



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# **Sal quaternário de 2-metilbenzotiazole como ligando cromatográfico para a purificação de proteínas**

**Liliana Preciosa Moreira Alves**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Doutora Susana Sofia Ramos  
Coorientador: Prof.<sup>o</sup> Doutor Paulo Jorge da Silva Almeida

**Covilhã, junho de 2014**

# Dedicatória

A todos os que me ajudaram.  
Neste trilha desafiante e recompensador.  
Um trilha em que nunca estive sozinha.

# Prefácio

A presente dissertação intitulada *Sal quaternário de 2-metilbenzotiazole como ligando cromatográfico para a purificação de proteínas*, aborda questões de diferentes áreas da ciência. O foco principal deste projeto é a síntese de novos suportes de afinidade utilizando para tal um ligando sintético, nomeadamente o sal quaternário de 2-metilbenzotiazole.

Esta dissertação está dividida em quatro capítulos principais, cujos conteúdos são a seguir apresentados:

No *Capítulo I* é apresentada a introdução, que inclui uma breve revisão da literatura sobre os principais temas do trabalho. O primeiro tópico a ser abordado é a cromatografia, com especial ênfase para a cromatografia de afinidade e os parâmetros a ter em conta quando é considerada num protocolo. O segundo tema explorado são as cianinas e os seus precursores, sais quaternários de amónio, tais como os sais de 2-metilbenzotiazole, contextualizado no tema de ligandos sintéticos.

No *Capítulo II* são descritos todos os materiais, métodos e estratégias utilizados ao longo do trabalho, para a síntese do ligando, a escolha do método de imobilização e a sua posterior imobilização nas diferentes matrizes. Os suportes cromatográficos obtidos foram caracterizados e foi testada a capacidade de separação de proteínas por cromatografia de afinidade.

No *Capítulo III* e numa primeira parte são apresentados e discutidos os resultados da síntese, o estudo dos diferentes métodos de imobilização e as diversas matrizes testadas. Numa segunda parte deste capítulo são apresentados e discutidos os resultados da cromatografia de afinidade realizados com as matrizes derivatizadas, bem como a influência da densidade de ligando nos resultados cromatográficos.

Esta dissertação termina com as *Conclusões e Perspetivas futuras*, que inclui as principais conclusões resultantes do estudo realizado neste projeto e resume ainda as recomendações finais e/ou perspetivas para trabalhos futuros.

# Resumo

A cromatografia de afinidade é o método de purificação mais seletivo para proteínas e outras biomoléculas. O desenvolvimento de novos suportes cromatográficos tem sido um tema de grande importância e interesse por parte de investigadores de diferentes áreas, no intuito de encontrar um suporte ideal que reúna características tais como custos baixos, eficiência, reutilizabilidade e estabilidade física e química.

O sal de 2-metilbenzotiazole utilizado neste trabalho é de síntese fácil, baixo custo e apresenta na sua estrutura um braço espaçador longo e um grupo carboxílico que transformam este ligando sintético potencialmente adequado para a imobilização numa matriz e para posteriores estudos cromatográficos.

Foram estudados vários métodos de imobilização do ligando à matriz no sentido de avaliar qual o melhor método para a imobilização deste tipo de ligandos. Dentro destes, a esterificação de Steglich revelou ser o método mais eficaz na imobilização do sal de 2-metilbenzotiazole a uma matriz de Sepharose CL-6B. Foram sintetizados vários suportes com diferentes densidades de ligando. Os suportes assim obtidos foram quantitativa e qualitativamente caracterizados por microscopia eletrónica de varrimento, espectroscopia de raios-X por dispersão em energia e análise elementar.

Adicionalmente, foram exploradas as interações de afinidade entre os suportes cromatográficos obtidos e várias proteínas modelo. Os melhores resultados foram obtidos utilizando o suporte com a menor densidade de ligando, ou seja, de 0,18 mmol de sal de 2-metilbenzotiazole/g de suporte cromatográfico, o qual permite separar a ribonuclease, a  $\alpha$ -quimotripsina e a albumina de soro bovino a partir de uma mistura artificial de proteínas. A separação das três proteínas foi conseguida através da eluição por passos, com a diminuição gradual da concentração de sulfato de amónio no tampão de eluição.

Estes estudos iniciais permitiram demonstrar o potencial da aplicabilidade de ligandos catiónicos, tais como os sais de 2-metilbenzotiazole, para separação e purificação de proteínas por meio de cromatografia de afinidade, revelando um comportamento cromatográfico distinto e com boa reprodutibilidade.

## Palavras-chave

Cromatografia de afinidade; Esterificação de Steglich; Purificação de proteínas; Sal de 2-metilbenzotiazole

# Abstract

The most selective purification method for proteins and other biomolecules is affinity chromatography. The development of new chromatographic supports, with optimal characteristics in terms of low cost, efficiency, reusability and physico-chemical stability, has been a topic of great importance.

The 2-methylbenzothiazole salt used in this work is easy to synthesize at low-cost. The carboxyl groups and the long spacer arm present in its structure make this synthetic ligand potentially suitable for immobilization on a matrix and allow subsequent chromatographic studies.

Several methods of ligand immobilization into a matrix were studied in order to evaluate the best method for the immobilization of such ligands. Among these, Steglich esterification was found to be the most effective method for the immobilization of the 2-methylbenzothiazole salt onto the Sepharose CL-6B matrix. Several supports with different ligand densities were synthesized. The obtained supports were qualitatively and quantitatively characterized by scanning electron microscopy, energy dispersive X-ray spectroscopy and elemental analysis.

Additionally, the affinity interactions between the chromatographic supports and various model proteins were explored. The best results were achieved using a chromatography support with the lowest ligand density, i.e. 0.18 mmol of 2-methylbenzothiazole salt/g of chromatographic support, enabling to separate ribonuclease,  $\alpha$ -chymotrypsin and bovine serum albumin from an artificial mixture. The separation of the three proteins was achieved by stepwise elution with decreasing gradient of ammonium sulphate in the elution buffer.

These initial studies have demonstrated the potential applicability of cationic ligands, such as salts of 2-methylbenzothiazole, for separation and purification of proteins via affinity chromatography, revealing a distinct and reproducible chromatographic behavior.

## Keywords

Affinity chromatography; 2-Methylbenzothiazole salt; Proteins purification; Steglich esterification

# Índice

Prefácio	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice	vi
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Esquemas	xiv
Lista de Acrónimos	xv
Objetivos	xvii

## Capítulo I. Introdução

1.1	Cromatografia	2
1.1.1	Processo cromatográfico	2
1.1.2	Cromatografia preparativa <i>versus</i> analítica	4
1.1.3	Métodos cromatográficos	5
1.1.3.1	Cromatografia de afinidade (CA)	6
1.1.3.1.1	Matriz	7
1.1.3.1.2	Braço espaçador	9
1.1.3.1.3	Ligandos na cromatografia de afinidade	10
1.1.3.1.4	Imobilização de ligandos de afinidade	11
1.2	Cianinas e os sais de 2-metilbenzotiazole	15
1.2.1	Suportes cianínicos em CA	16
1.2.2	Sais de 2-metilbenzotiazole como potenciais ligandos em CA	16

## Capítulo II. Parte Experimental

2.1	Materiais, solventes e reagentes	18
2.2	Instrumentação	18
2.3	Síntese do brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-metilbenzotiazol-3-io	19
2.4	Estudo de métodos de imobilização para a obtenção de novos suportes cromatográficos	20
2.4.1	Celulose microcristalina	20
2.4.1.1	Método de cura	20
2.4.1.1.1	Método de cura com DMF/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20
2.4.1.1.2	Método de cura com DMF/TsOH	21
2.4.1.2	Método do cloreto de tionilo	21
2.4.1.3	Método da DCC com piridina ou DMAP	21

2.4.2	Celulose em esferas	21
2.4.2.1	Esterificação de Steglich	21
2.4.3	Sepharose CL-6B	22
2.4.3.1	Esterificação de Steglich	22
2.5	Avaliação dos suportes em CA	22
2.5.1	Ensaio cromatográfico	22
2.5.2	Ensaio cromatográfico com as proteínas isoladas	23
2.5.2.1	Na presença de cloreto de sódio	23
2.5.2.2	Na presença de sulfato de amônio	24
2.5.3	Ensaio cromatográfico com a mistura artificial de proteínas	24
2.5.4	Ensaio de reprodutibilidade	24
2.6	SDS-PAGE	25

### Capítulo III. Resultados e Discussão

3.1	Síntese do brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-metilbenzotiazol-3-io	27
3.2	Métodos de imobilização	27
3.2.1	Método de cura	28
3.2.2	Método do cloreto de tionilo	29
3.2.3	Método da DCC com piridina ou DMAP	29
3.3	Suporte de celulose em esferas	31
3.3.1	Estudos de CA no suporte de celulose em esferas	33
3.3.1.1	Condições iônicas	33
3.3.2.2	Condições hidrofóbicas	34
3.4	Suportes em Sepharose CL-6B	36
3.4.1	Estudos de CA nos suportes de Sepharose CL-6B	38
3.4.1.1	Condições iônicas	39
3.4.1.2	Condições hidrofóbicas	48
3.4.2	SDS-PAGE	54
3.4.3	Ensaio de reprodutibilidade	54
3.4.4	Estudos de CA nos suportes de Sepharose CL-6B derivatizados com o ácido 11-bromoundecanóico	55
3.4.4.1	Condições iônicas	56
3.4.4.2	Condições hidrofóbicas	57
3.4.5	SEM e EDS	58
	Conclusões	60
	Perspetivas Futuras	63
	Bibliografia	65
	Anexo	72

# Lista de Figuras

## Capítulo I.

**Figura 1.** Esquema típico de um processo cromatográfico (adaptada de Pfaunmiller *et al.*, 2013). 3

**Figura 2.** Princípios de alguns processos cromatográficos mais relevantes (adaptado de Healthcare, 2010). 6

**Figura 3.** Representação ilustrativa do processo de CA (adaptada de Magdeldin *et al.*, 2012). 6

**Figura 4.** Estrutura parcial da Sepharose CL. 9

**Figura 5.** Cromatogramas representativos do perfil de eluição na presença e ausência do braço espaçador (adaptada de Magdeldin *et al.*, 2012). 9

**Figura 6.** Estrutura química de corantes representativos utilizados como ligandos na CA. A: Cibacron Blue F3GA (adaptado de Yavuz *et al.*, 2003); B: Tiocarbocianina (adaptado de Boto *et al.*, 2008); C: Cianina aminoesquarílica (adaptada de Silva *et al.*, 2013). 11

**Figura 7.** Imobilização do ligando de afinidade por ativação da matriz (adaptada de Ayyar *et al.*, 2012). 12

**Figura 8.** Estrutura geral das cianinas (adaptada de Almeida, 1999). 15

## Capítulo III.

**Figura 9.** Condições de derivatização de uma matriz pelo método de cura (adaptada de Silva *et al.*, 2006). 28

**Figura 10.** Espectro de ATR da celulose microcristalina derivatizada. 30

**Figura 11.** Espectro de ATR da celulose microcristalina. 30

**Figura 12.** Espectro de ATR da celulose em esferas derivatizada (suporte C1). 31

**Figura 13.** Espectro de ATR da celulose em esferas. 32

**Figura 14.** Sal de 2-metilbenzotiazole 3 imobilizado numa matriz de celulose em esferas. 33



<b>Figura 15.</b> Perfil cromatográfico obtido com o suporte <b>C1</b> . Injeção de 100 µL de <b>proteína correspondente</b> (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).	34
<b>Figura 16.</b> Perfil cromatográfico obtido com o suporte <b>C1</b> . Injeção de 100 µL de <b>proteína correspondente</b> (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).	35
<b>Figura 17.</b> Perfil cromatográfico obtido com o suporte de controlo. Injeção de 100 µL de <b>lisozima</b> (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão em <b>A</b> : Tris-HCl 10 mM a pH 8 e em <b>B</b> : NaCl 0,05 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8. Para o passo de eluição utilizou-se a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).	36
<b>Figura 18.</b> Espectro de ATR da Sepharose CL-6B derivatizada (suporte <b>S1</b> ).	37
<b>Figura 19.</b> Espectro de ATR da Sepharose CL-6B.	37
<b>Figura 20.</b> Sal de 2-metilbenzotiazole <b>3</b> imobilizado numa matriz de Sepharose CL-6B.	39
<b>Figura 21.</b> Perfis cromatográficos obtidos com os suportes <b>S1</b> , <b>S2</b> , <b>S3</b> e <b>S4</b> . Injeção de 100 µL de <b>lisozima</b> (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de NaCl 0,05 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).	40
<b>Figura 22.</b> Perfis cromatográficos obtidos com os suportes <b>S1</b> , <b>S2</b> , <b>S3</b> e <b>S4</b> . Injeção de 100 µL de <b>lisozima</b> (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de NaCl 0,05 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 2 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).	41
<b>Figura 23.</b> Perfis cromatográficos obtidos com os suportes <b>S1</b> , <b>S2</b> , <b>S3</b> e <b>S4</b> . Injeção de 100 µL de <b>lisozima</b> (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de NaCl 0,05 M em acetato 10 mM a pH 4 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato 10 mM a pH 4 (representado pela linha a tracejado).	42

<b>Figura 24.</b> Perfis cromatográficos obtidos com os suportes <b>S1, S2, S3 e S4</b> . Injeção de 100 µL de <b>α-quimotripsina</b> (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).	43
<b>Figura 25.</b> Perfis cromatográficos obtidos com os suportes <b>S1, S2, S3 e S4</b> . Injeção de 50 µL de <b>α-quimotripsina</b> (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).	43
<b>Figura 26.</b> Perfis cromatográficos obtidos com os suportes <b>S1, S2, S3 e S4</b> . Injeção de 100 µL de <b>α-quimotripsina</b> (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato 10 mM a pH 4 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato 10 mM a pH 4 (representado pela linha a tracejado).	44
<b>Figura 27.</b> Perfis cromatográficos obtidos com os suportes <b>S1, S2, S3 e S4</b> . Injeção de 100 µL de <b>α-quimotripsina</b> (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 7 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 7 (representado pela linha a tracejado).	45
<b>Figura 28.</b> Perfis cromatográficos obtidos com os suportes <b>S1, S2, S3 e S4</b> . Injeção de 100 µL de <b>α-quimotripsina</b> (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 9 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 9 (representado pela linha a tracejado).	46
<b>Figura 29.</b> Perfis cromatográficos obtidos com os suportes <b>S1, S2, S3 e S4</b> . Injeção de 100 µL de <b>BSA</b> (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).	47
<b>Figura 30.</b> Perfis cromatográficos obtidos com os suportes <b>S1, S2, S3 e S4</b> . Injeção de 100 µL de <b>RNase</b> (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).	47

- Figura 31.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes **S1**, **S2**, **S3** e **S4**. Injeção de 100 µL de **lisozima** (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado). 49
- Figura 32.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes **S1**, **S2**, **S3** e **S4**. Injeção de 50 µL de **lisozima** (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado). 49
- Figura 33.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes **S1**, **S2**, **S3** e **S4**. Injeção de 100 µL de  **$\alpha$ -quimotripsina** (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado). 50
- Figura 34.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes **S1**, **S2**, **S3** e **S4**. Injeção de 100 µL de **BSA** (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado). 51
- Figura 35.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes **S1**, **S2**, **S3** e **S4**. Injeção de 100 µL de **RNase** (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado). 51
- Figura 36.** Perfil cromatográfico obtido com o suporte **S4**. Injeção de 100 µL de proteína correspondente. Utilizou-se no passo inicial a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8, seguindo-se a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,6 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e por último a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado). 52
- Figura 37.** Perfil cromatográfico obtido com o suporte **S4**. Injeção de 150 µL de uma mistura de **RNase**,  **$\alpha$ -quimotripsina** e **BSA**. Utilizou-se no passo inicial uma solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8, seguindo-se uma solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,6 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e por último uma solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado). 53

<b>Figura 38.</b> SDS-PAGE das frações recuperadas a partir de cada banda cromatográfica.	54
<b>Figura 39.</b> Perfil cromatográfico obtido para o suporte <b>S4</b> (—) na Figura 37 e depois de cinquenta corridas cromatográficas (—) com uma mistura de <b>RNase</b> , <b><math>\alpha</math>-quimotripsina</b> e <b>BSA</b> . Utilizou-se no passo inicial uma solução tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8, seguindo-se a solução tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e por último uma solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).	55
<b>Figura 40.</b> Ácido 11-bromoundecanóico <b>2</b> imobilizado numa matriz de Sepharose CL-6B.	55
<b>Figura 41.</b> Perfis cromatográficos obtidos para o suporte <b>B2</b> (e comparados com o suporte <b>S4</b> ). Injeção de 100 $\mu\text{L}$ de <b>proteína correspondente</b> (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).	57
<b>Figura 42.</b> Perfis cromatográficos obtidos para o suporte <b>B2</b> (e comparados com o suporte <b>S4</b> ). Injeção de 100 $\mu\text{L}$ de <b>proteína correspondente</b> (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 ou Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).	58
<b>Figura 43.</b> Imagens SEM com ampliação de 100, 250, 500 e 5000x: (a) Sepharose CL-6B; (b) suporte de controlo; e (c) suporte <b>S4</b> .	59
<b>Figura 44.</b> Imagens SEM e o corresponde mapeamento de enxofre com ampliação de 1300x nos suportes: (a) suporte <b>S1</b> ; (b) suporte <b>S2</b> ; (c) suporte <b>S3</b> ; e (d) suporte <b>S4</b> .	59

# Lista de Tabelas

## Capítulo I.

<b>Tabela 1.</b> Classificação dos métodos cromatográficos de acordo com as diferenças nas propriedades das biomoléculas (adaptada de Healthcare, 2010).	5
<b>Tabela 2.</b> Exemplo de algumas matrizes comercialmente disponíveis (adaptada de Denizli <i>et al.</i> , 2001).	8

## Capítulo III.

<b>Tabela 3.</b> Suportes cromatográficos obtidos com a esterificação de Steglich a partir da matriz de celulose em esferas.	33
<b>Tabela 4.</b> Suportes cromatográficos obtidos com a esterificação de Steglich a partir do sal de 2-metilbenzotiazole <b>3</b> numa matriz de Sepharose CL-6B.	38
<b>Tabela 5.</b> Suportes cromatográficos obtidos com a esterificação de Steglich a partir do ácido 11-bromoundecanóico <b>2</b> numa matriz de Sepharose CL-6B.	56

# Lista de Esquemas

## Capítulo I.

Esquema 1. Esterificação de Steglich (adaptado de Rodrigues, 2011).	13
Esquema 2. a) Rearranjo da <i>O</i> -acilisourea com formação da <i>N</i> -acilisourea; b) Participação da DMAP na esterificação (adaptado de Rodrigues, 2011).	14
Esquema 3. Sínteses de Hofmann (adaptado de Munawar <i>et al.</i> , 2011).	16

## Capítulo III.

Esquema 4. Síntese do brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-metilbenzotiazol-3-io 3.	27
---	----

# Lista de Acrónimos

ATR	Attenuated Total Reflectance (Refletância Total Atenuada)
AE	Análise Elementar
EDS	Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (Espetroscopia de raios X por Dispersão em Energia)
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)
CA	Cromatografia de Afinidade
c.c.f	Cromatografia em camada fina
RMN de $^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
d	Dupleto em RMN de $^1\text{H}$
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DIU	<i>N,N</i> -Diisopropilureia
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO- $d_6$	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
DTT	Ditiotreitol
eq.	Equivalentes
EUA	Estados Unidos da América
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espetroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier)
RMN de $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de próton
IV	Infravermelho
m	Multiplete em RMN de $^1\text{H}$
m/v	Massa/volume
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida)
PDT	Photodynamic Therapy (Terapia Fotodinâmica)
pH	Potencial de Hidrogénio
PHEMA	Polihidroxietilmetacrilato
pl	Ponto Isoelétrico
PM	Peso Molecular
PSA	Persulfato de Amónio
PVA	Polyvinyl Alcohol (Álcool polivinílico)
p.f.	Ponto de fusão
Q	Quantidade de ligando ligado à matriz (mmol de ligando/g suporte)
RNase	Ribonuclease
s	Singleto em RMN de $^1\text{H}$
SEM	Scanning Electron Microscope (Microscopia Eletrónica de Varrimento)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil Sulfato de Sódio)

<b>t</b>	Tripleto em RMN de $^1\text{H}$
<b>TEMED</b>	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametiletilenodiamina
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>Tris</b>	Tris-(hidroximetil)-aminometano
<b>TsOH</b>	Ácido <i>p</i> -toluenossulfônico
<b>UV/Vis</b>	Ultravioleta/Visível
<b>v/v</b>	Volume/volume
<b><math>\delta</math></b>	Desvio químico em relação ao TMS (ppm)
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamento (Hz)
<b><math>\lambda_{\text{máx}}</math></b>	Comprimento de onda do máximo de absorção ( $\text{cm}^{-1}$ )
<b><math>\nu_{\text{máx}}</math></b>	Frequência do máximo de absorção de uma banda ( $\text{cm}^{-1}$ )



# Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é o de avaliar o potencial de um sal quaternário de 2-metilbenzotiazole como possível e inovador ligando de afinidade para a separação e purificação de proteínas. Esta escolha teve por base as potenciais propriedades singulares e promissoras deste tipo de ligando para o processo de afinidade uma vez que pode ser responsável por diferentes tipos de interações moleculares com as proteínas. Desta forma, estabeleceram-se os seguintes objetivos específicos:

- Desenvolver um método que permita a imobilização de sais de 2-metilbenzotiazole a uma matriz;
- Preparar diferentes suportes cromatográficos com diferentes concentrações de ligando;
- Explorar os suportes cromatográficos com diferentes concentrações de ligando em cromatografia de afinidade e avaliar a existência de interação seletiva das diferentes proteínas com o ligando, em condições hidrofóbicas e iônicas.

# CAPÍTULO I.

---

## INTRODUÇÃO

## 1.1 Cromatografia

A purificação de proteínas tem sido utilizada há mais de 200 anos. No entanto, até ao início do século 20, as tecnologias de separação envolviam apenas os métodos de filtração, precipitação e cristalização. Em 1906, o pesquisador russo Mikhail Tswett, ao descrever o seu trabalho sobre a separação de pigmentos de plantas através de uma coluna de carbonato de cálcio, introduziu o termo cromatografia, para o processo, e cromatograma, para descrever as bandas separadas na coluna. Estas palavras são de origem grega, onde “cromo” vem do grego *chroma*, que significa cor, e “grafia” também vem do grego *graphe*, que significa escrever. Mais tarde explicou que a separação não dependia da cor, mas sim das interações das substâncias, coloridas ou não, com a fase estacionária (Collins *et al.*, 2006; Healthcare, 2010).

Hoje em dia, a maioria dos processos de purificação conhecidos envolvem, de alguma forma, a cromatografia. Como resultado, a separação cromatográfica de misturas de proteínas tornou-se um dos meios mais eficazes e amplamente utilizado para a purificação de proteínas (Hedhammar *et al.*, 2006).

O objetivo do processo de purificação não é apenas o de remover contaminantes indesejados, mas também obter e manter a qualidade, a estabilidade e a atividade biológica das biomoléculas. O nível desejado de pureza depende da aplicação final pretendida para a biomolécula. Se a aplicação envolve estudos estruturais e aplicações terapêuticas, a biomolécula deve ter um elevado grau de pureza, em contraste com as biomoléculas para aplicações industriais, como por exemplo na indústria alimentar ou detergentes domésticos, em que o grau de pureza requerido não é tão elevado (Queiroz *et al.*, 2001).

Assim, a cromatografia tornou-se uma ferramenta indispensável para a separação e purificação de substâncias biológicas, devido à sua simplicidade, robustez, versatilidade e alta reprodutibilidade (Biosciences, 2001; Sousa *et al.*, 2012).

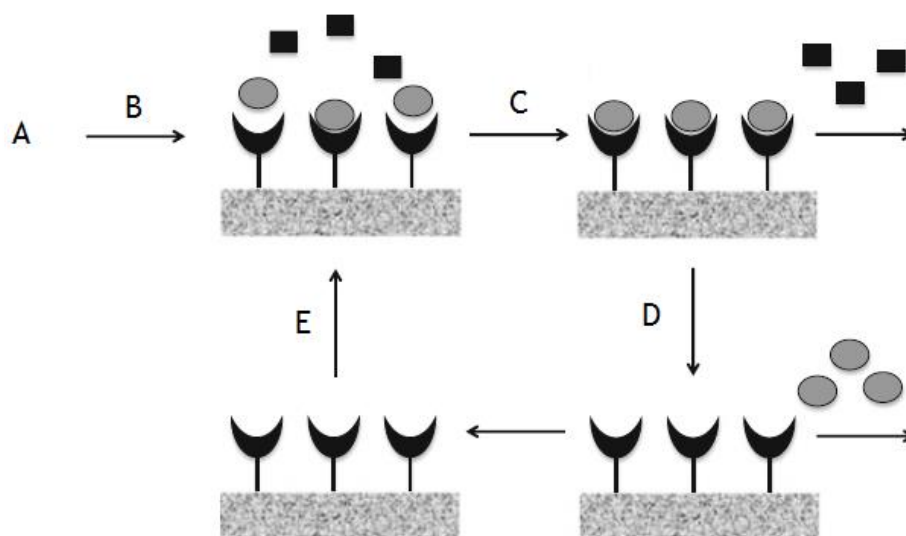
### 1.1.1 Processo cromatográfico

A cromatografia é o método utilizado para separar componentes de uma amostra, tendo em conta as propriedades físicas e químicas de cada biomolécula (Sattayasai, 2012). Deste modo, a carga, o tamanho molecular, a hidrofobicidade e a polaridade determinam o tipo de interação entre o soluto na fase móvel e a fase estacionária (Queiroz *et al.*, 2001). A fase estacionária é empacotada numa coluna vertical e deve ser insolúvel no tampão, enquanto que, a fase móvel é por sua vez inserida na coluna, podendo ser líquida ou gasosa (Sattayasai, 2012), sendo responsável pelo transporte dos compostos através da fase estacionária.

Após injeção, a amostra vai percorrer a coluna por adição contínua de fase móvel, processo este designado por eluição. A separação ocorre dependendo da interação diferencial dos diferentes componentes da amostra com as fases estacionária e móvel, ou seja, as diferentes biomoléculas interagem com intensidades distintas, percorrendo a coluna com velocidades diferentes (Jungbauer, 1993). Esta interação diferencial das várias biomoléculas vai provocar uma sucessão de bandas separadas. As frações correspondentes às bandas podem ser recolhidas e a concentração de proteína em cada uma das frações pode ser determinada pela medição da absorvância. Estas bandas refletem a concentração de biomoléculas em função do tempo ou do volume de eluente à saída da coluna, o que é normalmente representado através de um cromatograma (Ghose *et al.*, 2003; Healthcare *et al.*, 2010).

O processo cromatográfico encontra-se esquematizado na Figura 1 e pode ser dividido nas seguintes etapas:

- A. Equilíbrio das fases:** ajuste da fase móvel e estacionária às condições de ligação;
- B. Aplicação da amostra:** injeção de uma quantidade de solução de proteína específica na coluna;
- C. Lavagem ou remoção do material não ligado:** os componentes de material não ligado que permaneceram na fase móvel são removidos porque não interagem com a fase estacionária;
- D. Eluição da biomolécula:** a proteína alvo é recuperada por alteração da composição da fase móvel; e
- E. Regeneração/limpeza:** lavagem de impurezas da fase estacionária, o que permite a reutilização da coluna (Liapis, 1989; Jungbauer, 1993).



**Figura 1.** Esquema típico de um processo cromatográfico (adaptada de Pfaunmiller *et al.*, 2013).

A biomolécula alvo que fica fortemente adsorvida à fase estacionária elui mais lentamente do que as biomoléculas fracamente ligadas, sendo necessário a aplicação de alterações significativas na fase móvel para a obtenção de um gradiente de eluição. As estratégias mais comuns de eluição de proteínas são alterações da força iónica (tipo e concentração de sal), pH e adição de um agente competitivo (Wood *et al.*, 1989; Biosciences, 2001; Hedhammar *et al.*, 2006; Viera *et al.*, 2011).

A eluição pode ser realizada de diferentes formas, através de um gradiente de eluição linear, por passos ou isocrático, dependendo das condições aplicadas. No gradiente linear, a composição da fase móvel é alterada continuamente para condições que favoreçam a dissociação da proteína. Esta forma de eluição aumenta a separação e é normalmente utilizada quando a amostra é desconhecida. No gradiente por passos, a composição do eluente varia de forma descontínua e várias biomoléculas podem ser eluídas através desta estratégia (Wood *et al.*, 1989). Neste tipo de eluição o consumo de tampão é reduzido e é uma alternativa mais rápida ao gradiente linear. Por último, a eluição isocrática é quando a composição do eluente é constante. Este tipo de eluição é conhecido pela interação constante entre o soluto e o suporte onde as condições são mantidas inalteradas durante todo o processo de purificação (ligação e eluição) (Cramer *et al.*, 1993; Healthcare, 2010).

