo e para as espécies de RNA de alto peso molecular (ou seja, RNA 23S e 16S). Os resultados das simulações podem ser interpretados considerando a polarização de concentração esperada para cada componente, expressa pelo rácio C_m/C_b , onde C_m é a concentração junto à superfície da membrana e C_b é a concentração no seio da solução. Os valores calculados de C_m/C_b para o plasmídeo *pVAX1-LacZ*, e para as várias espécies de RNA, estão indicados nas figuras 7.5 e 7.6, respetivamente, para o caso de $r_p = 5$ nm (para $r_p = 15$ nm e $r_p = 25$ nm podem ser obtidas conclusões semelhantes). Como é possível constatar na figura, existe uma maior acumulação de moléculas de pDNA junto à membrana, por comparação com as moléculas de RNA, o que é consequência dos menores coeficientes de difusão das moléculas de pDNA. Esta acumulação de pDNA afeta a acumulação de RNA (e provavelmente de outras moléculas carregadas negativamente presentes em solução, que não foram consideradas neste estudo) reduzindo a polarização de concentração por efeitos de repulsão eletrostática. Como é sabido, o decréscimo de polarização de concentração de um componente reduz a sua permeação observada. O efeito da presença de moléculas de RNA na polarização de concentração de pDNA é claramente menos significativo, o que se deve ao facto das moléculas de RNA apresentarem um tamanho inferior e serem menos carregadas negativamente (assim, só para concentrações altas de RNA são esperados efeitos significativos).

Comparando os resultados obtidos para os dois plasmídeos, pode-se observar que, para além do efeito da presença das moléculas de RNA ser semelhante, os valores de S_{obs} , quer para o plasmídeo *pVAX1-LacZ* quer para o plasmídeo *pCAMBIA-1303*, são semelhantes pese embora os dois plasmídeos apresentem tamanhos distintos, tal como se pode observar na figura 7.3. A independência de S_{obs} com o tamanho das moléculas de pDNA é um resultado previamente reportado na literatura [59, 61, 60]. No entanto, deve-se ter especial cuidado na interpretação deste resultado uma vez que, tal como indicado na tabela 7.2, as concentrações dos dois plasmídeos nos lisados apresentam quase uma ordem de grandeza de diferença entre si. Sendo moléculas com elevada carga negativa, os efeitos do potencial elétrico na camada de polarização, contabilizados na equação estendida de Nernst-Planck (secção 2.5), desempenham um importante papel na permeação deste tipo de biomoléculas. À medida que a concentração de pDNA aumenta é gerado um gradiente do potencial elétrico, de valor negativo, mais acentuado na camada de polarização, facto que leva a uma redução do grau de polarização e consequentemente do valor de S_{obs} .

Para se obter uma separação satisfatória entre pDNA e RNA é necessário obter, simultaneamente, valores reduzidos de S_{obs} de pDNA e valores elevados de S_{obs} das moléculas de RNA na operação de ultrafiltração. Dado que a permeação observada das moléculas de RNA é praticamente independente de J_v , facto originado pela presença das moléculas de pDNA (ver figura 7.4), a utilização de um fluxo elevado não garante por si só uma elevada permeação destas moléculas. Para o conseguir, pode-se optar por utilizar membranas com poros de maiores dimensões (pelo menos de 25 nm de raio). Assim, considerando que a permeação de pDNA pode ser mantida relativamente baixa aplicando fluxos de filtração de reduzido valor ($1 - 3 \mu\text{m/s}$) para $r_p = 25$ nm (tal como indicado na figura 7.2), pode-se concluir que a melhor opção será realizar a operação de ultrafiltração a baixos fluxos e utilizando membranas com 20 – 25 nm de raio de poro.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

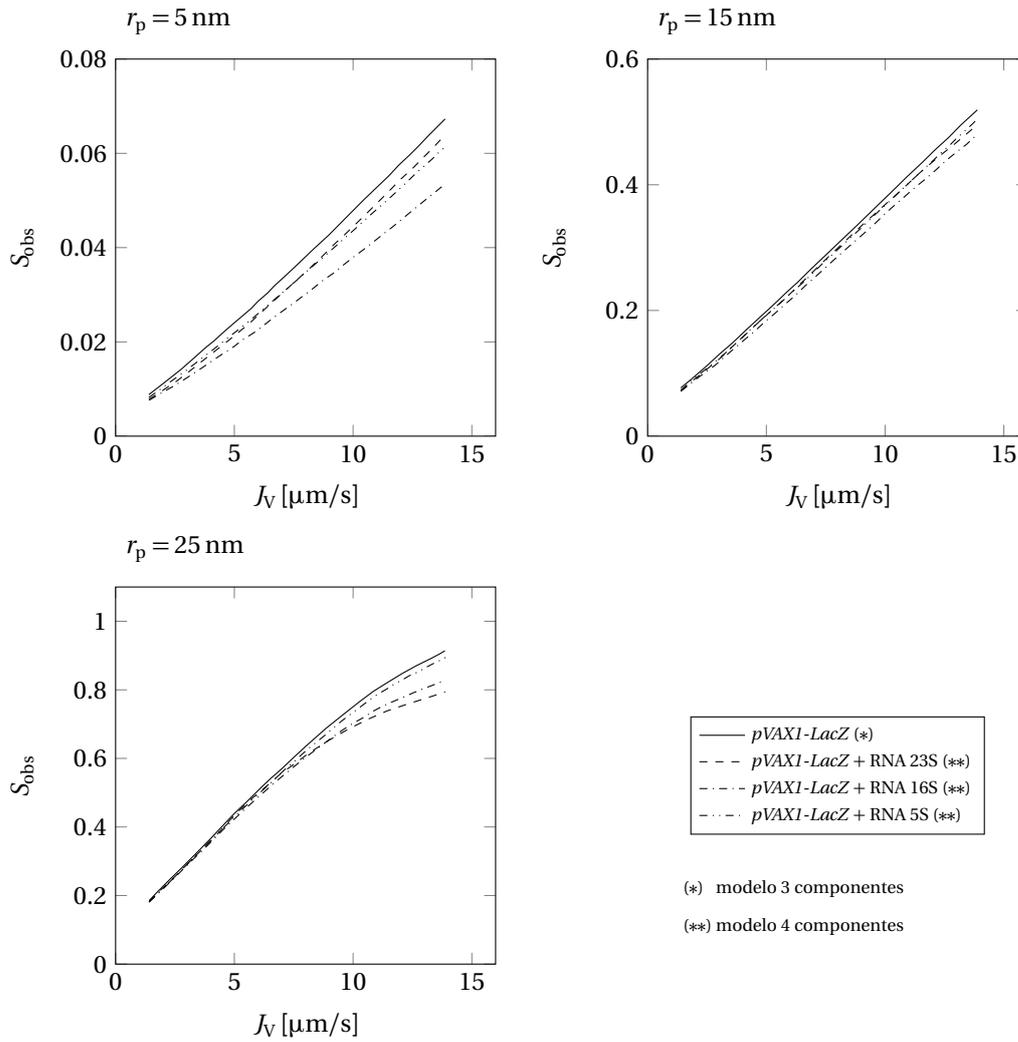


Figura 7.2: Valores de S_{obs} do plasmídeo $pVAX1-LacZ$, calculados com os modelos de 3 e 4 componentes para a célula de filtração Amicon 8010, em função do fluxo de permeado, para diferentes valores de r_p . Os restantes dados foram: $\omega = 760\text{ min}^{-1}$, $[\text{CH}_3\text{COOK}] = 316\text{ mol/m}^3$ e $T = 298\text{ K}$.

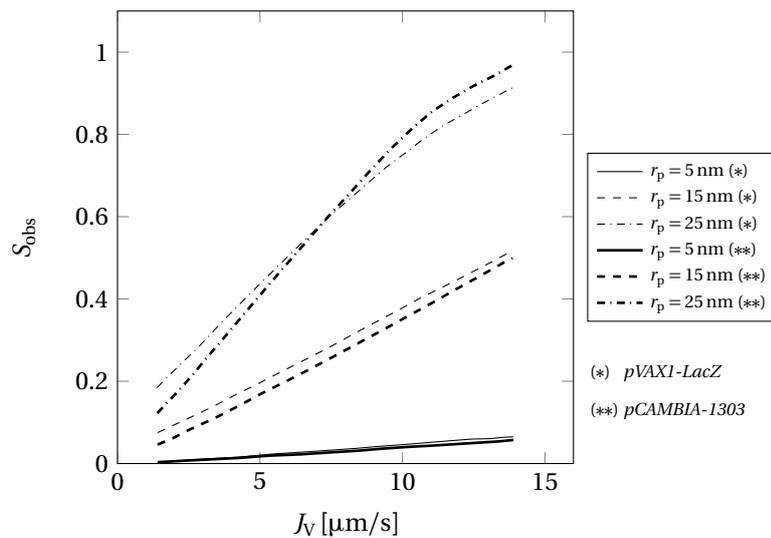


Figura 7.3: Valores de calculados de S_{obs} dos plasmídeos $pVAX1-LacZ$ e $pCAMBIA-1303$ em função do fluxo de filtração, para vários valores de r_p .

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

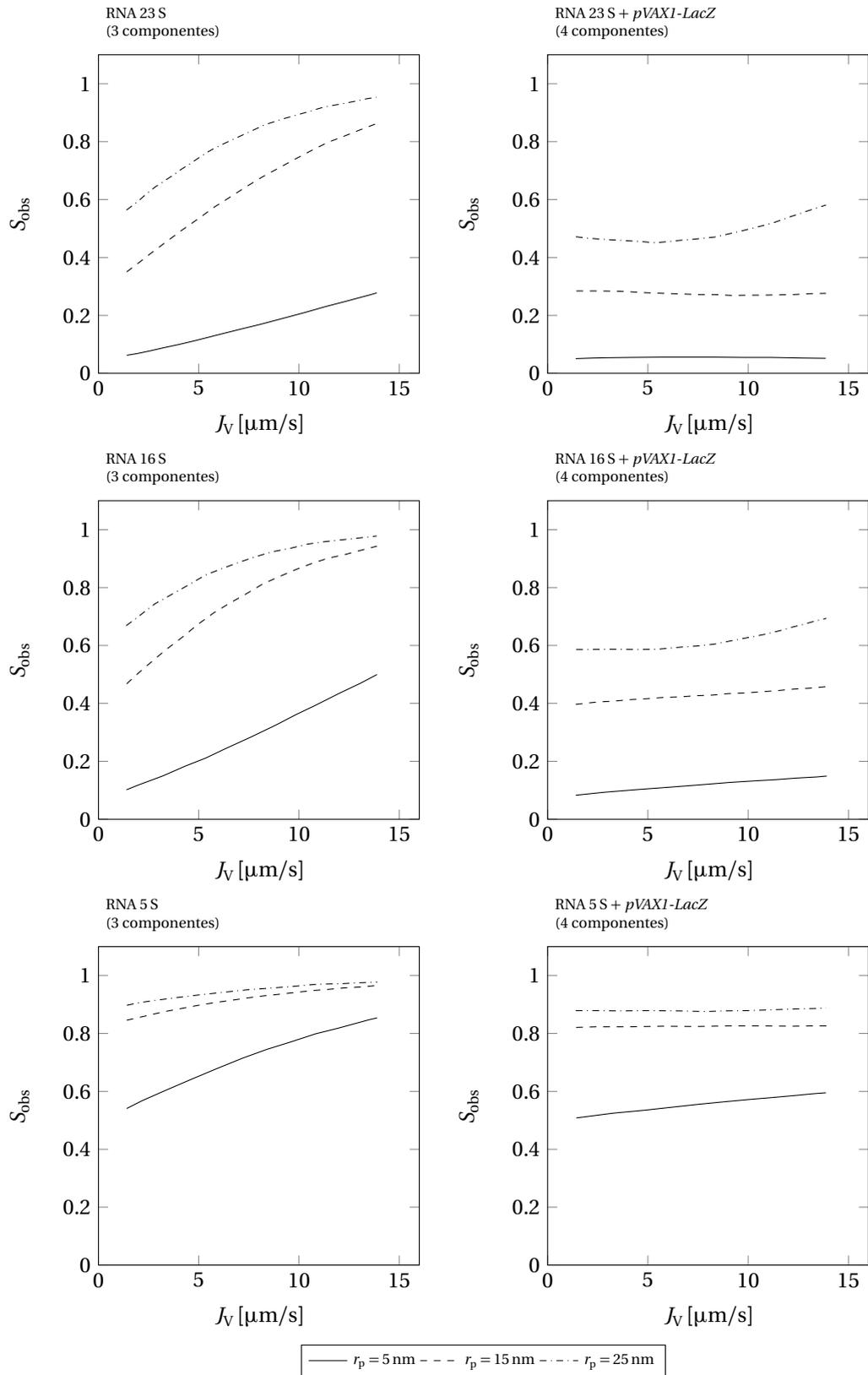


Figura 7.4: Valores calculados de S_{obs} das várias espécies de RNA, obtidos pelos modelos de 3 e 4 componentes para a célula de filtração Amicon 8010, em função do fluxo de permeado. Os cálculos foram efetuados para uma velocidade de agitação de 760 min^{-1} , $[\text{CH}_3\text{COOK}] = 316 \text{ mol/m}^3$ e $T = 298 \text{ K}$.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

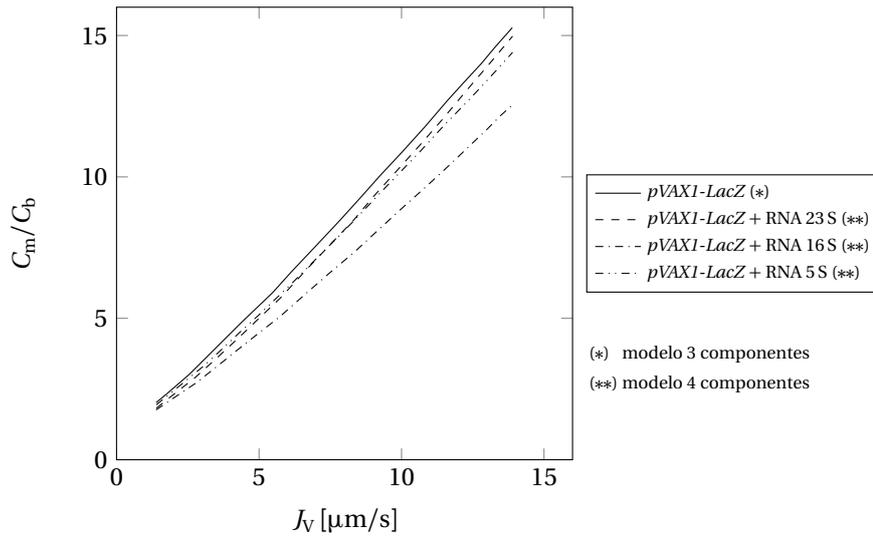


Figura 7.5: Polarização de concentração estimada, expressa pelo rácio C_m/C_b , para o plasmídeo *pVAX1-LacZ*, em função do fluxo de permeado. Cálculos feitos com os modelos de 3 e 4 componentes, para a célula de filtração Amicon 8010, com $r_p = 5 \text{ nm}$, $\omega = 760 \text{ min}^{-1}$ e $[\text{CH}_3\text{COOK}] = 316 \text{ mol/m}^3$.

