

UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Aplicação de antibióticos como ligandos em cromatografia de afinidade para purificação de DNA plasmídico

CATARINA CAMELO NUNES

Dissertação submetida à Universidade da Beira Interior para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Orientadores: Professora Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomaz
Professor Doutor João Carlos Ramos Nunes Marcos

Covilhã
2008

*“Hold fast to dreams
For if dreams die
Life is a broken-winged bird
That cannot fly.*

*Hold fast to dreams
For when dreams go
Life is a barren field
Frozen with snow.”*

Langston Hughes

Aos meus pais e irmã

AGRADECIMENTOS

Foram muitas as pessoas que permitiram que este trabalho fosse sendo realizado e que finalmente chegasse ao seu fim, e a todas elas agradeço do fundo do coração.

À minha orientadora, Prof. Dr^a. Cândida Tomaz, pela orientação, conhecimentos transmitidos e apoio, mas acima de tudo pela simpatia, amizade e bom coração que sempre demonstrou ter.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Marcos pela disponibilidade e ajuda, que tão importantes foram para o decorrer do trabalho, mas também pela sua simpatia, que sempre tornou tudo mais fácil.

Ao Prof. Dr. Paulo Almeida, antes de mais pela enorme ajuda, apoio e dedicação, pelos conhecimentos transmitidos e pela paciência, mas também pela boa disposição, simpatia e amizade, que fizeram do trabalho nesse mundo que é a química orgânica, uma jornada mais fácil de transpor.

Agradeço também ao Dr. Hélio Faustino pela grande ajuda e paciência, por todas as vezes que deixou o próprio trabalho para me orientar, mas agradeço-lhe principalmente pela amizade, simpatia e boa disposição que demonstrou desde o primeiro momento, que tanto ajudaram a que as longas horas dentro do laboratório parecessem minutos.

À Dr^a. Fani Sousa pela ajuda e disponibilidade, pela paciência, mas principalmente pela enorme simpatia, que quase faz dela uma exceção...

Agradeço ao Dr. Luís Matias pela realização dos espectros de RMN, e a todos os outros técnicos que, de alguma forma, me ajudaram a chegar ao fim.

A todos os amigos/colegas de laboratório, antigos ou recentes, que ajudam a superar tantas metas, especialmente à minha colega Dr^a. Teresa Tente pela amizade e apoio e por ter sempre compreendido a forma como por vezes me sentia. Agradeço também ao Dr. Michael Santos por todas as placas que semeou, mas principalmente pela sua amizade e ao Dr. Nuno Fernandes, cuja amizade vem já dos tempos de estudante.

A todos os meus amigos, dentro e fora da ubi, que apesar de serem poucos, são genuínos e por isso, muito obrigada.

Agradeço aos meus pais, que sempre fizeram tudo para que eu chegasse onde cheguei e continuam a fazê-lo para que consiga chegar ainda mais longe. Agradeço-lhes pelo amor e força que me permitiram ser quem sou, chegar onde cheguei e que todos os dias me permitem dar mais um passo, neste caminho atribulado que é a vida.

Agradeço à minha irmã do fundo do coração por sempre ter acreditado em mim e nos meus sonhos, por estar sempre presente, por sempre me ter dado força para me tornar a pessoa que sou hoje, pelo amor sem o qual tudo teria sido mais difícil.

Aos meus melhores amigos de 4 e 2 patas, de pêlo e penas, que sem eles tudo seria mais triste, mais difícil, mais cinzento.

Agradeço finalmente à UBI, a instituição que escolhi para a minha formação, para me tornar melhor e maior, nesta bela terra que me viu nascer.

