



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# Funcionalização de criogéis para purificação cromatográfica de DNA plasmídico

Andreia Sofia Costa Brito

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

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomaz  
Co-orientador: Prof. Doutor Paulo Jorge da Silva Almeida

Covilhã, Outubro de 2015



*“ O valor das coisas não está  
no tempo que elas duram  
mas na intensidade com que  
acontecem. Por isso existem  
pessoas inesquecíveis  
coisas inexplicáveis  
e pessoas incomparáveis”*

*Fernando Pessoa*



# Agradecimentos

Antes de mais gostaria de agradecer aos meus orientadores, Prof. Doutora Cândida Tomaz e ao Prof. Doutor Paulo Almeida, pela orientação, conhecimentos transmitidos, disponibilidade, ajuda e acima de tudo pela simpatia.

Também gostaria de agradecer à Universidade da Beira Interior, ao Departamento de Química e ao centro de Investigação em Ciências da Saúde. Particularmente ao grupo de Biotecnologia e Ciências Biomoleculares e ao grupo de Química Orgânica, com um especial agradecimento à Doutora Catarina Nunes por todo o acompanhamento, ajuda e conhecimento que me transmitiu.

Não poderia deixar de agradecer a todos os companheiros de laboratório por todo o apoio, convívio, bom ambiente, por todas as conversas, brincadeiras e bons momentos que sempre vou lembrar. Um especial agradecimento aquelas pessoas que fizeram com que serões de longas tardes e noites passassem tão fugazmente. Um agradecimento também a todos os amigos que sempre me ouviram e apoiaram.

Por último, quero agradecer aos meus pais e irmã por todos os sacrifícios que fizeram para que aqui chegasse e terminasse este ciclo.



# Resumo

A cromatografia é uma poderosa ferramenta preparativa e analítica e um dos métodos de purificação mais importantes aplicados em processos “downstream” no ramo da Biotecnologia. A cromatografia de afinidade é uma das técnicas de eleição na purificação de DNA plasmídico (pDNA), sendo o ligando usado um dos fatores principais para o sucesso do processo. A purificação cromatográfica de pDNA requer suportes altamente porosos devido ao seu alto peso molecular e à elevada viscosidade das suas soluções. Os criogéis são materiais poliméricos macroporosos com canais interconectados, sendo uma alternativa aos suportes particulados convencionais na purificação de pDNA. O 3,8-diamino-6-fenilfenantridina (DAPP) e o tosilato de 5-pent-4-en-1-il-fenantridínio são ligandos de origem sintética e apresentam na sua estrutura um braço espaçador e carga positiva, o que os torna potencialmente adequados para a imobilização num criogel usando e o metacrilado de 2-hidroxietilo (HEMA) como co-monomero, para posteriores estudos cromatográficos. Neste projeto, foram testados dois métodos de imobilização do ligando à matriz e dois suportes de controlo. Foram efetuados vários ensaios cromatográficos, de retenção e de separação das isoformas superenrolada (sc) e circular aberta (oc) de pDNA. Adicionalmente, testou-se a separação da isoforma sc a partir de uma amostra de lisado clarificado. Os resultados mostram que o DAPP (5 mg/mL) e o HEMA são os ligandos com melhores perfis de retenção sendo por isso escolhidos para os estudos de separação de isoformas. Tanto o DAPP como o HEMA mostraram seletividade para a isoforma sc usando como passo de ligação uma solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e como passo de eluição, tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0 na presença de NaCl. Quanto à amostra de lisado clarificado, apenas o HEMA revelou capacidade de separação da isoforma sc dos contaminantes RNA e proteínas. Estes estudos iniciais permitiram demonstrar o potencial da aplicabilidade de criogéis com ligandos sintéticos para a separação e purificação de pDNA por cromatografia de afinidade.

## Palavras-chave

Criogéis, Cromatografia de afinidade, DAPP, DNA plasmídico, Fenantridinas, HEMA, Purificação.



# Abstract

Chromatography is a powerful analytical and preparative tool and one of the major methods applied in downstream purification processes in the biotechnology field. Affinity chromatography is one of the techniques of choice in purification processes of plasmid DNA (pDNA) and the ligands are the main factor for a successful process. Purification of pDNA requires highly porous matrices due to their high molecular weight and high viscosity of the solutions. The cryogels are macroporous polymeric materials with interconnected channels becoming an alternative to the conventional particulate supports in the purification of pDNA. The 3,8-Diamino-6-phenylphenanthridine (DAPP), tosylate 5-(pent-4-en-yl)phenanthridinium and 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) are synthetic ligands with an easy synthesis that present in their structure one spacer arm and positive charge which made them potentially suitable ligands for immobilization onto a cryogel and subsequent chromatographic studies. In this study two immobilization methods of ligand to the matrix and two control supports were studied. Several chromatographic experiments were carried out: initially, the retention, and separation of supercoiled (sc) isoform from open circular (oc) isoform in a sample of concentrated pDNA and then separation of sc isoforms from impurities in a sample of clarified lysate. The results showed that DAPP 5 (mg/mL) and HEMA have the best retention profiles being chosen for the isoforms separation studies. Both DAPP and HEMA showed selectivity for the sc isoform using 10 mM sodium acetate buffer pH 5, as binding step, and two step elution with a 10 mM sodium acetate buffer pH 5 in the presence NaCl. Only HEMA showed ability to separate sc isoform from impurities such as RNA and proteins in the clarified lysate sample. These initial studies have demonstrated the potential applicability of cryogels with synthetic ligands to pDNA separation and purification by affinity chromatography.

## Keywords

Affinity chromatography, cryogels, DAPP, HEMA, phenanthridines, plasmid DNA, purification.



# Índice

Capítulo 1 .....	1
Introdução.....	1
1.1 Importância do DNA plasmídico .....	1
1.2 Técnicas de cromatografia para purificação de DNA plasmídico .....	2
1.2.1 Tipos de cromatografia .....	3
1.2.1.1 Cromatografia de exclusão molecular .....	3
1.2.1.2 Cromatografia de troca aniônica .....	3
1.2.1.3 Cromatografia de interação hidrofóbica .....	4
1.2.1.4 Cromatografia de fase reversa.....	4
1.2.1.5 Cromatografia de afinidade .....	4
1.2.2 Importância de matrizes cromatográficas na purificação de pDNA .....	5
1.3 Criogéis .....	6
1.3.1 Diferenças entre géis e criogéis .....	8
1.3.2 Preparação dos criogéis .....	9
1.3.2.1 Preparação da solução contendo os precursores do criogel .....	9
1.3.2.2 Congelamento da solução.....	10
1.3.2.3 Descongelamento do criogel .....	11
1.3.3 Métodos de funcionalização dos criogéis.....	12
1.3.3.1 Poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) [poli(HEMA)] .....	13
1.3.3.2 Poli(metacrilato de 2-hidroxietilo- metacrilato de glicidilo) [poli (HEMA-GMA)] .....	13
1.4 Ligandos de afinidade na purificação de pDNA .....	14
1.4.1 Fenantridinas.....	15
1.4.2 Derivados de fenantridina .....	16
1.4.3 O ligando 3,8-diamino-6-fenilfenantridina (DAPP) .....	18
1.4.3.1 Efeito das forças iônicas no pKa do DAPP na ligação ao DNA.....	19
1.4.4 Derivatização de Fenantridinas .....	20
1.5 Objetivos do Trabalho.....	21
Capítulo 2 .....	23
Parte experimental .....	23
2.1 Materiais, solventes e reagentes .....	23
2.2 Equipamentos.....	23
2.3 Métodos .....	24
2.3.1 Síntese do <i>p</i> -toluenosulfonato de pent-4-en-1-ilo .....	24
2.3.2 Aminoacilação da DAPP.....	25
2.3.3 Alquilação.....	27
2.3.3.1 Fenantridina.....	27

2.3.3.2 DAPP .....	27
2.3.3.3 3,8-Dibenzamida-6-fenilfenantridina (1a) .....	27
2.3.3.4 3,8-Diacetamida-6-fenilfenantridina (1b) .....	28
2.3.4 Preparação do criogel .....	28
2.3.4.1 Síntese do criogel poli(HEMA-GMA) .....	28
2.3.4.2 Síntese do criogel poli(HEMA-tosilato de 5-(pent-4-en-1-il)fenantridínio) 1:29 e 1:14.....	28
2.3.4.3 Imobilização do DAPP ao criogel poli(HEMA-GMA) 5, 10 e 40 mg/mL.....	29
2.3.4.4 Síntese do criogel poli(HEMA) .....	29
2.3.5 Condições de crescimento .....	29
2.3.6 Lise, isolamento primário e produção do plasmídeo .....	29
2.3.7 Avaliação dos suportes cromatográficos por cromatografia de afinidade .....	30
2.3.7.1 Ensaio cromatográfico com amostra pré-purificada de plasmídeo pVAX1-LacZ .....	31
2.3.7.1.1 Ensaio cromatográfico por fluxo de gravidade em colunas de polipropileno econo-pac da Bio-rad .....	31
2.3.7.1.2 Ensaio cromatográfico por FPLC do criogel HEMA e DAPP.....	31
2.3.7.2 Ensaio cromatográfico com lisado clarificado .....	32
2.3.8 Quantificação de proteínas .....	32
2.3.9 Quantificação de endotoxinas.....	33
Capítulo 3 .....	35
Resultados e Discussão.....	35
3.1 Aminoacilação do DAPP .....	35
3.2 Métodos de Imobilização/Funcionalização .....	38
3.2.1 Método de imobilização do DAPP .....	38
3.2.2 Método de funcionalização do tosilato de 5-(pent-4-en-1-il)fenantridínio (fenantridina vinílica).....	40
3.2.2.1 Síntese do p-toluenosulfonato de pent-4-en-1-ilo.....	42
3.3 Caracterização dos suportes cromatográficos .....	42
3.3.1 SEM.....	42
3.3.2 Capacidade de re-hidratação por “Swelling degree” .....	44
3.3.3 Análise elementar .....	45
3.4 Estudos de cromatografia de afinidade por fluxo de gravidade .....	46
3.4.1 Ensaio cromatográfico com criogel DAPP .....	47
3.4.1.1 DAPP 40 mg/mL .....	47
3.4.1.2 DAPP 10 mg/mL .....	48
3.4.1.3 DAPP 5mg/mL.....	49
3.4.2 Ensaio cromatográfico com o criogel poli(HEMA-GMA) (suporte de controlo).....	51
3.4.3 Ensaio cromatográfico com o criogel fenantridina vinílica .....	51
3.4.3.1 Criogel fenantridina vinílica 1:29 .....	52
3.4.3.2 Criogel fenantridina vinílica 1:14 .....	53

3.4.4 Ensaio cromatográfico com o criogel poli(HEMA) (suporte de controlo) .....	54
3.5. Ensaio cromatográfico no sistema FPLC .....	55
3.5.1 Separação das isoformas superenrolada e circular aberta do pVAX1-LacZ .....	55
3.5.1.1 Criogel DAPP 5mg/mL .....	55
3.5.1.2 Criogel poli(HEMA) .....	57
3.5.2. Separação das isoformas superenrolada e circular aberta do lisado clarificado ...	58
3.5.2.1 Criogel DAPP 5 mg/mL .....	58
3.5.2.1 Criogel poli(HEMA) .....	59
3.6 Avaliação da qualidade do DNA plasmídico purificado com o criogel poli(HEMA) .....	60
Capítulo 4 .....	61
Conclusões e perspetivas futuras .....	61
Bibliografia.....	63



# Lista de Figuras

Figura 1. Diferentes tipos de cromatografia (adaptada de Healthcare, 2010). .....	3
Figura 2. Aplicações dos polímeros na Biotecnologia (Adaptado de Lozinsky 2008). .....	7
Figura 3. Representação esquemática da formação de criogéis.....	9
Figura 4. Estrutura tridimensional do criogel obtido ao longo do trabalho aqui descrito. ....	11
Figura 5. Poli(HEMA-GMA). .....	14
Figura 6. Fenantridina. ....	15
Figura 7. Brometo de Etídio.....	17
Figura 8. 3,8-diamino-6-fenilfenantridina (DAPP). ....	18
Figura 9. Curva de referência com padrões de albumina de soro bovino (25- 2000 µg/mL). ..	32
Figura 10. Curva de referência dos padrões de endotoxinas (0,1-1 EU/mL). .....	33
Figura 11. Síntese do dibenzamida (1a), diacetamida (1b), dihexanamida (1c), diacrilamida (1d). .....	35
Figura 12. Espectro IV dos criogéis: a) criogel poli(HEMA-GMA) (Suporte de controlo); b) criogel DAPP 5 mg/mL; c) criogel DAPP 10 mg/mL; d) criogel DAPP 40 mg/mL. ....	40
Figura 13. Espectros IV dos criogéis: a) criogel poli(HEMA) (suporte de controlo); b) criogel fenantridina vinílica 1:29; c) criogel fenantridina vinílica 1:14. ....	42
Figura 14. Imagens SEM com ampliação 70 e 400x: a) criogel DAPP 40 mg/mL; b) criogel DAPP 10 mg/mL; c) criogel DAPP 5mg/mL. ....	43
Figura 15. Imagens SEM com ampliação 70 e 400x: a) criogel poli(HEMA-GMA) (suporte de controlo); b) criogel poli(HEMA) (suporte de controlo). ....	43
Figura 16. Imagens SEM com ampliação 70 e 400x: a) criogel fenantridina vinílica 1:14; b) criogel fenantridina vinílica 1:29. ....	44
Figura 17. Perfis cromatográficos obtidos nos ensaios 1,2,e,3 com o suporte criogel DAPP 40 mg/mL. Injeção de 20 µL de pDNA (1120 µg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução	

tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado). ..... 48

Figura 18. Perfis cromatográficos obtidos nos ensaios 1 e 2 com o suporte criogel DAPP 10 mg/mL. Injeção de 50 µL de pDNA (447,5 µg/mL) e 25 µL de pDNA (2347,5 µg/mL), respectivamente nos ensaios 1 e 2. Utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado). ..... 49

Figura 19. Perfis cromatográficos obtidos nos ensaios 1,2 e 3 com o suporte criogel DAPP 5 mg/mL. Injeção de 20, 30 e 40 µL de pDNA (1120 µg/mL) respectivamente utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado). ..... 50

Figura 20. Perfil cromatográfico obtido com o suporte criogel poli (HEMA-GMA). Injeção de 50 µL de pDNA (1120 µg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado). ..... 51

Figura 21. Perfis cromatográficos obtidos nos ensaios 1,2 e 3 com o suporte criogel Fenantridina vinílica 1:29. Injeção de 20, 30 e 50 µL de pDNA (1120 µg/mL) respectivamente utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado). ..... 52

Figura 22. Perfis cromatográficos obtidos nos ensaios 1 e 2 com o suporte criogel Fenantridina vinílica 1:14. Injeção de 20 µL de pDNA (1120 µg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado). ..... 53

Figura 23. Perfis cromatográficos obtidos nos ensaios 1,2 e 3 com o suporte criogel poli(HEMA). Injeção de 50, 75 e 80 µL de pDNA (1120 µg/mL), respectivamente utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado). ..... 54

Figura 24. Perfil cromatográfico obtido com o suporte criogel DAPP 5mg/mL. a) Injeção de 25 µL de pDNA (600 µg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0, para o primeiro passo de eluição solução tampão de NaCl 0,22 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o segundo passo de eluição solução tampão de NaCl

0,55 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado); b) eletroforese de agarose das frações recolhidas. .... 56

Figura 25. Perfil cromatográfico obtido com o suporte criogel poli(HEMA): a) Injeção de 25 µL de pDNA (600 µg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0, para o primeiro passo de eluição solução tampão de NaCl 0,249 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o segundo passo de eluição solução tampão de NaCl 0,40M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado); b) eletroforese de agarose das frações recolhidas. .... 57

Figura 26. Perfil cromatográfico obtido com o suporte criogel DAPP 5 mg/mL com lisado clarificado. a) Injeção de 25 µL de pDNA (600 µg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0, para o primeiro passo de eluição solução tampão de NaCl 0,22 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o segundo passo de eluição solução tampão de NaCl 0,55 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado); b) eletroforese de agarose das frações recolhidas. .... 58

Figura 27. Perfil cromatográfico o suporte criogel poli(HEMA) com lisado clarificado: a) Injeção de 25 µL de pDNA (600 µg/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0, para o primeiro passo de eluição solução tampão de NaCl 0,22M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o segundo passo de eluição solução tampão de NaCl 0,55M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado); b) eletroforese de agarose das frações recolhidas. .... 59



## Lista de Tabelas

Tabela 1. Desvios químicos do $^1\text{H}$ RMN das 3,8-diamidas derivadas do DAPP [DMSO, $\delta$ (ppm), $J$ (Hz)].	36
Tabela 2. Desvios químicos do $^1\text{H}$ RMN dos R's das 3,8-diamidas derivadas do DAPP [DMSO, $\delta$ (ppm)].	37
Tabela 3. Relação entre o comprimento de onda máximo e absorvância dos espectros UV-Vis dos diferentes compostos.	37
Tabela 4. Tabela resumo dos criogéis sintetizados/funcionalizados.	38
Tabela 5. Capacidade de re-hidratação do criogel DAPP e HEMA.	44
Tabela 6. Análise elementar dos criogéis DAPP 40, 10 e 5 mg/mL.	45
Tabela 7. Análise elementar dos criogéis fenantridina vinílica 1:14 e 1:2.	46
Tabela 8. Avaliação da qualidade do plasmídeo.	60



# Lista de Acrónimos

AE	Análise Elementar
APS	Persulfato de amónio ( <i>ammonium persulfate</i> )
ATR	Refletância total atenuada ( <i>Attenuated total reflectance</i> )
BCA	Ácido bicinconínico ( <i>Bicinchoninic acid</i> )
BSA	Albumina Sérica Bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
c.c.f	Cromatografia em camada fina
c.d.o	Comprimento de onda
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
D	Dupleto em RMN <sup>1</sup> H
DAPP	3,8-diamino-6-fenilfenantridina
Dd	Duplo dubleto em RMN <sup>1</sup> H
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FTIR	Espetroscopia de infravermelho por transformada de Fourier ( <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> )
gDNA	DNA genómico
GMA	Metacrilato de Glicidilo ( <i>Glicidyl methacrylate</i> )
HEMA	Metacrilato de 2-hidroxietilo
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento (Hz)
Kpb	Quilo pares de bases
LAL	<i>Limulus ameobocyte lysate</i>
M	Multiplete em RMN <sup>1</sup> H
MBAAm	<i>N,N'</i> - metileno-bis(acrilamida)
MeOD	Metanol deuterado
Oc	Circular aberta ( <i>open circular</i> )
pDNA	DNA plasmídico
PHEMA	Poli(HEMA)
Poli(HEMA-GMA)	Poli[(metacrilato de 2-hidroxietilo)-co-(metacrilato de glicidilo de metacrilato)]
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de protão
S	Singleto em RMN <sup>1</sup> H
Sc	Superenrolada ( <i>supercoiled</i> )
SEM	Espetroscopia eletrónica de varrimento ( <i>Scanning electron microscope</i> )
Sl	Singleto largo em RMN <sup>1</sup> H
T	Tripleto em RMN <sup>1</sup> H
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> - tetrametilenodiamino
Tris	Tris-(hidroximetil)aminometano
USA	Estados Unidos da América ( <i>United States of America</i> )
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

$\nu_{\text{máx}}$	Frequência do máximo de absorção de uma banda ( $\text{cm}^{-1}$ )
$\Delta$	Desvio químico
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo de absorção ( $\text{cm}^{-1}$ )

# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1 Importância do DNA plasmídico

Nas últimas duas décadas, a purificação da molécula de DNA plasmídico (pDNA) tem se tornado num procedimento rotineiro em laboratório e no ramo industrial (Diogo *et al.*, 2005). O desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, tais como as vacinas de DNA e a terapia génica, forçaram o desenvolvimento de processos de purificação de pDNA em grande escala (Diogo *et al.*, 2005).

A terapia génica consiste na introdução de ácidos nucleicos em células humanas, de modo a modificar o seu repertório genético para processos terapêuticos (Ferreira *et al.*, 2000). Os ácidos nucleicos podem ser “antisense”, RNA, ou DNA que se liga às sequências alvo inibindo a expressão de um gene específico, tanto por bloqueamento do RNA mensageiro como pelos genes promotores (Ferreira, 2005). O DNA plasmídico pode ser usado para expressar especificamente um antigénio em células, estimulando e promovendo a resposta e memória imunitária, o que mostra o seu potencial para criar novas tecnologias mais seguras de produção e formação de vacinas (Ferreira *et al.*, 2000).

A aprovação de novos protocolos de terapia génica e vacinas de DNA usando sistemas de entrega de vetores de DNA tem promovido uma maior procura e necessidade de produção de pDNA com elevado grau de pureza (Ferreira, 2005).

Por norma, a produção do pDNA começa a uma escala de bancada com a construção e seleção do vetor de expressão apropriado, seguido da seleção e otimização das condições de fermentação, crescimento celular e finalmente dos processos de isolamento e purificação (Ferreira *et al.*, 2000).

Cada molécula de pDNA é constituída por um polímero linear de desoxirribonucleótidos ligados por ligações fosfodiéster, estando os grupos fosfato carregados negativamente a pH>4 (Diogo *et al.*, 2005). Os eixos do pDNA podem estar enrolados formando a isoforma maioritária designada de superenrolada (sc) de pDNA, existindo também frações da molécula numa forma não-enrolada designada como isoforma circular aberta (oc) (Diogo *et al.*, 2005). O método de purificação tem de assegurar que a estabilidade estrutural e estabilidade funcional da maior parte das conformações ativas sc de pDNA é mantida, assim como o seu conteúdo (> 97%), contendo em menor quantidade as isoformas linear e oc (Stadler *et al.*, 2004).

## 1.2 Técnicas de cromatografia para purificação de DNA plasmídico

A cromatografia é um dos métodos mais usados em Biotecnologia, tanto a nível analítico e preparativo, como industrial, devido à sua simplicidade, robustez, versatilidade e alta reprodutibilidade (Sousa *et al.*, 2012). A cromatografia é definida como um processo de separação obtida mediante a distribuição de componentes de uma mistura entre duas fases, uma fase estacionária e uma fase móvel (Scott, 2003). Os componentes que aderem preferencialmente à fase estacionária são retidos por mais tempo no sistema do que os que são distribuídos seletivamente na fase móvel. Como consequência, os solutos são eluídos a partir do sistema consoante as concentrações locais na fase móvel à medida que aumentam os seus coeficientes de distribuição em relação aos da fase estacionária (Scott, 2003).

A cromatografia é atualmente um dos processos essenciais na purificação de DNA plasmídico, podendo ser usada a nível preparativo ou como ferramenta analítica (Ghanem *et al.*, 2013). A cromatografia tem sido estabelecida como um método proeminente para a purificação de proteínas, DNA e outras moléculas (Boyer e Hsu, 1993). A purificação de pDNA por cromatografia apresenta diversas limitações no seu caminho, relacionadas com a estrutura das fases estacionárias existentes, com as moléculas de pDNA e as impurezas associadas (Diogo *et al.*, 2005). A baixa seletividade e co-eluição são problemas diretamente associados às semelhanças físicas e químicas entre as impurezas e o DNA (Diogo *et al.*, 2005). A separação e purificação de moléculas de DNA é diferente da das proteínas, devido não só aos diferentes coeficientes de difusão que se devem às diferenças de tamanho e estrutura das moléculas, mas também às diferenças de massa entre eles (Fishman e Patterson, 1996; Diogo *et al.*, 2005). Um dos problemas da cromatografia de pDNA é a baixa capacidade de ligação das fases estacionárias ao pDNA, o que resulta do facto da maioria dos poros das matrizes cromatográficas ter sido originalmente desenhadas para a ligação de proteínas (Stadler *et al.*, 2004). Esta inadequação pode ser ultrapassada aumentando o tamanho dos poros da fase estacionária (Diogo *et al.*, 2005), o que melhora o acesso do pDNA aos espaços internos conectados permitindo a existência de um fluxo contínuo e conseqüentemente uma melhoria da transferência interna de massa (Gustavsson e Larsson, 1996; McCoy *et al.*, 1996; Lyddiatt e O'Sullivan, 1998).

Por norma, a cromatografia é uma técnica usada após os passos de clarificação e concentração, isto é, depois da carga de impurezas e o volume do processo já terem sido reduzidos (Diogo *et al.*, 2005; Ghanem *et al.*, 2013). Têm sido usadas diferentes técnicas cromatográficas tais como, exclusão molecular, troca aniónica, interação hidrofóbica, fase reversa e afinidade, individualmente ou integradas em combinação em diversos processos de purificação de pDNA (Diogo *et al.*, 2005) (Figura 1).

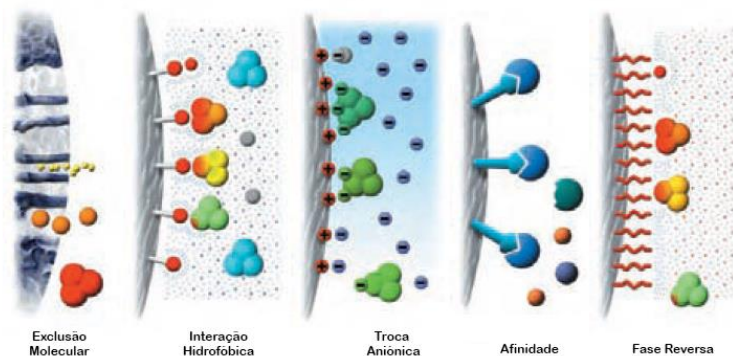


Figura 1. Diferentes tipos de cromatografia (adaptada de Healthcare, 2010).

## 1.2.1 Tipos de Cromatografia

### 1.2.1.1 Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular fraciona e purifica o plasmídeo a partir de um lisado clarificado segundo as diferenças de tamanho, e pode ser usada como um único passo ou em sequência com outros métodos cromatográficos (Ghanem *et al.*, 2013). Devido à complexidade da mistura de diferentes moléculas com uma elevada variedade de massas moleculares, a capacidade de resolução da cromatografia de exclusão molecular é limitada (Sousa *et al.*, 2008). No entanto, pode ser usada para separar amostras menos complexas, pois moléculas de dimensões elevadas, tais como as diversas formas de pDNA e DNA genómico (gDNA), não conseguem aceder aos poros internos, podendo assim ser separados de moléculas de RNA e outras impurezas de pequeno tamanho (Sousa *et al.*, 2008). A cromatografia de exclusão molecular é um passo ideal para o passo de polimento final, permitindo a remoção dos contaminantes residuais (Ferreira, 2005).