O último passo corresponde à regeneração e limpeza da matriz, que não deixa de ser menos importante, uma vez que permite a reutilização da matriz para novos ensaios cromatográficos (Healthcare, 2010). Neste passo, as impurezas são removidas para manter as características nativas da matriz, tais como a seletividade e o tempo de vida do suporte (Cramer *et al.*, 1993; Narayanan, 1994). Além disso, um meio impuro pode indesejavelmente induzir a diminuição da capacidade de ligação e aumento da pressão. O procedimento de limpeza depende do tipo de matriz e evita a contaminação microbiana durante o seu armazenamento (Healthcare, 2010).

### 1.1.2 Cromatografia preparativa *versus* analítica

A quantidade do produto, o grau de pureza e a estabilidade das biomoléculas são requisitos importantes para a escolha do tipo de cromatografia (Jungbauer, 1993).

A cromatografia pode ser preparativa ou analítica consoante o objetivo da separação. A cromatografia líquida, em que a fase móvel é um líquido, é a mais utilizada para a escala preparativa. Enquanto a cromatografia em fase gasosa, em que a fase móvel é um gás, é uma ferramenta indispensável à escala analítica (Weltrli *et al.*, 1976; Garcia *et al.*, 1993; Guiochon, 2002).

A cromatografia líquida preparativa tornou-se o instrumento primário para a purificação de proteínas a partir de misturas biológicas complexas em processos biotecnológicos. Na

cromatografia preparativa, o objetivo é obter uma dada quantidade de produto puro com elevada produtividade, o que requer altas eficiências de coluna (Weltrli *et al.*, 1976; Cramer *et al.*, 1993). Sendo a cromatografia preparativa a ferramenta mais utilizada na indústria biotecnológica, é utilizada em larga escala, produzindo por vezes quilogramas ou mesmo toneladas da biomolécula alvo (Ghose *et al.*, 2001).

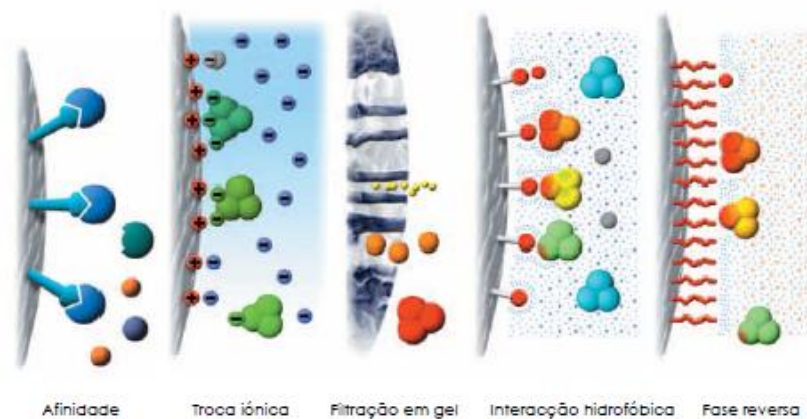
A cromatografia analítica, por sua vez, permite identificar e quantificar os componentes de misturas simples ou complexas. O objetivo desta cromatografia baseia-se na determinação rápida da estrutura do composto e o cálculo da sua concentração, por meio da calibração do sinal do detetor (Guiochon, 2002). Na cromatografia analítica, uma pequena amostra é aplicada à coluna e é procurada a resolução máxima, através da manipulação das características das diferentes fases do sistema (Jungbauer, 1993; Guiochon, 2002). Assim sendo, neste tipo de cromatografia é necessária uma elevada seletividade e sensibilidade (Hess *et al.*, 1993; Fekete *et al.*, 2012). Ultimamente têm sido desenvolvidos instrumentos cada vez mais complexos com duas ou mais colunas acopladas, no sentido de resolver problemas de separação analítica ou preparativa (Guiochon, 2002).

### 1.1.3 Métodos cromatográficos

Os métodos cromatográficos podem ser classificados de acordo com as interações dominantes entre a fase estacionária e a biomolécula que se pretende separar. Dependendo das propriedades da biomolécula alvo, tais como tamanho, carga, hidrofobicidade, polaridade ou afinidade, são utilizados diferentes tipos de cromatografia para conseguir a separação desejada (Tabela 1 e Figura 2).

**Tabela 1.** Classificação dos métodos cromatográficos de acordo com as diferenças nas propriedades das biomoléculas (adaptada de Healthcare, 2010).

Propriedade	Técnica
Bioreconhecimento (especificidade do ligando)	Cromatografia de afinidade
Carga	Cromatografia de troca iónica
Tamanho	Filtração em gel ou exclusão molecular
Hidrofobicidade	Cromatografia de interação hidrofóbica Cromatografia de fase reversa

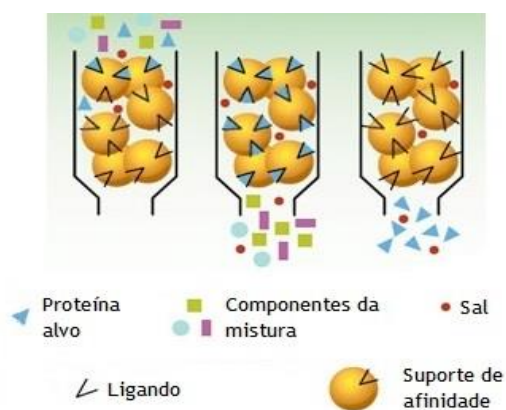


**Figura 2.** Princípios de alguns processos cromatográficos mais relevantes (adaptada de Healthcare, 2010).

### 1.1.3.1 Cromatografia de afinidade (CA)

Desde o início da CA, há cerca de 50 anos, que se tornou um procedimento muito útil e utilizado na purificação de biomoléculas, estando referenciado que mais de 60% de todas as técnicas de purificação envolvem este tipo de cromatografia (Cuatrecasas *et al.*, 1968; Lowe, 1996).

A ampla aplicabilidade deste tipo de cromatografia baseia-se no facto de qualquer biomolécula suscetível de ser purificada ter, normalmente, um local de reconhecimento através do qual ele pode ser ligado por uma molécula natural ou artificial. Assim sendo, esta técnica fundamenta-se na especificidade da interação ligando-proteína. Esta dependência de interações de afinidade no reconhecimento biológico indica que é adequada para a preservação da atividade biológica da proteína isolada e foi descrita como a melhor técnica para preservar a atividade biológica das proteínas (Shi *et al.*, 1996). Resumindo, a CA é baseada principalmente no reconhecimento molecular de uma molécula alvo por meio de uma molécula associada a uma coluna, geralmente designada ligando (Figura 3) (Magdeldin *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Representação ilustrativa do processo de CA (adaptada de Magdeldin *et al.*, 2012).

É comumente aceite que este método proporciona elevada pureza e atividade específica de materiais biológicos, quando comparado com outras técnicas cromatográficas, tais como a cromatografia de fase reversa, de troca iónica ou de exclusão molecular. Por exemplo, a cromatografia de fase reversa é altamente seletiva, mas requer a utilização de solventes orgânicos e, por conseguinte, é raramente utilizada para a separação de proteínas devido à sua desnaturação permanentemente (Chen *et al.*, 2000). Por outro lado, a utilização da cromatografia de exclusão molecular permite a separação de proteínas de diferentes tamanhos com base no seu tempo de retenção (Berek, 2010). No entanto, dois principais inconvenientes desta técnica consistem na recuperação da proteína desejada em soluções muito diluídas e a incapacidade de separar as proteínas com tamanhos idênticos. Assim, por utilização da CA, mais do que alcançar uma elevada seletividade, é possível recuperar as proteínas com a sua atividade biológica totalmente conservada, como já foi referido anteriormente.

Na verdade, a CA permite a purificação de proteínas e outras macromoléculas biológicas (Doğan *et al.*, 2012) e possibilita o aumento dos rendimentos finais (Boto *et al.*, 2008; Gallant *et al.*, 2008). A interação global entre a molécula alvo e o ligando imobilizado na matriz é uma consequência da combinação de várias interações moleculares, nomeadamente, eletrostáticas, ligações de hidrogénio, hidrofóbicas, interações de van der Waals e  $\pi$ - $\pi$  (Kumaraswamy *et al.*, 2011).

Ao longo dos anos, tornou-se vez mais importante aumentar a resolução, seletividade, eficiência e rapidez do processo cromatográfico, porque a complexidade e quantidade de amostras também aumentaram. Assim sendo, é necessário desenvolver novos suportes cromatográficos para a separação de misturas complexas e a manutenção dos rendimentos satisfatórios de recuperação (Car *et al.*, 1991; Sousa *et al.*, 2012). No desenvolvimento de novos protocolos de CA devem ser considerados principalmente a natureza da matriz, o braço espaçador e o ligando bem como o método de imobilização a utilizar.

#### 1.1.3.1.1 Matriz

A matriz é um suporte inerte ao qual pode ser imobilizado um ligando de uma forma direta ou indireta (Kumaraswamy *et al.*, 2011). As matrizes mais comuns consistem em materiais porosos, tais como agarose, celulose, dextrano, poliacrilamida, sílica, entre outros (Tabela 2). Todas elas estão comercialmente disponíveis e com uma gama diversificada de tamanho de partícula e do poro (Magdeldin *et al.*, 2012).



**Tabela 2.** Exemplo de algumas matrizes comercialmente disponíveis (adaptada de Denizli *et al.*, 2001).

Tipo de matriz	Fornecedor	Nome comercial
Agarose	Pharmacia LKB, Sweden	Sepharose
	Bio-Rad, USA	Bio-gel
	Bio-Rad	Affi-gel blue
Celulose	Amicon, USA	Matrex Cellufine
Dextrano	Pharmacia LKB	Sephadex
Agarose/Poliacrilamida	IBF, France	Ultrogel
Poliacrilamida/dextrano	Pharmacia LKB	Sephacryl
Poliacrilamida	Röhm Pharma, Germany	Eupergit C
	IBF	Trisacryl
	Bio-Rad	Affi-gel
PHEMA	Tessek, Czechoslovakia	Separon H 1000
Metacrilato	Merck, Germany	TSK-Gel Toyopearl
	Separon	Alltech, USA
Vidro de porosidade controlada	Pierce, USA	CPG
Polímero revestido de sílica	J.T. Baker, USA	Prepscale
Sílica	Dupont, USA	Zorbax
	Shandon, UK	Hypersil WP300
	Merck	Lichrospher
	Beckman, USA	Ultrasphere
	Waters, USA	Spheron
	Alltech	Eupergit
Metacrilato	Alltech	Eupergit
Polímero sintético	Dyno Particles, Norway	Dynospheres
Polímero vinílico	Merck	Toyopearl
Poliestireno	PerSeptive Biosystems, USA	Poros-50
Sílica-PVA	FMC	Acti-Disk
Vidro	Schott Glass	Bioran-M

Uma matriz cromatográfica deve possuir idealmente um conjunto de propriedades e, como tal, deve ser: rígida, altamente porosa, uniforme, não tóxica, barata, simples de utilizar, química e fisicamente estável sob uma vasta gama de condições experimentais, insolúvel no solvente e não deve interagir com a amostra. Além disso, devem ser consideradas outras características, nomeadamente, apresentar elevada capacidade de ligação, manter boas propriedades de fluxo ao longo do processo, promover a imobilização estável do ligando, poder ser reutilizável em várias passagens cromatográficas e permitir a regeneração em condições extremas (Subramanian, 1984; Stickel *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2001; Deshmukh *et al.*, 2005; Block *et al.*, 2009).

A Sepharose, o nome comercial de um gel de agarose, foi modificada e desenvolvida para melhorar estas propriedades, resultando numa seleção de matrizes que atende às necessidades específicas de cada aplicação (Kumaraswamy *et al.*, 2011). A Sepharose CL (Figura 4) tem um teor mais baixo de grupos ionizáveis, tendo-se revelado mais resistente química e fisicamente do que a Sepharose e apresenta ainda melhores propriedades de fluxo. Estão atualmente disponíveis comercialmente três tipos de Sepharose CL com diferentes teores de agarose: 2%, 4% e 6%, designados CL-2B, CL-4B e CL-6B, respetivamente (Sigma-Aldrich, 2014a).

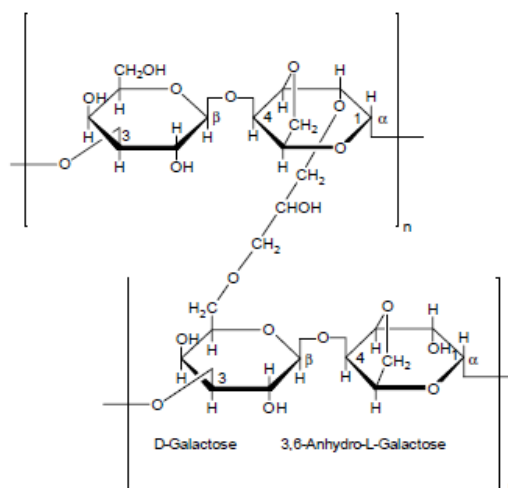


Figura 4. Estrutura parcial da Sepharose CL.

#### 1.1.3.1.2 Braço espaçador

Pelo facto dos locais de ligação da molécula alvo serem de difícil acesso, o chamado impedimento estereoquímico, é frequente incorporar um braço espaçador entre a matriz e o ligando para facilitar a ligação das biomoléculas. A Figura 5 mostra uma melhoria de ligação e de eluição quando um braço espaçador é introduzido (Magdeldin *et al.*, 2012).

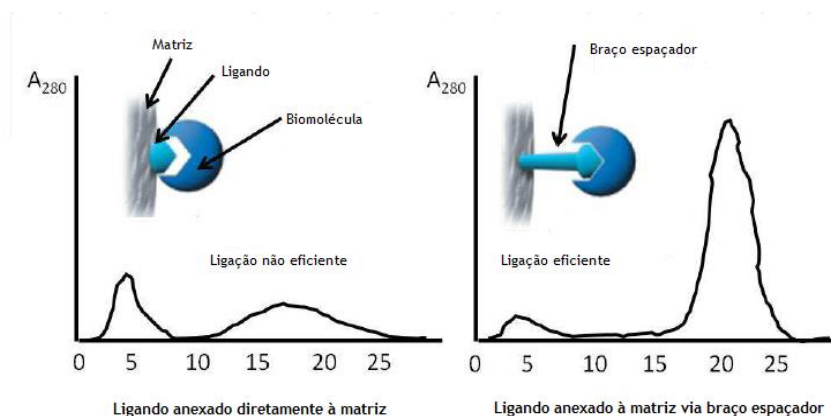


Figura 5. Cromatogramas representativos do perfil de eluição na presença e ausência do braço espaçador (adaptada de Magdeldin *et al.*, 2012).

O comprimento dos braços espaçadores também é crítico visto que braços muito curtos ou muito longos podem levar à insuficiência de ligação ou a ligações não específicas (Magdeldin *et al.*, 2012).

#### 1.1.3.1.3 Os ligandos utilizados na CA

O ligando é a molécula que se liga reversivelmente a uma biomolécula ou a um grupo específico de biomoléculas, permitindo a sua purificação. Deste modo, desempenha um papel primordial no sucesso de um protocolo de purificação, sendo responsável por conferir interações específicas que para serem bem-sucedidas, necessitam de ser estudadas e otimizadas através de condições de ligação e eluição apropriadas. A ligação de ligandos adequados permite uma elevada especificidade para a biomolécula alvo e uma purificação eficaz e direcionada (Narayanan *et al.*, 1994; Pardal *et al.*, 2002a; Sousa *et al.*, 2012).

A seleção do ligando na CA é influenciada por dois fatores principais: o ligando deve apresentar uma afinidade de ligação específica e reversível para a biomolécula alvo e deve conter grupos quimicamente modificáveis que lhe permitam a ligação à matriz (Kumaraswamy *et al.*, 2011).

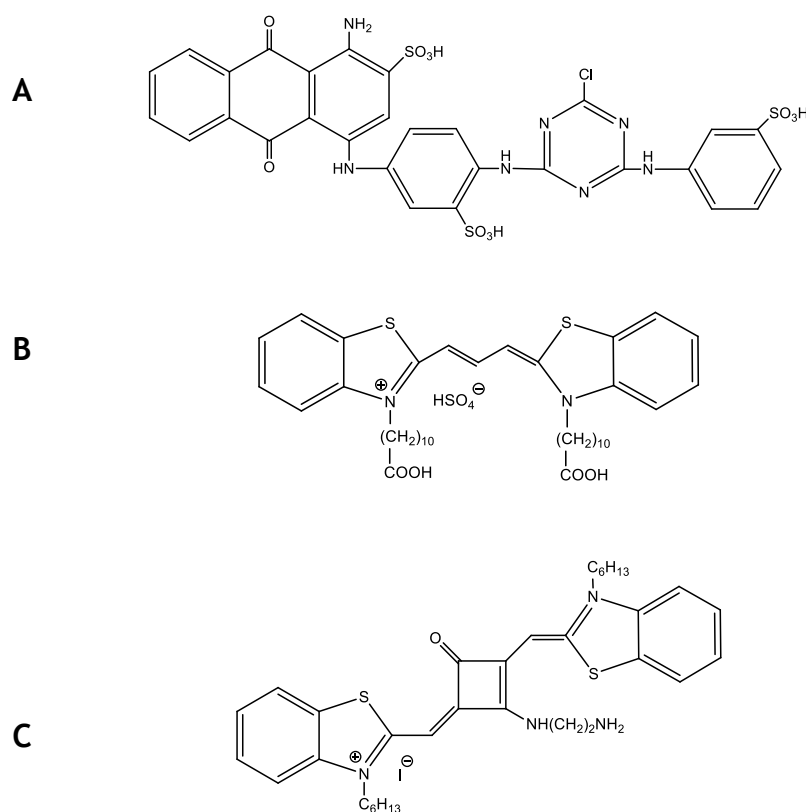
Na CA, os ligandos podem ser caracterizados como biológicos ou sintéticos, sendo atribuídas vantagens e desvantagens a cada um destes diferentes tipos (Silva *et al.*, 2013). Os ligandos biológicos apresentam algumas limitações, como a dificuldade em manter a sua atividade biológica original, uma baixa estabilidade de armazenamento, a necessidade de processos de purificação, o elevado custo de produção e a dificuldade de imobilização. Exemplos deste tipo de ligandos incluem enzimas, coenzimas, co-fatores, anticorpos, aminoácidos, oligopéptidos, proteínas, ácidos nucleicos e oligonucleótidos (Roque *et al.*, 2005).

Os ligandos sintéticos apresentam uma elevada estabilidade e idealmente devem ser preparados a partir de produtos químicos razoavelmente baratos e apresentar uma baixa toxicidade. Com estas características, este tipo de ligandos tornam-se preferidos na purificação de várias proteínas (Clonis *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2006).

Os corantes constituem um outro tipo de ligandos de afinidade que podem ser utilizados para purificar biomoléculas a partir de misturas complexas. Em 1968, Haeckel *et al.*, através da cromatografia de filtração em gel verificou a existência de interação entre a enzima piruvato cinase e o corante Blue Dextran. A ligação corante-enzima foi utilizada mais tarde em 1971 na purificação da piruvato cinase utilizando uma coluna deste corante (Staal *et al.*, 1971). A principal desvantagem dos corantes, enquanto ligandos, é a sua seletividade moderada para proteínas. Neste sentido, surgiu o conceito de corante biomimético, segundo o qual são concebidos corantes sintéticos que imitam ligandos naturais, e que são capazes de combinar a seletividade de ligandos naturais com a alta capacidade, durabilidade e custo-eficácia dos

ligandos sintéticos (Clonis *et al.*, 2000; Lowe *et al.*, 2001). A principal desvantagem destes ligandos é que o processo de seleção para uma biomolécula em particular é empírico e requer extensivos processos de rastreio durante o desenvolvimento do método (Clonis *et al.*, 2000).

São apresentados na Figura 6 alguns exemplos de corantes com aplicação relevante na CA, por exemplo, o cibacron blue F3G-A aqui destacado pelo seu caráter histórico (Subramanian, 1998; Kim *et al.*, 2012), as tiacarboecianinas (Boto *et al.*, 2008, 2009) e os corantes esquarílicos (Silva *et al.*, 2013) destacados aqui pela sua importância no âmbito deste trabalho.

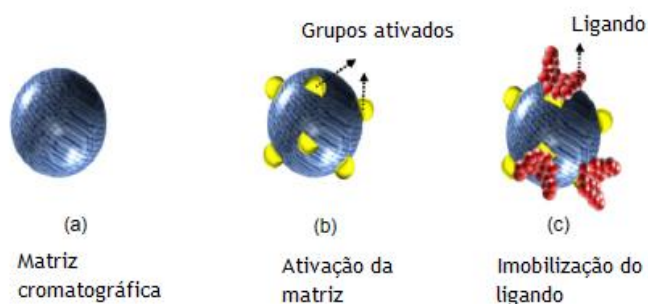


**Figura 6.** Estrutura química de corantes representativos utilizados como ligandos na CA. A: Cibacron Blue F3GA (adaptada de Yavuz *et al.*, 2003); B: Tiacarboecianina (adaptada de Boto *et al.*, 2008); C: Cianina aminoescarilica (adaptada de Silva *et al.*, 2013).

#### 1.1.3.1.4 Imobilização de ligandos de afinidade

A imobilização ou acoplamento do ligando de afinidade à matriz também é muito importante na conceção de um método de CA para a purificação de biomoléculas. A imobilização covalente é uma das formas mais comuns de ligação de um ligando de afinidade a uma matriz insolúvel (Magdeldin *et al.*, 2012). O processo de imobilização do ligando consiste na ativação da matriz, promovendo a reação com o grupo funcional do ligando (Figura 7), estabelecendo assim uma ligação covalente entre o ligando e a matriz. Exemplos de grupos funcionais

reativos são: aminas, sulfidrilos, ácidos carboxílicos, hidroxilos, tióis, aldeídos, entre outros (Kumaraswamy *et al.*, 2011).



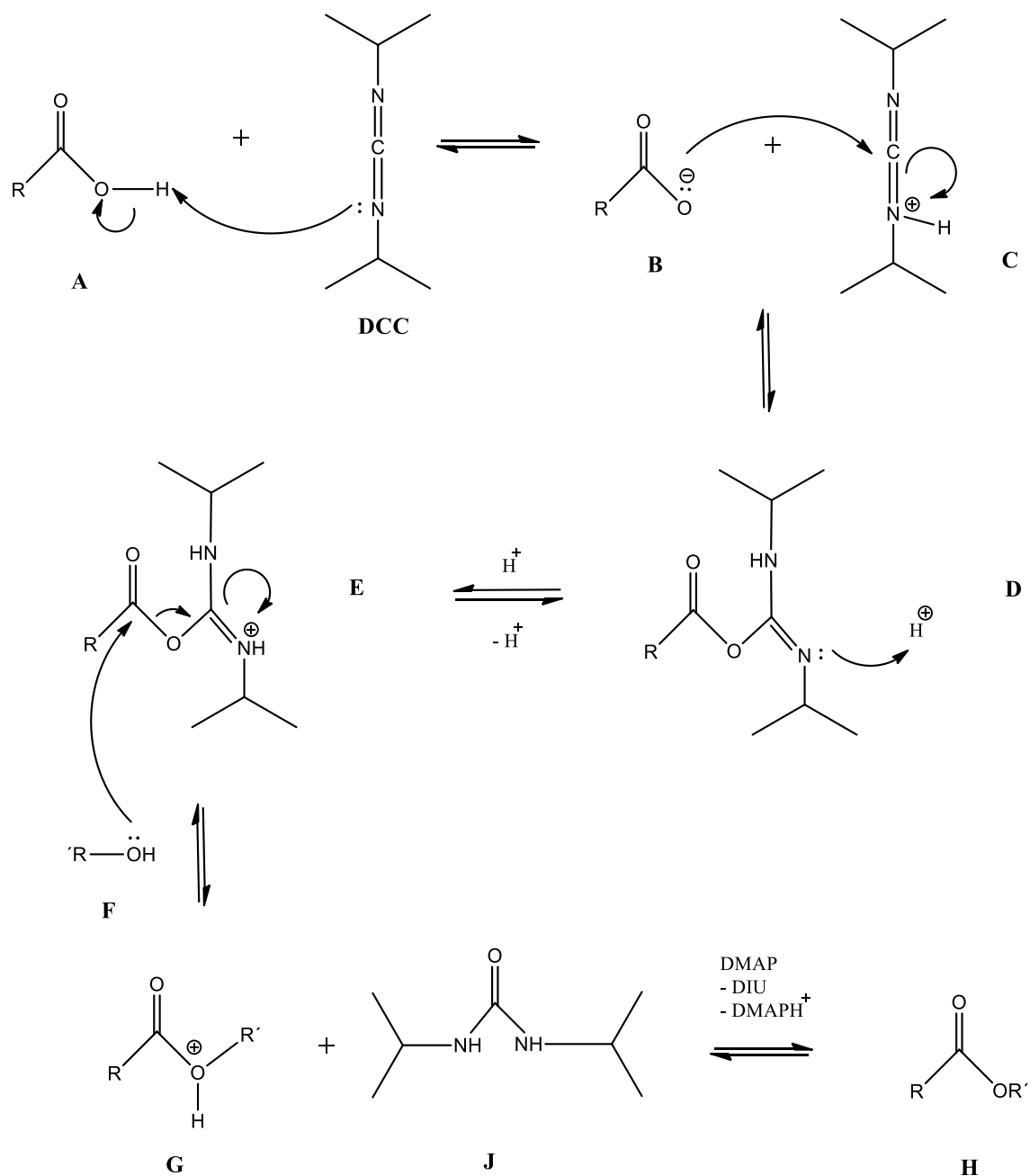
**Figura 7.** Imobilização do ligando de afinidade por ativação da matriz (adaptada de Ayyar *et al.*, 2012).

A ligação ligando-matriz pode ser realizada por vários métodos disponíveis. A escolha correta do método de imobilização depende das características do ligando. É importante salientar que não é necessário ligar uma grande quantidade de ligando para produzir um meio de afinidade eficiente. Uma alta concentração de ligando imobilizado é suscetível de ter efeitos adversos, ou seja, a eficiência da ligação pode ficar comprometida devido ao impedimento espacial entre os locais ativos, particularmente importantes quando moléculas grandes, tais como anticorpos, antígenos e enzimas interagem com pequenos ligandos. As biomoléculas a purificar também podem ficar fortemente ligadas ao ligando tornando a eluição difícil. Por fim, para concentrações muito elevadas de ligando podem aumentar as ligações não específicas, reduzindo assim a seletividade do meio (GE Healthcare, 2007).

De um modo geral, a imobilização de corantes reativos em matrizes, é frequentemente realizada por reação direta entre os grupos hidroxilo da matriz e os grupos presentes nas moléculas do corante (Denizli *et al.*, 2001). Por exemplo, os ligandos que apresentam ácidos carboxílicos na sua estrutura podem ser imobilizados em matrizes hidroxílicas através de um método de esterificação. A título de exemplo esterificações via ácidos de Lewis, de Brønsted ou recorrendo a carbodiimidas, são suscetíveis de serem utilizadas (Otera *et al.*, 2010).

No presente trabalho, tendo em conta o grupo carboxílico presente no ligando, foi utilizado um método de esterificação para promover a ligação à matriz de Sepharose CL-6B, nomeadamente, a esterificação de Steglich. A esterificação de Steglich é uma reação geralmente realizada à temperatura ambiente sem a utilização de condições ácidas ou básicas extremas (Laue *et al.*, 2005). Esta reação consiste basicamente na utilização do reagente de acoplamento, DCC (diciclohexilcarbodiimida), que torna o grupo hidroxilo do ácido carboxílico, um bom grupo abandonante, permitindo a sua substituição (Pilli *et al.*, 2003). O mecanismo da reação está representado no Esquema 1. A primeira etapa desta reação consiste na protonação de um dos azotos da DCC pelo ácido carboxílico A. A DCC, agora com um carbono extremamente eletrofílico, por estar entre dois azotos, um deles positivamente

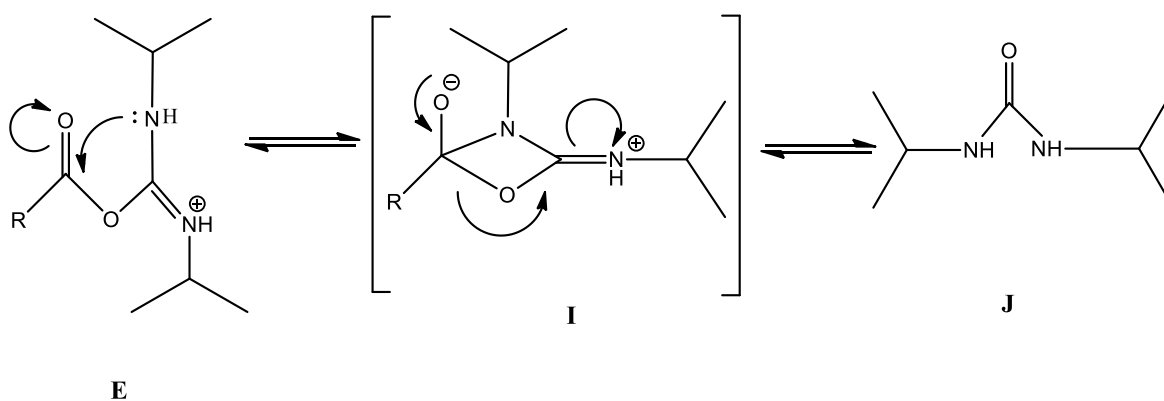
carregado, é atacada pelo carboxilato (**B**) dando origem à *O*-acilisourea **D**. Este intermediário, após uma nova protonação, sofre então uma nova adição nucleofílica por parte do álcool presente na reação, conduzindo à eliminação da *N,N*-diisopropilureia (DIU) (**J**) (excelente grupo abandonante) e à formação do éster **H**. Um dos maiores problemas desta reação é a separação da DIU (**J**) formada na reação, durante a purificação do éster desejado (Rodrigues, 2011).