ÍNDICE

1.	LISTA DE ABREVIATURAS	1
2.	RESUMO.....	3
3.	INTRODUÇÃO.....	6
3.1.	Terapias Moleculares	6
3.1.1.	Terapia Génica	6
3.1.1.1.	Estratégias para a Terapia Génica.....	8
3.1.1.2.	Sistemas de Transferência Genética.....	11
3.1.1.2.1.	Vectores não virais	12
3.2.	Preparação de DNA plasmídico.....	14
3.2.1.	Produção de DNA plasmídico	15
3.2.2.	Purificação de DNA Plasmídico.....	18
3.2.2.1.	Técnicas cromatográficas	20
3.2.2.1.1.	Cromatografia de Troca Iónica.....	21
3.2.2.1.2.	Cromatografia de Interação Hidrofóbica	23
3.2.2.1.3.	Cromatografia de Afinidade.....	23
3.2.2.1.4.	Cromatografia de exclusão molecular.....	26
3.2.2.1.5.	Cromatografia de Interação Tiofílica	26
3.2.2.1.6.	Suportes Cromatográficos.....	27
3.2.2.2.	Sistemas de Duas Fases Aquosas	28
3.3.	Ligandos do DNA de dupla cadeia	30
3.3.1.	Ligação de pequenas moléculas ao DNA	31
3.3.1.1.	Agentes Terapêuticos.....	33
3.3.1.1.1.	Antibióticos derivados de Poliamidas Polipirrole.....	33
3.3.1.1.2.	Antibióticos antineoplásticos derivados das bactérias Streptomyces	35
3.3.1.1.3.	Diamidinas aromáticas	36
3.3.1.1.4.	Alcalóides Isoquinolinos	38
3.3.1.1.5.	Outros tipos de antibióticos	40
3.3.1.2.	Agentes não terapêuticos	40
3.3.1.2.1.	Azul-de-metileno.....	40
3.3.1.2.2.	Brometo de Etídio.....	41
3.3.1.2.3.	Laranja de Tiazole	41
3.3.2.	Técnicas usadas para avaliar a afinidade da ligação entre ligandos e o DNA	42
3.3.2.1.	Titulação fluorimétrica	43
3.3.2.2.	“Fluorescent intercalator displacement”	44
3.3.2.3.	Outras técnicas.....	47
4.	OBJECTIVO.....	48
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	49
5.1.	Material biológico.....	49
5.2.	Reagentes.....	49

5.3.	Material e Equipamentos	51
5.4.	Soluções, Meios de Cultura e Géis.....	53
5.4.1.	Soluções	53
5.4.1.1.	Solução de KH_2PO_4 170 mM + K_2HPO_4 720 mM.....	53
5.4.1.2.	Tampão de Reutilização das Colunas Qiagen®	53
5.4.1.3.	Tampão de ressuspensão Tris-HCl 10 mM pH=8,0.....	54
5.4.1.4.	Tampão de migração TAE 1x, pH=8,0 (Pré-Preparado)	54
5.4.1.5.	Gel "Loading Buffer" (Pré-Preparado)	54
5.4.1.6.	Tampão Tris-HCl 0,05 M pH=7,5	54
5.4.1.7.	Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl XM pH=7,5	54
5.4.1.7.1.	Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,25 M pH=7,5	54
5.4.1.7.2.	Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,5 M pH=7,5	55
5.4.1.7.3.	Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,75 M pH=7,5	55
5.4.1.7.4.	Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 1,0 M pH=7,5	55
5.4.1.7.5.	Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 1,25 M pH=7,5	55
5.4.1.7.6.	Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 1,5 M pH=7,5	55
5.4.1.7.7.	Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 1,75 M pH=7,5	56
5.4.1.7.8.	Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 2,0 M pH=7,5	56
5.4.1.7.9.	Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 2,5 M pH=7,5	56
5.4.1.7.10.	Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 3,0 M pH=7,5	56
5.4.1.7.11.	Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 3,5 M pH=7,5	56
5.4.1.7.12.	Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 4,0 M pH=7,5	57
5.4.1.8.	Tampão Tris-HCl 0,05 M + $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ 2,25 M pH=7,5	57
5.4.1.9.	Soluções de Brometo de Etídio (BrEt)	57
5.4.1.9.1.	Solução A – Solução de BrEt 0,3 mM.....	57
5.4.1.9.2.	Solução B – Solução de BrEt 3,0 μM	57
5.4.1.10.	Soluções de DNA plasmídico	58
5.4.1.10.1.	Solução C – Solução de pDNA 3,0 mM.....	58
5.4.1.10.2.	Solução D – Solução de pDNA 30 μM	58
5.4.1.10.3.	Solução de pDNA 300 $\mu\text{g/ml}$	58
5.4.1.11.	Soluções de ligandos/Antibióticos (Solução E)	58
5.4.1.11.1.	Solução de cloreto de Berberina 1,0 mM.....	58
5.4.1.11.2.	Solução de Trissulfato de Neomicina 100 mM	59
5.4.1.12.	Solução de HCl 5%	59
5.4.1.13.	Solução de HCl 15%	59
5.4.1.14.	Solução de HCl 6N	59
5.4.1.15.	Solução de HCl 0,01 M.....	59
5.4.1.16.	Solução de NaOH 2N.....	59
5.4.1.17.	Solução de NaOH 1,0 M	59
5.4.1.18.	Solução de NaOH 0,6 M + 2 mg de borohidreto de sódio por ml	60
5.4.1.19.	Solução de NaOH 0,1 M	60
5.4.1.20.	Solução de eluição para Cromatografia de Camada Fina: Clorofórmio + Metanol 20%.....	60