### 1.2.1.2 Cromatografia de troca aniónica

A cromatografia de troca aniónica é um método muito comum na captura e purificação de pDNA, tanto numa escala preparativa como analítica (Stadler *et al.*, 2004) e tem como vantagens uma rápida separação sem a necessidade de uso de solventes (Diogo *et al.*, 2005). Na cromatografia de troca aniónica, ligandos capazes de estabelecer fortes interações tais como aminas quaternárias, são tipicamente immobilizadas a matrizes poliméricas (Sousa *et al.*, 2008). Este tipo de cromatografia baseia-se nas interações entre o pDNA e a fase estacionária tendo por base as interações formadas entre cargas opostas, provocando diferentes tempos de retenção das isoformas à medida que aumenta o gradiente de sal (Ghanem *et al.*, 2013). Com o aumento da concentração de sal, as moléculas de DNA eluem por ordem de tamanho da cadeia que está diretamente relacionado com o número de grupos fosfato carregados (Ghanem *et al.*, 2013). Esta técnica cromatográfica tem-se mostrado eficiente na separação da isoforma sc de pDNA, que é mais compacta e tem uma densidade de carga maior do que a isoforma oc (Sousa *et al.*, 2008). No entanto, muitas fases estacionárias exibem fraca

seletividade de separação entre o pDNA e as impurezas, devido a semelhantes afinidades de ligação (Diogo *et al.*, 2005).

### **1.2.1.3 Cromatografia de interação hidrofóbica**

A cromatografia de interação hidrofóbica fornece uma purificação baseada na hidrofobicidade (Sousa *et al.*, 2008). A interação hidrofóbica explora as diferenças de hidrofobicidade entre o pDNA, ácidos nucleicos de cadeia simples e endotoxinas (Diogo *et al.*, 2005). Neste método, a retenção ocorre a elevadas concentrações de sal e é dirigida principalmente pelo deslocamento de moléculas de água ordenadas em redor das biomoléculas e ligandos (Sousa *et al.*, 2008). A sua eluição é conseguida pela diminuição da concentração de sal na fase móvel, o que enfraquece as interações hidrofóbicas (Sousa *et al.*, 2008). A necessidade de altas quantidades de sal constitui a principal desvantagem deste processo, pois o uso de sal é associado a elevados custos e alto impacto ambiental (Sousa *et al.*, 2008 e Ghanem *et al.*, 2013).

### **1.2.1.4 Cromatografia de fase reversa**

A cromatografia de fase reversa é baseada nas interações hidrofóbicas entre o soluto e a fase estacionária não polar (Stadler *et al.*, 2004). Este método usa modificadores de emparelhamento de iões na fase móvel de modo a alterar a seletividade e promover a separação de solutos carregados. Contém uma fase estacionária hidrofóbica e uma fase móvel que consiste num eluente hidroorgânico, contendo iões anfifílicos e uma pequena parte hidrofílica (Diogo *et al.*, 2005). A eluição dos solutos ocorre por diminuição da ordem de polaridade (Stadler *et al.*, 2004). Apesar de apresentar algumas restrições devido ao uso de solventes orgânicos, constitui um método eficiente na remoção de endotoxinas e é um método analítico poderoso na confirmação da pureza (Stadler *et al.*, 2004).

### **1.2.1.5 Cromatografia de afinidade**

A cromatografia de afinidade tem como base processos biológicos naturais, tais como o reconhecimento molecular, para uma purificação seletiva de biomoléculas de acordo com a sua função ou estrutura química (Ghanem *et al.*, 2013). Apesar da cromatografia de afinidade ser capaz de purificar, eliminar passos adicionais, aumentar rendimentos e melhorar processos de forma a serem mais económicos, apresenta limitações particularmente a origem do ligando e a baixa capacidade de ligação (Ghanem *et al.*, 2013). Este tipo de cromatografia tornou-se rapidamente no método de separação de escolha em diversos campos da biologia, nomeadamente na área da farmacêutica e biotecnológica (Hage, 1999). O ligando imobilizado é o fator principal na determinação do sucesso dos métodos cromatográficos de afinidade, podendo ser de origem biológica ou não biológica (sintéticos) (Hage, 1999). A cromatografia de afinidade separa as biomoléculas de acordo com as interações reversíveis entre a biomolécula alvo e o seu ligando específico, o qual é acoplado à matriz cromatográfica (Sousa

*et al.*, 2008). As interações específicas que ocorrem entre o ligando e a molécula alvo, podem ser o resultado de interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals e/ou por pontes de hidrogénio (Sousa *et al.*, 2008). A escolha da matriz e das condições usadas depende das propriedades físico-químicas das biomoléculas e do tipo de interações moleculares (Sousa *et al.*, 2008). A eluição pode ser alcançada usando um ligando competitivo, por mudança de pH, força iónica ou polaridade, dependendo da matriz usada e das características químicas das biomoléculas (Sousa *et al.*, 2008). A cromatografia de pseudo-afinidade difere da cromatografia de afinidade, pois usa ligandos não biológicos, como corantes e metais. Independentemente da origem do ligando, este é determinante na divisão das técnicas de afinidade em várias subcategorias: nomeadamente cromatografia de afinidade com metais imobilizados; cromatografia de afinidade de tripla-hélice, cromatografia de afinidade aminoácido-DNA e cromatografia de afinidade com corantes. A cromatografia de corantes é uma abordagem eficiente, tanto na purificação de biomoléculas a nível analítico como preparativo (Li *et al.*, 2009). Esta técnica cromatográfica baseia-se no reconhecimento entre as características moleculares das biomoléculas e o pseudo-ligando de afinidade (Li *et al.*, 2009). Este tipo de cromatografia fornece uma vasta variedade de ligandos de baixo custo, estáveis e de fácil obtenção para processos de imobilização e posterior purificação (Li *et al.*, 2009). Existem diversos estudos de ligandos de origem aromática usados como intercaladores na purificação de pDNA como por exemplo, o derivado de fenantridina, 3,8-diamino-6-fenilfenantridina (DAPP) recentemente utilizado na separação e purificação de pDNA (Caramelo-Nunes *et al.*, 2014).

### **1.2.2 Importância de Matrizes Cromatográficas na purificação de pDNA**

A cromatografia é um dos métodos de purificação mais diversificados e importantes aplicados em processos de “downstream” (Sousa *et al.*, 2012). A diversidade e quantidade de biomoléculas presentes no extrato bruto, assim como as semelhanças entre as impurezas e a biomolécula alvo são considerados como desafios críticos nas etapas de extração e purificação (Sousa *et al.*, 2012). A necessidade de processos de purificação de pDNA em larga escala sofreu um aumento significativo nos últimos anos devido à rápida evolução nas áreas da terapia génica e vacinas de DNA (Ferreira, 2005). A purificação cromatográfica de pDNA é particularmente problemática devido à estrutura natural do pDNA, à semelhança entre o pDNA e as impurezas e a falta de capacidade e seletividade dos processos tradicionais de adsorção (Ferreira, 2005).

O sucesso da purificação de pDNA depende muito da seleção de uma fase estacionária adequada, sendo o suporte idealmente sólido, macroporoso, química e fisicamente estável tendo baixa adsorção não específica com alta capacidade de ligação, transferência de massa e manutenção de uma boa capacidade de fluxo durante o processo (Sousa *et al.*, 2012). Além das características ideais, a fase estacionária deve ser incompressível, de baixo custo, simples de usar, reutilizável e estável durante a sanitização (Sousa *et al.*, 2012).

Devido à enorme variedade de biomoléculas que devem ser separadas e purificadas a partir de um extrato bruto, é cada vez mais necessário o desenvolvimento contínuo de novos suportes cromatográficos, mais eficientes e específicos, de modo a obter a molécula alvo com elevado grau de pureza. Existem diversos suportes cromatográficos usados na purificação do pDNA, nomeadamente suportes porosos e não porosos de partículas empacotadas, “continuous bead” tais como membranas, monólitos e criogéis (Sousa *et al.*, 2012).

Os suportes empacotados com partículas não porosas, tais como agarose ou celulose têm-se mostrado eficientes na micro-separação de sequências específicas de DNA. Apresentam uma enorme vantagem devido à ausência significativa de resistência de difusão dentro da partícula tornando-a particularmente útil numa rápida separação e análise de biomoléculas (Lee *et al.*, 2003).

As matrizes cromatográficas superporosas apresentam uma elevada porosidade de modo a aumentar a área superficial de contacto com as biomoléculas (Rodrigues *et al.*, 2007). Teoricamente, moléculas como o RNA e algumas proteínas menores que o pDNA permitem uma transferência mais rápida entre o fluxo exterior e o interior da partícula porosa, tornando possível o uso de fluxos elevados e mantendo uma captura eficiente e controlada do pDNA (Sousa *et al.*, 2012).

A cromatografia baseada em monólitos tem-se mostrado adequada na separação e purificação de macromoléculas (Shin *et al.*, 2011). A coluna de monólito é particularmente interessante, pois devido à sua elevada porosidade a quedas de pressão baixas, a sua estrutura mantém-se intacta mesmo com fluxos elevados (Shin *et al.*, 2011). Os canais do monólito proporcionam uma elevada acessibilidade do pDNA à superfície interna do material resultando numa melhoria da capacidade de ligação (Danquah e Forde, 2007), o que torna os monólitos como um material alternativo na separação de plasmídeos (Zochling *et al.*, 2004).

### 1.3 Criogéis

O elevado peso molecular do pDNA é o principal responsável pela elevada viscosidade dos extratos de DNA, assim como os baixos coeficientes de difusão quando comparados com os das proteínas (Prazeres, 1998). Este fato constitui um problema de elevada relevância quando são usadas técnicas com suportes cromatográficos convencionais, que apresentam poros pequenos que não estão indicados para a separação de moléculas de largas dimensões (Diogo *et al.*, 2005). As técnicas cromatográficas convencionais (“gel bead”) que usam partículas esféricas empacotadas apresentam algumas limitações tendo taxas de fluxos reduzidas, perdas a altas pressões, baixa reprodutibilidade e dificuldade de “scale-up”, impossibilitando a sua aplicação em materiais mais viscosos (Ma e Ramakrishna, 2008; Uygun *et al.*, 2013). Na tentativa de ultrapassar estas limitações desenvolveram-se novos suportes cromatográficos, baseados em criogéis (Lozinsky *et al.*, 2003) que permitem melhorar a difusão, assim como aumentar a capacidade de ligação do suporte à molécula alvo (Perçin *et al.*, 2011).

Os criogéis são matrizes superporosas de hidrogéis preparados em condições criogénicas, formados pela reação entre precursores monoméricos ou polímeros (Lozinsky *et al.*, 2003; Sahiner e Yildiz, 2014). Estes foram mencionados pela primeira vez há cerca de 50 anos, onde as suas características não usuais de um polímero de gel tornaram-nos atrativos (Ertürk e Mattiasson, 2014; Lozinsky *et al.*, 2003). Estes polímeros macroporosos têm sido usados em várias áreas da química, biologia, bioengenharia e biotecnologia, incluindo a sua utilização como suporte cromatográfico, transportador de células e moléculas para imobilização, matrizes de eletroforese e de imunodifusão (Lozinsky *et al.*, 2003; Ertürk and Mattiasson, 2014) (Figura 2).

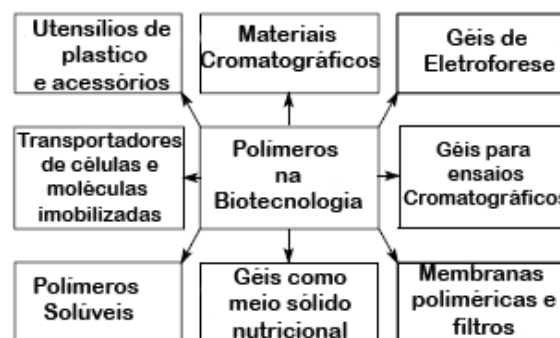


Figura 2. Aplicações dos polímeros na Biotecnologia (Adaptado de Lozinsky 2008).

A estrutura única dos criogéis, em combinação com a sua estabilidade osmótica e as propriedades de estabilidade química e mecânica, torna-os matrizes atrativas para processos cromatográficos de separação, não só de biomoléculas na escala das nanopartículas, plasmídeos, vírus e organelos celulares, mas também de células inteiras (Lozinsky *et al.*, 2003).

Os criogéis são materiais baratos e podem ser facilmente eliminados (Bereli *et al.*, 2010). Estes polímeros podem ser usados sob a forma de monólitos, bem como na forma de membranas, combinando as vantagens da cromatografia de membrana em termos de altas taxas de fluxo e alta reprodutibilidade (Bereli *et al.*, 2010). Curtas distâncias de difusão permitem uma utilização do ligando imobilizado nas paredes dos poros (Lozinsky *et al.*, 2002).

Os criogéis são sistemas de géis formados em condições criogénicas (congelamento - polimerização no estado congelado - descongelamento) de soluções ou dispersões coloidais de precursores específicos (Lozinsky, 2002; Ertürk e Mattiasson, 2014). Os géis, ao contrário dos criogéis, apesar de serem sistemas de polímeros imobilizados em que as macromoléculas formam uma matriz tridimensional como os criogéis, não apresentam um processo de formação criotópico (Lozinsky *et al.*, 2003).

A morfologia do gel é determinada pelo processo de preparação do gel, e a natureza das ligações é determinada pela estrutura química do polímero (Lozinsky *et al.*, 2003).

Dependendo do solvente de imobilização, podem-se formar hidrogéis e organogéis, sendo o seu solvente água e líquidos orgânicos, respetivamente (Okay, 2014). O solvente de imobilização é um fator crucial na formação da rede polimérica tridimensional do gel, pois o solvente não permite a formação de uma massa compacta de polímero, mas sim de objetos físicos que apresentam uma considerável reversibilidade de deformação, sem ocorrer destruição do polímero (Lozinsky *et al.*, 2003). O processo de congelação criotópico produz materiais poliméricos com diferenças morfológicas quando comparado com sistemas de matrizes poliméricas que não foram sujeitas a temperaturas de congelamento (Lozinsky, 2002; Lozinsky *et al.*, 2003).

### 1.3.1 Diferenças entre géis e criogéis

Do ponto de vista da química moderna de polímeros, os géis são sistemas de polímeros imobilizados com recurso a solventes em que as macromoléculas formam uma rede tridimensional fixa por ligações temporariamente estáveis e não flutuantes (Lozinsky *et al.*, 2002). Dependendo do tipo de ligação presente na estrutura tridimensional, os géis podem ser classificados como covalentemente ligados, géis ionotrópicos onde as macromoléculas são ligadas por interações electrostáticas e géis físicos em que as macromoléculas são ligadas por interações hidrofóbicas e por pontes de hidrogénio (Lozinsky *et al.*, 2002; Lozinsky, 2008).

De acordo com a sua morfologia, os géis podem ser classificados como sistemas homofásicos ou heterofásicos, onde não só o tamanho do poro, mas também a sua morfologia constitui um parâmetro importante na determinação da sua aplicabilidade na resolução de problemas específicos (Lozinsky, 2008). O congelamento criotrópico é um tipo específico de polimerização, que resulta num tratamento criogénico capaz de formar géis. Estes produtos obtidos por crio-congelamento em condições de  $-0^{\circ}\text{C}$  são designados como criogéis (Lozinsky *et al.*, 2002). Embora os criogéis possuam características específicas comparadas com os géis convencionais, estes são formados a temperaturas superiores às do ponto de cristalização do solvente (Lozinsky, 2008). A principal função da crio-congelação é a cristalização do solvente, o que distingue este processo de processos de arrefecimento e subsequente indução de congelamento, onde este acontece após um decréscimo da temperatura, não passando assim o solvente por fases de transição até ao congelamento (Lozinsky, 2002).

A estrutura esponjosa do criogel permite que o líquido seja bombeado pelo criogel a elevadas taxas de fluxo com a mínima resistência de fluxo. A estrutura e propriedades dos criogéis dependem da concentração dos precursores do gel e das condições do crio-congelamento utilizadas durante o processo (Dainiak *et al.*, 2007). Um aumento do co-monomero dá origem a um aumento da densidade de polímero na parede do poro, levando à formação de um gel macroporoso mais forte, e a um decréscimo da taxa de fluxo no criogel devido a um volume mais pequeno de cristais na formação do poro (Dainiak *et al.*, 2007).

### 1.3.2 Preparação dos criogéis

Os criogéis são geralmente preparados a temperaturas entre os -5 a -20°C. O processo de criocongelamento processa-se principalmente em três passos: (1) preparação da solução contendo os precursores do criogel; (2) congelamento da solução e (3) descongelamento do criogel (Figura 3).

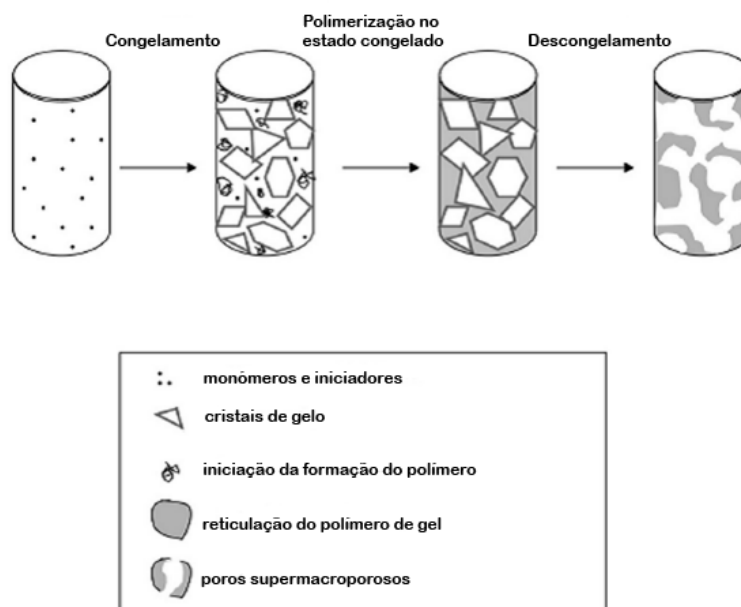


Figura 3. Representação esquemática da formação de criogéis.

(Adaptado de Ertürk e Mattiasson, 2014).

#### 1.3.2.1 Preparação da solução contendo os precursores do criogel

A preparação da solução inicial contendo os precursores monoméricos é um passo simples e rotineiro. A solução inicial deve conter os dois monómeros que vão constituir a rede estrutural do criogel, e ainda um agente reticulante como a *N,N'*-metileno-bis(acrilamida) (MBAAm), iniciadores da reação de polimerização tais como *N,N,N',N'*-tetrametilenodiamino (TEMED), persulfato de amônio (APS) e o solvente que vai servir de recipiente na formação dos poros (Perçin *et al.*, 2011).

A preparação da solução inicial constitui um passo muito importante, pois alterações na quantidade de água, o solvente mais usual, alterações na concentração dos solutos, composição dos precursores e outras condições de polimerização dos monómeros irão modificar as características do criogel, tais como tamanho do poro, espessura da parede do poro e também outras propriedades do material (Gun'ko *et al.*, 2013).

O solvente retido entre as ligações dos polímeros tem um papel muito importante no processo, pois evita que o sistema colapse formando uma massa compacta, assegurando assim a difusão das substâncias solúveis em volta do criogel (Lozinsky, 2002). A formação de

soluções de géis por polímeros de baixo peso molecular mostrou resultar na obtenção de poros largos, quando comparados com soluções de géis de polímeros de alto peso molecular (Henderson *et al.*, 2013). Este facto pode ser explicado pela equação de Mark-Kun-Houwink que propõe que soluções de polímeros de alto peso molecular geram poros mais pequenos devido ao volume relativamente pequeno de água livre (Henderson *et al.*, 2013).

### 1.3.2.2 Congelamento da solução

A mistura reacional, contendo os precursores da formação de gel é seguidamente congelada a temperaturas abaixo de 0°C, entre -5°C a -20°C (Lozinsky, 2002; Ertürk e Mattiasson, 2014). Este é um passo crucial, tanto para a formação do criogel, como para a formação das suas propriedades específicas que se devem a diversos processos que ocorrem em simultâneo durante a transformação da solução líquida numa matriz tridimensional polimérica (Lozinsky e Okay, 2014). O sistema do criogel na forma congelada, apesar de parecer um único bloco sólido, permanece essencialmente heterogéneo contendo uma micro-fase líquida não congelada ao longo dos cristais formados pelo solvente congelado (Lozinsky *et al.*, 2003).

Esta micro-fase apresenta apenas uma porção do volume inicial onde estão os precursores do gel concentrados (Lozinsky *et al.*, 2003). O aumento dramático da concentração dos precursores promove a formação do gel (Lozinsky *et al.*, 2003).

A temperatura de crio-congelação a que o criogel é sujeito na solução é um passo importante sendo responsável por definir tanto o tamanho, como a quantidade de poros existentes no criogel (Henderson *et al.*, 2013). Quando preparados pelo processo de crio-congelação a temperaturas mais baixas, por exemplo entre os -10 a -20°C, o solvente cristaliza de uma forma mais rápida resultando na nucleação de um maior número de cristais. Esta leva à formação de uma maior quantidade de partículas porosas formadas pelos cristais de gelo, possuindo no entanto um menor tamanho (Henderson *et al.*, 2013). Quanto maior a quantidade de solvente congelado, menor o volume da micro-fase líquida não congelada, aumentando assim a concentração das substâncias solúveis e levando à formação de uma parede mais fina e densa do poro (Lozinsky, 2002; Dainiak *et al.*, 2007). O tamanho do poro do criogel pode variar entre 10-100µm (Lozinsky *et al.*, 2003) (Figura 4).

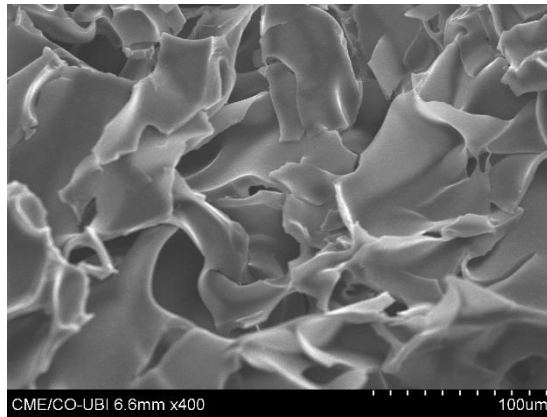


Figura 4. Estrutura tridimensional do criogel obtido ao longo do trabalho aqui descrito.

### 1.3.2.3 Descongelamento do criogel

Após um período de descongelamento, o criogel é retirado e colocado à temperatura ambiente. À medida que os cristais de solvente fundem e a rede polimérica é hidratada, dá-se por fim a formação de um criogel macroporoso interconectado (Henderson *et al.*, 2007). Os cristais do solvente congelado vão atuar como um agente moldador do poro e quando estes fundem, deixam um sistema contínuo de lacunas formando uma rede interconectada de poros fornecendo canais de passagem para a fase móvel (Lozinsky *et al.*, 2003; Dainiak *et al.*, 2007).

A superfície de tensão entre o solvente e a fase do gel é responsável pela forma do poro, tornando a superfície do poro macia (Lozinsky *et al.*, 2003). O tamanho do poro vai depender das características iniciais dos precursores do polímero de gel, das suas propriedades físico-químicas e das condições de congelamento (Dainiak *et al.*, 2007). Estes polímeros altamente porosos podem ser sintetizados a partir de qualquer material capaz de formar um gel contendo diferentes propriedades morfológicas e porosas (Ertürk and Mattiasson, 2014).

A determinação aproximada do tamanho do poro pode ser conseguida através de uma análise por espectroscopia eletrônica de varrimento (SEM) após este ter sido seco, não sendo contudo uma determinação muito rigorosa.

O criogel pode ser seco e re-hidratado muito rapidamente sem causar estragos na estrutura dos poros devido a elasticidade da parede do poro (Ertük and Mattiasson, 2014). Pode também ser armazenado por longos períodos de tempo sem causar mudanças no seu desempenho.

A capacidade de re-hidratação (“Swelling degree”) muda consoante o tipo de composição do polímero. Este comportamento é caracterizado pelo estudo do peso do criogel quando este é comprimido retirando o excesso de água comparado com o peso do criogel molhado, através da seguinte fórmula (Ertürk e Mattiasson,2007; Henderson *et al.*, 2013).

$$\text{"Swelling degree"} \approx \frac{(m \text{ criogel molhado} - m \text{ criogel seco})}{(m \text{ criogel molhado})} \quad (1)$$

A re-hidratação do criogel, quando colocado numa solução aquosa, ocorre muito rapidamente sendo uma questão de segundos após o contacto com a solução aquosa em questão, permitindo assim calcular aproximadamente o grau de porosidade (Ertük and Mattiasson, 2014).

### 1.3.3 Métodos de funcionalização dos criogéis

Existem diversos métodos de funcionalização de criogéis. Estes podem ser formados diretamente a partir de monómeros ou monómeros vinílicos devidamente funcionalizados, ou pela introdução de um ligando/funcionalidade no criogel após a sua formação, através de métodos de imobilização por reação entre grupos funcionais reativos entre si. As técnicas de copolimerização têm inúmeras vantagens no controlo do grau de grupos funcionais no produto controlando a sua estrutura e introduzindo as propriedades necessárias e desejadas no sistema de polímero (Kenawy *et al.*, 2002).

A introdução de um ligando irá criar uma afinidade específica entre o suporte e o pDNA garantindo assim uma retenção e purificação específica do pDNA. Os criogéis podem ser preparados com polímeros biodegradáveis, iónicos e biopolímeros, dependendo das propriedades requeridas pela sua aplicação (Gun'ko *et al.*, 2013).

A copolimerização de um monómero com outro, tendo um deles um grupo funcional, capaz de reagir com o grupo funcional do ligando, como por exemplo um grupo epóxido, é muitas vezes usada na formação de criogéis funcionais, geralmente não comprometem as suas propriedades mecânicas e osmóticas e reduzem o custo do material final (Kenawy *et al.*, 2002; Gun'ko *et al.*, 2013). A pós-modificação é muito usada para introduzir bio-ligandos que exigem condições especiais de imobilização, mas sem perdas da bio-actividade (Gun'ko *et al.*, 2013). O conteúdo de grupos funcionais, à superfície do criogel, depende do tipo de modificação e técnica usada, sendo que se for uma modificação à superfície esta vai estar limitada à área disponível para a interação, dependendo também do tamanho da molécula a imobilizar (Gun'ko *et al.*, 2013). A funcionalização do monómero, atuando como ligando, pode ser dez vezes maior comparado com a pós-modificação. Quando a rede densa do polímero é formada, sendo que o efeito é semelhante à reticulação física dos polímeros, pode ocorrer um impedimento da ligação a outros grupos dentro da camada do polímero, tornando-o inacessível a moléculas de grande tamanho (Gun'ko *et al.*, 2013).