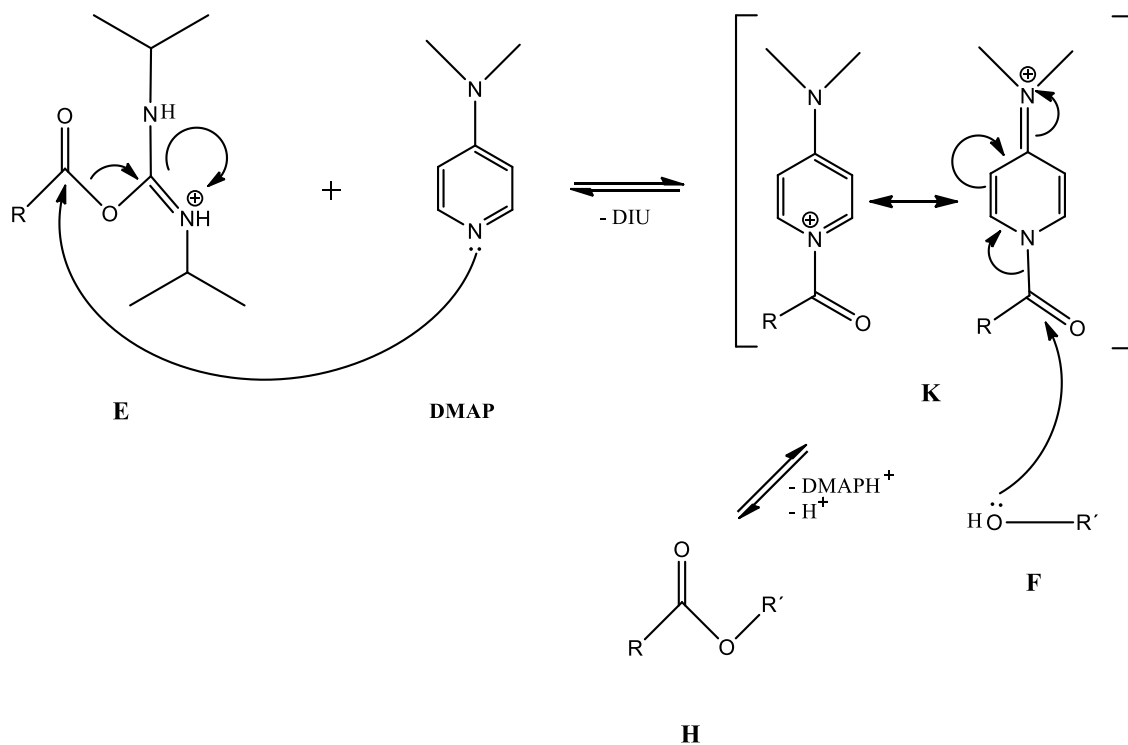
Esquema 1. Esterificação de Steglich (adaptado de Rodrigues, 2011).

É importante realçar que quando a esterificação é lenta existe a possibilidade de um rearranjo 1,3 do intermediário *O*-acilisoureira (**E**) resultando na *N*-acilisoureira (**J**) impossibilitando, assim, a reação com o álcool (Esquema 2a). Entretanto, a utilização de DMAP pode minimizar esta reação paralela (Esquema 2b), pois esta base substitui o grupo *O*-acilureia como grupo de saída, formando uma nova espécie acilante **K**. Esta nova espécie poderá então reagir com o álcool **F** conduzindo ao éster **H** (Rodrigues, 2011).

a) Rearranjo da *O*-acilisoureira com formação da *N*-acilisoureira



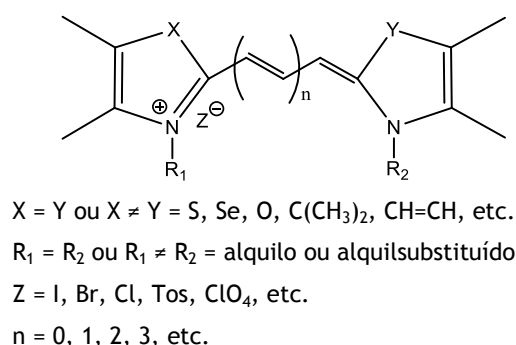
b) Participação da DMAP na esterificação



**Esquema 2.** a) Rearranjo da *O*-acilisoureira para a *N*-acilisoureira; b) Participação da DMAP na esterificação (adaptada de Rodrigues, 2011).

## 1.2 Cianinas e os sais de 2-metilbenzotiazole

Os corantes cianínicos, ou simplesmente cianinas, são sais monoácidos nos quais dois núcleos heterocíclicos contendo um azoto estão ligados por uma cadeia de ligações duplas conjugadas com um número ímpar de átomos de carbono (Figura 8). Um dos núcleos heterocíclicos funciona como doador e o outro como aceitador de elétrões. Os mais comuns apresentam anéis heterocíclicos de benzotiazole, benzoxazole, benzimidazole, indole e quinolina. No que diz respeito ao comprimento da cadeia,  $n$  pode ser 0, 1, 2, 3 ou mais e são designadas de acordo com o número de átomos de carbono da cadeia conjugada: cianinas ou monometinocianinas ( $n=0$ ), carbocianinas ou trimetinocianinas ( $n=1$ ), dicarbocianinas ou pentametinocianinas ( $n=2$ ), tricarbocianinas ou heptametinocianinas ( $n=3$ ), e assim sucessivamente (Almeida, 1999; Panigrahi *et al.*, 2012).



**Figura 8.** Estrutura geral das cianinas (adaptada de Almeida, 1999).

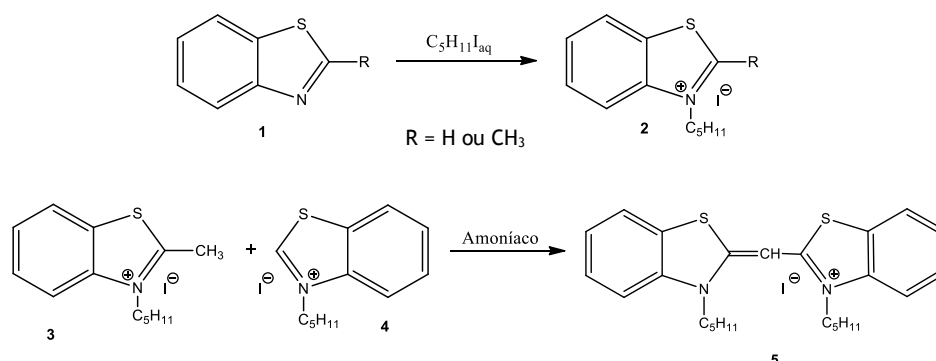
Em 1856, W. H. Perkin marcou a indústria da síntese de corantes com a descoberta da mauveína (Zollinger *et al.*, 1991; Abrahart *et al.*, 1968). No mesmo ano foi acidentalmente obtida, em laboratório, uma substância colorida preparada por Greville Williams, designada cianina por apresentar cor azul (do grego *Kyanos*, azul escuro) (Zollinger *et al.*, 1991). Desde então, o termo cianina tornou-se o nome geral deste grupo de corantes apesar de apresentarem um infindável número de cores, dependendo das suas características estruturais.

Desde então, as cianinas têm sido usadas para um conjunto variado de aplicações, nomeadamente, na fotografia, com sensibilizadores fotográficos à luz, não só visível, mas também no infravermelho, isto é, fotografia noturna; na terapia fotodinâmica (PDT), como marcadores para biomoléculas, incluindo proteínas específicas do HIV-1; como reagentes em análises químicas, nomeadamente como indicadores em titulações ácido-base e, até mesmo, como ligandos em CA, entre inúmeras outras (Almeida, 1999).

Em 1887, Hofmann durante as tentativas na síntese de corantes cianínicos (5), foi capaz de isolar iodetos de alquilo do benzotiazole e do 2-metilbenzotiazole através da reação do



benzotiazole (1; R=H) ou do 2-metilbenzotiazole (1; R=CH<sub>3</sub>) com o 1-iodopentano, como representado no Esquema 3 (Hofmann, 1887; Munawar *et al.*, 2011).



Esquema 3. Sínteses de Hofmann (adaptado de Munawar *et al.*, 2011).

### 1.2.1 Suportes cianínicos em CA

Várias cianinas têm sido objeto de investigação como ligandos específicos em CA (Pardal *et al.*, 2001; Boto *et al.*, 2008, 2009; Silva *et al.*, 2013). Nestes estudos foi demonstrada a interação seletiva de afinidade entre os corantes cianínicos e as diferentes proteínas, resultado de múltiplas interações nomeadamente eletrostáticas, ligações de hidrogénio, hidrofóbicas, interações de van der Waals e  $\pi$ - $\pi$ . As grandes vantagens da utilização destes ligandos sintéticos resultaram, por um lado, da facilidade de imobilização a uma variedade de matrizes através dos seus grupos funcionais e, por outro lado, após a otimização do método de ligação, de serem resistentes à degradação química e biológica e poderem ser armazenados e reutilizados (Pardal *et al.*, 2002a; Labrou 2003).

### 1.2.2 Sais de 2-metilbenzotiazole como potenciais ligandos em CA

Os sais quaternários de amónio são os precursores de praticamente todas as cianinas e a sua síntese é possível pela reação de uma base heterocíclica com um reagente alquilante adequado (Pardal *et al.*, 2002b). Como referido, foi anteriormente demonstrado o potencial dos corantes cianínicos como ligandos de afinidade (Pardal *et al.*, 2001; Boto *et al.*, 2008, 2009; Silva *et al.*, 2013). No entanto, desconhecendo-se a contribuição dos diferentes constituintes das cianinas, nomeadamente, o sal do núcleo heterocíclico carregado positivamente (interações iónicas), a cadeia *N*-alquílica (interações hidrofóbicas) e o anel heteroaromático ( $\pi$ - $\pi$ ), foi aqui estudado a contribuição do sal de 2-metilbenzotiazole como ligando cromatográfico mais simples que os seus congéneres cianínicos.

O sal de 2-metilbenzotiazole utilizado neste trabalho é de síntese fácil, de baixo custo, apresenta na sua estrutura um longo braço espaçador e um grupo carboxílico que torna este ligando sintético potencialmente adequado para a imobilização numa matriz com estudos cromatográficos posteriores.

## CAPÍTULO II.

---

## PARTE EXPERIMENTAL

## 2.1 Materiais, solventes e reagentes

Os reagentes DCC e DMAP e os solventes *N,N*-dimetilformamida (DMF), metanol, etanol, diclorometano e éter dietílico foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Os solventes utilizados, e sempre que necessário, foram secos sobre peneiros moleculares 4Å. A celulose microcristalina em pó, a celulose em esferas ST 50-75 µm e a Sepharose CL-6B foram adquiridas à Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA), Iontosorb (Ústí nad Labem, República Checa) e GE Healthcare Life Sciences (Uppsala, Suécia), respetivamente.

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada purificada num sistema de purificação Milli-Q da Millipore Systems (Bedford, Massachusetts). O cloreto de sódio (NaCl), o sulfato de amónio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], o tris(hidroximetil)aminometano (Tris), o azul de bromofenol, o ditiotretol (DTT) e todas as proteínas utilizadas foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). A solução a 30% de acrilamida/bis-acrilamida e as colunas cromatográficas de polipropileno econo-pac foram adquiridas à BioRad (Hercules, Califórnia). O NZYColour Protein Marker II foi adquirido à NZYTech (Lisboa, Portugal). O dodecil sulfato de sódio (SDS) e o glicerol foram adquiridos à Himedia (Mumbai, Índia). O persulfato de amónio (PSA) foi adquirido à Eurobio (Courtaboeuf, França) e a *N,N,N',N'*-tetrametiletilenodiamina (TEMED) foi adquirida à Merck (Darmstadt, Alemanha) e os concentradores Vivaspin® 6 à Sartorius Stedim Biotech (Goettingen, Alemanha).

## 2.2 Instrumentação

A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada fina (c.c.f.) utilizando placas de sílica Merck Kieselgel GF<sub>254</sub> com 0,2 mm de espessura. O eluente consistiu numa mistura de 10% de metanol em diclorometano. Após a eluição e secagem das placas, estas foram visualizadas à luz ultravioleta de comprimento de onda (c.d.o) de 254 nm.

Os pontos de fusão foram determinados em tubos capilares abertos, num aparelho medidor de ponto de fusão Büchi 530 e não foram corrigidos.

Os espectros de infravermelho (IV) por refletância total atenuada (ATR) foram efetuados num espectrofotómetro Thermoscientific Nicolet iS10: smart iTR equipado com diamante. Para a aquisição dos dados de ATR, foi colocada uma amostra sobre o diamante e o espectro foi registado. No espectro de IV são indicadas a frequência do máximo de uma banda de absorção ( $\nu_{\max}$  em cm<sup>-1</sup>) e, caso se justifique, a atribuição dessa banda a um grupo de átomos relevante na molécula.

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e RMN de <sup>13</sup>C foram efetuados num espetrómetro Bruker Avance 400 MHz e processados com o software TOPSPIN 3.1 (Fitchburg, Wisconsin, EUA), utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*<sub>6</sub>) como

solvente (RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz e RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz). Nos dados de RMN de  $^1\text{H}$  são indicados o desvio químico ( $\delta$  em ppm), o número de prótons a que corresponde o sinal, a multiplicidade do sinal [singleto (s), duplete (d), tripleto (t), multiplete (m)], o valor da constante de acoplamento ( $J$  em Hz) e a atribuição do sinal aos prótons correspondentes. Nos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  são indicados o desvio químico ( $\delta$  em ppm) e a atribuição do carbono na molécula.

Os suportes obtidos foram secos num forno de vidro de secagem Büchi TO-51, sob pressão reduzida e na presença de pentóxido de fósforo. As análises quantitativas dos suportes obtidos foram realizadas por análise elementar (AE) num analisador elementar Carlo-Erba modelo CHNS EA-1108 (Milão, Itália).

As análises qualitativas e semi-quantitativas dos suportes obtidos foram efetuadas pela realização de imagens de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e pelo mapeamento de enxofre, por espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS). As imagens de microscopia eletrónica de varrimento e o EDS foram realizadas num microscópio eletrónico de varrimento HITACHI S4100 (Tóquio, Japão) equipado com um espectrómetro de energia dispersiva RONTEC UHV, utilizando amostras polidas.

As absorvâncias foram medidas num espectrofotómetro UV-Vis Thermo Fisher Scientific model Evolution 160 (Madison, Wisconsin, EUA) com células de quartzo, após a recolha das frações resultantes dos ensaios cromatográficos. O aparelho utilizado para aplicação de potencial elétrico foi o PowerPac<sup>TM</sup> HC power supply - Bio-Rad (Hercules, Califórnia, EUA).

### 2.3 Síntese do brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-metilbenzotiazol-3-io

Uma mistura de 2,35 g de 2-metilbenzotiazole (2,0 mL, 15,7 mmol) e 4,66 g de ácido 11-bromoundecanóico (17,6 mmol) foi aquecida a 150 °C durante 24 h. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, o sólido obtido foi triturado num almofariz de porcelana. Adicionou-se éter dietílico ao pó assim obtido, lavou-se, recolheu-se por filtração sob pressão reduzida e recristalizou-se de acetonitrilo seco. Rendimento: 68%. P.f. 168-170 °C; IV ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 2913, 2850, 1717 (C=O), 1172, 778; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,25-1,34 (10H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1,39-1,49 (4H, m, 3- $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$ , 3- $\text{N}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2$ ), 1,80-1,88 (2H, m, 3- $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 2,18 (2H, t,  $J = 7,3$  Hz,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 3,22 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ ), 4,71 (2H, t,  $J = 7,8$  Hz, 3- $\text{NCH}_2$ ), 7,80 (1H, t,  $J = 8,3$  Hz, 6-CH), 7,90 (1H, t,  $J = 7,3$  Hz, 5-CH), 8,35 (1H, d,  $J = 8,3$  Hz, 4-CH), 8,47 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, 7-CH); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 16,9 (2- $\text{CH}_3$ ), 24,4 ( $\text{CH}_2$ ), 26,0 ( $\text{CH}_2$ ), 27,8 ( $\text{CH}_2$ ), 28,5 ( $\text{CH}_2$ ), 28,6 ( $\text{CH}_2$ ), 28,7 ( $\text{CH}_2$ ), 28,8 (2 $\times\text{CH}_2$ ), 33,9 ( $\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 50,2 (3- $\text{NCH}_2$ ), 117,0 (4-CH), 124,9 (7-CH), 128,6 (6-CH), 129,3 (7a-C), 129,7 (5-CH), 141,0 (3a-C), 175,6 (CO), 177,1 (2-C).

O brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-metilbenzotiazol-3-íio (aqui designado como ligando ou sal de 2-metilbenzotiazole) foi sintetizado de acordo com um procedimento já descrito e os dados espectroscópicos obtidos estão de acordo com a literatura (Boto *et al.*, 2007a).

## 2.4 Estudo de métodos de imobilização para a obtenção de novos suportes cromatográficos

Para a imobilização do ligando a uma matriz, foram testados vários métodos de imobilização e avaliadas diferentes matrizes. Após a imobilização e independentemente do método de imobilização utilizado, as matrizes derivatizadas foram lavadas sequencialmente com várias porções de DMF e metanol e submetidas à extração de Soxhlet com os mesmos solventes e na mesma ordem. As amostras resultantes foram então secas durante pelo menos 24 h a 50 °C, sob pressão reduzida na presença de pentóxido de fósforo. A percentagem de azoto foi quantificada por AE.

### 2.4.1 Celulose microcristalina

Foi realizado um estudo preliminar dos diferentes métodos de imobilização, descritos a seguir, com celulose microcristalina. Esta foi previamente seca durante pelo menos 24 h a 80 °C, sob pressão reduzida na presença de pentóxido de fósforo.

#### 2.4.1.1 Método de cura

Uma mistura de celulose microcristalina (1,0 g, 18,39 equiv. OH) e de 2-metilbenzotiazole (0,125-1,00 g, 0,30-2,41 mmol) na ausência de catalisador, ou com cloreto de zinco ou hipofosfito de sódio hidratado (0,5% em peso), foi transferida para um tubo de silicato, humedecida com 1 mL de DMF e coberta com uma folha de alumínio perfurada. A mistura resultante foi então inserida no vaso reacional e aquecida sob vácuo, variando a concentração de ligando, a temperatura máxima e o tempo de aquecimento. Estas variações são discutidas a seguir no Capítulo III.

##### 2.4.1.1.1 Método de cura com DMF/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Uma mistura de celulose microcristalina (1,0 g, 18,39 equiv. OH) e de 2-metilbenzotiazole (0,125-1,00 g, 0,30-2,41 mmol) foi transferida para um tubo de silicato, humedecida com 1 mL de DMF/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1%, 2,5% e 5% (v/v) e coberta com uma folha de alumínio perfurada. A mistura resultante foi então inserida no vaso reacional e aquecida sob vácuo, variando a concentração de ligando, temperatura máxima e o tempo de aquecimento. Estas variações são discutidas a seguir no Capítulo III.

#### 2.4.1.1.2 Método de cura com DMF/TsOH

Uma mistura de celulose microcristalina (1,0 g, 18,39 equiv. OH) e de sal de 2-metilbenzotiazole (0,125-1,00 g, 0,30-2,41 mmol) foi transferida para um tubo de silicato, humedecida com 1 mL de DMF/TsOH a 5%, 10% e 20% (m/v) e coberta com uma folha de alumínio perfurada. A mistura resultante foi então inserida no vaso reacional e aquecida sob vácuo, variando a concentração de ligando, temperatura máxima e o tempo de aquecimento. Estas variações são discutidas a seguir no Capítulo III.

#### 2.4.1.2 Método do cloreto de tionilo

Uma mistura de sal de 2-metilbenzotiazole (0,125-1,00 g, 0,30-2,41 mmol) e cloreto de tionilo (0,50-1,0 mL, 6,88-13,77 mmol) foi refluxada durante 4 h. Em seguida, evaporou-se à secua obtendo-se um óleo ao qual se adicionou a celulose microcristalina (1,0 g, 18,39 equiv. OH), a DMF (1-10 mL) e aqueceu-se novamente a mistura resultante durante 4 h a 80 °C.

#### 2.4.1.3 Método da DCC com piridina ou DMAP

A uma mistura de celulose microcristalina (1,0 g, 18,39 equiv. OH) e de sal de 2-metilbenzotiazole (0,125-1,00 g, 0,30-2,41 mmol) adicionou-se piridina ou DMAP (0,1 e 0,2 equivalente molar), DCC (2,0 equivalentes molares) e DMF (15 mL). A mistura resultante foi mantida sob agitação suave variando os tempos reacionais e o número de ciclos de adição dos catalisadores.

### 2.4.2 Celulose em esferas

À semelhança da celulose microcristalina, a celulose em esferas foi previamente seca pelo menos durante 24 h a 80 °C, sob pressão reduzida na presença de pentóxido de fósforo. Posteriormente, avaliou-se a esterificação com DCC/DMAP (esterificação de Steglich) na matriz de celulose em esferas, após otimização como método de imobilização.

#### 2.4.2.1 Esterificação de Steglich

A uma mistura de celulose em esferas (1,0 g, 18,39 equiv. OH) e de sal de 2-metilbenzotiazole (1,00 g, 2,41 mmol) adicionou-se DMAP (0,2 equivalente molar), DCC (2,0 equivalentes molares) e DMF (15 mL). A mistura resultante foi mantida sob agitação suave durante cerca de 96 h à temperatura ambiente, tendo-se adicionado mais duas vezes as mesmas quantidades de DMAP/DCC após 2 h e 4 h de reação, respetivamente.

A celulose em esferas derivatizada assim obtida foi sequencialmente lavada com grandes volumes de DMF e metanol para remover o excesso de ligando e, em seguida, foi submetida à extracção em Soxhlet com os mesmos solventes, durante aproximadamente 24 h. A celulose foi armazenada a 25 °C em água desionizada.

As amostras de controlo de celulose em esferas foram submetidas às mesmas condições mas na ausência do sal de 2-metilbenzotiazole.

### 2.4.3 Sepharose CL-6B

A Sepharose CL-6B foi sucessivamente lavada num funil de vidro sinterizado, de placa porosa, com várias porções de etanol e éter dietílico. Em seguida, a Sepharose CL-6B foi seca pelo menos durante 24 h a 80 °C, sob pressão reduzida na presença de pentóxido de fósforo. Esta matriz foi submetida à esterificação de Steglich, método de imobilização anteriormente descrito para a celulose em esferas.

#### 2.4.3.1 Esterificação de Steglich

A uma mistura de Sepharose (1,0 g) e de sal de 2-metilbenzotiazole (0,125-1,00 g, 0,30-2,41 mmol) adicionou-se DMAP (0,2 equivalente molar), DCC (2,0 equivalentes molares) e DMF (15 mL). A mistura resultante foi mantida sob agitação suave durante cerca de 96 h à temperatura ambiente, tendo-se adicionado mais duas vezes as mesmas quantidades de DMAP/DCC após 2 h e 4 h de reação, respetivamente. Utilizando o mesmo procedimento e de forma a avaliar o desempenho cromatográfico do braço espaçador, foi igualmente imobilizado o ácido 11-bromoundecanóico (0,125-1,00 g, 0,47-3,77 mmol) em Sepharose CL-6B.

Os suportes obtidos pela derivatização da Sepharose CL-6B foram sequencialmente lavados com DMF e metanol para remover o excesso de ligando e, em seguida, foram submetidos à extração em Soxhlet com os mesmos solventes, durante aproximadamente 24 h. Os suportes foram armazenados a 25 °C em água desionizada.

Os brancos, que funcionaram como suportes de controlo, foram submetidos às mesmas condições mas na ausência de ligando.

## 2.5 Avaliação dos suportes em CA

Os suportes utilizados nestas experiências foram preparados de acordo com as condições descritas no método da esterificação de Steglich e com diferentes densidades de ligando. Todos os ensaios foram acompanhados com o suporte de controlo.

Os suportes resultantes modificados com o sal de 2-metilbenzotiazole foram posteriormente estudados como suportes específicos para CA.

As proteínas modelo utilizadas nos ensaios foram a lisozima (PM 14,7 kDa, pl 11,0-11,2),  $\alpha$ -quimotripsina (PM 25 kDa, pl 8,7), BSA (PM 66 kDa, pl 4,7) e RNase (PM 13,7 kDa, pl 7,8). Em cada etapa cromatográfica foram recolhidas frações de 1 mL, após às quais foi monitorizada a absorvância a 280 nm num espectrofotómetro de UV-Vis. Finalmente, se

necessário as frações recolhidas foram concentradas e dessalinizadas em concentradores Vivaspín® 6. As amostras foram conservadas a 4 °C para posterior análise.

### 2.5.1 Ensaios cromatográficos

Prepararam-se soluções padrão de proteína lisozima,  $\alpha$ -quimotripsina, BSA e RNase, com concentrações de 12,5 mg proteína/mL de solução tampão. As soluções de proteína foram preparadas no tampão utilizado para o passo de ligação. Os ensaios cromatográficos foram realizados utilizando as proteínas isoladas e, após uma separação seletiva utilizando uma mistura artificial de proteínas.

A preparação das colunas cromatográficas foi realizada através do empacotamento dos géis em mini-colunas de bancada, à temperatura ambiente, de forma a obter-se um volume de cerca de 1 mL de gel. Após o empacotamento, as colunas foram abundantemente lavadas com água destilada e equilibradas com a fase móvel desejada para o ensaio cromatográfico.

Nestes ensaios também foi avaliada qual a matriz mais adequada para a continuidade dos estudos cromatográficos. Os estudos consistiram nos ensaios cromatográficos quer com matrizes cromatográficas derivatizadas a partir de celulose em esferas, quer a partir de matrizes de Sepharose CL-6B, ambas derivatizadas com o sal de 2-metilbenzotiazole. As matrizes derivatizadas que revelaram o melhor comportamento cromatográfico de ligação/eluição foram as de Sepharose CL-6B. Assim, a continuidade dos estudos cromatográficos foi realizada para os suportes derivatizados a partir de uma matriz de Sepharose CL-6B.

### 2.5.2 Ensaios cromatográficos com as proteínas isoladas

#### 2.5.2.1 Na presença de cloreto de sódio

Nos ensaios realizados com as proteínas isoladas (lisozima,  $\alpha$ -quimotripsina, BSA, RNase), 100  $\mu$ L de cada amostra foi injetada na matriz com uma concentração de 12,5 mg/mL de solução tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8. Estes ensaios cromatográficos consistiram nos seguintes passos cromatográficos:

- 1º passo - equilíbrio da coluna com 10 mL de solução tampão de Tris-HCl 10 mM pH 8;
- 2º passo - injeção da solução de proteína nas concentrações indicadas anteriormente;
- 3º passo - injeção de 10 mL de solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 e recolha das frações de 1 mL;
- 4º passo - injeção de 10 mL de solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e recolha das frações de 1 mL.



### 2.5.2.2 Na presença de sulfato de amônio

Nos ensaios realizados com as proteínas isoladas (lisozima,  $\alpha$ -quimotripsina, BSA, RNase), 100  $\mu$ L de cada amostra foi injetada na matriz com uma concentração de 12,5 mg/mL de solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8. Estes ensaios cromatográficos consistiram nos seguintes passos cromatográficos:

- 1º passo - equilíbrio da coluna com 10 mL de solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8;
- 2º passo - injeção da solução de proteína nas concentrações indicadas anteriormente;
- 3º passo - injeção de 10 mL de solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e recolha das frações de 1 mL;
- 4º passo - injeção de 10 mL de solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 e recolha das frações de 1 mL.

### 2.5.3 Ensaios cromatográficos com a mistura artificial de proteínas

Para estes ensaios cromatográficos apenas foi considerada a variação da concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Para estes ensaios cromatográficos preparou-se uma mistura artificial de proteínas (RNase,  $\alpha$ -quimotripsina e BSA) pela junção de 50  $\mu$ L de cada proteína isolada com uma concentração de 12,5 mg/mL de solução tampão  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8. Assim, foram injetados 150  $\mu$ L da mistura artificial na coluna. Estes ensaios cromatográficos consistiram nos seguintes passos cromatográficos:

- 1º passo - equilíbrio da coluna com 10 mL de solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8;
- 2º passo - injeção da solução de proteína nas concentrações indicadas anteriormente;
- 3º passo - injeção de 10 mL de solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e recolha das frações de 1 mL;
- 4º passo - injeção de 10 mL de solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,6 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e recolha das frações de 1 mL;
- 5º passo - injeção de 10 mL de solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 e recolha das frações de 1 mL.

### 2.5.4 Ensaios de reprodutibilidade

Este estudo foi realizado para determinar a reprodutibilidade dos resultados e a estabilidade da coluna. Após meio ano de ensaios cromatográficos, o ensaio 2.5.3 foi repetido 50 vezes.

## 2.6 SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15% foi realizada de acordo com o protocolo do sistema Bio-Rad (Hercules, Califórnia) e após a purificação das frações recolhidas nas experiências de CA.

