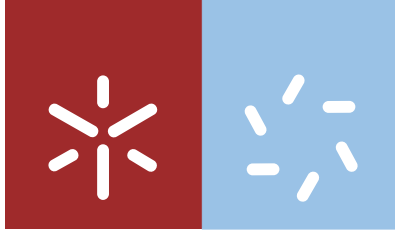


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Rúben André Gomes de Oliveira

**Sistemas de duas fases aquosas
ambientalmente sustentáveis para a
purificação de DNA plasmídico**



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Rúben André Gomes de Oliveira

**Sistemas de duas fases aquosas
ambientalmente sustentáveis para a
purificação de DNA plasmídico**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Bioquímica Aplicada

Trabalho realizado sob a orientação do
Professor Doutor João Carlos Marcos

outubro de 2013

DECLARAÇÃO

Nome Rúben André Gomes de Oliveira

Endereço electrónico: rubenoliveira89mail.com

Número do Bilhete de Identidade: 13741901

Título dissertação Sistemas de duas fases aquosas ambientalmente sustentáveis para a purificação de DNA plasmídico

Orientador(es): Professor Doutor João Carlos Marcos

Ano de conclusão: 2013

Designação do Mestrado: Mestrado em Bioquímica Aplicada

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

“Yes, I did, Dr. Wolfert, but you must understand it is the task of science to discover the truth. There is no shame attached to the recognition of error.”

Citação retirada do filme “Dr. Ehrlich’s magic bullet”

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica Aplicada pela Universidade do Minho

Agradecimentos

Depois de terminada a tese de mestrado, olho para o ano passado com um sentimento de alívio e alegria. Alegria por ter terminado este ciclo de estudos e por me sentir satisfeito com o trabalho realizado. Foram muitas horas passadas no laboratório (acho que a partir de certo ponto já tinha a programação da rádio comercial memorizada), muitas noites passadas a escrever e ler artigos. E apesar das dificuldades, termino com um sentimento de dever cumprido e acima de tudo, com muito conhecimento armazenado. É certo que a parte teórica é essencial para o desenvolvimento cognitivo e sentido crítico. Contudo, a aprendizagem que se obtém num ano de trabalho no laboratório é inestimável. Apesar da realização da tese de mestrado ser um processo individual, várias pessoas contribuíram para que este trabalho fosse levado a bom porto. Por isso, deixo aqui o meu apreço a essas pessoas.

Quero agradecer ao Professor Doutor João Carlos Ramos Nunes Marcos pela orientação prestada e pela ajuda preciosa. O seu conhecimento ajudou-me em muito na programação do trabalho experimental e na interpretação dos resultados obtidos. Além disso, o Professor João Carlos acompanhou-me desde o primeiro ano de universidade e foi o orientador do meu Projeto de Licenciatura. Este conhecimento prévio contribuiu para um bom ambiente de trabalho e a possibilidade para explorar novas abordagens, valiosas sugestões e oportunas críticas. Apesar das suas muitas ocupações, agradeço a sua disponibilidade para discutir o andamento do trabalho e a motivação perante resultados menos conseguidos.

Agradeço ao Pedro, grande amigo desde o primeiro ano de universidade, pelo companheirismo e ajuda na execução do trabalho. Sempre que precisava de realizar alguma atividade no Departamento de Biologia ele mostrava-se sempre disponível. As suas visitas ao laboratório eram sempre um bom tempo de descontração e uma oportunidade para desanuviar.

A todos os meus amigos que me souberam apoiar e motivar nos momentos mais cruciais. Eles são uma parte muito importante para mim.

Quero deixar aqui o mais profundo agradecimento aos meus pais. Foi graças a eles que me tornei na pessoa que sou. Deram-me uma excelente educação, se fiz ou faço alguma coisa de errada, é certo que não têm culpa nisso. Desde sempre que se preocuparam com a educação dos filhos. O meu pai foi durante muitos anos sócio do Círculo de leitores e desde que me lembro, ele incutiu-me a paixão pelos livros e conhecimento. Eles possibilitaram a minha entrada na universidade e pagaram todas as despesas inerentes.

Aos meus irmãos, por quem tenho um grande carinho, que me ajudaram e motivaram ao longo do ano. São uma companhia essencial na minha vida e no meu bem-estar.

A toda a minha família, em especial à minha prima Daniela, que sempre se preocupou comigo e pelo meu sucesso. Além disso, ela proporcionou-me o emprego part-time que ajudou a minimizar os custos dos meus pais na minha educação.

Por último, deixo um grande apreço e um muito obrigado à minha namorada Patrícia. Foi uma pessoa que me apoiou imenso e lidou com as minhas frustrações. Acompanhou todo o meu trabalho, dando a sua opinião e contributo.

Resumo

Os sistemas de duas fases aquosas (SDFA's) oferecem um grande potencial para a purificação em grande escala de DNA plasmídico (pDNA) para posterior aplicação em terapias moleculares. Estes sistemas baseiam-se na mistura de dois polímeros ou de um polímero e um sal em água, que acima de concentrações críticas formam duas fases distintas que possibilitam a partição diferencial dos compostos adicionados. Considerando as diversas vantagens, que incluem a facilidade de aumento de escala e o baixo custo, destaca-se a operação em contínuo (em macro e microescala) e a elevada capacidade.

Neste trabalho, estudou-se a possibilidade de utilização de sistemas de duas fases aquosas ambientalmente sustentáveis para a purificação de pDNA. Testaram-se sistemas polímero-sal e líquido iónico-sal. Foi caracterizado o sistema PEG-citrato de sódio. E observou-se que as curvas binodais obtidas são semelhantes às de outros sistemas PEG-sal bem previamente descritos. A caracterização do sistema permitiu concluir que o efeito de “salting-out” do citrato é fator determinante para a formação e separação das fases.

Os estudos de partição e purificação das moléculas de pDNA, presentes no lisado alcalino, permitiram selecionar os sistemas 23% (p/p) citrato de sódio, 20% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 e 16% (p/p) citrato de potássio, 36% (p/p) brometo de 1-butil-3-metilimidazólio para posterior purificação num processo multi-estágio. Nestes sistemas, registou-se a acumulação de moléculas de RNA na fase superior. As moléculas de pDNA apresentaram distribuição na fase inferior rica em sal.

Apesar de se ter registado a presença de RNA na fase superior destes sistemas, ainda permaneceram moléculas de ácido ribonucleico na fase inferior onde também se distribuem as moléculas de plasmídeo. Assim, procedeu-se ao uso de vários estágios para remover a totalidade das moléculas de RNA e dos contaminantes proteicos. Utilizando este processo de multi-estágio obteve-se plasmídeo com elevado grau de pureza na fase inferior. Estes dois sistemas apresentam assim um grande potencial para futura purificação de pDNA em contínuo.

Abstract

Aqueous two-phase systems (ATPS's) offer a great potential for large scale purification of plasmid DNA (pDNA) for subsequent use in molecular therapies. These systems are based on the mixture in water of two polymers or a polymer and a salt - which above critical concentrations form two phases. This allow the differential partition of compounds between the two phases. These systems presents several advantages that includes easy scale-up, low cost, possibility of continuous operation (at macro and micro scale) and high capacity.

In this work it was studied the possibility of using environmental friendly aqueous two-phase systems for purifying pDNA. The systems tested were polymer-salt and ionic liquid-salt. The system PEG-sodium citrate was characterized and it was observed that binodal curves obtained were similar to other PEG-salt systems previously described. From the characterization of these systems it was concluded that the effect of "salting -out" of citrate is determinant for the formation and separation of the phases.

Partition and purification studies of pDNA molecules, present in the alkaline lysate, allowed the selection of the systems 23% (w/w) sodium citrate, 20% (w/w) PEG 400 at pH 6,9 and 16% (w/w) potassium citrate, 36% (w/w) 1-butyl-3-methylimidazolium bromide for further purification in multi-stage process. In these systems, RNA molecules partitioned to the top phase, while plasmid DNA molecules were distributed in the salt-rich bottom phase.

Although it was detected the presence of RNA in the top phase of these systems, some ribonucleic acid molecules remained in the bottom phase. Thus, we proceeded to use several stages to remove all of the RNA molecules and protein contaminants. Using this multi-stage process plasmid was obtained with high purity in the bottom phase. These two systems present though great potential for future purification of pDNA in continuous mode.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Índice	vii
Abreviaturas	x
Símbolos	xii
1 – Introdução	1
2 – Sistemas de duas fases aquosas (SDFA's) – Considerações gerais e Aplicações	7
2.1. Caracterização de sistemas de duas fases aquosas	8
2.1.1. Caracterização de sistemas de duas fases aquosas líquido iónico-sal	9
2.1.1.1. Efeito do sal na formação de duas fases	10
2.1.1.2. Efeito dos líquidos iónicos na formação de duas fases	12
2.1.1.3. Aplicação dos SDFA's compostos por líquidos iónicos	12
2.2. Partição em sistemas de duas fases aquosas	16
2.2.1. Exclusão	16
2.2.2. Interações eletrostáticas	17
2.2.3. Hidrofobicidade	17
2.2.4. Afinidade específica	18
3 – Produção e extração de DNA plasmídico	21

3.1. Introdução	22
3.1.1. <i>Escherichia coli</i> : organismo hospedeiro para a produção de plasmídeo	22
3.1.2. <i>E. coli</i> DH5 α e DH5 α [acKA-pta] [poxB]	25
3.1.3. DNA plasmídico (pDNA)	26
3.2. Materiais e Métodos	30
3.2.1. Materiais	30
3.2.2. Microrganismos	30
3.2.3. Cultura de <i>E. coli</i> DH5 α em frascos agitados	30
3.2.4. Lise celular	31
3.3. Resultados e Discussão	31
3.3.1. Cultura de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	31
4 – Caracterização de sistemas polietilenoglicol-citrato de sódio	34
4.1. Introdução	35
4.2. Materiais e Métodos	35
4.2.1. Materiais	35
4.2.2. Preparação dos sistemas de fases aquosas	35
4.2.3. Determinação das linhas binodais	35
4.2.4. Determinação das “tie-lines”	36
4.2.5. Determinação de citrato de sódio	36
4.2.6. Determinação de polietilenoglicol	37
4.3. Resultados e discussão	37
4.3.1. Efeito do peso molecular do polímero	37
4.3.2. Efeito do pH	38

4.3.3. Confirmação das “tie-lines”	40
5 – Estudos de partição e purificação de DNA plasmídico em sistemas PEG-sal e líquido iônico-sal	42
5.1. Introdução	43
5.2. Materiais e Métodos	43
5.2.1. Materiais	43
5.2.2. Extrato celular	43
5.2.3. Preparação dos sistemas de duas fases aquosas	43
5.2.4. Preparação dos sistemas de duas fases aquosas para ensaios em multi-estágio	45
5.2.5. Eletroforese em gel de agarose	45
5.2.6. Determinação da concentração de proteínas	46
5.3. Resultados e Discussão	46
5.3.1. Efeito do peso molecular do polímero	46
5.3.2. Efeito do pH	48
5.3.3. Otimização do processo de purificação em sistemas polímero-sal	50
5.3.4. Purificação de plasmídeo em SDFA’s líquidos iônicos-sal	55
5.3.5. Ensaio multi-estágio	60
5.3.6. Quantificação proteica em sistemas polímero-sal e líquido iônico-sal	64
7 – Conclusões e Trabalho Futuro	67
Referências	73

Abreviaturas

[C₄mim]⁺ ou [Bmim]⁺ – Ião 1-butil-3-metilimidazólio

[C₄mim]BF₄ ou [Bmim]BF₄ – Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio

[C₄mim]Br ou [Bmim]Br – Brometo de 1-butil-3-metilimidazólio

[C₄mim]Cl ou [Bmim]Cl – Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio

[C₄mim]PF₆ ou [Bmim]PF₆ – Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio

[C₄py]Cl – cloreto de n-butilpiridina

[N₄₄₄₄]Cl – cloreto de tetra-n-butilamônio

[P₄₄₄₄]Cl – cloreto de tetra-n-butilfosfônio

BSA – Albumina do soro bovino, derivado do inglês “Bovine serum albumin”

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

GFP – Proteína de fluorescência verde, derivado do inglês “Green fluorescence protein”

GST – Glutathione-S-transferase

HCMV – Citomegalovírus humano, derivado do inglês “Human cytomegalovirus”

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

LI – Líquido iônico

LPS – Lipopolissacarídeos

MCS – Local de múltipla clonagem, derivado do inglês “Multiple cloning site”

mRNA – RNA mensageiro

NAG – N-acetilglucosamina

NAM – Ácido N-acetilmurâmico

PCR – Reação em cadeia do enzima polimerase. Processo utilizado para a amplificação de ácidos nucleicos, derivado do inglês “Polymerase chain reaction”

pDNA – DNA plasmídico

PEG – Polietilenoglicol

PEI – Polietileneimina

RNA – Ácido ribonucleico

SDFA – Sistema de duas fases aquosas

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

Símbolos

ΔG – Variação da energia de Gibbs

ΔH – Variação da entalpia

ΔS – Variação da entropia

T – Temperatura absoluta

“No amount of experimentation can ever
prove me right, a single experiment can prove me wrong.”

Albert Einstein

1- Introdução

Os princípios da terapia génica residem na introdução de um gene nas células-alvo de modo a que a sua subsequente expressão atinja um propósito terapêutico. O potencial da terapia génica como opção medicinal para reverter desordens genéticas hereditárias e outras condições induzidas pela presença de um ou mais genes mutados é real. O gene de interesse é inserido num vetor capaz de o introduzir de maneira segura nas células destinatárias. Existe uma grande variedade de vetores que podem ser empregues. Estes incluem tanto os vetores virais (particularmente os adenovírus) como os não-virais, nomeadamente os lipossomas e o DNA plasmídico. A entrada dos vetores não-virais nas células é mediada por endocitose. Uma porção dos vetores abandona o endossoma e fica em contacto direto com o citoplasma. Uma vez no citoplasma, algumas moléculas são degradadas por nucleases citoplasmáticas, reduzindo a eficiência de transfeção. As

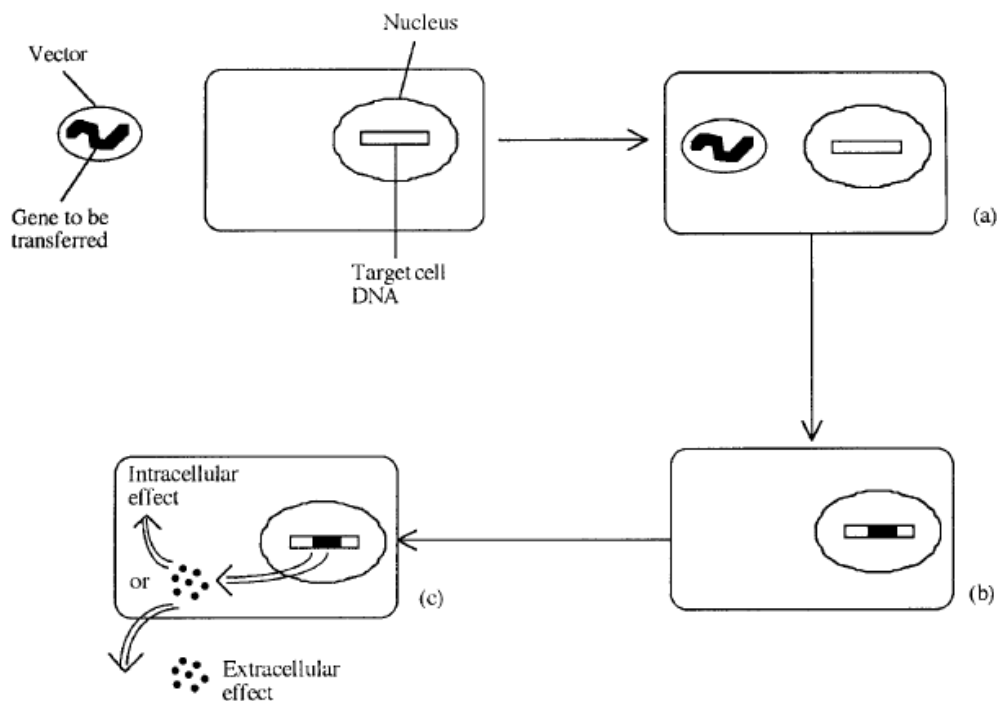


Figura 1.1 - Representação esquemática retratando os princípios básicos da terapia génica. O gene de interesse terapêutico é primeiramente inserido num vetor para posterior introdução do ácido nucleico nas células-alvo. (a) Entrada do gene de interesse associado ao vetor no citoplasma da célula. (b) Transferência do gene terapêutico para o núcleo da célula. No caso de vetores virais há a integração do gene exógeno no DNA da célula-alvo. Com vetores não-virais não se verifica essa inserção. (c) O gene de interesse terapêutico é expresso, resultando na síntese da proteína pretendida. Processos regulatórios asseguram que a proteína é retida no citoplasma ou então é exportada para fora da célula (Gary Walsh, 2003).

restantes moléculas de DNA exógeno podem ingressar no núcleo por entrada direta como consequência da rutura do invólucro nuclear associado ao processo de mitose. Outra possibilidade de penetração pode ser através dos poros nucleares, que poderá ocorrer via difusão passiva ou por um transporte com necessidade energética (Walsh, 2003).

Ginn *et al.* enumeraram 31 países onde decorreram ensaios clínicos com biofármacos baseados em terapia génica até 2012. É de ressaltar que 63,7% dos ensaios efetuados foram registados nos Estados Unidos da América. A maioria dos ensaios clínicos tinham como propósito o tratamento de doenças cancerígenas (64,4%), sendo a transferência do gene supressor tumoral p53 para as células-alvo a terapia mais recorrente. Ao contrário do que se poderia pensar, apenas 8,7% dos estudos realizados em terapia génica tinham como finalidade o tratamento de doenças monogénicas. Foi registada uma grande diversidade de genes utilizados nos ensaios de terapia génica. Como seria expectável, os genes mais utilizados estavam associados ao tratamento de doenças cancerígenas (antigénios, citocinas e genes supressores tumorais) (Ginn *et al.*, 2013).

Mais de três quartos dos ensaios clínicos realizados até à data encontram-se em fase I/II. Ainda assim, a proporção de ensaios em fase II, II/III e III continua a aumentar (21,2% comparado com 19,1% em 2007 e 15% em 2004), indicando o progresso atingido (Ginn *et al.*, 2013). Alguns ensaios de terapia génica mostraram potencial, destacando-se os exemplos para o tratamento da hemofilia B e para a deficiência na lipoproteína lipase em adultos. Amit Nathwani *et al.* utilizaram o vetor “recombinant adeno-associated virus” rAAV contendo um promotor específico e a sequência do gene FIX (gene que codifica o fator de coagulação IX, ausente nos indivíduos com hemofilia). Dos seis pacientes tratados, quatro foram capazes de produzir o fator IX e evitando assim hemorragias espontâneas. Para os outros dois pacientes, o tempo decorrido entre as injeções com ação profilática foi aumentado. Embora seja necessário um acompanhamento a longo prazo, e apesar do risco de disfunção hepática, esta terapia demonstrou grande potencial para converter uma forma severa de hemofilia numa forma mais moderada ou até reverte-la por completo (Nathwani *et al.*, 2011).

A escolha do vetor a utilizar irá depender de certas considerações. A maior contemplação reside no objetivo final da aplicação da terapia génica. Outra consideração a reter é a duração desejada da consequente expressão do gene introduzido. Na maioria das doenças genéticas, a expressão a longo prazo é fundamental. Isto porque o principal objetivo no tratamento de doenças monogénicas reside na transferência estável em células estaminais do gene de interesse, de modo a assegurar a continuidade da terapia. A fibrose cística é a doença hereditária mais comum na Europa e Estados Unidos da América, daí que 22,4% dos 161 ensaios clínicos totais realizados para o tratamento de doenças monogénicas tenham tido como alvo de estudo a fibrose cística (Ginn *et al.*, 2013). Para assegurar a expressão a longo prazo do gene de interesse, é necessária a utilização de um vetor viral, visto que este tipo de vetores insere de forma aleatória o DNA nos

cromossomas das células hospedeiras. Além disso, com o uso de vetores virais, a eficiência da transferência do gene é extremamente elevada. Os vetores virais também apresentam elevada especificidade para as células que vão internalizar. Contudo, este tipo de vetores é passível de desencadear reações inflamatórias no paciente. E o risco de carcinogênese é maior devido à inserção do material genético no DNA celular. Para outras aplicações, como algumas formas de cancro, a expressão a curto prazo do gene inserido é o desejável. Este tipo de expressão é obtido com o uso de vetores não-virais. Com estes vetores não ocorre a integração do gene terapêutico no cromossoma do hospedeiro, evitando a segregação de genes essenciais ou ativação de oncogenes (Walsh, 2003).

Uma grande variedade de vetores foram empregues nos ensaios de terapia génica. Apesar dos vetores virais ainda registarem maior aplicação, a utilização de vetores não-virais tem vindo a aumentar (Ginn *et al.*, 2013). O DNA plasmídico é um dos vetores não-virais mais frequentemente utilizados para introduzir informação genética devido à sua

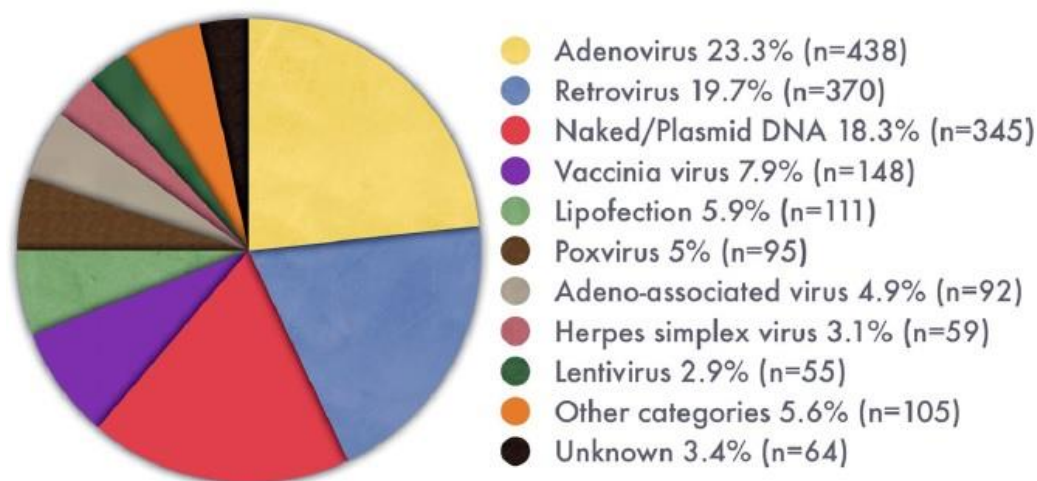


Figura 1.2 – Vetores utilizados nos ensaios de terapia génica (adaptado de Ginn *et al.*, 2013).

fácil produção em culturas bacterianas, nomeadamente *Escherichia coli* (Carnes *et al.*, 2009). Além disso, apresentam baixa imunogenicidade e possibilidade de serem produzidos em escala industrial. Porém apresentam baixa especificidade e eficácia (Walsh, 2003). Foram desenhados vários plasmídeos com o intuito de aumentar o rendimento e a qualidade dos vetores construídos (Carnes *et al.*, 2010). Apesar dos esforços efetuados para a otimização dos vetores, o gene inserido pode conferir baixo rendimento ou toxicidade ao plasmídeo (Carnes and Williams, 2007).

A produção de DNA plasmídico é usualmente realizada em estirpes de *E.coli* como DH5 α , DH5, DH1, JM108 ou DH10B (Williams *et al.*, 2009). Yau *et al.* realizaram um estudo intensivo sobre o rendimento e a percentagem de moléculas de pDNA com

estrutura superenrolada em 17 estirpes diferentes. A cultura das células bacterianas foi realizada em frascos agitados e foram testados três plasmídeos diferentes. As estirpes HB101 e DH5 α tiveram quase 100% de plasmídeos com conformação superenrolada e elevados rendimentos em dois dos três tipos de plasmídeo em estudo (Yau *et al.*, 2008).

O aumento do rendimento e produtividade com diminuição dos custos é um requisito essencial para a produção de DNA plasmídico em escala industrial. Durante muito tempo, a grande maioria dos processos de fermentação resultava em reduzidos rendimentos de plasmídeo (< 200 mg/L), elevando o custo de produção e purificação do mesmo. No entanto foram descritos alguns processos de elevado rendimento (500-1500 mg/L), possibilitando a produção de plasmídeo com custos aceitáveis. Mais recentemente, Williams *et al.* otimizaram um vetor e concomitante processo de fermentação que possibilitou o aumento do rendimento de DNA plasmídico para 2,2 g/L (Williams *et al.*, 2009).

O processo de fermentação exerce um grande impacto na qualidade do pDNA. Assim como, a composição do meio de cultura também afeta o crescimento e as características de lise celular (O’Kennedy *et al.*, 2000). De maneira a isolar o plasmídeo recorre-se usualmente à lise alcalina seguida da utilização de técnicas que possibilitam a separação do pDNA de outros componentes celulares como o DNA genómico, RNA e proteínas (Cano *et al.*, 2005). Enquanto o RNA é facilmente degradado pela RNase A, é no DNA cromossomal onde reside o maior problema. É que este não é facilmente removido da preparação com plasmídeo por resinas de troca aniónica ou matrizes de sílica e pode passar despercebido num gel com brometo de etídio (Paul *et al.*, 2008). É na remoção quase total do DNA genómico, onde subsiste a grande vantagem da lise alcalina quando comparada com outros métodos de lise celular.

Devido à emergência de introdução de terapias moleculares tais como as vacinas de DNA e a terapia génica (Cano *et al.*, 2005), tem-se registado nos últimos anos uma grande necessidade desenvolvimento de novos métodos para a purificação de DNA, como por exemplo os baseados em sistemas de duas fases aquosas. Existem numerosos protocolos para purificar DNA plasmídico a uma escala laboratorial. Muitos são baseados em métodos cromatográficos, visto que estas técnicas apresentam uma alta resolução e permitem obter preparações de DNA plasmídico com elevado grau de pureza. Todavia, estes procedimentos apresentam alguns problemas como a sua escalabilidade, utilização de produtos tóxicos, baixa capacidade e rendimentos baixos (Xu *et al.*, 2005). A sua implementação em larga escala exige elevados investimentos e custos de operação (Barbosa and Marcos, 2010). Devido à procura de grandes quantidades de pDNA (apenas

um em 10^4 - 10^5 dos plasmídeos internalizados pelas células entrarão no núcleo intactos e serão expressos com sucesso) para futuras aplicações clínicas tornou-se imperativo o desenvolvimento e implementação de técnicas mais económicas com capacidade e rendimentos mais elevados. Para esse objetivo, sistemas de duas fases aquosas podem ser uma alternativa viável.

Neste trabalho apresenta-se o estudo realizado com o intuito de definir condições ideais para a purificação de DNA plasmídico em sistemas de duas fases aquosas. Tendo como perspectiva a utilização de sistemas ambientalmente sustentáveis, foram selecionados os sistemas polietilenoglicol-citrato de sódio e líquido iónico-sal. O primeiro, além do baixo custo inerente aos sistemas polímero-sal, tem a vantagem adicional de gerar efluentes menos tóxicos, já que o citrato é facilmente degradado por microrganismos (Marcos, 2000). Os líquidos iónicos são caracterizados pelas suas estabilidade química e térmica, elevada capacidade de solubilização, baixas toxicidade e volatilidade e pelo facto de não serem inflamáveis (Freire *et al.*, 2012). A capacidade de manipular as suas polaridades e afinidades, modificando o núcleo catiónico ou aniónico que os compõem, é uma grande vantagem visto que a maioria dos polímeros tem baixa polaridade (Freire *et al.*, 2012). Além disso, o uso de líquidos iónicos é vantajoso uma vez que são menos viscosos que a maioria dos polímeros utilizados em sistemas de duas fases aquosas. A baixa viscosidade favorece a transferência de massa durante o processo de extracção (Li *et al.*, 2010).

Depois de encontradas as condições ideais para a purificação de moléculas de plasmídeo em sistemas polímero-sal e líquido iónico-sal, serão selecionados os sistemas que poderão assegurar uma futura purificação de pDNA de modo contínuo em sistemas de microfluidos.

**2- Sistemas de duas fases
aquosas (SDFA's)-
Considerações gerais e
Aplicações**

2.1. Caracterização de sistemas de duas fases aquosas

Os sistemas de duas fases aquosas formam-se após a mistura de soluções aquosas de dois polímeros ou de um polímero e um sal quando as concentrações destes componentes ultrapassam um determinado valor crítico. Estes sistemas são utilizados tradicionalmente para a separação e purificação de amostras biológicas como ácidos nucleicos, proteínas ou células (Hardt *et al.*, 2012). A composição dos SDFA's pode ser representada esquematicamente num diagrama de fases (Figura 2.1), em que o eixo das abcissas corresponde à concentração do componente que se acumula na fase inferior e o eixo das ordenadas à concentração do componente que se acumula na fase superior do sistema. A linha CP'B representa a binodal que dita as concentrações mínimas dos compostos que permitem a formação de duas fases distintas. Assim, concentrações abaixo desta linha não possibilitam a formação de duas fases, enquanto concentrações acima da binodal formam duas fases. A constituição de cada sistema bifásico pode ser definida por uma linha reta denominada "tie-line", que intersecta a binodal em dois pontos (C e B). O ponto C corresponde à composição da fase superior e o ponto B à constituição da fase inferior. Todos os pontos situados sob a mesma "tie-line" correspondem a sistemas com a mesma composição de fase superior e inferior, divergindo apenas nas razões volumétricas de fases (Kepka, 2004; Marcos, 2000). As "tie-lines" são caracterizadas pelo seu comprimento. O comprimento é calculado considerando a "tie-line" a hipotenusa de um triângulo, em que os catetos são formados pela diferença de concentração dos componentes nas duas fases (Marcos, 2000).

Os diagramas de fases são ainda caracterizados pelo ponto crítico (que na Figura 2.1 é identificado pelo ponto P') e pelo ponto limite. O ponto crítico corresponde à composição teórica em que o volume e a composição das duas fases são iguais. Pode ser obtido pela interseção com a binodal de uma linha que passa pelo ponto médio de várias "tie-lines". O ponto limite é o ponto onde a binodal é tangente à linha que une segmentos iguais nos eixos do diagrama. A posição relativa do ponto limite e do ponto crítico define a simetria do diagrama de fases. Assim, quanto mais afastados estiverem mais assimétrico é o diagrama. Quando coincidem, o diagrama considera-se simétrico (Marcos, 2000).

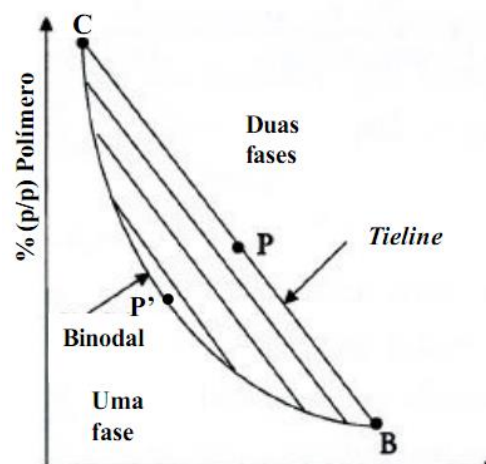


Figura 2.1 - Diagrama de fases para sistemas de duas fases aquosas polímero-polímero ou polímero-sal (Kepka, 2004).