### **1.3.3.1 Poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) [poli(HEMA)]**

Polímeros reticulados derivados do monómero metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) representam uma importante classe de polímeros reticulados hidrofílicos, os quais são altamente usados como hidrogéis em lentes de contacto (Wichterle e Lim, 1960; Mathur *et al.*, 1996). Variando a quantidade de água como solvente na polimerização da reticulação do HEMA é possível obter matrizes estruturais com uma elevada porosidade (Mattiasson *et al.*, 2009). Vários investigadores testaram o poli(HEMA) em estudos de ligação específica a proteínas e de capacidade de purificação de pDNA e anti-dsDNA na presença de ligandos específicos (Perçin, 2011; Özgür *et al.*; 2011 Uygun, 2013). Este polímero foi escolhido devido às suas características físicas e químicas interessantes, nomeadamente por ser opaco, esponjoso, elástico e de fácil compressão manual, sendo possível retirar a água acumulada nos poros e rehidrata-lo até ao seu tamanho original em 1 a 25 segundos (Özgür *et al.*, 2011).

Os criogéis produzidos a partir do monómero HEMA contêm paredes finas e poros largos contínuos interconectados (10-200 µm de diâmetro) que fornecem canais pelos quais passa a fase móvel (Özgür *et al.*, 2011). Como o tamanho dos poros da matriz é muito maior do que o tamanho das moléculas de DNA, estes permitem a passagem do DNA facilmente, apresentando também uma baixa resistência de fluxo na coluna de criogel (Özgür *et al.*, 2011).

De acordo com os estudos anteriores, o poli(HEMA) é um produto sintético, não tóxico e biocompatível que apresenta uma força mecânica adequada para o uso em diversas aplicações biotecnológicas. A presença de grupos hidroxilo que atuam como local de ligação para espécies bioativas, após uma ativação ou introdução de diferentes grupos funcionais à cadeia polimérica, é uma importante mais-valia (Kenawy *et al.*, 2002).

As propriedades do poli(HEMA) podem ser modificadas por introdução de uma grande variedade de diferentes grupos através da copolimerização ou por aditivos. Os grupos epóxido podem ser introduzidos na estrutura do polímero HEMA por copolimerização deste com um monómero contendo grupos epóxido na sua estrutura, como é o caso do metacrilato de glicidilo (GMA).

### **1.3.3.2 Poli(metacrilato de 2-hidroxietilo- metacrilato de glicidilo) [poli(HEMA-GMA)]**

O GMA é um monómero que contém dupla funcionalidade, tendo um grupo vinílico e um grupo epóxido. Ambos os grupos reagem prontamente com uma vasta variedade de monómeros e moléculas funcionais fornecendo ao usuário o máximo de liberdade e flexibilidade no “design” do polímero. O polímero formado pelo monómero GMA contém ambas as funções vinílicas e epoxídicas, o que permite que seja muito reativo e vantajoso para modificações pós-polimerização (Benaglia *et al.*, 2013).

O poli(HEMA-GMA) representa uma plataforma atrativa para estudos de modificação pós-polimerização e pode ser usado sem ativação *à priori* para a imobilização de (bio)moléculas através da abertura do anel pela cadeia lateral de oxirano (Barbey *et al.*, 2013).

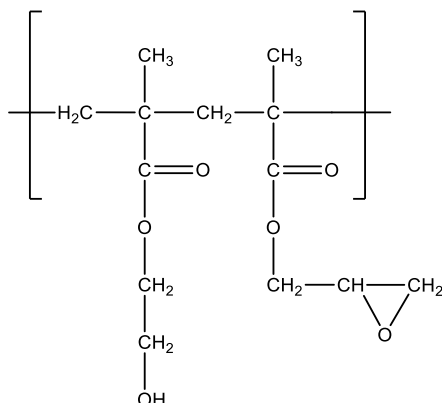


Figura 5. Poli(HEMA-GMA).

O poli(HEMA-GMA) (Figura 5) é muito versátil, pois o grupo epóxido reage com vários tipos de nucleófilos tais como carboxilos, álcoois, aminas, tióis e azidas (Lillethorup *et al.*, 2014). Estes tratamentos de pós-modificação permitem a obtenção de uma série de polímeros com várias propriedades (Lillethorup *et al.*, 2014). Recentemente foi demonstrado que o grupo formado após a reação de abertura do anel epóxido, pode também ser usado como um segundo passo de modificação pós-polimerização criando polímeros bifuncionais (Lillethorup *et al.*, 2014). O GMA é um reagente de baixo custo devido à sua elevada utilização industrial na produção de resinas de metacrilato e epóxido para serem empregues como revestimentos e adesivos (Benaglia *et al.*, 2013).

Existem diversos estudos publicados das diferentes aplicações deste polímero, tais como a utilização de poli(HEMA-GMA) acoplado com triptofano para a separação de lisozima a partir da casca do ovo, a utilização de um corante, o Cibacron Blue F3GA acoplado a um polímero de GMA numa tentativa de separar a lisozima da clara do ovo e também a quelação de um criogel poli(HEMA-GMA) com iões Ni(II) como suporte cromatográfico de afinidade com metais na adsorção de urease a partir de uma solução aquosa (Altintaş e Denizli *et al.*, 2005; Altintaş *et al.*, 2007; Uygun *et al.*, 2013).

## 1.4 Ligandos de afinidade na purificação de pDNA

A aplicação do ligando certo é um passo crucial no desenvolvimento de um sistema de purificação de sucesso (Caramelo-Nunes *et al.*, 2014). Os ligandos usados podem ser tanto de origem sintética como de origem natural, no entanto é bastante comum a utilização de moléculas contendo na sua estrutura anéis aromáticos (Caramelo-Nunes *et al.*, 2014). Os ligandos são uma parte essencial na cromatografia de afinidade, pois apresentam um papel importante na especificidade e estabilidade dos sistemas de purificação (Caramelo-Nunes *et al.*, 2013a). O sucesso da separação por afinidade é principalmente afetado pelo tipo de

ligando usado, levando à procura de novos protocolos mais sofisticados e seletivos, tendo por base o desenho e escolha de ligandos com alta afinidade e especificidade (Caramelo-Nunes *et al.*, 2013a).

### 1.4.1 Fenantridinas

As fenantridinas foram primeiramente sintetizadas nos finais do século XIX por Pictet e Ankersmit pela protólise do produto de condensação de benzaldeído e uma anilina (Tumir *et al.*, 2014). São compostos heterocíclicos de azoto formados por três anéis aromáticos fundidos. As condições de reação foram melhoradas por Morgan e Walls com base numa reação que inclui uma ciclização por fecho do anel e desidratação com oxicloreto de fósforo, em ebulição e em nitrobenzeno (Tumir *et al.*, 2014). As fenantridinas e sistemas heterocíclicos relacionados são importantes grupos de produtos naturais, compostos farmacologicamente ativos e agentes fluorescentes (Tummatorn *et al.*, 2014). As características estruturais das fenantridinas incorporam um conjunto único de propriedades relacionadas com a interação com moléculas de DNA e RNA, tais como o tamanho e curvatura da superfície aromática que corresponde à forma dos pares de bases (Tummatorn *et al.*, 2014; Tumir *et al.*, 2014). A fenantridina é uma base fraca com um pKa 5,50 (Theobald e Schofield, 1949), possui um anel muito estável que resiste à oxidação por diversos ácidos (Theobald e Schofield, 1949). Para a maioria das aplicações em que o alvo é o DNA, a fenantridina é convertida numa fenantridina carregada positivamente através de uma simples alquilação do azoto da posição 5 (N5) da fenantridina heterocíclica (Tumir *et al.*, 2014) (Figura 6).

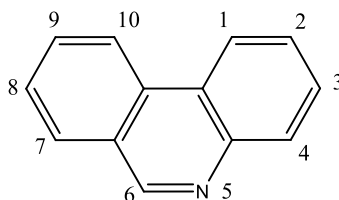


Figura 6. Fenantridina.

Quimicamente as fenantridinas apresentam propriedades similares à acridina, um composto orgânico e heterocíclico contendo um grupo azoto na sua estrutura, sendo eficaz na ligação ao DNA e RNA devido à sua capacidade de intercalação (Souibgui *et al.*, 2014). As fenantridinas representam um importante núcleo de estruturas de uma variedade de moléculas tanto de origem sintética, como de origem natural que exibem uma atividade biológica importante, desde antibacteriana, antiprotozoária a propriedades anti tumorais pela intercalação com o DNA (Mondal *et al.*, 2012).

Intercaladores são fármacos que são inseridos entre os pares de bases adjacentes de uma dupla hélice do ácido nucleico, formando estruturas estáveis (Kubař *et al.*, 2006). Os efeitos

mutagénicos, teratogénicos e carcinogénicos dos intercaladores e inversamente, a sua atividade farmacológica antitumoral e antiviral têm sido um grande foco de interesse por parte da comunidade científica (Kubař *et al.*, 2006).

O núcleo da fenantridina é muito usado como possível unidade intercaladora (Tumir *et al.*, 2014). A curvatura aromática da fenantridina encaixa perfeitamente na forma dos pares de bases, enquanto o seu tamanho permite a incorporação de substituintes consideravelmente longos nas posições 3 e 8 livres para a ligação do DNA e/ou interações não covalentes adicionais com a estrutura organizada dos polinucleótidos (Tumir *et al.*, 2014). O intercalador liga-se à dupla hélice do DNA por interações não covalentes com os pares de bases do DNA e por pontes de hidrogénio entre os grupos polares e as ligações fosfato-pentose (Kubař *et al.*, 2005). Recentemente mostrou-se que as interações de empilhamento têm um papel mais importante do que esperado e que a força destes complexos pode ser comparada com a resultante das ligações de hidrogénio (Kubař *et al.*, 2005). Pensa-se que a intercalação é uma reação composta por dois passos: um primeiro passo relativamente fraco de difusão controlada e a inserção do ligando como segundo passo (Kubař *et al.*, 2005).

Os derivados de fenantridinas são uma das famílias de compostos biológicos mais estudadas com capacidade de ligação ao DNA (Tumir *et al.*, 2014). O seu potencial terapêutico foi reconhecido pela primeira vez em 1931 por Morgan e Walls (Theobald e Schofield, 1949) o que levou a posteriores estudos até à atualidade. Várias estratégias sintéticas têm sido desenvolvidas incluindo a formação de ligações C-C e ligações C-N na formação de novos compostos funcionais (Tummatorn *et al.*, 2014).

#### **1.4.2 Derivados de fenantridina**

Desde a descoberta da estrutura do DNA nos anos 60, os derivados de fenantridina são reconhecidos como um símbolo de ligação ao DNA que por muitas décadas foram aplicados como marcadores fluorescentes de DNA e RNA, como é o caso do brometo de etídio (Tumir *et al.*, 2014). Após duas décadas marcadas por um baixo interesse pelas fenantridinas e seus derivados, a descoberta de alcalóides de fenantridina resultou num forte aumento do interesse científico (Tumir *et al.*, 2014). No entanto, os derivados de fenantridina são pouco utilizados em aplicações medicinais em humanos pelo seu potencial e propriedades carcinogénicas e mutagénicas, o que influencia negativamente a realização de estudos orientados na área da biomedicina (Tumir *et al.*, 2014).

Um dos derivados de fenantridina conhecido pelas suas propriedades como marcador de fluorescência e um dos primeiros intercaladores a ser estudado é o diamino-5-etil-6-fenilfenantridina, também designado como brometo de etídio. Este composto exhibe uma importante atividade anti-tripanosossomal sendo vastamente usado como agente de coloração de ácidos nucleicos, devido à fluorescência significativa que exhibe quando intercalado (Ross *et al.*, 1999).

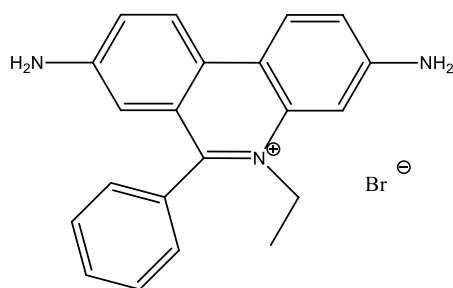


Figura 7. Brometo de Etídio.

O brometo de etídio (Figura 7) é um dos mais conhecidos intercaladores de DNA carregados positivamente (Ross *et al.*, 1999). De um ponto de vista fisiológico das forças iônicas relevantes, o brometo de etídio liga-se à hélice dos ácidos nucleicos por intercalação entre os pares de base (Luedtke *et al.*, 2005).

O brometo de etídio liga-se aos ácidos nucleicos de cadeia dupla com uma energia livre de cerca de  $5-9 \text{ Kcal mol}^{-1}$ , dependendo da natureza do ácido nucleico (Luedtke *et al.*, 2005). Tanto o modo de ligação, como a energia livre dos complexos do ácido nucleico-etídio, são altamente sensíveis à força iônica da solução o que levanta a possibilidade do empilhamento das bases do etídio e o sítio de intercalação específico poderem também depender das interações electrostáticas (Luedtke *et al.*, 2005). As interações de intercalação entre o etídio e mais de um par de bases são baseadas na premissa de que o núcleo de fenantridina do brometo de etídio é um sistema policíclico pobre em eletrões que, dependendo das restrições geométricas, pode ligar-se diretamente a bases relativamente ricas em eletrões (Luedtke *et al.*, 2005). Desta forma, conclui-se que as forças de dispersão fornecem provavelmente a principal força motriz para a intercalação. No entanto, a complementaridade electrostática pode ter um papel importante na determinação da especificidade do sítio de ligação do brometo e a sua orientação de ligação (Luedtke *et al.*, 2005).

Juntamente com os derivados do brometo de etídio reportados na literatura, a maioria dos derivados de fenantridinas são constituídas por modificações nas amins hexocíclicas (Rangarajan e Friedman, 2007).

A mono-acilação dos grupos amina resulta em dois regioisómeros com propriedades físicas similares, levando a dificuldades durante a purificação (Rangarajan e Friedman, 2007). Segundo a literatura, a diferença de atividade das duas amins hexocíclicas deve-se à diferente atribuição das características eletrónicas entre as duas amins, devido ao par de eletrões na posição 3 e 8 da amina se deslocar em graus de extensão diferentes (Rangarajan e Friedman, 2007). O par solitário da amina 3 pode deslocar-se para o azoto quaternário tornando-o deficiente em eletrões e menos reativo do que a amina 8 (Rangarajan e Friedman,

2007). A separação e isolamento dos regioisómeros formados durante as modificações das aminas hexocíclicas é um problema, uma vez que apresentam tempos de retenção cromatográficos similares, o que pode resultar numa purificação incompleta (Rangarajan e Friedman, 2007). A modificação da amina hexocíclica pode levar a uma baixa afinidade destes derivados para os ácidos nucleicos, decorrente da interferência com a intercalação da molécula (Luedtke *et al.*, 2003). Além disso, a introdução de um substituinte na posição 6 da fenantridina pode influenciar as propriedades óticas do cromóforo e assim ter um impacto significativo na ligação de afinidade à cadeia dupla de DNA (Tumir *et al.*, 2014).

### 1.4.3 O ligando 3,8-diamino-6-fenilfenantridina (DAPP)

O derivado 3,8-diamino-6-fenilfenantridina (DAPP) (Figura 8) é um análogo não quaternário do brometo de etídio (Caramelo-Nunes *et al.*, 2014). O DAPP contém um núcleo de fenantridina em que o grupo fenilo e os dois grupos amina estão ligados ao núcleo e o grupo fenilo é o único que não faz parte do sistema molecular planar (Caramelo-Nunes *et al.*, 2014).

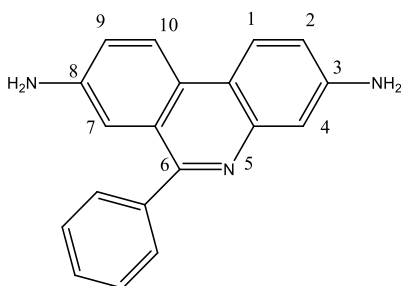


Figura 8. 3,8-diamino-6-fenilfenantridina (DAPP).

O DAPP tem sido usado como parte estrutural de matrizes poliméricas como ligando cromatográfico de afinidade na purificação de pDNA (Caramelo-Nunes *et al.*, 2014).

A maior parte dos ligandos do DNA são carregados positivamente, o que aumenta a solubilidade na água e a sua afinidade para esta molécula (Shi e Macgregor, 2007). A contribuição das interações eletrostáticas entre o ligando carregado positivamente e o DNA carregado negativamente para a ligação de afinidade é geralmente considerada responsável pelas mudanças favoráveis de entropia (Shi e Macgregor, 2007).

O DAPP é uma molécula intercaladora que se liga fortemente ao DNA, o que significa que este desenrola depois da ligação (Misra e Honig, 1995; Shi e Macgregor, 2007; Caramelo-Nunes *et al.*, 2014). A intercalação afeta a flexibilidade do ácido nucleico distorcendo o arranjo do par de bases, o que facilita a introdução de outra molécula intercaladora (Caramelo-Nunes *et al.*, 2014). A molécula de DAPP liga-se fortemente à dupla hélice do DNA por interações não covalentes de empilhamento dos anéis aromáticos condensados com os pares de bases de DNA, enquanto que os resíduos fenílicos são inseridos no “minor groove” (Misra e Honig, 1995;

Shi e Macgregor, 2007; Caramelo-Nunes *et al.*, 2013). O DAPP tem sido usado como um ligando de afinidade para separar a forma sc do pDNA das isoformas linear e oc (Caramelo-Nunes *et al.*, 2013a; Caramelo-Nunes *et al.*, 2013b). As pontes de hidrogénio que se estabelecem entre o grupo amina do DAPP e os grupos fosfato do DNA tem um papel menos importante na ligação de afinidade (Kubař *et al.*, 2005). Jones e Wilson (1981) mostraram que tanto a ligação do DAPP como intercalador, como a estrutura do complexo de intercalação, são similares ao complexo DNA-brometo de etídio. A intercalação do DAPP no DNA resulta numa estabilização do estado protonado que se manifesta com uma mudança do pKa do DAPP após a ligação (Misra e Honig, 1995). A ligação é muito sensível a variações do pH, pelo que quando o pH da solução tampão é menor do que o pKa do DAPP (5,8) o ligando está protonado e as moléculas carregadas negativamente são retidas na coluna (Caramelo-Nunes *et al.*, 2013b).

#### **1.4.3.1 Efeito das forças iónicas no pKa do DAPP na ligação ao DNA**

A estabilização da energia DAPP-DNA é substancialmente maior quando a molécula está protonada devido a formação de interações eletrostáticas (Caramelo-Nunes *et al.*, 2014). A valores de pH abaixo do pKa em estado livre do DAPP (5,8), forças de atração adicionais entre a carga negativa do DNA e a carga positiva da fenantridina aumentam as interações intermoleculares de Coulomb (Misra e Honig, 1995). O intercalador carregado positivamente liga ao pDNA mais fortemente do que na sua forma neutra, uma vez que com valores de pH parcialmente mais elevados não é observada retenção do mesmo numa coluna de Sepharose-DAPP (Caramelo-Nunes *et al.*, 2013b). As principais contribuições de energia livre de associação do ligando aos ácidos nucleicos podem divididas em polares (eletrostáticas) e não polares, onde as contribuições não polares incluem interações hidrofóbicas, interações de van der Waals e entropias de translação, rotação e configuração (Misra e Honig, 1995)

A mudança de pKa de um simples grupo do ligando aquando da ligação é uma medida das diferentes contribuições eletrostáticas para a energia livre de ligação dos ligandos carregados no estado neutro (Misra e Honig, 1995).

Em estudos recentes, foi demonstrado que quando o DAPP se encontra ligado a uma matriz de Sepharose, a força da interação DAPP-DNA varia consoante as mudanças de pH (Caramelo-Nunes *et al.*, 2013b). Desta forma, a matriz foi capaz de reter todas as moléculas de pDNA a pH 5,0 mas apenas obteve uma retenção parcial a pH igual a 6,0 e não obteve qualquer retenção a pHs iguais a 7,4 e 8,0 (Caramelo-Nunes *et al.*, 2013b). Este facto mostra que a interação DAPP-matriz é muito sensível a variações de pH e que a pH baixos as atrações eletrostáticas entre a carga da superfície do DNA e o suporte são as dominantes (Allemant *et al.*, 1997). A pH igual a 5,0, o gel apresentava uma cor vermelha escura intensa uma vez que o núcleo da fenantridina está protonado, significando que o pKa do DAPP ligado à matriz de Sepharose não sofreu mudanças substanciais relativamente à sua forma livre (Cimecioglu e

Weiss, 1995). A protonação dos grupos da molécula de fenantridina é evidente através da mudança de cor do gel a diferentes pHs, passando de um cor laranja escura para vermelho e depois para vermelho escuro quando o pH é diminuído de 8,0 para 5,0 (Caramelo-Nunes *et al.*, 2013).

No entanto, o pH não é a única variável que afeta a estabilização do DAPP-DNA; a presença de sal em grandes concentrações impede a ligação entre o DAPP e o DNA, destabilizando o complexo formado (Caramelo-Nunes *et al.*, 2014). A ligação entre a molécula de DAPP carregada e o DNA é progressivamente enfraquecida com o aumento da concentração de sal (Caramelo-Nunes *et al.*, 2013b). Esta destabilização é vista como uma vantagem, sendo usada para o processo de eluição de todas as isoformas da molécula de DNA (Caramelo-Nunes *et al.*, 2013)

#### 1.4.4 Derivatização de Fenantridinas

Existe uma variedade de métodos/protocolos para a síntese de fenantridinas, tanto substituídas ou não substituídas (Theobald e Schofield, 1949). Existem também diversos derivados de fenantridinas, análogos ao brometo de etídio. O desenvolvimento de uma estratégia de preparação de derivados onde o ponto de ligação é o átomo de azoto quaternário, tem sido extremamente usada na formação de novos compostos, contendo como principal grupo um núcleo de fenantridina. Antes de se iniciar a síntese de moléculas com propósitos de intercalação devem ter-se em consideração alguns aspetos importantes, tais como a disponibilidade de grupos funcionais nas moléculas que são passíveis de modificação, a capacidade dessas moléculas para realizar o seu propósito após a modificação e a facilidade e capacidade de “scale-up” da síntese da molécula (Rangarajan e Friedman,2007).

Quando se modifica uma fenantridina, tal como o DAPP, é importante considerar a variação da cadeia alquílica na posição 5, a modificação/substituição das aminas hexocíclicas das posições 3,8 e a modificação/substituição do grupo fenilo por outros grupos na posição 6 da fenantridina (Rangarajan e Friedman,2007). Estas modificações poderão encontrar obstáculos devido à falta de grupos funcionais para a modificação, formação de misturas regioisómeras depois da modificação, necessidade de vários passos de síntese durante o procedimento e, mais importante, a perda ou diminuição de afinidade de ligação aos ácidos nucleicos depois da modificação (Rangarajan e Friedman,2007).

A escolha do método de síntese depende de como o sistema tricíclico é formado, nomeadamente se a partir de grupos bifenilo substituído ou um derivado de fluoreno ou se a partir de um composto que não contém uma ligação bifenilica (Katritzky e Boulton, 1971). Na síntese a partir de bifenilos ou derivados de fluoreno, podem obter-se fenantridinas através da ciclização de dois compostos bifenilos substituídos com o propósito de obter um fecho do anel, através do uso de cloreto de fósforo com ou sem a presença de um solvente com altas temperaturas de ebulição como o nitrobenzeno (Katritzky e Boulton, 1971).

Nas reações que não contêm uma ligação bifenílica há formação de uma fenantridona a partir de sulfatos de diazônio de amino-benzanilida e pelo aquecimento da solução aquosa permitindo a decomposição do sulfato em acetona (Katritzky e Boulton, 1971). Este tipo de reações dá frequentemente origem a inúmeros compostos, para além do composto desejado (Katritzky e Boulton, 1971). As fenantridinas podem ser também conseguidas através de outros métodos envolvendo reações com intermediários de benzeno (Katritzky e Boulton, 1971). O benzeno reage com o isocianato de fenilo dando origem a uma fenantridina por reações Diels-Alder (Katritzky e Boulton, 1971). A fenantridina é formada pelo ataque de uma segunda molécula de benzeno sobre o aduto ou na fenantridona (Sheehan e Daves, 1965). Existem diversos métodos descritos para a formação de fenantridonas que por conversão dos seus derivados dá origem à fenantridina desejada (Katritzky e Boulton, 1971). Um dos procedimentos usados e recomendados para uma síntese em larga escala envolve a conversão de lactama em fenantridina realizado com aquecimento de pentassulfureto de fósforo, seguido de dessulfurização com raney níquel ou raney cobalto (Katritzky e Boulton, 1971).

## 1.5 Objetivos do Trabalho

Os objetivos deste trabalho de investigação foram:

- a síntese de novos ligandos derivados de fenantridinas, seguida de produção de criogéis e derivatização e imobilização dos mesmos;
- a aplicação dos criogéis em estudos cromatográficos de retenção e separação seletiva de pDNA em amostras pré-purificadas e em lisado clarificado de *Escherichia coli*.



# Capítulo 2

## Parte experimental

### 2.1 Materiais, solventes e reagentes

Todos os reagentes cuja síntese não se encontra descrita e o metacrilato de glicidilo (GMA), 3,8-diamino-6-fenilfenantridina (DAPP), persulfato de amónio, cloreto de sódio, acetato de sódio e azul bromofenol foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) e a sua composição era analiticamente pura. O DAPP foi adquirido à Alfa Aesar (Ward Hill, Massachusetts, EUA) assim como *N,N,N',N'*-tetrametileno diamina (TEMED). O *N,N*-metileno-bis(acrilamida), o metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) e a fenantridina foram adquiridos à Acros Oorganics (Fair Lawin, New Jersey, EUA). O Tris-(hidroximetil)aminometano (Tris) foi aquirido à Merck (Darmstadt, Alemanha). Todas as soluções foram preparadas com água desionizada purificada num sistema de purificação Mili-Q da Milipore Systems (Bedford, Massachusetts). A agarose foi adquirida à GibcoBRL Life Technologics e o Green Safe à NZYTech (Lisboa, Portugal). O plasmídeo pVAX1LACZ<sup>©</sup> de 6050 pares de bases (Invitrogene, Carlsband, CA, EUA) com resistência à kanamicina foi obtido pela transformação de células competentes de estirpe *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  conservada em crio-tubos a -80°C numa solução de 30% (v/v) de glicerol e 70 % (v/v). As colunas cromatográficas de polipropileno econo-pac e o adaptador de fluxo foram adquiridos à Bio-rad (Hercules, California, EUA). Os concentradores Vivaspin<sup>®</sup>6 foram adquiridos à Stedim Biotech (Goettingen, Alemanha).