Estas amostras foram tratadas por adição de 10 µL de tampão de redução (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 25% glicerol, 0,01% azul de bromofenol, 3% DTT), seguidas por incubação a 100 °C durante 8 min. Em seguida, um potencial elétrico de 80 V foi aplicado durante 30 min. Posteriormente, aumentou-se o potencial elétrico para 150 V durante 1 h na presença do tampão de corrida contendo Tris (25 mM), glicina (192 mM), SDS (0,1% p/v) a pH 8,3. Os géis foram corados durante 1,5 h com azul brilhante Coomassie R-250.

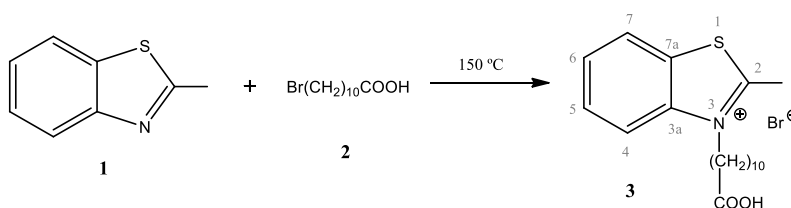
## CAPÍTULO III.

---

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Síntese do brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-metilbenzotiazol-3-io

A síntese do brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-metilbenzotiazol-3-io **3**, aqui designado como ligando ou sal de 2-metilbenzotiazole, teve como objetivo a sua posterior utilização como ligando para estudos de CA. Deste modo, o sal de 2-metilbenzotiazole foi sintetizado por fusão da base heterocíclica [2-metilbenzotiazole (**1**)] com o reagente alquilante [ácido 11-bromoundecanóico (**2**)] a aproximadamente 150 °C durante 24 h (Esquema 4). Os dados espectroscópicos do composto obtido estão de acordo e confirmam a estrutura atribuída (Boto *et al.*, 2007a).



Esquema 4. Síntese do brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-metilbenzotiazol-3-io **3**.

Este sal apresenta duas excelentes características adequadas para um ligando em CA, afigurando-se promissor no prosseguimento deste estudo. Por um lado, a cadeia alquílica constitui um braço espaçador entre a parte aromática do sal e a matriz. A utilização de um braço espaçador vai assegurar que o ligando esteja colocado a uma distância adequada da superfície da matriz, assegurando que ele esteja totalmente acessível para todos os centros de ligação disponíveis numa proteína, o que por sua vez, poderá aumentar potencialmente a afinidade entre a proteína e o ligando (Zou *et al.*, 2001). Por outro lado, a presença de um grupo carboxílico reativo no sal de 2-metilbenzotiazole **3** permite a possibilidade de uma fixação bem-sucedida na matriz, através de uma esterificação entre o referido grupo carboxílico e os grupos hidroxilos da matriz.

### 3.2 Métodos de imobilização

Foram efetuados estudos para a imobilização do sal de 2-metilbenzotiazole **3** na Sepharose CL-6B para a obtenção de potenciais ligandos para CA. A confirmação da ligação do ligando às matrizes foi qualitativamente confirmada por espectroscopia de infravermelho (IV) por refletância total atenuada (ATR), por observação das bandas típicas dos C-H alifáticos (tipicamente entre 3000-2840 cm<sup>-1</sup>) e da banda C=O dos ésteres (tipicamente entre 1790-1650 cm<sup>-1</sup>). Numa fase posterior, nas matrizes de celulose em esferas e Sepharose CL-6B, a percentagem de azoto foi quantificada por AE. Esta técnica baseia-se na quantificação dos átomos de azoto, carbono, hidrogénio e enxofre ou de bromo presentes numa amostra. Uma vez que as matrizes não apresentam azoto na sua constituição, será possível calcular a

quantidade de azoto e, conseqüentemente, de sal de 2-metilbenzotiazole **3** presente, verificando-se então a quantidade de sal de 2-metilbenzotiazole **3** ligado à matriz, de acordo com a seguinte equação (adaptada de Silva *et al.*, 2006):

$$Q = \frac{\% N}{1,4}$$

(mmol de sal de 2-metilbenzotiazole **3**/g suporte)

### 3.2.1 Método de cura

Os estudos iniciaram-se com a metodologia baseada no método de cura já anteriormente utilizado para a fixação da Rodamina B à celulose (Silva *et al.*, 2006) e posteriormente modificado para a derivatização de matrizes cromatográficas de celulose com uma tiacarbocianina possuidora de uma cadeia espaçadora (Boto *et al.*, 2008). Este método consiste numa esterificação promovida pelo aquecimento, a temperaturas superiores a 180 °C (Figura 9), de uma mistura íntima de celulose com o composto a imobilizar (ligando), envolvendo uma condensação direta com eliminação de água.

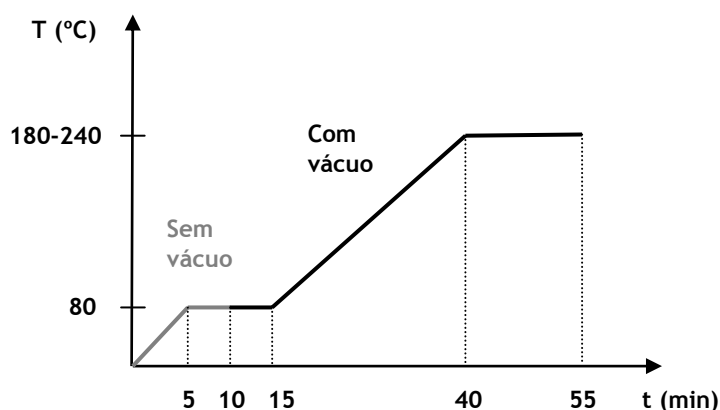


Figura 9. Condições de derivatização de uma matriz pelo método de cura (adaptada de Silva *et al.*, 2006).

O método foi adaptado para a derivatização de matrizes cromatográficas de celulose com o sal de 2-metilbenzotiazole **3**. A mistura de celulose microcristalina com o sal **3** foi aquecida sob vácuo, variando a concentração de ligando, a temperatura máxima utilizada, o tempo de aquecimento e a ausência ou presença de catalisadores (cloreto de zinco ou hipofosfito de sódio hidratado). O ponto de fusão do sal encontra-se compreendido entre 168-170 °C, nas condições de aquecimento utilizadas verificou-se a decomposição do sal. Por outro lado, para um programa de aquecimento a temperaturas inferiores, não se verificou qualquer imobilização na matriz. O uso de catalisadores ou a redução do tempo de exposição do sal, ao programa de aquecimento, resultou igualmente no insucesso da imobilização.

Na tentativa de criar condições para o método de cura ser eficaz na imobilização do sal de 2-metilbenzotiazole **3**, utilizaram-se ainda ácidos fortes de Lewis para tentar melhorar a reação

de esterificação. No entanto, ambos os ácidos utilizados ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{TsOH}$ ) mostraram-se ineficazes na imobilização do sal de 2-metilbenzotiazole **3** à matriz de celulose microcristalina.

### 3.2.2 Método do cloreto de tionilo

A esterificação via cloreto de acilo constitui um método alternativo à esterificação direta. A preparação de cloretos de acilo a partir dos ácidos correspondentes é normalmente efetuada com cloreto de tionilo ( $\text{SOCl}_2$ ). Os cloretos de acilo são mais reativos que os correspondentes ácidos carboxílicos, pelo que teoricamente a reação de adição nucleófila ocorre mais rapidamente e a temperaturas inferiores, evitando deste modo a eventual decomposição do ligando e permite-nos obter mais facilmente o éster. Na prática, e neste caso em concreto também não se verificou sucesso na imobilização do ligando à matriz.

### 3.2.3 Método da DCC com piridina ou DMAP

Na tentativa de obter um método que não envolvesse um processo com temperaturas elevadas como no de cura e em alternativa ao método do cloreto de tionilo, utilizou-se o método de esterificação denominada por Steglich, onde é utilizada DCC na presença de um catalisador. Dos dois catalisadores testados, a piridina revelou-se praticamente ineficaz enquanto a DMAP permitiu a obtenção das matrizes derivatizadas pretendidas. Este método de esterificação mostrou ser eficaz e fácil de ser utilizado com este ligando catiónico. Qualitativamente a ligação foi confirmada pela observação, nos espetros de IV por ATR, das bandas típicas dos C-H alifáticos ( $2914,49$  e  $2849,75\text{ cm}^{-1}$ ) e da banda C=O dos ésteres ( $1736,80\text{ cm}^{-1}$ ), como anteriormente referido e representado na Figura 10, bandas estas que estão ausentes no espetro de IV de celulose microcristalina (Figura 11).

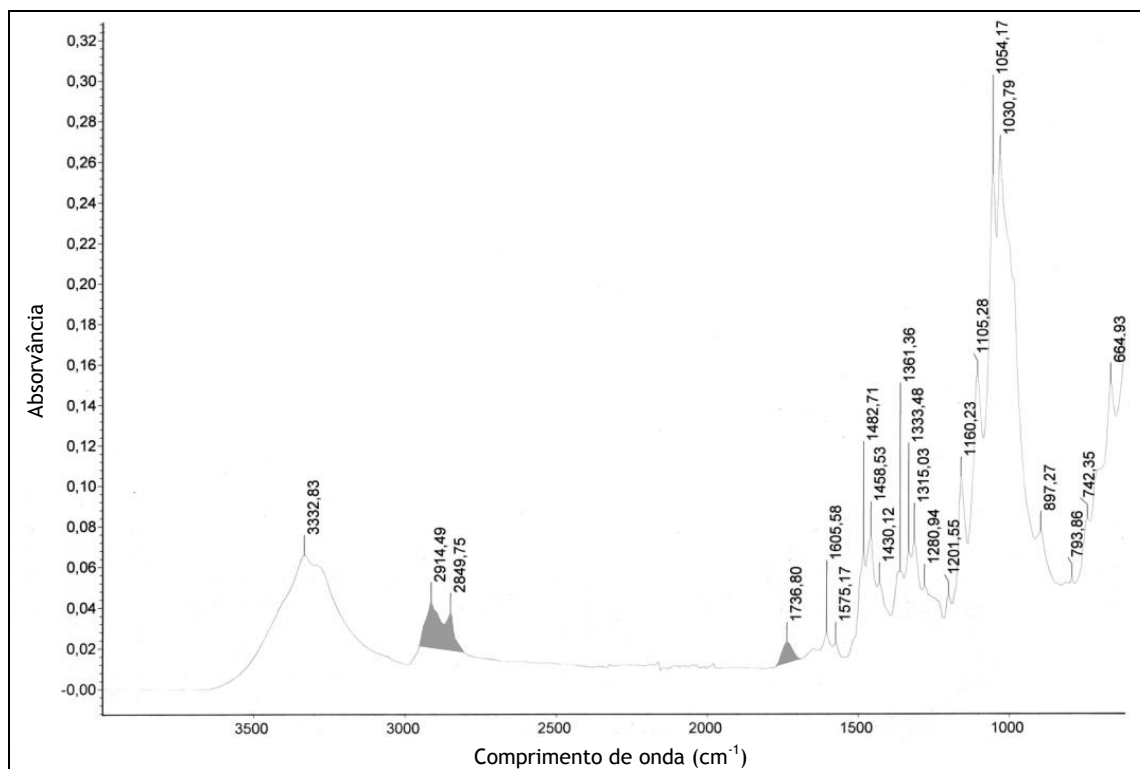


Figura 10. Espectro de ATR da celulose microcristalina derivatizada.

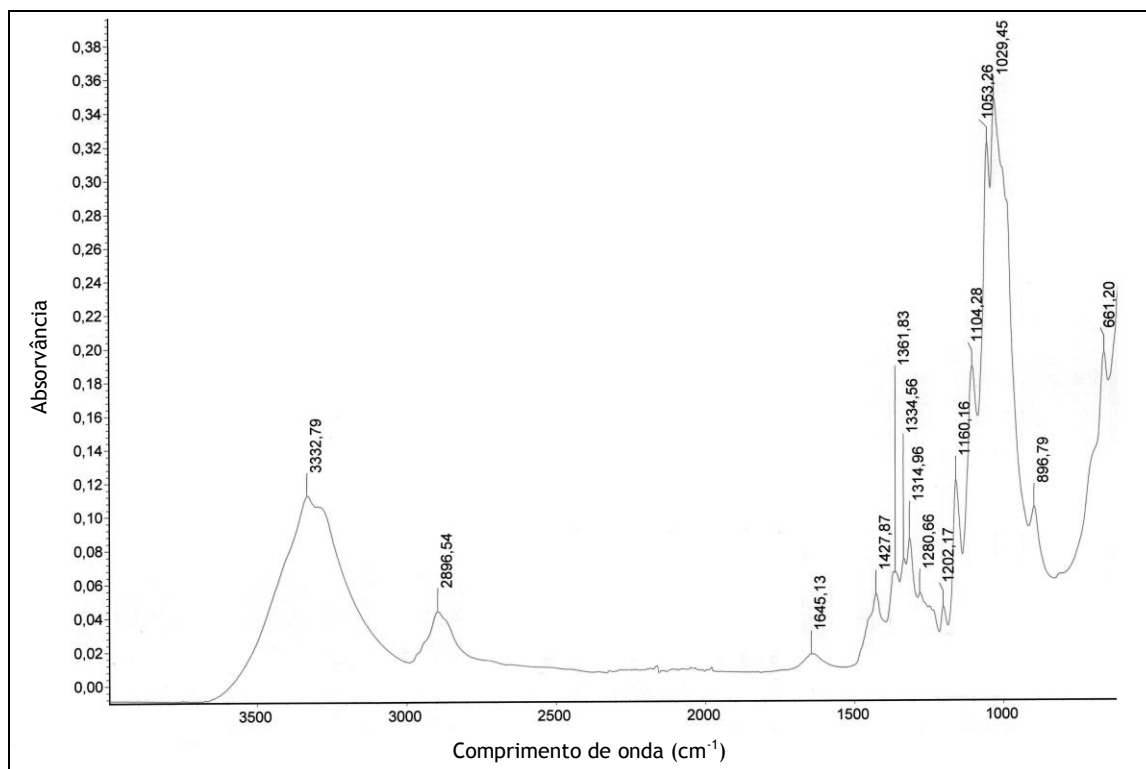


Figura 11. Espectro de ATR da celulose microcristalina.

### 3.3 Suporte de celulose em esferas

No que diz respeito às matrizes utilizadas, a celulose microcristalina foi escolhida para uma avaliação preliminar, uma vez que permitiu uma comparação direta com os resultados obtidos em estudos anteriores (Silva *et al.*, 2006; Boto *et al.*, 2008). Após a escolha do método de imobilização que garantiu a fixação do sal 2-metilbenzotiazole **3** na matriz de celulose microcristalina, nomeadamente a esterificação de Steglich, este foi reproduzido para uma matriz de celulose em esferas. Como era esperado e desejado, verificou-se a reprodutibilidade do método nesta matriz o que permitiu, consequentemente, prosseguir para os estudos em CA, com colunas preparadas com celulose em esferas.

A fixação do ligando na celulose derivatizada foi qualitativamente confirmada pela presença da banda típica dos C-H alifáticos ( $2915,07$  e  $2849,15\text{ cm}^{-1}$ ) e da banda C=O dos ésteres ( $1732,32\text{ cm}^{-1}$ ), pela análise dos espectros de IV por ATR (Figura 12), bandas estas ausentes no espectro de IV de celulose em esferas (Figura 13).

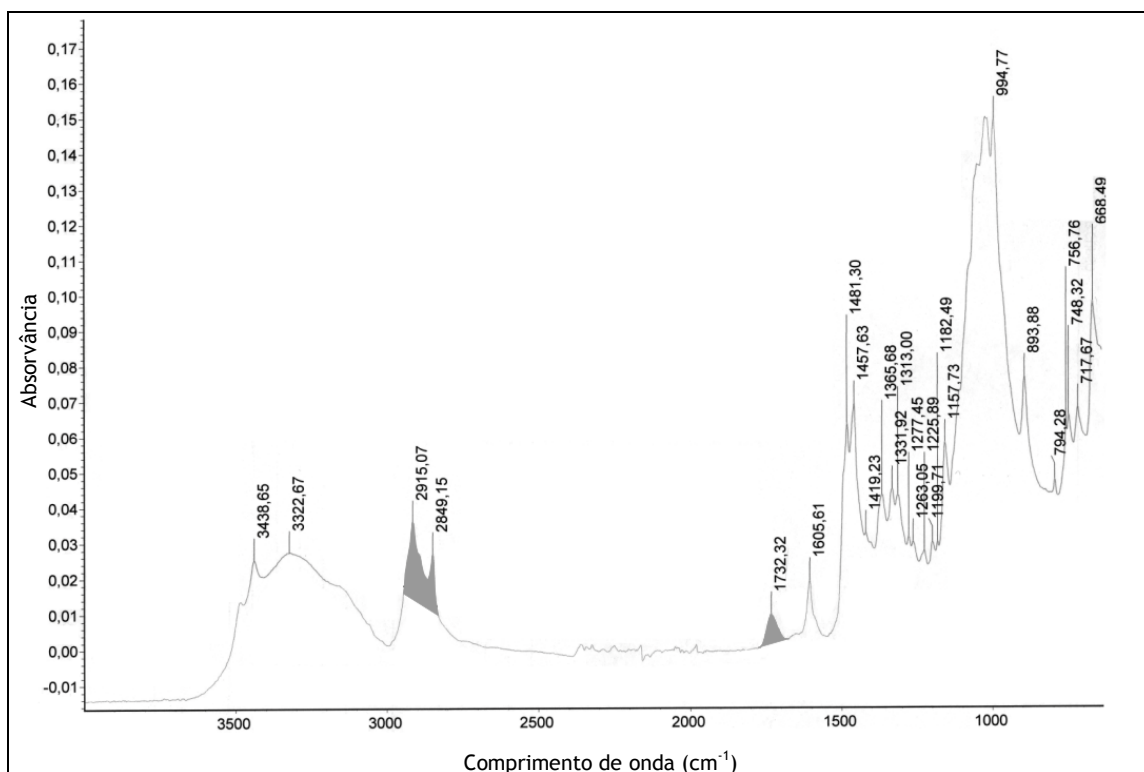


Figura 12. Espectro de ATR da celulose em esferas derivatizada (suporte C1).



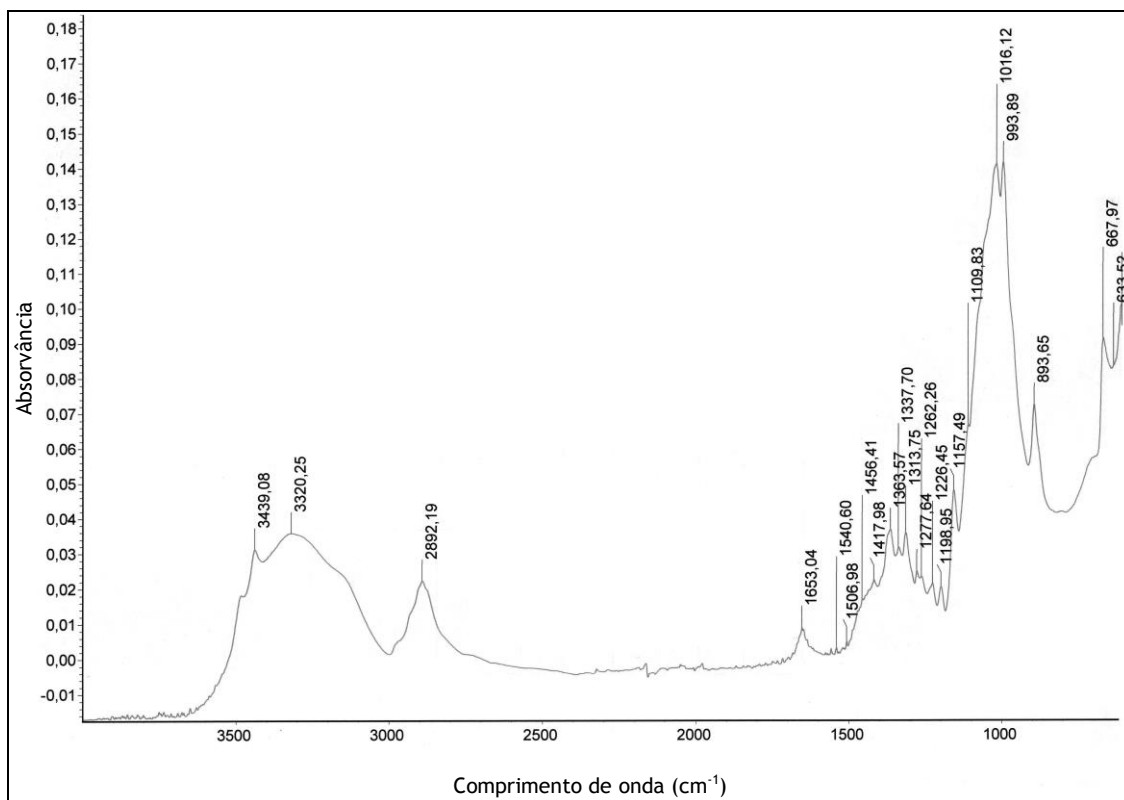


Figura 13. Espectro de ATR da celulose em esferas.

Como descrito em 2.4.2, o suporte derivatizado com o sal de 2-metilbenzotiazole **3** foi obtido pela esterificação de Steglich utilizando uma proporção de 1:1 (%p/p) de sal e celulose em esferas. Este suporte obtido foi submetido a AE para quantificar a percentagem de azoto. Verificou-se neste suporte uma percentagem de azoto de 1,05%, correspondendo a um valor de  $Q$  de 0,75 mmol de ligando/g de suporte, como ilustrado na Tabela 3. Os valores obtidos situam-se aproximadamente na gama de valores obtidos aquando da imobilização de uma tiacarboxianina em celulose em esferas, com valores de  $Q$  compreendidos entre 0,15 e 0,72 mmol de corante/g de celulose corada (Boto *et al.*, 2008).

Tabela 3. Suportes cromatográficos obtidos com a esterificação de Steglich a partir da matriz de celulose em esferas.

Condições constantes	Suportes	Sal de 2-metilbenzotiazole <b>3</b> / celulose (% p/p)	mmol sal de 2-metilbenzotiazole <b>3</b> /g celulose	% N	$Q$
(2 eq. DCC + 0,2 eq. DMAP) × 3 15 mL DMF, 96 horas $T_{\text{ambiente}}$	C1	1:1	2,41	1,05	0,75
	Branco*	-	0,00	<0,07**	-

\* Suporte branco: obtido nas mesmas condições de esterificação de Steglich mas na ausência de sal de 2-metilbenzotiazole **3** sendo utilizado como suporte de controlo.

\*\* Inferior ao limite de deteção do azoto no aparelho de AE (0,07%).

### 3.3.1 Estudos de CA no suporte de celulose em esferas

Os estudos cromatográficos de afinidade foram sempre acompanhados com o respetivo suporte de controlo (ausência do sal de 2-metilbenzotiazole **3**). O estudo das interações de afinidade foi desenvolvido pela realização de ensaios cromatográficos em colunas empacotadas com cada suporte, pretendendo-se verificar a existência de interações entre as proteínas padrão lisozima, BSA,  $\alpha$ -quimotripsina, RNase e o sal de 2-metilbenzotiazole **3**, imobilizado numa matriz de celulose em esferas (Figura 14). Nomeadamente, interações iónicas devido à estrutura catiónica do ligando, interações hidrofóbicas, pela presença de cadeias alquílicas e interações  $\pi$ - $\pi$  pelo anel heteroaromático. Os cromatogramas foram traçados a partir dos valores de densidade ótica obtidos em cada fração, a c.d.o de 280 nm. Estas proteínas foram escolhidas como modelos uma vez que são geralmente utilizadas como proteínas representativas para muitos e diversos estudos bio- e físico-químicos (Boto *et al.*, 2008).

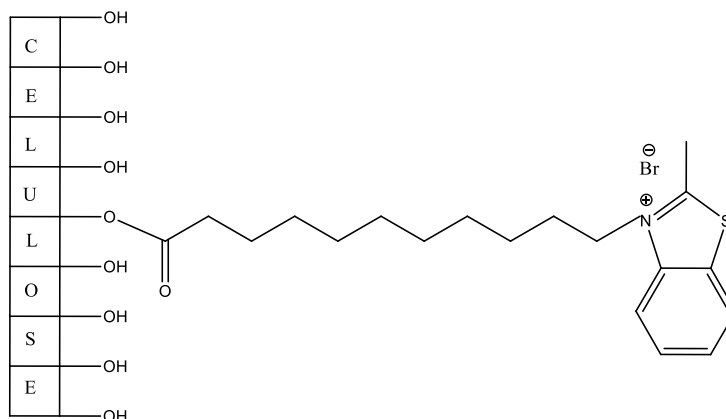
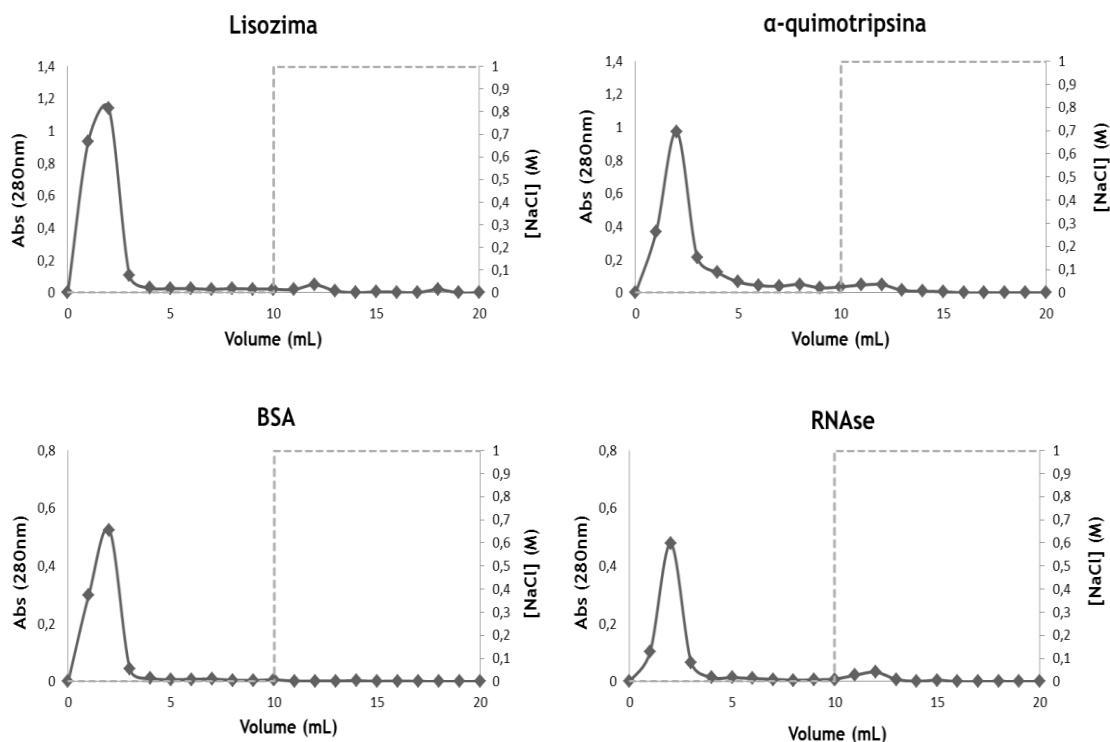


Figura 14. Sal de 2-metilbenzotiazole **3** imobilizado numa matriz de celulose em esferas.

#### 3.3.1.1 Condições iónicas

Os ensaios em CA iniciaram-se pelo estudo das interações iónicas. Para tal, as soluções de proteínas foram preparadas e as colunas foram equilibradas com uma solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 seguindo-se os passos descritos em 2.5.2.1.

Como se pode verificar na Figura 15, e a título representativo, as proteínas não estabeleceram interação com o suporte. Aquando da adição dos 10 mL de solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 as proteínas eluíram na sua totalidade.

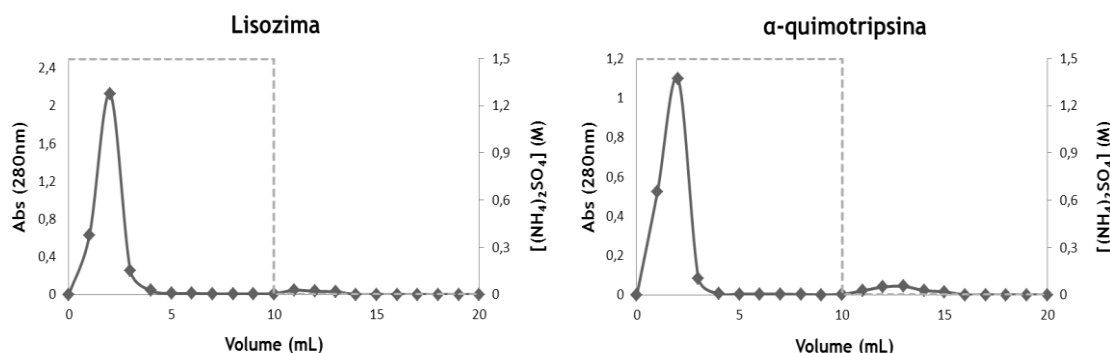


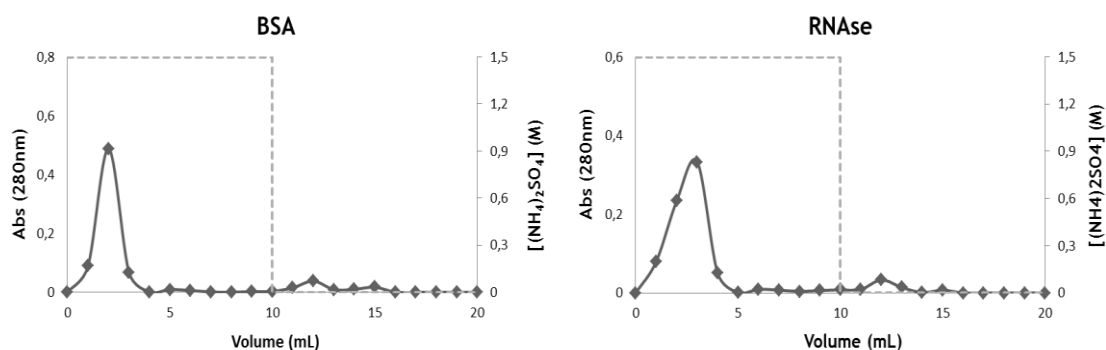
**Figura 15.** Perfil cromatográfico obtido com o suporte C1. Injeção de 100  $\mu$ L de **proteína correspondente** (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).