Os sistemas de duas fases aquosas foram pela primeira vez descritos na literatura pelo microbiólogo holandês Beijerinck. Ele registou que juntando soluções aquosas de gelatina e agar, estes separavam-se em duas fases. Só passado mais de meio século é que Albertsson, ao tentar isolar pirenóides de cloroplastos, descobriu acidentalmente que uma mistura do polímero polietilenoglicol e tampão fosfato de potássio formava duas fases. Este facto despertou grande

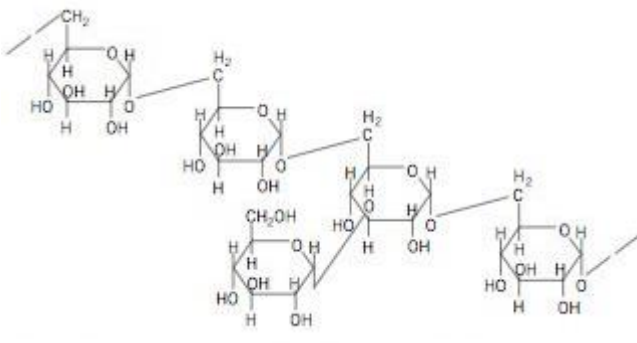


Figura 2.2 - Estrutura química de um fragmento de dextrano (retirado do website dextran.net).

interesse neste cientista, levando-o a desenvolver extensivos estudos sobre as aplicações destes sistemas (Albertsson, 1986).

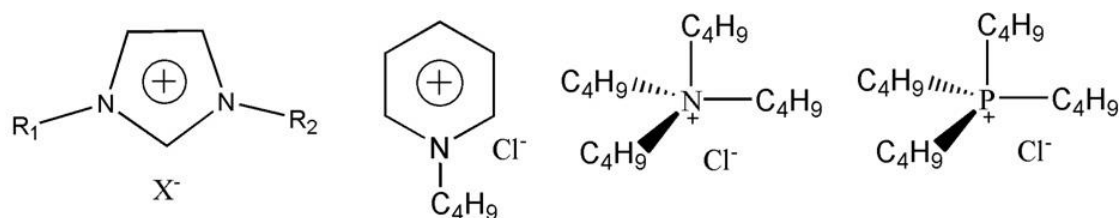
Existem vários sistemas de duas fases aquosas, como PEG-fosfato, PEG-citrato, PEG-sulfato de amónio e PEG-dextrano, todos eles apresentando vantagens e

desvantagens e por isso cabe ao investigador utilizar aquele que se adequa ao seu objetivo. Estes sistemas têm custos reduzidos, não são utilizados produtos tóxicos e é uma técnica bastante simples de executar (Xu *et al.*, 2005). Ainda assim, é necessária uma cromatografia para alcançar o nível de pureza adequado para aplicações terapêuticas, como é o caso da terapia génica e das vacinas de DNA (Duarte *et al.*, 2007).

2.1.1. Caracterização de sistemas de duas fases aquosas líquido iónico-sal

Os líquidos iónicos (LI's) são sais que, ao contrário de outros eletrólitos, são líquidos a baixas temperaturas. Walden descreveu o composto nitrato de etilamónio como sendo o primeiro líquido iónico em 1914 (Oppermann *et al.*, 2011). Devido à sua natureza iónica, apresentam propriedades únicas: baixa volatilidade, estabilidade química e térmica, elevada capacidade de solubilização e não são inflamáveis. Estas características tornam atrativa a utilização dos líquidos iónicos na extração de vários compostos orgânicos, traduzindo-se numa alternativa aos solventes orgânicos (Freire *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2010).

Os líquidos iónicos podem ser utilizados para formar SDFA's. É uma das grandes vantagens destes líquidos é a capacidade de manipular as suas polaridades e afinidades modificando o núcleo catiónico ou aniónico que os compõem (Figura 2.3). Esta característica é de facto um grande benefício dada a reduzida polaridade de grande parte dos polímeros usados



$R_1 = \text{H}, \text{CH}_3$

$R_2 = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_4\text{H}_9, \text{C}_6\text{H}_{13},$
 $\text{C}_8\text{H}_{17}, \text{OH}-\text{C}_2\text{H}_4^-, \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2^-,$
 allyl

$X = \text{Cl}^-, \text{Br}^-, \text{BF}_4^-, \text{CH}_3\text{CO}_2^-,$
 $\text{MeSO}_4^-, \text{EtSO}_4^-, \text{CH}_3\text{SO}_3^-,$
 $\text{CF}_3\text{SO}_3^-, \text{N}(\text{CN})_2^-, \text{HSO}_4^-$

Figura 2.3 - Estrutura química dos líquidos iônicos comumente utilizados em sistemas de duas fases aquosas (Li *et al.*, 2010).

em sistemas de duas fases aquosas (Freire *et al.*, 2012). Além disso, o uso de líquidos iônicos é vantajoso uma vez que são menos viscosos que a maioria dos polímeros utilizados em sistemas de duas fases aquosas. A baixa viscosidade favorece a transferência de massa durante o processo de extração, assim como facilita a deslocação das fases nos microcanais de um sistema de microfluidos. É de ressaltar que a maioria dos líquidos iônicos utilizados em SDFA's apresenta baixa toxicidade (Li *et al.*, 2010).

2.1.1.1. Efeito do sal na formação de duas fases

Em sistemas líquido iônico-sal, este último tem grande influência no equilíbrio de fases do sistema. Foi documentado que a formação de sistemas de duas fases aquosas ocorria consoante a adição de quantidades apropriadas de sais como K_2HPO_4 , K_3PO_4 , K_2CO_3 , KOH , NaOH ou Na_2HPO_4 em solução aquosa de cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio ($[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ ou $[\text{Bmim}]\text{Cl}$). Todavia, a adição de KH_2PO_4 , K_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_4\text{SO}_4$, KCl ou NaCl não resultava na separação de fases. Foi sugerido que se tratava de um fenómeno solvofóbico. Os iões cosmotrópicos, como são exemplo HPO_4^{2-} , OH^- , CO_3^{2-} e PO_4^{3-} , são benéficos para a formação de SDFA's. Isto porque as interações entre estes aniões e as moléculas de água são mais fortes que as interações que as moléculas de água estabelecem entre si. Contudo, os iões caotrópicos (Cl^- , NH_4^+ , K^+ e H_2PO_4^-) exibem interações mais fracas com a água (Li *et al.*, 2010). O facto dos iões cosmotrópicos estabelecerem fortes ligações com a água diminui o número de moléculas de água livres para solvatar as moléculas de líquido iónico. O efeito de “salting-out” causado pelo sal proporciona a formação de duas fases: a fase superior rica em líquido iónico e a fase inferior rica em sal. Como os iões caotrópicos formam ligações mais fracas com a água, a energia necessária para quebrar essas ligações e assim proporcionar moléculas de água livres para solvatar as moléculas de líquido iónico é menor. A solubilização das moléculas de líquido iónico torna inviável a formação de

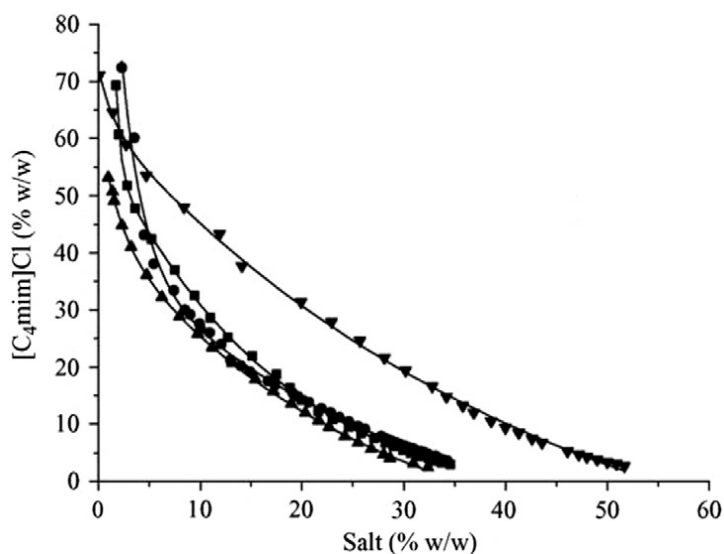


Figura 2.4 – Curvas binodais para sistemas [C₄mim]Cl-sal a 298,15 K:

▼ KOH; ■ K₂HPO₄; ● K₂CO₃; ▲ K₃PO₄ (Li *et al.*, 2010).

sistemas de duas fases aquosas. A constituição do complexo ião-água é um fator preponderante para a formação de duas fases (Li *et al.*, 2010; Shahriari *et al.*, 2012).

A Figura 2.4 exhibe as linhas binodais para SDFA's formados pelo líquido iônico [C₄mim]Cl e diferentes sais inorgânicos. Pode afirmar-se que a capacidade dos diversos sais para formar duas fases segue a

seguinte ordem: K₃PO₄ > K₂HPO₄ ≈ K₂CO₃ > KOH. Esta apetência pode ser explicada pela energia de Gibbs de hidratação dos aniões dos sais. Os iões cosmotrópicos têm grandes valores negativos de energia de Gibbs, enquanto os iões caotrópicos exibem baixos valores negativos ou até valores positivos de energia de Gibbs de hidratação. É por isso mais fácil formar sistemas de duas fases aquosas recorrendo ao uso de sais cosmotrópicos (Li *et al.*, 2010).

Os SDFA's são sistemas ternários compostos por água e outros dois solutos. O diagrama de fases triangular na Figura 2.5 representa a composição ternária de um sistema líquido iônico-sal hipotético. Todos os sistemas com composição abaixo da binodal formam duas fases enquanto aqueles que se encontram acima da binodal formam um sistema homogêneo e monofásico. Para um sistema com composição total M, as composições das duas fases são representadas pelos pontos B e D, que são os pontos extremos da "tie-line". Esses pontos representam as concentrações finais dos componentes na fase superior e inferior do sistema M. Ao longo da "tie-line", os diferentes sistemas possíveis diferem nas composições totais e na razão de volumes, porém apresentam a mesma concentração de componentes na fase superior e inferior. O ponto C representa o ponto crítico do diagrama de fases (Freire *et al.*, 2012).

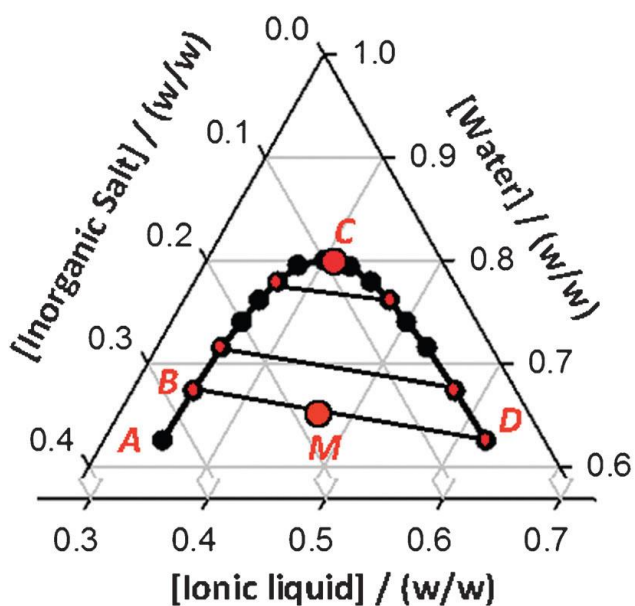


Figura 2.5 – Diagrama de fases triangular para um sistema hipotético composto por líquido iônico, sal e água (Freire *et al.*, 2012).

2.1.1.2. Efeito dos líquidos iónicos na formação de duas fases

Devido às diferentes estruturas dos catiões e aniões que compõem os líquidos iónicos, estes possuem características distintas. Bridges *et al.* estudaram os diagramas de fase dos sistemas compostos por 1-butil-3-metilimidazólio ([C₄C₁im]Cl), cloreto de n-butilpiridina ([C₄py]Cl), cloreto de tetra-n-butilamónio ([N₄₄₄₄]Cl), cloreto de tetra-n-butilfosfónio ([P₄₄₄₄]Cl) e o sal K₃PO₄ (Figura 2.6). Quanto mais próxima da origem está a curva binodal, maior é a hidrofobicidade do líquido iónico e maior é a capacidade para formar duas fases. A aptidão dos diferentes líquidos iónicos para formar sistemas de duas fases aquosas na presença de K₃PO₄ segue a seguinte ordem: [P₄₄₄₄]Cl > [N₄₄₄₄]Cl > [C₄py]Cl > [C₄C₁im]Cl. Este resultado pode ser explicado pelo facto dos líquidos iónicos [P₄₄₄₄]Cl e [N₄₄₄₄]Cl terem cargas altamente escudadas, diminuindo a capacidade para estabelecerem ligações com moléculas de água e por isso potenciando o efeito de “salting-out”. O líquido iónico [C₄py]Cl está menos escudado, embora a carga está principalmente localizada no átomo de azoto. Finalmente, o líquido iónico [C₄C₁im]Cl possui um catião com uma carga dispersa equitativamente ao longo do heterociclo, e por isso apresenta maior habilidade para estabelecer ligações de hidrogénio com a água. Assim, o efeito de “salting-out” é menor e a capacidade para formar duas fases também (Bridges *et al.*, 2007).

O efeito do comprimento da cadeia alifática dos diversos líquidos iónicos também foi investigado. À medida que o comprimento da cadeia

alifática dos líquidos iónicos aumenta, as binodais aproximam-se da origem, indicando a maior capacidade do IL's de cadeia longa para formar duas fases. Este fenómeno pode estar relacionado com a hidrofobicidade, que aumenta com o comprimento da cadeia alifática (Li *et al.*, 2010).

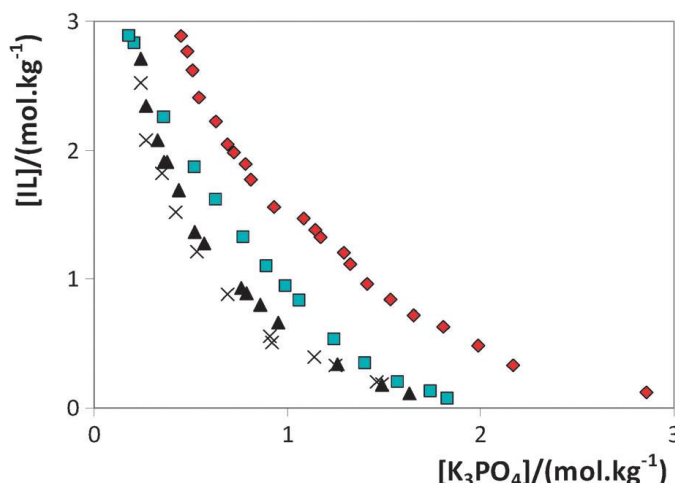


Figura 2.6 – Diagrama de fases para diferentes sistemas líquido iónico-K₃PO₄ a temperatura ambiente: \blacklozenge [C₄C₁im]Cl, \blacksquare [C₄py]Cl, \blacktriangle [N₄₄₄₄]Cl, \times [P₄₄₄₄]Cl (Bridges *et al.*, 2007).

2.1.1.3. Aplicação dos SDFA's compostos por líquidos iónicos

As características peculiares dos líquidos iónicos fazem deles candidatos promissores para a purificação de biomoléculas. O processo de separação está correlacionado com a estrutura molecular do líquido iónico utilizado para formar o sistema de duas fases aquosas e, nas interações que este pode estabelecer com as diferentes biomoléculas. Num SDFA composto por água, sal

inorgânico e líquido iónico, a fase superior é rica em líquido iónico enquanto a fase inferior é mais rica em sal. A diferença existente entre a composição das duas fases culmina numa partição seletiva do soluto. Além disso, ambas as fases contêm água, proporcionando um meio compatível para albergar as diferentes biomoléculas (Freire *et al.*, 2012).

Ultimamente tem-se registado uma grande procura por biomoléculas, particularmente por proteínas (que têm vindo a ser usadas exhaustivamente em aplicações terapêuticas e de diagnóstico), facto que impulsionou o desenvolvimento de novos métodos de separação e purificação. Uma vez que as proteínas facilmente sofrem desnaturação e perdem a sua atividade biológica quando em contacto com a maioria dos solventes orgânicos, o uso de líquidos iónicos parece ser uma alternativa viável para a purificação das mesmas (Freire *et al.*, 2012). A partição de moléculas em sistemas de duas fases aquosas é dependente de vários fatores, entre os quais se destacam a composição do SDFA, o valor do pH e a temperatura. O pH é um fator que condiciona a partição de proteínas em SDFA's compostos por líquidos iónicos, visto que a carga global das proteínas é afetada pelo valor do pH (Li *et al.*, 2010).

Os estudos da extracção do citocromo c revelaram que a eficiência era máxima no seu ponto isoelétrico ($pI = 9.4$) e ia diminuindo à medida que o valor do pH aumentava (Li *et al.*, 2010). Dreyer e Kragl estudaram a purificação de proteínas em sistemas de duas fases aquosas compostos pelo líquido iónico Ammoeng™ 110 e o tampão K_2HPO_4/KH_2PO_4 . A partição de

quatro proteínas (albumina de soro bovino, lisozima, tripsina e a mioglobina) foi investigada a diferentes temperaturas e pH (Figura 2.7) (Dreyer and Kragl, 2008). Os investigadores chegaram à conclusão que a carga superficial das proteínas e o peso molecular são fatores que influenciam a partição proteica. Proteínas com maior peso molecular, como a albumina de soro bovino, são atraídas para a fase rica em líquido iónico. Ao invés, proteínas mais pequenas, como a mioglobina, ficam retidas na fase rica em sal. Também foi demonstrado que a carga superficial das proteínas afeta a partição destas em SDFA's compostos por líquidos iónicos. As proteínas carregadas negativamente estabelecem interações eletrostáticas com o núcleo catiónico do líquido iónico e por isso são atraídas para a fase superior rica em líquido iónico. Assim sendo, é possível adaptar o sistema para a extração de diferentes proteínas recorrendo apenas à alteração do pH (Dreyer and

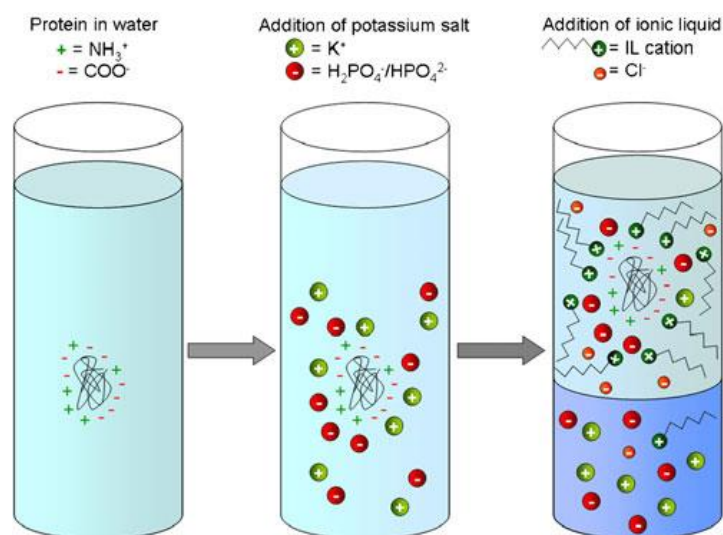


Figura 2.7 – Representação esquemática da partição de uma proteína num sistema líquido iónico-sal. A proteína apresenta partição na fase superior rica em líquido iónico (Dreyer e Kragl, 2008).

Kragl, 2009). Zhuo *et al.* procederam à extração de albumina de soro bovino utilizando um sistema de duas fases aquosas composto por cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio e K_2HPO_4 . Foi descoberto que a proteína carregada negativamente estabelecia interações eletrostáticas com o cátion 1-butil-3-metilimidazólio ($[Bmim]^+$). Contudo, à medida que se adicionava K_2HPO_4 , os investigadores observaram um efeito de “salting-out” que dirigiu as proteínas para a fase superior rica em líquido iónico. De acordo com o seu modelo, os autores consideraram que as interações eletrostáticas e o efeito de “salting-out” são os principais fatores que influenciam a partição proteica em SDFA's compostos por líquidos iónicos (Zhuo *et al.*, 2007).

Ao contrário dos estudos anteriores, Pei *et al.* sugeriram que as interações hidrófobas eram as forças principais que governavam a extração de proteínas para a fase rica em líquido iónico. Os autores utilizaram diversos líquidos iónicos que diferiam entre si no número de átomos de carbono ($[C_4mim]Br$, $[C_6mim]Br$, $[C_8mim]Br$). Eles estudaram o efeito da temperatura na eficiência de extração da albumina de soro bovino num sistema de duas fases composto pelos líquidos iónicos referidos acima. Temperaturas mais elevadas favorecem a extração de proteínas para a fase rica em líquido iónico. Os investigadores descobriram que o processo de extração era endotérmico. Calcularam que durante o processo, o valor de ΔG era negativo enquanto o valor de ΔH e $T\Delta S$ eram positivos. Isto significa que o valor de $T\Delta S$ era sempre maior que o valor de ΔH , por isso a reacção era governada por alterações entrópicas, que são características das interações hidrofóbicas (Pei *et al.*, 2009).

O líquido iónico AmmoengTM 110 é hidrofílico e em soluções aquosas o cátion interage com os grupos químicos carregados negativamente da molécula alvo. O líquido iónico $[C_8mim]Br$ é de carácter mais hidrofóbico, exibindo outro tipo de interações. Devido à sua longa cadeia de átomos de carbono, as interações hidrofóbicas entre o cátion $[C_8mim]^+$ e as moléculas alvo são privilegiadas. É por isso importante perceber que ainda há muita pesquisa que precisa de ser feita de modo a descobrir quais os fatores que determinam o processo de extração de uma determinada biomolécula. O mais provável é ser um misto de interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a molécula alvo e o líquido iónico, dependendo muito do líquido iónico usado para formar o sistema de duas fases e das propriedades químicas da molécula alvo (Oppermann *et al.*, 2011).

Para que a purificação de biomoléculas em SDFA's formados por líquidos iónicos seja viável, é necessário perceber até que ponto a atividade das moléculas de interesse é influenciada pela presença dos líquidos iónicos. Estudos de difração de raios-X mostraram que a estrutura das proteínas albumina de soro humana e citocromo c de coração de cavalo era preservada para concentrações acima de 25% (p/p) de $[C_4mim]Cl$. Porém, para a concentração de 50% (p/p) de $[C_4mim]Cl$, ambas as proteínas demonstravam um grande estado de desnaturação. A alteração da conformação de algumas proteínas na fase superior rica em líquido iónico também foi examinada por UV-visível e FTIR. Foi demonstrado que não existia interações fortes entre os grupos

funcionais das proteínas e as cadeias dos líquidos iônicos. Este resultado assegura que a estrutura secundária das proteínas é mantida (Li *et al.*, 2010).

O efeito dos líquidos iônicos na atividade enzimática da tripsina e da “horseradish peroxidase” (HRP) foram estudados. Os autores concluíram que a atividade da tripsina na fase superior diminuía ligeiramente com o aumento das concentrações de líquidos iônicos, e mais de 89% da atividade era mantida para concentrações máximas de [C₄mim]Br, [C₆mim]Br e [C₈mim]Br. Em concordância, mais de 90% da atividade “horseradish peroxidase” foi preservada na fase superior do sistema composto por [C₄mim]Cl, K₂HPO₄ e água. Assim sendo, os sistemas de duas fases aquosas constituídos por líquidos iônicos mostram-se promissores para a purificação de biomoléculas (Li *et al.*, 2010).

A concentração e purificação de moléculas de DNA é um procedimento indispensável para a sua aplicação terapêutica. É necessária a remoção de todos os contaminantes (proteínas, lípidos, polissacarídeos, RNA) presentes na matriz que contém as moléculas de ácido desoxirribonucleico. A tradicional extração com solventes orgânicos revela uma série de problemas devido à sua toxicidade. Nesse aspeto, os líquidos iônicos são uma alternativa promissora. Wang *et al.* referiu pela primeira vez a extração de DNA de dupla cadeia recorrendo ao uso de um líquido iônico. Os autores misturaram uma determinada quantidade de hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio ([Bmim]PF₆ ou [C₄mim]PF₆) a uma solução aquosa de DNA. Foi registado que grande percentagem das moléculas de DNA foram extraídas para a fase rica em líquido iônico, sendo que apenas quantidades vestigiais de DNA foram registadas na fase aquosa. Dentro da gama de concentrações de DNA estudadas, verificaram um aumento da eficiência de extração com o aumento do volume de líquido iônico utilizado. Este aumento de eficiência foi mais notório para concentrações de ácido desoxirribonucleico compreendidas entre 2-5 ng/μL. Para concentrações mais elevadas (50-100 ng/μL), a eficiência de extração também aumenta com o acréscimo de líquido iônico, apesar de não ser um incremento tão significativo. Quando o volume de [Bmim]PF₆ era constante, um declínio na eficiência de extração era observado com o aumento da concentração de DNA. Isto poderia ter sido causado por um efeito de saturação da fase rica em líquido iônico, que já não disponha de espaços livres para albergar mais moléculas de DNA (Wang *et al.*, 2007).

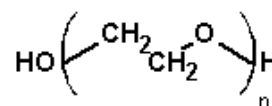
Assim sendo, os líquidos iônicos podem ser um meio apropriado para a purificação de pDNA em sistemas de duas fases aquosas.

2.2. Partição em sistemas de duas fases aquosas

A adição de um soluto a um sistema de duas fases aquosas conduz à sua distribuição diferencial entre as duas fases. Esta resulta das diferentes características físico-químicas das fases e conseqüentemente da diferente afinidade do soluto para cada uma delas. A diferença de afinidade é expressa em termos do coeficiente de partição (K). Este é obtido pela razão entre a concentração do soluto em cada uma das fases. O coeficiente de partição é influenciado por diversas contribuições, sendo as mais importantes a exclusão, hidrofobicidade, afinidade específica e as interações eletrostáticas. Assim sendo, a partição de um soluto entre as duas fases é o resultado do somatório de todas estas interações.

2.2.1. Exclusão

As moléculas de polímero estabelecem ligações de hidrogénio com as moléculas de água. Assim, a formação de interações entre moléculas de polímero é acompanhada pelo estabelecimento de ligações de hidrogénio com moléculas de água de maneira a manter as moléculas de polímero em solução. A solvatação das moléculas de polímero implica a exclusão entre moléculas de polímeros adjacentes, formando-se pequenas cavidades entre as moléculas. Estes espaços livres podem permitir o alojamento de determinados solutos (Brooks and Sharp, 1985). A totalidade do espaço não ocupado existente no solvente denomina-se volume livre. Assim, a formação de espaços livres que permitam a distribuição do soluto nas fases será um fator determinante para a partição diferencial das biomoléculas adicionadas. Esta capacidade vai depender do tamanho das biomoléculas e da composição do sistema (Eiteman and Gainer, 1989).



As moléculas de menor dimensão terão uma distribuição similar nas duas fases visto que facilmente se acumularão em qualquer das fases. À medida que se regista um aumento de dimensão será observada uma partição diferencial entre as duas fases. Estudos realizados em sistemas PEG-sal demonstraram que a adição de sais, o pH e o comprimento da “tie-line” têm uma importante influência nos espaços livres existentes nas fases do sistema (Sasakawa and Walter, 1972). Marcos *et al.* estudaram a partição de penicilina acilase em sistemas PEG-citrato de sódio. Os autores concluíram que o coeficiente de partição das proteínas e do enzima diminuía com o aumento do peso molecular do PEG. Isto porque, o aumento da cadeia carbonada irá resultar na redução de volume livre, culminando na redução do espaço disponível para albergar as proteínas na fase superior rica em PEG (Marcos *et al.*, 1999).

Figura 2.8 - Estrutura química do polietilenoglicol (retirado do website chemindustry.ru).

Em sistemas polímero-polímero, o aumento do peso molecular do polímero ou da sua concentração numa das fases dirige a partição do soluto para a outra fase. O aumento do peso molecular do polímero irá resultar na diminuição do volume livre e conseqüentemente, o soluto terá mais dificuldade em acomodar-se nessa fase (Guan *et al.*, 1993).

2.2.2. Interações eletrostáticas

As interações eletrostáticas estão correlacionadas com as cargas elétricas dos átomos presentes em solução. Segundo a lei de Coulomb, quanto maior for a carga dos iões e menor for a distância entre eles, maior será a interação eletrostática estabelecida (Berg *et al.*, 2002). Em termos de composição do sistema de duas fases aquosas, estas interações estão relacionadas com a concentração e tipo de sais presentes. O valor de pH tem influência na carga dos solutos e dos solventes do sistema e conseqüentemente na razão entre as concentrações das diferentes espécies com carga (Marcos *et al.*, 1999).

O anião e o catião constituintes do sal exibem, geralmente afinidades diferentes para as duas fases. Contudo, as suas concentrações são iguais em cada uma das fases daí que se pode considerar que um sistema de duas fases é eletricamente neutro. Assim num sistema, as duas fases são eletricamente neutras e de maneira a manter esta condição, o transporte de um ião de uma fase para a outra será acompanhado pela passagem de um ião de carga oposta. Deste modo, a diferença de potencial não afeta a partição de solutos iônicos uma vez que apenas quantidades equivalentes de iões de cargas diferentes podem ser transferidas através da interface (Albertsson, 1986; Marcos, 2000).

Em sistemas PEG-citrato de sódio, foi verificado que a variação de pH influencia a partição e purificação de penicilina acilase (Marcos *et al.*, 1999). Os autores averiguaram que o aumento do pH direcionava o enzima para a fase superior rica em PEG. A partição do enzima para a fase superior pode ser explicado pelo efeito eletrostático do anião do citrato. O aumento do pH proporciona o aumento da razão de citrato trivalente/citrato divalente. A afinidade para a fase superior com o aumento do pH é devida ao aumento do efeito de “salting-out” proporcionado pelos iões trivalentes de citrato (Marcos *et al.*, 1999).

2.2.3. Hidrofobicidade

A hidrofobicidade de uma molécula é caracterizada pela repelência desta para a água. Uma vez que a estrutura da água é estabilizada por pontes de hidrogénio, as interações favoráveis

de qualquer molécula com a água serão de natureza polar. As moléculas hidrófobas possuem grupos químicos apolares que por sua vez não estabelecem interações favoráveis com a água. Moléculas hidrófobas em solução formam agregados, originando uma quebra na estrutura da água, pois as moléculas de água vão rodear as moléculas hidrófobas diminuindo a entropia (Lodish *et al.*, 2000).

Os sistemas de duas fases aquosas podem ser considerados como sendo formados por dois solventes com hidrofobicidades diferentes. Assim, a diferença de hidrofobicidades entre as fases vai ser determinante no processo de partição de um soluto. A hidrofobicidade de cada uma das fases vai depender do tipo e concentração do polímero, e do tipo e concentração de sais presentes. Assim, no caso do polietilenoglicol e poliácridamida a hidrofobicidade aumenta com o aumento do peso molecular do polímero. Isto porque com o aumento do peso molecular a cadeia carbonada do polímero também aumenta, resultando num aumento da hidrofobicidade (Zaslavsky *et al.*, 1984).

De um modo geral, o aumento da força iónica promove o aumento da hidrofobicidade. O aumento de iões em solução diminui o número de moléculas de água livres para a solvatação das moléculas hidrófobas, o que proporciona a formação de micelas (Marcos *et al.*, 2000). Em sistemas de duas fases, o aumento da força iónica provoca o aumento de interações hidrófobas na fase rica em polímero apolar. Com o aumento da força iónica será então esperado um deslocamento dos solutos apolares para a fase rica no polímero mais hidrófobo. Em sistemas PEG-citrato de sódio foi registado que a partição de proteínas na fase superior rica em PEG diminui com o aumento do peso molecular do polímero. Isto porque o aumento da cadeia alifática do polímero aumenta a hidrofobicidade da fase, e como a maioria das proteínas são hidrófilas, estas não apresentam distribuição nesta fase (Marcos *et al.*, 1999).