### 2.2 Equipamentos

A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia de camada fina (c.c.f) utilizando placas pré-revestidas com sílica gel da Macherey-Nagel Alugram<sup>®</sup> SIL G/UV<sub>254</sub> de 0,2 mm. O eluente era constituído por uma mistura de 0-2% 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 365 e 254 nm.

Os espectros de infravermelho (IV) por refletância total atenuada (ATR) foram efetuados num espectrofotómetro Thermoscientific Nicolet is10: smart iTR equipado com diamante. Para a obtenção dos dados de ATR foi colocada uma amostra sobre o diamante e o espectro foi registado. No espectro de IV são indicados a frequência do máximo de absorção de uma banda ( $\nu_{\max}$  em  $\text{cm}^{-1}$ ) e caso se justifique, a atribuição dessa banda a um grupo funcional relevante na molécula.

As leituras de absorvância foram medidas num espectrofotómetro UV-Vis Thermo Fisher Scientific modelo Evolution 160 (Madison, Wisconsin, EUA) com células de quartzo, após a recolha das frações resultantes dos ensaios cromatográficos.

Os espetros de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  foram efetuados num espetrómetro Bruker Avance 400 MHz (RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz e RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz) e processados com o software TOPSPIN 3.1 (Fitchburg, Wisconsin, EUA) usando dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO- $d_6$ ), metanol deuterado (MeOD) e clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como solvente e padrão interno. 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), singleto largo (sl) duplete (d), duplo dublete (dd), 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 criogéis foram obtidos por criocongelação num banho de acetona termostaticado a  $-12^\circ\text{C}$  da JP-Selecta.

As análises qualitativas dos suportes obtidos foram efetuadas pela realização de imagens de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) obtidas num microscópio eletrónico de varrimento HITACHI S4100 (Tóquio, Japão).

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 1108 (Vigo, Espanha).

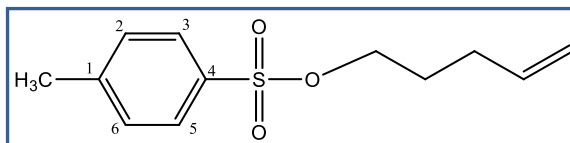
Os ensaios cromatográficos foram efetuados num sistema de “Fast Protein Liquid Chromatography” (FPLC) da Amersham Pharmacia Biotech. Equipado com um Controlador Plus LCC-501, bombas P-500, registador REC 112 e um coletor de frações FRAC-100. É constituído ainda por uma detetor de condutividade e uma unidade ótica UV-1.

## 2.3 Métodos

### 2.3.1 Síntese do *p*-toluenosulfonato de pent-4-en-1-ilo

A uma solução de cloreto de tosilo (1,04 g; 5,5 mmol), piridina (0,0403 mL; 0,50 mmol), trietilamina (1,4 mL; 10 mmol) em 15 mL de diclorometano, arrefecida em banho de gelo, foi adicionada uma solução de 4-penten-1-ol (0,58 mL; 5 mmol) em 10 mL de diclorometano, após o qual se deixou à temperatura ambiente. Seguiu-se a evolução da reação por c.c.f (sílica, diclorometano, metanol/ éter etílico 0-2%) tendo-se completado em 16h.

A mistura resultante foi lavada com 25 mL de uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio e 25 mL de água destilada. A fase orgânica resultante foi seca sobre sulfato de sódio anidro e purificada por uma coluna cromatográfica (sílica, diclorometano, metanol/ éter etílico 0-2%), tendo-se obtido o *p*-toluenosulfonato de pent-4-en-1-ilo



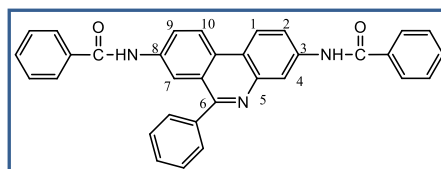
com um rendimento de 36%; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,79 (d,  $J = 8,1$  Hz, 2H, ArH), 7,34 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H, ArH), 5,74 - 5,60 (m, 1H, =CH), 5,00 - 4,89 (m, 2H, =CH), 4,11 - 3,98 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,45 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,08 (dt,  $J = 7,6, 4,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,81 - 1,67 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ) ppm; RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 144,70 (C), 136,62 ( $\text{CH}_{\text{Tos}}$ ), 133,17 (C), 129,83 ( $\text{CH}_{\text{Tos}}$ ), 127,90 (CH), 115,86 ( $\text{CH}_2$ ), 69,80 ( $\text{CH}_2$ ), 29,38 ( $\text{CH}_2$ ), 27,99 ( $\text{CH}_2$ ), 21,64 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.

### 2.3.2 Aminoacilação da DAPP

Processo geral: A uma suspensão de DAPP (1,05 mmol) em 15 mL de acetonitrilo e piridina (2,26 mmol), agitada à temperatura ambiente, foi adicionado gota à gota durante 1 min., uma solução do agente acilante adequado (anidrido benzóico, anidrido acético, cloreto de hexanoílo ou cloreto de acríloílo; 1,05 mmol) em 1 mL de acetonitrilo. Seguiu-se a evolução da reação por c.c.f (sílica, diclorometano, metanol/ éter etílico 0-2%) tendo-se completado de 2-16h.

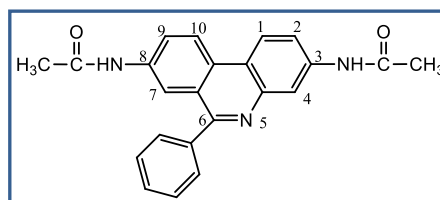
A solução resultante foi concentrada e adicionou-se éter etílico e éter petróleo até cristalização do produto que se recolheu por filtração, tendo-se obtido as seguintes 3,8-diamidas derivadas do DAPP:

**A.1 3,8-Dibenzamida-6-fenilfenantridina (1a)**, obtido por acilação com anidrido benzóico, após 2h de reação, com um rendimento de 70%; cristais laranja; IV  $\nu_{\text{max}}$ : 1659 ( $\text{C}=\text{O}$ )  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )

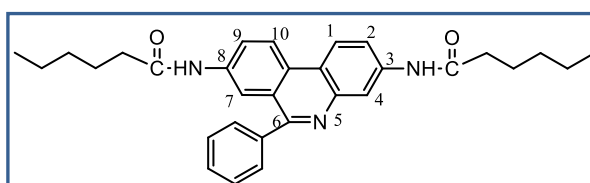


$\delta$ : 10,64 (s, 1H, NH), 10,63 (s, 1H, NH), 8,88 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1H, H1 ou H10), 8,77 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H, H1 ou H10), 8,65 (s, 1H, H4 ou H7), 8,61 (s, 1H, H4 ou H7), 8,41 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H, H2 ou H9), 8,13 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H, H2 ou H9), 8,04 (d,  $J = 7,2$  Hz, 2H, PhH), 7,96 (t,  $J = 8,5$  Hz, 3H, PhH), 7,77 (d,  $J = 6,5$  Hz, 2H, PhH), 7,69 - 7,43 (m, 8H, PhH) ppm; RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 167,61 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 166,23 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 166,17, 160,86, 143,59, 139,77, 139,65, 138,35, 135,17, 134,91, 133,12, 132,05, 131,05, 129,93, 129,52, 129,34, 129,00, 128,83, 128,76, 128,68, 128,61, 128,05, 128,02, 124,86, 124,71, 123,42, 123,02, 121,03, 119,69, 119,25, 117,91 ppm,

**A.2 3,8-Diacetamida-6-fenilfenantridina (1b)**, obtido a partir de DAPP e anidrido acético; após 16h de reação, com um rendimento de 96%; cristais amarelo claro; IV  $\nu_{max}$ : 2980 (CH<sub>3</sub>), 1664 (C=O) cm<sup>-1</sup>; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 8,76 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, H1 ou H10), 8,66 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, H1 ou H10), 8,43 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, H4 ou H7), 8,32 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H, H4 ou H7), 8,18 (dd, *J* = 9,0, 1,6 Hz, 1H, H2 ou H9), 7,85 (dd, *J* = 8,9, 1,8 Hz, 1H, H2 ou H9), 7,77 - 7,66 (m, 2H, PhH), 7,66 - 7,52 (m, 3H, PhH), 2,15 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2,06 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>) ppm; RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 168,91 (C=O), 168,87 (C=O), 160,68, 143,48, 139,71, 139,57, 138,26, 129,77, 128,87, 128,82, 128,50, 124,60, 123,61, 123,33, 122,91, 119,83, 119,14, 117,77, 116,33, 24,41, 24,23 ppm.

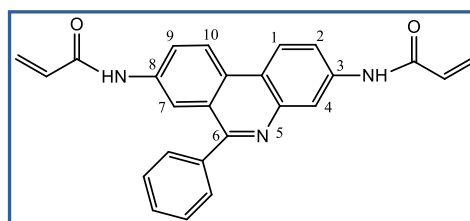


**A.3 3,8-Dihexanamida-6-fenilfenantridina (1c)**, obtido a partir de DAPP e cloreto de hexanoílo; após 3h de reação, com um rendimento de 82%; cristais amarelos; IV  $\nu_{max}$ : 2928, 2858 (CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>), 1689 (C=O) cm<sup>-1</sup>; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 10,52 (s, 1H, NH), 10,44 (s, 1H, NH), 8,87 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, H1 ou H10), 8,78 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, H1 ou H10), 8,71 (s, 1H, H4 ou H7), 8,47 (s, 1H, H4 ou H7), 8,29 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, H2 ou H9), 7,93 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, H2 ou H9), 7,79 (s, 2H, PhH), 7,69 (s, 3H, PhH), 2,42 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, COCH<sub>2</sub>), 2,32 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, COCH<sub>2</sub>), 1,67 - 1,62 (m, 2H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1,60 - 1,53 (m, 2H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1,40 - 1,16 (m, 8H, CO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 0,96 - 0,75 (m, 6H, CO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>) ppm; RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 171,82 (C=O), 171,64 (C=O), 159,38, 139,93, 138,58, 130,15 (CH), 129,66 (CH), 128,16 (CH), 123,42 (CH), 123,16 (CH), 123,00 (CH), 120,73 (CH), 119,14 (CH), 116,58 (CH), 36,05 (CH<sub>2</sub>), 35,90 (CH<sub>2</sub>), 30,41 (CH<sub>2</sub>), 30,38 (CH<sub>2</sub>), 24,25 (CH<sub>2</sub>), 24,09 (CH<sub>2</sub>), 21,42 (CH<sub>2</sub>), 21,38 (CH<sub>2</sub>), 13,41 (CH<sub>3</sub>), 13,36 (CH<sub>3</sub>) ppm.



**A.4 3,8-Diacrilamida-6-fenil fenantridina (1d)**

obtido a partir de DAPP e cloreto de acríloílo; após 16h de reação, com um rendimento de 86%; cristais vermelhos; IV  $\nu_{max}$ : 2590 (CH=CH), 1685 (C=O) cm<sup>-1</sup>; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 11,25 (s, 1H, NH), 11,08 (s, 1H, NH), 9,01 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H, H1 ou H10), 8,92 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, H1, H10), 8,72 (s, 1H, H4 ou H7), 8,61 (s, 1H, H4 ou H7), 8,46 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, H2 ou H9), 8,13 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, H2 ou H9), 7,90-7,86 (m, 2H, PhH), 7,79-7,74 (m, 3H, PhH), 6,67 (dd, *J* = 16,7, 10,2 Hz, 1H, CH<sub>gem</sub>), 6,53 (dd, *J* = 17,0, 10,2 Hz, 1H, CH<sub>gem</sub>), 6,37 (d, *J* = 17,2 Hz, 1H, CH<sub>trans</sub>), 6,28 (d, *J* = 17,2 Hz, 1H, CH<sub>trans</sub>), 5,86 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H, CH<sub>cis</sub>), 5,80 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H, CH<sub>cis</sub>) ppm; RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 164,52 (C=O), 164,36 (C=O), 160,34, 140,98, 139,60, 136,31, 131,78, 131,64, 131,10, 130,79, 129,23, 128,68, 128,17, 124,41, 124,28, 122,33, 121,45, 120,62, 118,42 ppm.

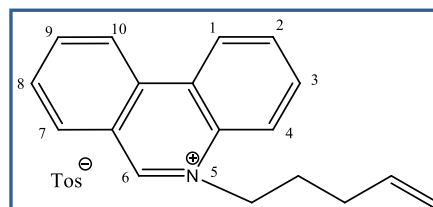


### 2.3.3 Alquilação

#### 2.3.3.1 Fenantridina

Uma suspensão de fenantridina (0,2 g; 1,1 mmol) em 20 mL de nitrobenzeno e *p*-toluenosulfonato de pent-4-en-1-ilo (0,742 g; 3,3 mmol) foi refluxada durante 16h, tendo-se seguido a evolução da reação por c.c.f (sílica, diclorometano, metanol/ éter etílico 0-2%.

Por concentração e adição de uma mistura de éter etílico/éter petróleo, formando-se um sólido cristalino que foi recristalizado de éter etílico/ éter petróleo, tendo-se obtido o **tosilado de 5-(pent-4-en-1-il)fenantridínio** na forma de cristais agulhas



amarelados com um rendimento de 40%; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 10,35 (s, 1H, H6), 9,20 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H, ArH), 9,14 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H, ArH), 8,64 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H, ArH), 8,59 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, ArH), 8,41 (t,  $J = 7,6$  Hz, 1H, ArH), 8,20-8,04 (m, 3H; ArH), 7,48 (d,  $J = 7,9$  Hz, 2H, Híão tosilato), 7,09 (d,  $J = 7,7$  Hz, 2H, Híão tosilato), 5,90 - 5,83 (m, 1H, NCH), 5,15-4,96 (m, 4H, NCH + =CH), 2,23-2,11 (m, 2H, CH2) ppm; RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 155,83 (CH), 145,99, 138,23 (CH), 137,79 (CH), 137,28, 134,62, 133,34 (CH), 133,05, 132,30 (CH), 130,56 (CH), 130,53 (CH), 128,25 (CH), 126,16, 125,70 (CH), 125,29, 123,90, 123,38, 120,17 (CH), 116,08, 57,68, 30,17, 28,33, 20,98 (CH) ppm.

#### 2.3.3.2 DAPP

Uma suspensão de DAPP (0,03 g; 0,01 mmol) em 5 mL de nitrobenzeno e agente alquilante 11-bromoundec-1-eno (0,027 mL; 0,13 mmol) foi refluxada durante 6h. Seguiu-se a evolução da reação por c.c.f. em 2% metanol, verificando-se a não alteração do DAPP.

#### 2.3.3.3 3,8-Dibenzamida-6-fenilfenantridina (1a)

Processo geral: Uma suspensão de 3,8-dibenzamida-6-fenilfenantridina (**1a**) (0,02 mmol) em 30 mL de acetonitrilo e agente alquilante adequado (11-bromoundec-1-eno, *p*-toluenosulfonato de etilo ou iodoetano; 0,21 mmol) foi refluxado até 48h. Seguiu-se a evolução da reação por c.c.f. 0-2% metanol verificando-se a não alteração da diamida de partida. O uso de outros solventes, nomeadamente 5,0 mL de 1,2-diclorometano, 8 mL de dimetilformamida ou 6 mL de nitrobenzeno, assim como o aquecimento po fusão a 140°C, não alterou este resultado.

### 2.3.3.4 3,8-Diacetamida-6-fenilfenantridina (1b)

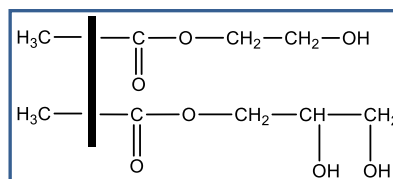
Processo geral: Uma suspensão de 3,8-diacetamida-6-fenilfenantridina (1b) (0,02 mmol) em 5 mL de nitrobenzeno e agente alquilante adequado (4-bromobut-1-eno ou *p*-toluenosulfonato de etilo ou iodoetano; 0,21 mmol), na presença ou ausência na presença e na ausência de iodeto de potássio 15% (w/v), foi refluxado até 72h. Seguiu-se a evolução da reação por c.c.f. 0-2% metanol verificando-se a não alteração da diamida de partida.

### 2.3.4 Preparação do criogel

Processo geral: A uma solução de GMA e HEMA em água destilada foi adicionada uma suspensão de MBAAm em água destilada, e à suspensão resultante foi adicionado TEMED. A reação de crio-polimerização foi iniciada pela adição de persulfato de amônio, agitada durante 1 min e imediatamente colocada numa coluna de gravidade da Bio-rad e esta colocada num banho de acetona a -12°C, durante 24h. Após 24h, o criogel foi lavado com água destilada e guardado numa solução de azida de sódio a 2% a 4°C.

#### 2.3.4.1 Síntese do criogel poli(HEMA-GMA)

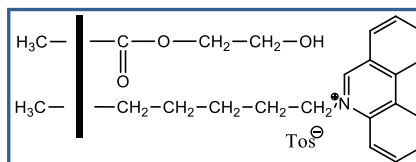
Uma solução de HEMA (0,675 mL), e GMA (0,05 mL) em 2,5 mL de água destilada foi adicionado MBAAm (0,1415 g) em 5 mL de água destilada. A esta mistura adicionou-se TEMED (0,0125 mL) e persulfato de amônio (0,010 g),



agitou-se durante 1 minuto e colocou-se imediatamente numa coluna de gravidade da Bio-rad num banho de acetona a -12°C durante 24h. Após 24h, o criogel foi lavado com água destilada e guardado numa solução de azida de sódio a 2% a 4°C.

#### 2.3.4.2 Síntese do criogel poli(HEMA-tosilato de 5-(pent-4-en-1-il)fenantridínio) 1:29 e 1:14

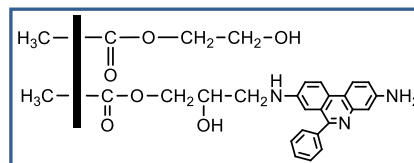
Uma solução de 1:29 e 1:14 de tosilato de 5-(pent-4-en-1-il)fenantridínio e HEMA sendo (0,0945 g:0,675 mL) e (0,0945 g:1,35 mL), respetivamente em 2,5 mL de água destilada foi adicionado MBAAm (0,1415 g) em 5 mL de



água destilada. A esta mistura adicionou-se TEMED (0,0125 mL) e persulfato de amônio (0,01 mg), agitou-se durante 1 minuto e colocou-se imediatamente numa coluna de gravidade da Bio-rad num banho de acetona a -12°C durante 24h. Após 24h, o criogel foi lavado com água destilada e guardado numa solução de azida de sódio a 2% a 4°C.

### 2.3.4.3 Imobilização do DAPP ao criogel poli(HEMA-GMA) 5, 10 e 40 mg/mL

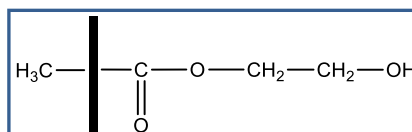
Uma solução de DAPP (0,44 g; 0,15 g; 0,055 g) dissolveu-se em HCl 5% (11 mL; 10 mL; 11 mL) respetivamente. Esta mistura fez-se passar pelo criogel e este colocado num banho de água destilada a 70°C



durante 16h (tapado). Após as 16h, o criogel lavou-se com uma solução de HCl 1,25% e posteriormente com água destilada e guardado numa solução de azida de sódio a 2% a 4°C.

### 2.3.4.4 Síntese do criogel poli(HEMA)

Uma solução de HEMA (1,4 mL) em 2,5 mL de água destilada adicionou-se uma solução de MBAAm (0,1415 g) em 5 mL de água destilada. A esta mistura foi



adicionado TEMED (0,0125 mL) e persulfato de amónio (0,010 g), agitou-se durante 1 minuto e colocou-se imediatamente numa coluna de gravidade da Bio-rad num banho de acetona a -12°C durante 24h. Após 24h, o criogel foi lavado com água destilada e guardado numa solução de azida de sódio a 2% a 4°C.

### 2.3.5 Produção do DNA plasmídico

Uma estirpe de *E. coli* DH5α contendo o plasmídeo pVAX1-LacZ 6,05 kpb (Invitrogen, Carlsband, CA, EUA) foi cultivada durante a noite num meio agar de Luria Bertani (Lennox) (Laboratórios Conda, Madrid, Espanha) suplementado com 30 µg/ mL de kanamicina a 37° C. A estirpe *E. coli* DH5α cresceu à mesma temperatura num agitador orbital com meio Terrific Broth (20 g/L triptona, 24 g/L extrato de levedura, 4 mL/L glicerol, 0,017 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,072 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) suplementado com 30 µg/mL de kanamicina. As células foram depois recolhidas por centrifugação no final da fase de crescimento exponencial e armazenadas a -20°C até a sua utilização. As células de *E. coli* sem a presença de plasmídeo foram cultivadas na ausência de antibióticos, nas mesmas condições descritas anteriormente.

### 2.3.6 Lise, isolamento primário e purificação do DNA plasmídico

As células contendo o plasmídeo foram lisadas usando o método alcalino. A centrifugação de uma amostra de 250 mL de células foi realizada a 5445 x g durante 30 min, a 40°C. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets ressuspensos em 20 mL de 50 mM glucose, 25 mM de Tris-HCl e 10 mM de EDTA (pH8,0). As células foram depois lisadas com a adição de 20 mL de 200 mM NaOH, 1% (W/v) de solução de SDS. Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, o material celular, gDNA e proteínas foi precipitado, pela adição suave de 16 mL de 3 M de acetato de potássio pré-arrefecido (pH5,0) e agitando cuidadosamente. O precipitado foi removido fazendo uma centrifugação dupla de 20000 x g durante 30 min a 4°C.

O plasmídeo do sobrenadante foi precipitado após a adição de 0,7 volumes de isopropanol e incubação em gelo durante 30 min. O pDNA foi recuperado por centrifugação a 16000 x g durante 30 min a 4°C. Os pellets foram redissolvidos em 1 mL de uma solução tampão de acetato de sódio 10 mM (pH5,0). A clarificação do lisado foi conseguida dissolvendo sulfato de amónio na solução tendo uma concentração final de 2,5 M, seguido de 15 min de incubação no gelo. As proteínas precipitadas e RNA foram removidos por centrifugação a 10000 x g durante 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram recuperados e a concentração de ácidos nucleicos quantificada por medição da absorvância a 260 nm. O DNA plasmídico com a isoforma sc numa percentagem maior que 90 % foi obtida usando um kit da “Qiagen plasmid midi kit” (Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante.

### **2.3.7 Avaliação dos suportes cromatográficos por cromatografia de afinidade**

Os suportes cromatográficos utilizados foram preparados de acordo com as condições descritas pelo processo de criocongelação e funcionalização por pós-modificação e por ligação do ligando a um monómero. Todos os ensaios foram acompanhados por ensaios de controlo em suportes não derivatizados.

Nos ensaios cromatográficos por gravidade foi avaliada, numa primeira fase, a capacidade de ligação dos criogéis ao pDNA utilizando os ligandos DAPP e tosilato de 5-pent-4-en-1-il-fenantridínio incorporados durante o processo de polimerização vinílica em diferentes densidades e dos suportes de controlo. As matrizes derivatizadas que apresentaram melhor comportamento cromatográfico de ligação/eluição foram o criogel DAPP 5mg/mL e o criogel HEMA, que forem posteriormente avaliados em termos de seletividade para as diferentes isoformas de pDNA.

O pDNA utilizado nos ensaios foi o pVAX1LACZ© de 6050 pares de bases (Invitrogene™) com resistência à kanamicina, obtido pela transformação de células competentes de estirpe *Escherichia coli* DH5α. Em cada passo cromatográfico foram recolhidas frações de 0,5 mL, cuja a absorvância foi medida a 260 nm num espectrofotómetro de UV-Vis. Nos ensaios de seletividade foram também recolhidas frações 0,5 mL que foram concentradas e dessalinizadas em concentradores Vivaspin® 6 e posteriormente analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

### **2.3.7.1 Ensaios cromatográficos com amostra pré-purificada de plasmídeo pVAX1-LacZ**

#### **2.3.7.1.1 Ensaios cromatográficos por fluxo de gravidade em colunas de polipropileno econo-pac da Bio-rad**

Nos ensaios cromatográficos com os criogéis foi injetada uma solução de plasmídeo pVAX1LACZ de 6,05 kpb com uma solução de tampão acetado de sódio 10 mM pH5,0. Para o criogel DAPP 5,10 e 40 mg/mL foi injetado 30 e 40 µL a 1120 µg/mL; 50 µL a 447,5 µg/mL e 25 µL a 2347,5 µg/mL; 20 µL a 1120 µg/mL de plasmídeo, respetivamente. Para criogel 5-pente-4-en-1-il-fenantridina 1:29 e 1:14 foi injetado 20, 30, 35 e 50 µL a 1120 µg/mL e 20 µL a 1120 µg/mL de plasmídeo, respetivamente. Para o criogel HEMA-GMA foi injetado 50 µL a 1120 µg/mL de plasmídeo e para o criogel HEMA foi injetado 50, 75 e 80 µL a 1120 µg/mL de plasmídeo. Os ensaios cromatográficos consistiram nos seguintes passos cromatográficos:

1º passo- equilíbrio da coluna com 30 mL de solução tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0;

2º passo- injeção de pDNA nas concentrações indicadas anteriormente;

3º passo- injeção de 10 mL de solução tampão acetado de sódio 10 mM pH 5,0;

4º passo- injeção de 10 mL de solução tampão de NaCl 1M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e recolha das frações de 0,5 mL.