5.4.1.21.	Solução de Ácido Fórmico 70%	60
5.4.1.22.	Solução de tiosulfato de sódio 1,3 M	60
5.4.1.23.	Solução de etanol 20%	60
5.4.1.24.	Solução de ligando (Berberina hidrolizada) 10 mg/ml	60
5.4.1.25.	Solução de cloreto de Berberina 5 mg/ml	61
5.4.2.	Meios de Cultura	61
5.4.2.1.	Meio sólido LB (Luria-Bertani) – Agar 35g/l + Kanamicina 30µg/ml .	61
5.4.2.2.	Meio líquido TB (“Terrific Broth”).....	61
5.4.3.	Géis	61
5.4.3.1.	Gel de Agarose a 1% + BrEt 0,5 µg/ml.....	61
5.5.	Fermentação Celular	62
5.5.1.	Pré-Fermentação.....	62
5.5.2.	Fermentação	63
5.6.	Reutilização das Colunas de Purificação Qiagen®	63
5.7.	Lise Alcalina e purificação do Plasmídeo	63
5.8.	Electroforese em Gel de Agarose	65
5.9.	Determinação das Constantes de Ligação entre Ligandos e pDNA.....	65
5.9.1.	Determinação do comprimento de onda de emissão máximo para o BrEt.....	65
5.9.2.	Determinação do parâmetro k_f	66
5.9.3.	Determinação do parâmetro k_b	66
5.9.4.	Determinação dos parâmetros de ligação entre o BrEt e o pDNA.....	66
5.9.5.	Determinação dos parâmetros de ligação entre o pDNA e o ligando.....	67
5.10.	Imobilização do ligando ao suporte cromatográfico.....	68
5.10.1.	Clivagem da ligação acetal (grupo metilenodioxido) da berberina.....	68
5.10.1.1.	Abordagem 1 – Clivagem com HCl 5%	68
5.10.1.2.	Abordagem 2 – Clivagem com HCl 15%	69
5.10.1.3.	Abordagem 3 – Clivagem com PCl ₅ como activador	69
5.10.1.4.	Abordagem 4 – Clivagem com NaOH 2N.....	70
5.10.1.5.	Abordagem 5 – Clivagem com HCl 6N	71
5.10.1.6.	Abordagem 6 – Clivagem com Ácido Fórmico 70%	71
5.10.1.7.	Abordagem 7 – Clivagem com AlCl ₃ como activador	72
5.10.2.	Preparação do Suporte Cromatográfico Epóxi – (CH ₂) ₄ – Sepharose™	73
5.10.3.	Determinação quantitativa dos grupos epóxido do gel Epóxi – (CH ₂) ₄ – Sepharose™.....	73
5.10.4.	Imobilização do ligando ao gel Epóxi – (CH ₂) ₄ – Sepharose™	74
5.10.5.	Inactivação dos grupos epóxido livres.....	75
5.11.	Cromatografia de Camada Fina	75
5.12.	Preparação das amostras para construção do espectro de RMN ¹ H.....	76
5.13.	Espectros de Infravermelho (IV)	76
5.14.	Espectros UV/Visível	76
5.15.	Cromatografia de Afinidade no sistema FPLC®	76
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78