2.2.4. Afinidade específica

Até agora, as interações referidas estão diretamente relacionadas com as características físico-químicas das fases e da sua interação com o soluto. Existe outro tipo de interação que pode ser utilizada para modificar o coeficiente de partição da molécula de interesse, nomeadamente ligandos de afinidade. Se o ligando se ligar especificamente à molécula que se pretende purificar, a formação do complexo irá resultar na sua distribuição específica numa determinada fase para a qual apresenta afinidade (Brooks and Sharp, 1985). A aglomeração do ligando numa das fases pode ser alcançada recorrendo a dois métodos diferentes: a seleção de condições de maneira a que o ligando se acumule nessa fase, ou por ligação covalente do ligando ao polímero predominante nessa fase (Marcos, 2000).

Os sistemas de duas fases aquosas possuem uma elevada capacidade e são uma técnica simples de utilizar. Isto é particularmente importante quando recentemente foi relatado que em culturas bacterianas da estirpe DH5 α [acKA-pta] [poxB] de *E.coli* é possível atingir produtividades de plasmídeo de 2,1 gramas/litro. Porém, uma das desvantagens desta técnica é a sua reduzida seletividade, que pode ser ultrapassada pelo uso de ligandos específicos para as moléculas de pDNA, que se acumulará numa das fases (Duarte *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2010). Um dos ligandos primeiramente estudado foi a polietileneimina (PEI), muito devido à sua elevada afinidade para o DNA plasmídico. O uso de polietileneimina ainda levanta certas preocupações, visto que este polímero pode apresentar certos níveis de toxicidade. Além disso, a principal ligação entre o DNA e a PEI é conseguida maioritariamente através de interações eletrostáticas, o que pode representar um verdadeiro risco visto que moléculas como endotoxinas, RNA e DNA genómico, que possuem carga negativa, podem igualmente ligar-se à PEI o que acarreta problemas de pureza assim como de segurança (Duarte *et al.*, 2007). Em sistemas PEG-sulfato de amónio, o uso de PEI ligada a moléculas de PEG não possibilitou a partição das moléculas de pDNA para a fase superior rica em PEG. Este fenómeno pode ser resultado da elevada concentração de sal presente nestes sistemas, impedindo a correta ligação do pDNA ao ligando. No entanto, em sistemas PEG-dextrano, a adição de uma quantidade adequada de sal possibilitou a modulação da interação entre a PEI e o DNA plasmídico. Este facto permitiu a separação das moléculas de plasmídeo das moléculas de RNA para diferentes fases. Estes resultados foram utilizados para desenvolver uma metodologia para a purificação de plasmídeo em dois passos de extração. No primeiro, o sistema PEG-sulfato de amónio é empregue para remover a maioria dos contaminantes para a fase superior rica em PEG. A fase inferior, onde se distribuem as moléculas de plasmídeo, é recolocada num sistema PEG-dextrano com uma pequena concentração de PEI. Neste último passo de purificação é obtido um rendimento de 100% de plasmídeo sem contaminação de RNA e apenas com uma ínfima quantidade de proteínas (Duarte *et al.*, 2007).

Alternativamente, foi proposto um ligando de características proteicas composto pela proteína glutationa-S-transferase (GST) em combinação com um fator de transcrição *Zinc Finger* denominado GST-ZnF, representado na Figura 2.9 (Barbosa *et al.*, 2010). A afinidade do complexo proteico GST-ZnF para com o plasmídeo é devida à ligação do complexo a uma sequência específica no DNA plasmídico, permitindo o seu isolamento na fase superior de um

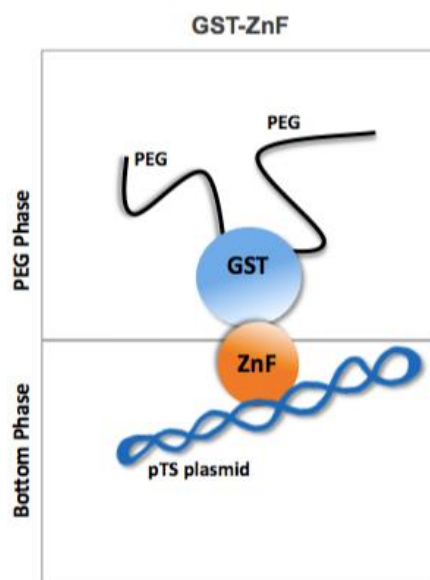


Figura 2.9 - Representação esquemática do complexo GST-ZnF (Barbosa *et al.*, 2010).

sistema PEG-dextrano (Barbosa *et al.*, 2010). Este isolamento na fase do PEG acontece porque o ligando foi primeiramente PEGuilado, ou seja, a proteína glutationa-S-transferase é ligada covalentemente a moléculas de polietilenoglicol. Neste sistema, a PEGuilação faz com que o ligando vá para a fase do PEG, onde existem menos contaminantes. A presença do ligando na fase do PEG direciona o pDNA para a mesma e assim separa-o dos demais contaminantes (Barbosa *et al.*, 2010). O problema inerente ao uso deste ligando é a necessidade de PEGuilação, sendo que é um processo complexo e poderá ser ineficiente, para além de se poder obter produtos com diferentes graus de PEGuilação, o que poderá requerer uma

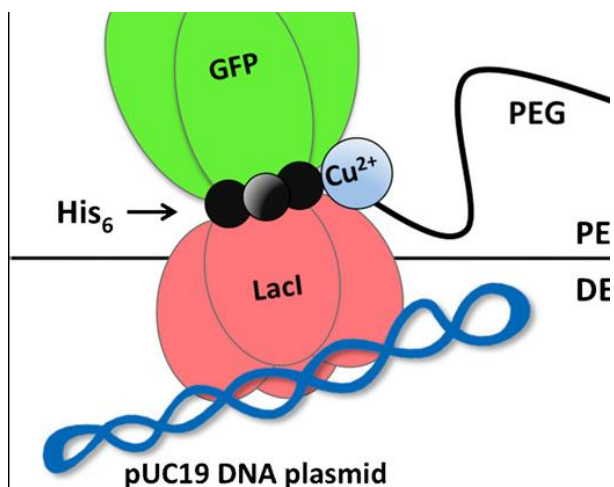


Figura 2.10 - Representação esquemática do complexo LacI-His₆-GFP (Barbosa *et al.*, 2010).

posterior purificação (Barbosa *et al.*, 2010). Este passo leva a grandes custos de produção e pelo facto de a PEGuilação ser ineficiente é necessário utilizar reagente em excesso, o que poderá tornar todo o processo economicamente desfavorável (Barbosa *et al.*, 2010). Foi estudado outro ligando de afinidade, que não necessita de PEGuilação, para aumentar a seletividade do plasmídeo para a fase do PEG num sistema PEG-dextrano. Este ligando consiste na conjugação da proteína LacI com um *tag* de Histidina₆ e a proteína GFP. A proteína recombinante LacI-His₆-GFP (Figura 2.10) é composta por três domínios diferentes: o domínio da proteína LacI, que se liga especificamente a uma sequência do plasmídeo; o domínio da GFP, que permite a deteção do complexo numa mistura com outras biomoléculas e por último o *tag* de His₆, que é responsável por conectar os outros dois domínios e ainda permite a purificação de pDNA através de cromatografia de afinidade. Este processo permite obter plasmídeo livre de contaminantes como RNA e DNA genómico (Barbosa *et al.*, 2010).

3- Produção e extração de DNA plasmídico

3.1. Introdução

3.1.1. *Escherichia coli*: organismo hospedeiro para a produção de plasmídeo

Escherichia coli é uma espécie de bactéria Gram-negativa em forma de bastonete. Foi em 1885 que o médico alemão Theodor Escherich descobriu esta bactéria unicelular em fezes humanas. Primeiramente, denominou-a *Bacterium coli commune* devido ao facto de ter sido encontrada no cólon. Só passados alguns anos é que foi adotado o nome científico de *Escherichia coli*, em honra do médico alemão (Castellani and Chalmers, 1919).

De um modo geral, as bactérias desenvolvem-se em meios hipotónicos e dada a fragilidade da membrana plasmática ocorreria lise celular se não fosse a presença de uma parede celular rígida. Esta estrutura constitui uma proteção mecânica eficaz contra a rutura osmótica da célula bacteriana em ambientes hipotónicos. A parede celular também é responsável pela morfologia bacteriana e pelo duplo comportamento das bactérias em relação à coloração de Gram. Esta coloração tem um grande significado a nível taxonómico pois permite dividir as bactérias em dois grupos: Gram positivas e Gram negativas. Estes dois grupos diferem drasticamente entre si na organização das estruturas fora da membrana plasmática. A *E.coli*, tal como as restantes bactérias Gram-negativas, não retém o corante cristal violeta utilizado na coloração de Gram. É por isso utilizada a safranina que vai tingir as bactérias Gram-negativas num tom rosa (Figura 3.1) (Parente and Sousa, 1998).

A maioria das bactérias Gram positivas tem uma espessa camada de peptidoglicano adjacente à membrana plasmática. Contrariamente, as bactérias Gram negativas apresentam uma fina camada de peptidoglicano. Para além da camada de peptidoglicano, as Gram negativas

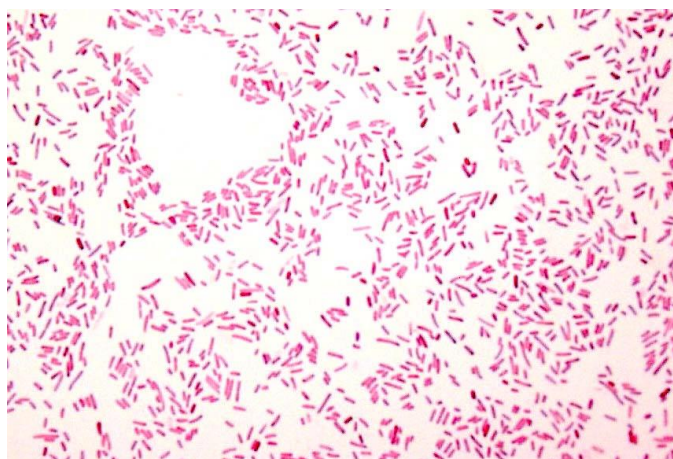


Figura 3.1 - Células de *E. coli* vistas ao microscópio após coloração de Gram (imagem retirada do website people.upei.ca).

possuem uma membrana lipídica externa. Nesta membrana estão ancoradas lipoproteínas que por sua vez estão ligadas covalentemente ao peptidoglicano. A organização e dimensão da membrana externa são muito similares às da membrana plasmática. Aliás, as duas membranas aderem uma à outra em centenas de pontos, culminando em várias discontinuidades na estrutura do peptidoglicano. Na membrana externa

estão presentes os lipopolissacarídeos (LPS) que estão associados à patogenicidade das bactérias Gram negativas (Salton and Kim, 1996; Parente and Sousa, 1998).

O peptidoglicano é um heteropolímero rígido e insolúvel na água e em cada bactéria constitui uma única macromolécula. É composto por cadeias lineares de dois açúcares, o ácido N-acetilmurâmico (NAM) e N-acetilglucosamina (NAG), dispostos

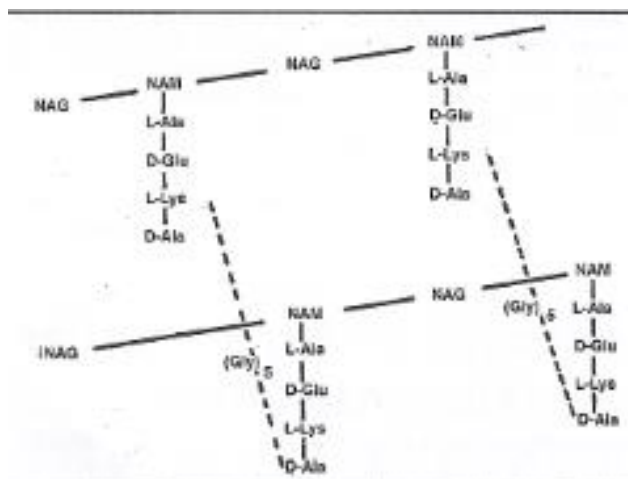


Figura 3.2 – Estrutura do peptidoglicano de *S. aureus*. L-Ala: L-alanina; D-Glu: ácido D-glutâmico; L-Lys: L-lisina; D-Ala: D-alanina; Gly: glicina (Parente and Sousa, 1998).

alternadamente e unidos por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). A cada molécula de NAM, através de uma ligação amida, ligam-se cadeias peptídicas (por norma quatro aminoácidos) (Figura 3.2). A ligação glicosídica β (1 \rightarrow 4) entre NAG e NAM é suscetível à ação hidrolítica da lisozima. As cadeias peptídicas pertencentes a cadeias lineares vizinhas estabelecem entre si pontes interpeptídicas, usualmente entre o grupo $-\text{NH}_2$ do terceiro aminoácido e o grupo $-\text{COOH}$ do quarto aminoácido. O ácido meso-diaminopimélico é aminoácido pouco frequente nas bactérias Gram positivas, sendo mais frequente no peptidoglicano das bactérias Gram negativas (Parente and Sousa, 1998).

Além do peptidoglicano, outras macromoléculas participam na arquitetura da parede celular das bactérias Gram negativas. A membrana exterior é composta por uma bicamada fosfolipídica. Esta membrana é constituída por lipopolissacarídeos, fosfolípidos e proteínas. O lipopolissacarídeo é uma molécula anfifílica, com uma região polissacarídea (hidrófila) e o lípido A (hidrófoba). Esta molécula está ancorada na membrana exterior através do lípido A e a região hidrófila projeta-se para o exterior da célula, contribuindo para a carga negativa da superfície bacteriana (Figura 3.3) (Parente and Sousa, 1998). O LPS, através do lípido A, tem sido responsabilizado pelas manifestações clínicas que ocorrem durante a infeção por bactérias Gram negativas: febre, inflamação e choque séptico. O LPS participa na ativação dos macrófagos e dos linfócitos B e T (Parente and Sousa, 1998; Salton and Kim, 1996).

As diferenças estruturais entre os dois grupos de bactérias explicam a diferente coloração de Gram. O corante cristal violeta adicionado é retido nas Gram positivas devido à reduzida porosidade da espessa camada de peptidoglicano, atribuindo-lhes um tom púrpura. Em contraste, a fina camada de peptidoglicano presente nas bactérias Gram-negativas e as discontinuidades no peptidoglicano nos pontos de adesão entre as duas membranas não permitem a fixação do corante (Salton and Kim, 1996; Parente and Sousa, 1998).

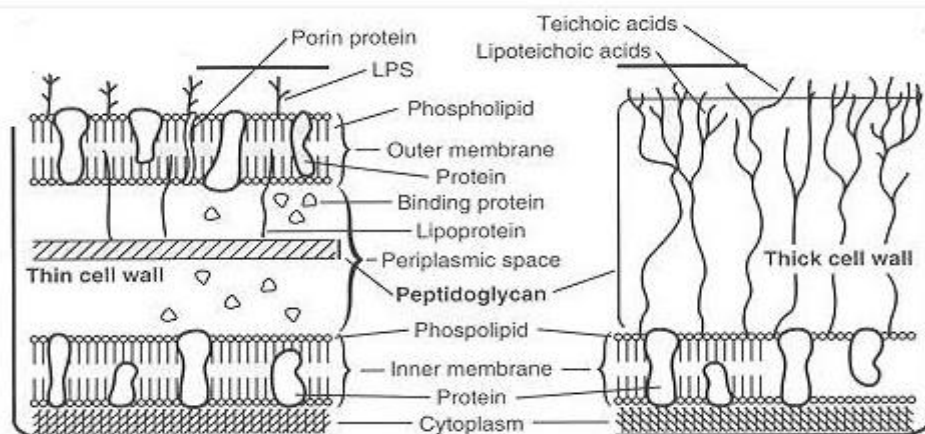


Figura 3.3 – Esquema que retrata as diferenças estruturais e moleculares entre a parede celular das bactérias Gram negativas e Gram positivas (Salton and Kim, 1996).

A temperatura ideal para o crescimento de *E. coli* é 37°C, daí serem parte integral da flora intestinal de vários organismos endotérmicos. Desde que as bactérias não adquiram elementos genéticos que lhes confirmam fatores de virulência, estes organismos instituem uma relação de comensalismo com o hospedeiro (Salton and Kim, 1996). As células de *Escherichia coli* produzem vitamina K₂ (Bentley and Meganathan, 1982) e previnem o estabelecimento de bactérias patogênicas no intestino (Hudault *et al.*, 2001; Yadav *et al.*, 2005). As estirpes virulentas de *E. coli* podem causar gastroenterites, infecções no trato urinário, entre outras enfermidades (Salton and Kim, 1996). Esta espécie é considerada um anaeróbio facultativo, sendo que é capaz de crescer tanto na presença como ausência de oxigênio. Estas bactérias podem crescer utilizando vários substratos, incluindo a oxidação do ácido pirúvico, ácido fórmico e aminoácidos, e a redução de oxigênio, nitrato e fumarato (Ingledeew and Poole, 1984).

A primeira sequenciação completa do genoma de *E. coli* (estirpe K-12) foi publicada em 1997. Tratava-se de uma molécula de DNA circular com 4.6 milhões de pares de base, contendo 4288 genes que codificavam proteínas. A sequenciação permitiu verificar que o genoma continha quantidades significativas de transposões e sequências repetitivas (Blattner *et al.*, 1997). No presente, mais de 60 genomas de diferentes estirpes de *E. coli* foram sequenciados. A comparação entre as diferentes sequências mostrou que apenas 20% de cada genoma representa sequências presentes em todas as estirpes, enquanto 80% de cada genoma varia consoante a estirpe (Lukjancenko *et al.*, 2010).

A espécie *Escherichia coli* é frequentemente utilizada como organismo modelo em diversos estudos. O cultivo destas bactérias em laboratório é simples e pouco dispendioso. Além disso, apresentam um rápido crescimento e os genomas de várias estirpes já foram sequenciados. Devido ao seu longo historial em experiências laboratoriais, *E. coli* desempenha um papel importante na indústria biotecnológica. O trabalho de Stanley Cohen e Herbert Boyer em *E. coli*, usando plasmídeos e enzimas de restrição para criar DNA recombinante, tornou-se um marco na

história da biotecnologia. Esta espécie é um dos hospedeiros mais requisitados para a produção de proteínas recombinantes. Os genes que codificam a proteína de interesse podem ser inseridos em plasmídeos e estes internalizados em *E. coli*. A proteína pode ser produzida em massa em fermentadores industriais. A insulina humana foi a primeira proteína recombinante a ser comercializada (Walsh, 2003).

3.1.2. *E. coli* DH5 α e DH5 α [acKA-pta] [poxB]

A espécie *Escherichia coli* exibe uma elevada diversidade genética e fenotípica. Ao exemplo de outras formas de vida, surgem novas estirpes de *E. coli* devido a processos mutagénicos e outros fenómenos genéticos. Uma estirpe é um subgrupo dentro da mesma espécie que apresenta características únicas e que a distingue de outros subgrupos. Estas diferenças são usualmente detetadas a nível molecular, contudo podem resultar em mudanças fisiológicas importantes. Por exemplo, uma estirpe pode adquirir patogenicidade, capacidade de usar uma única fonte de carbono, habitar um determinado nicho ecológico ou resistir a agentes antimicrobianos. Neste trabalho experimental, a produção e obtenção de plasmídeo ocorreu em células das estirpes DH5 α e DH5 α [acKA-pta] [poxB] de *E. coli*.

A estirpe DH5 α não tem capacidade patogénica visto que foi criada para uso laboratorial. Esta estirpe foi desenvolvida em 1985 por Douglas Hanahan, dispondo de várias mutações que permitem o seu uso na tecnologia de DNA recombinante. Alguns dos genes mutados são: *endA1*, *recA1*, *gyrA96* e *lacZAM15* (Taylor *et al.*, 1993). A mutação do gene *endA1* resulta na redução da atividade do enzima nuclease, permitindo um incremento na qualidade e rendimento das moléculas de plasmídeo purificado (Durfée *et al.*, 2008). A proteína *recA* participa na reparação do DNA, divisão dos cromossomas e na recombinação homóloga. A mutação do gene *recA1* é favorável porque reduz a recombinação homóloga, resultando num inserto mais estável (Kawashima *et al.*, 1984). A mutação *lacZAM15* inibe a actividade do gene *lacZ*, levando à produção de uma forma inativa da enzima β -galactosidase. As bactérias da estirpe DH5 α não podem clivar o substrato X-gal permanecendo incolores (X-gal torna as células azuis quando clivado). Todavia, se um plasmídeo contendo a subunidade *lacZ α* , for introduzido nas bactérias, vai produzir um péptido que vai complementar o gene truncado *lacZ*, culminando na produção de β -galactosidase ativa. Assim, se a transformação das células for bem-sucedida, iremos visualizar colónias de cor azul. As colónias que não internalizaram as moléculas de plasmídeo apresentarão uma cor branca, visto não produzirem a enzima β -galactosidase (De Togni *et al.*, 2013).

A estrutura genómica desta estirpe cinge-se a um único cromossoma circular formado por 4686137 nucleótidos e 4359 genes. Além do DNA cromossomal também possui DNA plasmídico (NCBI, [Genome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uid) in: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uid

s=22068). Esta estirpe não possui capacidade patogénica e de reparação do DNA, pelo que possui elevada radiosensibilidade. Tesfai *et al.* submetem bactérias da estirpe DH5 α a sucessivas exposições à radiação. O objetivo do estudo era perceber se a exposição contínua à radiação provocaria algum tipo de resistência. De facto ficou demonstrado que a exposição sucessiva à radiação provocava um aumento da resistência das bactérias, apesar da incapacidade para reparar as cadeias de DNA (Tsfai *et al.*, 2011).

A presença de acetato em concentrações superiores a 5 gramas/litro é um fator limitante durante o processo de fermentação de *E. coli* devido ao seu efeito inibitório no crescimento celular (Chong *et al.*, 2013). A acumulação de acetato varia com a estirpe em questão e é condicionada pela elevada taxa de crescimento e reduzida concentração de oxigénio (Son *et al.*, 2011). Assim, a criação de estirpes modificadas geneticamente com maior tolerância ao acetato será uma característica promissora de modo a obter elevadas densidades populacionais (Chong *et al.*, 2013).

Em *E. coli* existem duas vias metabólicas para a produção de acetato. A primeira é mediada pelo enzima piruvato oxidase (*poxB*; POXB catalisa a conversão de piruvato a acetato). A segunda via metabólica é catalisada pelos enzimas acetato cinase e fosfotransacetilase (*ackA-pta*; PTA catalisa a reação de transformação de acetil-CoA a acetil-P, ACKA catalisa a conversão de acetil-P a acetato) (Chong *et al.*, 2013; Carnes *et al.*, 2011).

Carnes *et al.* efetuaram mutações genéticas para reduzir a acumulação de acetato de modo a aumentar a produção de plasmídeo em DH5 α . Para determinar os efeitos da deleção de genes cruciais nas vias metabólicas do acetato, estirpes de DH5 α com “knockout” dos genes *pta*; *ackA-pta*; *poxB* e *ackA-pta poxB* foram criadas e testadas para verificar se têm algum efeito no aumento de produção do plasmídeo NTC7482-41H-HA (Carnes *et al.*, 2011). Os níveis de acetato registados em frascos agitados para a estirpe selvagem foram 3.0-3.4 g/L, 2.1-3.4 g/L para a estirpe com mutação no gene *poxB*, 1.3-1.5 g/L para as células com mutação no gene *pta*, 0.7-0.9 g/L para as células com mutação nos genes *ackA-pta* e 0.6 g/L para a estirpe com “knockout” nos genes *ackA-pta poxB*. As células com “knockout” dos genes *ackA-pta poxB* foram as únicas que não apresentaram lise celular após 12 horas de indução. Esta estirpe apresentou um rendimento de plasmídeo de aproximadamente 2,1 g/L (Carnes *et al.*, 2011). A estirpe DH5 α [acKA-pta][poxB] utilizada neste trabalho experimental foi gentilmente cedida por este grupo de investigação.

3.1.3. DNA plasmídico (pDNA)

O DNA plasmídico é uma pequena molécula de DNA que está fisicamente separada do DNA cromossomal. Estas moléculas circulares de DNA de dupla cadeia são comumente encontradas em bactérias mas também estão presentes em certos organismos eucariotas. As moléculas de DNA plasmídico variam de tamanho desde algumas centenas de pares de base até

100000 pares de base. Os plasmídeos contêm genes que desempenham funções relevantes na sobrevivência do organismo, como é o caso da resistência a antibióticos (Lodish *et al.*, 2000). O termo plasmídeo foi primeiramente utilizado pelo biólogo molecular Joshua Lederberg em 1952 (Lederberg, 1952). Tal como o DNA cromossomal, o DNA plasmídico é replicado antes de cada divisão celular. Estas moléculas têm premissas para se replicarem independentemente do DNA cromossomal. O número de moléculas de pDNA presentes numa célula é variável (Lodish *et al.*, 2000).

Uma grande variedade de plasmídeos criados em laboratório são utilizados como vetores na tecnologia de DNA recombinante. O gene de interesse biotecnológico é inserido no plasmídeo, especificamente num local que em inglês é denominado “multiple cloning site” que é uma pequena região que contém várias sequências de restrição, permitindo a fácil inserção do fragmento de DNA a expressar neste local. Os plasmídeos são depois inseridos em bactérias num processo denominado transformação. Estas bactérias são expostas a antibióticos que vão permitir somente o crescimento e desenvolvimento das bactérias que internalizaram as moléculas de pDNA, visto que é no DNA plasmídico onde se encontra o gene que confere resistência a antibióticos. As bactérias transformadas são depois colocadas em fermentadores em condições ótimas para o seu crescimento. No interior dos hospedeiros, as moléculas de plasmídeo são replicadas, produzindo grandes quantidades de moléculas de DNA recombinante que contêm o pequeno fragmento de DNA de interesse (Cooper, 2000; Lodish *et al.*, 2000).

Hoje em dia, proteínas recombinantes e os outros produtos que resultam da tecnologia de DNA recombinante são usados na indústria farmacêutica e laboratórios de pesquisa. Bactérias como *E. coli* podem ser induzidas para produzirem grandes quantidades de proteína para o qual o gene inserido codifica. Estes organismos unicelulares são um hospedeiro fácil de manusear e com custos de manutenção mínimos.

O DNA plasmídico pode adquirir diversas conformações, as quais proporcionam diferentes velocidades de migração num gel de eletroforese. *In vivo*, as moléculas de plasmídeo apresentam uma estrutura compacta e superenrolada (DNA superenrolado). No laboratório, o correto manuseamento destas moléculas permite a permanência da estrutura nativa, contudo uma pequena quantidade apresentará pequenas incisões numa das cadeias. A presença de uma clivagem numa das cadeias implicará o desenrolar das cadeias, culminando numa conformação relaxada do DNA (DNA circular relaxado). Quando as duas cadeias de DNA sofrem uma clivagem, a forma circular das moléculas de plasmídeo desaparece dando origem a uma conformação linear (DNA linear). O DNA superenrolado está totalmente intacto e as duas cadeias de DNA circular entrelaçam-se entre elas, resultando numa forma compacta (Jiang *et al.*, 2010). É devido a esta conformação condensada que o DNA superenrolado apresenta uma maior migração num gel de eletroforese quando comparado com outras conformações de plasmídeo,

uma vez que exibe uma resistência inferior devido à menor superfície de contacto. As duplas cadeias do DNA superenrolado podem conter regiões onde existem pares de bases desemparelhados, resultando numa versão menos compacta denominada DNA superenrolado desnaturado (Ribeiro *et al.*, 2002).

Neste projeto laboratorial, as células DH5 α de *E. coli* continham o plasmídeo pVAX1/*lacZ* enquanto o plasmídeo NTC 7482-41H-HA estava presente nas bactérias DH5 α [acKA-ptA] [poxB]. O plasmídeo pVAX1/*lacZ* foi desenhado pela Invitrogen com o propósito de ser usado para o desenvolvimento de vacinas de DNA. O vetor foi construído de acordo com as normas presentes no documento “Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications”, publicado em Dezembro de 1996 pela organização “Food and Drug Administration (FDA)”. É um plasmídeo de 6100 pares de bases e com elevada taxa de replicação em *E. coli* (Life Technologies in: <http://www.lifetechnologies.com/search/global/searchAction.action?query=Pvax&resultPage=1&resultsPerPage=15>). Este plasmídeo possui a origem de replicação pUC, sequência de DNA que sinaliza a DNA polimerase da célula hospedeira para replicar a molécula de DNA (Cooper, 2000). A origem de replicação pUC proporciona uma elevada taxa de replicação (Life Technologies in: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/vectors/pvax1lacz.pdf>). O vetor também contém os promotores “Human cytomegalovirus” (HCMV) e T7. O promotor HCMV permite a elevada expressão de proteínas recombinantes (Boshart *et al.*, 1987). Além disso, possui um sinal de poliadenilação para um término eficiente da transcrição e correta poliadenilação do mRNA (“Bovine growth hormone poliadenilation signal”) (Goodwin and Rottman, 1992). Contém ainda um gene que confere resistência à canamicina às células que internalizarem o plasmídeo e o gene *lacZ* que codifica para o enzima β -galactosidase. A transformação bem-sucedida irá resultar na expressão de β -Galactosidase que poderá ser facilmente detetada (Life Technologies in: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/vectors/pvax1lacz.pdf>).

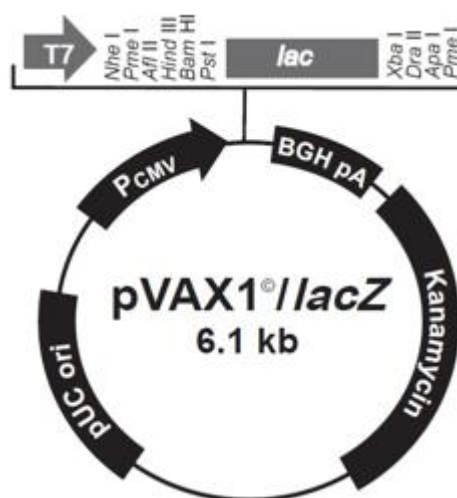


Figura 3.4 - Mapa de restrição do vetor pVAX1/*lacZ* (imagem retirada do website lifetechnologies.com).