### 3.3.1.2 Condições hidrofóbicas

Foram realizados ensaios de CA em condições que favorecem as interações hidrofóbicas. Para tal as soluções de proteínas foram preparadas e as colunas foram equilibradas com uma solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 seguindo-se os passos descritos em 2.5.2.2.

Nas condições hidrofóbicas as proteínas revelaram não estabelecer interações com os ligandos presentes na matriz. Como se pode verificar na Figura 16, e a título representativo, ao utilizar-se a solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 as proteínas eluíram na sua totalidade.





**Figura 16.** Perfil cromatográfico obtido com o suporte C1. Injeção de 100  $\mu\text{L}$  de **proteína correspondente** (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).

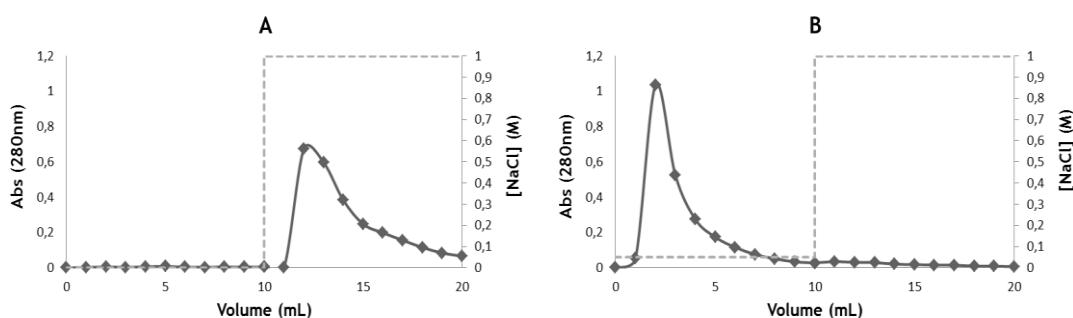
As alterações na força iónica são conseguidas por alteração do tipo e da concentração de sal. No entanto, deve ser tido em conta que concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  acima de 1,5 M podem induzir a precipitação das proteínas.

Como o pH e a força iónica do meio têm um efeito importante e decisivo sobre o equilíbrio de adsorção das proteínas a serem separadas, foi estudado o efeito do pH, variando o mesmo de 4 a 9, na solução tampão. No entanto, não se verificaram melhorias no perfil cromatográfico sendo as alterações do pH ou da força iónica os métodos mais comuns geralmente utilizados para a eluição das proteínas ligadas na coluna de afinidade.

Contrariamente ao esperado, e independentemente das condições utilizadas, as proteínas não estabeleceram qualquer interação com o sal de 2-metilbenzotiazole **3**. Como a concentração de ligando está na gama de concentrações utilizadas nos casos descritos para cianinas, a inexistência de interação das proteínas estudadas com o ligando não deverá ter origem na concentração de ligando utilizada aquando da derivatização da matriz de celulose.

Na tentativa de encontrar outras proteínas que interagissem com o ligando, foram adicionalmente testadas a tripsina (PM 23,8 kDa, pI 10,1-10,5) e a  $\gamma$ -globulina (PM 156 kDa, pI 6,85-6,95), mas os perfis cromatográficos mantiveram-se iguais aos anteriores, isto é, não estabeleceram interações com o ligando.

Relativamente ao suporte de controlo, ele comportou-se como esperado, ou seja, não estabeleceu qualquer interação com as proteínas, exceto no estudo com a lisozima na presença de Tris-HCl 10 mM pH 8. No entanto, ao aplicar-se uma pequena quantidade de NaCl (0,05 M), deixou de existir interação (Figura 17). Isto pode ser explicado pelo facto da solução de Tris promover as interações iónicas com o próprio suporte de celulose, resultado este que foi tido em conta nos estudos subsequentes que serão aqui apresentados.



**Figura 17.** Perfil cromatográfico obtido com o suporte de controle. Injeção de 100  $\mu$ L de lisozima (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão em A: Tris-HCl 10 mM a pH 8 e em B: NaCl 0,05 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8. Para o passo de eluição utilizou-se a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).

Perante estes resultados e as respetivas conclusões, afigurou-se oportuno testar uma matriz diferente. A Sepharose é conhecida por apresentar uma boa estabilidade química e mecânica após a imobilização do ligando, bem como por ter a capacidade de formar uma rede porosa (Subramanian, 1984), transformando a matriz de Sepharose CL-6B, interessante para este estudo. Para além disso, decidiu-se sintetizar vários suportes, com diferentes densidades de ligando e estudar a influência deste parâmetro nos perfis cromatográficos.

### 3.4 Suportes em Sepharose CL-6B

Utilizando como matriz a Sepharose CL-6B e seguindo a metodologia da esterificação de Steglich, descrita em 2.4.3, foram obtidos os suportes derivatizados com diferentes densidades de ligando. Tal como nas derivatizações descritas anteriormente, a fixação do ligando na Sepharose CL-6B derivatizada foi qualitativamente confirmada pela presença da banda típica dos C-H alifáticos ( $2926,79$  e  $2855,62$   $\text{cm}^{-1}$ ) e da banda C=O dos ésteres ( $1712,96$   $\text{cm}^{-1}$ ) pela análise dos espectros de IV por ATR (Figura 18), bandas estas ausentes no espectro de IV de Sepharose CL-6B (Figura 19).

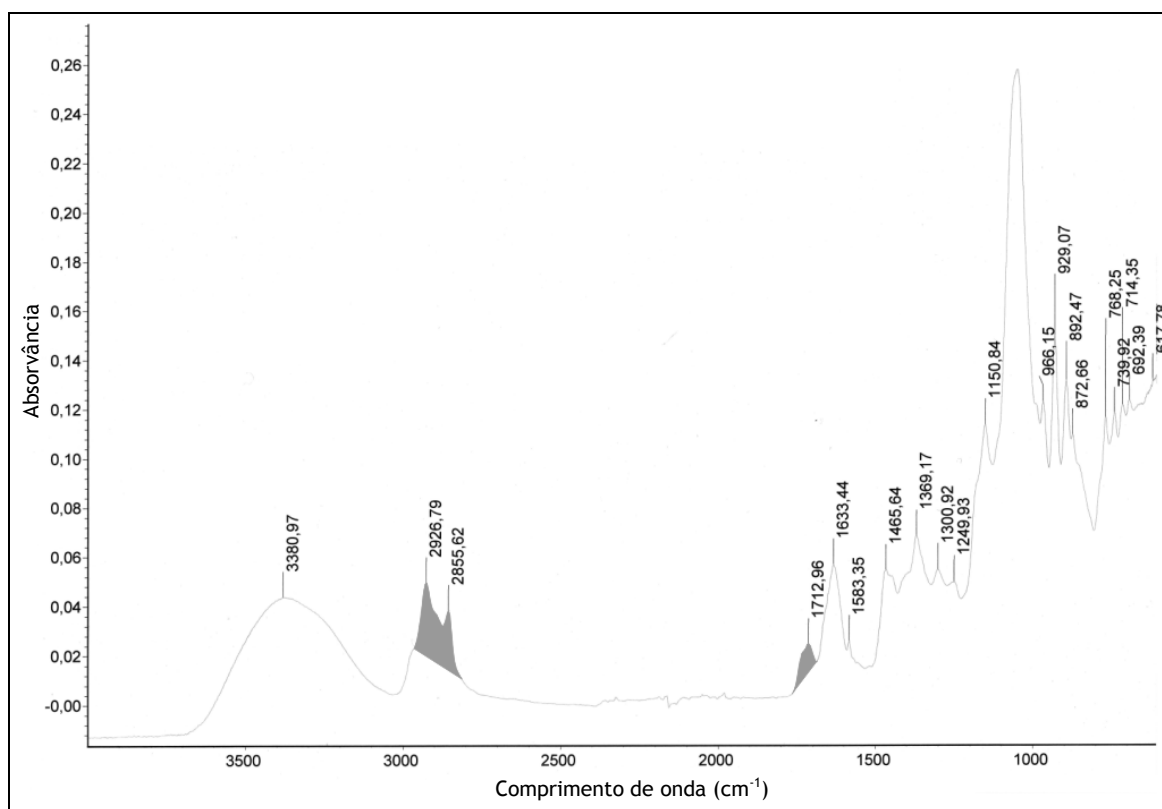


Figura 18. Espectro de ATR da Sepharose CL-6B derivatizada (suporte S1).

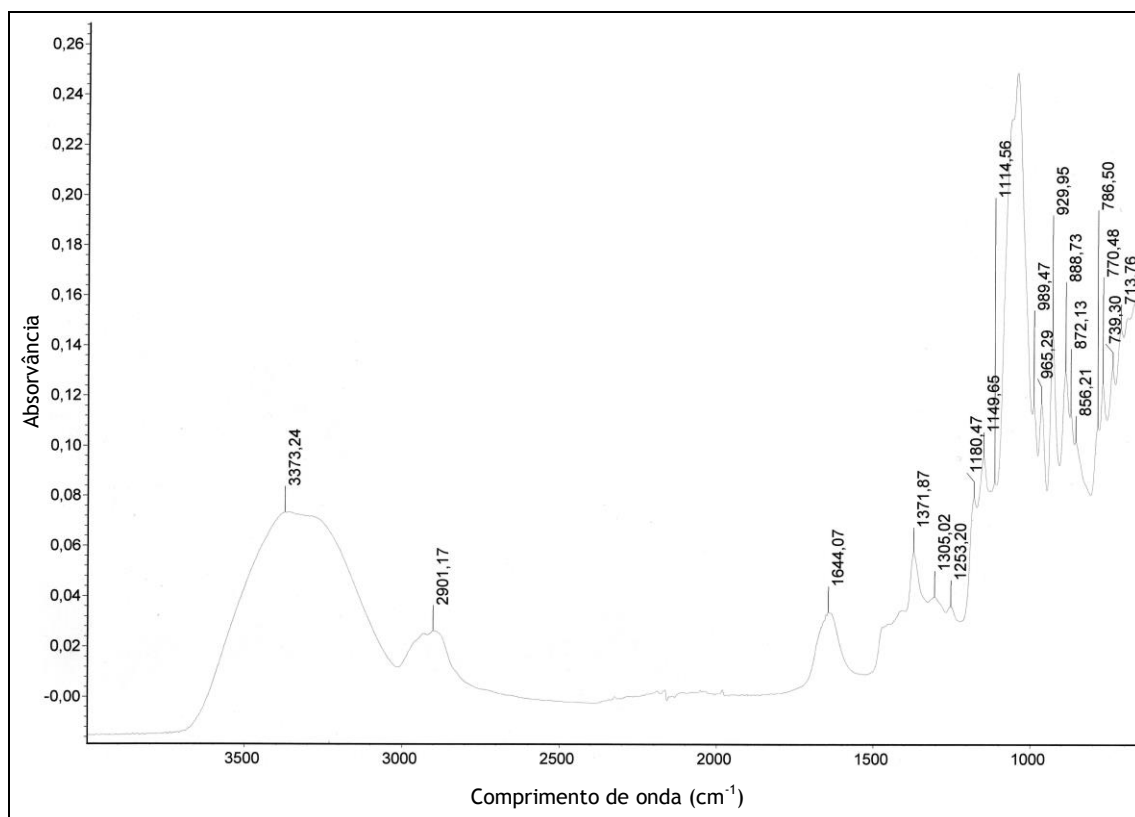


Figura 19. Espectro de ATR da Sepharose CL-6B.

Foram preparados quatro suportes e respetivos suportes de controlo utilizando o processo de derivatização descrito em 2.4.3.

Como já foi referido, a quantidade de ligando imobilizado na Sepharose CL-6B foi calculada a partir da percentagem de azoto, determinada por AE. Cada experiência de imobilização foi acompanhada por um suporte de controlo, obtido nas mesmas condições de esterificação de Steglich mas na ausência de sal de 2-metilbenzotiazole **3**, e a quantidade de azoto estava abaixo do limite de deteção para todos os brancos (inferior a 0,07%) permitindo concluir que todo o azoto é de facto proveniente do ligando.

**Tabela 4.** Suportes cromatográficos obtidos com a esterificação de Steglich a partir do sal de 2-metilbenzotiazole **3** numa matriz de Sepharose CL-6B.

Condições constantes	Suportes	Sal de 2-metilbenzotiazole <b>3</b> / Sepharose CL-6B (% p/p)	mmol de sal de 2-metilbenzotiazole <b>3</b> / g Sepharose CL-6B	% N	Q
(2 eq. DCC + 0,2 eq. DMAP) × 3 15 mL DMF, 96 horas T <sub>ambiente</sub>	S1	1:1	2,41	0,53	0,38
	S2	1:2	1,21	0,50	0,36
	S3	1:4	0,60	0,34	0,24
	S4	1:8	0,30	0,25	0,18
	Branco*	-	0,00	<0,07**	-

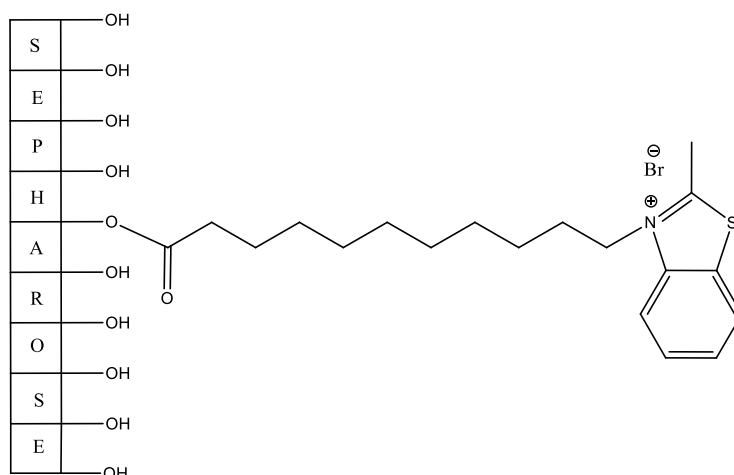
\* Suportes brancos: obtidos nas mesmas condições de esterificação de Steglich mas na ausência de sal de 2-metilbenzotiazole **3** sendo utilizados como suportes de controlo.

\*\* Inferior ao limite de deteção do azoto no aparelho de AE (0,07%).

### 3.4.1 Estudos de CA nos suportes de Sepharose CL-6B

Tal como anteriormente descrito para a celulose em esferas, foi estudado o conjunto de matrizes de Sepharose CL-6B derivatizadas com o sal de 2-metilbenzotiazole **3** e os respetivos suportes de controlo (ausência do sal de 2-metilbenzotiazole **3**).

O estudo das interações de afinidade foi desenvolvido pela realização de ensaios cromatográficos em colunas empacotadas com cada suporte, pretendendo-se verificar a existência de interações entre as proteínas padrão lisozima, BSA,  $\alpha$ -quimotripsina, RNase e o sal de 2-metilbenzotiazole **3**, imobilizado em diferentes proporções numa matriz de Sepharose CL-6B (Figura 20).



**Figura 20.** Sal de 2-metilbenzotiazole **3** imobilizado numa matriz de Sepharose CL-6B.

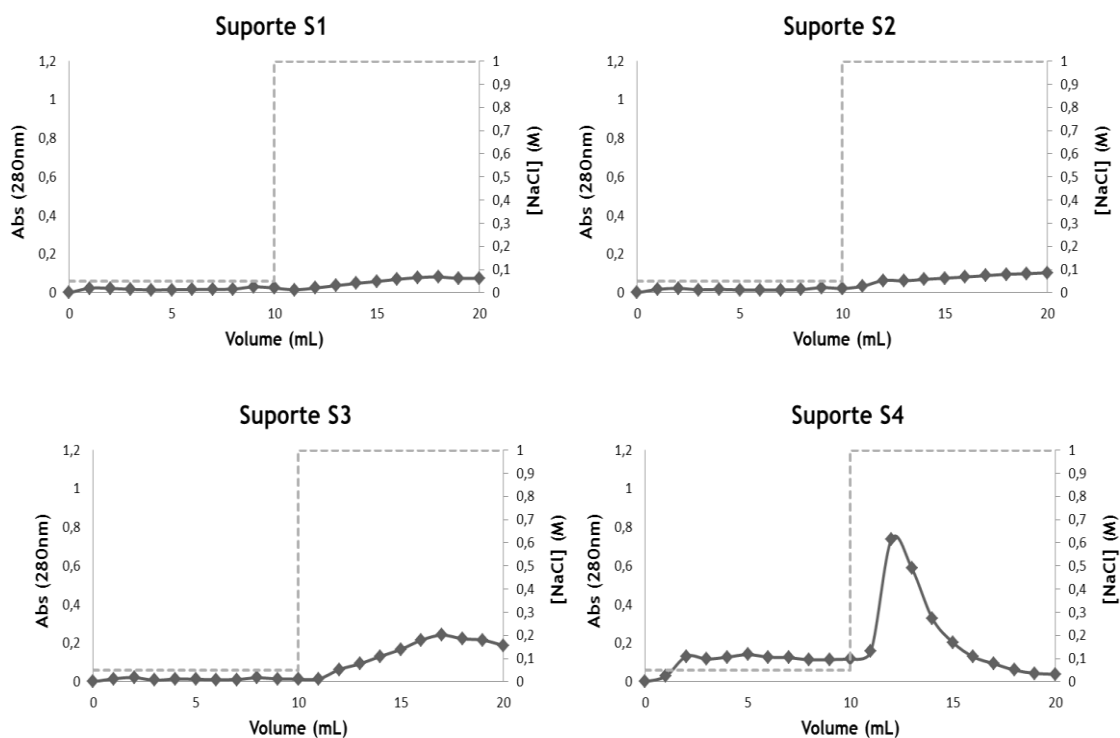
#### 3.4.1.1 Condições iônicas

Para o estudo das interações iônicas em CA, as soluções de proteínas foram preparadas e as colunas foram equilibradas com uma solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 seguindo-se os passos descritos em 2.5.2.1. Com exceção do ensaio com a lisozima em que se utilizou a solução tampão de NaCl 0,05 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8, de forma análoga ao procedimento adotado para os suportes de celulose em esferas (Figura 17).

As figuras que se seguem apresentam os principais resultados do estudo da interação dos suportes **S1**, **S2**, **S3** e **S4** com a lisozima.

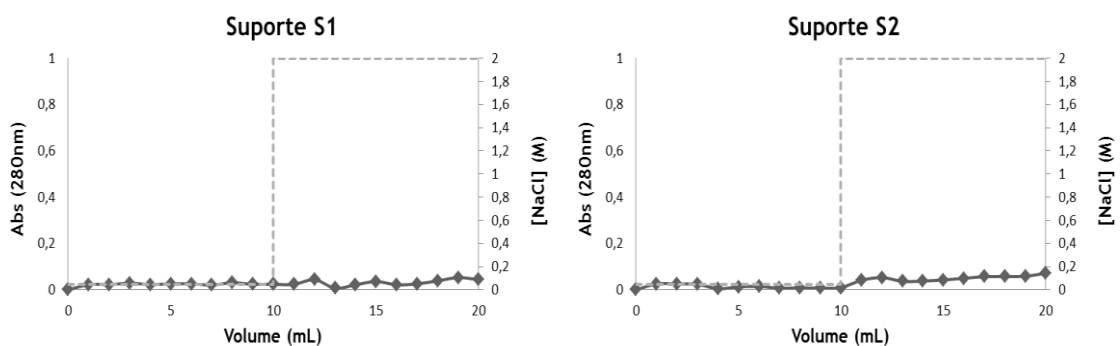
A lisozima apresenta um ponto isoelétrico (pI) de 11 (Boto *et al.*, 2008), ou seja, está carregada positivamente a pH abaixo do seu pI. Da análise dos cromatogramas representativos da Figura 21, verifica-se uma elevada retenção da lisozima nos suportes **S1**, **S2** e **S3** quando se promove a ligação com a adição da solução tampão de NaCl 0,05 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8. No suporte **S4** não se verifica essa retenção. Relativamente ao perfil de eluição promovido pela adição da solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8, ele é crescente de **S1** para **S4**, ou seja, à medida que a densidade de ligando diminui. Apesar da elevada retenção, este não é um padrão de interação desejável, porque após a ligação, não foi possível recuperar as proteínas retidas, particularmente em **S1** e **S2**. Desta forma optou-se por aumentar a concentração de NaCl de 1 M para 2 M no passo de eluição (Figura 22).

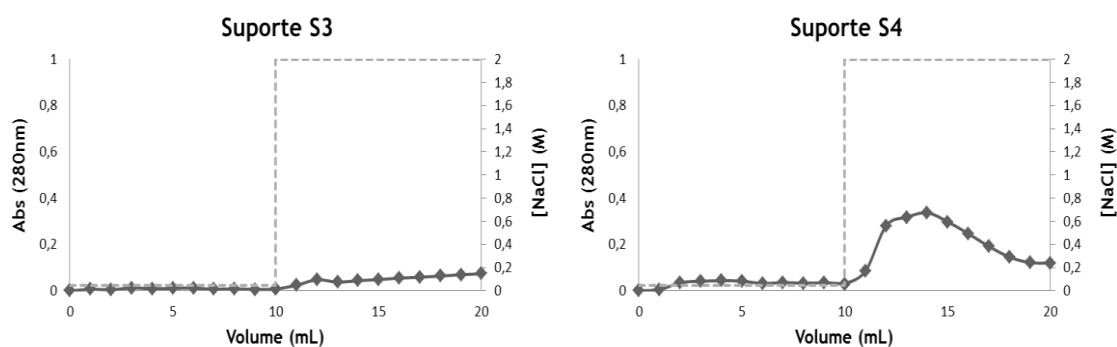




**Figura 21.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes S1, S2, S3 e S4. Injeção de 100  $\mu$ L de lisozima (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de NaCl 0,05 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).

O objetivo desta abordagem foi o de aumentar o efeito de competição do NaCl e assim enfraquecer as interações entre a proteína e o ligando, provocando a sua eluição embora, e como se pode observar nos cromatogramas representativos da Figura 22, tal não tenha acontecido.

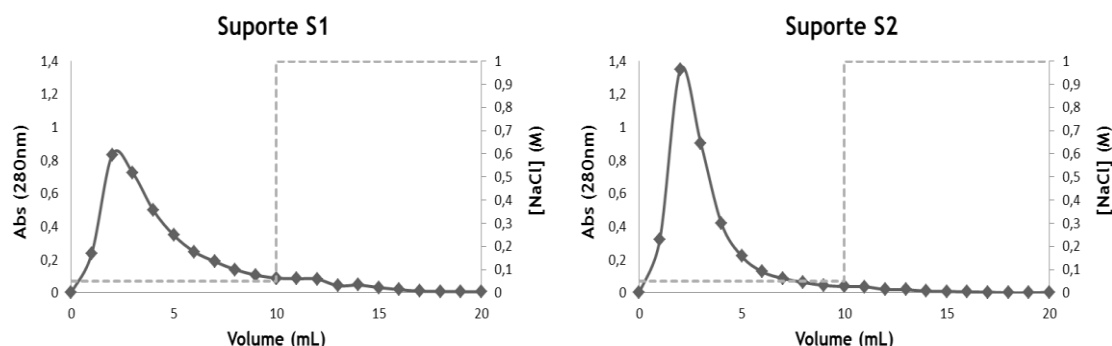


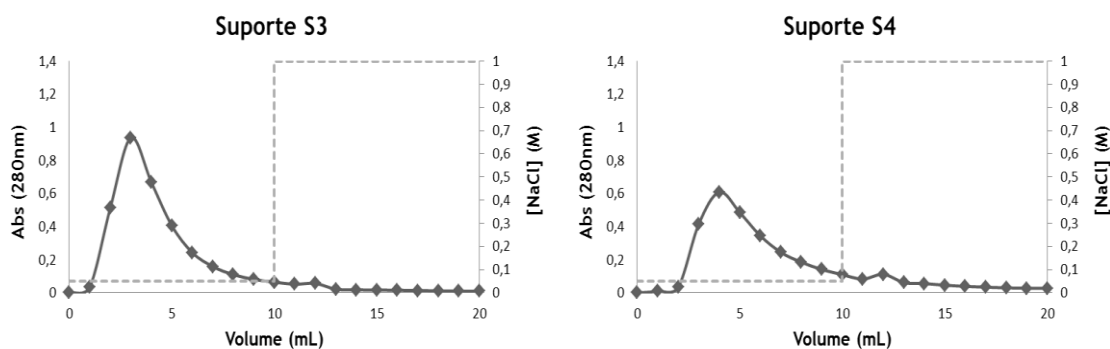


**Figura 22.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes **S1**, **S2**, **S3** e **S4**. Injeção de 100  $\mu$ L de lisozima (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de NaCl 0,05 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 2 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).

Em consequência do resultado anterior optou-se por variar o valor de pH (4, 5, 6, 7 e 9) tentando, deste modo, promover um melhor perfil cromatográfico de ligação/eluição da lisozima. Para os ensaios com variação do pH a 4, 5 e 6 prepararam-se as soluções tampão utilizando o acetato de sódio (NaOAc) 10 mM. Para o pH 7 e 9 manteve-se o tampão Tris-HCl 10 mM.

Na Figura 23, estão representados cromatogramas representativos do estudo realizado a pH 4 e verifica-se que quando se promove a ligação com a solução tampão de NaCl 0,05 M em acetato de sódio 10 mM, a proteína elui quase na totalidade, concluindo-se desta forma que não existiu interação entre a lisozima e o ligando. O mesmo perfil cromatográfico é verificado a pH 5 e 6. No entanto, para pH 7 e 9, o perfil cromatográfico é idêntico ao observado a pH 8 (Figura 22), existe retenção da lisozima no suporte, não sendo possível recuperar a proteína através da sua eluição (com exceção em **S4**).

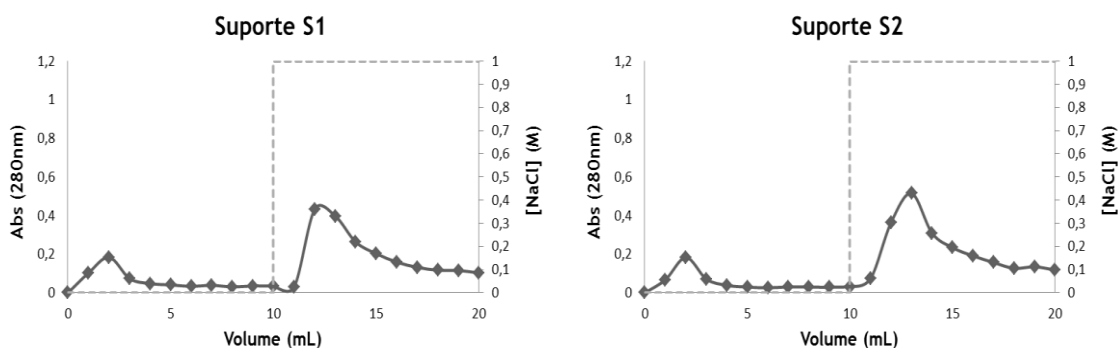


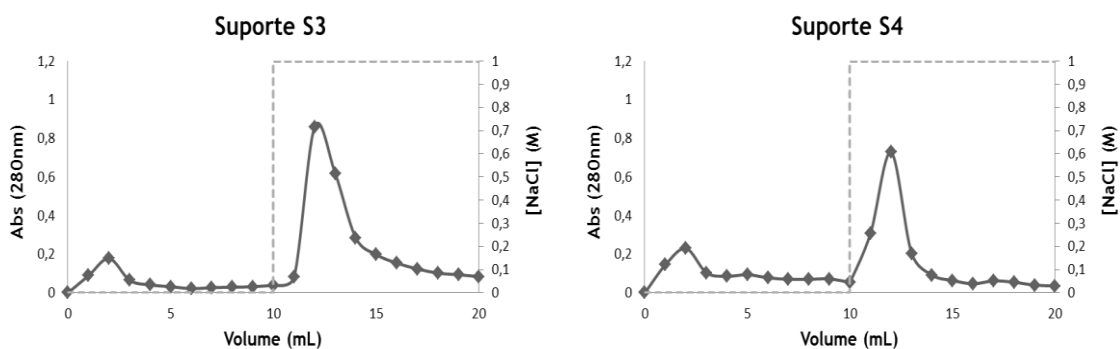


**Figura 23.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes S1, S2, S3 e S4. Injeção de 100  $\mu$ L de lisozima (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de NaCl 0,05 M em acetato 10 mM a pH 4 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato 10 mM a pH 4 (representado pela linha a tracejado).