#### **2.3.7.1.2 Ensaios cromatográficos por FPLC do criogel HEMA e DAPP**

Nos ensaios cromatográficos com o criogel HEMA e DAPP foram injetados 100 µL a 500 µg/mL de plasmídeo pVAX1LACZ de 6,05 kpb no criogel com uma solução de tampão acetado de sódio 10 mM pH5,0. Os ensaios cromatográficos consistiram nos seguintes passos cromatográficos:

1º passo- equilíbrio da coluna com 30 mL de solução tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0;

2º passo- injeção de pDNA nas concentrações indicadas anteriormente;

3º passo- injeção de 10 mL de solução tampão acetado de sódio 10 mM pH 5,0;

4º passo- injeção de 10 mL de solução tampão com diferentes concentrações de NaCl em acetato de sódio 10 mM pH 5,0;

5º passo- recolha das frações de 0,5 mL e análise por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

### 2.3.7.2 Ensaios cromatográficos com lisado clarificado

Nos ensaios cromatográficos com o criogel HEMA e DAPP foram injetados 100  $\mu$ L a 500  $\mu$ g/mL de lisado clarificado no criogel com uma solução de tampão acetado de sódio 10 mM pH 5,0. Os ensaios cromatográficos consistiram nos seguintes passos cromatográficos:

1º passo- equilíbrio da coluna com 30 mL de solução tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0;

2º passo- injeção de pDNA nas concentrações indicadas anteriormente;

3º passo- injeção de 10 mL de solução tampão acetado de sódio 10 mM pH 5,0;

4º passo- injeção de 10 mL de solução tampão com diferentes concentrações de NaCl em acetato de sódio 10 mM pH 5,0;

5º passo- recolha das frações de 0,5 mL e análise por eletroforese em gel de agarose 0,8%

### 2.3.8 Quantificação de proteínas

O teor de proteínas presente nas amostras foi quantificado através de micro-BCA (“bicinchoninic acid”) pelo kit de determinação de proteínas da Pierce (Rockford, EUA). A quantificação consiste na adição de 200  $\mu$ L de reagente BCA a 50  $\mu$ L de amostra numa microplaca. Após 30 min de incubação a 60 °C, mediu-se a absorvância a 592 nm num leitor de placas. A curva de calibração foi construída com albumina de soro bovino (BSA) como padrão (20  $\mu$ g/mL a 2000 mg/mL) (Figura 9).

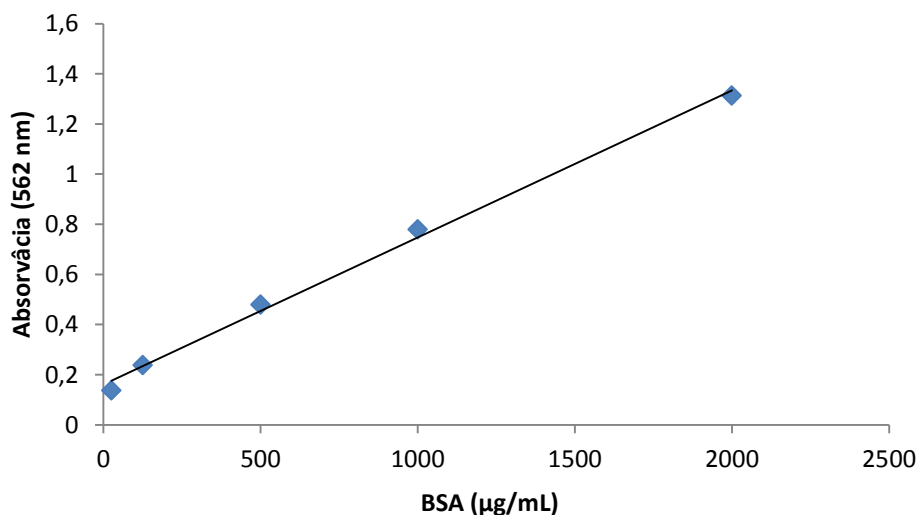


Figura 9. Curva de referência com padrões de albumina de soro bovino (25- 2000  $\mu$ g/mL).

### 2.3.9 Quantificação de endotoxinas

A contaminação com endotoxinas foi avaliada através do kit Pierce® LAL Chromogenic Endotoxin Quantification Kit (Rockford, USA). A curva de calibração foi construída com endotoxinas fornecidas pelo kit, cujas concentrações estavam entre 0,1 UE/mL e 1 EU/mL (Figura 10).

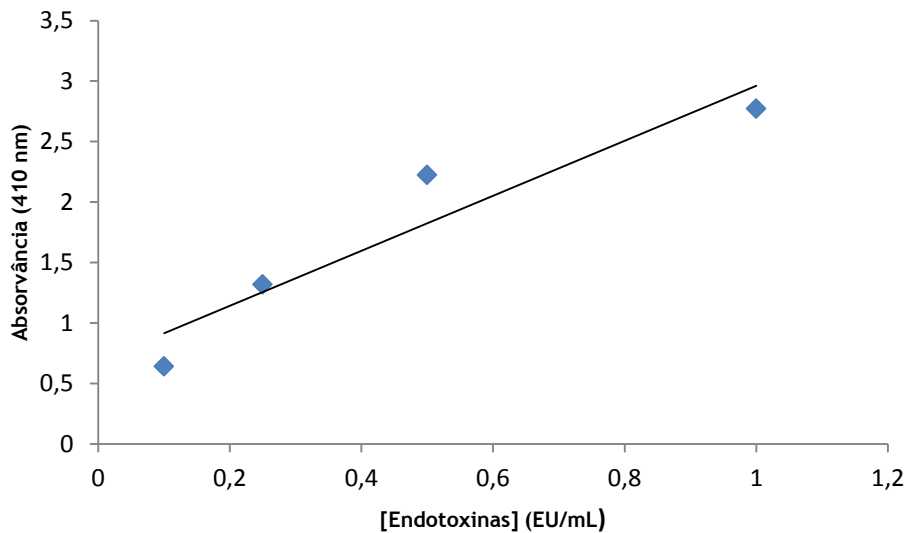


Figura 10. Curva de referência dos padrões de endotoxinas (0,1-1 EU/mL).

Todos os materiais e soluções utilizadas para este procedimento devem ser livres de endotoxinas. De forma a garantir estas condições, todo o procedimento foi realizado no interior de uma *hotte*. As amostras para a análise e os padrões do kit foram diluídas com água livre de endotoxinas, que também foi usada como branco.



# Capítulo 3

## Resultados e Discussão

### 3.1 Aminoacilação do DAPP

A síntese dos compostos 3,8-dibenzamida-6-fenilfenantridina (**1a**), 3,8-diacetamida-6-fenilfenantridina (**1b**), 3,8-dihexanamida-6-fenilfenantridina (**1c**) e 3,8-diacrilamida-6-fenilfenantridina (**1d**), pela acilação das aminas presente nas posições 3,8 (Figura 11), tinha como objetivo a sua posterior alquilação na amina da posição 5, de modo a que estas 3,8-diamidas possam ser utilizadas como ligandos com maior grau de complexidade e desta forma potenciar uma maior seletividade em estudos de cromatografia de afinidade.

Para tal as 3,8-diamidas derivadas de DAPP **1a-d** foram primeiramente preparadas por acilação com anidrido benzóico, anidrido acético, cloreto de hexanoílo e cloreto de acrilóilo respetivamente a 180°C em refluxo entre 2-16h. As amidas foram obtidas com rendimentos de 70-96% e foram caracterizadas estruturalmente por RMN e IV. O segundo passo seria a alquilação da 5-amina das 3,8-diamidas, de modo a ser introduzido uma cadeia alquilvinílica que atuaria como braço espaçador entre o núcleo de fenantridina e a matriz do criogel. O braço espaçador permitiria que o ligando estivesse a uma distância adequada e tornando acessível a ligação da amina do núcleo de fenantridina carregado positivamente com os grupos fosfato de pDNA carregados negativamente e também atuaria como co-monómero para posterior formação do criogel (Silva *et al.*, 2010). No entanto essa alquilação após várias tentativas com diversos agentes alquilantes não foi conseguida.

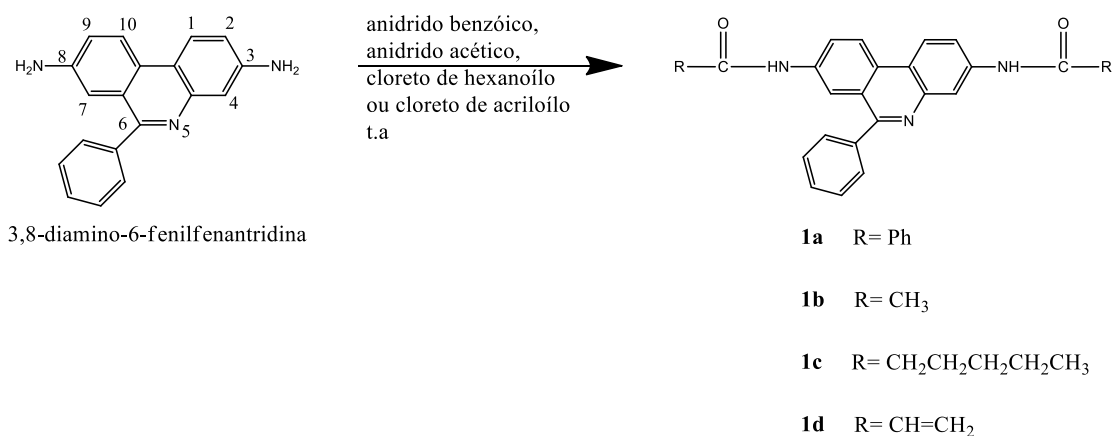


Figura 11. Síntese do dibenzamida (**1a**), diacetamida (**1b**), dihexanamida (**1c**), diacrilamida (**1d**).

Para todos os derivados de fenantridina foram realizados os respectivos espectros IV. Estes apresentam as bandas relativas aos grupos C=O presentes em cada um dos compostos assim como os grupos funcionais aromáticos do **1a**, grupo acetilo do **1b**, grupo alifático do **1c** e grupo vinílico do **1d**.

Realizaram-se também espectros de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN de modo a comprovar a estrutura dos compostos. O espectro do  $^{13}\text{C}$  RMN apresenta todos os carbonos presentes na estrutura. A identificação e caracterização dos espectros de próton das diaminas derivadas de DAPP foi realizada tendo por base a multiplicidade esperada com base nas constantes de acoplamento a curta e longa distância (Tabela 1).

Tabela 1. Desvios químicos do  $^1\text{H}$  RMN das 3,8-diamidas derivadas do DAPP [DMSO,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz)].

	H-1,10	H-2,9	H-3,8	H-4,7
<b>1a</b>	8,77 e 8,88 (d, $J=8,9-9,0$ )	8,13 e 8,41 (d, $J=8,6$ )	10,63 e 10,64 (s)	8,61-8,65 (s)
<b>1b</b>	8,66 e 8,76 (d, $J=9,0$ )	7,85 e 8,18 (dd, $J=8,9-9,0$ ; 1,6-1,8)	10,30 (d)	8,32 e 8,43 (d, $J=1,5-1,6$ )
<b>1c</b>	8,78 e 8,87 (d, $J=7,9-8,7$ )	7,93 e 8,29 (d, $J=8,0-8,1$ )	10,44 e 10,52 (s)	8,47 e 8,71 (s)
<b>1d</b>	8,92 e 9,01 (d, $J=9,1-9,2$ )	8,18 e 8,46 (d, $J=8,7-9,2$ )	11,08 e 11,25 (s)	8,61 e 8,72 (s)

Comparando os desvios químicos dos espectros de próton entre as diferentes 3,8-diamidas pode verificar-se que há uma semelhança e coerência entre eles, estando de acordo com a sua estrutura química. De acordo com a estrutura molecular das 3,8-diamidas, os H-2,9 estão acoplados a curta distância com os H-1,10 e a longa distância com os H-4,7 apresentando-se assim os H-2,9 na forma de duplos dubletos (dd) com uma constante de acoplamento de 9,0 e 1,5 Hz e os H-1,10 e H-4,7 na forma de dubletos. No entanto, apenas para a diamida **1b** este facto foi verificado, estando na forma de dd e tendo como constantes de acoplamento 8,9-9,9 e 1,6-1,8, como esperado. Para as restantes 3,8-diamidas, **1a**, **1c** e **1d**, estes não acoplaram a longa distância, estando os H-1,10 e H-2,9 na forma de dubletos com constante de acoplamento entre os 8,6 e 9,0 e os H-4,7 na forma de singletos.

Tabela 2. Desvios químicos do  $^1\text{H}$  RMN dos R's das 3,8-diamidas derivadas do DAPP [DMSO,  $\delta$  (ppm)].

	1a	1b	1c	1d
<b>R</b>	Ph	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH=CH <sub>2</sub>
<b>Multiplicidade (ppm)</b>	(d) 7,77 (m) 7,69 - 7,43	(s) 2,05 e 2,14	(t) 2,42 e 2,32 (m) 1,60 - 1,53 (m) 1,40 - 1,16 (m) 0,96 - 0,75	(dd) 6,67 e 6,53 (d) 6,37 e 6,28 (d) 5,86 e 5,80

Foram também visualizados os desvios químicos dos diferentes grupos presentes no grupo amidas nas posições 3 e 8, nomeadamente os prótons dos anéis aromáticos do **1a**, do grupo acetilo do **1b**, da cadeia alifática do **1c** e os prótons da cadeia vinílica do **1d**, o que comprova que o processo de acilação ocorreu como esperado (Tabela 2).

Tabela 3. Relação entre o comprimento de onda máximo e absorvância dos espectros UV-Vis dos diferentes compostos.

	$\lambda_{\text{máx}}$ (cm <sup>-1</sup> )	Absorvância (nm)	Cor
<b>DAPP</b>	418	0,467	Amarelo Torrado
<b>1a-Dibenzamida</b>	369	0,342	Laranja claro
<b>1b- Diacetamida</b>	364	0,125	Amarelo claro
<b>1c-Dihexanamida</b>	433	0,292	Amarelo
<b>1d-Diacrilamida</b>	435	0,357	Vermelho escuro

Adicionalmente, as diamidas derivadas do DAPP foram caracterizadas por espectroscopia de UV-vis com  $\lambda_{\text{máx}}$  entre 364 e 435 (absorvâncias 0,125-0,407) (Tabela 3). Pela análise dos dados fornecidos pela tabela pode constatar-se uma relação entre a cor e consequentemente o c.d.o a que ocorre o máximo de absorção.

## 3.2 Métodos de Imobilização/Funcionalização

No presente estudo foram sintetizados sete criogéis por dois métodos de funcionalização diferentes: método de pós-imobilização e o método de substituição de um dos monómeros da matriz do criogel (Tabela 4). Foram também sintetizados os respectivos suportes de controlo na ausência de ligando. Para o método de pós-imobilização, com o ligando DAPP foram funcionalizadas três concentrações diferentes de DAPP (40, 10 e 5 mg/mL) e o respetivo suporte de controlo [criogel poli(HEMA-GMA)]. Para o método de substituição de um dos monómeros da matriz foram sintetizados dois criogéis com diferentes proporções de HEMA relativamente ao monómero tosilato de 5-(pent-4-en-1-il)fenantridínio, nomeadamente 1:29 e 1:14, e o respetivo suporte de controlo (criogel HEMA).

Tabela 4. Tabela resumo dos criogéis sintetizados/funcionalizados.

Criogel	Estrutura	Concentração
(Criogel DAPP) Criogel poli(HEMA-GMA-DAPP)		40 mg/mL 10 mg/mL 5 mg/mL
Criogel poli(HEMA-GMA) (suporte de controlo)		
(Criogel Fenantridina vinílica) Criogel poli(HEMA- tosilato de 5-(pent-4-en-1-il) fenantridínio)		1:29 1:14
(Criogel HEMA) Criogel poli(HEMA)		

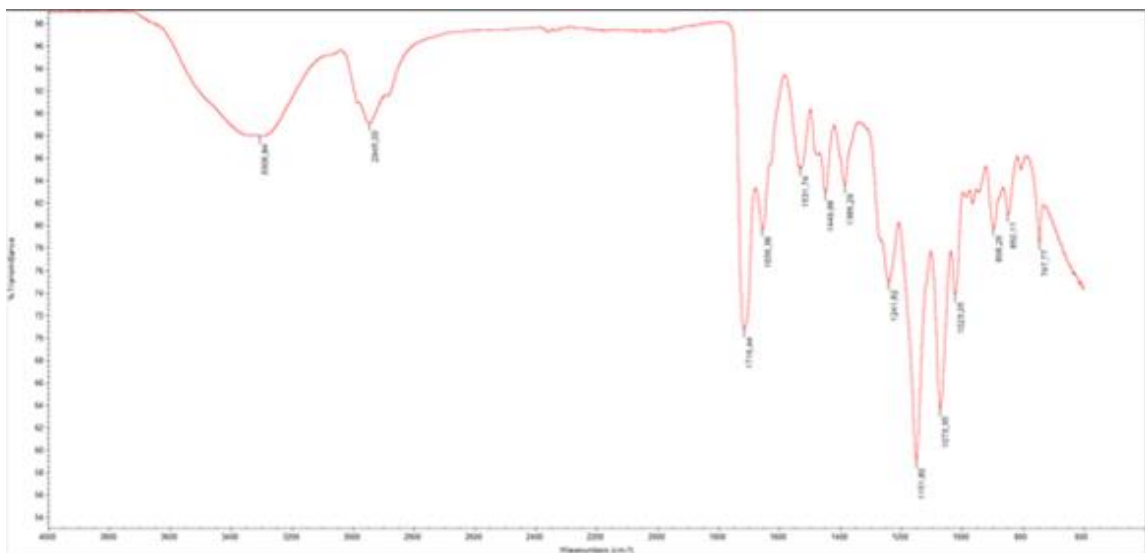
### 3.2.1 Método de imobilização do DAPP

A imobilização do DAPP na matriz do criogel foi conseguida usando uma solução de HCl 1,7%. As condições ácidas usadas catalisam a ligação do DAPP ao criogel por protonação do grupo epóxido presente no criogel (Figura 12a), o que permite posteriormente a ligação da amina hexocíclica do DAPP.

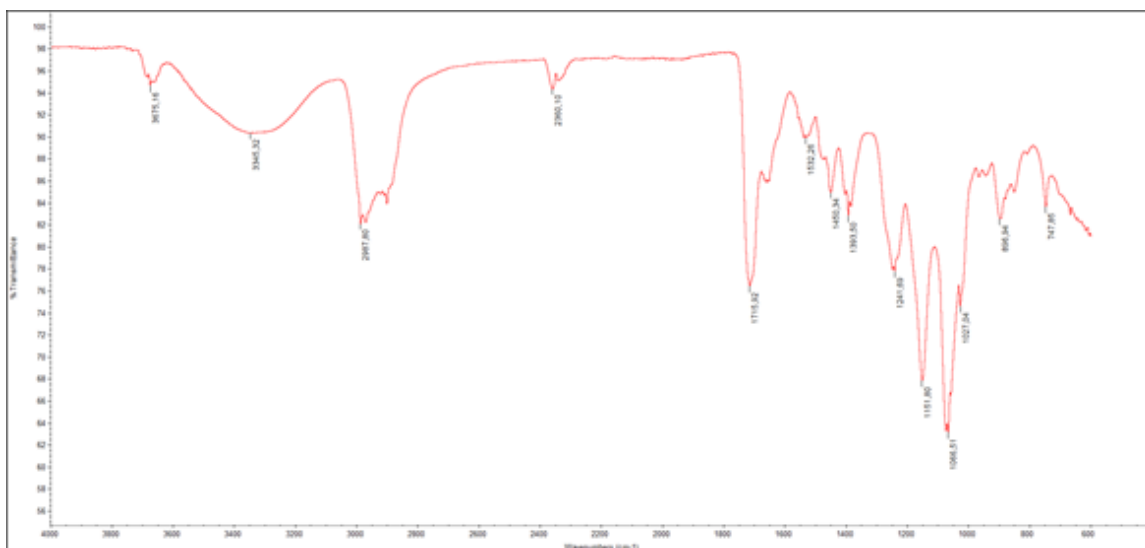
Efetuarão-se espectros do IV para os criogéis obtidos com três concentrações diferentes de DAPP usadas e respetivo suporte de controlo (Figura 12). A análise mais detalhada não

permitted to differentiate the cryogels, nor distinguish the different concentrations of ligand used. Only a visible broadening of the band at  $\sim 2900$  ( $\nu_{\max}$  in  $\text{cm}^{-1}$ ) that is probably due to the presence of the aromatic nucleus of the ligand. This fact may be due to the quantity of ligand used not being sufficient to be visualized, being thus masked by the functional groups of the cryogel matrix.

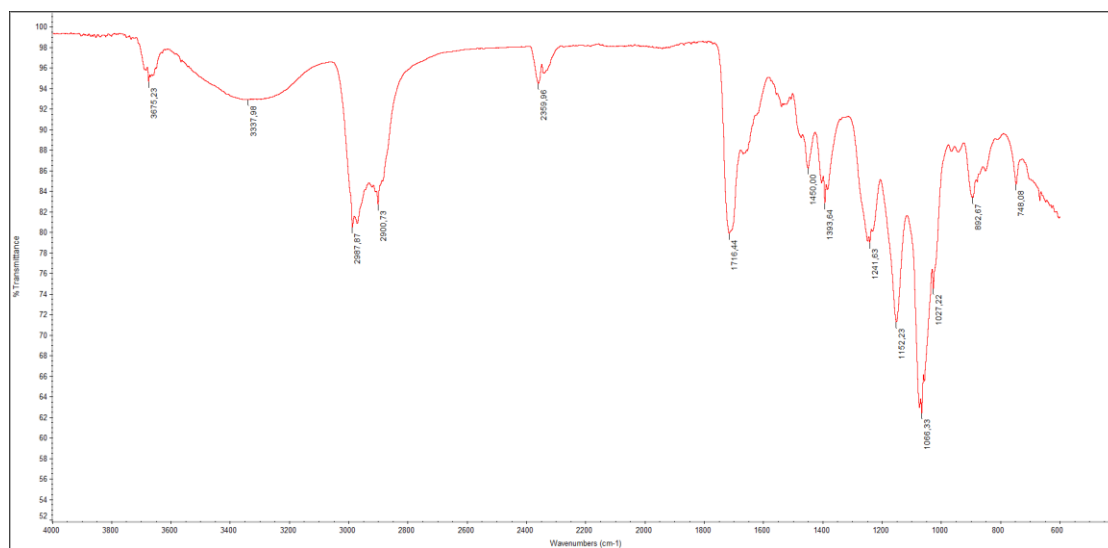
a)



b)



c)



d)

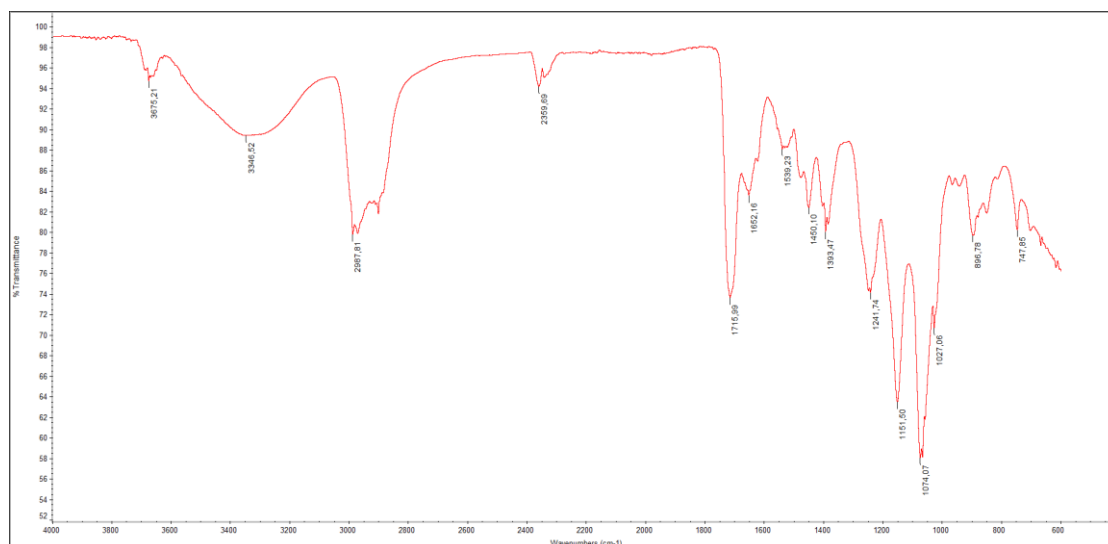


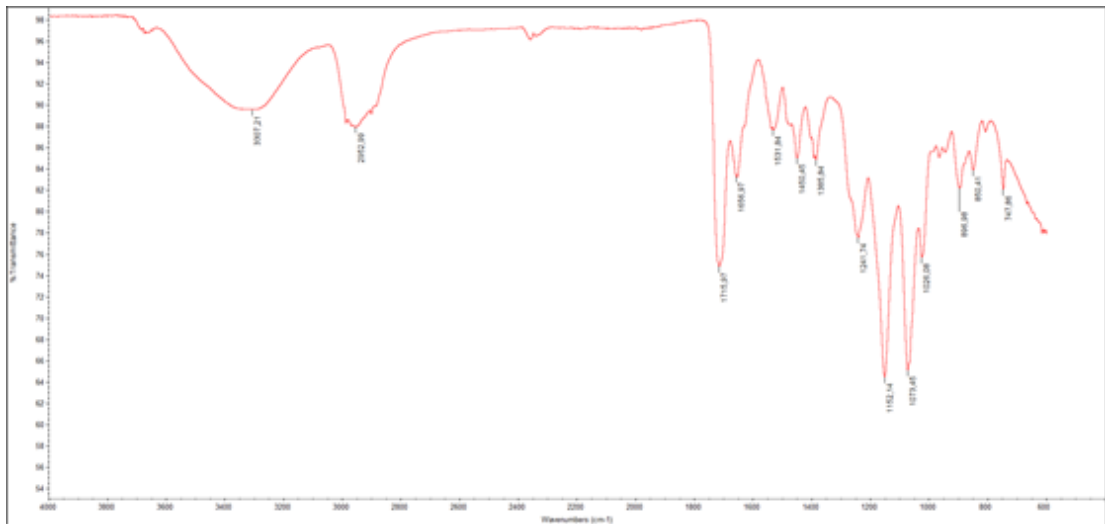
Figura 12. Espectro IV dos criogéis: a) criogel poli(HEMA-GMA) (Suporte de controle); b) criogel DAPP 5 mg/mL; c) criogel DAPP 10 mg/mL; d) criogel DAPP 40 mg/mL.