O plasmídeo NTC7482-41H-HA possui 6212 pares de base. Este vetor foi desenhado com o intuito de proporcionar um elevado número de cópias de moléculas de plasmídeo devido à redução de fatores de inibição da replicação e à incorporação de fatores que aumentam a taxa de replicação (Carnes *et al.*, 2010). A produtividade do plasmídeo NTC7482-41H-HA foi melhorada com a extensão da origem pUC de modo a incluir uma sequência (PAS-

BH) na cadeia contínua que permite o emparelhamento de todas as proteínas que constituem o primossoma (Williams *et al.*, 2009). O primossoma é um complexo proteico responsável por criar primers de RNA que vão fornecer o terminal 3' OH necessário para a DNA polimerase III iniciar a síntese da cadeia descontínua (Cooper, 2000). Assim, a inserção da sequência PAS-BH é benéfica para a

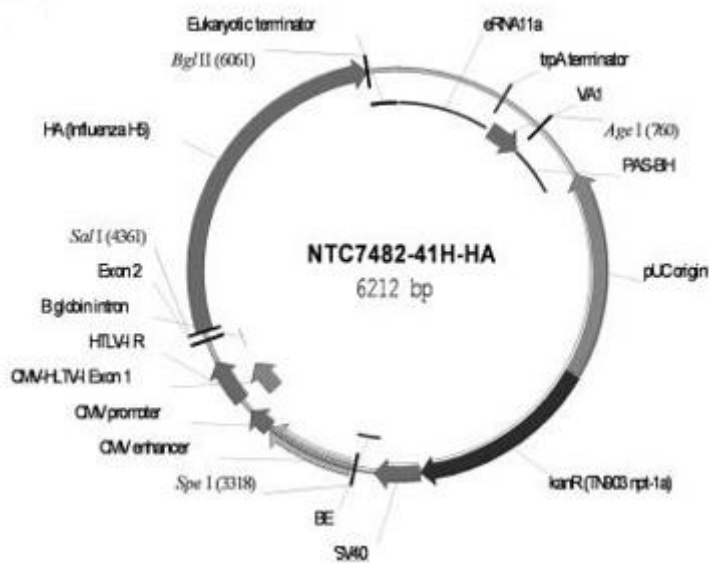


Figura 3.5 - Mapa de restrição do plasmídeo NTC7482-41H-HA (Carnes *et al.*, 2010).

replicação do DNA plasmídico visto que promove a produção de *primers* que permitem à DNA polimerase adicionar novos nucleótidos à cadeia em construção (Williams *et al.*, 2009). Williams *et al.* estudaram e concluíram que o vetor pNTCUltra1 atingiu o dobro da produtividade quando comparado com os vetores de elevada produção pVAX1 e gWIZ. Tal rendimento foi devido à presença do “enhancer” SV40 no vetor pNTCUltra1 (Williams *et al.*, 2009). Foi descoberto que este “enhancer” promove a transcrição (Schirm *et al.*, 1987). O plasmídeo NTC7482-41H-HA também possui as sequências PAS-BH e SV40, o que proporciona elevados rendimentos de DNA plasmídico (Carnes *et al.*, 2010). Além disso, também possui um gene que confere resistência à canamicina. Estas características permitem a elevada expressão deste plasmídeo nas células hospedeiras (Carnes *et al.*, 2010).

A terapia génica requer a inserção de genes com função terapêutica em locais específicos do genoma humano. Os plasmídeos podem ser os vetores utilizados para transportar o gene de interesse até às células alvo. O DNA plasmídico pode ser produzido em larga escala e é imunológica e geneticamente inócua para o hospedeiro, uma vez que o gene terapêutico não é inserido no genoma. Contudo, os baixos níveis de transfeção e de expressão do gene são uma desvantagem quando comparados com os métodos virais, sendo necessárias maiores quantidades de DNA recombinante para obter uma taxa de células transformadas aceitável (Walsh, 2003). É por isso que a utilização de plasmídeos com elevadas taxas de replicação desempenha um papel importante na terapia génica.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Materiais

Os materiais utilizados na cultura das bactérias *E. coli* DH5 α estão presentes na Tabela 3.1.

3.2.2. Microrganismos

Foram utilizadas as estirpes de *E. coli* DH5 α e DH5 α [acKA-pta] [poxB] para produzirem os plasmídeos pVAX1/*lacZ* e NTC 7482-41H-HA respectivamente. A primeira estirpe foi produzida pela Invitrogen e a estirpe DH5 α [acKA-pta] [poxB] foi gentilmente cedida pela empresa Nature Technology Corporation (Lincoln, Nebraska, EUA).

Tabela 3.1 – Reagentes utilizados na cultura do microrganismo.

Reagente	Fornecedor
Extrato de levedura	BDH
Triptona	BDH
NaCl	Panreac
Canamicina	Sigma

3.2.3. Cultura de *E. coli* DH5 α em frascos agitados

O plasmídeo pVAX1/*lacZ* foi produzido em células de *Escherichia coli* DH5 α . As células bacterianas cresceram em meio LB (Luria-Bertani) com a seguinte composição: triptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v) e NaCl 0,5% (p/v). O meio de cultura foi ajustado a pH 7,4. De modo a garantir um crescimento estéril da cultura de *E. coli*, o meio, recipientes e pontas de pipetas foram previamente esterilizados a 121°C durante 20 minutos. Depois de autoclavar, foi adicionada canamicina com concentração de 30 mg/ml. O antibiótico foi adicionado ao meio com o intuito de possibilitar apenas o crescimento de bactérias com DNA plasmídico, visto que o plasmídeo pVAX1/*lacZ* possui um gene que confere resistência á canamicina. O antibiótico foi esterilizado por filtração recorrendo ao uso de um filtro Filtropur S 0,2 μ m da Sarstedt.

Foi utilizado um pré-inóculo com 25 ml de meio LB, canamicina 0,1% (p/v) e 0,5 ml de uma cultura de *Escherichia coli* DH5 α preservada em glicerol a -80°C. Os pré-inóculos foram incubados a 37°C e 180 rpm durante 12 horas numa incubadora Minitron da Infors. A trabalhar á chama, retirou-se amostras de cada pré-inóculo para medir a absorvância a 600 nm. De acordo com a absorvância lida, foi adicionado o volume exato de pré-inóculo a meios de cultura LB com 250 ml de volume de modo a que a densidade ótica fosse de 0,3. A absorvância foi lida num espectrofotómetro Jasco Model 7850 UV/Vis. As culturas de 250 ml de meio foram incubados a 37°C e a 180 rpm e a absorvância a 600 nm foi lida em intervalos de uma hora. O crescimento das culturas bacterianas foi interrompido no fim da fase exponencial. As culturas celulares foram centrifugadas a 5000g durante 15 minutos a 4°C numa centrífuga Hermle Z36HK. No caso da estirpe DH5 α [acKA-pta] [poxB] não foi efetuada cultura celular, uma vez que a massa celular resultante da cultura foi gentilmente cedida pela empresa Nature Technology Corporation (Lincoln, Nebraska, EUA).

3.2.4. Lise celular

O sedimento correspondente a 250 ml de cultura bacteriana foi suspenso em 12,5 ml de uma solução contendo 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8 (solução 1). A suspensão foi gentilmente agitada durante 10 minutos num banho de gelo, enquanto foi adicionada 12,5 ml de uma solução 1% (p/v) SDS e 200 mM NaOH (solução 2). Esta solução provoca a lise celular. Seguidamente, adicionou-se 9,4 ml de uma solução de neutralização composta por 3 M acetato de potássio e 11,5% (p/v) ácido acético (solução 3). A solução final foi centrifugada a 15000g durante 20 minutos a 4°C. O lisado alcalino foi armazenado a -20°C. As células de *E. coli* DH5 α [acKA-pta] [poxB] (Plasmídeo NTC 7482-41H-HA) foram lisadas recorrendo ao método descrito acima, divergindo apenas nos volumes das soluções adicionados. Assim, para 1 grama de células utilizou-se 10 ml da solução 1, 10 ml da solução 2 e 7,52 ml da solução 3.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Cultura de *Escherichia coli* DH5 α

Em qualquer ser vivo, o crescimento é um processo dinâmico que requer energia e nutrientes para a síntese dos componentes celulares e manutenção da célula. De todos os organismos vivos, os microrganismos são os mais versáteis e diversificados nas suas exigências nutricionais. A água representa grande parte do peso total das células sendo, por isso, um fator fundamental. Outros nutrientes indispensáveis são o carbono, hidrogénio, azoto, enxofre,

magnésio, fósforo, considerados macronutrientes. Os micronutrientes, exigidos em menores quantidades mas funcionalmente muito importantes, incluem o manganês, cobalto, cobre, molibdênio, zinco. Muitos deles são essenciais para a atividade de certas enzimas funcionando como cofatores (Pampulha, 1998).

O conhecimento das exigências nutricionais dos microrganismos permite o seu crescimento em meios de cultura. Na sua composição, os meios de cultura deverão incluir os nutrientes indispensáveis ao organismo em causa, sob forma assimilável. Além disso, um meio de cultura deve ser estéril de modo a impedir o crescimento e propagação de organismos contaminantes. Fatores como o pH e a tensão de oxigênio também influenciam o crescimento das bactérias (Pampulha, 1998).

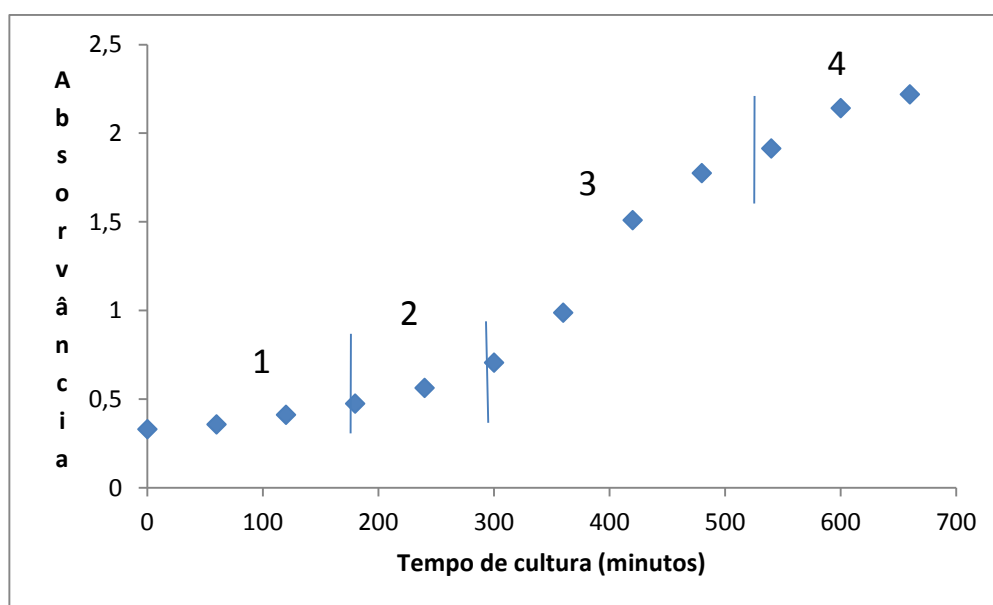


Figura 3.6 - Curva de crescimento de *Escherichia coli* DH5α em frascos agitados. 1. Fase de latência; 2. Fase de aceleração; 3. Fase exponencial; 4. Fase de desaceleração. A densidade ótica foi lida a 600nm.

As bactérias da estirpe DH5α de *E. coli* cresceram em meio líquido com os nutrientes necessários ao seu crescimento, assim como condições químicas e físicas favoráveis. Nesse meio de cultura foi inoculada uma população viável de bactérias e o seu crescimento foi acompanhado ao longo do tempo com sucessivas leituras de absorvância da população bacteriana. As leituras das densidades óticas ao longo do tempo possibilitaram a determinação da curva de crescimento destes microrganismos num sistema fechado (Figura 3.6). Após uma fase de latência inicial, durante a qual as bactérias ajustam-se ao novo meio, segue-se um período de aceleração e a população entra numa fase de crescimento constante (fase exponencial) (Pampulha, 1998). Segue-se uma fase de desaceleração, onde ainda se regista o crescimento da população bacteriana, porém apresenta uma menor taxa de crescimento. Nesta fase é alcançado um valor máximo de crescimento (Pampulha, 1998). É neste momento em que a cultura bacteriana é interrompida visto

que se segue uma fase estacionária com uma taxa de crescimento nula. Isto pode ser explicado pelo facto de a concentração de um ou mais nutrientes tornar-se limitante, daí o declínio da taxa de crescimento (fase estacionária). Posteriormente, o esgotamento de nutrientes e a acumulação de produtos inibitórios do metabolismo levam a que os microrganismos deixem de se dividir (Pampulha, 1998). É por este motivo que a cultura de bactérias é suspensa antes de se atingir a fase estacionária, de maneira a obter a máxima densidade populacional possível.

4- Caracterização de sistemas polietilenoglicol–citrato de sódio

4.1. Introdução

Tendo em consideração uma possível implementação industrial, o sistema PEG-citrato de sódio foi selecionado para a purificação de DNA plasmídico. Além do baixo custo inerente aos sistemas polímero-sal, tem ainda a vantagem adicional, de que ao contrário do sistema polietilenoglicol-sulfato de amónio, originar efluentes menos tóxicos, visto que o citrato é facilmente degradado pelos microrganismos.

Antes de começar os estudos de partição das moléculas de plasmídeo é necessária a caracterização do sistema PEG-citrato de sódio. Nesta secção estão presentes os diagramas de fases para este sistema em diversas condições. Foi estudado o efeito do peso molecular do polímero e do pH.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Materiais

Os PEG's de diversos pesos moleculares foram adquiridos à Sigma-Aldrich.

O citrato de sódio e o ácido cítrico foram provenientes da PRONALAB.

4.2.2. Preparação dos sistemas de duas fases aquosas

Os sistemas de duas fases aquosas foram preparados em tubos graduados de 15 ml com fundo cónico. Para formar duas fases, misturaram-se quantidades apropriadas de soluções de PEG e citrato de sódio. Por fim, adicionou-se água desionizada até um peso final de 5 gramas.

Foram utilizadas soluções concentradas de PEG 600, PEG 400 e PEG 300. As soluções de citrato de sódio ao pH requerido foram preparadas misturando volumes adequados de soluções concentradas de citrato de sódio (1,2 mol/Kg) e ácido cítrico (1,2 mol/Kg).

4.2.3. Determinação das linhas binodais

As linhas binodais foram determinadas por titulação turbidimétrica segundo o método de Albertsson, 1986. Foram preparados vários sistemas com concentrações de polímero e sal predeterminadas. Os constituintes eram homogeneizados e a formação das duas fases era

caracterizada a priori por uma solução turva. Depois de formado o sistema de duas fases, era adicionada gradualmente água destilada até a mistura se apresentar límpida, característica indicativa da presença de uma fase homogênea. Calculou-se então a composição global do sistema considerando a quantidade total de água adicionada. Esta composição define um ponto da binodal. No caso de pontos extremos, foram acrescentadas soluções de PEG ou de citrato de sódio, em vez de água. Para cada diagrama de fases, a binodal foi obtida unindo os diversos pontos calculados pelo processo descrito.

4.2.4. Determinação das “tie-lines”

Os sistemas de composição estabelecida foram preparados como descrito anteriormente. As duas fases foram separadas por centrifugação a 15000g durante 2 minutos. Foi registada a densidade de cada uma das fases, sendo a fase inferior removida com uma seringa. A concentração de polímero e citrato de sódio foi determinada em cada uma das fases. A “tie-line” foi determinada por regressão linear dos pontos correspondentes à concentração total dos sistemas e das fases superior e inferior de cada ensaio.

4.2.5. Determinação de citrato de sódio

O citrato de sódio presente em cada uma das fases foi quantificado por HPLC. Foi utilizada uma coluna Merck 5 µm LiChrospher 100 RP-18 (250×4 mm I.D.) num sistema constituído por uma bomba Jasco PV-90, detetor ultravioleta Jasco UV-975, registador Shimadzu CR-6A Chromatopac e injetor Rheodyne 7725i com um loop de 20 µl. As amostras foram eluídas isocriticamente com uma solução de ácido fosfórico 200 mM-metanol (90:10, v/v) com um fluxo de 1ml/minuto. A deteção foi efetuada a 220 nm.

A concentração de citrato de sódio foi calculada a partir da área do respetivo pico presente no cromatograma e de uma curva de calibração construída com soluções padrão com concentrações compreendidas entre 0,05 M e 0,15 M. Para cada solução padrão foram efetuadas três eluições e considerada a mediana destas. As amostras foram diluídas com água destilada de maneira a que a sua concentração se situasse dentro dos limites da curva de calibração. Tal como para a curva de calibração também foram feitas três eluições tendo sido considerada a mediana destas.

4.2.6. Determinação de polietilenoglicol

A concentração de PEG foi calculada por refratometria. O índice de refração das várias amostras foi lido num refratómetro Bellingham+Stanley Limited e a concentração de PEG determinada a partir de uma curva de calibração de soluções padrão com concentrações entre 1% e 50% (p/p). Uma vez que o índice de refração é aditivo, antes do cálculo da concentração de PEG, a contribuição do citrato de sódio foi subtraída ao valor do índice de refração obtido. A contribuição do citrato de sódio foi calculada por uma curva de calibração com concentrações compreendidas entre 0,1 M e 1 M.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Efeito do peso molecular do polímero

As linhas binodais para formar os sistemas de duas fases aquosas de polietilenoglicol-citrato de sódio com vários pesos moleculares de polímero foram determinadas por turbidimetria. A cada ponto da binodal corresponde um sistema com concentrações de polímero e sal predeterminadas. Os pesos moleculares utilizados foram 300, 400 e 600 e usou-se soluções de citrato de sódio com pH 6,9.

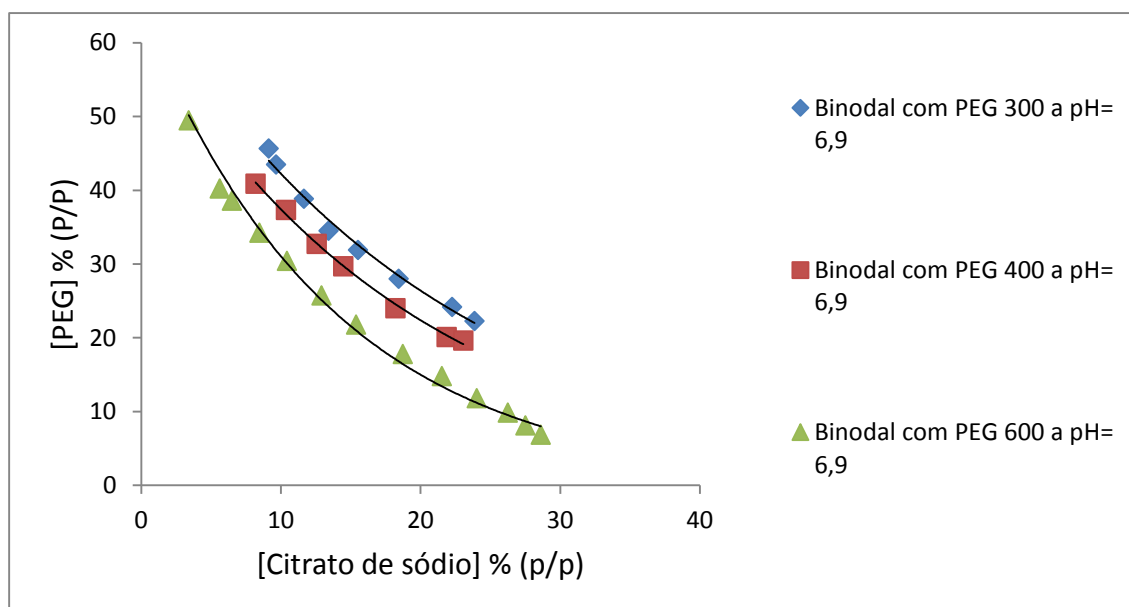


Figura 4.1 – Diagramas de fases do sistema PEG-citrato de sódio a pH 6,9 com diferentes pesos moleculares de polímero.

Na Figura 4.1 estão representadas as binodais para os diversos pesos moleculares de PEG a pH 6,9. Com o aumento do peso molecular do PEG é possível constatar a aproximação da

binodal da origem, resultado que está de acordo com dados publicados anteriormente com outros pesos moleculares de PEG (Marcos *et al.*, 1999). Isto significa, que para a mesma concentração de citrato de sódio, a quantidade de PEG necessária para a formação de um sistema de duas fases é menor. Este fenómeno é mais notório para concentrações medianas de sal. Por exemplo, num sistema contendo 15% de citrato de sódio é preciso acrescentar 22% de PEG 600 para haver formação de duas fases. Todavia, para a mesma concentração de sal as duas fases formam-se com 34% de PEG 300. Assim sendo, verifica-se que com o decréscimo do peso molecular do polímero a binodal afasta-se da origem e conseqüentemente, para a mesma concentração de citrato serão necessárias maiores concentrações de polietilenoglicol para formar um sistema de duas fases. Este fenómeno pode ser explicado pelo facto de que com o aumento do peso molecular do PEG, as diferenças entre os dois componentes são mais acentuadas e a separação de fases será resultante do “salting-out” do PEG pelo citrato e a exclusão deste pelo polímero (Albertsson, 1986; Marcos *et al.*, 2000).

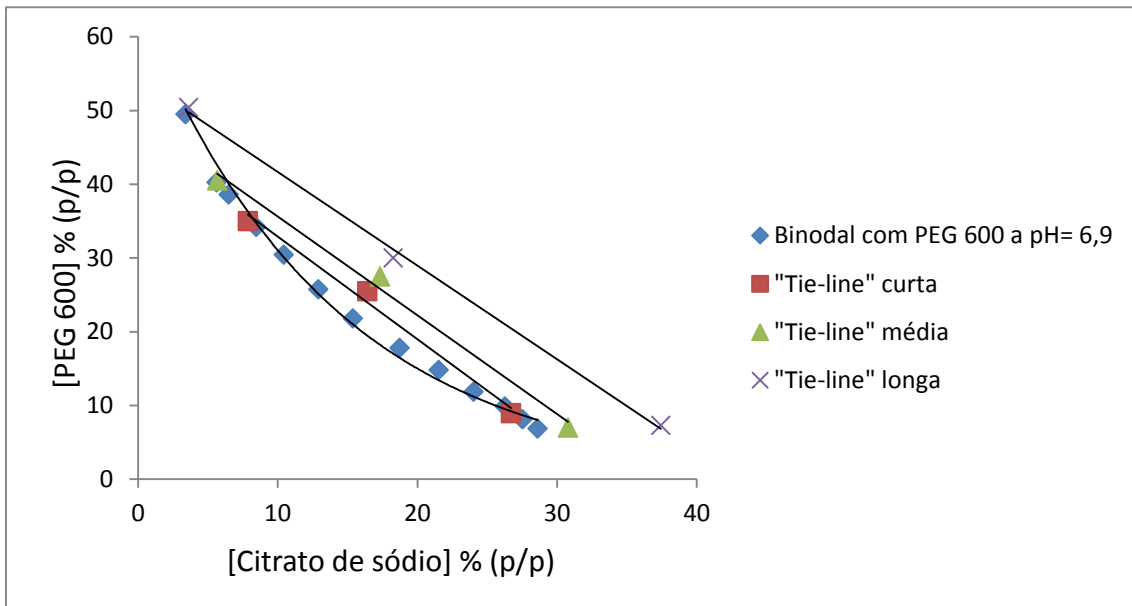
4.3.2. Efeito do pH

Foram determinadas as linhas binodais para PEG 300, 400 e 600 a pH 4,9; 5,9 e 6,9. Juntamente com as binodais, também foram determinadas as “tie-lines” para diferentes composições de polímero e sal. Uma “tie-line” é uma linha reta caracterizada pelo facto de todos os pontos situados sobre ela corresponderem a sistemas com a mesma composição de fase superior e inferior mas diferentes razões de volume.

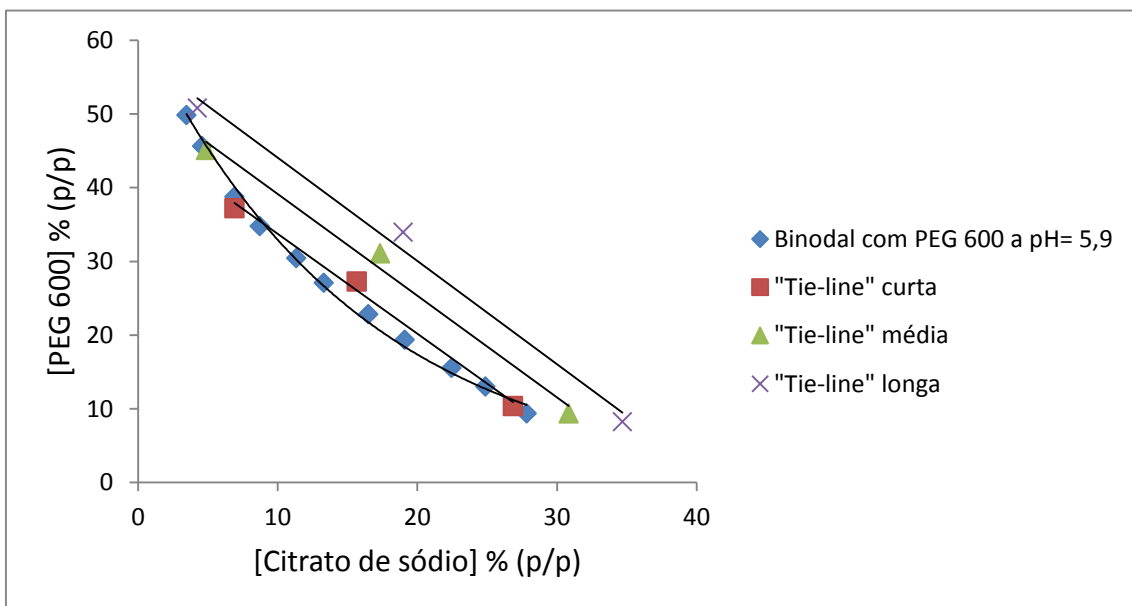
Na Figura 4.2 apresentam-se os diagramas de fase para os vários valores de pH e PEG 600. Pode-se afirmar que o diagrama de fases se aproxima da origem com o aumento do pH. Isto significa que são precisas menores concentrações de polímero e sal para que se registre a formação de duas fases. Este fenómeno já tinha sido observado noutros sistemas formados por um polímero e um sal, sendo o resultado consequência do aumento do número e carga das espécies carregadas com o aumento do pH (Marcos *et al.*, 1999), uma vez que o pK_a do citrato divalente é 5,82, a pH 6,9 grande percentagem do sal vai estar na forma trivalente (Marcos *et al.*, 1999). Tendo em conta que em parte, a formação de duas fases ocorre devido à incompatibilidade entre o polímero e o sal, o aumento do número de cargas em solução tem como efeito inerente o aumento desta incompatibilidade (Albertsson, 1986). O aumento do comprimento das “tie-lines” está também correlacionado com o aumento do pH (Albertsson, 1986).

4 - Caracterização de sistemas polietilenoglicol-citrato de sódio

a)



b)



c)

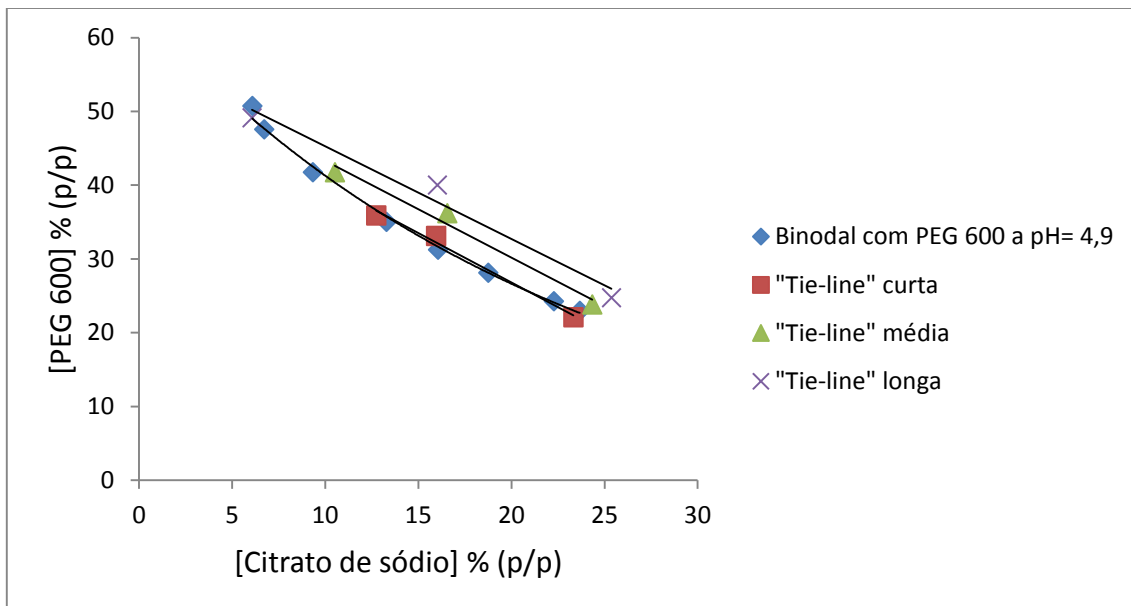


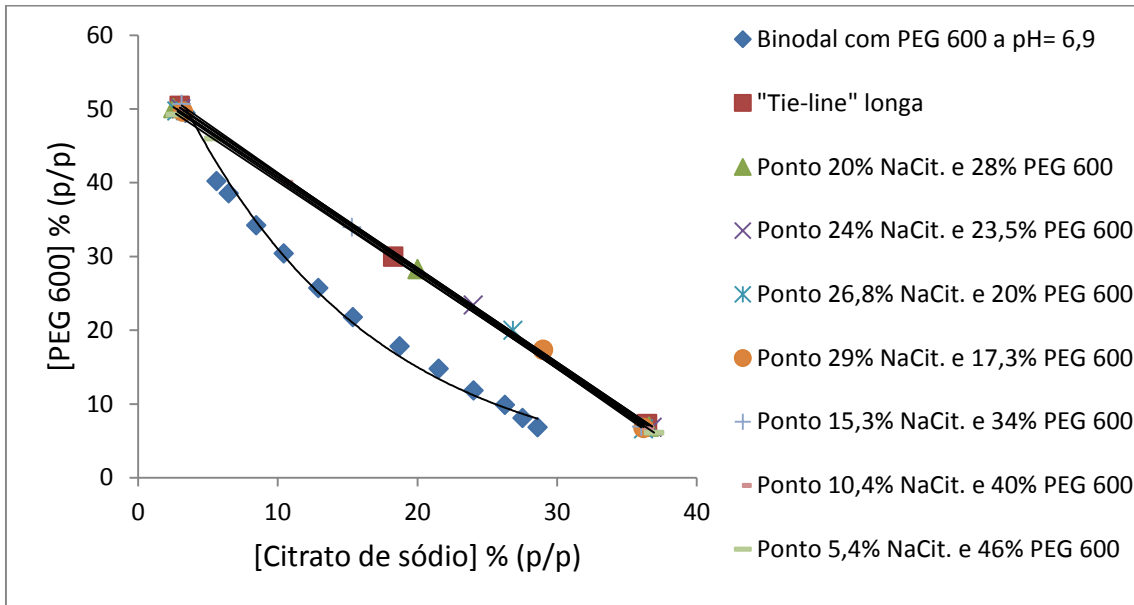
Figura 4.2 – Diagramas de fases dos sistemas PEG 600-citrato de sódio a diferentes valores de pH a) 6,9; b) 5,9; c) 4,9.

Em estudos anteriores foi registada a diminuição da solubilidade do PEG com o aumento do pH. Isto é devido a uma alteração da estrutura da água em consequência do aumento de espécies carregadas negativamente. Assim, a divergência das binodais com o aumento do pH pode ser devida ao efeito de “salting-out” proporcionado pelo sal, diminuindo a solubilidade do polímero na fase do sal e este forma uma outra fase (Ananthpadmanabhan and Goddard, 1987).