As figuras que se seguem apresentam os principais resultados do estudo da interação dos suportes S1, S2, S3 e S4 com a  $\alpha$ -quimotripsina.

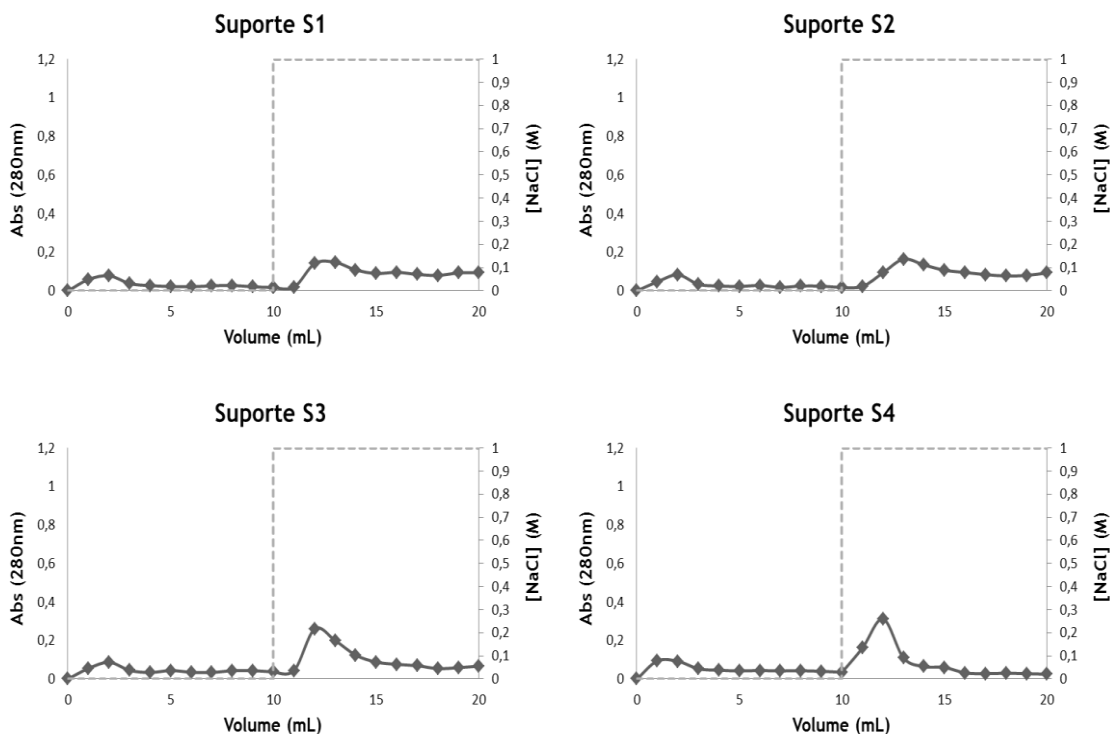
A  $\alpha$ -quimotripsina apresenta um pI de 8,7 (Boto *et al.*, 2008), encontrando-se carregada positivamente nas condições utilizadas (pH 8). Apesar de nestas condições a interação ligando/proteína estar desfavorecida, a proteína apresenta uma interação parcial. Ou seja, elui parcialmente quando é promovida a ligação com Tris-HCl 10 mM a pH 8 e elui na totalidade quando é promovida a eluição com a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (Figura 24). Este tipo de perfil obtido é teoricamente característico de proteína em excesso para a quantidade de ligando presente, assim decidiu-se injetar metade da quantidade de  $\alpha$ -quimotripsina (50  $\mu$ L) e averiguar a alteração, ou não, do perfil cromatográfico.





**Figura 24.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes S1, S2, S3 e S4. Injeção de 100  $\mu$ L de  $\alpha$ -quimotripsina (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).

Com a injeção de 50  $\mu$ L de  $\alpha$ -quimotripsina (Figura 25) verificou-se a diminuição das absorvâncias em ambos os patamares, quer aquando da utilização da solução tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8, quer com adição de NaCl 1 M.



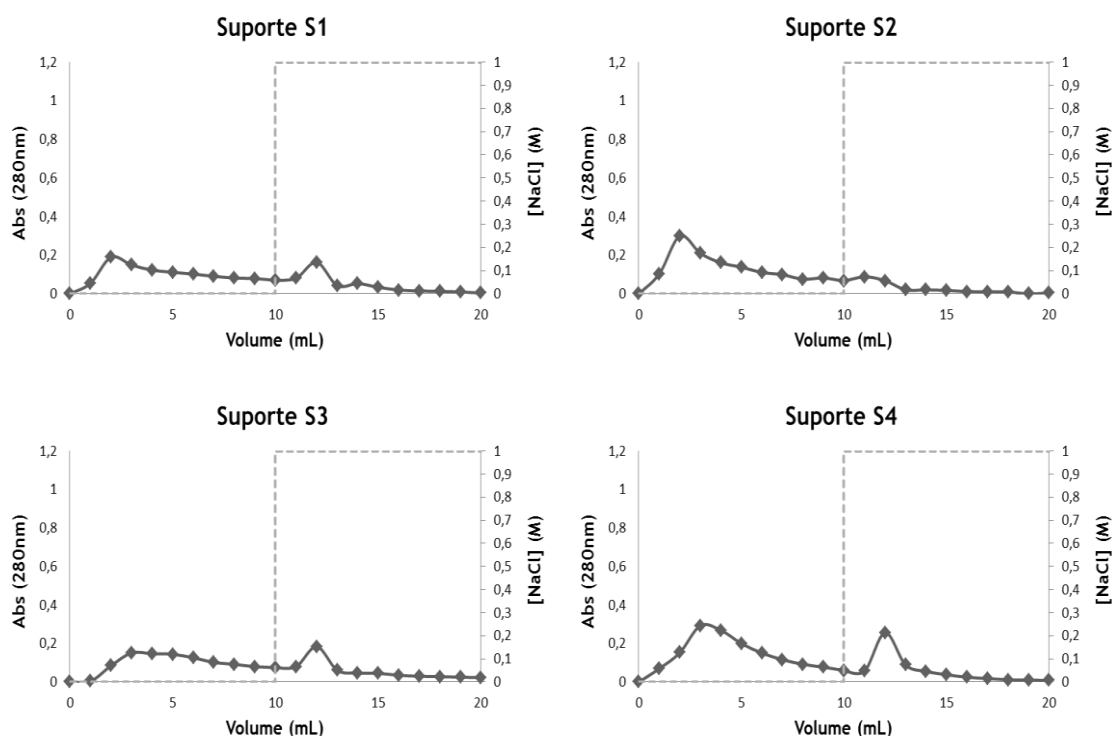
**Figura 25.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes S1, S2, S3 e S4. Injeção de 50  $\mu$ L de  $\alpha$ -quimotripsina (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).

Estes resultados permitiram concluir que na realidade não se tratava de excesso de proteína injetada, mas sim que existe uma interação pouco forte entre o ligando e a proteína. Na

realidade e caso estes resultados fossem provenientes de excesso de proteína, os valores de absorvância que aparecem na 2ª e 3ª leitura desapareceriam e o perfil de eluição com NaCl 1 M manter-se-ia. No entanto, como se pode verificar as absorvâncias diminuíram em ambos os patamares (Figura 25).

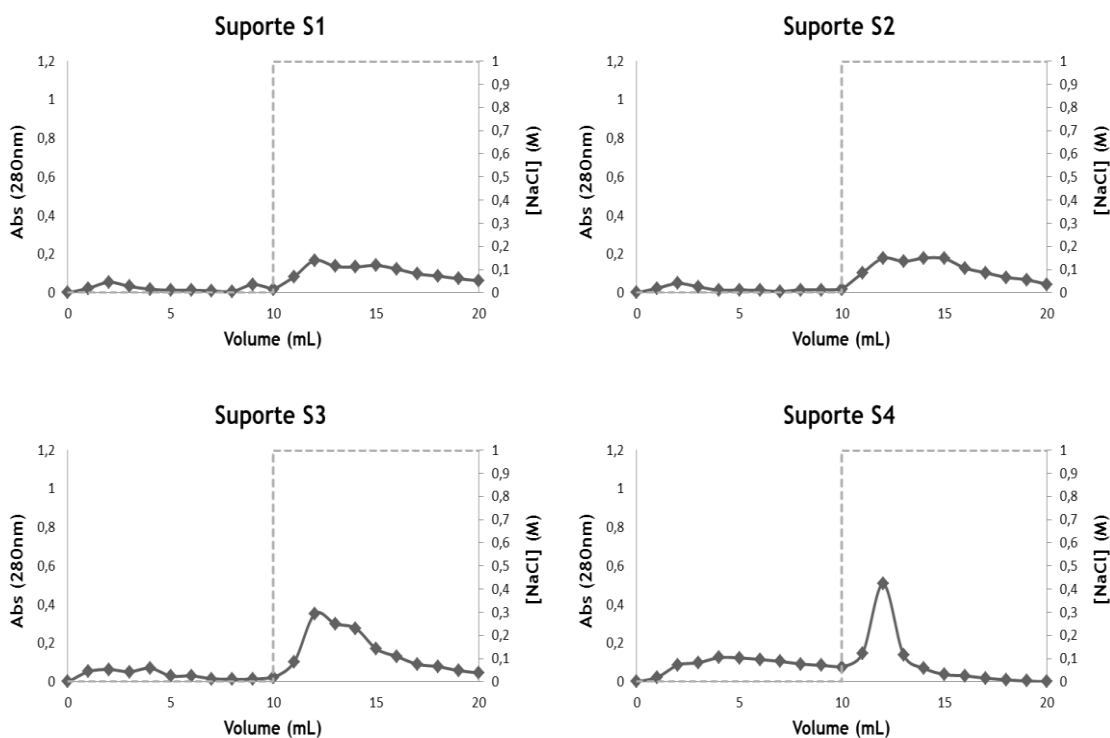
Analogamente ao estudo realizado com a lisozima, fez-se variar o valor de pH (4, 5, 6, 7 e 9) na solução tampão. Como a  $\alpha$ -quimotripsina apresenta um pI de 8,7 (Boto *et al.*, 2008), está carregada positivamente a pH inferiores ao seu pI e negativamente a pH superiores ao seu pI.

Os perfis cromatográficos do estudo da  $\alpha$ -quimotripsina a pH 4 estão representados nos cromatogramas da Figura 26. Como se pode verificar, não existiu melhorias nos perfis cromatográficos comparativamente aos perfis a pH 8. Para os cromatogramas obtidos a pH 5 e 6 obtiveram-se perfis cromatográficos idênticos aos obtidos a pH 4.



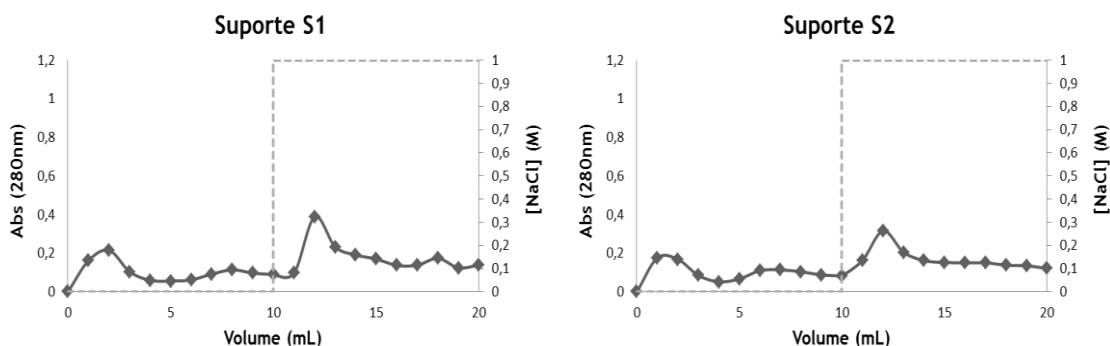
**Figura 26.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes **S1**, **S2**, **S3** e **S4**. Injeção de 100  $\mu$ L de  $\alpha$ -quimotripsina (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato 10 mM a pH 4 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato 10 mM a pH 4 (representado pela linha a tracejado).

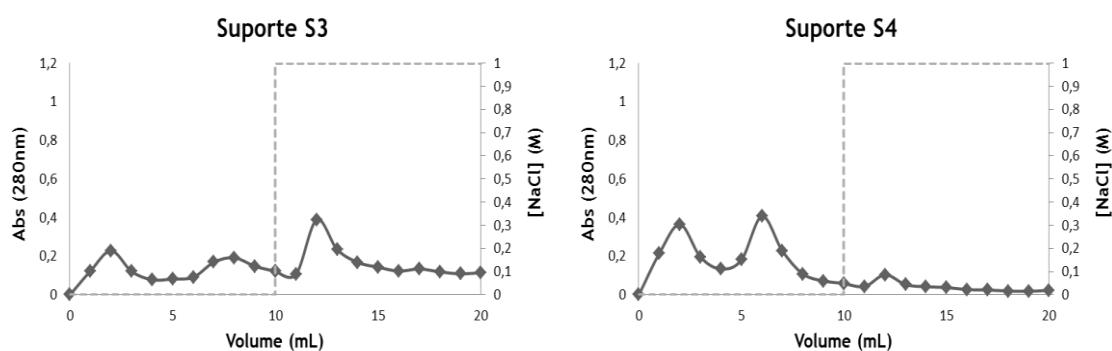
Na figura 27, estão representados os cromatogramas obtidos a pH 7. Nos suportes **S1**, **S2** e **S3** existiu interação do ligando com a  $\alpha$ -quimotripsina quando se promoveu a ligação com a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 7, mas pelo contrário tal não aconteceu com o suporte **S4**. Quando se promoveu a eluição com o aumento da força iônica, verificou-se um arrastamento no perfil de eluição, com exceção em **S4** que apresenta uma banda de absorvância mais bem definida.



**Figura 27.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes S1, S2, S3 e S4. Injeção de 100  $\mu$ L de  $\alpha$ -quimotripsina (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 7 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 7 (representado pela linha a tracejado).

Por último, foi analisado o comportamento cromatográfico da  $\alpha$ -quimotripsina em Tris-HCl 10 mM a pH 9 (Figura 28). Esta proteína encontra-se carregada negativamente, uma vez que o pH do meio se encontra acima do seu pI, pelo que a interação ligando/proteína deveria estar favorecida. No entanto, na prática o perfil cromatográfico obtido não revela este comportamento esperado.

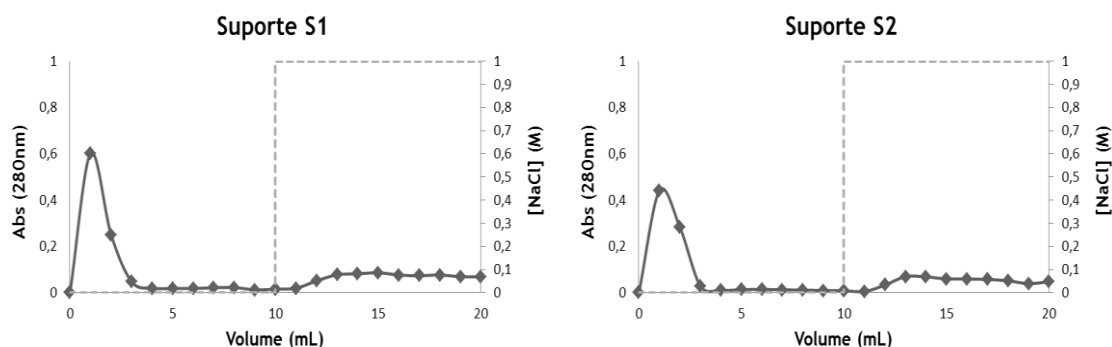


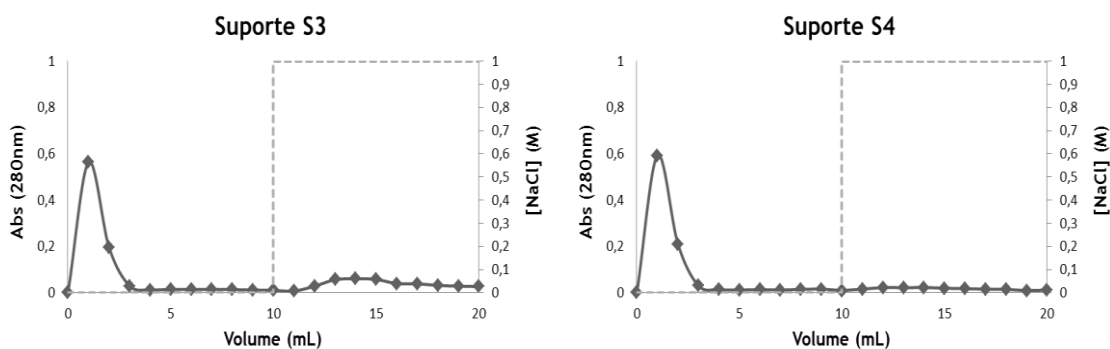


**Figura 28.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes S1, S2, S3 e S4. Injeção de 100  $\mu$ L de  $\alpha$ -quimotripsina (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 9 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 9 (representado pela linha a tracejado).

As figuras que se seguem apresentam os principais resultados do estudo da interação dos suportes S1, S2, S3 e S4 com a BSA.

A Figura 29 corresponde ao perfil cromatográfico da BSA com os diferentes suportes e os resultados mostram que esta proteína não interage com o suporte, sendo imediatamente eluída quando aplicada a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8. O pI da proteína é de 4,7 (Boto *et al.*, 2008) e tendo em conta que o pH utilizado nestes ensaios foi superior (pH 8) ao pI da BSA, esta proteína estava carregada negativamente. No entanto, a BSA não interage com o ligando, apesar deste apresentar um carácter positivo. Teoricamente, não era o perfil cromatográfico esperado mas na prática obtém-se um perfil de eluição bem definido, na presença da solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8.

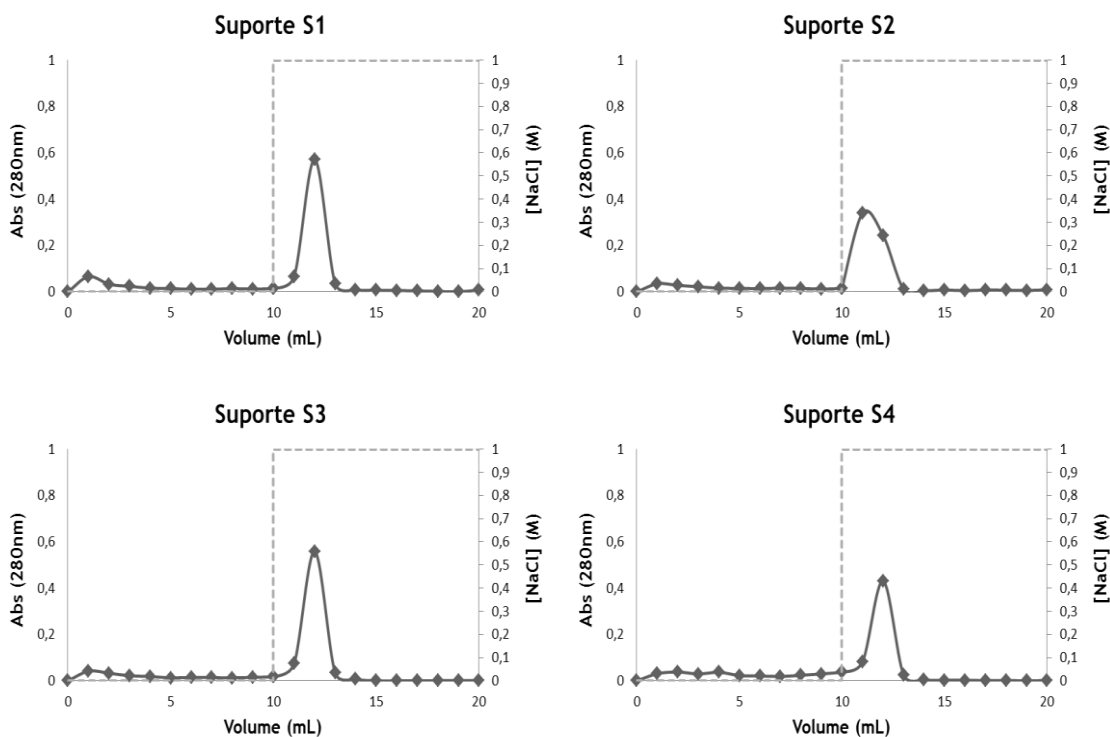




**Figura 29.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes S1, S2, S3 e S4. Injeção de 100  $\mu$ L de BSA (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).

As figuras que se seguem apresentam os principais resultados do estudo da interação dos suportes S1, S2, S3 e S4 com a RNase.

Ao contrário da BSA, a RNase estabeleceu interação com o ligando, como se pode ver nos perfis cromatográficos obtidos na Figura 30.



**Figura 30.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes S1, S2, S3 e S4. Injeção de 100  $\mu$ L de RNase (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).



O *pI* desta proteína é de 9,6 (Sigma-Aldrich, 2014b), assim ela encontra-se carregada positivamente a pH 8, desfavorecendo teoricamente a interação com o ligando catiónico. A eluição ocorreu com a adição, num segundo passo, de NaCl 1 M em tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8. A presença de NaCl no tampão indicou que a interação da RNase com o ligando foi enfraquecida por competição, resultando na sua eluição.

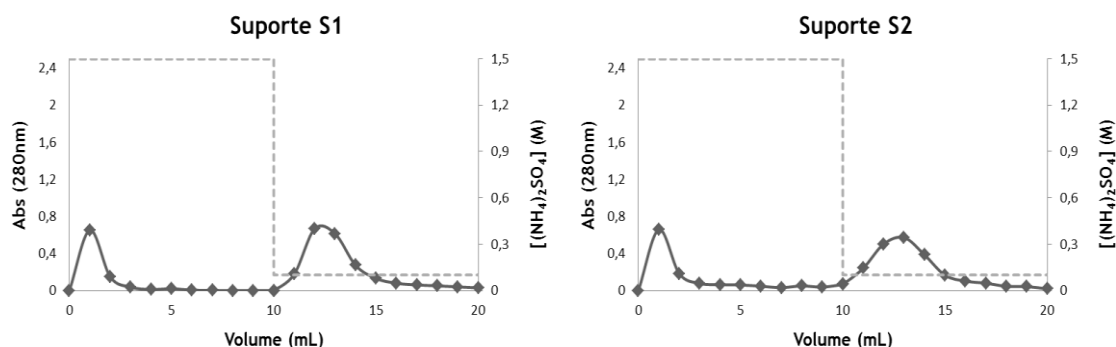
Na tentativa de encontrar outras proteínas que interagissem com o ligando, foram adicionalmente testadas a tripsina (PM 23,8 kDa, *pI* 10,1-10,5) e a  $\gamma$ -globulina (PM 156 kDa, *pI* 6,85-6,95), mas não apresentaram interação com o ligando quando se promoveu a ligação com a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8.

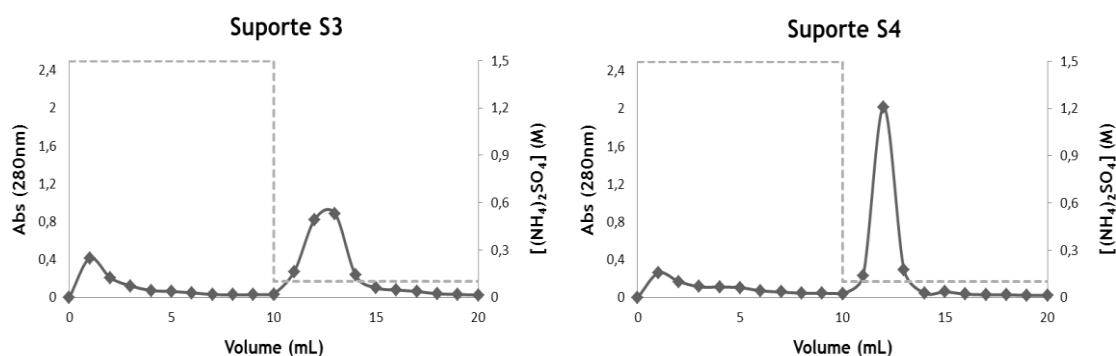
No entanto, uma interação iônica entre o ligando e as diferentes proteínas não é o único processo ativo. Como referido anteriormente, para além das possíveis interações iônicas, também as interações hidrofóbicas devem ser consideradas no presente estudo uma vez que a presença do anel aromático e a cadeia carbonada no sal de 2-metilbenzotiazole **3** podem favorecer as interações hidrofóbicas com as proteínas e originar uma retenção seletiva.

#### 3.4.1.2 Condições hidrofóbicas

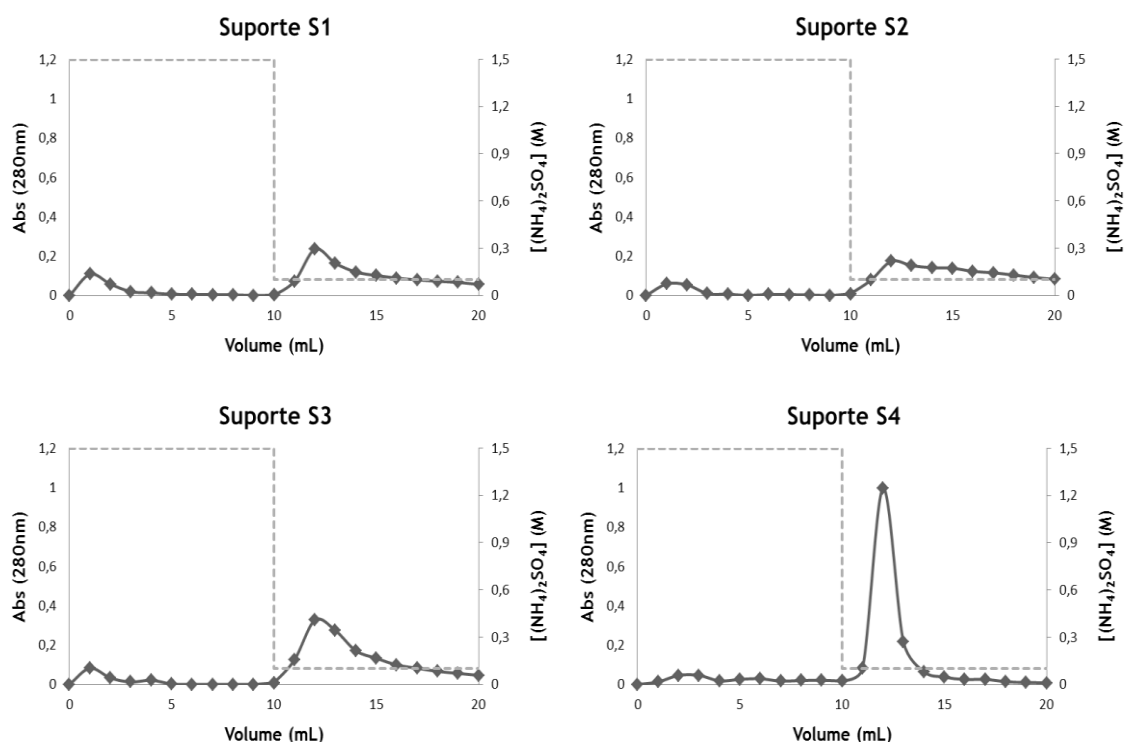
No estudo das interações em CA foram preparadas as soluções de proteína e as colunas foram equilibradas com uma solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 seguindo-se os passos descritos em 2.5.2.2. Tendo em conta os resultados das interações iônicas, observados anteriormente, em que as proteínas lisozima,  $\alpha$ -quimotripsina e RNase interagiram com o ligando nas condições de ligação com a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8, foi utilizada a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 para promover a eluição.

Nas Figuras 31 e 32 são apresentados os perfis cromatográficos da lisozima quando foram injetados na coluna, 100  $\mu\text{L}$  e 50  $\mu\text{L}$ , respetivamente. A lisozima, em condições hidrofóbicas estabelece interações com o suporte **S4**, quando se promove a ligação com a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8. Nos restantes suportes, onde a concentração de ligando é maior, foi estabelecida uma interação pouco forte e um perfil de eluição com arrastamento.