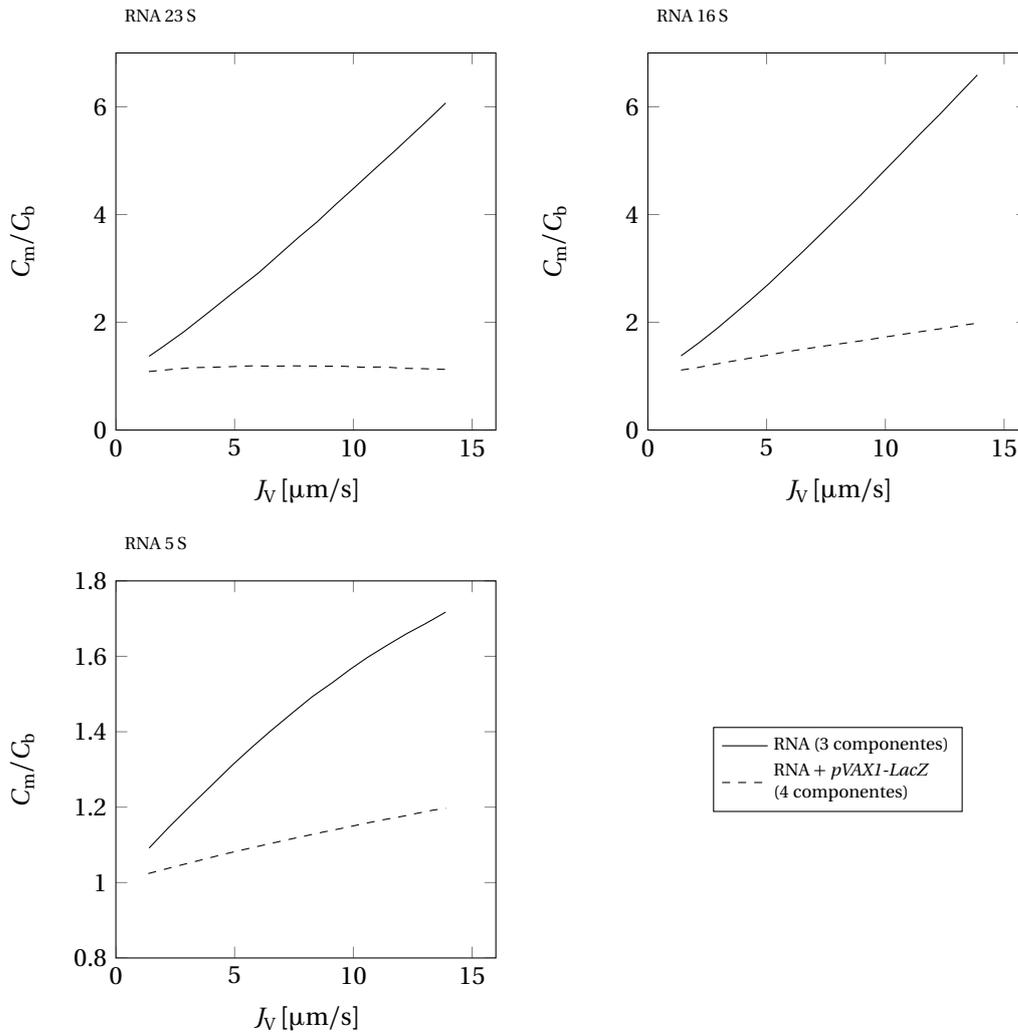


Figura 7.6: Polarização de concentração estimada, expressa pelo rácio C_m/C_b , para as várias espécies de RNA, em função do fluxo de permeado. Cálculos feitos com os modelos de 3 e 4 componentes, para a célula de filtração Amicon 8010, com $r_p = 5 \text{ nm}$, $\omega = 760 \text{ min}^{-1}$ e $[\text{CH}_3\text{COOK}] = 316 \text{ mol/m}^3$.

7.3.2 Resultados experimentais - Ultrafiltração

Para avaliar as conclusões obtidas, referidas na secção anterior, foram realizados ensaios de ultrafiltração dos lisados microfiltrados de *pVAX1-LacZ* e *pCAMBIA-1303*, utilizando duas membranas distintas, uma com $r_p = 4.8$ nm [47] e outra com $r_p = 25$ nm, de 100 e 300 kDa respetivamente, referidas na secção 7.2.3. O valor de $r_p = 25$ nm foi obtido experimentalmente pela medição das permeações observadas dos dextransos T70 e T500. Foram usadas duas velocidades de agitação (100 e 760 min^{-1}) e diferentes valores de fluxo no intervalo $1.4 - 8.3$ $\mu\text{m/s}$ ($5 - 30$ $\text{L/h}\cdot\text{m}^2$).

Os resultados obtidos, para um fator de concentração volumétrico (VCF) igual a 10, estão representados na figura 7.7. O rendimento de recuperação de pDNA foi calculado como o rácio entre a quantidade de pDNA presente no volume total de permeado recolhido e a quantidade de pDNA presente no volume de permeado da operação de microfiltração (MFP) processado em cada ensaio. O rendimento de remoção de RNA foi calculado como $1 - (V_p C_{\text{RNA,p}}) / (V_{\text{MFP}} C_{\text{RNA,MFP}})$, onde $C_{\text{RNA,p}}$ representa a concentração no volume total de permeado, $C_{\text{RNA,MFP}}$ é a concentração de RNA no MFP, V_p é o volume de permeado recolhido e V_{MFP} é o volume de MFP processado em cada ensaio.

Como se pode verificar na figura 7.7, a utilização da membrana com $r_p = 25$ nm, a baixos fluxos de filtração, é claramente a melhor opção para obter, simultaneamente, um elevado rendimento de recuperação de pDNA e um elevado rendimento de remoção de RNA. Para a membrana com $r_p = 4.8$ nm, a remoção do RNA 23S e 16S é reduzida, tal como se pode constatar pela análise da figura 7.8. Para a membrana com $r_p = 25$ nm observa-se uma elevada permeação de todas as espécies de RNA (figura 7.8), em todo o intervalo de fluxos considerados nos ensaios, no entanto, só para valores reduzidos de fluxo se consegue obter um elevado rendimento de recuperação de pDNA.

Para comparar os resultados experimentais com as previsões do modelo, efetuaram-se os cálculos do rendimento de recuperação de pDNA e do rendimento de remoção de RNA através dos modelos de 3 e 4 componentes, respetivamente, uma vez que a presença das moléculas de RNA apresenta uma reduzida influência na permeação de pDNA. Os valores de remoção total de RNA, indicados na figura 7.7, foram obtidos a partir das concentrações iniciais de cada tipo de RNA (tabela 7.2) e da remoção estimada das diferentes espécies de RNA, indicada na figura 7.8. Como se pode constatar na figura 7.7, as previsões da remoção de RNA total estão de acordo com os resultados experimentais, embora se observe uma ligeira tendência para se verificarem rendimentos de recuperação de pDNA mais altos do que o previsto, assim como rendimentos de remoção de RNA total mais reduzidos. Esta tendência indica que as permeações destas moléculas foram inferiores ao previsto, facto que pode sugerir alguma ocorrência de colmatação.

O sucesso da aplicação de uma operação de ultrafiltração, para separar pDNA e RNA, com a membrana de 25 nm foi igualmente testado por eletroforese (figura 7.9). Como se pode observar, usando a membrana de 25 nm (*Biomax 300*) os permeados da ultrafiltração (UFP) contêm quantidades significativas de RNA e simultaneamente reduzidas quantidades de pDNA. Observa-se igualmente uma clara permeação de HMw RNA, o que indica que a separação do pDNA, quer do HMw RNA quer de LMw RNA, pode assim ser obtida. Para a membrana de 4.8 nm (FS40PP), observa-se um comportamento distinto na medida em que a grande maioria do RNA é retido pela membrana, em especial o HMw RNA, o que está de acordo com as previsões do modelo.

7.3.3 Resultados isolamento intermediário

Os resultados obtidos para os vários processos de isolamento intermediário de pDNA encontram-se na tabela 7.3. Para as condições operatórias escolhidas na realização dos vários ensaios verifica-se uma reduzida colmatação das membranas, colmatação essa representada pelo rácio entre a permeabilidade hidráulica das membranas no fim dos ensaios e as suas permeabilidades iniciais ($L_{p,f}/L_{p,0}$).

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

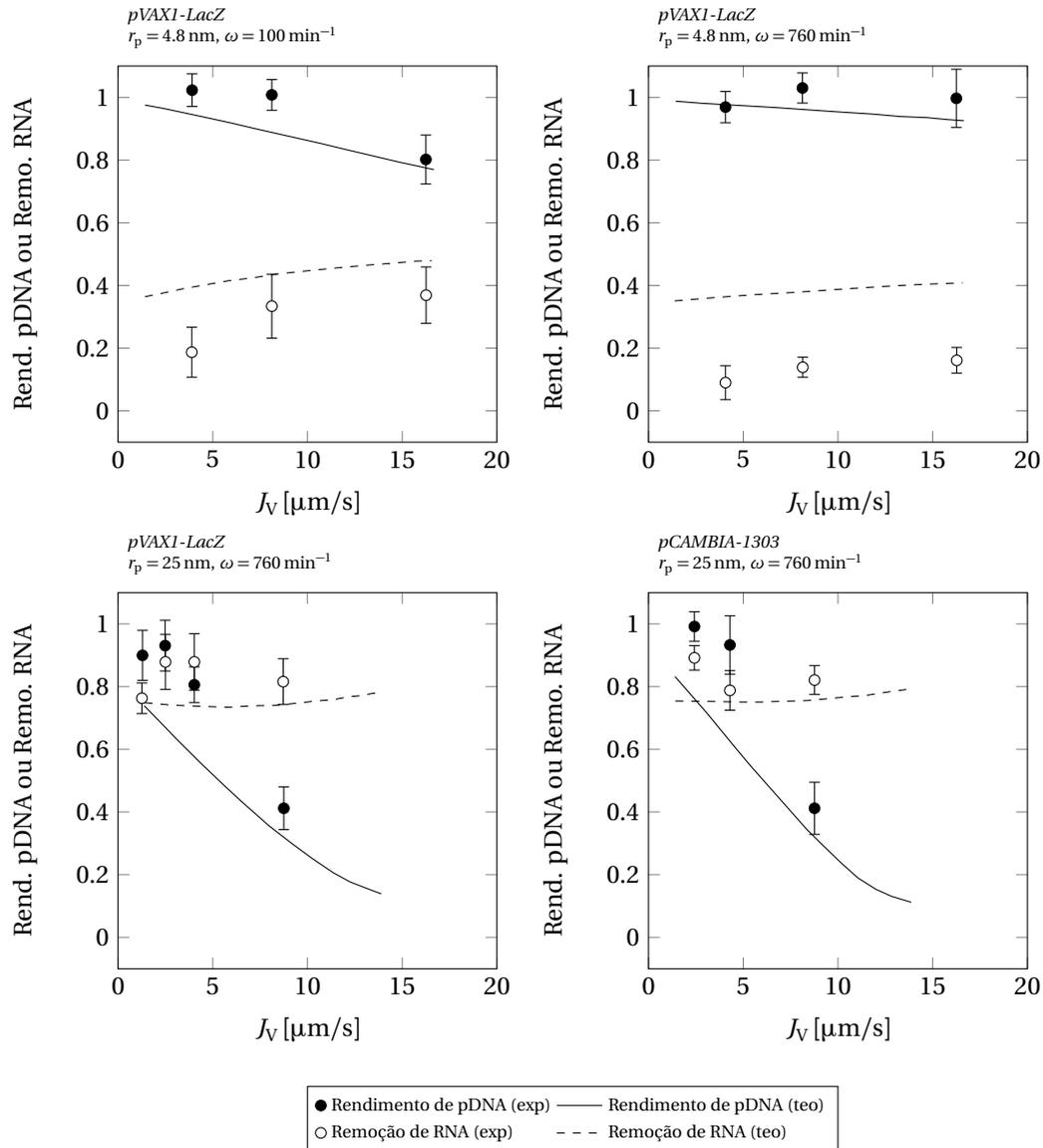


Figura 7.7: Rendimentos de recuperação de pDNA e rendimentos de remoção de RNA, determinados experimentalmente, comparados com as previsões teóricas para o processo de filtração (concentração do MFP com duas membranas distintas a $VCF=10$). Na figura está igualmente indicado o raio do poro e a velocidade de agitação usada em cada ensaio.

Este fator pode ter especial importância do ponto de vista de aplicação prática, uma vez que pode proporcionar um aumento no número de ciclos de utilização entre lavagens (ou substituição) de membranas, sendo este parâmetro um dos principais fatores de impacto ambiental e económico deste tipo de processos [32].