4.3.3. Confirmação das “tie-lines”

Os métodos utilizados para a realização das “tie-lines” foram confirmados pela determinação da composição das fases superior e inferior de sistemas situados sobre a “tie-line” predeterminada. Tendo em conta a Figura 4.3 e considerando o erro experimental associado, constata-se que os sistemas realizados para validar as “tie-lines” apresentam igual constituição de fase superior e inferior. Este resultado está de acordo com a definição de “tie-line”, uma vez que todos os pontos situados sobre essa linha correspondem a sistemas com a mesma constituição de fase superior e inferior.

a)



b)

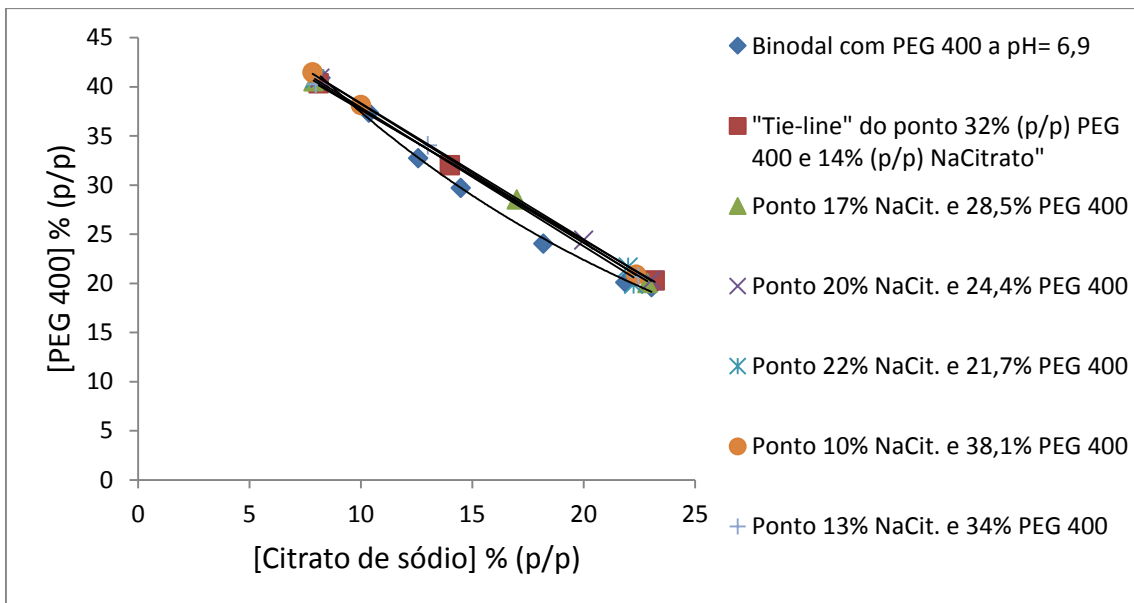


Figura 4.3 - Confirmação da determinação das “tie-lines”. **a)** Sistema PEG 600-citrato de sódio pH 6,9, “tie-line” longa. **b)** Sistema PEG 400-citrato de sódio pH 6,9, “tie-line” do ponto 32% (p/p) PEG 400 e 14% citrato de sódio. Na legenda dos gráficos estão descritas as composições totais dos pontos utilizados para validar as respectivas “tie-lines”.

**5 - Estudos de partição e purificação
de DNA plasmídico em sistemas
PEG-sal e líquido iónico-sal**

5.1. Introdução

O desenvolvimento de um processo de purificação de moléculas de plasmídeo utilizando sistemas de duas fases aquosas envolve a variação sistemática de diversos parâmetros até se atingir o resultado desejado. Neste capítulo estão expostos os resultados referentes à otimização das condições adequadas à purificação de pDNA em sistemas polietilenoglicol-citrato de sódio e líquido iónico-sal. Foi investigado o efeito do peso molecular do PEG e o pH da solução de citrato de sódio na partição e purificação de DNA plasmídico. Em relação aos sistemas líquido iónico-sal, foram testados diversos líquidos iónicos de modo a averiguar a variação da partição com a mudança do líquido iónico. Com os resultados obtidos foi possível estabelecer as condições propícias para a purificação de plasmídeo a partir de um extrato bruto.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Materiais

Os reagentes utilizados neste capítulo constam na tabela 5.1.

5.2.2. Extrato celular

Para os estudos de partição e purificação de plasmídeo foram utilizados os lisados alcalinos das estirpes DH5 α e DH5 α [acKA-pta] [poxB] de *E. coli*.

5.2.3. Preparação dos Sistemas de duas fases aquosas

Os sistemas de duas fases aquosas polímero-sal foram preparados, no caso dos sistemas de 2 gramas, em microtubos de 2ml (Figura 5.1). Os sistemas formavam-se com a adição exata de água desionizada, PEG, lisado alcalino e citrato de sódio. O lisado alcalino foi adicionado de modo a perfazer 20% (p/p) da composição total do sistema. A quantidade de

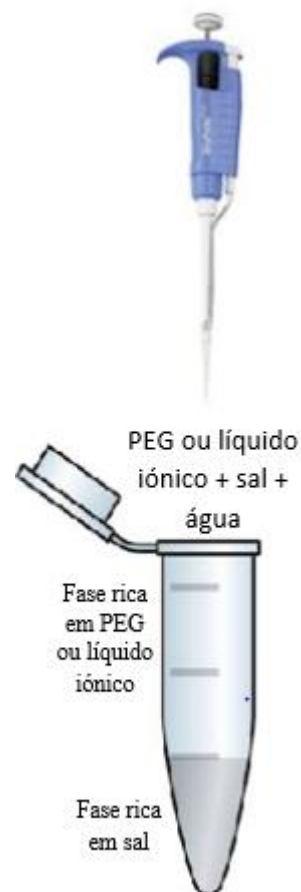


Figura 5.1 – Representação de um sistema de duas fases aquosas hipotético. A imagem pretende ilustrar os diferentes constituintes que compõem os sistemas polímero-sal e líquido iónico-sal respectivamente. Além disso, também mostra a diferente partição dos constituintes pelas duas fases.

PEG e citrato de sódio a adicionar foi calculada a partir do respetivo diagrama de fases presente no capítulo 4. Foram utilizadas soluções de PEG 600, PEG 400 e PEG 300. As soluções de citrato de sódio foram preparadas misturando volumes adequados de soluções concentradas de citrato de sódio (1,2 mol/kg) e ácido cítrico (1,2 mol/kg). Os vários componentes foram misturados no vórtex e centrifugados a 15000g durante 2 minutos a 4°C de maneira a acelerar a separação das duas fases. As fases foram separadas por remoção da fase inferior com uma seringa.

A preparação dos sistemas líquido iónico-sal foi semelhante à dos sistemas polímero-sal divergindo no facto de serem sistemas de 1 grama, apresentarem na sua composição líquido iónico em detrimento do PEG e no sal utilizado. Para os líquidos iónicos [C₄mim]PF₆ e [C₄mim]BF₄, o sal utilizado foi o carbonato de sódio. O citrato de potássio foi o sal usado para formar duas fases com [C₄mim]Cl e [C₄mim]Br.

Tabela 5.1 - Reagentes usados neste capítulo.

Reagente	Fornecedor
PEG 300	Sigma
PEG 400	Sigma
PEG 600	Sigma
Citrato de sódio	PRONALAB
Citrato de potássio	PRONALAB
Comassie Blue G250	Thermo Scientific
Albumina do soro bovino	Sigma
Agarose	Sigma
[C ₄ mim]Cl	Iolitec
[C ₄ mim]Br	Iolitec
[C ₄ mim]PF ₆	Iolitec
[C ₄ mim]BF ₄	Iolitec

5.2.4. Preparação dos sistemas de duas fases aquosas para ensaios em multi-estágio

Os SDFA's que mostraram capacidade de separar o RNA das moléculas de plasmídeo seguiram para ensaios de multi-estágio. Foram utilizados SDFA's de 2 gramas. Estes sistemas eram constituídos por PEG, citrato de sódio, água desionizada e 20% (p/p) lisado bacteriano. Paralelamente ao sistema de 2 gramas, fez-se um sistema de duas fases de 14 gramas, cuja constituição englobava igualmente o polímero, o sal e água, mas o lisado celular foi substituído pela mistura das três soluções usadas na lise alcalina (ver secção 3.2.4.). Depois de formado o SDFA de 2 gramas, a fase superior foi removida. O volume retirado da fase superior foi repostado com uma nova fase superior proveniente do sistema de 14 gramas. Este processo repetiu-se as vezes necessárias até que todo o RNA que se encontrava na fase inferior fosse removido (Figura 5.2).

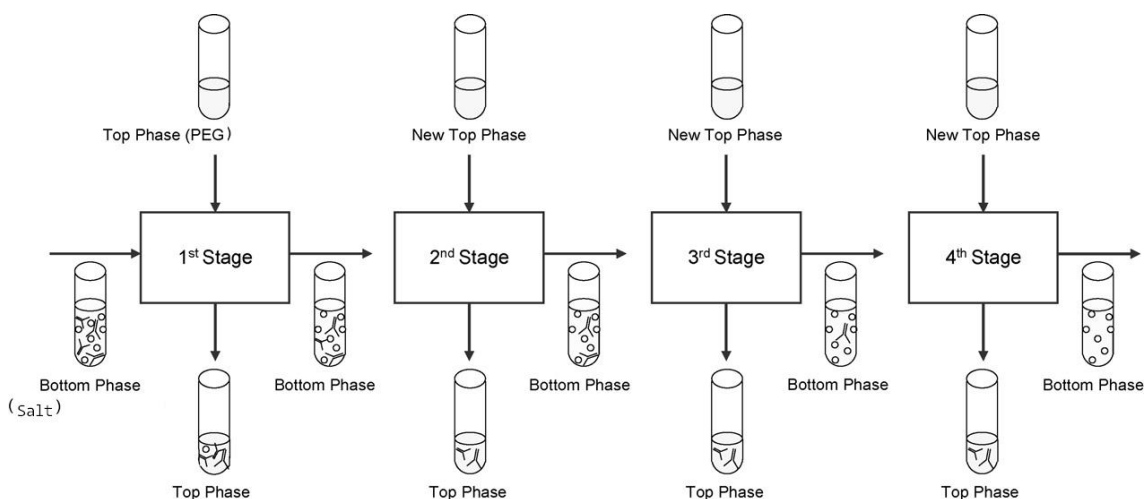


Figura 5.2 - Esquema representativo do processo de multi-estágio em sistemas polímero-sal. Foram adicionadas novas fases superiores até se obter plasmídeo puro na fase inferior. RNA; pDNA (adaptado de Rosa *et al.*, 2009).

No caso dos sistemas líquido iónico-sal o procedimento foi o mesmo divergindo apenas no volume e composição dos sistemas. Todos os sistemas utilizados em multi-estágio foram homogeneizados no vórtex e centrifugados a 15000g durante 2 minutos a 4°C.

5.2.5. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada com o intuito de separar e permitir identificar os ácidos nucleicos, nomeadamente DNA e RNA, presentes nos sistemas de duas fases aquosas. Os géis de agarose eram constituídos por 0,5 gramas de agarose e 50 ml de tampão TAE 1x. Antes da polimerização do gel, adicionou-se 1µl de brometo de etídeo, agente que vai ficar

intercalado entre as duas cadeias de DNA e, conseqüentemente vai permitir a visualização dos ácidos nucleicos. Após a solidificação do gel, foram colocadas nos diferentes poços 10µl de amostra em conjunto com 2µl de tampão de carregamento (0,0025 gramas de azul bromofenol, 0,7 gramas de H₂O desionizada e 0,3 gramas de glicerol). O gel correu durante 60 minutos, a 60 volts em tampão TAE 1x. No final, procedeu-se à visualização dos géis numa câmara com luz UV e recorrendo ao programa Quantity One 1-D da Bio-Rad.

5.2.6. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteína total foi calculada pelo método de Bradford. Este método baseia-se na alteração do máximo de absorvância do corante Comassie Blue G-250 de 465 nm (vermelho) para 595 nm (azul) por ligação a proteínas.

A determinação foi efetuada pela adição de 500 µl de reagente de Bradford a 25 µl de amostra adequadamente diluída (no caso dos lisados bacterianos usou-se um volume de 50 µl). Após agitação, a absorvância foi lida a 595 nm num leitor de microplacas Varian Cary 50. A concentração proteica foi calculada recorrendo a uma curva de calibração construída com soluções padrão de albumina de soro bovino com concentrações entre 2,5 µg/ml e 30 µg/ml. Para cada amostra foram realizadas três determinações independentes sendo considerada a mediana.

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Efeito do peso molecular do polietilenoglicol

Depois de traçadas as binodais e “tie-lines” para os diferentes pH’s e pesos moleculares de polietilenoglicol, foram determinados vários pontos para proceder ao estudo da partição do pDNA em sistemas PEG-citrato de sódio. Os pontos escolhidos pertenciam às “tie-lines” anteriormente traçadas para os diferentes pH’s e pesos moleculares de polímero.

A partição de ácidos nucleicos em sistemas de duas fases aquosas é dependente de diversos fatores, nomeadamente o tamanho e as propriedades químicas da macromolécula, a composição iónica e as propriedades inerentes aos componentes que constituem o sistema. Em sistemas PEG-sal, o peso molecular do polímero é uma das condições que mais afeta a partição das biomoléculas (Lif *et al.*, 1961).

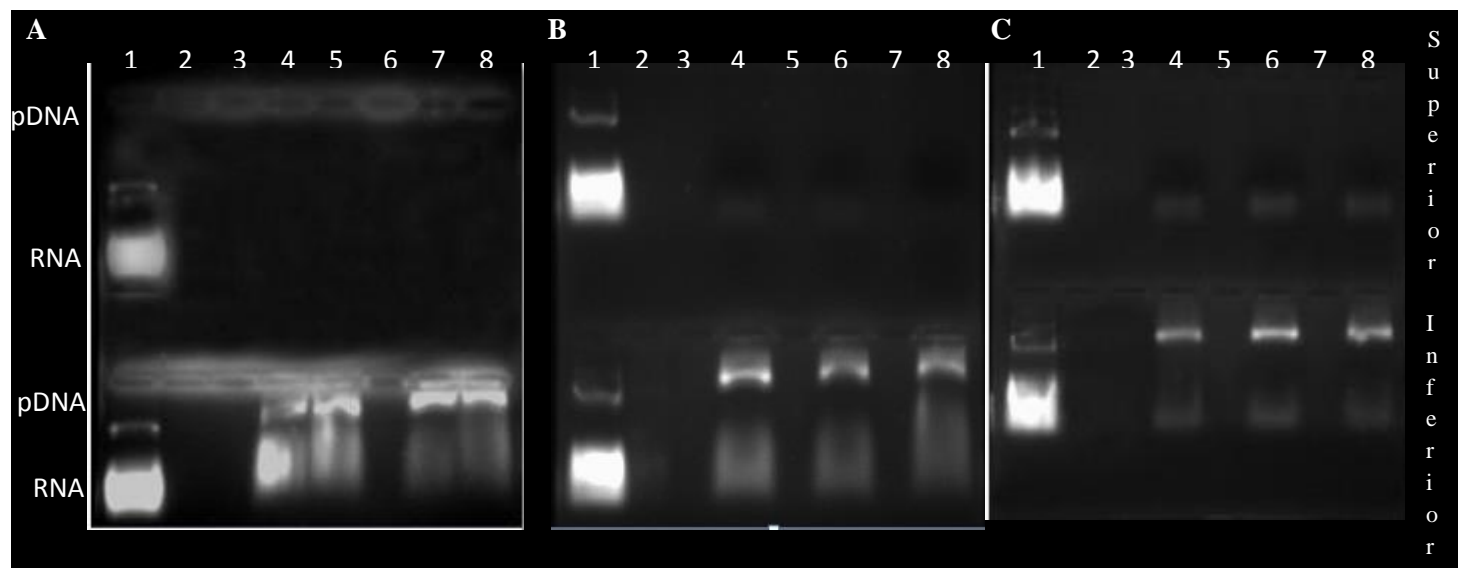


Figura 5.3 - Géis de agarose referentes à partição do lisado em sistemas PEG-citrato de sódio para diferentes pesos moleculares de PEG a pH 6,9. **A)** PEG 600. Poços: (1) lisado da estirpe DH5 α ; (2), (3) e (6) sem amostra; (4) sistema 16,41% (p/p) citrato de sódio e 25,5% (p/p) PEG 600; (5) sistema 17,34% (p/p) citrato de sódio e 27,5% (p/p) PEG 600; (7) sistema 18,28% (p/p) citrato de sódio e 30% (p/p) PEG 600; (8) sistema 19% (p/p) citrato de sódio e 35% (p/p) PEG 600. **B)** PEG 400. Poços: (1) lisado da estirpe DH5 α ; (2), (3), (5) e (7) sem amostra; (4) sistema 16% (p/p) citrato de sódio e 32% (p/p) PEG 400; (6) sistema 15% (p/p) citrato de sódio e 34% (p/p) PEG 400; (8) sistema 16% (p/p) citrato de sódio e 36% (p/p) PEG 400. **C)** PEG 300. Poços: (1) lisado da estirpe DH5 α ; (2), (3), (5) e (7) sem amostra; (4) sistema 16% (p/p) citrato de sódio e 34% (p/p) PEG 300; (6) sistema 17% (p/p) citrato de sódio e 36% (p/p) PEG 300; (8) sistema 18% (p/p) citrato de sódio e 38% (p/p) PEG 300.

Assim, primeiramente procedeu-se ao estudo da influência do peso molecular do polímero na partição do DNA plasmídico. Foram utilizados PEG 300, PEG 400 e PEG 600 e para cada um destes polímeros realizaram-se ensaios para diferentes composições dos sistemas, correspondendo a diferentes “tie-lines”. Os resultados dos géis de agarose apresentam-se compilados na Figura 5.3. Numa primeira análise, o gel correspondente aos sistemas compostos com PEG 600 permite concluir que não houve partição de RNA para a fase superior rica em polímero. Este resultado inviabilizou a utilização de PEG 600 para ensaios de purificação de pDNA uma vez que a totalidade das moléculas de RNA encontravam-se na fase inferior juntamente com o DNA plasmídico. Contrariamente, nos géis com amostras de sistemas nos quais foram utilizados respetivamente PEG 300 e PEG 400 podem ser visualizadas as bandas correspondentes ao RNA na fase superior. Apesar de ainda ser possível visualizar RNA na fase inferior, pode inferir-se que com estes polímeros é possível proceder à purificação de plasmídeo num processo de multi-estágio ou contínuo, eliminando a maioria das moléculas de RNA da fase inferior.

Seria previsível que as moléculas de pDNA e RNA, carregadas negativamente, tivessem uma preferência para a fase superior rica em polietilenoglicol devido à repulsão exercida pelas cargas negativas dos iões do sal que constitui a fase inferior. Contudo em todos os géis da Figura 5.3 é possível verificar que todo o DNA plasmídico encontra-se na fase inferior. É sabido que à

medida que as cadeias de PEG aumentam, moléculas individuais de polímero interagem umas com as outras formando uma espécie de malha cujo tamanho dos espaços que a compõem pode ser mais pequeno que uma proteína e, por consequência mais reduzidos que moléculas de ácidos nucleicos (Huddleston *et al.*, 1991). Assim, as moléculas de pDNA não têm partição na fase rica em PEG devido ao reduzido espaço livre da malha do polímero, o que favorece a exclusão das moléculas de plasmídeo para a fase inferior (Atha and Ingham, 1981). O fenómeno de colapso das moléculas de pDNA em soluções de PEG também pode ser uma condicionante para que haja a partição das moléculas de plasmídeo na fase rica em citrato de sódio (Vasilevskaya *et al.*, 1995). Na presença de PEG com baixo peso molecular ou pequenas concentrações de polímero, as cadeias mais flexíveis de polietilenoglicol podem interagir com as moléculas de pDNA, resultando numa compatibilidade entre as moléculas de PEG e de plasmídeo. Se o peso molecular do PEG é maior, a sua qualidade como solvente para as moléculas de DNA plasmídico é reduzida, culminando numa incompatibilidade que vai favorecer a migração das macromoléculas para a fase rica em sal (Vasilevskaya *et al.*, 1995). Nos sistemas estudados, grande parte das moléculas de RNA acumulam-se na fase inferior juntamente com o DNA plasmídico. Contudo, é visível a presença de RNA na fase superior nos sistemas com PEG 300 e PEG 400. Este fenómeno pode ser explicado pelo facto de os espaços livres que compõem a malha nestes pesos moleculares permitirem o alojamento na fase superior das moléculas de RNA. As restantes moléculas de RNA permanecem na fase inferior porque foi atingido o nível de saturação na fase superior, ou seja, já não existem espaços livres para albergar mais moléculas de RNA. Com o aumento do peso molecular do PEG, o empacotamento das moléculas vai ser maior, deixando menos espaço livre entre elas e, consequentemente a partição de RNA para a fase rica em polímero é inexistente ou muito reduzida, facto que acontece nos sistemas com PEG 600.

Assim, os polímeros PEG 300 e PEG 400 foram seleccionados para posterior purificação de plasmídeo em processos de multi-estágio.

5.3.2. Efeito do pH

Para além do peso molecular do polímero, o pH também condiciona a partição de biomoléculas em sistemas PEG-sal. Depois de anteriormente ter-se estudado o efeito do peso molecular do PEG na partição de ácidos nucleicos, procedeu-se ao estudo do efeito do pH. Foram realizadas experiências a pH 4,9; 5,9 e 6,9 para diferentes comprimentos de “tie-line”. Valores de pH's superiores a 6,9 não foram alvo de estudo porque o aumento deste parâmetro promove o enfraquecimento das ligações de hidrogénio entre as bases azotadas das cadeias complementares

de DNA. Consequentemente as forças de repulsão existentes entre os grupos fosfato carregados negativamente induzem à separação da cadeia dupla (Frerix *et al.*, 2006).

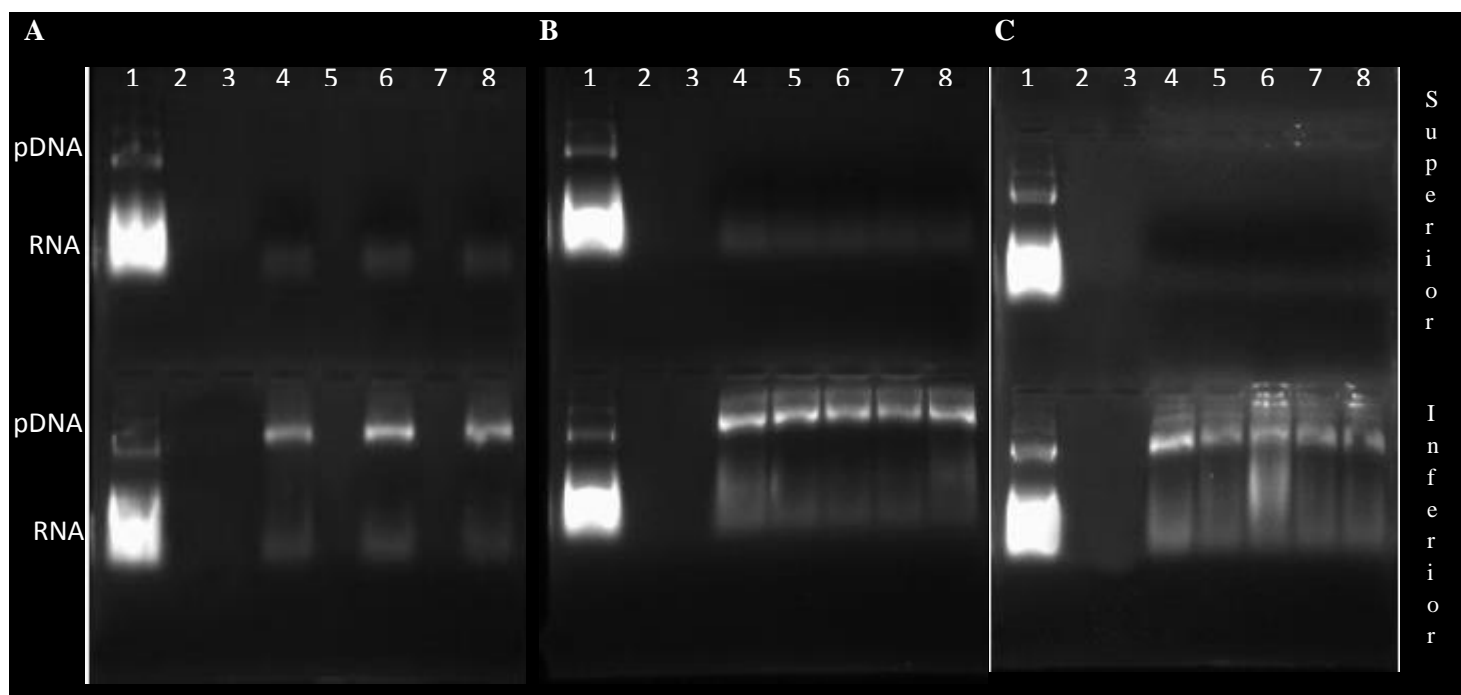


Figura 5.4 - Géis de agarose referentes à partição do lisado em sistemas PEG 300-citrato de sódio para diferentes valores de pH. **A**) pH 6,9. Poços: (1) lisado da estirpe DH5 α ; (2), (3), (5) e (7) sem amostra; (4) sistema 16% (p/p) citrato de sódio e 34% (p/p) PEG 300; (6) sistema 17% (p/p) citrato de sódio e 36% (p/p) PEG 300; (8) sistema 18% (p/p) citrato de sódio e 38% (p/p) PEG 300. **B**) pH 5,9. Poços: (1) lisado da estirpe DH5 α ; (2) e (3) sem amostra; (4) sistema 15% (p/p) citrato de sódio e 37% (p/p) PEG 300; (5) sistema 16% (p/p) citrato de sódio e 39% (p/p) PEG 300; (6) sistema 17% (p/p) citrato de sódio e 41% (p/p) PEG 300; (7) sistema 18% (p/p) citrato de sódio e 43% (p/p) PEG 300; (8) sistema 19% (p/p) citrato de sódio e 45% (p/p) PEG 300. **C**) pH 4,9. Poços: (1) lisado da estirpe DH5 α ; (2) e (3) sem amostra; (4) sistema 15% (p/p) citrato de sódio e 42% (p/p) PEG 300; (5) sistema 16% (p/p) citrato de sódio e 44% (p/p) PEG 300; (6) sistema 17% (p/p) citrato de sódio e 46% (p/p) PEG 300; (7) sistema 18% (p/p) citrato de sódio e 48% (p/p) PEG 300; (8) sistema 19% (p/p) citrato de sódio e 50% (p/p) PEG 300.

Na Figura 5.4 apresentam-se os géis de eletroforese correspondentes a sistemas PEG 300-citrato de sódio a pH 6,9; 5,9 e 4,9 respetivamente. Com o aumento do pH pode observar-se um aumento da concentração de plasmídeo na fase inferior. Este fenómeno já havia sido descrito em estudos anteriores (Rahimpour *et al.*, 2006; Frerix *et al.*, 2006). Frerix *et al.* efetuou um estudo onde variou o pH de sistemas PEG-fosfato de potássio entre 5,9 e 8,4. Nessa gama de pH, quase 90% do DNA plasmídico encontrava-se na fase inferior. Registaram ainda que a presença de RNA na fase superior aumentou de 40% para 70% entre pH 5,9 e 6,9 (Frerix *et al.*, 2006). Em concordância, na Figura 5.4 pode constatar-se que as bandas correspondentes a RNA na fase superior apresentam uma maior intensidade à medida que aumenta o pH. Por consequência, o facto de haver mais RNA na fase superior contribui para a menor presença na fase inferior, fase onde se encontram as moléculas de DNA plasmídico e por isso o aumento do pH contribui para a sua purificação.

A variação de pH provoca a alteração da razão entre citrato trivalente/citrato divalente, o que irá influenciar a partição das moléculas de ácidos nucleicos. O pK_a para o citrato divalente é 5,82. Isto significa que a fração de citrato trivalente aumenta de 54% para 92% entre pH 5,9 e 6,9 (Marcos, 2000). É neste intervalo onde se verifica um maior incremento de RNA na fase superior, fenómeno que se deve ao aumento de citrato trivalente em solução. Este aumento vai culminar num efeito de “salting-out” na fase rica em sal. À medida que se regista o aumento de pH, as moléculas de água que estavam envolvidas no processo de solvatação de biomoléculas são atraídas pelos iões de citrato, o que diminui o número de moléculas de água disponíveis para solvatar as biomoléculas. Esta destabilização vai direcionar as moléculas de RNA para a fase superior. As moléculas de DNA plasmídico também são afetadas pelo efeito de “salting-out”. Contudo, os espaços livres existentes na fase superior rica em PEG não têm volume suficiente para albergar as moléculas de pDNA.

Depois de se analisar os resultados obtidos, selecionou-se os pesos moleculares PEG 300 e PEG 400 e os pH's 4,9; 5,9 e 6,9 para uma fase de otimização dos sistemas de duas fases aquosas de maneira a obter a maior taxa de concentração e purificação de DNA plasmídico. Isto porque apesar de, por exemplo, a pH 4,9 ter-se registado uma menor quantidade de RNA na fase superior, não significa que para outros pontos do diagrama de fases, não se verifiquem resultados tão bons ou melhores do que aqueles demonstrados nos sistemas a pH 5,9 e 6,9.

5.3.3. Otimização do processo de purificação em sistemas polímero-sal

Os sistemas de duas fases aquosas apresentam várias vantagens destacando-se a sua simplicidade técnica, a facilidade de implementação em larga escala e a possibilidade de desenvolver processos de baixo custo comparativamente com outros métodos de purificação (Xu *et al.*, 2005). No entanto, exibem uma séria desvantagem. A inexistência de um modelo adequado capaz de prever, de um modo geral e com apreciável rigor, a partição de solutos em SDFAs. Sendo a partição dependente de uma multiplicidade de fatores, a existência de tal modelo mesmo que contemplando apenas as interações principais é de importância fundamental. Além disso, deve-se notar que no processo de separação de um componente de uma mistura, além das interações do componente com os elementos que compõem o sistema de duas fases, as interações entre os diversos componentes da mistura são igualmente preponderantes (Rahimpour *et al.*, 2006). Assim, a seleção de um sistema para a purificação de DNA plasmídico é geralmente empírico. Isto é, variam-se sistematicamente determinados parâmetros até se atingir um resultado aceitável (Albertsson, 1986).

As características de um sistema de duas fases aquosas estão dependentes do tipo e concentração de polímero presente, do tipo e concentração de sais existentes e do pH. Um dos parâmetros usualmente variado é o comprimento da “tie-line” o que corresponde à variação da diferença de concentração dos componentes em cada uma das fases. Deste modo todos os principais fatores referidos anteriormente vão ser variados (Albertsson, 1986).