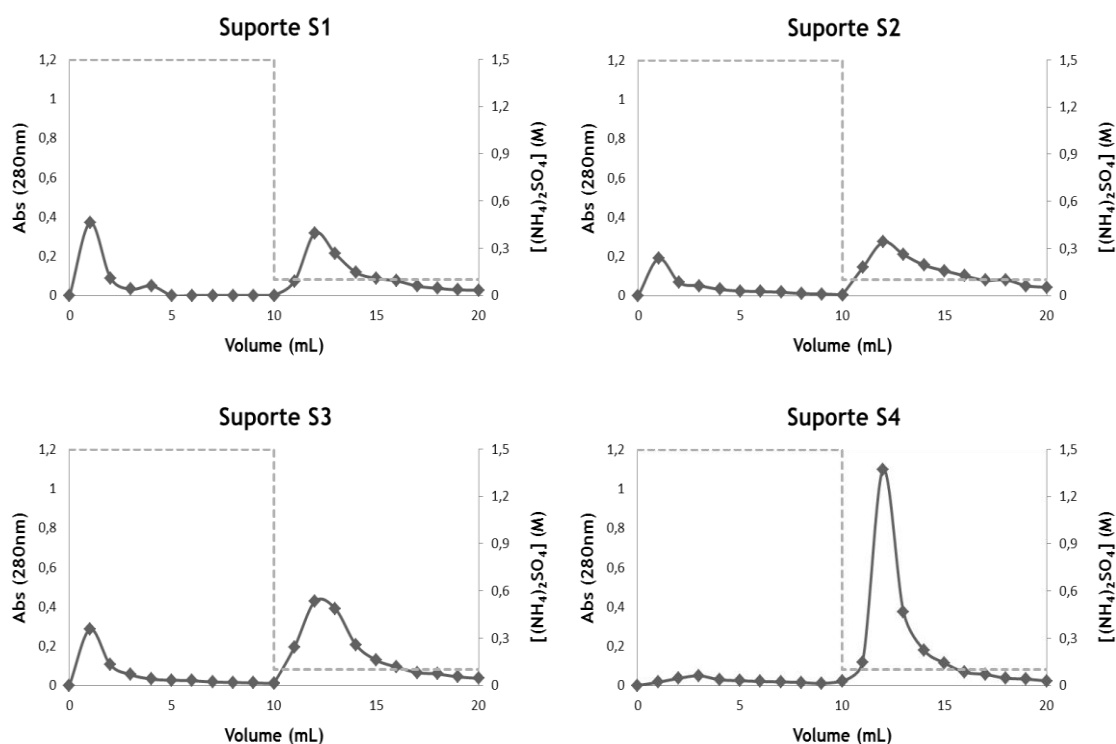
**Figura 31.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes S1, S2, S3 e S4. Injeção de 100  $\mu\text{L}$  de lisozima (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).



**Figura 32.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes S1, S2, S3 e S4. Injeção de 50  $\mu\text{L}$  de lisozima (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).

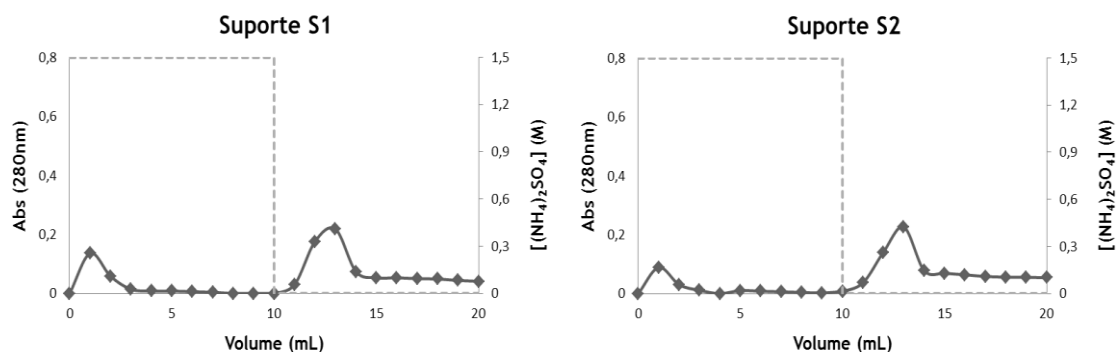
Na Figura 33 é apresentado o perfil cromatográfico da  $\alpha$ -quimotripsina. Tal como no caso anterior, esta proteína estabelece interações com o ligando quando se promove a ligação com a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8, com especial destaque para a interação ocorrida no suporte S4. No segundo passo, quando é aplicada a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8, a  $\alpha$ -quimotripsina elui na sua totalidade. Obtém-se

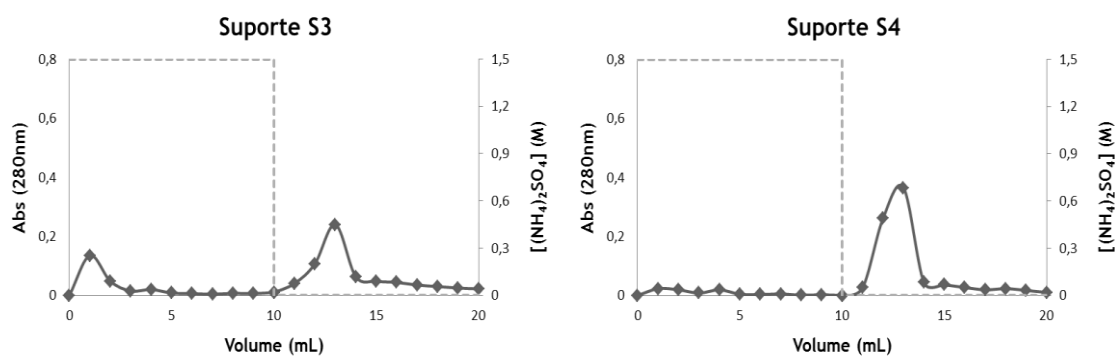
assim o perfil cromatográfico ligação/eluição desejado, quer neste caso, quer no caso anterior da lisozima.



**Figura 33.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes S1, S2, S3 e S4. Injeção de 100  $\mu$ L de  $\alpha$ -quimotripsina (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).

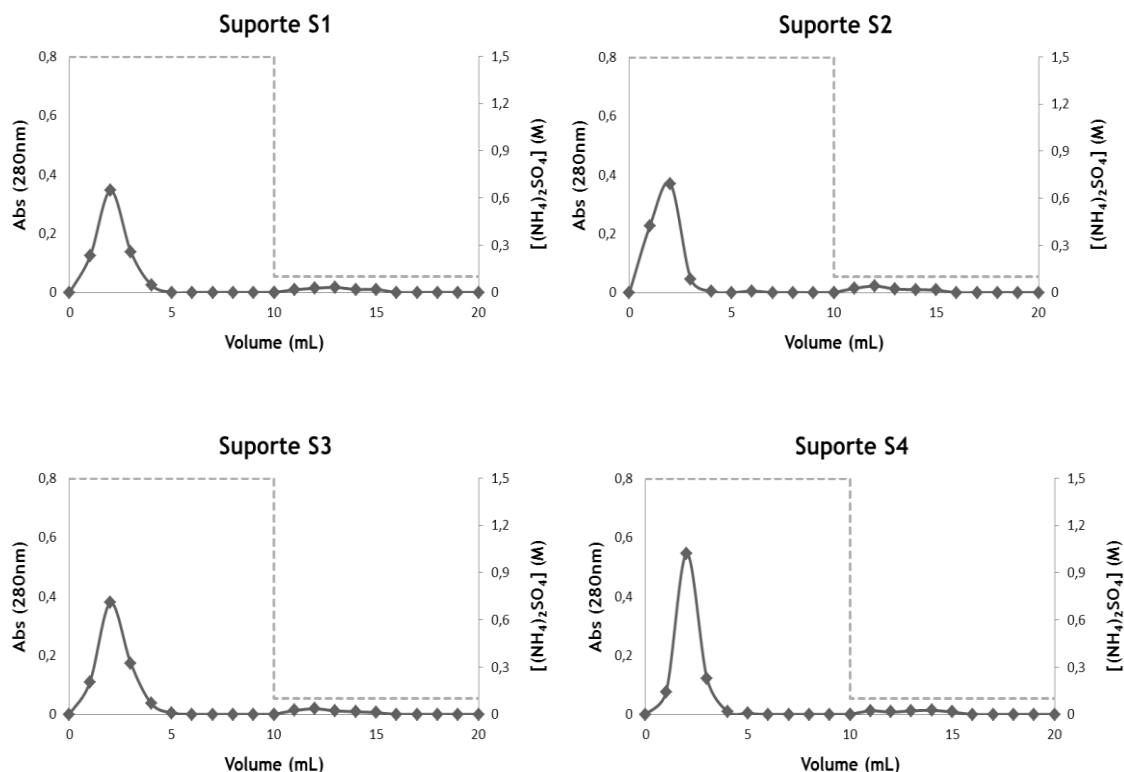
Na Figura 34 é apresentado o perfil cromatográfico da BSA. Esta proteína estabelece interações com o ligando quando se promove a ligação com a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8, com especial destaque para o suporte S4, onde se obtém um perfil de ligação/eluição desejado, tal como nos ensaios cromatográficos para a lisozima e  $\alpha$ -quimotripsina.





**Figura 34.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes S1, S2, S3 e S4. Injeção de 100  $\mu$ L de BSA (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).

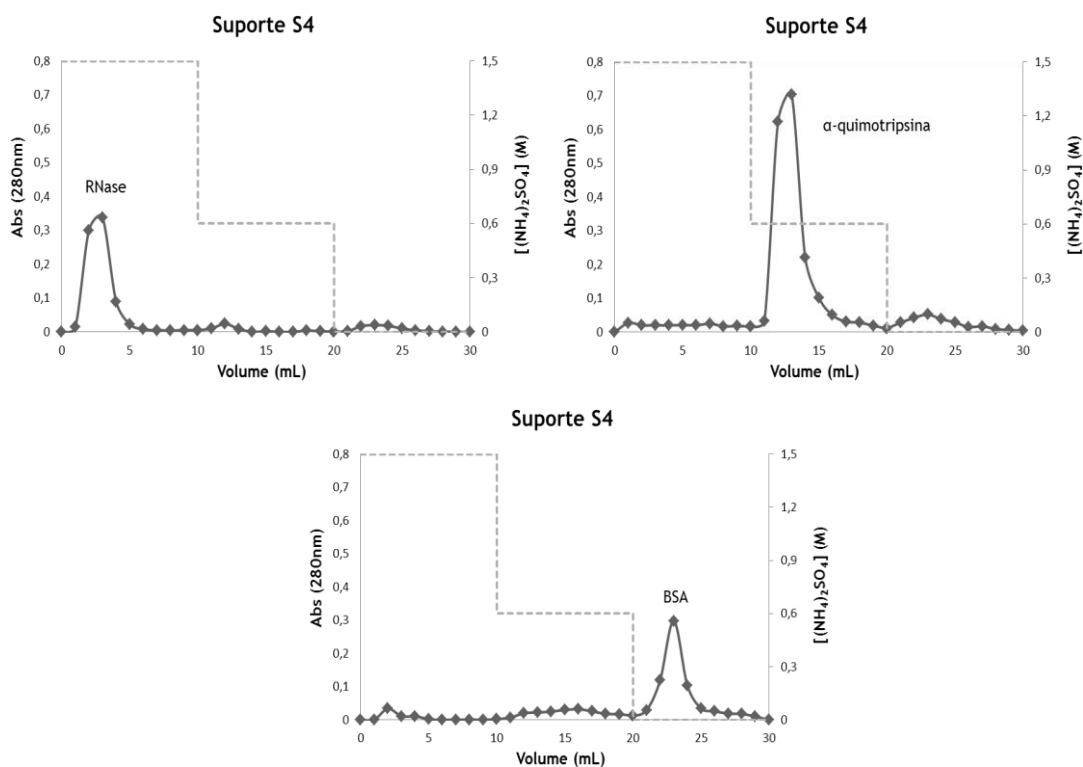
Na Figura 35 é apresentado o perfil cromatográfico da RNase. Em condições hidrofóbicas, esta proteína não interage com o suporte. Verifica-se que ao adicionar a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 a proteína elui imediatamente.



**Figura 35.** Perfis cromatográficos obtidos com os suportes S1, S2, S3 e S4. Injeção de 100  $\mu$ L de RNase (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).

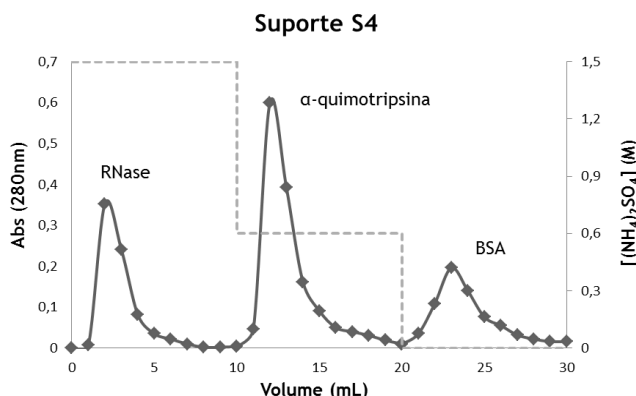
Com base no estudo cromatográfico das interações hidrofóbicas, o suporte cromatográfico obtido utilizando a concentração mais baixa de ligando, o suporte **S4**, demonstrou ter uma interação desejável e seletiva com as diferentes proteínas. Este resultado permitiu eleger este suporte como o melhor de todos os aqui obtidos e estudados, sendo que esta conclusão é coerente com o que se encontra descrito na literatura. De acordo com Murza *et al.* (2000), uma menor densidade de ligando é vantajosa na maioria dos casos uma vez que o acesso do ligando imobilizado aos locais de ligação da proteína não é prejudicado.

Tendo em conta as proteínas que apresentaram interações predominantemente hidrofóbicas com o ligando e ter-se observado que o suporte **S4**, com uma densidade de ligando de 0,18 mmol/g suporte, demonstrou os melhores resultados apontando para a proporção ideal entre o ligando e a matriz, foram realizados vários ensaios para testar as condições cromatográficas que permitiram a ligação e eluição de cada proteína, possibilitando a separação seletiva destas proteínas. Para tal, foram testadas várias concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Os melhores perfis cromatográficos foram obtidos com a diminuição do gradiente de concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , nomeadamente de 1,5 M, 0,6 M e 0 M na solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8, como representado na Figura 36.



**Figura 36.** Perfil cromatográfico obtido com o suporte **S4**. Injeção de 100  $\mu\text{L}$  de proteína correspondente. Utilizou-se no passo inicial a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8, seguindo-se a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,6 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e por último a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).

Estes três ensaios cromatográficos representativos (Figura 36) mostraram claramente que uma diminuição na força iônica promove a eluição seletiva das três proteínas do suporte S4, revelando assim um comportamento distinto de interação individual. Por conseguinte, quando uma mistura artificial das três proteínas foi injetada e, em seguida, eluída com uma diminuição do gradiente de concentração do  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , conseguiu-se a separação das três proteínas em estudo (Figura 37). No cromatograma, é possível observar que num primeiro passo, utilizando a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8, eluiu a RNase, uma vez que não interagiu com o ligando, enquanto que a  $\alpha$ -quimotripsina e a BSA ficaram totalmente retidas nas mesmas condições. Quando a força iônica do tampão foi reduzida para  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,6 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8, a  $\alpha$ -quimotripsina eluiu. Assim, a BSA demonstrou a interação mais forte com o ligando e foi eluída no passo final com Tris-HCl 10 mM a pH 8.



**Figura 37.** Perfil cromatográfico obtido com o suporte S4. Injeção de 150  $\mu\text{L}$  de uma mistura de RNase,  $\alpha$ -quimotripsina e BSA. Utilizou-se no passo inicial uma solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8, seguindo-se uma solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,6 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e por último uma solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).

A lisozima também foi estudada nestes ensaios cromatográficos com a mistura artificial de proteínas tendo-se comportado como a  $\alpha$ -quimotripsina, ou seja, eluiu com a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,6 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8.

Nos estudos com o suporte de controlo, nenhuma das proteínas apresentou interação com o ligando nas condições de ligação com a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8. Estes ensaios demonstraram claramente que o ligando é o responsável pelas interações observadas com as proteínas.

### 3.4.2 SDS-PAGE

A pureza das frações das proteínas recuperadas correspondentes às três bandas de eluição (Figura 37) foi monitorizada por análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), como demonstrado na Figura 38. A coluna M representa a mistura artificial das três proteínas que foi injetada na coluna. Por comparação com as amostras de controlo representadas nas colunas A, B e C, é possível identificar, na coluna 1, a proteína eluída na primeira banda do cromatograma, a RNase. Na coluna 2, a proteína eluída na segunda banda do cromatograma, que corresponde à  $\alpha$ -quimotripsina e, finalmente, a proteína recuperada a partir da terceira banda cromatográfica, que corresponde à BSA (coluna 3).

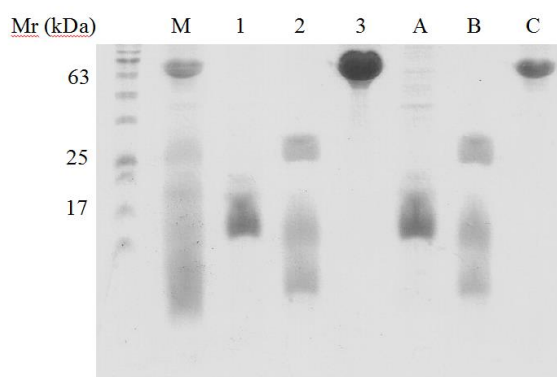
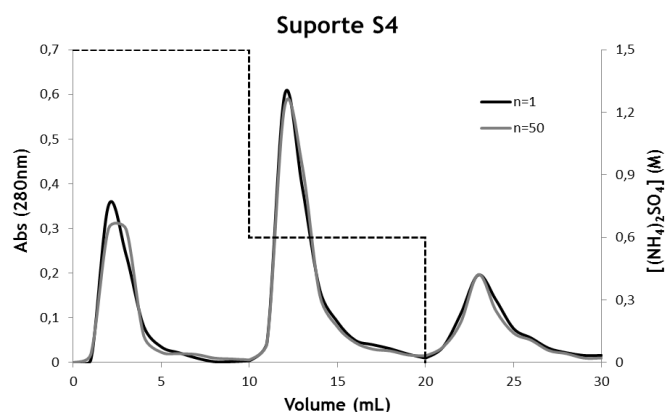


Figura 38. SDS-PAGE das frações recuperadas a partir de cada banda cromatográfica.

### 3.4.3 Ensaios de reprodutibilidade

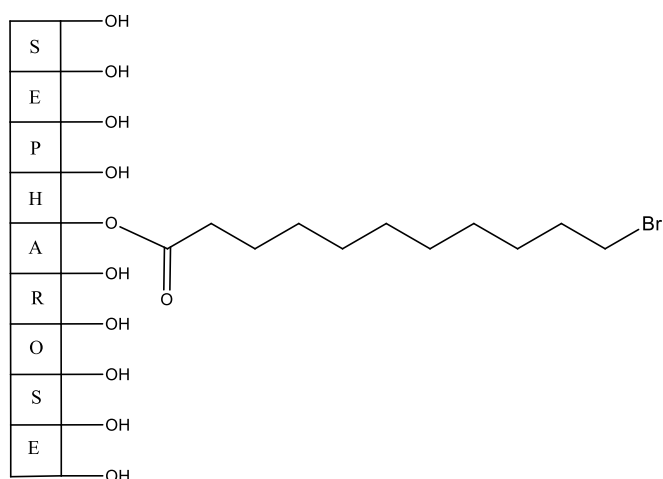
Foram realizados vários ensaios adicionais para verificar, por um lado, a possível perda de ligando e, por outro, averiguar a reprodutibilidade e reutilização do suporte S4. Para tal, o suporte foi lavado diversas vezes tendo-se constatado que a cor do suporte não sofreu qualquer tipo de alteração visual. O suporte foi ainda deixado em água e etanol a 4 °C durante cerca de seis meses, tendo-se verificado que as águas-mães não apresentaram moléculas de ligando mensuráveis pela medição de absorvância. Após esse período, o ensaio reproduzido na Figura 37 foi repetido cinquenta vezes, obtendo-se o perfil cromatográfico representado pela linha de cor cinza na Figura 39. Após as cinquenta repetições o perfil cromatográfico mantém-se inalterado. Estes ensaios permitiram assim demonstrar a boa reprodutibilidade do padrão de eluição, bem como a estabilidade da coluna.



**Figura 39.** Perfil cromatográfico obtido para o suporte S4 ( — ) na Figura 37 e depois de cinquenta corridas cromatográficas (—) com uma mistura de RNase,  $\alpha$ -quimotripsina e BSA. Utilizou-se no passo inicial uma solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8, seguindo-se a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,6 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e por último uma solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).

#### 3.4.4 Estudos de CA nos suportes de Sepharose CL-6B derivatizados com o ácido 11-bromoundecanóico

Analogamente ao estudo realizado para os suportes de Sepharose CL-6B com o sal de 2-metilbenzotiazole **3** foram derivatizadas matrizes de Sepharose CL-6B com o braço espaçador, o ácido 11-bromoundecanóico (Figura 40), de forma a avaliar a contribuição da cadeia *N*-alquílica na interação ligando-proteína. Desta forma e seguindo a metodologia da esterificação de Steglich, descrita em 2.4.3, foram obtidos os suportes derivatizados com diferentes densidades de ligando e a quantidade de ácido 11-bromoundecanóico **2** imobilizado em Sepharose CL-6B foi calculada a partir da percentagem de bromo, determinada por AE (Tabela 5).



**Figura 40.** Ácido 11-bromoundecanóico **2** imobilizado numa matriz de Sepharose CL-6B.



**Tabela 5.** Suportes cromatográficos obtidos com a esterificação de Steglich a partir do ácido 11-bromoundecanóico **2** numa matriz de Sepharose CL-6B.

Condições constantes	Suportes	Ácido 11-bromoundecanóico <b>2</b> / Sepharose CL-6B (% p/p)	mmol de ácido 11-bromoundecanóico <b>2</b> /g Sepharose CL-6B	% Br	Q
(2 eq. DCC + 0,2 eq. DMAP) × 3 15 mL DMF, 96 horas T <sub>ambiente</sub>	B1	1:1	3,77	2,70	0,34
	B2	1:2	1,88	1,60	0,20
	B3	1:4	0,94	0,86	0,11
	B4	1:8	0,47	0,85	0,11

Uma vez que o ácido 11-bromoundecanóico **2** não apresenta azoto na sua constituição mas bromo, o valor de *Q* foi calculado através da adaptação da equação anteriormente utilizada, verificando-se então a quantidade de ácido 11-bromoundecanóico **2** ligado à matriz, de acordo com a seguinte equação (adaptada de Silva *et al.*, 2006):

$$Q = \frac{\% \text{ Br}}{7,9}$$

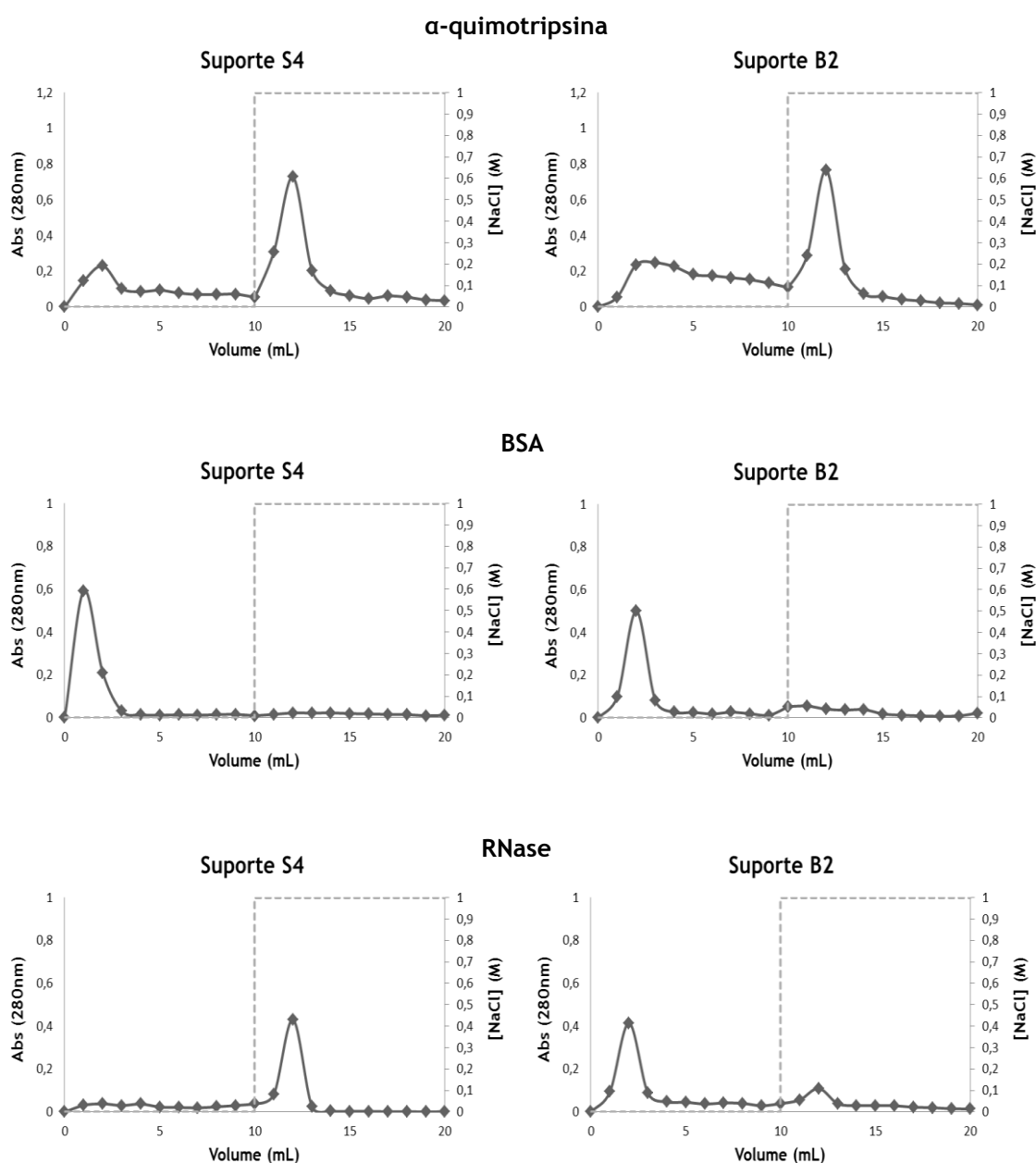
(mmol de ácido 11-bromoundecanóico **2**/g suporte)

O estudo das interações de afinidade foi desenvolvido pela realização de ensaios cromatográficos pretendendo-se verificar a contribuição do braço espaçador na interação com as proteínas padrão. Para tal, fez-se um estudo comparativo com o conjunto de melhores resultados, nas interações estabelecidas entre a  $\alpha$ -quimotripsina, a RNase e a BSA e o sal de 2-metilbenzotiazole **3**. Deste modo, foi selecionado o suporte com a densidade de ligando mais próxima do suporte **S4**, ou seja, o suporte **B2** que apresenta uma densidade de ligando de 0,20 mmol de ácido 11-bromoundecanóico **2**/g suporte.

#### 3.4.4.1 Condições iónicas

Para o estudo das interações iónicas em CA, as soluções de proteínas foram preparadas e as colunas foram equilibradas com uma solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 seguindo-se os passos descritos em 2.5.2.1.

Na Figura 41 são apresentados os perfis cromatográficos da  $\alpha$ -quimotripsina, RNase e BSA numa analogia entre o suporte **S4** e o suporte **B2**. Em condições iónicas, a  $\alpha$ -quimotripsina e a BSA apresentam perfis cromatográficos semelhantes em ambos suportes. A RNase revelou apresentar um padrão de retenção diferente, ou seja, estabelece interação com o suporte **S4** e tal não acontece com o suporte **B2**. Isso indica que a parte aromática e a carga catiónica do sal de 2-metilbenzotiazole **3** são responsáveis por algumas interações observadas apenas no suporte **S4**, nomeadamente relacionadas com o carácter iónico do ligando.



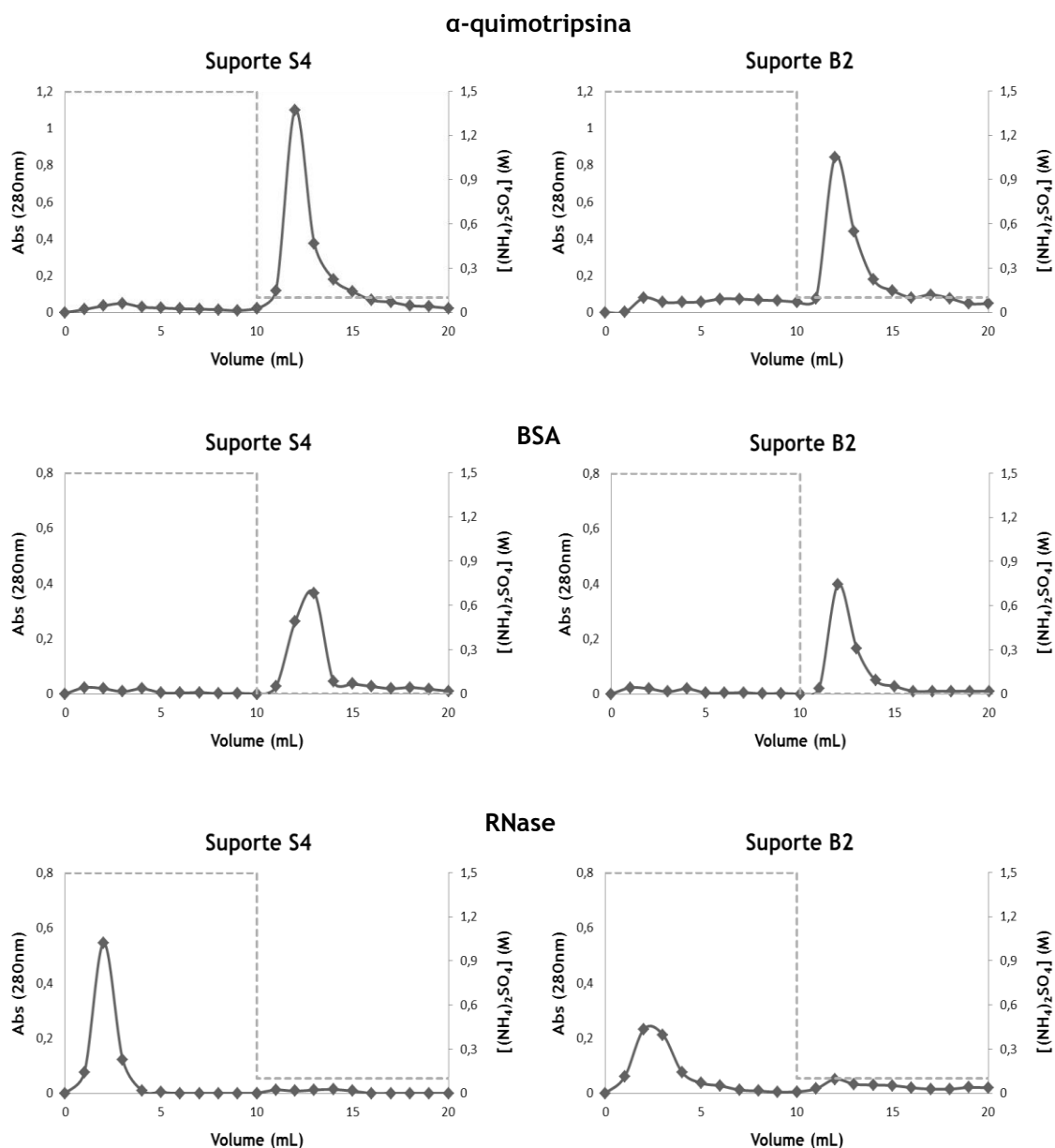
**Figura 41.** Perfis cromatográficos obtidos para o suporte **B2** (e comparados com o suporte **S4**). Injeção de 100  $\mu$ L de proteína correspondente (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).