Com a utilização da membrana com o poro de menores dimensões (FS40PP, Processo A), obtiveram-se elevados rendimentos de recuperação de pDNA, sendo este o processo que apresentou melhor performance neste domínio (tabela 7.3). No entanto, o rendimento de remoção de RNA obtido foi modesto, estando de acordo com os resultados obtidos no capítulo 6. Contudo, é importante referir que este processo pode ainda assim ser útil no contexto do isolamento intermediário de pDNA, por exemplo em operações de concentração e de troca de tampão, dado os valores elevados de rendimento de recuperação de pDNA obtidos e o reduzido grau de colmatação das membranas verificado nestes ensaios.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

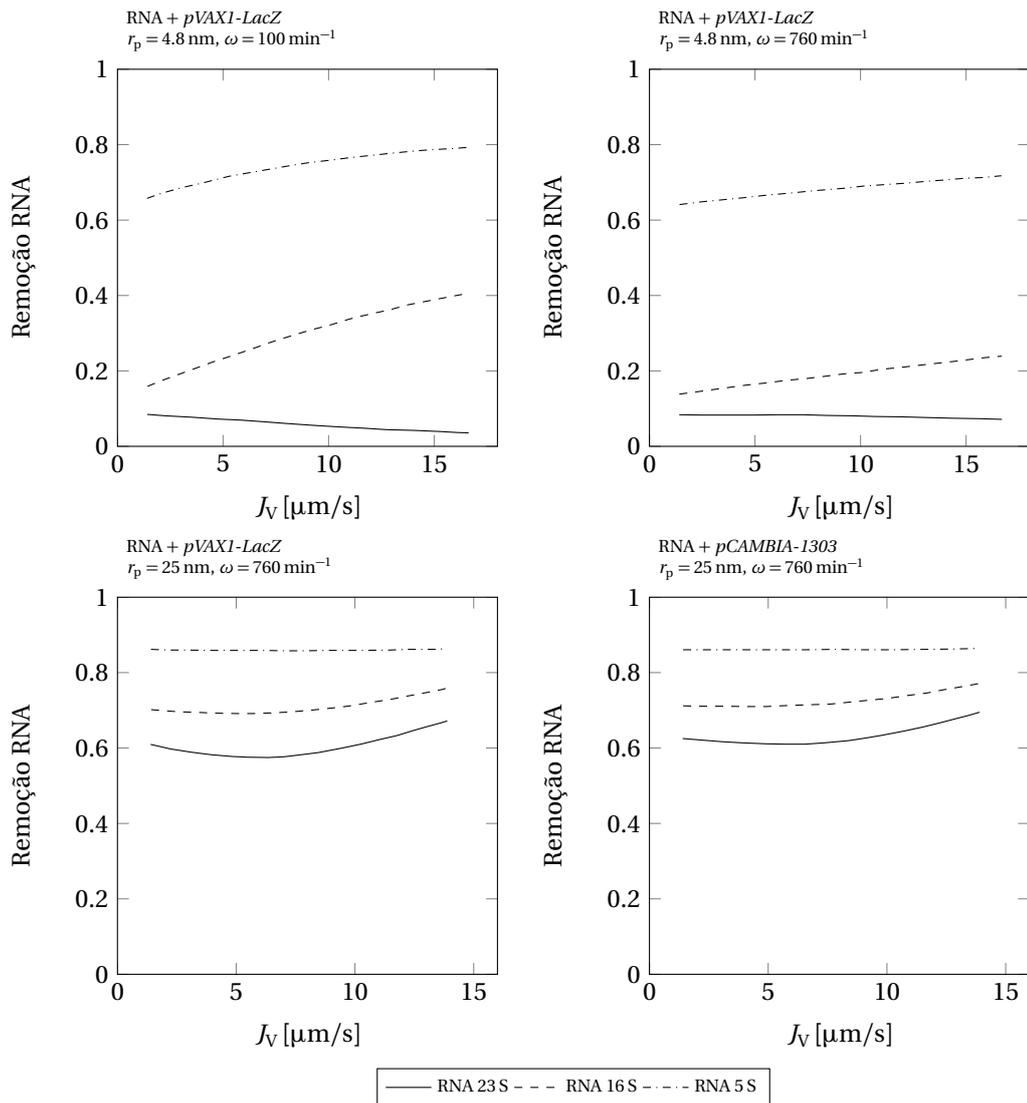


Figura 7.8: Valores calculados de remoção de RNA no processo de ultrafiltração estudado (concentração do MFP com duas membranas distintas, a VCF = 10). Na figura está igualmente indicado o tamanho de poro e a velocidade de agitação utilizada em cada ensaio.

Tal como referido anteriormente, para obter rendimentos de remoção de RNA mais elevados é necessário utilizar uma membrana com um poro de maiores dimensões. Assim, foi utilizada uma membrana de 300 kDa de “cut-off” (Biomax 300, $r_p = 25$ nm). Procurou-se melhorar o valor de remoção de

Tabela 7.3: Resultados obtidos nos vários processos de isolamento intermediário estudados. Os valores encontram-se representados em percentagem com a indicação do respetivo desvio padrão obtido.

Processo	$L_{p,f}/L_{p,0}$	R_{pDNA}^a	R_{RNA}^b	Pureza ^c
“A”	97.3 ± 1.7	98.6 ± 3.1	19.2 ± 6.1	9.53 ± 0.3
“B”	87.2 ± 1.6	82.1 ± 2.8	96.5 ± 1.3	63.34 ± 6.1
“C”	86.1 ± 1.0	95.7 ± 5.0	96.6 ± 1.1	38.99 ± 2.5
“D”		88.6 ± 8.0	88.0 ± 1.9	35.74 ± 2.1

^a Rendimento de recuperação de pDNA

^b Rendimento de remoção de RNA

^c Pureza cromatográfica nas análises de HIC

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

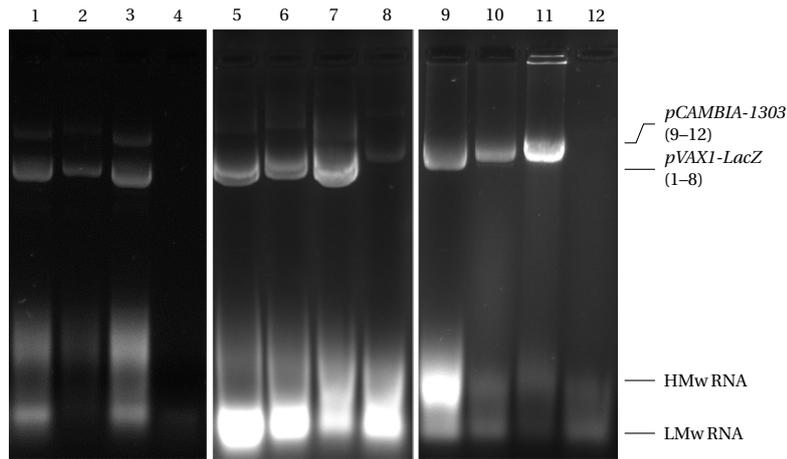


Figura 7.9: Análise por AGE dos seguintes ensaios: (1–4) MF do lisado da fermentação *pVAX1-LacZ* seguida de UF a $3.7 \mu\text{m/s}$ e $\omega = 760 \text{ min}^{-1}$, com a membrana *FS40PP* (1-lisado, 2-MFP, 3-UFC, 4-UFC). (5–8) MF do lisado da fermentação do *pVAX1-LacZ* seguida de UF a $2.4 \mu\text{m/s}$ e $\omega = 760 \text{ min}^{-1}$ com a membrana *Biomax 300* (5-lisado, 6-MFP, 7-UFC, 8-UFP). (9–12) MF do lisado da fermentação com *pCAMBIA-1303* seguido de UF a $2.4 \mu\text{m/s}$ e $\omega = 760 \text{ min}^{-1}$ com a membrana *Biomax 300* (9-lisado, 10-MFP, 11-UFC, 12-UFP).

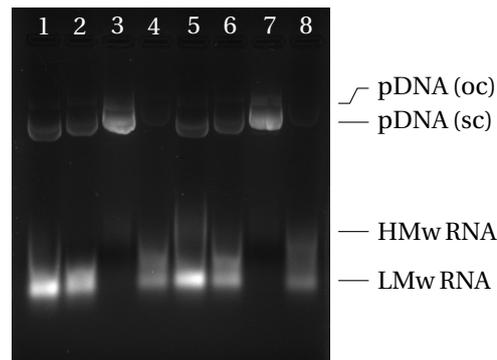


Figura 7.10: Análise de amostras, ao longo do processo B, por eletroforese em gel de agarose. Estão representados os resultados obtidos em duas repetições do processo. Amostras 1 e 5: lisado; Amostras 2 e 6: permeado da microfiltração; Amostras 3 e 7: produto final obtido após diafiltração; Amostras 4 e 8: permeado conjunto da operação de ultrafiltração/diafiltração. Na figura é possível verificar a elevada permeação das várias espécies de RNA bem como alguma permeação do plasmídeo *pVAX1-LacZ*.

RNA através da utilização de uma operação de diafiltração (Processo B). Tal como se pode verificar na tabela 7.3, por este método obtém-se uma elevada remoção de RNA (cerca de 96.5%), inclusivamente superior à que se obtém com o processo alternativo estudado (88%, Processo D). Contudo, o aumento do tamanho do poro conduz igualmente a uma diminuição do rendimento de recuperação de pDNA, por comparação com o Processo A, que se situou em 82% neste processo. Este valor encontra-se ainda acima do limite mínimo de rendimento que se considera aceitável para uma operação unitária num processo de produção de pDNA [39, 15, 133]. A perda de rendimento verificada deve-se essencialmente à permeação de parte do plasmídeo *pVAX1-LacZ* na membrana, uma vez que grande parte do pDNA restante foi analisado no permeado (cerca de 14%, em média, do plasmídeo presente inicialmente). A ocorrência de alguma permeação de pDNA, e concomitante elevada permeação das diferentes espécies de RNA presentes, está explícita na análise por eletroforese em gel de agarose de amostras recolhidas ao longo do processo (figura 7.10). Pode ainda ser acrescentado que este pro-

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

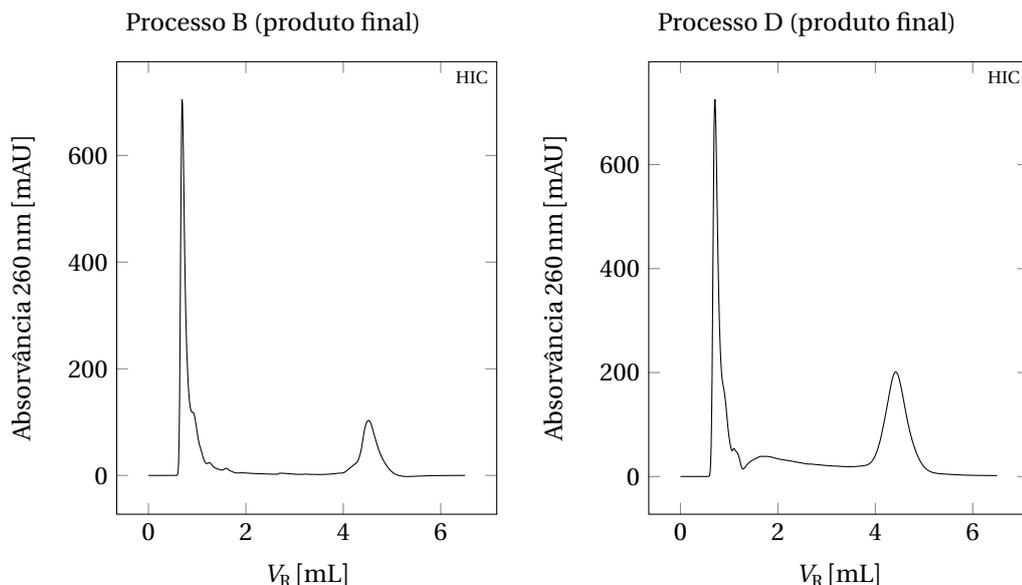


Figura 7.11: Perfil cromatográfico, obtido com o método de HIC, dos produtos finais referentes aos processos B e D. Na figura é notório o aumento do valor da pureza cromatográfica obtida com o processo à base de operações de membranas (processo B).

cesso permitiu obter um valor de pureza cromatográfica bastante superior, quando comparado com o processo alternativo (Processo D), tal como pode ser observado na tabela 7.3 e na figura 7.11. A pureza cromatográfica foi calculada pelo rácio entre a área do pico referente ao plasmídeo e a área total do cromatograma, nas análises pelo método HIC. Na figura 7.11 encontram-se as análises de HIC do produto final dos dois processos. O cromatograma referente ao processo B apresenta uma notória superior remoção de contaminantes e consequentemente um valor mais elevado de pureza cromatográfica.

O modelo desenvolvido prevê uma menor permeação do plasmídeo *pCAMBIA-1303* nas condições operatórias utilizadas nos processos de isolamento primário, nomeadamente um fluxo de $2.4 \mu\text{m/s}$ e uma velocidade de agitação de 760 min^{-1} (ver figura 7.3). Deste modo, foi assim testado o processo de isolamento intermediário na purificação deste plasmídeo (processo C, figura 7.1). Como se pode observar na tabela 7.3, obteve-se um elevado rendimento de recuperação de pDNA (95.7%), acompanhado de um igualmente elevado rendimento de remoção de RNA (96.7%), indicando assim uma satisfatória seletividade do processo para efetuar a separação pDNA/RNA, facto nunca antes obtido recorrendo unicamente a processos de membranas [18, 16, 32]. O menor valor obtido para este processo, em termos da pureza cromatográfica, fica-se a dever à menor concentração do plasmídeo *pCAMBIA-1303* nos lisados (tabela 7.2).

7.4 Conclusões

A separação entre o pDNA e as várias espécies de RNA pode ser obtida por ultrafiltração. Para isso é fundamental otimizar quer o tamanho do poro da membrana quer o valor do fluxo de filtração. O desenvolvimento de um modelo teórico com capacidade de prever as permeações observadas de pDNA e RNA revelou-se decisivo na escolha dos parâmetros operacionais. Este modelo, originalmente desenvolvido para sistemas de 3 componentes (o plasmídeo, um contra-íão e um co-íão), com o objetivo de contabilizar o efeito da força iónica da solução nos valores de permeação de pDNA, foi neste capítulo estendido para um sistema de 4 componentes (o plasmídeo, uma espécie de RNA, um contra-íão

e um co-ião). Os efeitos mútuos da permeação simultânea de pDNA e RNA foram investigados, com os resultados a mostrarem que a permeação de RNA é fortemente afetada pela presença das moléculas de pDNA, causando uma redução dos seus valores de S_{obs} . Os resultados experimentais confirmam as previsões do modelo, nomeadamente ao comprovarem que a escolha de uma membrana com poro de 25 nm, operada a baixos fluxos, é a melhor escolha para efetuar a referida separação.

A separação pode ser ainda otimizada efetuando uma diafiltração após o passo de concentração. Foram testados 3 processos de isolamento intermediário recorrendo a operações de separação com membranas. Os resultados obtidos confirmam as previsões do modelo, nomeadamente a reduzida permeação de pDNA na membrana com o poro de menores dimensões, acompanhada de uma igualmente reduzida permeação de RNA, em especial de HMw RNA. A utilização deste processo, apesar de revelar uma reduzida capacidade de remoção de RNA, apresenta valores bastante elevados de rendimento de recuperação de pDNA e valores mínimos de colmatação, características necessárias à obtenção de um processo com excelente capacidade de efetuar operações de concentração e de troca de tampão. A utilização de uma membrana com um poro de maiores dimensões, para as condições operatórias ótimas determinadas pelo modelo, permitiu obter elevados rendimentos de remoção dos vários tipos de RNA. Em especial, a aplicação do processo no isolamento intermediário do plasmídeo *pCAMBIA-1303* permitiu obter resultados, quer de recuperação de pDNA quer de remoção de RNA, que revelaram ser consideravelmente melhores quando comparados com os que se obtêm por intermédio de um processo alternativo usado em laboratório e que gera um maior impacto ambiental e económico, em especial de um ponto de vista de aplicação industrial. Para o caso do plasmídeo *pVAX1-LacZ*, apesar de se obter novamente um elevado rendimento de remoção de RNA, o rendimento de recuperação de pDNA revelou ser mais reduzido, sendo que a perda de rendimento se deve essencialmente à maior permeação deste plasmídeo pela membrana. Com base no modelo teórico desenvolvido, prevê-se que possa vir a ser possível reduzir o valor de permeação, quer pelo aumento da concentração de *pVAX1-LacZ* nos lisados quer pela redução da força iónica da solução, recorrendo por exemplo a uma operação prévia de concentração ou de dessalinização. Assim, criadas as condições para assegurar uma reduzida permeação de pDNA, a remoção de RNA poderá ser aumentada se no processo forem utilizados volumes de diafiltração mais elevados, sendo este um tema para trabalho futuro.