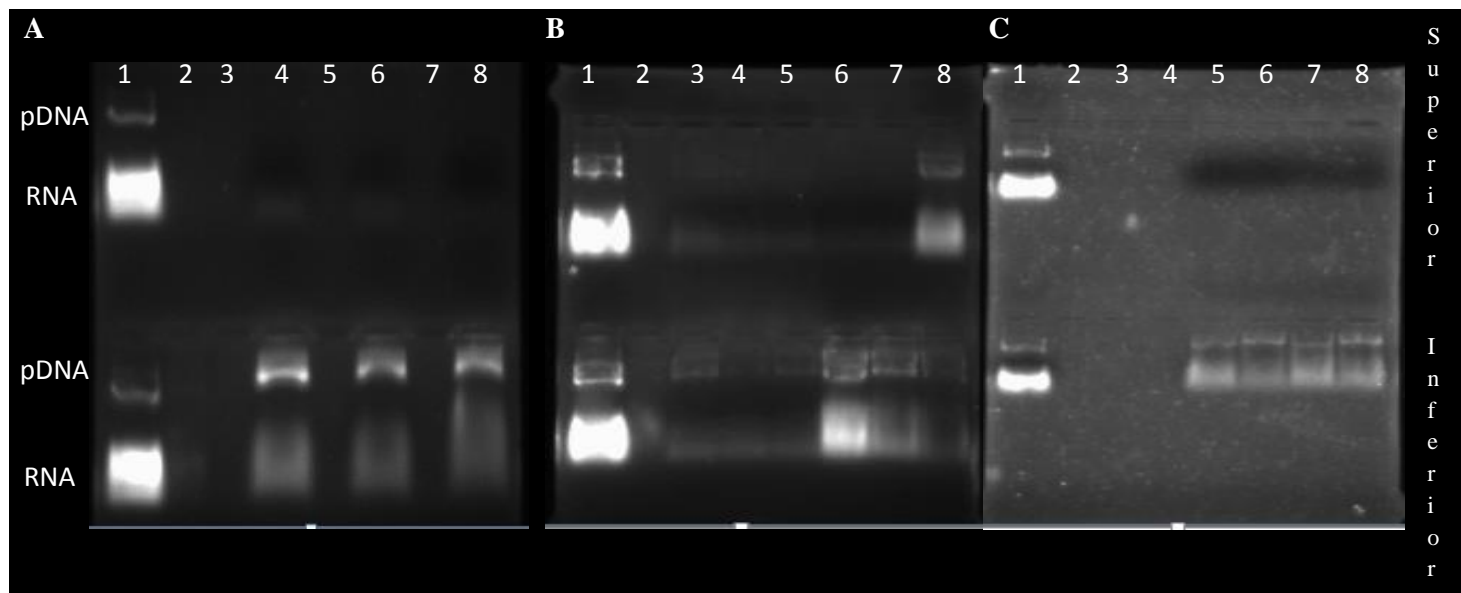


Figura 5.5 - Géis de agarose referentes à partição do lisado em sistemas PEG 400-citrato de sódio a diferentes pH's. **A)** pH 6,9. Poços: (1) lisado da estirpe DH5 α ; (2), (3), (5) e (7) sem amostra; (4) sistema 14% (p/p) citrato de sódio e 32% (p/p) PEG 400; (6) sistema 15% (p/p) citrato de sódio e 34% (p/p) PEG 400; (8) sistema 16% (p/p) citrato de sódio e 36% (p/p) PEG 400. **B)** pH 5,9 e 4,9. Poços: (1) lisado da estirpe DH5 α ; (2) sem amostra; (3) sistema 15% (p/p) citrato de sódio e 34% (p/p) PEG 400 a pH 5,9; (4) sistema 16% (p/p) citrato de sódio e 38% (p/p) PEG 400 a pH 5,9; (5) sistema 17% (p/p) citrato de sódio e 42% (p/p) PEG 400 a pH 5,9; (6) sistema 17% (p/p) citrato de sódio e 36% (p/p) PEG 400 a pH 4,9; (7) sistema 18% (p/p) citrato de sódio e 38% (p/p) PEG 400 a pH 4,9; (8) sistema 19% (p/p) citrato de sódio e 40% (p/p) PEG 400 a pH 4,9. **C)** pH 4,9. Poços: (1) lisado da estirpe DH5 α ; (2), (3) e (4) sem amostra; (5) sistema 17% (p/p) citrato de sódio e 36% (p/p) PEG 400; (6) sistema 18% (p/p) citrato de sódio e 38% (p/p) PEG 400; (7) sistema 18,5% (p/p) citrato de sódio e 39,5% (p/p) PEG 400; (8) sistema 19% (p/p) citrato de sódio e 40% (p/p) PEG 400.

As experiências anteriores, onde se variou o peso molecular do polímero e o pH, revelaram que era possível obter uma purificação apreciável de DNA plasmídico recorrendo ao uso de sistemas de duas fases formados por polietilenoglicol e citrato de sódio. O PEG com peso molecular 600 foi excluído para a purificação de pDNA uma vez que demonstrou uma total incapacidade de separar as moléculas de RNA das moléculas de plasmídeo. Assim, procedeu-se a uma otimização da purificação utilizando sistemas compostos por PEG 400 e PEG 300, e variando o pH entre os valores 4,9; 5,9 e 6,9.

Os ensaios com PEG 400 a pH 6,9 revelaram uma boa partição e concentração de pDNA na fase inferior. Porém, a quantidade de RNA que se observa na fase superior para aqueles sistemas é mínima (Figura 5.5 A). Procedeu-se, então, ao estudo da partição a pH's 4,9 e 5,9. Na Figura 5.5 B pode observar-se que a pH 5,9 há menos RNA na fase inferior quando comparado com os sistemas a pH 4,9.

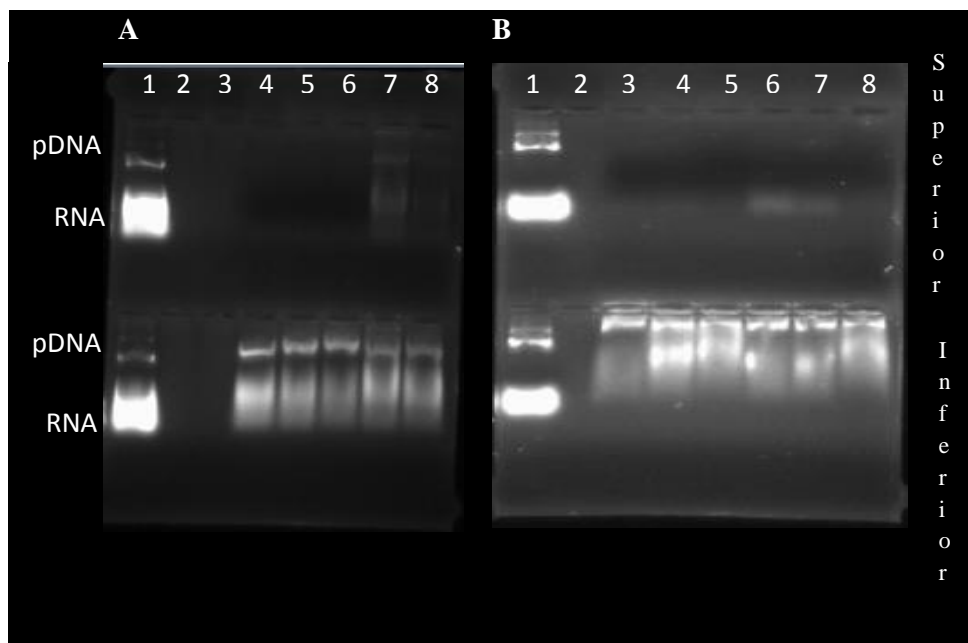


Figura 5.6 - Géis de agarose referentes à partição do lisado em sistemas polímero-sal. **A)** Partição do lisado em sistemas PEG 400-citrato de sódio a pH 4,9. Poços: (1) lisado da estirpe DH5 α ; (2) e (3) sem amostra; (4) sistema 17% (p/p) citrato de sódio e 36% (p/p) PEG 400; (5) sistema 18% (p/p) citrato de sódio e 38% (p/p) PEG 400; (6) sistema 18% (p/p) citrato de sódio e 40% (p/p) PEG 400; (7) sistema 19% (p/p) citrato de sódio e 38% (p/p) PEG 400; (8) sistema 19% (p/p) citrato de sódio e 40% (p/p) PEG 400. **B)** Partição do lisado em sistemas PEG 600-citrato de sódio e PEG 400-citrato de sódio a diferentes pH's. Poços: (1) lisado da estirpe DH5 α ; (2) sem amostra; (3) sistema 18,28% (p/p) citrato de sódio e 30% (p/p) PEG 600 a pH 6,9; (4) sistema 18,79% (p/p) citrato de sódio e 35% (p/p) PEG 600 a pH 5,9; (5) sistema 16,55% (p/p) citrato de sódio e 37,22% (p/p) PEG 600 a pH 4,9; (6) sistema 14% (p/p) citrato de sódio e 32% (p/p) PEG 400 a pH 6,9; (7) sistema 16% (p/p) citrato de sódio e 38% (p/p) PEG 400 a pH 5,9; (8) sistema 18% (p/p) citrato de sódio e 38% (p/p) PEG 400 a pH 4,9.

No entanto, a quantidade de plasmídeo é maior nos sistemas a pH 4,9. E, no ponto 19% citrato de sódio e 40% PEG 400 a pH 4,9, uma grande percentagem das moléculas de RNA encontra-se na fase superior, apesar de acontecer o mesmo com as moléculas de plasmídeo. Analisado este resultado, selecionaram-se novos pontos a pH 4,9 nos quais a quantidade de sal e polímero era menor de modo a permitir exclusivamente a partição de RNA para a fase superior. Os pontos escolhidos resultaram numa total partição do DNA plasmídico na fase inferior, todavia não se registou RNA na fase superior (Figura 5.5 C). Numa segunda tentativa, experimentou-se novos sistemas de duas fases onde em dois deles registou-se a presença de RNA na fase superior rica em PEG (Figura 5.6 A). Contudo, tal como havia sucedido com o gel presente na Figura 5.5 B foi detetada a presença de pDNA na fase superior. A presença de pDNA na fase superior destes sistemas pode ser explicada pela elevada concentração de polímero com baixo peso molecular na constituição total dos mesmos. Assim, as cadeias mais flexíveis de PEG 400 podem interagir com as moléculas de pDNA, resultando numa compatibilidade entre as moléculas de PEG e de plasmídeo (Vasilevskaya *et al.*, 1995).

Todos os sistemas formados com PEG 400 a pH 4,9 depararam-se ser inviáveis para a purificação de DNA plasmídico, já que não ocorreu a separação das moléculas de RNA e pDNA

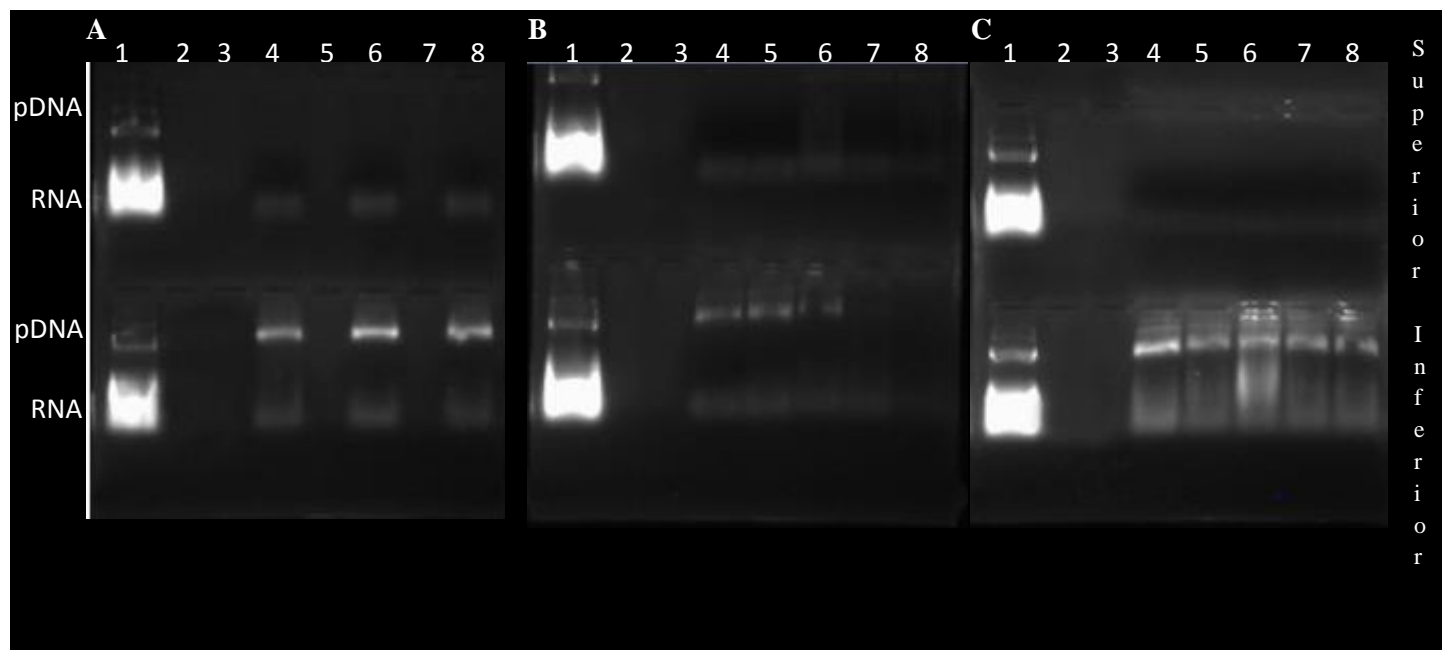


Figura 5.7 - Géis de agarose referentes à partição do lisado em sistemas PEG 300-citrato de sódio a pH 6,9 e 4,9. **A)** pH 6,9. Poços: (1) lisado da estirpe DH5 α ; (2), (3), (5) e (7) sem amostra; (4) sistema 16% (p/p) citrato de sódio e 34% (p/p) PEG 300; (6) sistema 17% (p/p) citrato de sódio e 36% (p/p) PEG 300; (8) sistema 18% (p/p) citrato de sódio e 38% (p/p) PEG 300. **B)** pH 6,9. Poços: (1) lisado da estirpe DH5 α ; (2) e (3) sem amostra; (4) sistema 19% (p/p) citrato de sódio e 40% (p/p) PEG 300; (5) sistema 20% (p/p) citrato de sódio e 42% (p/p) PEG 300; (6) sistema 21% (p/p) citrato de sódio e 44% (p/p) PEG 300; (7) sistema 22% (p/p) citrato de sódio e 46% (p/p) PEG 300; (8) sistema 23% (p/p) citrato de sódio e 48% (p/p) PEG 300. **C)** pH 4,9. Poços: (1) lisado da estirpe DH5 α ; (2) e (3) sem amostra; (4) sistema 15% (p/p) citrato de sódio e 42% (p/p) PEG 300; (5) sistema 16% (p/p) citrato de sódio e 44% (p/p) PEG 300; (6) sistema 17% (p/p) citrato de sódio e 46% (p/p) PEG 300; (7) sistema 18% (p/p) citrato de sódio e 48% (p/p) PEG 300; (8) sistema 19% (p/p) citrato de sódio e 50% (p/p) PEG 300.

para as diferentes fases. Este resultado promoveu a pesquisa de outros pontos nos diagramas de fases de PEG 400-citrato de sódio a pH 6,9 e pH 5,9. De facto a seleção destes novos sistemas resultou numa separação parcial das moléculas de RNA das moléculas de plasmídeo (Figura 5.6 B). Nos pontos 14% (p/p) citrato de sódio, 32% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 e 16% (p/p) citrato de sódio, 38% (p/p) PEG 400 a pH 5,9 é possível visualizar a presença de RNA na fase superior ainda que exista RNA na fase inferior. Na fase inferior, tal como nos demais sistemas já estudados, encontram-se as moléculas de plasmídeo. Apesar de ambos os sistemas apresentarem uma boa concentração de pDNA na fase do sal, o ponto 14% (p/p) citrato de sódio, 32% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 exibe uma maior concentração de RNA na fase superior e por consequência um maior fator de purificação. Daí este ponto ter sido selecionado para a purificação de pDNA em ensaios multi-estágio.

Depois de terminadas as experiências com PEG 400, estudou-se a partição de DNA plasmídico em sistemas PEG 300-citrato de sódio a pH 6,9. Foram selecionados três pontos referentes a três “tie-lines” com comprimentos distintos. Em todos os sistemas foi detetada a existência de RNA na fase superior rica em polímero, ainda que seja possível visualizar moléculas de ácido ribonucleico na fase inferior em conjunto com as moléculas de pDNA (Figura 5.7 A). Apesar de haver separação das moléculas de RNA das moléculas de plasmídeo, foram estudados outros pontos pertencentes a “tie-lines” mais afastadas da origem do diagrama de fases de modo a perceber se existe algum sistema que possua um fator de purificação mais elevado e uma maior concentração de plasmídeo. Em todos os novos pontos foi visualizado RNA na fase superior, contudo nos pontos 21% (p/p) citrato de sódio, 44% (p/p) PEG 300 a pH 6,9 e 23% (p/p) citrato de sódio, 48% (p/p) PEG 300 a pH 6,9 foi registrada a presença de DNA plasmídico na fase superior (Figura 5.7 B). Além disso, a

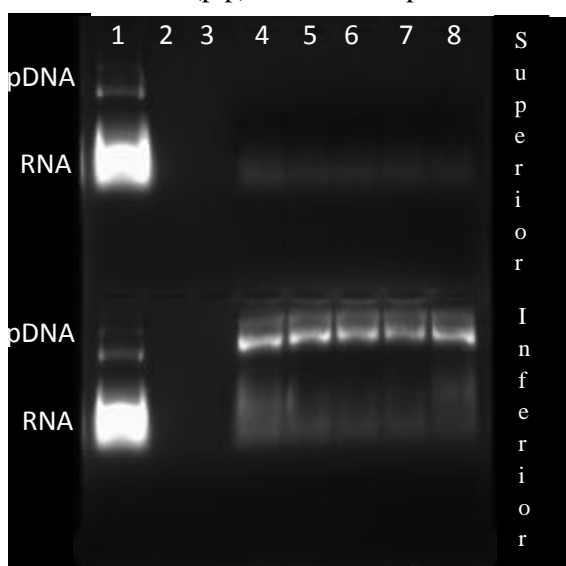


Figura 5.8 - Gel de agarose referente à partição do lisado em sistemas PEG 300-citrato de sódio a pH 5,9. Poços: (1) lisado da estirpe DH5 α ; (2) e (3) sem amostra; (4) sistema 15% (p/p) citrato de sódio e 37% (p/p) PEG 300; (5) sistema 16% (p/p) citrato de sódio e 39% (p/p) PEG 300; (6) sistema 17% (p/p) citrato de sódio e 41% (p/p) PEG 300; (7) sistema 18% (p/p) citrato de sódio e 43% (p/p) PEG 300; (8) sistema 19% (p/p) citrato de sódio e 45% (p/p) PEG 300.

concentração de plasmídeo na fase inferior destes sistemas era menor quando comparada com os sistemas que figuram no gel da Figura 5.7 A.

Os resultados com sistemas compostos por PEG 300-citrato de sódio a pH 6,9 não foram muito satisfatórios. Por isso, determinou-se as binodais para sistemas PEG 300-citrato de sódio mas agora para pH 5,9 e 4,9. Os vários pontos correspondentes a diferentes “tie-lines”

foram selecionados tendo em conta o diagrama de fases para pH 4,9. Na Figura 5.7 C parece não haver vestígios de RNA na fase superior dos diversos pontos. Isto quer dizer que a pH 4,9, os sistemas PEG 300-citrato de sódio são incapazes de separar as moléculas de RNA das moléculas de plasmídeo e por conseguinte inaptos para a purificação de pDNA. Assim sendo restava apenas estudar a partição dos ácidos nucleicos em sistemas PEG 300-citrato de sódio a pH 5,9. O gel

de agarose correspondente às amostras dos pontos a pH 5,9 está representado na Figura 5.8. Em todos os sistemas é possível registar a ocorrência de RNA na fase superior, demonstrando a capacidade destes sistemas para separar as moléculas de RNA das moléculas de plasmídeo. Apesar de ainda existir moléculas de RNA na fase inferior, é viável a utilização destes sistemas para a purificação de plasmídeo em ensaios multi-estágio e em contínuo visto que a presença de RNA na fase onde se alojam as moléculas de pDNA vai sendo cada vez menor à medida que se

aumenta o número de estágios. O ponto 15% (p/p) citrato de sódio, 37% (p/p) PEG 300 a pH 5,9 registou maior quantidade de plasmídeo na fase rica em sal. Assim sendo, os pontos 14% (p/p) citrato de sódio, 32% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 e 15% (p/p) citrato de sódio, 37% (p/p) PEG 300 a pH 5,9 foram selecionados para a purificação de plasmídeo em multi-estágio.

5.3.4. Purificação de plasmídeo em SDFA's líquidos iónicos-sal

Os líquidos iónicos são sais que, ao contrário de outros eletrólitos, são líquidos a baixas temperaturas (Oppermann *et al.*, 2011). Como sais que são, os líquidos iónicos podem ser utilizados para formar sistemas de duas fases aquosas.

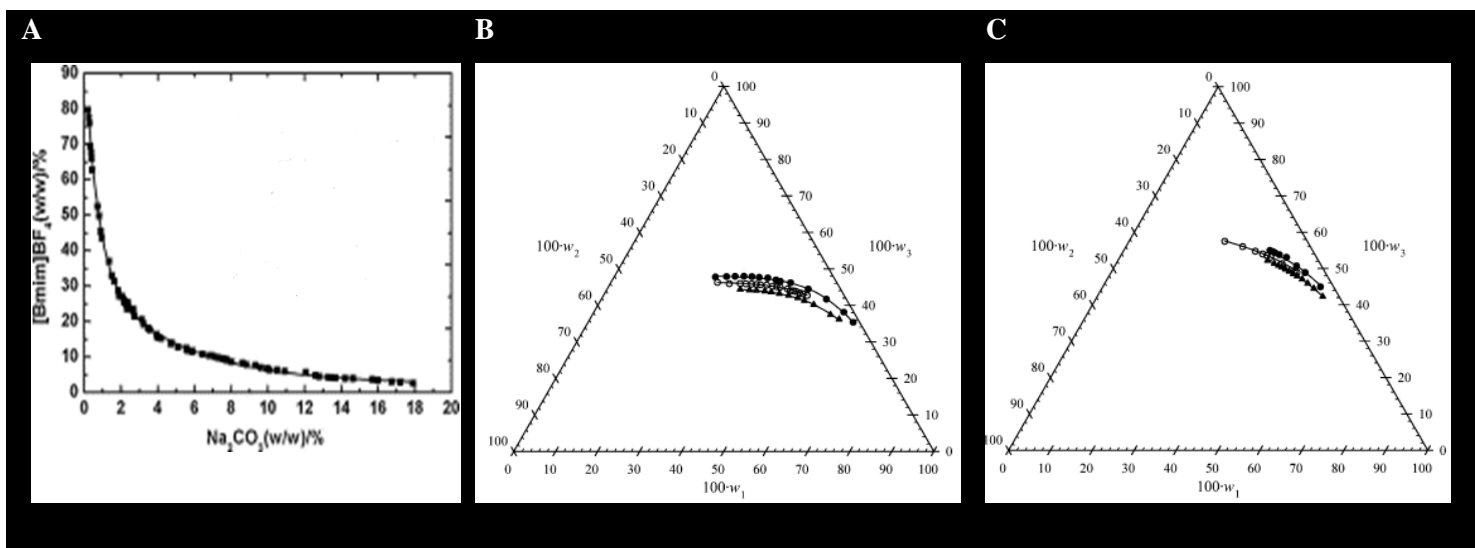


Figura 5.9 - Curvas binodais para os diferentes sistemas líquido iónico-sal. **A)** Diagrama de fases para SDFA's compostos por [Bmim]BF₄ + Na₂CO₃ + H₂O a 298.15 K. Esta binodal também foi utilizada para formar SDFA's formados por [Bmim]PF₆ + Na₂CO₃ + H₂O (Li *et al.*, 2009). **B)** Curva binodal para sistemas [C₄mim]Cl (1) + citrato de potássio (2) + H₂O (3) a diferentes temperaturas. ●, 278.15 K; ○, 298.15 K; ▲, 318.15 K (Zafarani-Moattar and Hamzehzadeh, 2010). **C)** Curva binodal para SDFA's [C₄mim]Br (1) + citrato de potássio (2) + H₂O (3) a diferentes temperaturas. ●, 278.15 K; ○, 298.15 K; ▲, 318.15 K (Zafarani-Moattar and Hamzehzadeh, 2010).

Uma das grandes vantagens destes líquidos é a capacidade de manipular as suas polaridades e afinidades modificando o núcleo catiónico ou aniónico que os compõem. Esta característica é de facto um grande benefício dada a reduzida polaridade de grande parte dos polímeros usados em SDFA's (Freire *et al.*, 2012). Além disso, o uso de líquidos iónicos é vantajoso uma vez que são menos viscosos que a maioria dos polímeros utilizados em sistemas de duas fases. A baixa viscosidade favorece a transferência de massa durante o processo de extração, assim como facilita a deslocação das fases nos microcanais de um sistema de microfluidos. E é de ressaltar que a maioria dos líquidos iónicos utilizados em SDFA's apresenta baixa toxicidade (Li *et al.*, 2010).

Terminadas as experiências de otimização com os sistemas PEG-citrato de sódio, iniciou-se o estudo da purificação das moléculas de plasmídeo em sistemas líquido iónico-sal. Os líquidos iónicos utilizados foram o [C₄mim]Br, [C₄mim]Cl, [C₄mim]PF₆ e o [C₄mim]BF₄. Ao contrário dos sistemas PEG-citrato de sódio, para estes sistemas não foram determinados os diagramas de fase. Para esse efeito foram utilizados os diagramas de fases que estão ilustrados na Figura

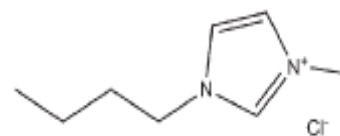


Figura 5.10 - Estrutura química do líquido iónico cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio ([C₄mim]Cl ou [Bmim]Cl) (Marques *et al.*, 2013).

5.9 B e C, respetivamente para os líquidos iónicos [C₄mim]Cl e [C₄mim]Br. Para os líquidos iónicos [C₄mim]PF₆ e o [C₄mim]BF₄, o diagrama de fases usado foi o que se encontra na Figura 5.9 A. Todos os componentes foram misturados de modo a que os diversos sistemas tivessem 1 grama.

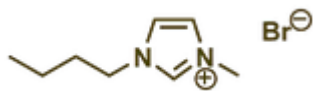


Figura 5.12 - Estrutura química do líquido iónico brometo de 1-butil-3-metilimidazólio ([C₄mim]Br ou [Bmim]Br) (retirado do website iolitec-usa.com).

Os primeiros líquidos iónicos a serem testados foram o [C₄mim]Cl e [C₄mim]Br. O sistema era composto por [C₄mim]Cl ou [C₄mim]Br, citrato de potássio, lisado alcalino de células DH5α e água. O lisado tinha concentração de 20% (p/p). Foram selecionados três pontos com diferentes comprimentos de “tie-line” para os dois líquidos iónicos. Nos sistemas [C₄mim]Cl-sal, o gel de agarose ilustrado na Figura 5.14 revelou a existência de

moléculas de RNA e pDNA na fase superior. Contudo, para as três amostras estudadas, também se registou a presença de moléculas de plasmídeo e RNA na fase inferior rica em sal. O facto de não se registar a partição de DNA plasmídico numa única fase impossibilitou o uso do líquido iónico [C₄mim]Cl para a purificação, uma vez que à medida que seriam removidas moléculas de RNA também se registaria a perda de moléculas de pDNA. Paralelamente, os sistemas [C₄mim]Br-sal revelaram

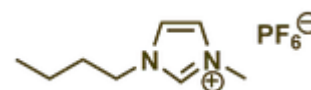


Figura 5.11 - Estrutura química do líquido iónico hexafluorofosfato de 1-Butil-3-metilimidazólio ([C₄mim]PF₆ ou [Bmim]PF₆) (retirado do website iolitec-usa.com).

capacidade para purificar moléculas de DNA plasmídico. Isto porque foi detetada a presença de RNA na fase superior enquanto o plasmídeo apresentou total partição na fase inferior. Na fase inferior das amostras também foi visualizada a existência de RNA em conjunto com pDNA.

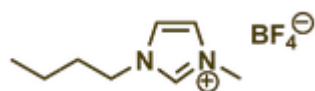


Figura 5.13 - Estrutura química do líquido iónico tetrafluoroborato de 1-Butil-3-metilimidazólio ([C₄mim]BF₄ ou [Bmim]PF₄) (retirado do website iolitec-usa.com).

Todavia, a porção de RNA que permaneceu na fase inferior rica em sal pode ser removida recorrendo a processos de purificação em multi-estágio ou contínuo. O sistema 36% (p/p) [C₄mim]Br e 16% (p/p) citrato de potássio foi selecionado para posterior purificação em multi-estágio visto ter sido o SDFA com maior concentração de DNA plasmídico.

Terminadas as experiências com [C₄mim]Cl e [C₄mim]Br, procedeu-se a novos ensaios de partição mas desta vez com os líquidos iónicos [C₄mim]PF₆ e [C₄mim]BF₄. Os sistemas eram compostos pelo respetivo líquido iónico, água e o carbonato de sódio (Na₂CO₃) foi o sal utilizado. Tal como anteriormente, o lisado bacteriano estava presente numa concentração de 20% (p/p). A visualização do gel de agarose (Figura 5.15) permitiu concluir que os sistemas compostos por estes dois líquidos iónicos não possibilitaram a separação das moléculas de plasmídeo das moléculas de RNA. Apesar das moléculas de pDNA se concentrarem na fase superior rica em líquido iónico, as moléculas de RNA também se lhes juntaram, impossibilitando a purificação de plasmídeo.

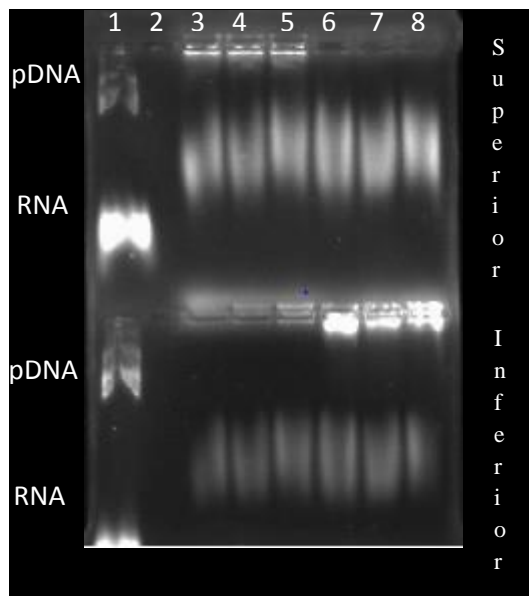


Figura 5.14 - Gel de agarose referente à partição do lisado em sistemas [C₄mim]Cl-citrato de potássio e [C₄mim]Br-citrato de potássio. Poços: (1) lisado alcalino de células DH5 α ; (2) sem amostra; (3) sistema 24% (p/p) citrato de potássio e 36% (p/p) [C₄mim]Cl; (4) sistema 26% (p/p) citrato de potássio e 36% (p/p) [C₄mim]Cl; (5) sistema 30% (p/p) citrato de potássio e 36% (p/p) [C₄mim]Cl; (6) sistema 16% (p/p) citrato de potássio e 36% (p/p) [C₄mim]Br; (7) sistema 20% (p/p) citrato de potássio e 36% (p/p) [C₄mim]Br; (8) sistema 24% (p/p) citrato de potássio e 36% (p/p) [C₄mim]Br.