#### 3.4.4.2 Condições hidrofóbicas

No estudo das interações em CA foram preparadas as soluções de proteína e as colunas foram equilibradas com uma solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 seguindo-se os passos descritos em 2.5.2.2.

Na Figura 42 são apresentados os perfis cromatográficos da  $\alpha$ -quimotripsina, RNase e BSA numa analogia entre o suporte **S4** e o suporte **B2**. Em condições hidrofóbicas, em ambos os

suportes todas as proteínas apresentam perfis cromatográficos semelhantes. Estes resultados sugerem que a cadeia *N*-alquílica é a principal responsável por interações hidrofóbicas.

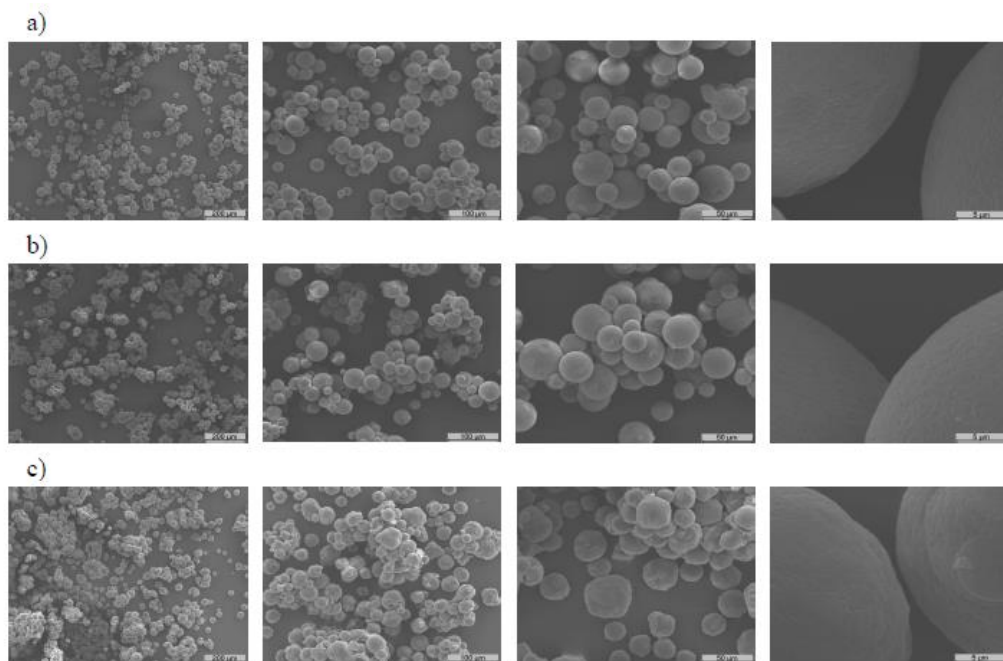


**Figura 42.** Perfis cromatográficos obtidos para o suporte B2 (e comparados com o suporte S4). Injeção de 100  $\mu$ L de **proteína correspondente** (12,5 mg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e para o passo de eluição a solução tampão de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 ou Tris-HCl 10 mM a pH 8 (representado pela linha a tracejado).

### 3.4.5 SEM e EDS

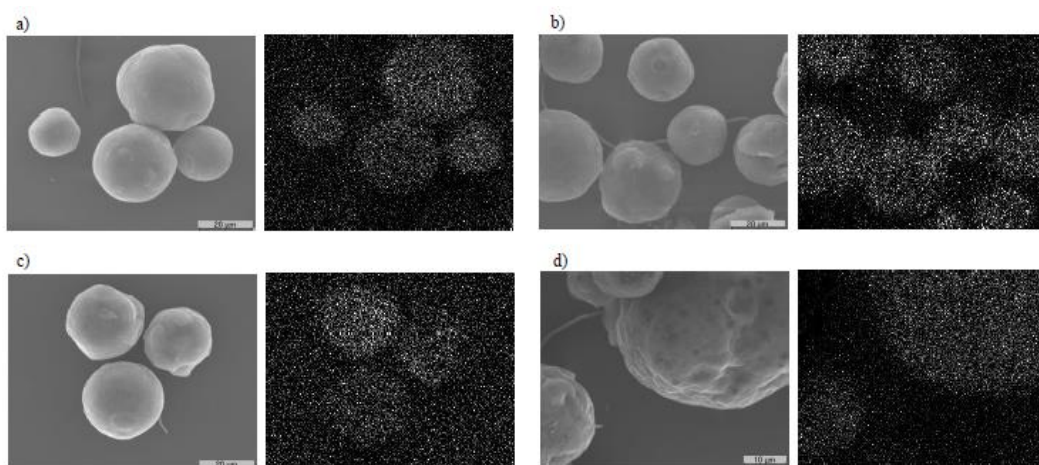
Este estudo permitiu a caracterização da morfologia das esferas de Sepharose CL-6B. As imagens de microscopia eletrônica de varrimento (SEM) antes [Figura 43(a)] e após a

imobilização do sal de 2-metilbenzotiazole **3** [Figura 43(c)] demonstraram a preservação da morfologia das esferas, e por conseguinte, o desempenho cromatográfico não foi alterado.



**Figura 43.** Imagens SEM com ampliação de 100, 250, 500 e 5000x: (a) Sepharose CL-6B; (b) suporte de controlo; e (c) suporte S4.

A análise das imagens obtidas através do mapeamento de enxofre, por espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS), demonstraram uma distribuição uniforme do ligando sobre as esferas de Sepharose CL-6B (Figura 44).



**Figura 44.** Imagens SEM e o corresponde mapeamento de enxofre com ampliação de 1300x nos suportes: (a) suporte S1; (b) suporte S2; (c) suporte S3; e (d) suporte S4.

## CONCLUSÕES

---

Ao longo dos últimos anos, o desenvolvimento de novas técnicas para a purificação de biomoléculas tem sido uma temática de grande importância e tem revelado um progresso contínuo, em várias e diferentes áreas do conhecimento, com especial ênfase para a biotecnologia e para as ciências da saúde. Dentro dos vários métodos de purificação, a cromatografia e em especial a cromatografia de afinidade, tem desempenhado um papel chave nestas áreas de conhecimento e ainda na indústria biotecnológica.

Dentro da cromatografia de afinidade, a utilização de ligandos de pseudo-afinidade com origem sintética tem-se revelado cada vez mais importante, especialmente pela sua facilidade de obtenção a partir de produtos químicos relativamente baratos e pela sua alta estabilidade, especialmente quando comparados com os ligandos de origem natural. Desta forma, o desenvolvimento de novos suportes cromatográficos baseados em sais de 2-metilbenzotiazole como aquele aqui estudado, possuidores de um grupo carboxílico capaz de se ligar covalentemente a matrizes hidroxílicas por métodos de esterificação em condições suaves, concretamente pelo método de Steglich, separadas da matriz por um braço espaçador suficientemente longo minimizando impedimentos estereoquímicos de interação com as moléculas biológicas alvo, representa *per se* um importante e promissor contributo para o desenvolvimento de novos protocolos cromatográficos.

Dentro dos resultados obtidos, o suporte cromatográfico mais bem-sucedido apresentou uma densidade de ligando de 0,18 mmol de sal de 2-metilbenzotiazole 3/g de suporte cromatográfico. O melhor desempenho global em CA demonstrado pelo suporte com menor densidade de ligando poderá ser explicado pelo facto do acesso do ligando aos locais de ligação da proteína não ser prejudicado, apontando para que uma densidade de ligando nesta gama de concentrações seja um bom compromisso entre uma maior capacidade possível e um melhor desempenho cromatográfico.

O desempenho cromatográfico deste suporte perante várias proteínas modelo, testado através de uma seleção criteriosa da fase móvel e do gradiente de sal, revelou ser capaz de separar seletivamente as três proteínas padrão RNase,  $\alpha$ -quimotripsina e BSA. Concretamente, o suporte cromatográfico revelou não interagir com a RNase ao contrário das restantes duas proteínas ( $\alpha$ -quimotripsina e BSA) que ficaram retidas na coluna, sendo estas duas últimas posteriormente eluídas seletivamente com a diminuição gradual da concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Os resultados cromatográficos aqui descritos parecem indicar uma combinação de várias interações moleculares estabelecidas entre o ligando e a proteína alvo, nomeadamente, interações aromáticas ( $\pi$ - $\pi$ ), eletrostáticas (iónicas) e hidrofóbicas (incluindo van der Waals) devido ao anel heteroaromático, o núcleo heterocíclico carregado positivamente e a cadeia *N*-alquílica, respetivamente. No entanto, à luz dos resultados obtidos e em função do braço espaçador escolhido, as interações hidrofóbicas parecem prevalecer.

Sendo este estudo apenas exploratório no que diz respeito à aplicação de sais de 2-metilbenzotiazole como ligandos em processos cromatográficos, esperamos que os resultados aqui obtidos, incluindo os menos bem-sucedidos, sirvam para apontar um caminho na escolha de melhores ligandos, melhores braços espaçadores, melhores métodos de ligação e melhores condições cromatográficas e que como tal, e subsequentemente, se possa tirar o melhor benefício para a utilização destes novos ligando em CA.

## **PERSPETIVAS FUTURAS**

---



Sendo a CA um dos métodos mais promissores em termos de separação e purificação de biomoléculas com interesse terapêutico e/ou industrial, pela sua simplicidade, versatilidade e alta reprodutibilidade, estudos embrionários de desenvolvimento de novos ligandos sintéticos, como os aqui apresentados, devem ser continuados e melhorados.

Desta forma, o desenvolvimento de ligandos baseados em sais de benzotiazole, possuidores de grupos carboxílicos e, como tal, facilmente imobilizados em matrizes cromatográficas, por esterificação de Steglich, deve ser desde já continuado utilizando cadeias espaçadoras de menor comprimento de forma a se conseguir obter o melhor balanço entre as interações iónicas e as hidrofóbicas. Adicionalmente, a introdução de grupos funcionais nos anéis heterocíclicos poderá ser um bom caminho no sentido de se variar o tipo e intensidade de interações a serem estabelecidas entre o ligando e as biomoléculas.

A aplicação de sais de 2-metilbenzotiazole **3** como ligandos em CA é uma nova abordagem promissora nesta área atendendo à facilidade com que se podem sintetizar. Nesse sentido, vários parâmetros cromatográficos devem ainda ser estudados, nomeadamente, a sua capacidade de ligação através de estudos de capacidade dinâmica de ligação para melhor caracterizar este suporte cromatográfico.

A toxicidade dos sais de 2-metilbenzotiazole **3** é uma questão aberta, uma vez que esta classe de compostos pode inibir o crescimento celular de células cancerosas e têm sido estudados na inibição de vírus (Yang *et al.*, 2007). No entanto, esta classe de compostos que exibiu um comportamento inibitório tem uma estrutura diferente da do ligando utilizado neste trabalho. Assim sendo, a toxicidade destes sais é uma questão que se deverá ter em conta em futuros estudos.

Finalmente, para aplicações práticas reais deste suporte, seria pertinente realizar a purificação de uma proteína a partir de um homogeneizado de *Escherichia coli* ou do sobrenadante de uma cultura celular, demonstrando assim o comportamento seletivo deste ligando, bem como, a possibilidade de aplicar estes suportes na purificação de biomoléculas (proteínas e/ou ácidos nucleicos) com aplicação terapêutica.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

Abrahart EN. *Dyes and Their Intermediates*, 2ª edição, E. Arnold Publishers, Ltd, Londres, 1977.

Almeida P. *Cianinas, a Cor não Visível da Fotografia*, Química - Boletim da SPQ - A Cor 1999; 73: 9-12.

Ayyar BV, Arora S, Murphy C, O'Kennedy R. *Affinity chromatography as a tool for antibody purification*. *Methods* 2012; 56: 116-129.

Berek D. *Size exclusion chromatography - a blessing and a curse of science and technology of synthetic polymers*. *Journal of Separation Science* 2010; 33: 315-335.

Biosciences A. *Protein Purification*. Amersham Biosciences, Uppsala, 2001.

Block H, Maertens B, Spriestersbach A, Brinker N, Kubicek J, Fabis R, Labahn J, Schäfer F. *Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review*. *Methods in enzymology* 2009; 463: 439-73.

Boto REF, Oliveira AS, Vieira Ferreira LF, Almeida P. *A study of N,N'-dicarboxyalkylthiacarbocyanines as cyanine direactive dyes covalently bound to cellulose*. *Dyes and Pigments* 2001; 48: 71-84.

Boto REF, El-Shishtawy RM, Santos PF, Reis LV, Almeida P. *Synthesis and characterization of novel mono and dicarboxyalkylthiacarbocyanines and their ester derivatives*. *Dyes and Pigments* 2007a; 73: 195-205.

Boto REF, Santos PF, Reis LV, Almeida P. *Synthesis and characterization of mono- and dicarboxyalkyloxcarbocyanines*. *Dyes and Pigments* 2007b; 75: 298-305.

Boto REF, Almeida P, Queiroz JA. *Thiacarbocyanine as ligand in dye affinity chromatography for protein purification*. *Biomedical Chromatography* 2008; 22: 278-288.

Boto REF, Anyanwu U, Sousa F, Almeida R, Queiroz JA. *Thiacarbocyanine as ligand in dye-affinity chromatography for protein purification. II. Dynamic binding capacity using lysozyme as a model*. *Biomedical Chromatography* 2009; 23: 987-993.

Car SA, Hemling ME, Bean MF, Roberts GD. *Perspective: analytical biotechnology integration of mass spectrometry in analytical biotechnology*. *Analytical Chemistry* 1991; 63: 2802-2824.

Chen S, Ho C, Hsaio K, Chen J. *Pressure-induced retention of the lysozyme on reversed-phase liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A* 2000; 891: 207-215.

- Clonis YD, Labrou NE, Kotsira VP, Mazitsos C, Melissis S and Gogolas G. *Biomimetic dyes as affinity chromatography tools in enzyme purification*. Journal of Chromatography A **2000**; 891: 33-44.
- Collins CH. *Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma*. Química Nova **2006**; 29: 889-890.
- Cramer SM, Jayaraman G. *Preparative chromatography in biotechnology*. Current Opinion in Biotechnology **1993**; 4: 217-225.
- Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB. *Selective enzyme purification by affinity chromatography*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA **1968**; 61: 636-643.
- Denizli A, Pişkin E. *Dye-ligand affinity systems*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods **2001**; 49: 391-416.
- Deshmukh NR, Lali AM. Adsorptive purification of pDNA on superporous rigid cross-linked cellulose matrix. Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **2005**; 818: 5-10.
- Doğan A, Özkara S, Sarı MM, Uzun L and Denizli A. *Evaluation of human interferon adsorption performance of Cibacron Blue F3GA attached cryogels and interferon purification by using FPLC system*. Journal of Chromatography B **2012**; 893-894: 69-76.
- Feng H, Jia L, Li H, Wang X. *Screening and chromatographic assessing of a novel IgG biomimetic ligand*. Biomedical Chromatography **2006**; 20: 1109-1115.
- Fekete S, Oláh E, Fekete J. *Fast liquid chromatography: the domination of core-shell and very fine particles*. Journal of Chromatography A **2012**; 1228: 57-71.
- Gallant SR, Koppaka V, Zecherle N. *Dye ligand chromatography*. Methods in Molecular Biology **2008**; 421: 61-69.
- Garcia FAP, Pires EMV. *Recovery Processes for Biological Materials*. Kennedy JF, Cabral JMS (Eds). John Wiley & Sons, New York, **1993**.
- Ghose S, Cramer SM. *Characterization and modeling of monolithic stationary phases: application to preparative chromatography*. Journal of Chromatography A **2001**; 928: 13-23.
- Ghose S, Kumpalume P. *Isolation and Purification of proteins*. Huttikaul R, Mattiasson B (Eds). Marcel Dekker, Nova Iorque, **2003**.

Guiochon G. *Preparative liquid chromatography*. Journal of Chromatography A **2002**; 965: 129-161.

Haeckel R, Hess B, Lauterborn W. Wüster KH. *Purification and allosteric properties of yeast pyruvate kinase*. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie **1968**; 349: 699-714.

Healthcare GE. *Strategies for protein purification*. Suécia, **2010**.

Healthcare GE. *Affinity Chromatography*. Principles and Applications Strategies for protein purification. Suécia, **2007**.

Hedhammar M, Karlström AE, Hober S. *Chromatographic methods for protein purification*. Estocolmo, **2006**.

Hess D, Covey TC, Winz R, Brownsey RW, Aebersold R. *Analytical and micropreparative peptide mapping by high performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry of proteins purified by gel electrophoresis*. Protein Science **1993**; 2: 1342-51.

Hofmann AW. *Noch einige weitere Beobachtungen über das o-Amidophenylmercaptan und seine Abkömmlinge*. Chemische Berichte **1887**; 20: 2251-2265.

Hutta M, Góra R, Halko R, Chalanyova M. *Some theoretical and practical aspects in the separation of humic substances by combined liquid chromatography methods*. Journal of Chromatography A **2011**; 1218: 8946-57.

Jungbauer A. *Preparative chromatography of biomolecules*. Journal of Chromatography **1993**; 639: 3-16.

Kennedy JF, Cabral JMF. *Recovery Processes for Biological Materials*. Kennedy JF, Cabral JMF (Eds). John Wiley & Sons, New York, **1993**.

Kim H, Webster C, Roberts JKM, Kositsawat J, Hung L, Terwilliger TC, Kim CY. *Enhancement of crystallization with nucleotide ligands identified by dye-ligand affinity chromatography*. Journal of Structural and Functional Genomics **2012**; 13: 71-79.

Kim SH, Hwang SH, Kim JJ, Yoon CM, Keum SR. *Syntheses and properties of functional aminosquarylium dyes*. Dyes and Pigments **1998**; 37: 145-154.

KumaraSwamy G, Kumar JMR, Sheshagirirao JVLN, Vnay Kumar D, Ratnamani C, Kranthi Kiran K. *Affinity Chromatography: A Review*. Journal of Pharmacy Research **2011**; 4: 1567-1574.

Labrou NE. *Design and selection of ligands for affinity chromatography*. Journal of Chromatography B **2003**; 790: 67-78.

Laue T, Plagens A. *Named Organic Reactions*, 2ª edição. John Willey & Sons Ltd, Inglaterra, **2005**.

Liapis AI. *Theoretical aspects of affinity chromatography*. Journal of Biotechnology **1989**; 11: 143-160.

Lowe CR. *Analytical biotechnology*. Current Opinion in Biotechnology **1996**; 7: 1-3.

Lowe CR, Lowe AR, Gupta G. *New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods **2001**; 49: 561-574.

Magdeldin S, Moser A. *Affinity Chromatography: Principles and Applications*. Affinity Chromatography. Magdeldin S (Ed). InTech, Croácia, **2012**.

Munawar AM, Nadeem S. *Thiazolium and Benzothiazolium Ionic Liquids, Ionic Liquids - Classes and Properties*. Handy S (Ed). InTech, Paquistão, **2011**.

Murza A, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. *Essential role of the concentration of immobilized ligands in affinity chromatography: Purification of guanidinobenzoatase on an ionized ligand*. Journal of Chromatography B **2000**; 740: 211-218.

Narayanan SR. *Preparative affinity chromatography of proteins*. Journal of Chromatography A **1994**; 658: 237-258.

Otera J, Nishikido J. *Esterification: Methods, Reactions, and Applications*. Wiley-VCH. **2006**.

Panigrahi M, Dash S, Patel S. Mishra BK. *Syntheses of cyanines: a review*. Tetrahedron **2012**; 68: 781-805.

Pardal AC, Ramos SS, Santos L, Almeida P. *Synthesis and fixation of aminocyanines to microcrystalline cellulose using cyanuric chloride as a cross-linking agent*. Coloration Technology **2001**; 117: 43-48.

Pardal AC, Nunes MJ, Gama AM, Queiroz JA. Almeida P. *Preliminary studies on the use of cyanines as ligands in dye-affinity chromatography of proteins*. Coloration Technology **2002a**; 118: 95-99.

Pardal AC, Ramos SS, Santos PF, Reis LV, Almeida P. *Synthesis and Spectroscopic Characterisation of N-Alkyl Quaternary Ammonium Salts Typical Precursors of Cyanines*. Molecules **2002b**; 7: 320-330.

- Pfaunmiller EL, Paulemond ML, Dupper CM, Hage DS. *Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **2013**; 405: 2133-2145.
- Pilli R, Costa P, Pinheiro S, Vasconcelos M. *Substâncias carboniladas e derivados*. Bookman Companhia Editora. Porto Alegre, **2003**.
- Queiroz JA, Tomaz CT, Cabral JMS. *Hydrophobic interaction chromatography of proteins*. Journal of Biotechnology **2001**; 87: 143-159.
- Rodrigues S. *Quimeras moleculares: síntese de novas moléculas híbridas contendo fulereno C<sub>60</sub>*. Belo Horizonte, **2011**.
- Roque AC, Gupta G, Lowe CR. *Design, synthesis, and screening of biomimetic ligands for affinity chromatography*. Methods in Molecular Biology **2005**; 310: 43-62.
- Sattayasai N. *Protein Purification*. Chemical Biology. Ekinici D (Ed). InTech, Tailândia, **2012**.
- Sigma-Aldrich. *Sepharose and Sepharose CL Gel Filtration Media* - Product Information. **2014a**.
- Sigma-Aldrich. *Ribonuclease A from bovine pâncreas for molecular biology* - Product Information. **2014b**.
- Silva A, Boto REF, El-Shishtawy RM, Almeida P. *Rhodamine B as ligand for affinity chromatography. Fixation onto cellulose studies by a curing method*. European Polymer Journal **2006**; 42: 2270-2282.
- Staal GE, Koster JF, Kamp H, Milligen-Boersma L, Veeger C. *Human erythrocyte pyruvate kinase. Its purification and some properties*. Biochimica et Biophysica Acta **1971**; 227: 86-96.
- Stickel JJ, Fotopoulos A. *Pressure-flow relationships for packed beds of compressible chromatography media at laboratory and production scale*. Biotechnology Progress **2001**; 17: 744-51.
- Sousa A, Sousa F, Queiroz JA. *Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA purification*. Journal of Separation Science **2012**; 35: 3046-3058.
- Shi Y, Jiang Y, Sui D, Li Y, Chen T, Ma L, Ding Z. *Affinity chromatography of trypsin using chitosan as ligand support*. Journal of Chromatography A **1996**; 742: 107-112.

Subramanian S. *Dye-ligand affinity chromatography: the interaction of cibacron blue F3GA with proteins and enzymes*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology **1984**; 16: 169-205.

Viera FB, Janson JC, Carlsson J. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*, 3ª edição. Janson JC (ed). John Wiley & Sons, Suécia, **2011**.

Weltrli A, Hermann U. *Effect of phase system selectivity in preparative column liquid chromatography*. Journal of Chromatography A **1976**; 125: 59-70.

Wood EJ. *Protein Purification Methods: A Practical Approach*. Harris ELV, Angel S (Eds). Oxford, **1989**.

Yang CH, Yang YN, Liang PH, Chen CM, Chen WL, Chang HY, Chao YS, Lee SJ. *Novel small-molecule inhibitors of transmissible gastroenteritis virus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **2007**; 51: 3924-3931.

Zollinger H, *Color Chemistry - Synthesis Properties and Applications of Organic Dyes And Pigments*, 2ª edição, Weinheim, VCH Publishers, **1991**.

Zou H, Luo Q, Zhou D. *Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods **2001**; 49: 199-240.



## ANEXO

---

## Publicações no âmbito deste trabalho

### Comunicações em painel

Alves LP, Ramos SS, Boto REF, Almeida P. *Novo método de ligação de cianinas à celulose: síntese total a partir de  $\omega$ -bromoalquilésteres de celulose*. XXII Encontro Nacional da SPQ/9º Encontro Nacional de Química Orgânica, Braga, Julho 2011.

Alves LP, Ramos SS, Boto REF, Almeida P. *Novos suportes para cromatografia de afinidade por síntese total de cianinas na matriz cromatográfica. Avaliação da contribuição de cada uma das partes na afinidade ligando-proteína*. 2º Simpósio da Unidade de Materiais Têxteis e Papeleiros, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Dezembro 2011.

Alves LP, Ramos SS, Boto REF, Sousa F, Almeida P. *Benzothiazolium Salt as a New Ligand in Affinity Chromatography for Protein Purification*. VIII Annual CICS Symposium, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Julho 2013.

Alves LP, Ramos SS, Boto REF, Sousa F, Almeida P. *Benzothiazolium Salt as a New Ligand in Affinity Chromatography for Protein Purification*. 10º Encontro Nacional de Química Orgânica e 1º Simpósio Luso-Brasileiro de Química Orgânica, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Lisboa, Setembro 2013.

Alves LP, Ramos SS, Boto REF, Sousa F, Almeida P. *A Benzothiazolium Salt as Chromatography Ligand for Protein Purification*. IX Annual CICS Symposium, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Junho 2014.

### Artigo

Alves LP, Ramos SS, Boto REF, Sousa F, Almeida P. *A Benzothiazolium Salt as Chromatography Ligand for Protein Purification*. Chromatographia (submitted) (2014).

**Chromatographia**  
**A Benzothiazolium Salt as Chromatography Ligand for Protein Purification**  
**--Manuscript Draft--**

<b>Full Title:</b>	<b>A Benzothiazolium Salt as Chromatography Ligand for Protein Purification</b>
<b>Article Type:</b>	Original
<b>Keywords:</b>	affinity chromatography; benzothiazolium salts; proteins purification; Steglich esterification
<b>Corresponding Author:</b>	Paulo Almeida, Ph.D Universidade da Beira Interior, Covilhã, PORTUGAL
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade da Beira Interior
<b>First Author:</b>	Paulo Almeida, Ph.D
<b>Order of Authors:</b>	Paulo Almeida, Ph.D Liliana P Alves, Bachelor Susana S Ramos, PhD Fani Sousa, PhD Renato EF Boto, PhD
<b>Abstract:</b>	<p>A new support for affinity chromatography was synthesized from Sepharose CL-6B containing a benzothiazolium bromide salt as a ligand. The original goal of this study was the evaluation of the azolium salt individual contribution as a constituent part of thiocarbocyanine dyes in an affinity relationship with standard proteins. This dye was previously post-grafted onto beaded cellulose by a curing method, successfully used as an affinity ligand for the interaction and isolation of different proteins. Following this idea, the immobilization of an azolium bromide salt onto Sepharose CL- 6B in different concentrations was performed by Steglich esterification, using dicyclohexylcarbodiimide as a coupling reagent and 4-dimethylaminopyridine as basic catalyser. The obtained crafted beaded Sepharose supports were qualitatively and quantitatively characterized by scanning electron microscopy, energy dispersive X-ray spectroscopy and elemental analysis.</p> <p>The affinity interactions between the chromatographic supports obtained and several standard proteins were finally evaluated. The best results were achieved using a chromatographic support with a ligand density of 0.18 mmol of benzothiazolium salt/g of chromatographies support, enabling the separation of ribonuclease, <math>\alpha</math>-chymotrypsin and bovine serum albumin from an artificial mixture using a decreasing ammonium sulphate stepwise gradient.</p> <p>In conclusion, this study allows demonstrating the potential applicability of small cationic ligands such as benzothiazolium salts, compared to these congener cyanine dyes previously studied, for the separation and purification of proteins by chromatography affinity, revealing a distinct and useful chromatographic behaviour by itself.</p>