Capítulo 8

Conclusão e perspectivas de trabalho futuro

No trabalho publicado em 2003 por Eon-Duval et al [16], no âmbito da utilização de uma operação de ultrafiltração no isolamento intermediário de DNA plasmídico, é possível ler o seguinte:

“...As membranas de ultrafiltração utilizadas foram desenvolvidas para a purificação de proteínas e o seu “cut-off” determinado pela retenção de proteínas globulares. Contrariamente a proteínas globulares, o DNA plasmídico é uma molécula longa e fina, o que dificulta a previsão do seu comportamento em operações de ultrafiltração. Apesar do tamanho médio de plasmídeos para fins terapêuticos ser de vários milhões de Daltons, o tamanho de poro selecionado neste estudo para reter o plasmídeo é consideravelmente inferior ...”

De facto, tal como afirmado por Eon-Duval et al, a permeação de plasmídeos em membranas de micro e ultrafiltração revela um comportamento completamente distinto do caso de proteínas globulares, que essencialmente se podem modelar como esferas rígidas e para as quais existem modelos bem estabelecidos na literatura. No caso do pDNA, é um facto bem conhecido que este exhibe valores de permeação significativos em membranas com poros de tamanho consideravelmente inferiores. Este comportamento impede assim a aplicação dos modelos de esferas rígidas para prever a permeação de pDNA em membranas de micro e ultrafiltração. Na presente tese de doutoramento procurou-se superar esta limitação pelo desenvolvimento de novos modelos que possam contabilizar efeitos da deformação molecular induzida pelas tensões de corte geradas à entrada dos poros, e assim permitir explicar este fenómeno. O conceito de deformação molecular foi igualmente explorado por outros autores. No entanto, apesar de o trabalho desenvolvido ser de inquestionável valor e de ter proporcionado importantes avanços no estado do conhecimento nesta matéria, os modelos desenvolvidos apresentam algumas desvantagens que podem ser enumeradas, e que foram previamente discutidas na secção 1.3.2.

Com a realização do presente trabalho foi possível obter uma ampliação do espectro de aplicação do modelo do transporte restringido, provavelmente o modelo mais citado e utilizado no âmbito das operações de micro e ultrafiltração. Com esta nova abordagem passa a ser possível aplicar o modelo, não só a moléculas com uma geometria rígida, como também a moléculas que exibem elevados graus de flexibilidade e como consequência valores significativos de permeação em poros com tamanhos inferiores. As moléculas foram modeladas como cadeias FJC e CSC e os seus coeficientes de partição determinados por simulações estocásticas. Nestas simulações determina-se a distribuição radial da probabilidade de uma molécula entrar no poro estabelecendo uma condição de entrada. No presente trabalho considerou-se como condição de entrada que a massa pontual mais perto do poro deverá estar projetada no interior do mesmo. Foi possível determinar uma equação que relaciona o coeficiente de partição com λ_g , e verificou-se que a equação é válida tanto para a abordagem FJC, como para a abordagem CSC.

A ligação com o modelo do transporte restringido foi feita notando que para moléculas longas e flexíveis, cujo tamanho é superior ao do poro, o fator de impedimento difusivo, dado pelo rácio entre o coeficiente de difusão das moléculas no interior do poro e o coeficiente de difusão numa situação não confinada, tende para zero. Por outro lado, o fator de impedimento convectivo deverá ser igual a 1,

assumindo que estas moléculas uma vez no interior de poros com menores dimensões deverão mover-se com a velocidade média do solvente. Verifica-se, pois, que o coeficiente de permeação intrínseca se torna igual ao coeficiente de partição.

O desenvolvimento teórico proposto neste trabalho teve por base as equações de Maxwell-Stefan. Com esta abordagem, verifica-se que as principais equações usadas nos modelos podem ser deduzidas com base no mesmo princípio teórico. A polarização de concentração pode ser obtida com recurso ao modelo do filme. Nestas condições, e considerando soluções diluídas e ideais, foi possível deduzir e aplicar a equação de Nernst-Planck na camada de polarização de concentração. Esta equação revela-se fundamental para determinar a polarização de concentração do DNA plasmídico dado que este tipo de moléculas apresenta uma elevada carga elétrica. A equação de Nernst-Planck introduz importantes efeitos na permeação de moléculas com carga. Em especial, os vários compostos iónicos em solução exercem uma influência mútua entre si, influência esta que se manifesta pelo surgimento de um potencial elétrico na camada de polarização. Assim, para além do fluxo de filtração e dos coeficientes de difusão, a concentração e valência elétrica dos iões desempenham um papel importante no estabelecimento dos gradientes de concentração na camada de polarização e consequentemente nos valores da permeação observada dos vários componentes da solução a filtrar.

No decorrer do trabalho verificou-se que as moléculas de RNA também exibem permeação em poros com dimensões inferiores às dimensões moleculares. Este facto leva assim à necessidade de considerar igualmente efeitos de deformação molecular para explicar a sua permeação. Neste domínio, o facto do desenvolvimento do modelo para o pDNA ter sido efetuado de um modo mais abrangente possibilitou a sua aplicação ao caso do RNA, uma molécula que revela igualmente um enorme potencial como fármaco de segunda geração, e onde os processos de membranas deverão ter aplicabilidade na sua produção. O modelo aplicado ao RNA permitiu obter previsões em concordância com os resultados experimentais. A descrição da sua polarização de concentração revelou também a importância da utilização da equação de Nernst-Planck, uma vez que a permeação de RNA na presença de pDNA revelou ser quase independente do fluxo de filtração, o que só pode ser explicado por efeitos de carga. Por outro lado, o modelo desenvolvido prevê, para as concentrações das espécies estudadas neste trabalho, que a influência da presença de RNA na permeação de pDNA é muito menos significativa, facto que também foi verificado na prática.

É importante referir que a dedução da equação de Nernst-Planck mostra o elevado número de simplificações que é necessário efetuar. Em especial, têm que ser consideradas soluções diluídas e ideais para a equação ser aplicável. Por outro lado, o efeito da pressão no potencial químico tem que ser desprezado, o que para solutos com elevados volumes parciais molares pode não ser o melhor procedimento. Em processos de ultrafiltração, em especial em operações de concentração, a aproximação de soluções diluídas e ideais pode igualmente apresentar-se como uma descrição pouco realista. No entanto, não é menos verdade que a complexidade inerente a processos de micro e ultrafiltração, em especial a ocorrência de colmatação e subsequente alteração físico-química da membrana, não permite garantir que mesmo um modelo teórico mais preciso possa descrever com exatidão todo o fenómeno de permeação. A introdução de novos termos na equação de Nernst-Planck aumenta consideravelmente a dificuldade de integração dos sistemas de equações diferenciais. Esta dificuldade surge pelo facto dos valores que se procuram calcular (as concentrações dos vários componentes no permeado) precisarem de ser conhecidos para proceder à integração das equações de forma direta. Para superar esta limitação foi desenvolvido um algoritmo que permite, de forma iterativa, estimar estes valores e ir efetuando novas estimativas mais precisas até se obter uma aceitável convergência. Naturalmente, à medida que um maior número de componentes é considerado nos cálculos a complexidade inerente é aumentada significativamente, pelo que o desenvolvimento de algoritmos mais eficientes é assim premente.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

No presente trabalho foi determinado o coeficiente de partição de moléculas longas e flexíveis em dois passos: pela representação da estrutura das moléculas por modelos FJC e CSC e pela simulação estocástica necessária para determinar a probabilidade de entrada destas estruturas em poros. Foi considerada como condição necessária de entrada no poro que a massa pontual mais perto do poro esteja projetada no seu interior, sendo a restante molécula forçada a permear pelo efeito de deformação causado pelas tensões de corte geradas pelo fluxo convectivo do solvente. A utilização deste procedimento permitiu obter previsões com uma satisfatória aproximação aos resultados experimentais. No entanto, verificou-se uma certa tendência para subestimar ligeiramente as permeações. Neste domínio, poderão obviamente ser efetuados alguns melhoramentos, como por exemplo na determinação experimental de condições de entrada em poros que possam descrever de forma mais realista o fenómeno de permeação. As representações FJC e CSC são igualmente representações que poderão ser demasiado simples para descrever a estrutura de pDNA e RNA. Por exemplo, nestas representações não é tido em conta o efeito do volume excluído, que pode desempenhar um papel importante. Estes dois efeitos poderão contribuir para que se verifiquem previsões de permeação geralmente mais elevadas do que as que se observam na prática. No entanto, do mesmo modo poderá ser referido que o incremento da complexidade na análise do problema gera incontornavelmente um enorme aumento no esforço, quer computacional quer de realização de ensaios experimentais, sem que exista uma clara certeza que a exatidão das previsões seja significativamente melhorada, o que se deve, tal como referido anteriormente, à elevada complexidade inerente aos processos de micro e ultrafiltração.

Os modelos teóricos desenvolvidos para estimar a permeação de pDNA consideram apenas a sua isoforma super-enrolada. Este facto deve-se em parte à escassez de dados na literatura que permitam estimar de forma precisa as propriedades das várias isoformas. Como trabalho futuro seria importante procurar alargar o modelo para permitir a sua aplicação diferenciada às várias isoformas de pDNA, que inevitavelmente são parte integrante dos lisados. Variações nos valores de permeação para diferentes isoformas, em processos de ultrafiltração, foi já verificada na prática [30] e a obtenção de um modelo teórico com capacidade de previsão constituiria uma ferramenta de inegável valor neste domínio, em especial tendo em consideração a importância da separação de isoformas num processo de produção de pDNA.

De um ponto de vista de aplicação prática foi possível obter uma elevada seletividade na separação pDNA/RNA por ultrafiltração. Neste aspeto, os modelos desenvolvidos revelaram-se essenciais para estimar as condições operatórias necessárias. O modelo previu a utilização de membranas com poros de razoáveis dimensões (20–25 nm) operadas a fluxos de filtração reduzidos. A utilização de baixos fluxos gera a possibilidade de reter o pDNA permitindo uma elevada permeação das moléculas de RNA. Por outro lado, devido aos reduzidos valores do coeficiente de difusão das moléculas de pDNA, fluxos baixos permitem obter uma menor polarização de concentração e conseqüente inferior grau de colmatação. Este facto pode gerar um aumento no tempo dos ciclos de utilização entre lavagens e uma redução na periodicidade de substituição de membranas. Por outro lado, minimizam a adsorção de compostos, facto que conduz a indesejadas alterações físico-químicas das membranas, o que pode levar a uma redução da reprodutibilidade entre filtrações. Este modo de operação a fluxo constante e de reduzido valor não é o mais utilizado, por exemplo em esquemas de purificação de proteínas. Para a sua implementação poderá ser necessário desenhar novos módulos de filtração que permitam efetuar um controlo preciso do fluxo de filtração. Por outro lado, fluxos reduzidos implicam a necessidade de utilizar uma maior área de membrana para obter uma produtividade semelhante. Assim, a viabilidade do processo terá que ser necessariamente avaliada tendo em conta as inerentes vantagens e desvantagens do método. No entanto, o processo de ultrafiltração/diafiltração desenvolvido no presente trabalho permite a eliminação da utilização de elevadas quantidades de agentes precipitantes, o que naturalmente tem o potencial de gerar um menor impacto ambiental e económico.

No âmbito da produção e purificação de DNA plasmídico é essencial obter métodos de quantificação que permitam, de forma célere e eficiente, quantificar não só o plasmídeo como também os vários contaminantes ao longo do processo. Nesta matéria, o método cromatográfico de HIC, desenvolvido por Diogo et al [88], revela possuir ótimas características para tal, nomeadamente uma boa reprodutibilidade, robustez, ausência de pré-tratamento das amostras (com exceção da remoção do conteúdo sólido) e rapidez de execução. No presente trabalho de doutoramento sugere-se que o RNA possa ser igualmente analisado por este método, permitindo uma análise simultânea conjuntamente com o pDNA. Para controlo de qualidade da preparação final de pDNA deverá ser preciso efetuar uma análise mais precisa do conteúdo de RNA, no entanto, para controlar os rendimentos de remoção desta biomolécula em fases intermédias do processo de produção verifica-se que o método de HIC pode constituir uma excelente alternativa.

Na presente tese de doutoramento procurou-se estudar a remoção de sólidos, originados pelo processo de lise alcalina, recorrendo ao uso de uma operação de microfiltração. Outras processos alternativos podem ser considerados, como por exemplo centrifugação, filtração convencional e flutuação forçada. No entanto, a centrifugação é geralmente considerada como pouco viável à escala industrial. Filtração convencional e operações de flutuação forçada não permitem garantir a total remoção de conteúdo sólido, pelo menos de uma forma tão segura como a que se obtém com uma operação de microfiltração. Este fator pode ter importância em especial para situações em que a operação subsequente apresente uma reduzida tolerância à presença de sólidos na corrente de entrada, como por exemplo operações de cromatografia. No presente trabalho foi estudada a microfiltração de um lisado alcalino. Foram obtidos elevados rendimentos de recuperação de pDNA e completa remoção de sólidos aquando da utilização de uma membrana hidrofílica de Nylon com um poro nominal de $0.2 \mu\text{m}$, a um fluxo de filtração constante de $73 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$. Durante a filtração dos lisados foi, contudo, observada alguma re-dissolução de gDNA durante o processo. Verificou-se que este efeito não poderia ser explicado apenas pela redução da força iónica do lisado durante o processo, e que teria de ser, portanto, resultante da degradação mecânica do conteúdo precipitado pela ação das tensões de corte geradas. De facto, observou-se que o gDNA re-dissolvido apresentou valores de permeação significativos numa membrana de ultrafiltração com um poro de tamanho reduzido ($r_p = 4 \text{ nm}$), confirmando a ideia de que a ação mecânica imposta no material precipitado leva a re-dissolução de pequenos fragmentos de gDNA, que como é sabido podem causar complicações em fases mais avançadas do processo. Este resultado está assim de acordo com a ideia de ser necessário impor, durante operações de separação sólido-líquido a seguir à lise, reduzidas tensões de corte para evitar a re-dissolução de contaminantes. Apesar disso, também se verificou que na segunda operação de membranas, a ultrafiltração, é possível remover de forma eficientemente estes fragmentos contaminantes.