### 3.2.2 Método de funcionalização do tosilato de 5-(pent-4-en-1-il)fenantridínio (fenantridina vinílica)

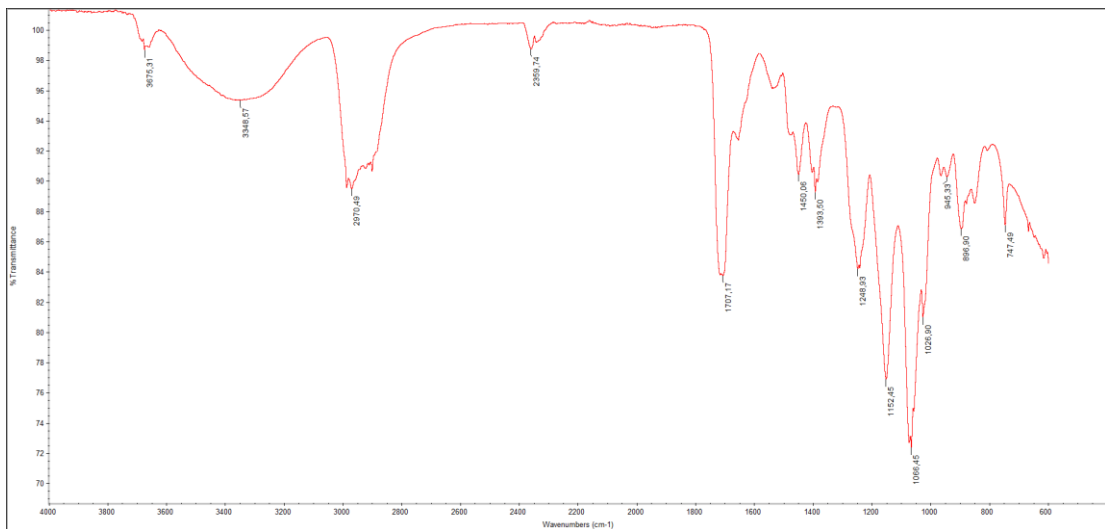
O método de ligação da fenantridina vinílica ao criogel foi conseguido através da substituição do monómero GMA do polímero pelo tosilato de 5-(pent-4-en-1-il)fenantridínio, não sendo necessária uma pós-modificação do ligando no criogel. Este método permite uma maior quantidade de ligandos ligados à matriz comparativamente com a pós-modificação com DAPP. Neste caso, devido aos largos poros interconectados, existe uma dificuldade de internalização da molécula, podendo haver uma maior ligação apenas à superfície (Gun'ko *et al.*, 2013).

Foram efetuados espectros de IV para as duas concentrações de fenantridina vinílica e do respetivo suporte de controlo (figura 13). Uma vez mais apenas é visível um alargamento da banda aos ~2900 ( $\nu_{\max}$  em  $\text{cm}^{-1}$ ) que se deve à presença do núcleo aromático do ligando. No entanto, a análise detalhada não permite diferenciar as densidades de ligando, o que pode dever-se à quantidade usada não ser suficiente para provocar uma banda de intensidade maior.

a)



b)



c)

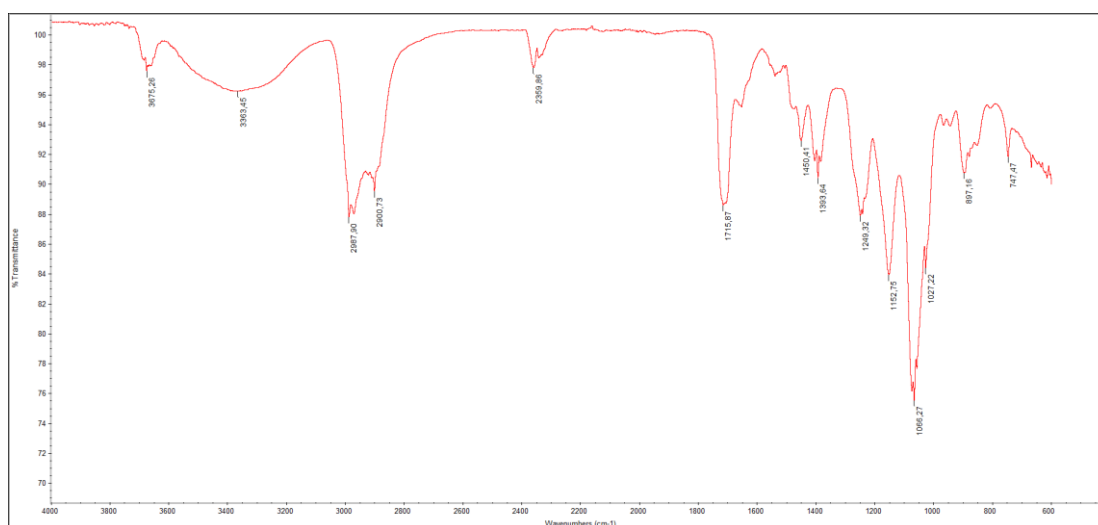


Figura 13. Espectros IV dos criogéis: a) criogel poli(HEMA) (suporte de controlo); b) criogel fenantridina vinílica 1:29; c) criogel fenantridina vinílica 1:14.

### 3.2.2.1 Síntese do p-toluenosulfonato de pent-4-en-1-ilo

A síntese deste agente alquilante teve como objetivo o seu posterior uso na reação com fenantridinas conferindo a estas últimas, a capacidade de serem copolimerizadas com monómeros vinílicos tipicamente usados na preparação de criogéis. As grandes vantagens do uso da cadeia pente-4-en-ilo ligado à fenantridina são, e como anteriormente já referidas, o de conferir ao ligando uma cadeia espaçadora e simultaneamente a capacidade de copolimerizar através do grupo vinilo.

A estrutura deste reagente foi devidamente caracterizada e confirmada por espectrometria de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN e IV.

## 3.3 Caracterização dos suportes cromatográficos

### 3.3.1 SEM

Este estudo permitiu a caracterização da morfologia e perceção da estrutura, assim como o tamanho dos poros dos diferentes criogéis. Para tal foram efetuadas imagens de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) das diferentes concentrações de DAPP e o respetivo branco, assim como as diferentes concentrações de fenantridina e o seu respetivo branco. Como se pode constatar pelas imagens (Figuras, 14, 15 e 16), os criogéis são estruturas macroporosas com canais interconectados. Tanto os criogéis, como os ligandos imobilizados e os brancos, não apresentam deformações na sua morfologia, contendo todos eles poros que vão entre os 10  $\mu\text{m}$  e os 100  $\mu\text{m}$ , tal como descrito na literatura (Lozinsky *et al.*, 2003).

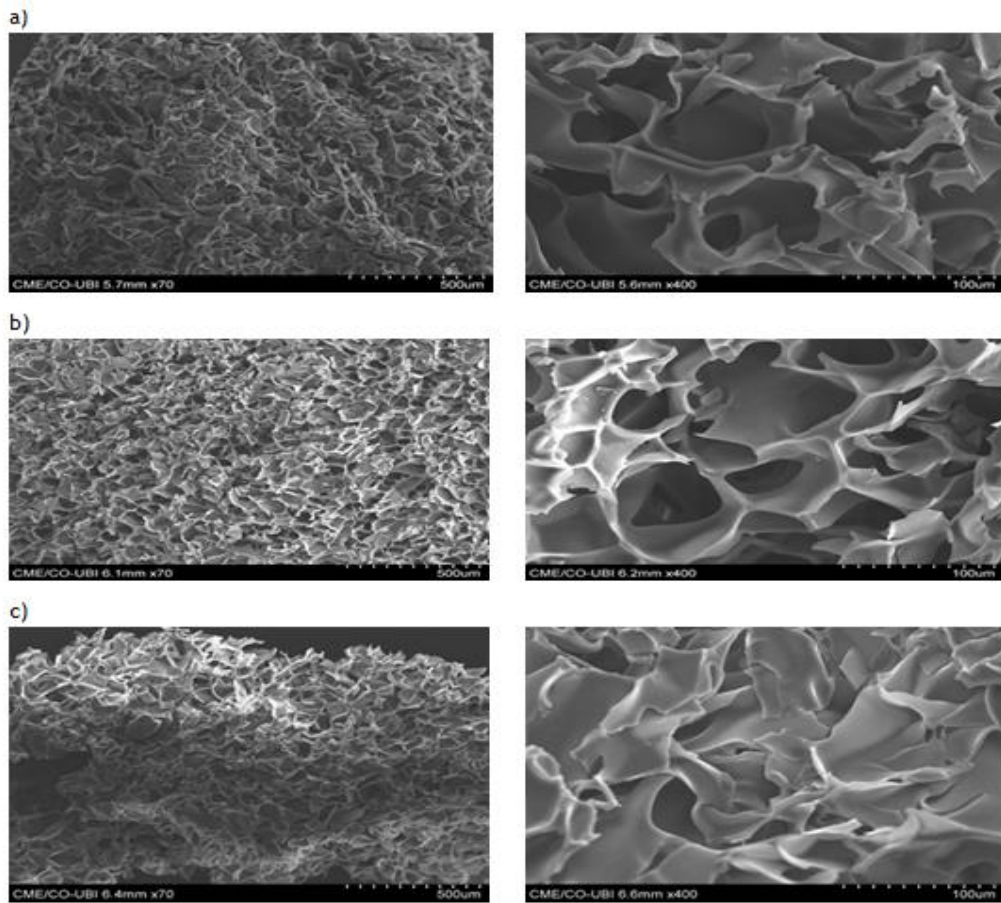


Figura 14. Imagens SEM com ampliação 70 e 400x: a) criogel DAPP 40 mg/mL; b) criogel DAPP 10 mg/mL; c) criogel DAPP 5mg/mL.

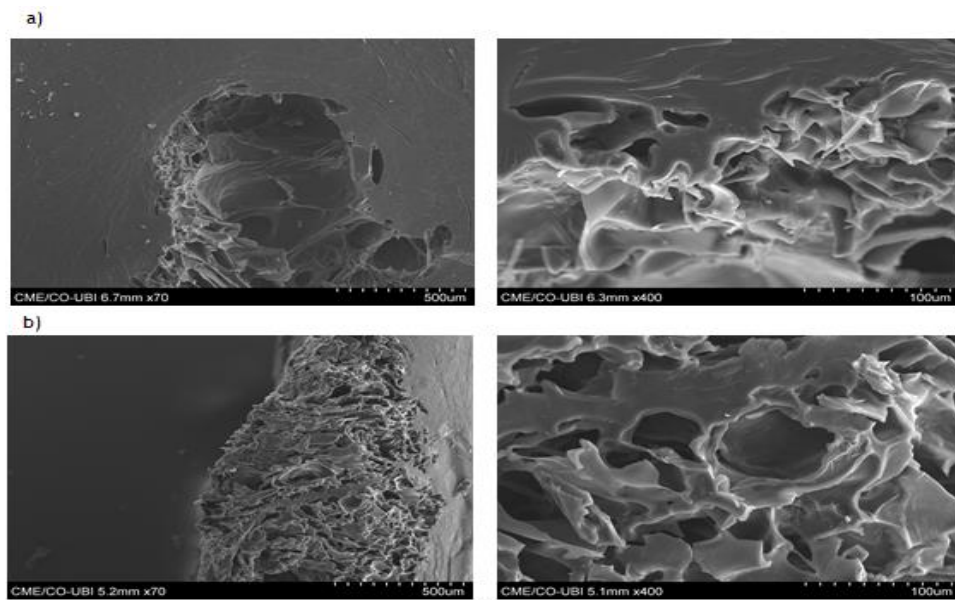


Figura 15. Imagens SEM com ampliação 70 e 400x: a) criogel poli(HEMA-GMA) (suporte de controle); b) criogel poli(HEMA) (suporte de controle).

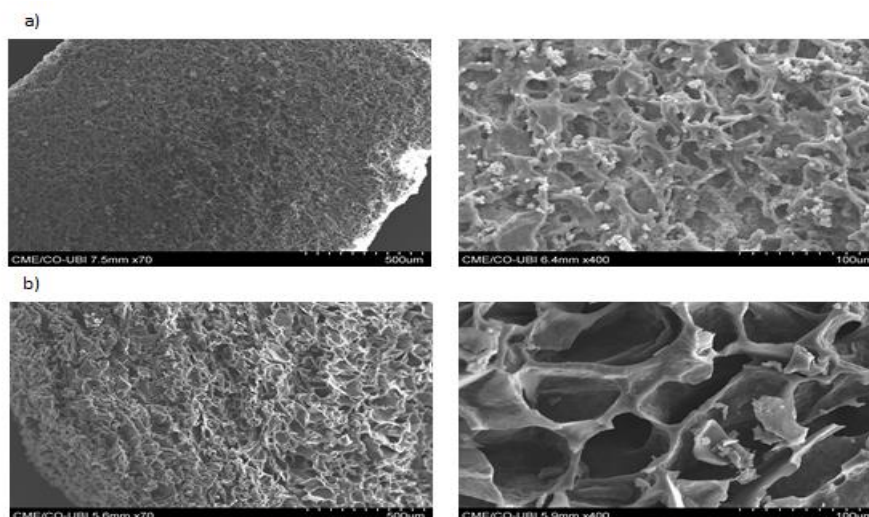


Figura 16. Imagens SEM com ampliação 70 e 400x: a) criogel fenantridina vinílica 1:14; b) criogel fenantridina vinílica 1:29.

### 3.3.2 Capacidade de re-hidratação por “Swelling degree”

A capacidade de re-hidratação foi calculada pela equação 1 registando-se os valores descritos na Tabela 5. O criogel poli (HEMA-fenantridina vinílica) não apresenta grau de re-hidratação. Este facto mostra que a incorporação da molécula de fenantridina vinílica nas concentrações usadas, na estrutura do criogel altera a sua capacidade de hidratação. Relativamente aos criogéis DAPP e HEMA, estes apresentam capacidade de re-hidratação traduzida por um grau de porosidade de 6,96 e 6,80 g H<sub>2</sub>O/g criogel, respetivamente. O grau de porosidade do criogel HEMA está de acordo com os valores descritos na literatura (Uygun *et al.*, 2013). No caso do criogel DAPP, pode concluir-se que a introdução da molécula de DAPP na estrutura do criogel não alterou a capacidade de re-hidratação.

Tabela 5. Capacidade de re-hidratação do criogel DAPP e HEMA.

	Criogel DAPP	Criogel Fenantridina vinílica	Criogel HEMA
Grau de re-hidratação (g H <sub>2</sub> O/g criogel )	6,96	Não contém	6,80

### 3.3.3 Análise elementar

A técnica de análise elementar (AE) baseia-se na quantificação dos átomos de azoto, carbono, hidrogénio e enxofre ou bromo presentes na constituição química dos compostos. Uma vez que os criogéis não imobilizados não contêm azoto na sua estrutura, será possível calcular a quantidade de azoto e assim a quantidade de ligando imobilizado presente e, conseqüentemente, a quantidade de ligando ligado ao criogel e a sua densidade, de acordo com a seguinte equação (adaptado de Caramelo-Nunes *et al.*, 2012a).

$$Q = \frac{\%N}{1,4 \times 3} \left( \text{mmol} \frac{DAPP}{g} \text{criogel} \right) \quad (2)$$

**Tabela 6.** Análise elementar dos criogéis DAPP 40, 10 e 5 mg/mL.

	DAPP 40 mg/mL (3 azotos - MW 285,34 g/mol)		DAPP 10 mg/mL (3 azotos - MW 285,34 g/mol)		DAPP 5 mg/mL (3 azotos - MW 285,34 g/mol)	
	%N	Q	%N	Q	%N	Q
	3,38	0,80	2,83	0,67	2,82	0,67
	3,41	0,81	2,84	0,68	2,80	0,67
<b>Média</b>		0,805		0,675		0,67
<b>mg (ligando imobilizado) por g de criogel</b>	229,7		192,6		191,2	

Pela análise da Tabela 6, os resultados mostram que tanto o criogel DAPP 10 mg/mL, como o 5 mg/mL ligaram praticamente a mesma quantidade de DAPP, sendo a densidade de ligando presente de cerca de 0,675 mmol de DAPP/ g de criogel. A densidade de ligando do criogel 40 mg/mL é relativamente superior. De acordo com a literatura e estudos anteriormente realizados por Caramelo-Nunes *et al.*, 2013 foi obtida uma densidade de 0,15 mmol DAPP/g de Sepharose derivatizada (42,8 mg DAPP/g de Sepharose derivatizada), o que é bastante inferior às densidades usadas, nomeadamente 0,805, 0,675 e 0,67 mmol de DAPP/ g de criogel. A baixa densidade de ligando poderá ser favorável na ligação do pDNA, uma vez que elevadas densidades nem sempre são a melhor opção para conseguir uma maior seletividade. De facto, a camada densa de ligandos imobilizados pode impedir o acesso do ligando aos locais de ligação do pDNA e, conseqüentemente, impedir o seu reconhecimento entre elas, levando a uma fraca retenção. Este facto foi constatado e será novamente discutido nos estudos de afinidade (Silva *et al.*, 2010).

Tabela 7. Análise elementar dos criogéis fenantridina vinílica 1:14 e 1:2.

	Fenantridina vinílica 1:14 (1 azotos - MW 181,23 g/mol)		Fenantridina vinílica 1:29 (1 azotos - MW 181,23 g/mol)	
	%N	Q	%N	Q
	1,28	0,91	1,42	1,01
	1,26	0,9	1,44	1,03
Média		0,905		1,02
mg (ligando imobilizado ) por g de criogel	164,01		184,85	

No caso dos criogéis derivados da fenantridina vinílica foi usada a mesma equação no cálculo das densidades, contabilizando apenas um átomo de azoto por molécula. A densidade constatada foi bastante elevada comparada com as densidades do DAPP, pois o método de imobilização do ligando foi diferente. A molécula de fenantridina modificada foi usada como monómero e polimerizada juntamente com o HEMA na derivatização do criogel. Como referido anteriormente, este tipo de imobilização pode ser até dez vezes superior comparado com a pós-modificação (Gun'ko *et al.*, 2013).

### 3.4 Estudos de cromatografia de afinidade por fluxo de gravidade

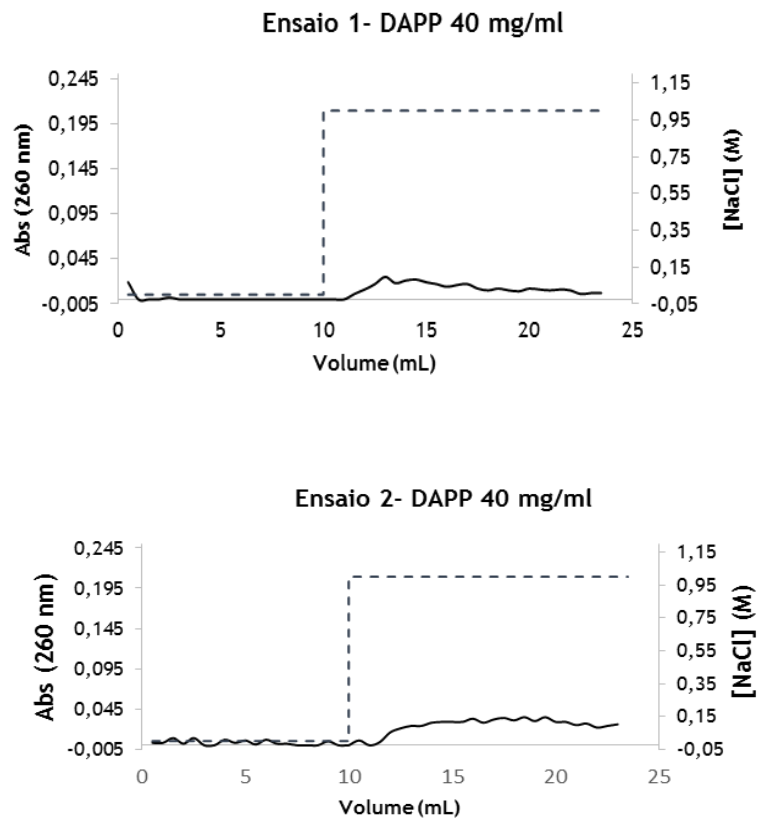
Os ensaios cromatográficos de afinidade foram sempre acompanhados com o respetivo suporte de controlo (criogel poli(HEMA-GMA) na ausência de DAPP e o criogel poli(HEMA) na ausência de fenantridina vinílica. O estudo das interações da afinidade foi realizado através de ensaios cromatográficos em colunas de polipropileno econo-pac da Bio-rad e empacotadas com cada suporte, tendo como objetivo verificar a existência de interações entre o plasmídeo pVAX1-LacZ e o DAPP e a fenantridina vinílica imobilizada numa matriz polimérica de criogel. As interações predominantes esperadas são as iónicas devido à estrutura catiónica do ligando. Os cromatogramas foram construídos a partir dos valores de densidade ótica em cada fração a um comprimento de onda (c.d.o) de 260 nm. O plasmídeo usado foi escolhido devido a estudos recentes de interação entre o pVAX1-LacZ e a molécula de DAPP (Caramelo-Nunes, *et al.*, 2013b).

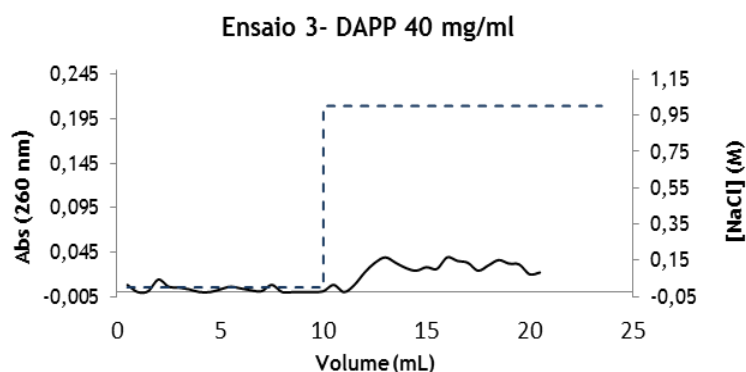
### 3.4.1 Ensaios cromatográficos com criogel DAPP

Para os ensaios de cromatografia de afinidade por fluxo de gravidade com o criogel DAPP, foram usadas três concentrações distintas de DAPP (40, 10 e 5 mg/mL). A coluna com o criogel foi equilibrada com tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e foram injetadas diferentes quantidades de pVAX1-LacZ, seguindo-se os passos de eluição descritos no ponto 2.3.7.1.1

#### 3.4.1.1 DAPP 40 mg/mL

Como se pode verificar pelos cromatogramas da figura 17, não se estabeleceu uma interação suficientemente forte entre o plasmídeo e o DAPP de densidade 40 mg/mL, não se obtendo um pico visível de retenção. Este facto pode ser explicado pela alta densidade de moléculas de DAPP no criogel impedindo assim a ligação ao plasmídeo.

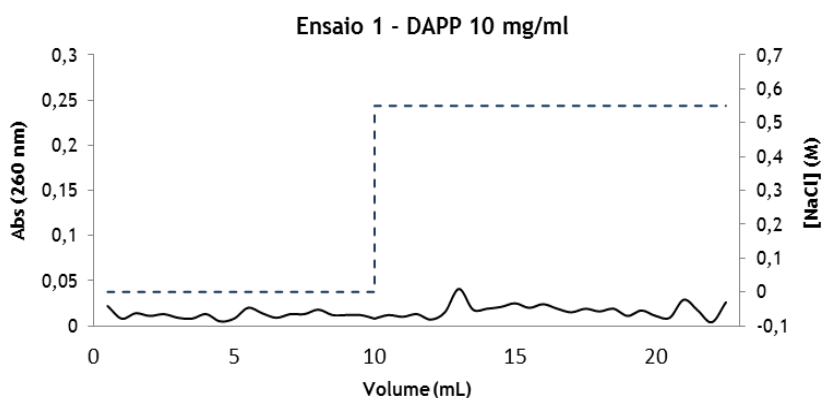




**Figura 17.** Perfis cromatográficos obtidos nos ensaios 1,2,e,3 com o suporte criogel DAPP 40 mg/mL. Injeção de 20  $\mu$ L de pDNA (1120  $\mu$ g/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado).

### 3.4.1.2 DAPP 10 mg/mL

Por análise dos cromatogramas obtidos (Figura 18), não se estabeleceu uma interação suficientemente forte entre o plasmídeo e o DAPP, tanto com uma concentração mais baixa (ensaio 1), como em concentrações mais elevadas como se pode verificar pelo ensaio 2 com 25  $\mu$ l a 2347,5  $\mu$ g/mL (Figura 18). O criogel DAPP não conseguiu reter a totalidade do plasmídeo sendo parte dele eluído logo no início. Este facto pode ser explicado, presumindo que 10 mg/mL é uma densidade de ligando ainda demasiado elevada, impedindo a ligação do plasmídeo ao DAPP.



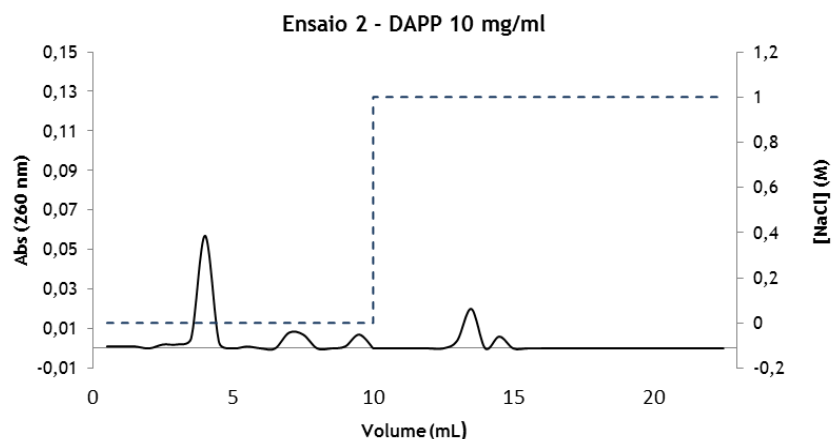
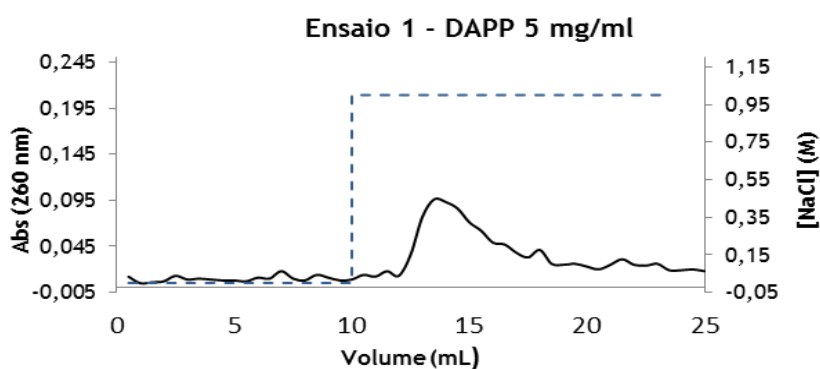


Figura 18. Perfis cromatográficos obtidos nos ensaios 1 e 2 com o suporte criogel DAPP 10 mg/mL. Injeção de 50  $\mu$ L de pDNA (447,5  $\mu$ g/mL) e 25  $\mu$ L de pDNA (2347,5  $\mu$ g/mL), respectivamente nos ensaios 1 e 2. Utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado).