O facto das experiências envolvendo sistemas de duas fases compostos por [C₄mim]Cl, [C₄mim]PF₆ e [C₄mim]BF₄ não terem resultado na purificação de pDNA pode ter sido, em certa medida, devido às interações estabelecidas entre as moléculas dos diferentes ácidos nucleicos e os diversos líquidos iónicos. Wang *et al.* sugeriram que o líquido iónico interage diretamente com as cadeias de DNA. Como a Figura 5.16 sugere, o catião [Bmim]⁺ tem uma forte tendência para atacar as ligações P-O dos grupos fosfato do DNA, uma vez que o átomo de oxigénio tem uma elevada densidade eletrónica. Como resultado, formou-se o aduto DNA-[Bmim]⁺ que possibilitou a concentração das moléculas de DNA na fase rica em líquido iónico (Wang *et al.*, 2007). Tal como descrito na literatura, o catião dos diversos líquidos iónicos também pode interagir com as ligações P-O dos grupos fosfato do DNA plasmídico. A formação do aducto pDNA-líquido iónico promove a concentração das moléculas de plasmídeo na fase superior rica em líquido iónico. Mas ao contrário dos investigadores, nas experiências decorridas utilizou-se uma matriz que além de conter pDNA também continha RNA entre outros contaminantes. E tal como as moléculas de plasmídeo, é provável que as moléculas de RNA também formem um aduto com o catião do líquido iónico, o que possibilitaria a aglomeração destas moléculas na fase superior em conjunto com o DNA plasmídico, e assim impedindo a separação e purificação das moléculas de plasmídeo.

No entanto, em sistemas [C₄mim]Br-citrato de potássio foi possível verificar a purificação parcial das moléculas de plasmídeo. O catião [Bmim]⁺ é estrutura comum a todos os líquidos iônicos utilizados neste trabalho. Por isso, a partição de ácidos nucleicos em sistemas líquido iônico-sal não é unicamente explicada tendo em consideração as interações estabelecidas entre

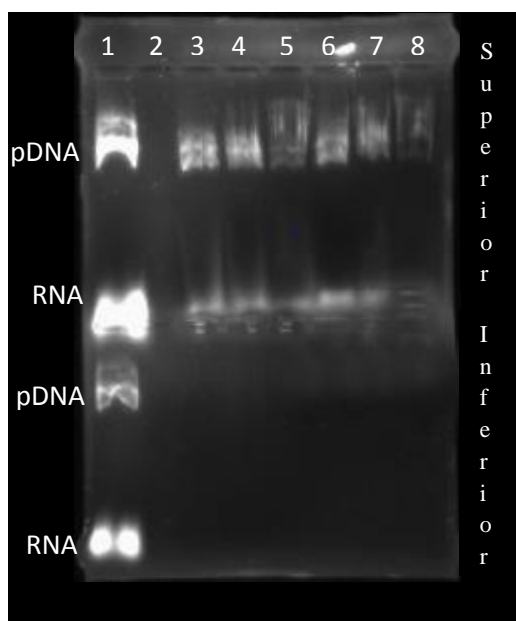


Figura 5.15 - Gel de agarose referente à partição do lisado em sistemas hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio-Na₂CO₃ e tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio-Na₂CO₃. Poços: (1) lisado alcalino de células DH5α; (2) sem amostra; (3) sistema 5% (p/p) Na₂CO₃ e 17% [C₄mim]PF₆ (p/p); (4) sistema 7% (p/p) Na₂CO₃ e 22% (p/p) [C₄mim]PF₆; (5) sistema 9% (p/p) Na₂CO₃ e 27% (p/p) [C₄mim]PF₆; (6) sistema 5% (p/p) Na₂CO₃ e 17% (p/p) [C₄mim]BF₄; (7) sistema 7% (p/p) Na₂CO₃ e 22% (p/p) [C₄mim]BF₄; (8) sistema 9% (p/p) Na₂CO₃ e 27% (p/p) [C₄mim]BF₄.

o catião [Bmim]⁺ e as cadeias dos ácidos nucleicos. A formação do aduto RNA-[Bmim]⁺ pode possibilitar a partição deste ácido nucleico na fase superior rica em líquido iônico. A formação do aduto pDNA-[Bmim]⁺ também poderá condicionar a distribuição das moléculas de plasmídeo na fase superior. Contudo, a formação do aduto não será o único condicionante na partição destas biomoléculas.

Os iões [PF₆]⁻, [BF₄]⁻, [Br]⁻ e [Cl]⁻ são a respetiva fração negativa dos líquidos iônicos hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio ([C₄mim]PF₆), tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio [C₄mim]BF₄, brometo de 1-butil-3-metilimidazólio ([C₄mim]Br) e cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio ([C₄mim]Cl). Num sistema, as duas fases são eletricamente neutras e de maneira a manter esta condição, o transporte de um ião de uma fase para a outra será acompanhado pela passagem de um ião de carga oposta (Albertsson, 1986). Assim, a passagem dos iões [PF₆]⁻, [BF₄]⁻, [Br]⁻ e [Cl]⁻ para a fase inferior é acompanhada pelo transporte do catião K⁺ (ião proveniente do citrato

de potássio) ou Na⁺ (proveniente do sal Na₂CO₃), dependendo do sistema em questão, para a fase superior.

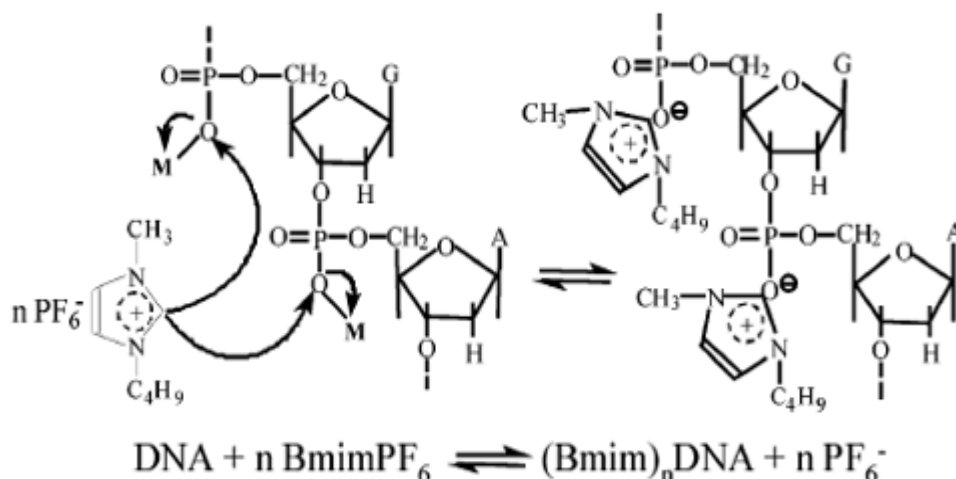


Figura 5.16 – Representação esquemática das interações estabelecidas entre o cátion [Bmim]⁺ e os grupos fosfato das cadeias de DNA durante a extração de DNA de dupla cadeia em sistemas compostos por [Bmim]PF₆ (Wang *et al.*, 2007).

Os aniões [PF₆]⁻, [BF₄]⁻ e [Cl]⁻ têm uma elevada densidade eletrónica. Estes iões têm tendência para atrair moléculas de água, diminuindo o número de moléculas de água disponíveis para solvatar as moléculas de RNA e de DNA plasmídico presentes na fase inferior dos sistemas líquido iónico-sal. Devido ao efeito de “salting-out”, as moléculas de plasmídeo e RNA migram para a fase superior onde já se encontram as moléculas de RNA e por consequência, os líquidos iónicos [Bmim]PF₆, [Bmim]BF₄ e [Bmim]Cl não possibilitam a purificação de plasmídeo.

Contrariamente, o anião [Br]⁻ possui uma menor densidade eletrónica que os iões falados anteriormente. Por conseguinte, a sua capacidade para atrair moléculas de água é menor. Este facto proporciona um maior número de moléculas de água disponíveis para solvatar as moléculas de pDNA e por isso a repulsão entre as biomoléculas e o anião é menor. Segundo a série de Hofmeister, o anião [Br]⁻ possui uma menor capacidade de “salting-out”. Este facto possibilita a permanência das moléculas de plasmídeo na fase inferior rica em sal. A formação do aduto RNA-[Bmim]⁺ proporcionou a partição das moléculas de RNA na fase superior, culminando na purificação de pDNA na fase inferior. Assim, é provável que a partição de ácidos nucleicos nos sistemas líquido iónico-sal estudados seja condicionada pela interação estabelecida entre o líquido iónico e as biomoléculas e, pelo efeito de repulsão causado pelos diferentes aniões constituintes dos líquidos iónicos.

5.3.5. Ensaio multi-estágio

O uso de sistemas de duas fases aquosas provou ser uma alternativa não cromatográfica para a concentração e purificação de DNA plasmídico. Todavia, a utilização de apenas um estágio não foi suficiente para separar a totalidade das moléculas de RNA das moléculas de pDNA. Assim, procedeu-se ao uso de vários estágios de SDFA's com o intuito de obter um elevado grau de pureza.

O processo de multi-estágio consistiu na sucessiva remoção da fase superior. À fase inferior, fase que contém as moléculas de plasmídeo, era adicionada uma nova fase superior composta apenas pelo polímero, o sal, água e as soluções utilizadas na lise celular. Os sistemas 15% (p/p) citrato de sódio, 37% (p/p) PEG 300 a pH 5,9; 14% (p/p) citrato de sódio, 32% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 e 36% (p/p) [C₄mim]Br, 16% (p/p) citrato de potássio foram os escolhidos para

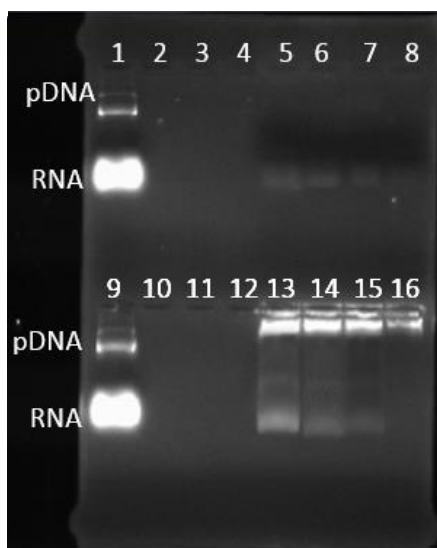


Figura 5.17 - Gel de agarose referente à partição do lisado num processo multi-estágio do sistema 15% (p/p) citrato de sódio e 37% (p/p) PEG 300 a pH 5,9. Poços: (1) e (9) lisado alcalino de células DH5 α ; (2), (3), (4), (10), (11) e (12) sem amostra; (5) fase superior do primeiro estágio; (6) fase superior do segundo estágio; (7) fase superior do terceiro estágio; (8) fase superior do quarto estágio; (13) fase inferior do primeiro estágio; (14) fase inferior do segundo estágio; (15) fase inferior do terceiro estágio com diluição; (16) fase inferior do quarto estágio.

a purificação de pDNA em multi-estágio. A escolha recaiu sobre estes sistemas porque, além de apresentarem um bom índice de recuperação de plasmídeo na fase inferior, revelaram a capacidade para separar as moléculas de RNA das moléculas de plasmídeo. Num processo multi-estágio é expectável a extração total ou maioritária dos contaminantes ao longo dos diferentes estágios.

No sistema com PEG 300 verifica-se a presença de RNA na fase superior (Figura 5.17). Nos três primeiros estágios é possível visualizar moléculas de RNA na fase inferior. Na fase inferior do quarto estágio não se verifica a presença de RNA na fase inferior onde se regista a partição das moléculas de plasmídeo. Isto significa que são necessários apenas quatro estágios para se obter amostras de plasmídeo sem contaminação de RNA. Verifica-se com o decorrer dos estágios a conseqüente diminuição da quantidade de RNA tanto na fase superior como na fase inferior. Isto resulta do facto de a fase superior, fase onde se regista a partição das moléculas de RNA, ser substituída por uma nova fase superior sem lisado em cada estágio.

Assim, os contaminantes que ainda subsistem na fase inferior vão sendo removidos com a sucessiva adição de novas fases superiores. É de ressaltar ainda que o sistema 15% (p/p) citrato de sódio, 37% (p/p) PEG 300 a pH 5,9 apresenta uma boa concentração de plasmídeo na fase inferior. A concentração de pDNA vai diminuindo com o

decorrer dos estágios porque foram retiradas amostras para realizar o gel de agarose. O volume retirado foi repostado por uma fase inferior sem lisado, daí a diminuição da concentração de plasmídeo.

A Figura 5.19 A representa o gel de eletroforese referente ao multi-estágio do ponto 14% (p/p) citrato de sódio, 32% (p/p) PEG 400 a pH 6,9. É visível a existência de RNA na fase superior dos três primeiros estágios. A quantidade de RNA diminui do 1º para o 3º estágio uma vez que o número de moléculas de RNA no sistema é cada vez menor, pois a fase superior que contém as biomoléculas de RNA é removida e substituída por uma nova fase sem lisado bacteriano. A partir do 4º estágio já não se visualiza a existência de RNA na fase superior e a análise da fase inferior relativa ao 7º estágio permite inferir que se conseguiu uma total remoção das moléculas de RNA da fase inferior. Assim, em apenas três estágios é possível obter plasmídeo sem contaminação de RNA. Comparativamente, é possível concluir que um processo de multi-estágio é mais eficaz que

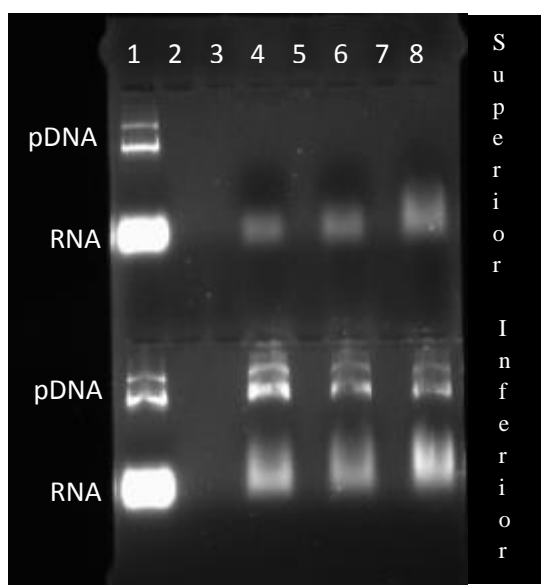


Figura 5.18 - Gel de agarose referente à partição do lisado em sistemas pertencentes à “tie-line” do ponto 14% (p/p) citrato de sódio e 32% (p/p) PEG 400 a pH 6,9. Poços: (1) lisado da estirpe DH5α; (2), (3), (5) e (7) sem amostra; (4) sistema 10% (p/p) citrato de sódio e 38% (p/p) PEG 400; (6) sistema 17% (p/p) citrato de sódio e 28,5% (p/p) PEG 400; (8) sistema 23% (p/p) citrato de sódio e 20% (p/p) PEG 400.

um único estágio em termos de remoção de contaminantes. Os resultados obtidos também confirmaram o facto do sistema escolhido poder ser utilizado futuramente para a purificação de plasmídeo em contínuo, visto que a adição descontínua de fase superior permitiu a total remoção das moléculas de RNA.

O ponto 14% (p/p) citrato de sódio e 32% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 revelou ser a melhor opção, referente aos sistemas polímero-sal, para a purificação de plasmídeo em contínuo. Para além de precisar de menos estágios para remover a totalidade das moléculas de RNA, apresenta maior quantidade de DNA plasmídico na fase inferior comparativamente ao sistema 15% (p/p) citrato de sódio, 37% (p/p) PEG 300 a pH 5,9. Os géis de agarose dos dois sistemas polímero-sal demonstra exatamente o contrário mas isto é explicado pelo facto de as amostras da fase

inferior no gel do ponto 14% (p/p) citrato de sódio e 32% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 terem uma diluição de 1:2 e 1:4 respetivamente. Contrariamente, no gel do sistema 15% (p/p) citrato de sódio, 37% (p/p) PEG 300 a pH 5,9 não se fez qualquer tipo de diluição.

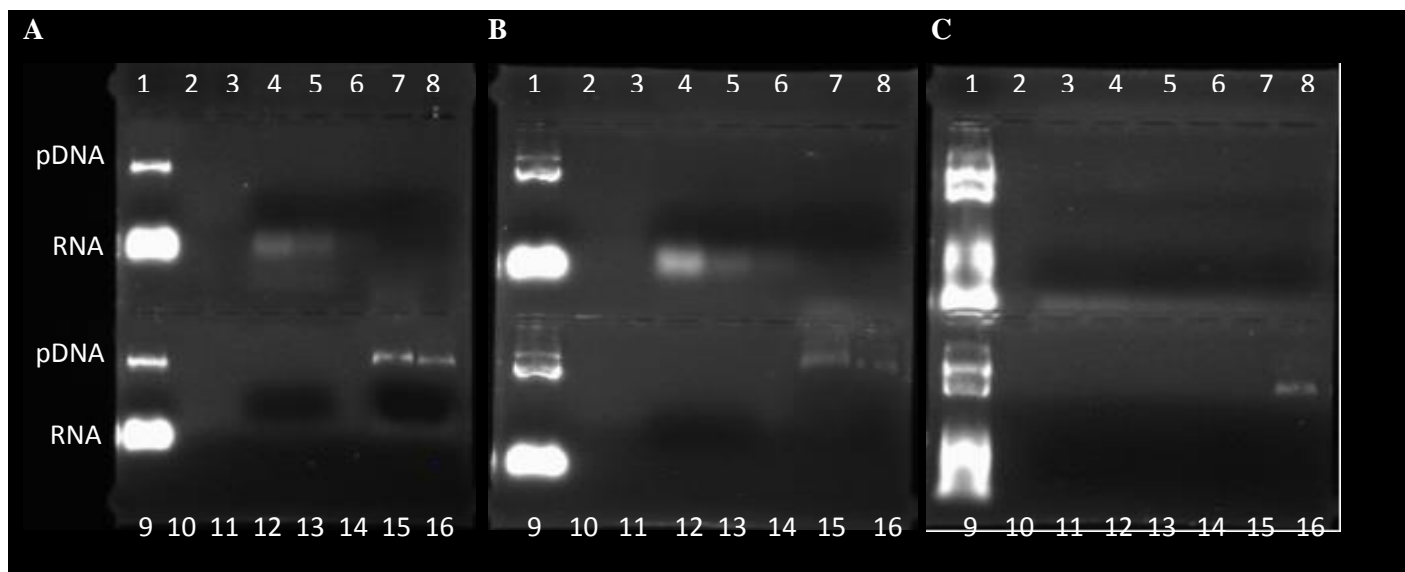


Figura 5.19 - Géis de agarose referentes à partição do lisado num ensaio multi-estágio em sistemas PEG 400-citrato de sódio a pH 6,9. **A)** Partição do lisado no sistema 14% (p/p) citrato de sódio, 32% (p/p) PEG 400. Poços: (1) e (9) lisado da estirpe DH5 α ; (2), (3), (10), (11) e (14) sem amostra; (4) fase superior do primeiro estágio; (5) fase superior do segundo estágio; (6) fase superior do terceiro estágio; (7) fase superior do quarto estágio; (8) fase superior do quinto estágio; (12) fase superior do sexto estágio; (13) fase superior do sétimo estágio; (15) fase inferior do sétimo estágio com diluição 1:2; (16) fase inferior do sétimo estágio com diluição 1:4. **B)** Partição do lisado no sistema 23% (p/p) citrato de sódio e 20% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 com lisado da estirpe DH5 α . Poços: (1) e (9) lisado; (2), (3), (10), (11) e (14) sem amostra; (4) fase superior do primeiro estágio; (5) fase superior do segundo estágio; (6) fase superior do terceiro estágio; (7) fase superior do quarto estágio; (8) fase superior do quinto estágio; (12) fase superior do sexto estágio; (13) fase superior do sétimo estágio; (15) fase inferior do sétimo estágio; (16) fase inferior do sétimo estágio com diluição 1:2. **C)** Partição do lisado no sistema 23% (p/p) citrato de sódio e 20% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 com lisado da estirpe DH5 α [acKA-pta] [poxB]. Poços: (1) e (9) lisado; (2) e (10) sem amostra; (3) fase superior do primeiro estágio; (4) fase superior do segundo estágio; (5) fase superior do terceiro estágio; (6) fase superior do quarto estágio; (7) fase superior do quinto estágio; (8) fase superior do sexto estágio; (11) fase superior do sétimo estágio; (12) fase superior do oitavo estágio; (13) fase superior do nono estágio; (14) fase superior do décimo estágio; (15) fase superior do décimo primeiro estágio; (16) fase inferior do décimo primeiro estágio com diluição 1:5.

O intuito de purificar plasmídeo em multi-estágio era perceber se seria possível remover a totalidade ou grande parte das moléculas de RNA da fase que continha plasmídeo e, se esse resultado fosse alcançado, proceder-se-ia futuramente à purificação contínua de pDNA em microescala. Em microescala, é importante que a razão volumétrica das fases seja de 1:1 ou até que o volume da fase rica em sal seja superior, visto que o fluxo de injeção da fase rica em sal é maior. Uma vez que o sistema 14% (p/p) citrato de sódio e 32% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 não contemplava esse requisito, procedeu-se à determinação da “tie-line” deste ponto de modo a encontrar um ponto com essa razão de fases (Figura 4.3 b)). Sistemas de duas fases que se encontram na mesma “tie-line” têm a mesma composição de fases, divergindo apenas nas razões volumétricas. Assim, e de acordo com a “tie-line” do ponto 14% (p/p) citrato de sódio e 32% (p/p) PEG 400 a pH 6,9, fez-se três sistemas situados em diferentes pontos da “tie-line” (Figura 5.18). O sistema composto por 23% (p/p) citrato de sódio, 20% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 foi o que apresentou uma razão de fase superior e fase inferior mais próxima de 1:1. Além disso, na Figura 5.18 é possível averiguar que é neste ponto onde se visualiza maior quantidade de RNA na fase

superior. Comparativamente aos outros sistemas, parece ter uma menor porção de DNA plasmídico. Isto pode ser explicado pelo facto de que neste sistema a fase inferior tem maior volume daí que a concentração de plasmídeo seja menor.

Apesar do sistema 23% (p/p) citrato de sódio e 20% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 ter a mesma composição de fases do ponto 14% (p/p) citrato de sódio e 32% (p/p) PEG 400 a pH 6,9, era necessário comprovar a mesma capacidade para remover as moléculas de RNA da fase inferior. Os géis de agarose referentes aos diversos estágios do ponto 23% (p/p) citrato de sódio e 20% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 com lisado alcalino da estirpe DH5 α e lisado alcalino da estirpe DH5 α [acKA-pta] [poxB] estão representados respetivamente nas Figuras 5.19 B e C. Tal como no gel análogo do ponto 14% (p/p) citrato de sódio e 32% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 (Figura 5.19 A), no quarto estágio do sistema 23% (p/p) citrato de sódio e 20% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 com lisado alcalino da estirpe DH5 α já não existe moléculas de RNA na fase superior. E a análise da fase inferior do sétimo estágio confirma a presença de DNA plasmídico sem contaminação de RNA. Em comparação, o ensaio multi-estágio com lisado alcalino da estirpe DH5 α [acKA-pta]

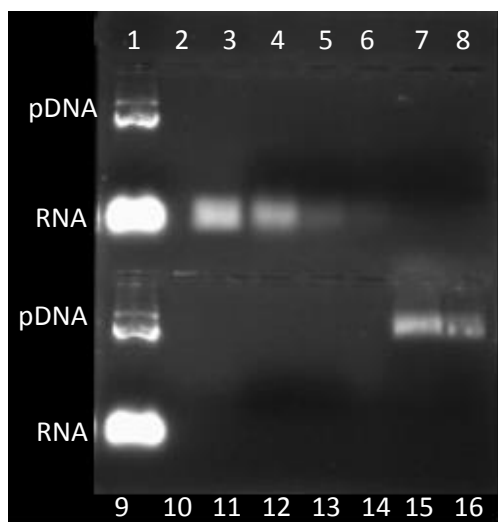


Figura 5.20 - Gel de agarose referente à partição do lisado num processo multi-estágio do sistema 16% (p/p) citrato de potássio e 36% (p/p) [C₄mim]Br. Poços: (1) e (9) lisado alcalino de células DH5 α ; (2), (10), (11), (12), (13) e (14) sem amostra; (3) fase superior do primeiro estágio; (4) fase superior do segundo estágio; (5) fase superior do terceiro estágio; (6) fase superior do quarto estágio; (7) fase superior do quinto estágio; (8) fase superior do sexto estágio; (15) fase inferior do sexto estágio; (16) fase inferior do sexto estágio com diluição 1:2.

36% (p/p) brometo de 1-butil-3-metilimidazólio. Tal como descrito acima, a fase superior foi constantemente substituída por uma nova fase superior sem lisado bacteriano.

[poxB] já requer mais estágios para remover as moléculas de RNA da fase inferior onde estão presentes as moléculas de DNA plasmídico. No entanto, a quantidade de plasmídeo e RNA é mais elevada do que no lisado alcalino da estirpe DH5 α . Isto porque esta estirpe foi concebida para produzir grandes quantidades de pDNA (2,1 gramas/litro), no entanto também revelou uma maior produção de RNA comparativamente à estirpe DH5 α . Apesar da maior quantidade de RNA, é possível verificar na Figura 5.19 C que as moléculas de pDNA presentes na fase inferior do décimo primeiro estágio estão igualmente sem contaminação de moléculas de RNA.

Terminados os estudos com sistemas polímero-sal, procedeu-se aos ensaios de multi-estágio com sistemas líquido iónico-sal. O ponto selecionado foi o 16% (p/p) citrato de potássio,

Na Figura 5.20 está ilustrado o gel de agarose correspondente às amostras dos sucessivos estágios do sistema 16% (p/p) citrato de potássio, 36% (p/p) [C₄mim]Br. É notória a presença de RNA na fase superior dos quatro primeiros estágios. A quantidade de RNA vai diminuindo com o decorrer dos estágios, tal como registado nos sistemas polímero-sal. Na fase superior do quinto estágio parece já não existir moléculas de RNA. Assim, em sistemas líquido iónico-sal são necessários quatro estágios para assegurar a obtenção de pDNA na fase inferior sem contaminação de RNA. Na fase inferior do sexto estágio pode visualizar-se a presença de pDNA sem aparente contaminação de RNA. Comparativamente com o ponto 23% (p/p) citrato de sódio, 20% (p/p) PEG 400 a pH 6,9, o sistema 16% (p/p) citrato de potássio, 36% (p/p) [C₄mim]Br necessita de mais um estágio para garantir a remoção das moléculas de RNA da fase inferior. No entanto, o sistema líquido iónico-sal parece apresentar maior quantidade de plasmídeo na fase inferior.

Os estudos realizados confirmaram que os pontos 23% (p/p) citrato de sódio, 20% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 e 16% (p/p) citrato de potássio, 36% (p/p) [C₄mim]Br seriam a melhor escolha para prosseguir para uma purificação em contínuo num dispositivo de microfluidos, visto que apresentam uma razão de fases apropriada e permitem a aparente remoção total das moléculas de RNA na fase inferior. Além disso, estes sistemas demonstraram boa capacidade de concentração de plasmídeo na fase inferior rica em citrato de sódio.

5.3.6. Quantificação proteica em sistemas polímero-sal e líquido iónico-sal

A produção de fármacos baseados em DNA plasmídico precisam de assegurar um elevado grau de pureza, tal como qualquer agente terapêutico. Depois de confirmada a remoção das moléculas de RNA, era necessário garantir que as proteínas presentes no lisado bacteriano tinham

sido removidas, de modo a não despoletar uma possível reação imunológica (Wiendhal *et al.*, 2012).

A quantificação proteica de amostras referentes a diferentes estágios dos sistemas 23% (p/p) citrato de sódio, 20% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 e 16% (p/p) citrato de potássio, 36% (p/p) [C₄mim]Br com lisado alcalino da estirpe DH5 α e lisado alcalino da estirpe DH5 α [acKA-ptA][poxB] foi realizada num espectrofotómetro de microplacas e a absorvância foi lida a 595 nm. Os resultados obtidos estão compilados na Tabela 5.2. A presença de proteínas na fase inferior do último estágio de cada amostra é nula ou tão ínfima que se torna indetetável por este

método de quantificação. A análise das fases superiores do primeiro estágio dos vários sistemas confirma a presença de proteínas nessas fases. Contudo, nas fases inferiores do primeiro estágio ainda estão presentes contaminantes proteicos. Isto quer dizer que ao longo dos diversos estágios as proteínas vão sendo extraídas para a fase superior, sendo que o DNA plasmídico fica retido na fase inferior. Ao longo dos estágios vão registrar-se cada vez menos proteínas na fase inferior até culminar na presença de pDNA livre de proteínas e ácidos ribonucleicos.

A análise da partição proteica em sistemas polímero-sal já havia sido anteriormente estudada. Um dos fatores com maior preponderância na partição de compostos em sistemas PEG-citrato é o peso molecular do polímero. Estudos anteriores mostraram que o coeficiente de

Tabela 5.2 – Quantificação proteica das fases superiores e inferiores relativas ao primeiro e último estágio dos diferentes sistemas selecionados para futura purificação de plasmídeo em modo contínuo. Todos os sistemas continham 20% (p/p) de lisado alcalino das estirpes DH5 α e DH5 α [acKA-pta] respetivamente.

Lisado	Sistemas	Fase superior do 1º estágio	Fase inferior do 1º estágio	Fase inferior do último estágio
Lisado alcalino de DH5 α	23% (p/p) NaCitrato e 20% (p/p) PEG 400	75 $\mu\text{g/ml}$	43,0657 $\mu\text{g/ml}$	0 $\mu\text{g/ml}$
	16% (p/p) citrato de potássio e 36 % (p/p) [C ₄ mim]Br	63,5476 $\mu\text{g/ml}$	37,6248 $\mu\text{g/ml}$	0 $\mu\text{g/ml}$
Lisado alcalino de DH5 α [acKA-pta]	23% (p/p) NaCitrato e 20% (p/p) PEG 400	58, 6861 $\mu\text{g/ml}$	31,1111 $\mu\text{g/ml}$	0 $\mu\text{g/ml}$

partição das proteínas diminui com o aumento do peso molecular do PEG (Marcos, 2000). A presença de proteínas na fase superior em sistemas PEG-citrato de sódio pode ser explicada pelas interações hidrofóbicas estabelecidas entre estas e as moléculas de polímero (Rahimpour *et al.*, 2006). O aumento do peso molecular do polímero resulta num menor número de grupos hidroxilo, o que aumenta a hidrofobicidade da fase superior. Sendo a superfície da maioria das proteínas predominantemente hidrófila, a sua afinidade para a fase superior diminui. Outro efeito adjacente ao aumento do peso molecular do PEG é a diminuição do espaço livre na fase superior. Sendo o volume das proteínas apreciável, isto implica uma maior dificuldade de partição na fase rica em polímero (Eiteman and Gainer, 1989). As proteínas distribuem-se predominantemente na fase superior para PEG's com pesos moleculares compreendidos entre 200 e 600. As moléculas de plasmídeo permanecem na fase inferior rica em sal (Ribeiro *et al.*, 2002). Além disso, a pH 6,9

há um aumento da concentração de citrato trivalente, resultando num efeito de “salting-out” na fase inferior rica em sal e direcionando as proteínas para a fase superior (Rahimpour *et al.*, 2006).