Nos ensaios de microfiltração, referidos no parágrafo anterior, observou-se a ocorrência de alguma colmatção das membranas. Devido à elevada quantidade de sólidos e de contaminantes dissolvidos nos lisados este fenómeno será sempre, em maior ou menor grau, uma inevitabilidade. Uma forma de procurar rentabilizar a operação e de reduzir o impacto ambiental e económico subjacente passa por desenvolver novas membranas que possam ser produzidas de forma económica e que sejam biodegradáveis. Nos nossos laboratórios estão a ser dados passos nesta direção como comprova um estudo recentemente publicado [134].

Bibliografia

- [1] A. E. Carnes, J. A. Williams, Plasmid DNA manufacturing technology, *Recent Patents on Biotechnology* 1 (2007) 1–15.
- [2] D. W. Emery, Gene therapy for genetic diseases: On the horizon, *Clinical and Applied Immunology Reviews* 4 (2004) 411–422.
- [3] T. Wirth, N. Parker, S. Ylä-Herttuala, History of gene therapy, *Gene* 525 (2013) 161–169.
- [4] A. Mountain, Gene therapy: the first decade, *Trends in Biotechnology* 18 (2000) 119–128.
- [5] M. Schleef, *Plasmid for therapy and vaccination*, Wiley-VCH, 2001.
- [6] M. A. Liu, DNA vaccines: a review, *Journal of Internal Medicine* 253 (2003) 402–410.
- [7] M. A. Liu, DNA vaccines: an historical perspective and view to the future, *Immunological Reviews* 239 (2011) 62–84.
- [8] M. A. Kutzler, D. B. Weiner, DNA vaccines: ready for prime time?, *Nature Reviews Genetics* 9 (2008) 776–788.
- [9] S. Duarte, G. Carle, H. Faneca, M. C. P. de Lima, V. Carle, Suicide gene therapy in cancer: Where do we stand now?, *Cancer Letters* 324 (2012) 160–170.
- [10] Y. Cai, S. Rodriguez, R. Rameswaran, R. Draghia-Akli, R. J. Juba, H. Hebel, Production of pharmaceutical-grade plasmids at high concentration and high supercoiled percentage, *Vaccine* 28 (2010) 2046–2052.
- [11] J. C. Nunes, A. M. Morão, C. Nunes, M. T. P. de Amorim, I. C. Escobar, J. A. Queiroz, Plasmid DNA recovery from fermentation broths by a combined process of micro- and ultrafiltration: modeling and application, *Journal of Membrane Science* 415 (2012) 24–35.
- [12] K. J. Prather, S. Sagar, J. Murphy, M. Chartrain, Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification, *Enzyme and Microbial Technology* 33 (2003) 865–883.
- [13] G. A. Gomes, A. M. Azevedo, M. R. Aires-Barros, D. M. F. Prazeres, Purification of plasmid DNA with aqueous two phase systems of PEG 600 and sodium citrate/ammonium sulfate, *Separation and Purification Technology* 65 (2009) 22–30.
- [14] F. Sousa, J. A. Queiroz, Supercoiled plasmid quality assessment by analytical arginine-affinity chromatography, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 124–129.
- [15] F. Smrekar, A. Podgornik, M. Ciringer, S. Kontrec, P. Raspor, A. Strancar, M. Peterka, Preparation of pharmaceutical-grade plasmid DNA using methacrylate monolithic columns, *Vaccine* 28 (2010) 2039–2045.
- [16] A. Eon-Duval, R. H. MacDuff, C. A. Fisher, M. J. Harris, C. Brook, Removal of RNA impurities by tangential flow filtration in an RNase-free plasmid DNA purification process, *Analytical Biochemistry* 316 (2003) 66–73.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

- [17] F. Sousa, S. Freitas, A. R. Azzoni, D. M. F. Prazeres, J. Queiroz, Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 45 (2006) 131–140.
- [18] D. W. Kahn, M. D. Butler, D. L. Cohen, M. Gordon, J. W. Kahn, M. E. Winkler, Purification of plasmid DNA by tangential flow filtration, *Biotechnology and Bioengineering* 69 (2000) 101–106.
- [19] R. J. Lander, M. A. Winters, F. J. Meacle, B. C. Buckland, A. L. Lee, Fractional precipitation of plasmid DNA from lysate by CTAB, *Biotechnology & Bioengineering* 79 (2002) 776–784.
- [20] D. M. F. Prazeres, G. N. M. Ferreira, Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination, *Chemical Engineering and Processing* 43 (2004) 615–630.
- [21] D. S. Holmes, M. Quigley, A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids, *Analytical Biochemistry* 114 (1981) 193–197.
- [22] K. Zhu, H. Jin, Y. Ma, Z. Ren, C. Xiao, Z. He, F. Zhang, Q. Zhu, B. Wang, A continuous thermal lysis procedure for the large-scale preparation of plasmid DNA, *Journal of Biotechnology* 118 (2005) 257–264.
- [23] K. O’Mahony, R. Freitag, F. Hilbrig, P. Müller, I. Schumacher, Proposal for a better integration of bacterial lysis into the production of plasmid DNA at large scale, *Journal of Biotechnology* 119 (2005) 118–132.
- [24] H. C. Birnboim, J. Doly, Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Research* 7 (1979) 1513–1523.
- [25] S. Chamsart, H. Patel, J. A. J. Hanak, A. G. Hitchcock, A. W. Nienow, The impact of fluid-dynamic-generated stresses on chDNA and pDNA stability during alkaline cell lysis for gene therapy products, *Biotechnology & Bioengineering* 75 (2001) 387–392.
- [26] J. Urthaler, C. Ascher, H. Wöhrer, R. Necina, Automated alkaline lysis for industrial scale cGMP production of pharmaceutical grade plasmid-DNA, *Journal of Biotechnology* 128 (2007) 132–149.
- [27] F. J. Meacle, R. Lander, P. A. Shamlou, N. J. Titchener-Hooker, Impact of engineering flow conditions on plasmid DNA yield and purity in chemical cell lysis operations, *Biotechnology and Bioengineering* 87 (2004) 293–302.
- [28] I. Theodossiou, I. J. Collins, J. M. Ward, O. R. T. Thomas, P. Dunnill, The processing of a plasmid-based gene from *E. Coli*. Primary recovery by filtration, *Bioprocess Engineering* 16 (1997) 175–183.
- [29] H. Blom, M. Bennemo, M. Berg, R. Lemmens, Flocculate removal after alkaline lysis in plasmid DNA production, *Vaccine* 29 (2011) 6–10.
- [30] D. R. Latulippe, A. L. Zydney, Separation of plasmid DNA isoforms by highly converging flow through small membrane pores, *Journal of Colloid and Interface Science* 357 (2011) 548–553.
- [31] A. S. Rathore, A. Shirke, Recent developments in membrane-based separations in biotechnology process: review, *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 41 (2011) 398–421.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

- [32] S. Freitas, S. Canário, J. A. L. Santos, D. M. F. Prazeres, Alternatives for the intermediate recovery of plasmid DNA: Performance, economic viability and environmental impact, *Biotechnology Journal* 4 (2009) 265–278.
- [33] R. van Reis, A. Zydney, Bioprocess membrane technology, *Journal of Membrane Science* 297 (2007) 16–50.
- [34] K. Plumb, Continuous processing in the pharmaceutical industry. Changing the mind set, *Chemical Engineering Research and Design* 83 (2005) 730–738.
- [35] S. Kong, J. Aucamp, N. J. Tichener-Hooker, Studies on membrane sterile filtration of plasmid DNA using an automated multiwell technique, *Journal of Membrane Science* 335 (2010) 144–150.
- [36] A. Eon-Duval, K. Gumbs, C. Ellet, Precipitation of RNA impurities with high salt in a plasmid DNA purification process: Use of experimental design to determine reaction conditions, *Biotechnology and Bioengineering* 83 (2003) 544–553.
- [37] M. S. Levy, I. J. Collins, J. T. Tsai, P. A. Shamlou, J. M. Ward, P. Dunnill, Removal of contaminant nucleic acids by nitrocellulose filtration during pharmaceutical-grade plasmid DNA processing, *Journal of Biotechnology* 76 (2000) 197–205.
- [38] D. Kendall, G. J. Lye, M. S. Levy, Purification of plasmid DNA by an integrated operation comprising tangential flow filtration and nitrocellulose adsorption, *Biotechnology and Bioengineering* 79 (2002) 816–822.
- [39] C. Kepka, R. Lemmens, J. Vasi, T. Nyhammar, P. Gustavsson, Integrated process for purification of plasmid DNA using aqueous two-phase systems combined with membrane filtration and lid bed chromatography, *Journal of Chromatography A* 1057 (2004) 115–124.
- [40] S. Kong, N. Titchener-Hooker, M. S. Levy, Plasmid DNA processing for gene therapy and vaccination: Studies on the membrane sterilization filtration step, *Journal of Membrane Science* 280 (2006) 824–831.
- [41] S. Freitas, M. L. Wu, G. A. Monteiro, D. M. F. Prazeres, J. A. L. Santos, Intermediate recovery of plasmid DNA using tangential flow filtration, in: *Intermediate recovery of plasmid DNA using tangential flow filtration*, Engineering with Membranes, 2008.
- [42] B. Sun, X. Yu, Y. Yin, X. Liu, Y. Wu, Y. Chen, X. Zhang, C. Jiang, W. Kong, Large-scale purification of pharmaceutical-grade plasmid DNA using tangential flow filtration and multi-step chromatography, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 1 (2013) 1–6.
- [43] W. M. Deen, Hindered transport of large molecules in liquid-filled pores, *AIChE Journal* 33 (1987) 1409–1425.
- [44] P. Dechadilok, W. M. Deen, Hindrance factors for diffusion and convection in pores, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 45 (2006) 6953–6959.
- [45] A. M. Morão, Remoção de poluentes persistentes por tecnologias de membrana e processos electroquímicos, Ph.D. thesis, Universidade da Beira Interior (2006).
- [46] A. Morão, M. T. P. de Amorim, A. Lopes, I. C. Gongalves, Characterization of ultra- and nanofiltration membranes for predictive purposes—development of a model for hindered transport of uncharged solutes in asymmetrical pores, *Desalination* 200 (2006) 152–154.

- [47] A. Morão, M. T. P. de Amorim, A. Lopes, I. Escobar, J. A. Queiroz, Characterization of ultrafiltration and nanofiltration membranes from rejections of neutral reference solutes using a model of asymmetric pores, *Journal of Membrane Science* 319 (2008) 64–75.
- [48] W. S. Opong, A. L. Zydney, Diffusive and convective protein transport through asymmetric membranes, *AIChE Journal* 37 (1991) 1497–1510.
- [49] M. J. Rosa, M. N. de Pinho, Separation of organic solutes by membrane pressure-driven processes, *Journal of Membrane Science* 89 (1994) 235–243.
- [50] C. Combe, C. Guizard, P. Aimar, V. Sanchez, Experimental determination of four characteristics used to predict the retention of a ceramic nanofiltration membrane, *Journal of Membrane Science* 129 (1997) 147–160.
- [51] W. R. Bowen, H. Mukhtar, Characterization and prediction of separation performance of nanofiltration membranes, *Journal of Membrane Science* 112 (1996) 263–274.
- [52] W. R. Bowen, A. W. Mohammad, Diafiltration by nanofiltration: prediction and optimization, *AIChE Journal* 44 (1998) 1799–1812.
- [53] A. W. Mohammad, N. Hilal, H. Al-Zoubi, N. A. Darwish, Prediction of permeate fluxes and rejections of highly concentrated salts in nanofiltration membranes, *Journal of Membrane Science* 289 (2007) 40–50.
- [54] M. N. de Pinho, V. Semião, V. Geraldes, Integrated modeling of transport process in fluid/nanofiltration membrane systems, *Journal of Membrane Science* 206 (2002) 189–200.
- [55] W. R. Bowen, A. W. Mohammad, N. Hilal, Characterization of nanofiltration membranes for predictive purposes—use of salts, uncharged solutes and atomic force microscopy, *Journal of Membrane Science* 126 (1997) 91–105.
- [56] W. R. Bowen, J. S. Welfoot, Modeling the performance of membrane nanofiltration—critical assessment and model development, *Chemical Engineering Science* 57 (2002) 1121–1137.
- [57] D. R. Latulippe, J. R. Molek, A. L. Zydney, Importance of biopolymer flexibility in ultrafiltration processes, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 48 (2009) 2395–2403.
- [58] E. Ark, Y. Sefi, B. Hajaj, G. Rothenberg, V. Gitis, Kinetics and mechanism of plasmid DNA penetration through nanopores, *Journal of Membrane Science* 371 (2011) 45–51.
- [59] D. R. Latulippe, K. Ager, A. L. Zydney, Flux-dependent transmission of supercoiled plasmid DNA through ultrafiltration membranes, *Journal of Membrane Science* 294 (2007) 169–177.
- [60] D. R. Latulippe, A. L. Zydney, Elongational flow model for transmission of supercoiled plasmid DNA during membrane filtration, *Journal of Membrane Science* 329 (2009) 201–208.
- [61] D. R. Latulippe, A. L. Zydney, Salt-induced changes in plasmid DNA transmission through ultrafiltration membranes, *Biotechnology and Bioengineering* 90 (2008) 390–398.
- [62] K. Ager, D. R. Latulippe, A. L. Zydney, Plasmid DNA transmission through charged ultrafiltration membranes, *Journal of Membrane Science* 344 (2009) 123–128.
- [63] S. Daoudi, F. Brochard, Flows of flexible polymer solution in pores, *Macromolecules* 11 (1978) 751–758.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