### 3.4.1.3 DAPP 5mg/mL

Pela análise dos cromatogramas da Figura 19, pode constatar-se que foi estabelecida uma interação suficientemente forte entre o plasmídeo e o DAPP, resultando assim num perfil de retenção. Aumentando a quantidade de pDNA injetado, o criogel continua a ter capacidade de retenção, sendo a quantidade não ligada com tampão sem NaCl pouco significativa, o que indica que tem efetivamente uma boa capacidade de retenção comparativamente com os criogéis DAPP de concentrações de 40 e 10 mg/mL.



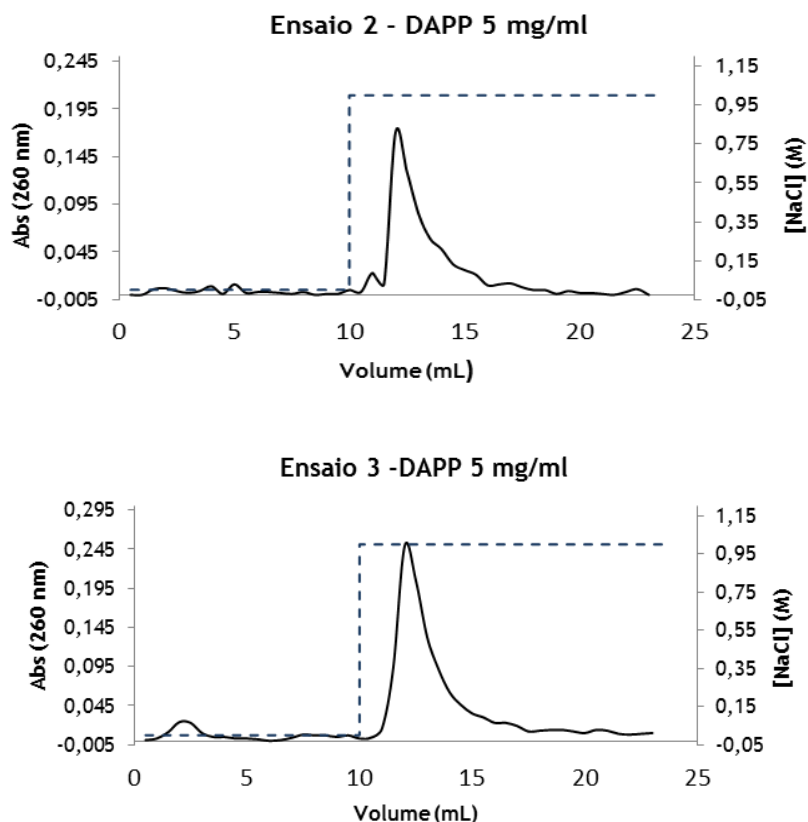


Figura 19. Perfis cromatográficos obtidos nos ensaios 1,2 e 3 com o suporte criogel DAPP 5 mg/mL. Injeção de 20, 30 e 40  $\mu$ L de pDNA (1120  $\mu$ g/mL) respetivamente utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado).

O criogel DAPP 5 mg/mL como tem uma densidade de ligando mais baixa, já não se encontra estruturalmente impedido, sendo possível ocorrer uma interação entre o ligando e a matriz. Esta interação pode ser o resultado não só da ligação entre o grupo carregado positivamente de 5-amina e os grupos fosfato carregados negativamente do plasmídeo, mas também de pontes de hidrogénio entre as bases azotadas e o anel aromático do DAPP, assim também como interações  $\pi$ - $\pi$  (Sousa et al., 2011).

Ao longo destes ensaios, pode concluir-se que concentrações mais baixas de DAPP no criogel melhoram a retenção do plasmídeo. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados com o mesmo ligando, DAPP, imobilizado numa matriz de Sepharose em que a densidade de ligando ideal era 0,015 mmol de DAPP/ g de Sepharose derivatizada (Caramelo-Nunes *et al.*, 2013a).

### 3.4.2 Ensaios cromatográficos com o criogel poli(HEMA-GMA) (suporte de controlo)

Para os ensaios cromatográficos de afinidade por fluxo de gravidade com o criogel de suporte poli(HEMA-GMA), o criogel foi equilibrado com tampão acetato 10 mM a pH 5,0, sendo injetadas diferentes concentrações de pVAX1-LacZ nos suportes e seguindo os passos descritos no ponto 2.3.7.1.1.

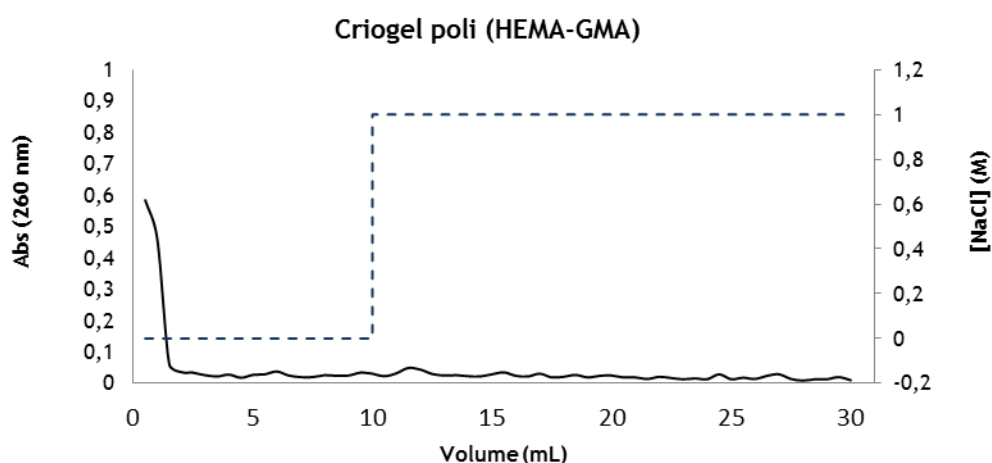


Figura 20. Perfil cromatográfico obtido com o suporte criogel poli (HEMA-GMA). Injeção de 50  $\mu$ L de pDNA (1120  $\mu$ g/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado).

Como se pode verificar pela cromatograma da Figura 20, o suporte de controlo (sem ligandos) não promoveu qualquer retenção do pDNA, o que comprova a especificidade do ligando estudado, o DAPP, para o pDNA, sendo as interações estabelecidas unicamente por parte do ligando e não pela matriz cromatográfica.

### 3.4.3 Ensaios cromatográficos com o criogel fenantridina vinílica

Para os ensaios cromatográficos de afinidade por fluxo de gravidade utilizou-se como ligando, a fenantridina vinílica, usada como monómero vinílico e polimerizada juntamente com o HEMA. Na síntese do criogel foram usadas duas concentrações diferentes de fenantridina vinílica 1:29 (mmolar), 1:14 (mmolar). Para os ensaios o criogel foi equilibrado com tampão acetato 10 mM a pH 5,0, sendo injetadas diferentes concentrações de pVAX1-LacZ nos suportes e seguindo os passos descritos no ponto 2.3.7.1.1.

### 3.4.3.1 Criogel fenantridina vinílica 1:29

Pela análise dos cromatogramas, verifica-se que para diferentes quantidades de pDNA estabeleceu-se uma interação específica entre a fenantridina vinílica e o pDNA, resultando na retenção do mesmo (Figura 21). A injeção de 20  $\mu\text{L}$  de amostra (ensaio 1) houve retenção total de pDNA na ausência de sal. À medida que se aumentam a quantidade de pDNA injetado registou-se uma maior retenção, no entanto são visualizadas perdas de pDNA na ausência de sal, o que indica que se ultrapassou a capacidade de ligação do suporte cromatográfico.

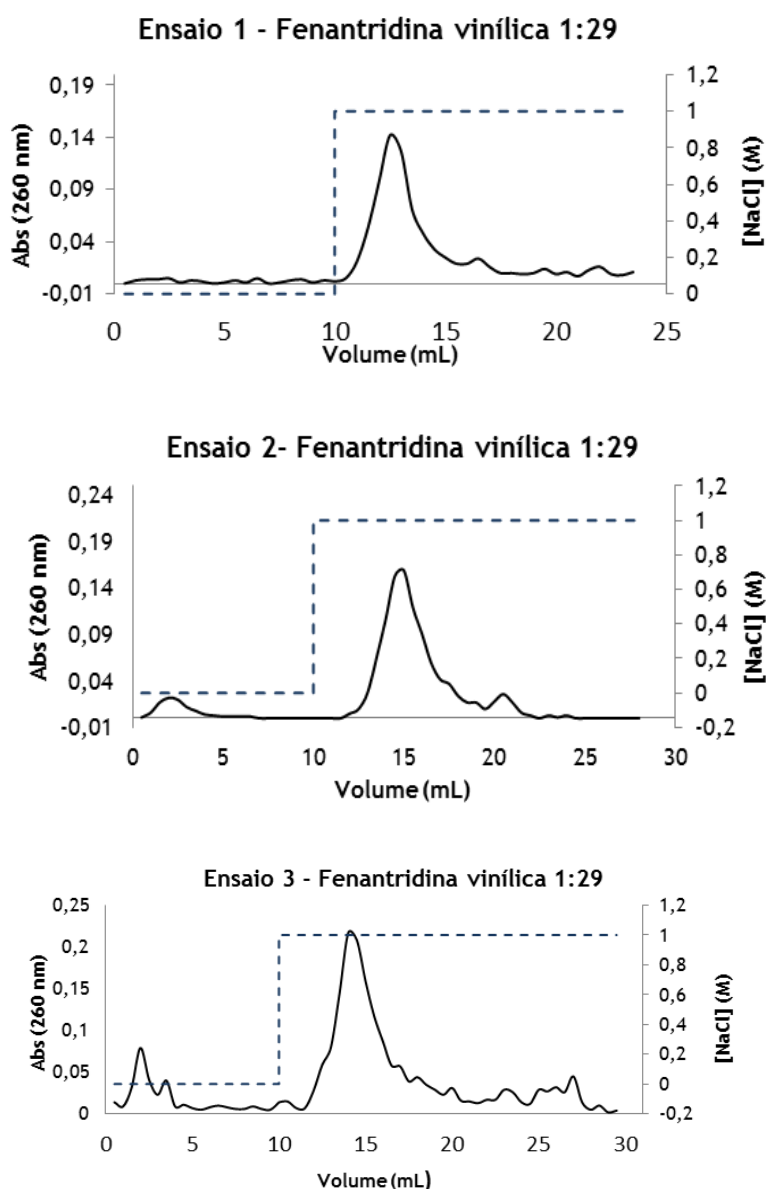


Figura 21. Perfis cromatográficos obtidos nos ensaios 1,2 e 3 com o suporte criogel Fenantridina vinílica 1:29. Injeção de 20, 30 e 50  $\mu\text{L}$  de pDNA (1120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) respetivamente utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado).

### 3.4.3.2 Criogel fenantridina vinílica 1:14

Como se pode verificar pelo perfil cromatográfico do criogel fenantridina vinílica na concentração 1:14 (Figura 22) e comparando com o perfil obtido na concentração 1:29 (Figura 21) não se observou uma interação tão forte, resultando numa menor retenção do plasmídeo.

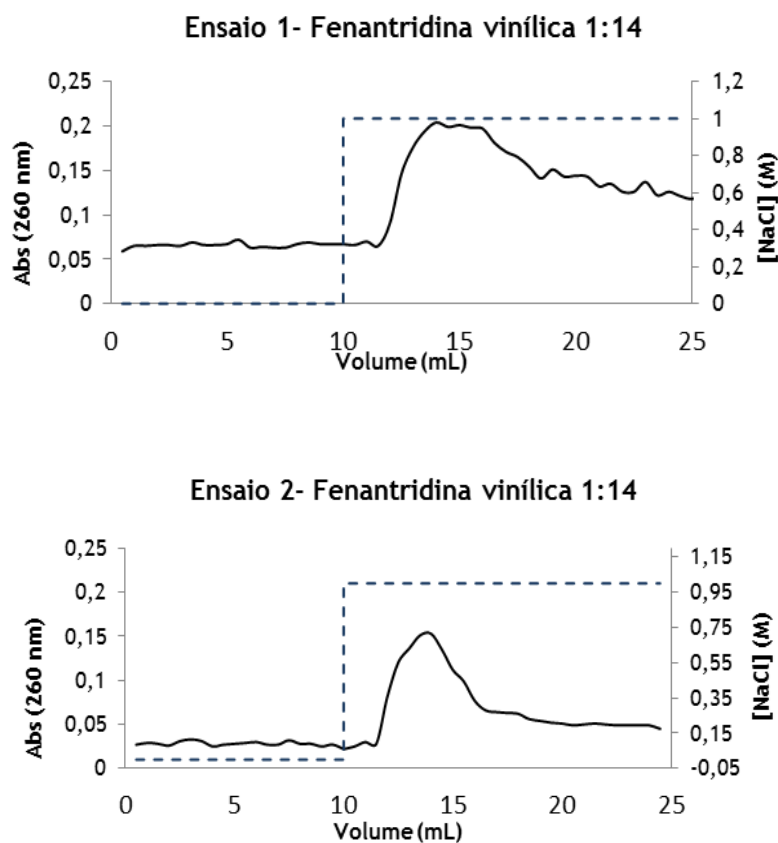


Figura 22. Perfis cromatográficos obtidos nos ensaios 1 e 2 com o suporte criogel Fenantridina vinílica 1:14. Injeção de 20  $\mu$ L de pDNA (1120  $\mu$ g/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado).

Este facto leva a concluir que quanto maior a densidade do monómero HEMA menor é a retenção, ou seja, a presença de uma concentração elevada de fenantridina vinílica impede o estabelecimento das interações com o plasmídeo. Isto que indica que na concentração 1:14 a molécula responsável pelo perfil de retenção seria o HEMA e não a fenantridina. Tal facto foi confirmado posteriormente com o suporte de controlo, poli(HEMA).

### 3.4.4 Ensaios cromatográficos com o criogel poli(HEMA) (suporte de controlo)

Contrariamente ao esperado o HEMA interagiu com o pDNA havendo retenção do plasmídeo apenas com tampão sem sal (Figura 23). Tendo em conta que o criogel poli(HEMA) é um suporte de controlo, não deveria estabelecer qualquer interação com o pDNA. Este comportamento indica que a molécula responsável pela ligação do pDNA nas fenantridinas vinílicas será efetivamente o HEMA e não a fenantridina. Comparativamente com os perfis cromatográficos do DAPP, o HEMA tem maior capacidade de retenção, obtendo picos maiores e mais intensos e sem perdas significativas de pDNA.

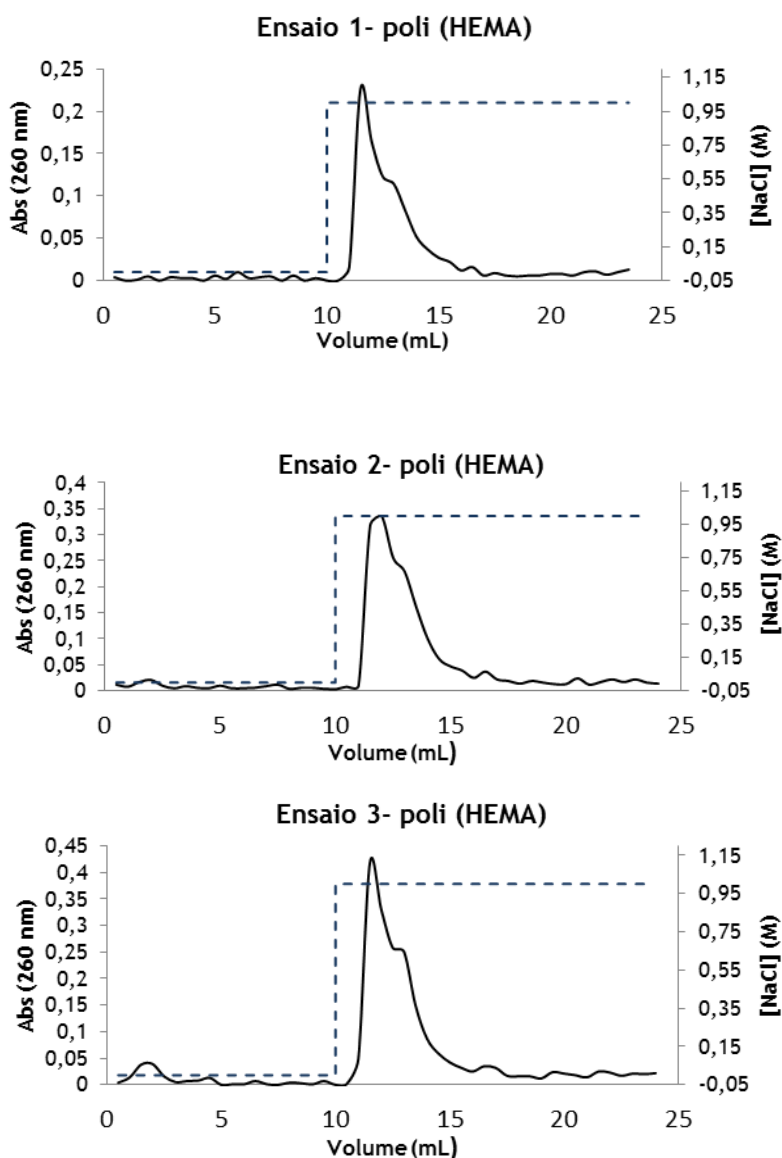


Figura 23. Perfis cromatográficos obtidos nos ensaios 1, 2 e 3 com o suporte criogel poli(HEMA). Injeção de 50, 75 e 80  $\mu\text{L}$  de pDNA (1120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), respetivamente utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o passo de eluição a solução tampão de NaCl 1 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado).

### **3.5. Ensaios cromatográficos no sistema FPLC**

Como o criogel DAPP 5 mg/mL e o criogel poli(HEMA) foram os que apresentaram melhores capacidades de retenção do pDNA, foram utilizados nos ensaios cromatográficos num sistema de FPLC de modo a avaliar a sua especificidade para as diferentes isoformas do plasmídeo pVAX1-LacZ.

#### **3.5.1 Separação das isoformas superenrolada e circular aberta do pVAX1-LacZ**

Os ensaios cromatográficos realizados por FPLC usaram como amostra uma solução de pDNA pré-purificada com o kit “Qiagen plasmid midi kit” com o objetivo de verificar a seletividade dos criogéis para as isoformas sc e oc. Para os ensaios de FPLC foram seguidos os passos descritos no ponto 2.3.7.1.2.

##### **3.5.1.1 Criogel DAPP 5mg/mL**

Como se pode observar pelo cromatograma da Figura 24, houve quase total retenção do pDNA sem a presença de sal, tendo sido eluídos dois picos de intensidades diferentes, que correspondem às diferentes isoformas. A eluição do primeiro pico foi conseguida com a presença de NaCl a 0,22 M e como se pode verificar pela eletroforese, contém apenas a isoforma oc. No entanto, esta banda apresenta uma intensidade bastante maior comparativamente à amostra inicial, o que poderá ser devido a uma maior concentração nos concentradores ou à conversão da isoforma sc para oc. A eluição do segundo pico foi conseguida com o aumento da concentração de NaCl para 0,55 M e como se pode visualizar pela eletroforese, não se conseguiu separar totalmente ambas as isoformas. Este pico contém não só uma banda de isoforma sc de pDNA como também a isoforma oc.

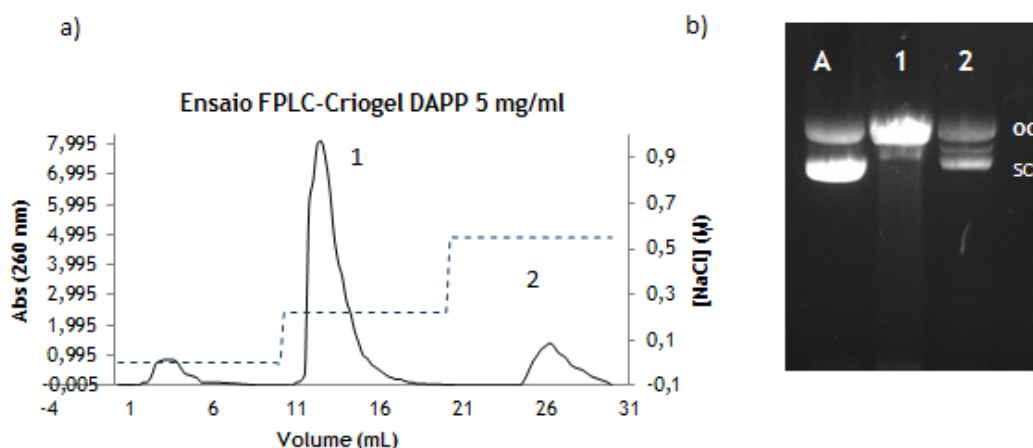


Figura 24. Perfil cromatográfico obtido com o suporte criogel DAPP 5mg/mL. a) Injeção de 25  $\mu$ L de pDNA (600  $\mu$ g/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0, para o primeiro passo de eluição solução tampão de NaCl 0,22 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o segundo passo de eluição solução tampão de NaCl 0,55 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado); b) eletroforese de agarose das frações recolhidas.

Após várias tentativas de otimização dos passos de eluição não se conseguiu obter a separação total de ambas as isoformas, no entanto é de notar que o suporte criogel DAPP 5 mg/mL apresenta seletividade para as isoformas, uma vez que a isoforma sc é eluída apenas no pico 2, apesar de conter também uma pequena quantidade da isoforma oc. Este comportamento pode indicar a presença de uma forte interação dos grupos fosfato da molécula de pDNA com o grupo amina do DAPP (Sousa *et al.*, 2008). Analogamente em estudos anteriores com o DAPP imobilizado numa matriz de Sepharose e usando as mesmas condições de ligação e de eluição, o pDNA foi retido na ausência de sal e eluídas as isoformas oc e sc a 0,22 M e 0,55 M, respetivamente (Caramelo-Nunes *et al.*, 2013b). No entanto, no presente estudo a separação não foi conseguida totalmente ao contrário do descrito por Caramelo-Nunes e colaboradores. Estes resultados podem indicar que os grupos OH do suporte do criogel poderão estar a interagir com a molécula de pDNA, mascarando assim as interações estabelecidas com a molécula de DAPP.

Para tentar perceber melhor a seletividade do criogel DAPP 5mg/mL e o seu potencial de purificação foram realizados ensaios usando uma amostra mais complexa, um lisado clarificado de pVAX1-LacZ.

### 3.5.1.2 Criogel poli(HEMA)

Como pode observar-se pelo cromatograma da Figura 25, tal como o criogel DAPP 5 mg/mL, o criogel HEMA ligou o pDNA na ausência de sal, sendo o plasmídeo eluído na forma de dois picos de intensidades semelhantes, o que corresponde às diferentes isoformas. A eluição da isoforma oc no primeiro pico foi conseguida com tampão acetato na presença de sal numa concentração de 0,249 M NaCl, como se pode verificar pela eletroforese realizada (Figura 25 b). A eluição da isoforma sc no segundo pico foi conseguida com o aumento da concentração de NaCl para 0,40 M. A respetiva eletroforese (Figura 25 b) mostra a presença de uma grande quantidade da isoforma sc e uma banda vestigial correspondendo à isoforma oc.

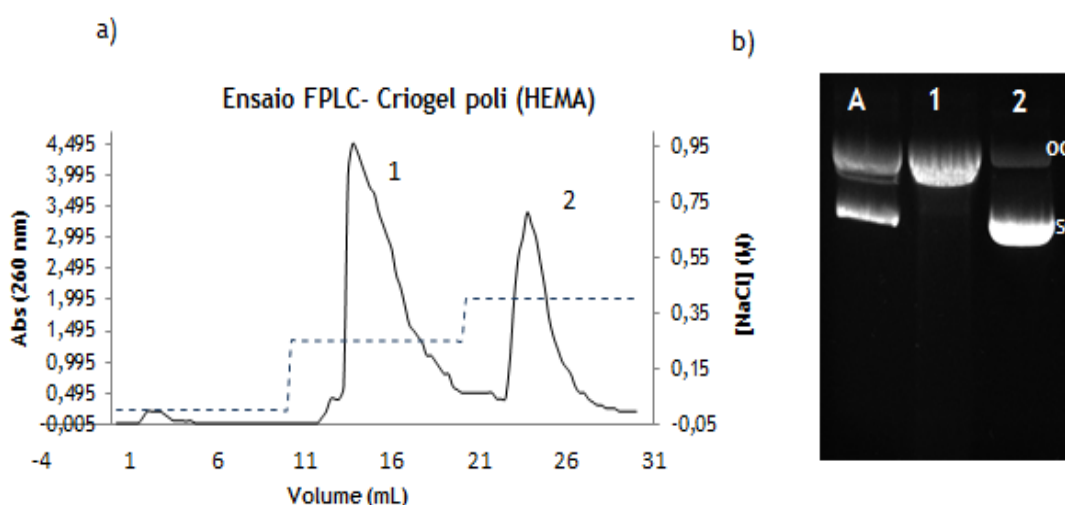


Figura 25. Perfil cromatográfico obtido com o suporte criogel poli(HEMA): a) Injeção de 25  $\mu$ L de pDNA (600  $\mu$ g/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0, para o primeiro passo de eluição solução tampão de NaCl 0,249 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o segundo passo de eluição solução tampão de NaCl 0,40M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado); b) eletroforese de agarose das frações recolhidas.