A partição de proteínas na fase superior de sistemas líquido iônico-sal já havia sido descrita anteriormente. Dreyer e Kragl retrataram a partição de diferentes proteínas num sistema composto pelo líquido iônico AmmoengTM 110 e o tampão K_2HPO_4/KH_2PO_4 (Dreyer and Kragl, 2008). A partição de quatro proteínas modelo (albumina de soro bovino, lisozima, tripsina e mioglobina) foi estudada a diferentes valores de temperatura e pH. Os autores sugeriram que as interações eletrostáticas entre os resíduos de aminoácidos carregados negativamente na superfície das proteínas e o catião do líquido iônico são o fator determinante para ocorrer a partição proteica na fase superior rica em líquido iônico (Dreyer and Kragl, 2009). Zhuo *et al.* extraíram a proteína albumina de soro bovino em sistemas $[C_4mim]Cl-K_2HPO_4$. Os autores identificaram as interações eletrostáticas entre a estrutura catiónica do líquido iônico e a superfície negativa da proteína como fator preponderante para a sua partição na fase superior rica em $[C_4mim]Cl$. O aumento da concentração de K_2HPO_4 na fase inferior provoca um efeito de “salting-out” que induz a distribuição da proteína na fase superior. De acordo com os autores, o efeito de “salting-out” e as interações eletrostáticas são a principal causa para a partição da proteína na fase superior rica em líquido iônico (Zhuo *et al.*, 2007).

7 – Conclusões e Trabalho Futuro

Os resultados obtidos neste estudo apontam para o facto dos sistemas polietilenoglicol-citrato de sódio e [C₄mim]Br-citrato de potássio poderem ser utilizados como primeiro passo num processo de purificação de DNA plasmídico, tanto em macro como em microescala. A simplicidade e facilidade de aumento de escala destes sistemas e o elevado fator de purificação inerente tornam muito apetecível a implementação dos sistemas de duas fases aquosas como método de purificação. Além disso, o uso de citrato de sódio e [C₄mim]Cl reduz a toxicidade dos efluentes associados ao processo. Numa altura em que é notória a necessidade de implementação de processos industriais pouco poluentes, esta é sem dúvida uma grande vantagem comparativamente a outros métodos.

Em termos fundamentais, este trabalho experimental também permitiu retirar importantes ilações. A nível da caracterização dos sistemas polietilenoglicol-citrato de sódio foi possível verificar que a formação de duas fases é potenciada pelo aumento do peso molecular do PEG e do pH. As linhas binodais apresentaram estruturas semelhantes à de outros sistemas descritos na literatura. O efeito de “salting-out” do PEG proporcionado pelo citrato contribuiu para a formação das duas fases. Assim, além de serem precisas menores concentrações de polímero e sal para a formação de duas fases, este sistema também demonstrou uma boa seletividade para as moléculas de plasmídeo.

A purificação de moléculas de DNA plasmídico em sistemas PEG 300-citrato de sódio e PEG 400-citrato de sódio é estritamente dependente da razão citrato divalente/citrato trivalente presente em solução. Isto porque com o aumento do pH há um incremento de aniões trivalentes em relação a aniões divalentes, culminando num maior efeito de “salting-out”. Devido ao efeito de “salting-out”, algumas moléculas de RNA migram para a fase superior rica em PEG. Contudo, as moléculas de plasmídeo registam partição na fase inferior do sistema polímero-sal. Este fenómeno pode ser explicado pelo facto de que com o aumento das cadeias de PEG, moléculas individuais de polímero interagem entre si formando uma espécie de malha cujo tamanho dos espaços podem ser suficientemente grandes para albergar moléculas de RNA, mas não o suficiente para acomodar as moléculas de pDNA de maior dimensão. Daí que estas últimas têm distribuição na fase inferior.

Em sistemas líquido iónico-sal, a purificação de plasmídeo é dependente das interações electrostáticas estabelecidas entre as moléculas de ácido nucleico e o núcleo catiónico do líquido iónico e, do efeito de “salting-out” proporcionado pelo anião que compõem os diferentes líquidos iónicos. Os sistemas com [C₄mim]Cl, [C₄mim]PF₆ e [C₄mim]BF₄ não demonstraram capacidade para separar as moléculas de RNA das moléculas de pDNA. Este facto pode ser explicado pelo efeito de “salting-out” proporcionado pelos aniões presentes na estrutura do líquido iónico. De maneira a manter a neutralidade eléctrica das duas fases, o transporte dos aniões [PF₆]⁻, [BF₄]⁻,

$[\text{Br}]^-$ ou $[\text{Cl}]^-$ para a fase do sal é acompanhado pela passagem do catião presente na estrutura do sal para a fase superior. Os iões $[\text{PF}_6]^-$, $[\text{BF}_4]^-$ e $[\text{Cl}]^-$ têm uma elevada densidade eletrónica. Estes aniões têm uma grande tendência para atrair moléculas de água, diminuindo o número de moléculas de água disponíveis para solvatar as moléculas de RNA e pDNA presentes na fase inferior. Devido ao efeito de “salting-out” causado pelos aniões e às interações estabelecidas entre os ácidos nucleicos e o núcleo catiónico do líquido iónico ($[\text{Bmim}]^+$), as moléculas de RNA e pDNA migram para a fase rica em líquido iónico.

O sistema $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Br}$ -citrato de potássio foi o único sistema líquido iónico-sal que permitiu a purificação de pDNA. O anião $[\text{Br}]^-$ presente na fase inferior possui uma densidade eletrónica menor, pelo que a sua capacidade para atrair moléculas de água é mais reduzida. Assim, o maior número de moléculas de água disponíveis para solvatar as moléculas de plasmídeo é maior, possibilitando a partição destas biomoléculas na fase inferior rica em sal. A formação do aduto RNA- $[\text{Bmim}]^+$ e a repulsão, ainda que reduzida, causada pelos iões $[\text{Br}]^-$ proporciona a distribuição de RNA na fase superior.

Apesar de ocorrer a partição de RNA na fase superior, ainda se registou a presença destas moléculas na fase inferior onde se encontram as moléculas de plasmídeo. De maneira a obter pDNA com elevado grau de pureza, procedeu-se ao uso de vários estágios onde a fase inferior foi mantida e a fase superior foi substituída. O processo de multi-estágio dos sistemas PEG-citrato de sódio e $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Br}$ -citrato de potássio demonstrou grande capacidade para remover a totalidade ou grande percentagem das moléculas de RNA da fase inferior.

O sistema PEG 400-citrato de sódio revelou ser a melhor opção referente aos sistemas polímero-sal para a purificação de plasmídeo. Para além de serem necessários menos estágios para remover a totalidade das moléculas de RNA, apresenta maior quantidade de DNA plasmídico na fase inferior comparativamente ao sistema PEG 300-citrato de sódio. Assim, os sistemas selecionados para futura purificação de plasmídeo de modo contínuo em dispositivos de microfluidos foram: 23% (p/p) citrato de sódio, 20% (p/p) PEG 400 a pH 6,9 e 16% (p/p) citrato de potássio, 36% (p/p) $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Br}$. Para além de assegurarem a remoção das moléculas de RNA da fase inferior, estes dois sistemas também asseguram a eliminação dos contaminantes proteicos presentes nesta fase.

Embora a utilização de sistemas de duas fases em descontínuo tenha demonstrado a capacidade de eliminar as moléculas de RNA e contaminantes proteicos, o desenvolvimento de um processo de purificação contínuo poderá revelar-se mais viável economicamente. A aplicação destes sistemas a um processo contínuo poderá ser uma hipótese de trabalho futuro.

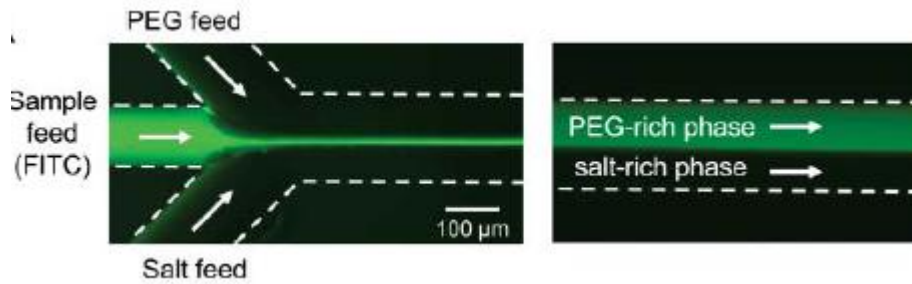


Figura 7.1 - Partição de analitos fluorescentes num microcanal com entrada tripla. A amostra é injetada no canal do meio, estando rodeada pelas soluções de PEG e sal. Nesta sequência de fotografias estão representadas sequencialmente a entrada tripla do dispositivo de microfluidos (imagem à esquerda). A imagem à direita retrata uma região a meio do microcanal onde se registará a partição diferencial dos diversos solutos para cada uma das fases (adaptado de Meagher *et al.*, 2008).

Os sistemas de microfluidos tiveram um grande impacto na ciência devido à miniaturização de sistemas analíticos complexos. As vantagens de utilizar estes micro-chips são elucidativas: reduzida quantidade de amostra e reagentes necessários, elevado rendimento e facilidade de transporte devido às pequenas dimensões. A configuração de um sistema de duas fases integrado num dispositivo de microfluidos está descrita na Figura 7.1. A figura demonstra a partição de analitos fluorescentes nesse dispositivo. O lisado bacteriano é injetado na entrada do meio de modo a que haja a partição das diferentes biomoléculas para as soluções adjacentes, de acordo com as suas afinidades para cada uma das fases. A fase rica em PEG ou $[C_4mim]Br$ é injetada na primeira entrada. Nesta fase irá registar-se a partição das moléculas de RNA e dos contaminantes proteicos. Na última entrada, será inserida a fase rica em sal, onde se registará a partição das moléculas de plasmídeo. As três entradas unem-se e dão acesso a um canal que deverá ter o comprimento suficiente para que a partição das diferentes biomoléculas seja atingida. No final do canal, as duas fases serão recuperadas, sendo que na fase rica em PEG ou $[C_4mim]Br$ estarão presentes as moléculas de RNA e proteínas enquanto na fase rica em sal estarão as moléculas de pDNA (Figura 7.2).

A purificação de DNA tem conhecido nos dias de hoje um grande desenvolvimento e inúmeras aplicações medicinais, sendo uma delas a terapia génica. A modernização das técnicas de isolamento, purificação e análise

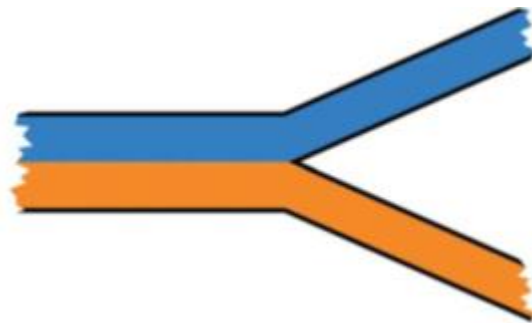


Figura 7.2 - Separação das soluções num canal com saída bifurcada (adaptado de Hardt *et al.*, 2012).

de DNA fomentam uma rápida e mais barata preparação de amostras. Tendo em consideração esse objectivo, a tecnologia de microfluidos pode dar um enorme contributo, uma vez que os protocolos tradicionais de extracção de DNA podem ser melhorados com o uso de dispositivos mais rápidos e pequenos. A possível integração de um processo de homogeneização celular e posterior purificação das moléculas de DNA plasmídico no mesmo micro-chip seria um avanço

considerável. Outra possibilidade seria a integração de processos de amplificação de DNA por PCR (Morales *et al.*, 2010). Sundberg *et al.* amplificaram um plasmídeo com 300 pares de bases (Sundberg *et al.*, 2010). Mahalanabis *et al.* desenharam um dispositivo para posterior detecção de bactérias (utilizaram a espécie *Bacillus subtilis*). O sistema de microfluidos era capaz de proceder à lise celular, purificação dos ácidos nucleicos, PCR e detecção por fluorescência (Mahalanabis *et al.*, 2010).

Os sistemas de duas fases aquosas garantem um fácil e viável aumento de escala com um modo de funcionamento em contínuo (Rosa *et al.*, 2012). Para processos de purificação industrial, os sistemas PEG-sal são os mais utilizados devido ao seu baixo custo, reduzida viscosidade e grande estabilidade para diversos valores de pH (Rosa *et al.*, 2012). As colunas utilizadas na extracção líquido-líquido podem ser adaptadas para processos de purificação em sistemas de duas fases aquosas. As colunas empacotadas têm uma reduzida dispersão axial e uma elevada eficácia na transferência de massa devido a uma maior área de contacto com a amostra (Figura 7.3). O material seleccionado para empacotar a coluna deve ser escolhido de modo a aumentar a transferência de massa do soluto (Rosa *et al.*, 2012). O desempenho de uma coluna empacotada para a extracção de imunoglobina G (IgG) em sistemas de duas fases aquosas num processo contínuo, foi avaliado nos estudos efectuados por Rosa *et al.* A fase rica em PEG foi escolhida como fase dispersa e aço inoxidável foi o material seleccionado para empacotar a coluna. Foi obtido uma taxa de recuperação de IgG de

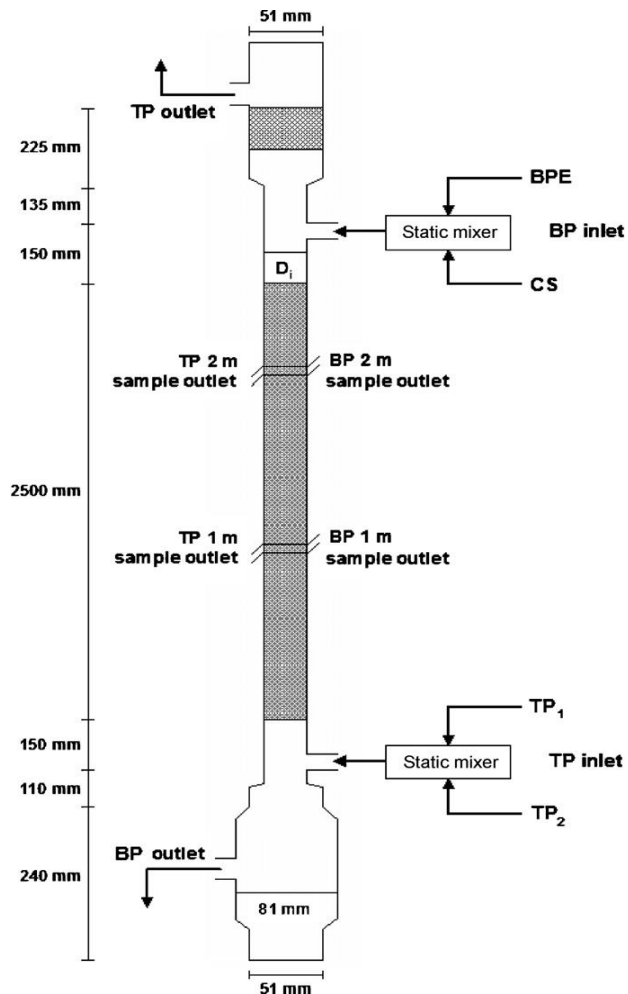


Figura 7.3 - Desenho esquemático de uma coluna empacotada com um diâmetro de 30 milímetros. A coluna possui uma área de contacto para a amostra de 707 mm². É composta por nove secções diferentes, cinco das quais apresentam uma altura de 0.5 metros. O material de empacotamento é aço inoxidável. A coluna é manuseada a temperatura ambiente e de um modo contínuo, onde a fase rica em PEG está continuamente a ser dispersa para a parte inferior da coluna. A fase rica em fosfato é adicionada na parte superior da coluna, mas vai migrando para a secção inferior da mesma. A amostra a purificar terá de ser adicionada juntamente com umas das fases (Rosa *et al.*, 2012).

85% e a remoção de cerca de 50% de contaminantes totais e mais de 85% de contaminantes proteicos foram removidos (Rosa *et al.*, 2012).

O estudo da purificação de moléculas de plasmídeo em macroescala poderia iniciar-se numa coluna como a descrita na Figura 7.3. Teriam de ser estudadas as condições ideais para seleccionar um sistema de duas fases aquosas para ser empregue na purificação de pDNA. Para além das condições inerentes ao sistema de duas fases, também teriam de ser relacionadas as condições óptimas relativas à coluna onde ocorreria a purificação de plasmídeo, nomeadamente o material de empacotamento e os fluxos de injeção das fases. O grau de pureza do plasmídeo obtido também teria de ser determinado, visto que para aplicações terapêuticas é necessário um nível de pureza superior a 99%. A possibilidade de implementação industrial de sistemas de duas fases como método de purificação de biofármacos poderia ter uma enorme significância tanto na quantidade como no custo de produção.

Referências

Albertsson, P. A. (1986) Partition of cell particles and macromolecules. 3rd ed. John Wiley and Sons, New York.

Ananthapadmanabhan, K. P.; Goddard, E. D. (1987) Aqueous biphasic formation in polyethyleneoxide-inorganic salt systems. *Langmuir*, 3: 25-31.

Atha, D. H.; Ingham, K. C. (1981) Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume. *The Journal of Biological Chemistry*, 256: 12108-12117.

Barbosa, H. S. C.; Marcos, J. C. (2010) Plasmid purification, therapeutic applications. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*.

Bentley, R.; Meganathan, R. (1982) Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 46: 241-280.

Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. (2002) Biochemistry. 5th ed. W. H. Freeman, New York.

Blattner, F. R.; Plunkett, G.; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B.; Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277: 1453-1462.

Boshart, M.; Weber, F.; Jahn, G.; Dorsch-Häsler, K.; Fleckenstein, B.; and Schaffner, W. (1985) A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of Human Cytomegalovirus. *Cell*, 41: 521-530.

Bridges, N. J.; Gutowski, K. E.; Rogers, R. D. (2007) Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt-salt ABS). *Green Chemistry*, 9: 177-183.

Brooks, D. E.; Sharp, K. A. (1985) Theoretical aspects of partitioning. In: Partitioning in aqueous two-phase systems edited by Walter, H.; Brooks, D. E.; Fisher, D. 1st ed. Academic Press Inc, Orlando.

Cano, T.; Murphy, J. C.; Fox, G. E.; Wilson, R. C. (2005) Separation of Genomic DNA from Plasmid DNA by Selective Renaturation with Immobilized Metal Affinity Capture. *Biotechnol. Prog.*, 21: 1472-1477.

Carnes, A. E.; Hodgson, C. P.; Luke, J. M.; Vincent, J. M.; Williams, J. A. (2009) Plasmid DNA Production Combining Antibiotic-Free Selection, Inducible High Yield Fermentation, and Novel Autolytic Purification. *Biotechnology and Bioengineering*, 104: 505-515.

Carnes, A. E.; Luke, J. M.; Vincent, J. M.; Anderson, S.; Schukar, A.; Hodgson, C. P.; Williams, J. A. (2010) Critical design criteria for minimal antibiotic-free plasmid vectors necessary to combine robust RNA Pol II and Pol III-mediated eukaryotic expression with high bacterial production yields. *Journal of gene medicine*, 12: 818-831.

Carnes, A. E.; Williams, J. A. (2007) Plasmid DNA manufacturing technology. *Recent Patents on Biotechnology*, 1: 151-166.

Castellani, A.; Chalmers, A. J. (1919) Manual of Tropical Medicine. 3rd ed. Williams Wood and Co, New York.

Cooper, G. M. (2000) The cell: a molecular approach. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

De Togni, P.; Fox, H. B.; Mornissey, S.; Tansey, S. B.; Levy, S. B.; Babior, B. M. (1988) Plasmids in bacteria exposed to activated neutrophils mediate mutagenesis when transferred to new hosts. *Blood*, 71: 463-466.

Dreyer, S.; Kragl, U. (2008) Ionic liquids for aqueous two-phase extraction and stabilization of enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, 99: 1416-1424.

Dreyer, S.; Kragl, U. (2009) Driving forces of protein partitioning in an ionic liquid-based aqueous two-phase system. *Biochemical Engineering Journal*, 46: 176-185.

Duarte, S. P.; Fortes, A. G.; Prazeres, D. M. F.; Marcos, J. C. (2007) Preparation of plasmid DNA polyplexes from alkaline lysates by a two-step aqueous two-phase extraction process. *Journal of Chromatography A*, 1164: 105 – 112.

Durfee, T.; Nelson, R.; Baldwin, S.; Plunkett, G.; Burland, V.; Mau, B.; Petrosino, J. F.; Qin, X.; Muzny, D. M.; Avelle, M.; Gibbs, R. A.; Csörgo, B.; Pósfai, G.; Weinstock, G. M.; Blattner, F. R. (2008) The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *Journal of Bacteriology*, 190: 2597-2606.

Eiteman, M. A.; Gainer, J. L. (1989) The effect of free-volume changes on partitioning in magnesium sulfate-poly(ethylene glycol) aqueous two-phase systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 992: 125-127.

Franco, T. T.; Andrews, A. T.; Asenjo, J. A.; (1996) Use of chemically modified proteins to study the of a single protein property on partitioning in aqueous two-phase systems: effect of surface charge. *Biotechnology and Bioengineering*, 49: 309-315.

Freire, M. G.; Cláudio, A. F. M.; Araújo, J. M. M.; Coutinho, J. A. P.; Marrucho, I. M.; Lopes, J. N. C.; Rebelo, L. P. N. (2012) Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids. *Chemical Society Reviews*, 41: 4966-4995.

Frerix, A.; Schönewald, M.; Geilenkirchen, P.; Müller, M.; Kula, M. R.; Hubbuch, J. (2006) Exploitation of the Coil-Globule Plasmid DNA Transition Induced by Small Changes in Temperature, pH Salt, and Poly(ethylene glycol) Compositions for Directed Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. *Langmuir*, 22: 4282-4290.

Ginn, S. L.; Alexander, I. E.; Edelstein, M. L.; Abedis, M. R.; Wixon, J. (2013) Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *The Journal of Gene Medecine*, 15: 65-77.

Goodwin, E. C.; and Rottman, F. M. (1992) The 3'-flanking sequence of the bovine growth hormone gene contains novel elements required for efficient and accurate polyadenylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 16330-16334.

Guan, Y.; Lilley, T. H.; Treffry, T. E. (1993) A new excluded volume theory and its application to the coexistence curves of aqueous polymer two-phase systems. *Macromolecules*, 26: 3971-3979.

Hardt, S.; Hahn, T. (2012) Microfluidics with aqueous two-phase systems. *Lab Chip*, 12: 434-442.

Hudault, S.; Guignot, J.; Servin, A. (2001) *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *GUT*, 49: 47-55.

Huddleston, J. G.; Ottomar, K. W.; Ngonyani, D. M.; Lyddiatt, A. (1991) Influence of system and molecular parameters upon fractionation of intracellular proteins from *Saccharomyces* by aqueous two-phase partition. *Enzyme and Microbial Technology*, 13: 24-32.

Ingledeu, W. J.; Poole, R. K. (1984) The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 48: 222-271.

Jiang, Y.; Rabbi, M.; Mieczkowski, P. A.; Marszalek, P. E. (2010) Separating DNA with different topologies by atomic force microscopy in comparison with gel electrophoresis. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114: 12162-12165.

Kawashima, H.; Horii, T.; Ogawa, T.; Ogawa, H. (1984) Functional domains of *Escherichia coli* recA protein deduced from the mutational sites in the gene. *Molecular and General Genetics*, 193: 288-292.

Kepka C. (2004) Integration of Aqueous Two-Phase Systems into Recovery Processes for Biomolecules. University of Lund, Sweden.

Lederberg, J. (1952) Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiology Reviews*, 32: 403-430.

Li, C. X.; Han, J.; Wang, Y.; Yan, Y. S.; Xu, X. H.; Pan, J. M. (2009) Extraction and mechanism investigation of trace roxithromycin in real water samples by use of ionic liquid-salt aqueous two-phase system. *Analytica Chimica Acta*, 653: 178-183.

Li, Z.; Pei, Y.; Wang, H.; Fan, J.; Wang, J. (2010) Ionic liquid-based aqueous two-phase systems and their applications in green separation processes. *Trends in Analytical Chemistry*, 29: 1336-1346.

Lif, T.; Frick, G.; Albertsson, P. –A. (1961) Fractionation of nucleic acids in aqueous polymer two-phase systems. *Journal of Molecular Biology*, 3:727-740.

Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S. L. (2000) *Molecular Cell Biology*. 4th ed. W.H. Freeman, New York.

Lukjancenko, O.; Wassenaar, T. M.; Ussery, D. W. (2010) Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microbial Ecology*, 60: 708-720.

Mahalanabis, M.; Do, J.; Al Muayad, H.; Zhang, J. Y.; Klapperich, C. M. (2010) An integrated disposable device for DNA extraction and helicase dependent amplification. *Biomed Microdevices*, 12: 353-359.

Marcos, J. C. (2000) Partição e purificação de penicilina acilase em sistemas de duas fases aquosas. Tese de Doutorado, Universidade do Minho.

Marcos, J. C.; Fonseca, L. P.; Ramalho, M. T.; Cabral, J. M. (1999) Partial purification of penicillin acylase from *Escherichia coli* in poly(ethylene glycol)-sodium citrate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 734: 15-22.

Marques, C. F. C.; Mourão, T.; Neves, C. M. S. S.; Lima, A. S.; Boal-Palheiros, I.; Coutinho, J. A. P.; Freire, M. G. (2013) Aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and

sodium carbonate as enhanced routes for the extraction of tetracycline. *Biotechnology Progress*, 29: 645-654.

Meagher, R. J.; Light, Y. K.; Singh, A. K. (2008) Rapid, continuous purification of proteins in a microfluidic device using genetically-engineered tags. *Lab Chip*, 8: 527-532.

Morales, M. C.; Zahn, J. D. (2010) Droplet enhanced microfluidic-based DNA purification from bacterial lysates via phenol extraction. *Microfluid Nanofluid*, 9: 1041-1049.

Nathwani, A. C.; Tuddenham, E. G.; Rangarajan, S.; *et al.* (2011) Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in haemophilia B. *The New England Journal Medicine*, 365: 2357–2365.

O’Kennedy, R.; Baldwin, C.; Keshavarz-Moore, E. (2000) Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps. *Journal of Biotechnology*, 76: 175-183.

Oppermann, S.; Stein, F.; Kragl, U.; (2011) Ionic liquids for two-phase systems and their application for purification, extraction and biocatalysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 493-499.

Pampulha, M. E. (1998) Nutrição e Crescimento de Microrganismos. In: Microbiologia edited by Ferreira, W. F. C. and Sousa, J. C. F. 1st ed. Volume 1. Lidel, Lisboa.

Parente, A. M.; Sousa, J. C. F. (1998) Características morfológicas e ultraestruturais dos microrganismos procaríotas. In: Microbiologia edited by Ferreira, W. F. C. and Sousa, J. C. F. 1st ed. Volume 1. Lidel, Lisboa.

Paul, B.; Cloninger, C.; Felton, M.; Khachatoorian, R.; Metznerberg, S. (2008) A non-alkaline method for isolating sequencing-ready plasmids. *Analytical Biochemistry*, 377: 218-222.

Pei, Y. C.; Wang, J. J.; Wu, K.; Xuan, X. P.; Lu, X. J. (2009) Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins. *Separation and Purification Technology*, 64: 288–295.

Rahimpour, F.; Feyzi, F.; Maghsoudi, S.; Hatti-Kaul, R. (2006) Purification of Plasmid DNA with Polymer-Salt Aqueous Two-Phase System: Optimization Using Response Surface Methodology. *Biotechnology and Bioengineering*, 95: 627-637.

Ribeiro, S. C.; Monteiro, G. A.; Cabral, J. M. S.; Prazeres, D. M. F. (2002) Isolation of plasmid DNA from cell lysates by aqueous two-phase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 78: 376-384.

Rosa, P. A. J.; Azevedo, A. M.; Ferreira, I. F.; Sommerfeld, S.; Bäcker, W.; Aires-Barros, M. R. (2012) Downstream processing of antibodies: Single-stage *versus* multi-stage aqueous two-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 41: 4966-4995.

Salton, M. R. J.; Kim, K. S. (1996) Structure. In: Medical Microbiology edited by Baron, S. 4th ed. Galveston, Texas.

Sasakawa, S.; Walter, H. (1972) Partition behaviour of native proteins in aqueous dextran-poly(ethylene glycol) phase systems. *Biochemistry*, 11: 2760-2765.

Schirm, S.; Jiricny, J.; Schaffner, W. (1987) The SV40 enhancer can be dissected into multiple segments, each with a different cell type specificity. *Genes & Development*, 1: 65-74.

Sebastião, M. J.; Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R. (1994) Partitioning of recombinant *Fusarium solani pisi* cutinase in polyethylene glycol-aqueous salt solution two-phase systems. *Journal of Chromatography A*, 668: 139-144.

Shahriari, S.; Neves, C. M. S. S.; Freire, M. G.; Coutinho, J. A. P. (2012) Role of the Hofmeister Series in the Formation of Ionic-Liquid-Based Aqueous Biphasic Systems. *Journal of Physical Chemistry*, 116: 7252-7258.

Sundberg, S. O.; Wittner, C. T.; Gao, C.; Gale, B. K. (2010) Spinning disk platform for microfluidic digital polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry*, 82: 1546-1550.

Taylor, R. G.; Walker, D. C.; McInnes, R. R. (1993) *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Research*, 21: 1677-1678.

Tesfai, A. T.; Beamer, S. K.; Matak, K. E.; Jaczynski, J. (2011) Radioresistance development of DNA repair deficient *Escherichia coli* DH5 α in ground beef subjected to electron beam at sub-lethal doses. *International Journal of Radiation Biology*, 87: 571-578.

Vasilevskaya, V. V.; Khokhlov, A. R.; Matsuzawa, Y.; Yoshikawa, K. (1995) Collapse of single DNA molecule in poly(ethylene glycol) solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 102: 6595-6602.

Walsh, Gary. (2003) Biopharmaceuticals. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.

Wang, J. H.; Cheng, H.; Chen, X. W.; Du, Z.; Fang, Z. L. (2007) Direct extraction of double-stranded DNA into ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate and its quantification. *Analytical Chemistry*, 79: 620-625.

Wiendhal, M.; Oelmeier, S. A.; Dimer, F.; Hubbuch, J. (2012) High-throughput screening-based selection and scale-up of aqueous two-phase systems for pDNA purification. *Journal of Separation Science*, 35: 3197-3207.

Williams, J. A.; Luke, J.; Langtry, S.; Anderson, S.; Hodgson, C. P.; Carnes, A. E. (2009) Generic plasmid DNA production platform incorporating low metabolic burden seed-stock and fed-batch fermentation processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 103: 1129-1143.

Xu, Y.; He, G.; Li, J. (2005) Effective extraction of elastase from *Bacillus* sp. fermentation broth using aqueous two-phase system. *J Zhejiang Univ SCI*, 11: 1087-1094.

Yadav, V.; Mandhan, R.; Dabur, R.; Chhillar, A. K.; Gupta, J.; Sharma, G. L. (2005) A fraction from *Escherichia coli* with anti-*Aspergillus* properties. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 375-379.

Yau, S. Y.; Keshavarz-Moore, E.; Ward, J. (2008) Host strain influences on supercoiled plasmid DNA production in *Escherichia coli*: Implications for efficient design of large-scale processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 101: 529-544.

Zafarani-Moattar, M. T.; Hamzehzadeh, S. (2010) Salting-out effect, preferential exclusion, and phase separation in aqueous solutions of chaotropic water-miscible ionic liquids and kosmotropic salts: effects of temperature, anions and cations. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 55: 1598-1610.

Zaslavsky, B. Y.; Masimov, A. A.; Gasanov, A. A.; Rogozhin, S.V. (1984) Relation between the relative hydrophobicity of macromolecules and the hydrophobic character of their aqueous solutions. *Journal of Chromatography*, 294: 261-267.

Zhuo, D.; Yong-Liang, Y.; Jian-Hua, W. (2007) Extraction of proteins from biological fluids by use of an ionic liquid/aqueous two phase system. *Chemistry*, 13: 2130-2137.