- [64] A. M. Morão, J. C. Nunes, F. Sousa, M. T. P. de Amorim, I. C. Escobar, J. A. Queiroz, Development of a model for membrane filtration of long and flexible macromolecules: application to predict dextran and linear DNA rejections in ultrafiltration, *Journal of Membrane Science* 336 (2009) 61–70.
- [65] A. M. Morão, J. C. Nunes, F. Sousa, M. T. P. de Amorim, I. C. Escobar, J. A. Queiroz, Ultrafiltration of supercoiled plasmid DNA: modeling and application, *Journal of Membrane Science* 378 (2011) 280–289.
- [66] M. Mulder, *Basic principles of membrane technology* 2nd edition, Kluwer Academic Publishers, 1998.
- [67] A. Maurel, *Techniques séparatives à membranes: Considération théoriques*, Techniques de L'Ingenieur J2-II-Génie des Procédés, J2790, 2006.
- [68] R. B. Bird, W. E. Stewart, E. N. Lightfoot, *Transport Phenomena* 2nd edition, John Wiley & Sons, 2002.
- [69] J. A. Wesselingh, R. Krishna, *Mass transfer in multicomponent mixtures*, Delft University Press, 2000.
- [70] R. Krishna, J. A. Wesslingh, The Maxwell-Stefan approach to mass transfer, *Chemical Engineering Science* 52 (1997) 861–911.
- [71] T. R. Noordman, J. A. Wesselingh, Transport of large molecules through membranes with narrow pores: the Maxwell-Stefan description combined with hydrodynamic theory, *Journal of Membrane Science* 210 (2002) 227–243.
- [72] R. Taylor, R. Krishna, *Multicomponent mass transfer*, John Wiley & Sons, 1993.
- [73] A. L. Zydney, Stagnant film model for concentration polarization in membrane systems, *Journal of Membrane Science* 130 (1997) 275–281.
- [74] S. S. Vasan, R. W. Field, On maintaining consistency between the film model and the profile of the concentration polarization layer, *Journal of Membrane Science* 279 (2006) 434–438.
- [75] J. A. Wesselingh, P. Vonk, Ultrafiltration of a large polyelectrolyte, *Journal of Membrane Science* 99 (1995) 21–27.
- [76] D. Arnold, J. C. Polking, *Ordinary differential equations using MATLAB*, Prentice Hall, 1999.
- [77] J. L. Anderson, J. A. Quinn, Restricted transport in small pores, *Biophysical Journal* 14 (1974) 130–150.
- [78] I. Teraoka, *Polymer solutions—an introduction to physical properties*, Wiley Interscience, 2002.
- [79] M. G. Davidson, U. W. Suter, W. M. Deen, Equilibrium partitioning of flexible macromolecules between bulk solutions and cylindrical pores, *Macromolecules* 20 (1987) 1141–1146.
- [80] P. Cifra, T. Bleha, Simulations of sieving characteristics of macromolecules in porous membranes at high concentrations, *Journal of Membrane Science* 265 (2005) 51–59.
- [81] G. F. Hermesen, B. A. de Geeter, N. F. A. van der Vegt, M. Wessling, Monte carlo simulation of partially confined flexible polymers, *Macromolecules* 35 (2002) 5267–5272.

- [82] D. M. F. Prazeres, Prediction of diffusion coefficients of plasmids, *Biotechnology and Bioengineering* 99 (2008) 1040–1044.
- [83] G. S. Manning, The persistent length of DNA is reached from the persistent length of its null isomer through an internal electrostatic stretching force, *Biophysical Journal* 91 (2006) 3607–3616.
- [84] D. Voet, J. Voet, *Biochemistry* 2nd edition, John Wiley & Sons, 1995.
- [85] G. Ralston, *Introduction to analytical ultracentrifugation*, Beckman, 2002.
- [86] M. Fukatsu, M. Kurata, Hydrodynamic properties of flexible-ring macromolecules, *Journal of Chemical Physics* 44 (1966) 4539–4545.
- [87] R. M. Robertson, S. Laib, D. E. Smith, Diffusion of isolated DNA molecules: dependence on length and topology, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 103 (2006) 7310–7314.
- [88] M. M. Diogo, J. A. Queiroz, D. M. F. Prazeres, Assessment of purity and quantification of plasmid DNA in process solutions using high-performance hydrophobic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A* 998 (2003) 109–117.
- [89] A. G. Gomes, A. M. Azevedo, M. R. Aires-Barros, D. M. F. Prazeres, Clearance of host cell impurities from plasmid-containing lysates by boronate adsorption, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 2262–2266.
- [90] S. Chamsart, T. Karnjanasom, Alkaline-cell lysis through in-line static mixer reactor for the production of plasmid DNA for gene therapy, *Biotechnology and Bioengineering* 96 (2007) 471–482.
- [91] Qiagen, *Plasmid purification handbook*, third edition, Qiagen, 2005.
- [92] A. Zydney, A. Xenopoulos, Improving dextran tests for ultrafiltration membranes: effect of device format, *Journal of Membrane Science* 291 (2007) 180–190.
- [93] B. V. D. Bruggen, J. Schaep, D. Wilms, C. Vandecasteele, A comparison of models to describe the maximal retention of organic molecules in nanofiltration, *Separation Science and Technology* 35 (2000) 169–182.
- [94] M. G. Davidson, W. M. Deen, Hindered diffusion of water-soluble macromolecules in membranes, *Macromolecules* 21 (1988) 3474–3481.
- [95] R. J. Young, P. A. Lovell, *Introduction to Polymers*, 2nd Edition, CRC Press, 2000.
- [96] A. Tager, *Physical Chemistry of Polymers*, MIR Publishers, 1987.
- [97] N. I. Abu-Lail, T. A. Camesano, Polysaccharide properties probed with atomic force microscopy, *Journal of Microscopy* 212 (2003) 217–238.
- [98] Y. Oono, M. Kohmoto, Renormalization group theory of transport properties of polymer solution. I. Dilute solutions, *Journal of Chemical Physics* 78 (1983) 520–528.
- [99] S. F. Sun, *Physical chemistry of macromolecules: basic principles and issues*, 2nd edition, Wiley Interscience, 2004.
- [100] P. J. Hagerman, Flexibility of DNA, *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 17 (1988) 265–286.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

- [101] O. Kratky, G. Porod, Röntgenuntersuchung gelöster fadenmoleküle, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 68 (1949) 1106–1123.
- [102] C. Bouchiat, M. D. Wang, J. F. Allemand, T. Strick, S. M. Block, V. Croquette, Estimating the persistent length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements, *Biophysical Journal* 76 (1999) 409–413.
- [103] R. Lewis, R. Pecora, Comparison of predicted Rouse-Zimm dynamics with observations for a 2311 base pair DNA fragment, *Macromolecules* 19 (1986) 2074–2075.
- [104] S. S. Sorlie, R. Pecora, A dynamic light scattering study of four DNA restriction fragments, *Macromolecules* 23 (1990) 487–497.
- [105] G. Voordow, Z. Kam, N. Borochoy, H. Eisenberg, Isolation and physical studies of the intact supercoiled, the open circular and the linear forms of ColE1-plasmid DNA, *Biophysical Chemistry* 8 (1978) 171–189.
- [106] J. Newman, J. Tracy, R. Pecora, Dynamic light scattering from monodisperse 2311 base pair circular DNA: ionic strength dependence, *Macromolecules* 27 (1994) 6808–6811.
- [107] T. H. Nguyen, M. Elimelech, Plasmid DNA adsorption on silica: kinetics and conformational changes in monovalent and divalent salts, *Biomacromolecules* 8 (2007) 24–32.
- [108] D. E. Smith, T. T. Perkins, S. Chu, Dynamical scaling of DNA diffusion coefficients, *Macromolecules* 29 (1996) 1372–1373.
- [109] S. Araki, T. Nakai, K. Takeyasu, K. Yoshikawa, Hydrodynamic radius of circular DNA is larger than that of linear DNA, *Chemical Physics Letters* 418 (2006) 255–259.
- [110] G. L. Lukacs, P. Haggie, O. Seksek, D. Lechardeur, N. Freedman, A. S. Verkman, Size-dependence DNA mobility in cytoplasm and nucleus, *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000) 1625–1629.
- [111] G. Chirico, G. Baldini, Rotational diffusion and internal motions of circular DNA. I. Polarized photon correlation spectroscopy, *Journal of Chemical Physics* 104 (1996) 6009–6019.
- [112] S. S. Zakharova, W. Jesse, C. Backendorf, S. U. Egelhaaf, A. Lapp, J. R. C. van der Maarel, Dimensions of plectonemically supercoiled DNA, *Biophysical Journal* 83 (2002) 1106–1118.
- [113] E. F. Casassa, Equilibrium distribution of flexible polymer chains between a macroscopic solution phase and small voids, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters* 5 (1967) 773–778.
- [114] J. C. Giddings, E. Kureca, C. P. Russell, M. N. Myers, Statistical theory for the equilibrium distribution of rigid molecules in inert porous networks, *Journal of Physical Chemistry* 72 (1968) 4397–4408.
- [115] T. K. Sherwood, P. L. T. Brian, R. E. Fisher, L. Dresner, Salt concentration at phase boundaries in desalination by reverse osmosis, *Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals* 4 (1965) 113–118.
- [116] K. J. Kim, P. V. Stevens, Hydraulic and surface characteristics of membranes with parallel cylindrical pores, *Journal of Membrane Science* 123 (1997) 303–314.
- [117] M. D. Lechner, D. G. Steinmeier, Sedimentation coefficients, diffusion coefficients, partial specific volumes, frictional ratios and second virial coefficients of polymers in solution, *Polymer Handbook* (3rd edition), Wiley Interscience, 1989.

- [118] D. Stein, F. H. J. van der Heyden, W. J. A. Koopmans, C. Dekker, Pressure-driven transport of confined DNA polymers in fluidic channels, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006) 15853–15858.
- [119] D. R. Latulippe, A. L. Zydney, Radius of gyration of plasmid DNA isoforms from static light scattering, *Biotechnology and Bioengineering* 107 (2010) 134–142.
- [120] M. Hammermann, C. Steinmaier, H. Merlitz, U. Kapp, W. Waldeck, G. Chirico, J. Langowski, Salt effects on the structure and internal dynamics of superhelical DNAs studied by light scattering and Brownian dynamics, *Biophysical Journal* 73 (1997) 2674–2687.
- [121] Y. Lyubchenko, L. Shlyakhtenko, Visualization of supercoiled DNA with atomic force microscopy in situ, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (2007) 496–501.
- [122] T. C. Boles, J. White, H. N. R. Cozzarelli, Structure of plectonemically supercoiled DNA, *Journal of Molecular Biology* 213 (1990) 931–951.
- [123] F. Sousa, L. Passarinha, J. A. Queiroz, Biomedical applications of plasmid DNA in gene therapy: a new challenge for chromatography, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 26 (2009) 83–116.
- [124] A. Carlson, M. Signs, L. Liermann, R. Boor, K. J. Jem, Mechanical disruption of *Escherichia-coli* for plasmid recovery, *Biotechnology & Bioengineering* 48 (1995) 303–315.
- [125] C. S. Chang, H. S. Ni, S. Y. Suen, W. C. Tseng, H. C. Chiu, C. P. Chou, Preparation of inorganic-organic anion-exchange membranes and their application in plasmid DNA and RNA separation, *Journal of Membrane Science* 311 (2008) 336–348.
- [126] A. Frerix, P. Geilenkirchen, M. Muller, M. R. Kula, J. Hubbuch, Separation of genomic DNA, RNA and open circular plasmid DNA from supercoiled plasmid DNA by combining denaturation, selective renaturation and aqueous two-phase extraction, *Biotechnology & Bioengineering* 96 (2007) 57–66.
- [127] S. A. Martins, D. M. Prazeres, J. M. Cabral, G. A. Monteiro, Comparison of real-time polymerase chain reaction and hybridization assays for the detection of *Escherichia coli* genomic DNA in process samples and pharmaceutical-grade plasmid DNA products, *Analytical Biochemistry* 322 (2003) 127–129.
- [128] S. S. Freitas, J. A. L. Santos, D. M. F. Prazeres, Plasmid purification by hydrophobic interaction chromatography using sodium citrate in the mobile phase, *Separation and Purification Technology* 65 (2009) 95–104.
- [129] B. Riesmeier, K. Kroner, M. Kula, Tangential filtration of microbial suspensions: filtration resistances and model development, *Journal of Biotechnology* 12 (1989) 153–172.
- [130] A. Morão, A. M. B. Alves, J. P. Cardoso, Ultrafiltration of demethylchlortetracycline industrial fermentation broths, *Separation and Purification Technology* 22 (2001) 459–466.
- [131] A. M. B. Alves, A. Morão, J. P. Cardoso, Isolation of antibiotics from industrial fermentation broths using membrane technology, *Desalination* 148 (2002) 181–186.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

- [132] A. Sousa, C. T. Tomaz, F. Sousa, J. A. Queiroz, Successful application of monolithic innovative technology using carbonyldiimidazole disk to purify supercoiled plasmid DNA suitable for pharmaceutical applications, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 8333–8343.
- [133] J. Urthaler, W. Buchninger, R. Necina, Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy, *Acta Biochimica Polonica* 52 (2005) 703–711.
- [134] T. R. Correia, P. A. Bernardo, P. H. Castilho, J. C. Nunes, M. T. P. de Amorim, I. C. Escobar, J. A. Queiroz, I. J. Correia, A. M. Morão, A bi-layer electrospun nanofiber membrane for plasmid DNA recovery from fermentation broths, *Separation and Purification technology* 112 (2013) 20–25.
- [135] G. Healthcare, *Gel filtration: principles and methods*, General Electric Company, 2010.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

Apêndice A

Determinação da concentração mássica de células para efetuar a lise

Para determinar a concentração mássica de células (peso húmido) a usar na etapa de lise foram realizados ensaios prévios de estabilidade de lisados. Para isso, efetuou-se a lise alcalina de suspensões de células com diferentes concentrações mássicas (figura A.1). A concentração mássica foi determinada como o rácio entre o peso húmido de células e o volume de tampão usado na sua ressuspensão. Os lisados obtidos foram posteriormente processados por centrifugação para remover o conteúdo sólido formado durante a lise. Como se pode verificar na figura A.1, para as concentrações de 180 e 240 g/L, observa-se um aumento da densidade ótica dos lisados centrifugados ao longo do tempo, facto que indica a ocorrência da precipitação de algum do material inicialmente dissolvido. Optou-se por escolher a concentração de 120 g/L, para a qual se verificou um reduzido aumento da densidade ótica, estando este valor igualmente dentro da gama de concentrações usadas por outros autores [28, 25, 26]. Com a escolha deste valor de concentração pretende-se assim evitar a ocorrência da precipitação de alguns constituintes do lisado em operações subsequentes à etapa da lise alcalina, facto que poderia introduzir efeitos indesejados na interpretação e desempenho dos processos.