Este resultado indica que o criogel HEMA apresenta seletividade para as isoformas consoante a concentração de sal usada. Como referido anteriormente no ponto 3.4.4., não era esperada a ocorrência de retenção de pDNA com este suporte, nem a seletividade do HEMA para separar as isoformas do pDNA, uma vez que este suporte era de controlo. A ligação do pDNA provavelmente deve-se a outro tipo de interações para além das iónicas prevalentes no ligando DAPP e na fenantridina vinílica. É de realçar que as interações de afinidade envolvem diferentes tipos de interações para além das eletrostáticas, nomeadamente interações hidrofóbicas, pontes de hidrogénio, interações  $\pi$ - $\pi$  e interações Van der Waals. Neste caso específico, e tendo em conta a estrutura química do monómero HEMA, as ligações prevalentes entre o suporte e o pDNA serão maioritariamente por pontes de hidrogénio e por interações hidrofóbicas.

Antes de se poder concluir sobre a eficiência deste suporte foi usada uma amostra mais complexa de modo a verificar se estabeleceriam diferentes interações entre as moléculas de RNA e DNA. Para tal foi usada uma amostra de lisado clarificado de pVAX1-LacZ (6,05kpb).

### 3.5.2. Separação das isoformas superenrolada e circular aberta do lisado clarificado

Para os ensaios cromatográficos por FPLC com lisado clarificado foram seguidos os passos descritos no ponto 2.3.7.2.

#### 3.5.2.1 Criogel DAPP 5 mg/mL

De acordo com os resultados obtidos anteriormente, verificou-se que o DAPP imobilizado no criogel reconhece especificamente a isoforma sc do pDNA, apesar de nas condições usadas haver ainda algum arrastamento de isoforma oc. Deste modo, testou-se a separação da isoforma sc do pDNA das impurezas presentes numa amostra mais complexa de lisado clarificado de *E.coli* (RNA, gDNA, endotoxinas e proteínas). Após várias tentativas de separação/otimização, o criogel foi equilibrado com tampão acetato 10 mM pH 5,0 à temperatura ambiente e com um fluxo de 1 mL/min. Foram usados 2 passos de eluição com a presença de sal, sendo o primeiro passo com uma concentração de 0,22 M de NaCl em tampão acetato 10 mM pH 5,0, e o segundo com uma concentração de 0,55 M de NaCl no mesmo tampão. Após a aplicação destas condições, foi obtido o seguinte cromatograma e a respetiva eletroforese (Figura 26).

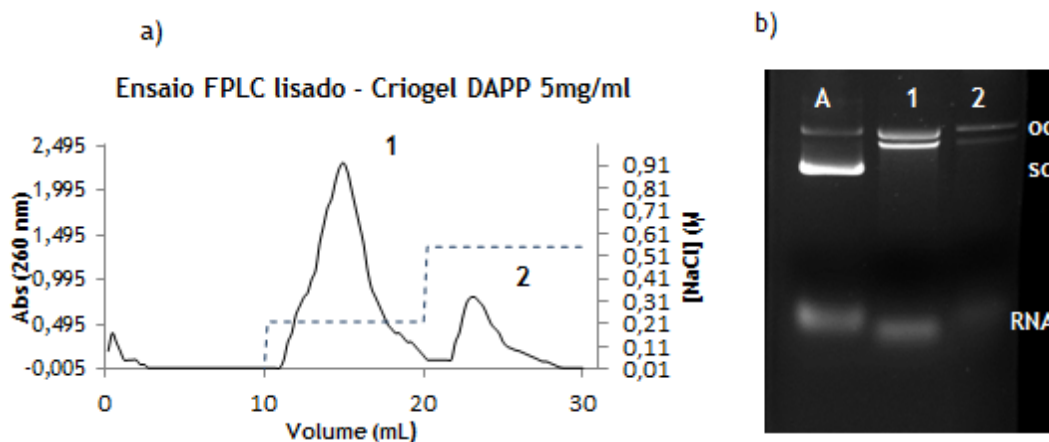


Figura 26. Perfil cromatográfico obtido com o suporte criogel DAPP 5 mg/mL com lisado clarificado. a) Injeção de 25  $\mu$ l de pDNA (600  $\mu$ g/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0, para o primeiro passo de eluição solução tampão de NaCl 0,22 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o segundo passo de eluição solução tampão de NaCl 0,55 M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado); b) eletroforese de agarose das frações recolhidas.

Os resultados mostram que nas condições testadas houve uma separação seletiva do RNA no pico 1, apesar de se observar uma quantidade residual deste ácido nucleico no pico 2. Este

resultado indica que é necessária uma maior otimização das condições usadas de modo a separar totalmente o RNA do pDNA.

### 3.5.2.1 Criogel poli(HEMA)

Como observado anteriormente, o criogel HEMA reconhece especificamente a isoforma sc do pDNA, separando-a da isoforma oc. Assim, resolveu testar-se a separação de isoforma sc do pDNA das impurezas presentes numa amostra mais complexa de lisado clarificado de E.coli (RNA, gDNA, endotoxinas e proteínas). Desta forma, após várias tentativas de separação/otimização, o criogel foi equilibrado com tampão acetato 10 mM pH 5,0 à temperatura ambiente e com um fluxo de 1 mL/min. Foram usados dois passos de eluição na presença de NaCl, sendo o primeiro com a concentração de NaCl 0,22 M em tampão acetato 10 mM pH 5,0 e o segundo passo com um aumento de sal para 0,55 M de NaCl no mesmo tampão. Após a aplicação destas condições foi obtido o seguinte cromatograma e a respetiva eletroforese (Figura 27).

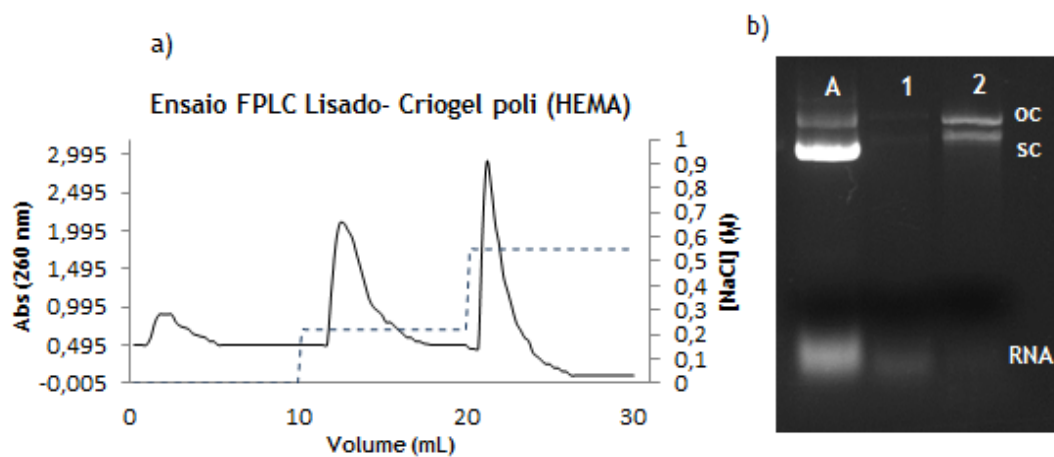


Figura 27. Perfil cromatográfico o suporte criogel poli(HEMA) com lisado clarificado: a) Injeção de 25  $\mu$ L de pDNA (600  $\mu$ g/mL) utilizando para o passo de ligação a solução tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0, para o primeiro passo de eluição solução tampão de NaCl 0,22M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e para o segundo passo de eluição solução tampão de NaCl 0,55M em acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (representado pela linha a tracejado); b) eletroforese de agarose das frações recolhidas.

O cromatograma mostra a presença de dois picos com tempos de retenção diferentes, que correspondem respetivamente ao RNA e às duas isoformas do pDNA, como se pode observar na eletroforese (Figura 27b). Apesar de nestas condições não ter sido possível separar as diferentes isoformas, houve uma separação seletiva do RNA e pDNA, apesar de uma pequena contaminação de RNA no pico 2. Contudo, o suporte conseguiu separar praticamente todo o pDNA, com uma recuperação de mais de 90% em relação ao pico 1. Mais uma vez, conclui-se que o suporte mostra especificidade para os diferentes ácidos nucleicos, havendo no entanto necessidade de uma melhor otimização das condições cromatográficas.

### 3.6 Avaliação da qualidade do DNA plasmídico purificado com o criogel poli(HEMA)

A libertação de endotoxinas para o meio é um problema recorrente quando a *E.coli* é usada como organismo de produção, sendo de difícil remoção nos passos de purificação subsequentes. (Mattiasson *et al.*, 2009). O Limulus ameocyte lysate (LAL) é usado como ligando num ensaio de elevada sensibilidade e especificidade na quantificação de endotoxinas (Mattiasson *et al.*, 2009). Além da presença das endotoxinas é necessário quantificar as proteínas pelo método de BCA, no qual é estimada a concentração de proteínas nas amostras. A presença de proteínas na solução final de pDNA pode levar a uma resposta imune e reações de hipersensibilidade, devido à produção de citocinas, hormonas e/ou anticorpos (Ferreira, 2005).

A qualidade do pDNA, assim como a qualidade da fração de sc de pDNA foi determinada por quantificação de proteínas (método BCA) e de endotoxinas presentes nas amostras (Tabela 8).

Tabela 8. Avaliação da qualidade do plasmídeo.

	Amostra inicial	Fração sc do pDNA
pDNA ( $\mu\text{g/mL}$ )	680	11,5
Proteínas ( $\mu\text{g/mL}$ )	Indetetável	Indetetável
Endotoxinas (EU/mL)	0,99	0,94

Os resultados do método de BCA indicam que tanto a amostra inicial como a fração de sc de pDNA apresentam valores indetetáveis de proteínas, ou seja, o valor está a baixo do limite exigido pela FDA (<1%). Este facto pode dever-se à presença de um passo de clarificação com sulfato de amónio após a lise que levou à precipitação das proteínas contaminantes. Quanto à presença de endotoxinas, a amostra inicial não contém valores elevados de endotoxinas, não se notando assim, uma redução significativa tendo sido apenas reduzida de 0,99 para 0,94 EU/mL, o que se encontra nos limites requeridos pela FDA (40 EU/mg pDNA). Estes resultados mostram que o processo cromatográfico em estudo, apesar de ainda não estar otimizado, é um potencial processo de purificação, separando a isoforma sc do pDNA com valores indetetáveis de proteínas e valores reduzidos de endotoxinas, assim requeridos pelas agências reguladoras, tais como a FDA.

# Capítulo 4

## Conclusões e perspectivas futuras

O rápido desenvolvimento de novas tecnologias e terapias, tais como vacinas de DNA e a terapia génica, levou a uma procura e desenvolvimento de novos processos de purificação de DNA plasmídico. Devido à alta viscosidade provocada pelo elevado peso molecular, os poros pequenos dos suportes cromatográficos convencionais não permitem a adsorção de moléculas de elevado tamanho. Para tal foram desenvolvidos criogéis como novos suportes cromatográficos altamente porosos capazes de ultrapassar este obstáculo.

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de novos criogéis capazes de separar as diferentes isoformas de pDNA, tanto numa solução de lisado clarificado como numa amostra concentrada de pDNA.

Inicialmente foi feito um primeiro passo de síntese química com o intuito de introduzir diferentes grupos funcionais no DAPP substituindo o seu grupo amina por grupos amida portadores de diferentes substituintes capazes de atuarem como ligandos específicos e terem a capacidade de reter e separar as isoformas do pDNA. Este objetivo não foi finalizado, uma vez que não foi possível introduzir o braço espaçador de função vinílica no DAPP e nos seus derivados aminados e, como tal, não puderem ser alvo de copolimerização com formação de criogéis para aplicação em cromatografia de afinidade. Alternativamente foram usados dois métodos de imobilização do ligando ao criogel, o método de pós-imobilização e o de substituição de um dos monómeros da matriz do criogel pelo ligando específico. Na pós-imobilização, utilizou-se a molécula de DAPP como ligando devido à presença de dois grupos amina que fariam a ligação ao criogel e a presença de um azoto carregado positivamente que faria a ligação com o pDNA. Na substituição do monómero da matriz pelo ligando, foi sintetizado o composto p-toluenosulfonato de pent-4-en-1-ilo atuando como braço espaçador e elo de ligação ao criogel. Para cada método de funcionalização foram produzidos criogéis com várias densidades de ligando. Os vários suportes foram devidamente caracterizados por SEM, IV e RMN e análise elementar.

Estes suportes foram testados em estudos, nos quais foi avaliada a capacidade de retenção do pDNA pelos criogéis. No caso do criogel DAPP as concentrações 10 e 40 mg/mL mostraram ser demasiado elevadas, bloqueando assim o acesso do pDNA à molécula de DAPP e não se observando um perfil de retenção. Pelo contrário o criogel DAPP 5mg/mL mostrou capacidade de retenção do pDNA, promovendo também a separação específica da isoforma oc da isoforma sc, apesar de as condições cromatográficas terem ainda de ser otimizadas. No caso da fenantridina vinílica concluiu-se que a matriz HEMA do criogel estabelece interações com o

pDNA, mascarando assim as possíveis interações estabelecidas pela fenantridina vinílica. Assim, foram efetuados estudos de retenção com o criogel poli(HEMA) (branco) verificando-se que estabelece interações com o pDNA, retendo-o com elevada capacidade.

Para avaliar a capacidade dos criogéis para purificar a isoforma sc a partir de misturas mais complexas foram efetuados estudos cromatográficos por FPLC. A separação das isoformas foi otimizada e realizada nas mesmas condições dos ensaios de retenção, verificando-se que tanto o criogel DAPP, como o poli(HEMA) apresentam alguma seletividade para separar o pDNA do RNA, apesar de se verificar sempre alguma contaminação de RNA na fração de pDNA. Por outro lado, verificou-se que o criogel poli(HEMA) não conseguiu separar ambas as isoformas na mistura clarificada de lisado, ao contrário do observado quando se usou apenas uma amostra de pDNA sem contaminantes.

Os resultados deste trabalho mostram que os criogéis estudados apresentam um grande potencial para serem aplicados na purificação de pDNA, apesar de não terem sido ainda totalmente otimizadas as condições cromatográficas que permitem a obtenção de pDNA com o grau de pureza que respeite os valores estabelecidos pelas agências reguladoras dos produtos para uso terapêutico.

No seguimento deste trabalho e como perspectivas futuras são de seguida propostas algumas linhas de investigação, nomeadamente:

- Otimização das condições cromatográficas dos criogéis HEMA e DAPP que mostraram ser promissores em termos de seletividade e especificidade nos processos de separação de pDNA;
- Desenvolvimento de novos reagentes alquilantes capazes de introduzirem simultaneamente um braço espaçador adequado e a função vinílica em derivados da fenantridina, incluindo os 3,8-diaminas tornando estes ligandos capazes de copolimerizarem originando criogéis em que o ligando se encontra adequadamente separado da matriz. Alternativamente, poder-se-ão utilizar os reagentes alquilantes aqui estudados, ou análogos, após redução da insaturação C=N da fenantridina cuja amina resultante será mais reativa.
- Uso de concentrações mais baixas de monómeros vinílicos derivados de fenantridinas na colimerização com HEMA, de forma a originar criogéis com propriedades mecânicas e grau de “swelling” adequadas, ao mesmo tempo com quantidades de ligando não muito elevadas potenciadores de afinidades não desfavorecidas por impedimento estérico, mais adequadas a uma processo de cromatografia.
- Realização adicional de estudos de toxicidade dos derivados da fenantridina e seus criogéis tendo em conta a similaridade estrutural com o bem conhecido e estudado mutagénico brometo de etídio.

# Capítulo 5

## Bibliografia

a- Caramelo-Nunes C, Bicho D, Almeida P, Marcos JC, Tomaz CT. Dynamic binding capacity and specificity of 3,8-diamino-6-phenylphenanthridine-Sepharose support for purification of supercoiled plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of Chromatography A*. 2013;1307;91- 98.

Altıntaş EB, Denizli A. Monosize poly(glycidyl methacrylate) beads for dye-affinity purification of lysozyme. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2006;38;99-106.

Altıntaş EB, Tüzmen N, Candan N, Denizli A. Use of magnetic poly(glycidyl methacrylate) monosize beads for the purification of lysozyme in batch system. *Journal of Chromatography B*. 2007;853;105-113.

Barbey R, Laporte V, Alnabulsi S, Klok HA. Postpolymerization Modification of Poly(glycidyl methacrylate) Brushes: An XPS Depth-Profiling Study. *Macromolecules*. 2013;46;6151-6158.

b-Caramelo-Nunes C, Almeida P, Marcos JC, Tomaz CT. Specific recognition of supercoiled plasmid DNA by affinity chromatography using the intercalator DAPP as ligand. *Journal of Chromatography B*. 2013; 928; 121- 124.

Benaglia M, Alberti A, Giorgini L, Magnoni F, Tozzi S. Poly(glycidyl methacrylate): a highly versatile polymeric building block for post-polymerization modifications. *Polymer Chemistry* 2013;4;124.

Bereli N, Şener G, Altıntaş EB, Yavuz H, Denizli A. Poly(glycidyl methacrylate) beads embedded cryogels for pseudo-specific affinity depletion of albumin and immunoglobulin G. *Materials Science and Engineering C*. 2010;30;323-329.

Boyer PM, Hsu JI. Protein Purification by Dye-Ligand Chromatography. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 1993;49.

Caramelo-Nunes C, Almeida P, Marcos JC, Tomaz CT. Aromatic ligands for plasmid deoxyribonucleic acid chromatographic analysis and purification: an overview. *Journal of Chromatography A*. 2014; 1327; 1- 13.

Cimecioglu AL, Weiss RA. Aromatic Polyamides of 3,8-Diamino-6-phenylphenanthridine and their Molecular complexes with sulfonated Polystyrene Ionomer. *Macromolecules* 1995;28;18; 6343-6346.

Dainiak MB, Galaev IY, Kumar A, Plieva FM, Mattiasson B. Chromatography of living cells using supermacroporous hydrogels, cryogels. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2007;106;101-127.

Diogo MM, Queiroz JA, Prazeres DMF. Chromatography of plasmid DNA. *Journal of Chromatography A*. 2005;1069;3-22.

Ertürk G, Mattiasson B. Cryogels-versatile tools in bioseparation. *Journal of Chromatography A*. 2014;1357;24-35.

Ferreira GNM, Monteiro A, Prazeres DMF, Cabral JMS. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends in Biotechnology*. 2000;18;380-388

Ferreira GNM. Chromatography Approaches in the Purification of Plasmid DNA for Therapy and Vaccination: Review. *Chemical Engineering and Technology*. 2005;28;11.

Ghanem A, Healey R, Adly FG. Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: A Review. *Analytica Chimica Acta*. 2013;760;1-15.

Gun'ko VM, Savina IN, Mikhalovsky SV. Cryogels: morphological, structural and adsorption characterisation. *Advanced Colloid and Interface Science* 2013;187-188;1-46.

Hage DS. Affinity Chromatography: A review of clinical Applications. *Clinical Chemistry*. 1999;45:5;593-615.

Heftman E. *Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related techniques volume 51 A*. 5ª edição. Amesterdão:Eslevier,1992.

Henderson TMA, Ladewig K, Haylock DN, McLean KM, O'Connor AJ. Cryogels for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*. 2013;1;2682-2695.

Jones RL, Wilson WD. Effect of ionic strength on the pKa of ligands bound to DNA. *Biopolymers*. 1981;20;141-154.

Katritzky ER, Boulton AJ. *Advances in Heterocyclic Chemistry Volume 13*. Inglaterra; Academic Press, 1971.

Kenawy ER, Abdel-Hay FI, El-Shanshoury AER, El-Newehy MH. Biologically active polymers. V. Synthesis and antimicrobial activity of modified poly(glycidyl methacrylate-co-2-hydroxyethyl methacrylate) derivatives with quaternary ammonium and phosphonium salts. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2002;40;2384-2393.

Kubar T, Hanus M, Ryjáček F, Hobza P. Binding of cationic and neutral phenanthridine intercalators to a DNA oligomer is controlled by dispersion energy: quantum chemical calculations and molecular mechanics simulations. *Chemistry European Journal*. 2006;12;280 - 290.

Lee Gy, Chen CH, Wang TH, Lee WC. Affinity chromatography of DNA on macroporous copolymerized particles of styrene and glycidyl methacrylate with immobilized polynucleotide. *Analytical Biochemistry*. 2003;312;235-241.

Li F, Dong PJ, Zhuang QF. Novel column-based protein refolding strategy using dye-ligand affinity chromatography based on macroporous biomaterial. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216;4383-4387.

Lillethorup M, Shimizu K, Plumere N, Pedersen SU, Daasbjerg K. Surface-Attached Poly(glycidyl methacrylate) as a Versatile Platform for Creating Dual-Functional Polymer Brushes. *Macromolecules*. 2014; 47; 5081–5088.

Lozinsky VI, Galaev IY, Plieva FM, Savina IN, Jungvid H, Mattiasson B. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnology*. 2003;21.

Lozinsky VI, Plieva FM, Galaev IY, Mattiasson B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. *Bioseparation*. 2002;10;163-188.

Lozinsky VI. Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and application. *Russian Chemical Reviews*. 2002;71;489-511.

Lozinsky VI. Polymeric cryogels as a new family of macroporous and supermacroporous materials for biotechnological purposes. *Russian Chemical Reviews*. 2008;57; 1015–1032.

Luedtke NW, Liu Q, Tor Y. On the electronic structure of ethidium. *Chemistry European Journal*. 2005;11;495 - 508.

Luedtke NW, Liu Q, Tor Y. Synthesis, photophysical properties, and nucleic acid binding of phenanthridinium derivatives based on ethidium. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2003;11;5235-5247.

Ma Z, Ramakrishna S. Electrospin regenerated cellulose nanofiber affinity membrane functionalized with protein A/G for IgG purification. *Journal of Membrane Science*. 2008;319;23-28.

Mattiasson B, Kumar A, Galaev IY. *Macroporous polymers: Production, Properties and Biotechnological/Biomedical Application*. Boca Raton: CRC Press, 2009.

Misra VK, Honig B. On the magnitude of the electrostatic contribution to ligand-DNA interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 1995;92;4691-4695.

Mondal P, Thander L, Chattopadhyay SK. A new entry to the phenanthridine ring system. *Tetrahedron Letters*. 2012;53;1328-1331.

Okay O. *Polymeric Cryogels: Macroporous Gels with Remarkable Properties*. *Advances in Polymer Science* 263. Suiça: Springer International Publishing, 2014.

Özgür E, Bereli N, Türkmen D, Ünal S, Denizli A. PHEMA cryogel for in-vitro removal of anti-dsDNA antibodies from SLE plasma. *Materials Science and Engineering C* 2011;31;915-920.

Perçin I, Sağlar E, Yavuz H, Aksöz E, Denizli A. Poly(hydroxyethyl methacrylate) based affinity cryogel for plasmid DNA purification. *International journal of biological macromolecules*. 2011;48;577-582.

Prazeres DMF, Schlupe T, Cooney C. Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography. A*. 1998;806;31-45.

Rangarajan S, Friedman SH. Design, synthesis and evaluation of phenanthridine derivatives targeting the telomerase RNA/DNA heteroduplex. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2007;17;2267-2273.

Reis R, Zydney A. Membrane separations in biotechnology. *Membrane separations in biotechnology*. 2001;12;208-211.

Rodrigues T, Carrondo MJI, Alves PM, Cruz PE. Purification of retroviral vectors for clinical applications: biological implication and technological challenges. *Journal of Biotechnology*. 2007;127;520-541.

Ross SA, Pitié M, Meunier B. A straightforward preparation of primary alkyl triflates and their utility in the synthesis of derivatives of ethidium. *Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 2000;571-574.

Sahiner N, Yildiz S. Preparation of superporous poly(4-vinyl pyridine) cryogel and their templated metal nanoparticle composites for H<sub>2</sub> production via hydrolysis reactions. *Fuel Processing Technology*. 2014;126;324-331.

Scott RPW. *Principles and practice of chromatography*. LIBRARYFORSCIENCE, 2003.

Shi X, Macgregor RB. The effect of charge on the volume change of DNA binding with intercalator DAPP. *Journal of Physical Chemistry B*. 2007;111;13.

- Silva A, Boto REF, Tomaz CT, Queiroz JA, Almeida P. Rhodamine B as Ligand for Affinity Chromatography: Chromatographic Studies on Derivatized Beaded Cellulose. *Journal of Chromatographic Science*. 2010;48.
- Souibgui A, Gaucher A, Marrot J, Bourdreux F, Aloui F, Ben Hassine B, Prim D. New series of acridines and phenanthrolines: synthesis and characterization. *Tetrahedron*. 2014;70;3042-3048.
- Sousa A, Bicho D, Tomaz CT, Sousa F, Queiroz JA. Performance of a non-grafted monolithic support for purification of supercoiled plasmid DNA. *Journal of Chromatography A* 2011;1218;1701-1706.
- Sousa A, Sousa F, Queiroz JA. Advances in Chromatographic supports for pharmaceutical grade plasmid DNA purification: A Review. *Journal of Separation Science*. 2012;35;3046-3058.
- Sousa F, Matos T, Prazeres D.M.F, Queiroz JA. Specific recognition of supercoiled plasmid DNA in arginine affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*. 2008;374;432-434.
- Sousa F, Prazeres DMF, Queiroz JA. Affinity Chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA: A Review. *Trends in Biotechnology*. 2008;26; 518-25.
- Stadler J, Lemmens R, Nyhammar T. Plasmid DNA purification: A Review. *Journal of Gene and Medicine*. 2004;6;554-566.
- Subramanian G. *Biopharmaceutical Production Technology*. 2012;2.
- Theobald RS, Schofield K. *The Chemistry of phenanthridine and its derivatives*. 1949.
- Tumir LM, Radić Stojković M, Piantanida I. Come-back of phenanthridine and phenanthridinium derivatives in the 21st century. *The Journal of Organic Chemistry*. 2014;10;2930-2954.
- Tummatorn J, Krajangsri S, Norseeda K, Thongsornkleeb C, Ruchirawat S. A new synthetic approach to 6-unsubstituted phenanthridine and phenanthridine-like compounds under mild and metal-free conditions. *Organic e Biomolecular Chemistry*. 2014;12;5077-5081.
- Unger KM, Ditz R, Machtejevas E, Skudas R, *Liquid Chromatography: Its Development and Key Role in Life Science Applicatiосn*. *Angewandte Chemie International Edition*. 2012;49;2300-2312.
- Uygun M, Akduman B, Akgöl S, Denizli A. A New Metal-chelated cryogel for reversible Immobilization of urease. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013;170;1815-1826.