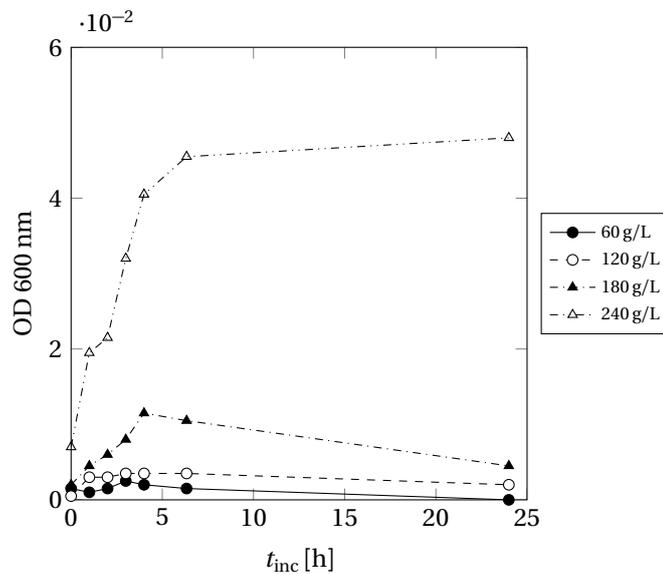


Figura A.1: Variação da densidade ótica (600 nm) em função do tempo de incubação para lisados alcalinos centrifugados a diferentes valores de concentração mássica de células (peso húmido).

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

Apêndice B

Caracterização de lisados centrifugados

Foram utilizados dois géis de SEC diferentes: o gel Sephacryl S-1000 SF e o gel Sephacryl S-100 HR (*GE Healthcare*), estando as suas principais características indicadas na tabela B.1.

Para efetuar a análise de lisados por SEC, os géis foram empacotados numa coluna com 50 mL de volume (*Sigma*), segundo as recomendações do fabricante. Obteve-se no final um volume de gel de aproximadamente 46 mL. A coluna foi conectada a um sistema cromatográfico (*Äkta purifier*, *GE Healthcare*) e as amostras de lisado foram injetadas e eluídas a um caudal de 0.5 mL/min, usando tampão Tris/HCl 10 mM a pH 8.00, com 150 mM de NaCl, como eluente. A absorvância do eluato foi continuamente monitorizada a 260 nm. Em alguns ensaios foram recolhidas amostras do eluído em intervalos de 10 min. Estas amostras foram posteriormente analisadas por AGE, HIC e BCA.

Na figura B.1 encontra-se o resultado da análise do lisado de *pVAX1-LacZ* no gel Sephacryl S-1000 SF. No cromatograma obtido (figura B.1 a) é possível identificar dois picos parcialmente sobrepostos. No primeiro pico elui o plasmídeo, que essencialmente é recolhido nas frações 4 e 5 (figura B.1 c). Devido à existência no lisado de várias espécies de RNA, estas biomoléculas eluem ao longo do segundo pico, com a prevista tendência da redução de tamanhos ao longo das várias frações. Nas análises de HIC das frações selecionadas (figura B.1 b), verifica-se a presença de plasmídeo apenas na fração 5. A área do pico na região 3 (contaminantes hidrofóbicos) diminui ao longo das frações, e na fração 10, que já parece não conter RNA, é nula. Na região 2 (contaminantes hidrofílicos), observa-se uma tendência contrária, registando-se uma maior absorvância na fração 9. Este facto parece indicar que os compostos que eluem na região 2 apresentam uma menor massa molecular.

Foi utilizado um procedimento semelhante para caracterizar o lisado com o gel Sephacryl S-100 HR. Os resultados obtidos encontram-se na figura B.2. É possível verificar que os ácidos nucleicos de maior massa molecular (pDNA e HMw RNA) não são retidos pelo gel e eluem em conjunto na fração 4. Para o LMw RNA observa-se uma ligeira retenção, sendo recolhido nas frações 4 e 5. Parte do material proteico é significativamente retido pelo gel. Observa-se a existência de uma elevada dispersividade de massas moleculares das proteínas presentes visto que estas são detetadas nas frações 5–12, cobrindo quase na totalidade o intervalo de fracionamento do gel. Pela análise dos cromatogramas de HIC (figura B.2 b), pode-se verificar que o RNA elui na região 3. De facto, apenas para as frações que contêm ácidos nucleicos (frações 4–5) existe um valor de absorvância significativo nesta região e para estas frações não se deteta uma absorvância significativa na região 2.

Tabela B.1: Principais características dos géis Sephacryl S-100 HR e Sephacryl S-1000 SF [135].

Gel	Intervalo de fracionamento [kDa]	Capacidade	Caudal recomendado	Tamanho médio das partículas
Sephacryl S-100 HR	1–100	0.4%–4% do volume total de coluna	10–35 cm/h	47 μm
Sephacryl S-1000 SF	500– 5×10^5	0.4%–4% do volume total de coluna	2–30 cm/h	65 μm

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

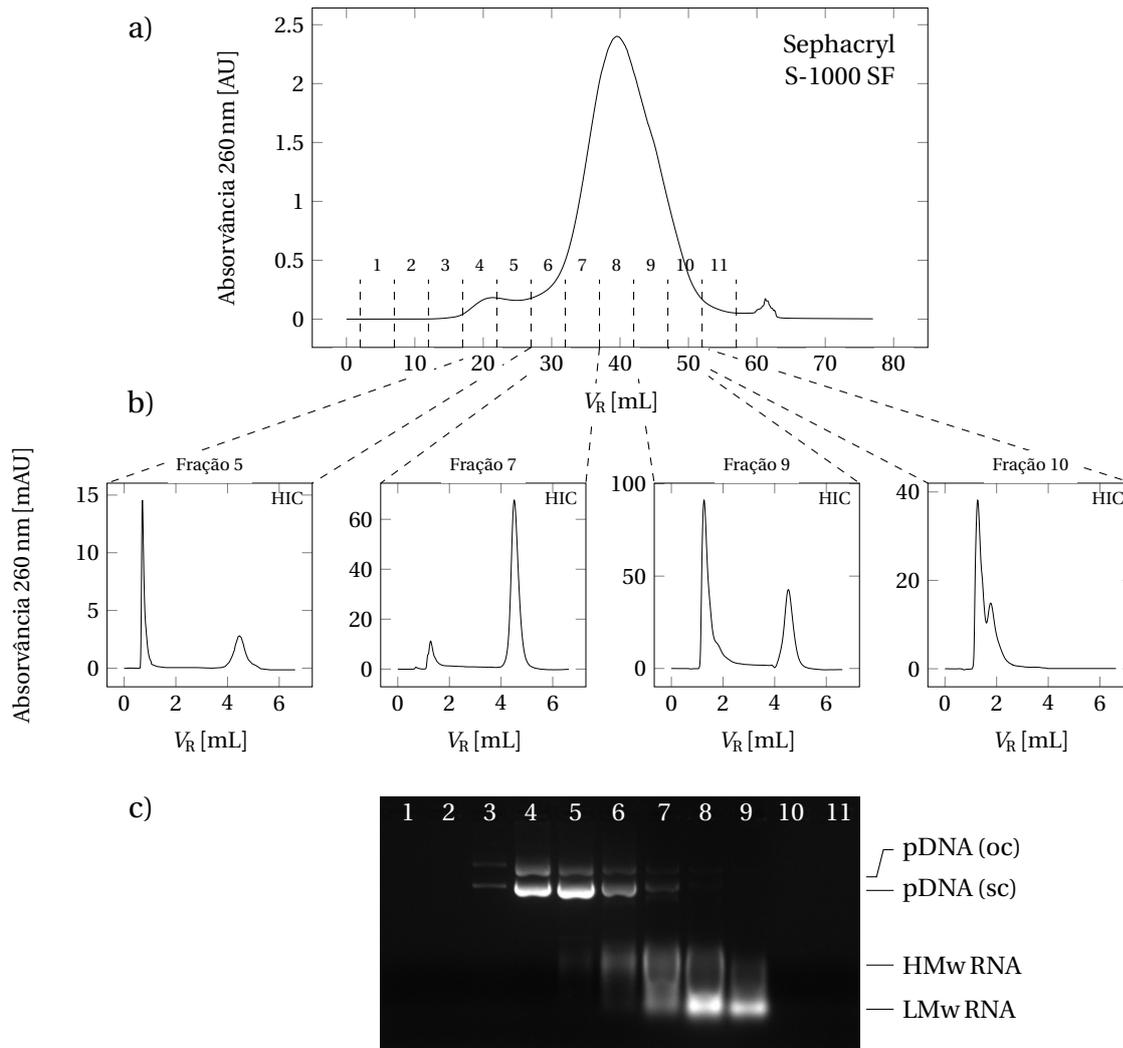


Figura B.1: Análise do lisado centrifugado obtido após lise alcalina de *E. coli* contendo o plasmídeo *pVAX1-LacZ*. a) Perfil cromatográfico do lisado no gel Sephacryl S-1000 SF (SEC); b) Análise por HIC-HPLC das frações 5, 7, 9 e 10, recolhidas durante o ensaio de SEC. c) Análise por eletroforese das frações recolhidas durante o ensaio de SEC.

A análise feita permite assim concluir uma importante característica do método de HIC face à caracterização de lisados, nomeadamente a possibilidade de quantificar numa só análise quer o pDNA (região 1) quer o RNA total presente (região 3). Os compostos que absorvem na região 2 apresentam uma menor massa molecular, sendo maioritariamente detetado nesta zona o material proteico presente nos lisados. Apesar de não serem aqui discutidos, os lisados do plasmídeo *pCAMBIA-1303* (usados no capítulo 7) apresentam resultados semelhantes. Espera-se que o material proteico presente nos lisados, pelo facto de apresentar uma menor massa molecular, possa ser separado do pDNA através de uma operação de ultrafiltração, tendo este resultado sido já verificado na prática [16, 32].

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

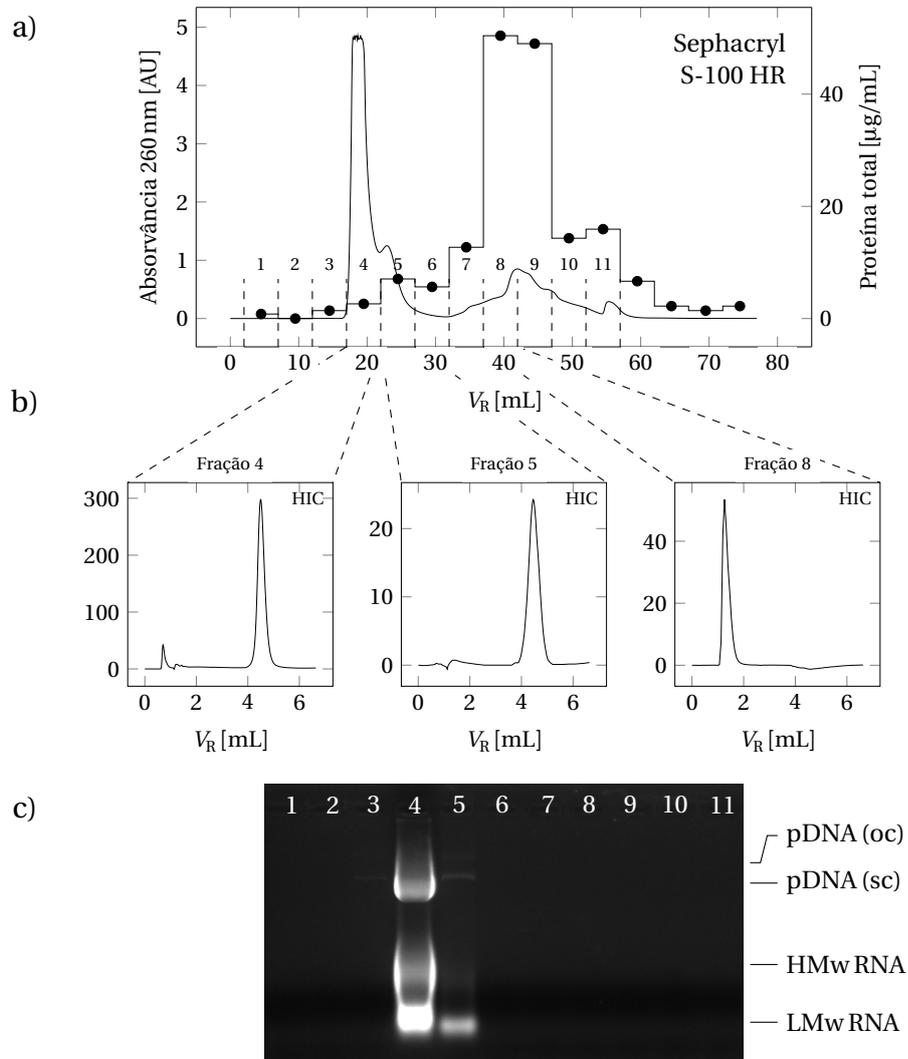


Figura B.2: Análise do lisado centrifugado obtido após lise alcalina de *E. coli* contendo o plasmídeo *pVAX1-LacZ*.

a) Perfil cromatográfico do lisado no gel Sephacryl S-100 HF (SEC). No mesmo gráfico encontram-se sobrepostos os valores de concentração de proteína total, obtidos para cada fração recolhida; b) Análise por HIC-HPLC das frações 4, 5, e 8, recolhidas durante o ensaio de SEC. c) Análise por eletroforese das frações recolhidas durante o ensaio de SEC.

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

Índice Remissivo

- absorvância, 57, 69, 77
- abstract, v
- acetato de potássio, 76, 77
- ácido acético, 76
- adsorção
 - membrana, 36, 86
 - nitrocelulose, 5
 - pDNA, 69, 76
- AFM, 49, 66
- agarose, *ver* AGE
- AGE, 68, 78, 84, 88, 104, 123
 - procedimento, 95
- agitador magnético, 35
- Åkta, 95, 123
- algoritmo
 - transporte iões, 63
- Amicon 8010, 35, 68, 76, 93
 - balanço de massa, 36
 - coeficiente de transferência de massa, 38, 63
 - modo de concentração, 36
 - modo diafiltração, 37
 - raio, 38
- Amicon 8050, 92
 - balanço de massa, 36
 - coeficiente de transferência de massa, 63
- ângulo
 - ângulo, 27
- ângulo
 - “phi”, 31
 - “theta”, 31
- arctan2, 27, 31
- Área
 - membrana, 77
- área
 - membrana, 12
- atan2, 27
- azoto, 77

- balanço de massa, 35
 - seletividade, 39
- BCA, 77, 80, 123
- Biomax 300, 93, 101
- bomba peristáltica, 35, 56, 69, 77, 92

- brometo de etídio, 75, 78
- “brownian motion tracking”, 51
- BSA, 77

- CaCl₂, *ver* cloreto de cálcio
- cadeias
 - de ligação livre, *ver* FJC
 - fechadas segmentadas, *ver* CSC
 - Gaussianas, 49, 54
 - ideias, 49
 - “worm-like”, *ver* WLC
- cadeias lineares
 - coeficiente de partição, 54
- caldos de fermentação, 91
- canais nanofluídicos, 58
- caracterização
 - membranas, 25, 39
- carga elétrica, 65
- carga membrana, 70
- caudal de permeado, 80, 93
- caudal volumétrico, 12, 92
- célula de filtração, *ver* Amicon 8010, 8050
- centrifugação, 75, 81, 94
 - impraticabilidade, 4
- centro de massa, 49, 64
- ciclo de renaturação, 75
- cloreto de cálcio, 76, 77
 - microfiltração, 83
 - precipitação, 5
 - precipitação de RNA, 83
 - precipitação RNA, 91
- cloreto de célio, 75
- cloreto de sódio, *ver* NaCl
 - sistema de 3 componentes, 20
- clorofórmio, 75
- co-ião, 20
- coeficiente
 - de atrito, 23
 - de atrito molar, 15
 - de atrito no poro, 24
 - de difusão, 15, 26, 41
 - de impedimento convectivo, 25, 55
 - de impedimento difusivo, 25

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

- de partição, 23, 26, 32, 53, 62
- de sedimentação, 43, 79
- de transferência de massa, 18, 38, 55, 56
- colmatação, 18
- coluna cromatográfica, 44, 77, 123
- comprimento
 - contorno, 49, 53, 65, 66
 - de Bjerrum, 41, 65
 - inverso Debye, 41, 65
 - persistência, 41, 50, 53, 65
 - por par de bases, 53, 65
 - poro, 26
 - segmentos, 27, 49
- concentração
 - camada de polarização, 18
 - mássica de células, 121
 - membrana, 18, 33, 55
 - no poro, 26
 - permeado, 55
 - poro, 24, 33
 - seio da solução, 18, 55
- condição de entrada no poro, 33, 53
- contaminantes
 - DNA genómico, *ver* DNA genómico
 - hidrofilicos, 44, 86
 - hidrofóbicos, 44, 80, 85
 - proteínas, *ver* proteínas
 - rendimento de remoção, 84
 - RNA, *ver* RNA
- contra-íão, 20
- coordenadas
 - cartesianas, 27
 - do centro de massa, 29
 - polares, 27
 - radial adimensional, 12, 21, 33
- cromatografia
 - exclusão molecular, *ver* SEC
 - fase reversa, 2
 - IMAC, 2
 - interação hidrofóbica, *ver* HIC
 - leito expandido, 2
 - permuta aniônica, 2
- cromatograma, 44, 123
- CSC, 27, 29, 78
 - algoritmo, 29, 64
 - código, 29
 - código três dimensões, 31
- coeficiente de partição, 62
- erro residual, 29
- três dimensões, 31
- “cut-off”, 77
- “dead-end”, 35
- deformação molecular, 54, 61
- densidade de cargas, 65
- dessalinização, 77
- detetor de IR, *ver* índice de refração
- dextrano
 - massa molecular, 51
 - raio hidrodinâmico, 40, 51
 - T2000, 48, 51
 - T500, 101
 - T70, 101
- diálise, 37
- diafiltração, 80, 93
- distância
 - de Kuhn, 49, 65
 - entre extremidades de uma cadeia, 28, 49
- DNA genómico, 75, 81, 91
 - fragmentos, 88
 - padrões, 77
 - quantificação, 77
 - redissolução, 80, 88
 - rendimento de remoção (MF), 83
- DNA plasmídico
 - adsorção, 80, 84
 - coeficiente de difusão, 41, 51, 69
 - comprimento de persistência, 41, 53
 - densidade carga, 41
 - linear, 51
 - massamolecular, 41
 - padrões, 77
 - propriedades, 40
 - quantificação, *ver* HIC
 - raio de giração, 42
 - raio dupla hélice, 41
 - raio hidrodinâmico, 51
 - rendimento de recuperação, 93, 101, 104
 - revisão bibliográfica, 7–8
 - SEC, 123
 - ultrafiltração, 61
- “downstream”, 2
- E. coli*, 75
- E. coli DH5 α* , 68, 76, 92

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

- E. coli* XL1 blue, 92
- EDTA, 76
- eletrólitos, 78
- eletroforese, *ver* AGE
- eletroneutralidade, 19, 20, 63, 78
- eluente, 44
- EMA, 2, 91
- ensaios clínicos, 75
- enzima, 2, 48, 75
- eppendorf, 57
- equação
 - diferencial, 20
 - Hagen-Poiseuille, 12
 - Maxwell-Stefan, 14
 - Nernst-Planck, 17, 63, 78
 - Stokes-Einstein, 17, 43, 50
- equilíbrio camada adsorvida, 70
- esfera rígida, 7, 23, 61
- esferas rígidas
 - coeficiente de partição, 33
 - concentração no poro, 33
- espessura camada de polarização, 17, 20, 63
- espectrofotômetro, 57, 69
- esterilização, 5
- estrutura super-enrolada, 61
- fator
 - de concentração, 85, 93, 101
 - de diluição, 76, 80
 - de impedimento convectivo, *ver* coeficiente
 - de impedimento difusivo, *ver* coeficiente
- FDA, 2, 91
- fenol, 75
- fermentação, 68, 92
- “filter-aids”, 75
- FJC, 27, 43, 48, 66
 - código, 28
 - código três dimensões, 31
 - coeficiente de partição, 53, 62
 - raio de giração, 49
 - três dimensões, 31
- fluxo
 - de permeado, 77
 - de soluto no poro, 25, 26
 - filtração, 12, 35, 55
 - molar, 17, 26
 - poro, 12, 24
 - fluxo crítico, 7–8
 - força iônica, 41, 53, 61, 65, 88
 - “force-extension”, 50
 - FS40PE, 56, 77, 85, 93, 101
 - tamanho de poro, 57
 - função de erro, 63
 - gDNA, *ver* DNA genômico
 - Glybera, 1
 - gradiente
 - concentração, 17
 - potencial elétrico, 19, 20
 - GreenSafe*, 95
 - Hagen-Poiseuille, 12, 21
 - HIC, 43, 77, 95
 - HMw RNA, *ver* RNA
 - HPLC, 77
 - iões, 19
 - ião
 - acetato, 95
 - potássio, 95
 - índice de refração, 57
 - integração numérica, 20
 - interações eletrostáticas, 61
 - isoforma, 88
 - linear, 62, 66
 - super-enrolada, 62, 66, 78, 91
 - isolamento intermediário, 3, 93, 101
 - isolamento intermediário alternativo, 94
 - isolamento primário, 2
 - isopropanol, 75
 - dessalinização, 95
 - isolamento intermediário alternativo, 94
 - precipitação, 78
 - Kuhn, *ver* distância
 - “light scattering”, 49, 51
 - lisado, 44, 75
 - clarificação, 92
 - estabilidade, 121
 - HIC, 44, 83
 - SEC, 123
 - lise alcalina, 44, 75, 76
 - método modificado, 91
 - procedimento, 45, 92
 - referências bibliográficas, 2, 45

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

- tampões, 45
- lise celular, *ver* lise alcalina, lise térmica
- lise mecânica, 75
- lise térmica, 2, 75
- lisozima, 75
- LMw RNA, *ver* RNA
- log-normal, 57
- Luria Bertani, 92

- massa molecular, 40, 41, 43
- Maxwell-Stefan, 13
 - simplificações da equação, 14
 - solutos iônicos, 17
 - solutos neutros, 18
- média radial, 25, 33
- membrana
 - Biomax 300, *ver* Biomax 300
 - colmatação, 76, 80
 - FS40PP, *ver* FS40PP
 - nitrocelulose, 91
 - Nylon, *ver* Nylon
 - TEPC, *ver* TEPC
 - XM300, *ver* XM300
 - YM100, *ver* YM100
- métodos estocásticos, 48
- MF-A, *ver* microfiltração
- MF-B, *ver* microfiltração
- MF-C, *ver* microfiltração
- MFP, 101
- Mg²⁺, 53
- microfiltração, 76, 79
 - MF-A, 79, 80
 - MF-B, 79, 81
 - MF-C, 79, 83
 - operação estudada, 3
 - permeabilidade, 12
 - revisão bibliográfica, 4
 - simulações, 79
 - tamanhos de poro, 11
- microplaca, 77
- MilliQ, 76
- mínimos quadrados, 40
- modelo
 - 3 componentes, 95
 - 4 componentes, 95
 - CSC, *ver* CSC
 - do filme, 17, 39
 - dos poros cilíndricos, 11
 - dos poros simétricos, 93
 - FJC, *ver* FJC
 - poros simétricos, 62, 68
 - transporte iões, 62
 - WLC, *ver* WLC
 - Zimm, 43, 50
- moléculas flexíveis, 47
 - coeficiente de partição, 32, 33, 53, 62
 - concentração no poro, 33
 - permeação intrínseca, 34, 63
 - representação, *ver* FJC, CSC
- mono-camada, 71
- Monte-Carlo, 27, 48, 53, 61

- N₂, *ver* azoto
- número
 - aleatório, 28
 - de Avogadro, 41
 - de Peclet, 26
 - de Reynolds, 38
 - de Schmidt, 38
 - de Sherwood, 38
 - nucleótidos, 43
 - pares de bases, 20, 41, 53
 - segmentos, 27, 49, 65
- NaCl, 53, 56, 68
- NaOH, 76
- Nernst-Planck, *ver* equação
- nitrocelulose, *ver* adsorção, 76
- Nylaflo, *ver* Nylon
- Nylon, 71, 92

- pCAMBIA-1303*, 92, 101, 105
 - permeação observada, 97
- PCR, 77, 80
- PD-10, *ver* SEC
- pDNA, *ver* DNA plasmídico
- PEG
 - raio hidrodinâmico, 40
- perfil
 - concentração, 20, 21
 - potencial elétrico, 20, 21
 - velocidade, 24
- permeação
 - intrínseca, 19, 26, 54, 63
 - observada, 19, 26, 37, 39, 55
- permeabilidade hidráulica, 13, 35, 102

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

- persistência, *ver* comprimento
- peso húmido, 75, 121
- plasmídeo, *ver* DNA plasmídico
- polarização de concentração, 17, 38, 62, 88
- poli-eletrólito, 62
- poliacrilonitrilo, 56
- policarbonato, 56, 68
- polidispersividade, 57
- polietersulfona, 93
- porosidade, 12, 26
- potencial
 - elétrico, 63
 - eletroquímico, 14
 - Maxwell-Stefan, 14
- precipitados, 75
- pressão, 35, 77
- primers, 77
- procedimento
 - HIC, 44
 - seletividade, 39
- proteínas, 75
 - quantificação, *ver* BCA
 - rendimento de remoção (MF), 83
 - SEC, 123
- proteínase K, 75
- pUC19*, 48, 56
- pUC19*
 - comprimento contorno, 53
 - distância entre extremidades da cadeia, 51
 - número de pares de bases, 51
 - raio de giração, 51
 - raio hidrodinâmico, 51
- pureza cromatográfica, 105
- purificação final, 2
- pVAX1-LacZ*, 68, 69, 76, 92, 101
 - permeação observada, 97
- PVDF, 56, 77, 93
- raio
 - da célula, 38
 - de giração, 28, 65
 - de giração instantâneo, 64
 - do poro, 40
 - dupla hélice, 41, 65
 - hidrodinâmico, 17, 26
- raio de giração instantâneo, 49
- rand, 28
- rendimento
 - de permeação, 80
 - de recuperação, 77, 80, 85, 93
- repulsão
 - eletrostática, 97
- repulsão eletrostática, 53, 61, 73
- resíduos sólidos, 76
- resumo, iii
- RNA, 42, 75
 - 16 S, 77, 78, 88
 - 23 S, 78, 88
 - 5 S, 78, 88
 - alto peso molecular, 79, 101
 - baixo peso molecular, 79, 101
 - coeficiente de sedimentação, 43
 - massa molecular, 43
 - permeação observada, 97
 - quantificação, *ver* HIC
 - raio de giração, 43, 79
 - raio hidrodinâmico, 43, 79
 - rendimento de remoção, 101, 104
 - SEC, 123
 - volume parcial específico, 43
- RNase, 45
- RNase A, 75
- Runge-Kutta, 20
- SEC
 - cromatograma, 123
 - PD-10, 77
- seletividade
 - convectiva, 15, 24
 - membranas, 39
- separação sólido-líquido, 75
- Sephacryl S-100, 56
 - características, 123
- Sephacryl S-1000
 - características, 123
- solução
 - balanço de massa, 36
 - de diafiltração, 77
 - diluída, 14
- solvente
 - “theta”, 50
 - bom, 50
 - orgânico, 75
 - “static light scattering”, 66

Purificação de DNA plasmídico usando tecnologias de membrana

- sulfato de amônio
 - HIC, 44, 77
 - isolamento intermediário alternativo, 94
- super-hélice, 66
- Svedberg, 43
- SYBR green, 77
- T_{50E10} , 76
- tampão
 - diafiltração, 80
 - lise, 45
 - MF-A, 88
 - MF-B, 81, 88
 - MF-C, 83
 - neutralização, 45
 - ressuspensão, 45
 - TAE, 78
 - Tris, *ver* Tris
- tecnologias de membranas
 - características, 4
 - referências bibliográficas, 11
 - separação de isoformas, 8
- temperatura, 41
- tensão de corte, 54, 81
- TEPC, 68
 - tamanho de poro, 57
- terapia génica, 1, 75
- termociclador, 77
- terra de diatomáceas, 76
- Terrific broth, 92
- tortuosidade, 13
- “track-etched”, 56, 68
- transfecção, 1
- transiluminador, 78, 95
- transporte restringido
 - fundamentos teóricos, 21, 47
 - referências bibliográficas, 6, 9, 47
- Tris, 56, 68, 76, 77, 93
- troca de tampão, 3, 38

- UF-A, *ver* ultrafiltração
- UF-B, *ver* ultrafiltração
- UF-C, *ver* ultrafiltração
- ultracentrifugação, 79
- ultrafiltração, 76, 85, 93
 - operação estudada, 3
 - permeação observada, 88
 - permeabilidade, 12
- revisão bibliográfica, 5–6
- separação de isoformas, 8
- separação pDNA/RNA, 101
- tamanhos de poro, 11
- UF-A, 85
- UF-B, 85
- UF-C, 85
- “Upstream”, 2

- vacinas DNA, 1, 75
- valência elétrica, 17
- vectores virais, 1
- velocidade
 - agitação, 69, 77
 - convectiva, 14, 24
 - difusiva, 14
 - fluido num poro, 12
 - solvente, 24
 - total, 14
- velocidade de agitação, 92
- vetor, 27
 - posição, 49, 64
- vectores virais, 75
- volume
 - parcial específico, 43, 79
 - parcial molar, 14

- WLC, 50, 53
 - distância entre extremidades da cadeia, 50
 - raio de giração, 50, 66

- XM300, 56, 68, 69

- YM100, 68, 69