6.1.	Produção e purificação do DNA plasmídico	78
6.2.	Seleção positiva do DNA plasmídico	79
6.3.	Electroforese de controlo.....	79
6.4.	Constantes de ligação entre ligandos e pDNA	80
6.4.1.	Cálculo dos parâmetros necessários para determinar as constantes de ligação	80
6.4.1.1.	Determinação do parâmetro k_f	81
6.4.1.2.	Determinação do parâmetro k_b	82
6.4.1.3.	Determinação dos parâmetros de ligação entre o BrEt e o pDNA.....	83
6.4.1.4.	Determinação dos parâmetros para as diferentes concentrações de NaCl.....	84
6.4.2.	Determinação das constantes de ligação entre o pDNA e a neomicina	87
6.4.2.1.	Determinação dos parâmetros de ligação entre o pDNA e a neomicina	87
6.4.2.1.1.	Na presença de 75 μ L de neomicina 100 mM	87
6.4.2.1.2.	Na presença de 150 μ L de neomicina 100 mM	88
6.4.2.1.3.	Na presença de 225 μ L de neomicina 100 mM	89
6.4.2.1.4.	Na presença de 300 μ L de neomicina 100 mM	91
6.4.2.1.5.	Na presença de 375 μ L de neomicina 100 mM	92
6.4.2.2.	Determinação da constante de ligação.....	93
6.4.2.3.	Valores da constante de ligação da neomicina ao pDNA, obtidos em todos os ensaios e para todas as concentrações de NaCl.....	94
6.4.3.	Determinação das constantes de ligação entre o pDNA e a berberina.....	97
6.4.3.1.	Determinação dos parâmetros de ligação entre o pDNA e a berberina	97
6.4.3.1.1.	Na presença de 75 μ L de berberina 1 mM.....	97
6.4.3.1.2.	Na presença de 150 μ L de berberina 1 mM.....	98
6.4.3.1.3.	Na presença de 225 μ L de berberina 1 mM.....	99
6.4.3.1.4.	Na presença de 300 μ L de berberina 1 mM.....	101
6.4.3.1.5.	Na presença de 375 μ L de berberina 1 mM.....	102
6.4.3.2.	Determinação da constante de ligação.....	103
6.4.3.3.	Valores da constante de ligação da berberina ao pDNA, obtidos em todos os ensaios e para todas as concentrações de NaCl.....	104
6.4.4.	Comparação dos resultados obtidos para a neomicina e a berberina	107
6.5.	Imobilização do ligando à coluna de purificação	108
6.5.1.	Clivagem da ligação acetal da berberina	108
6.5.1.1.	Abordagem 1 – Clivagem com HCl 5%	110
6.5.1.2.	Abordagem 2 – Clivagem com HCl 15%	111
6.5.1.3.	Abordagem 3 – Clivagem com PCl_5 como activador	112
6.5.1.4.	Abordagem 4 – Clivagem com NaOH 2N	112
6.5.1.5.	Abordagem 5 – Clivagem com HCl 6N	112
6.5.1.6.	Abordagem 6 – Clivagem com Ácido Fórmico 70%	113
6.5.1.7.	Abordagem 7 – Clivagem com $AlCl_3$ como activador	113

6.5.2.	Suporte Cromatográfico Epóxi – (CH ₂) ₄ – Sepharose™ e determinação quantitativa dos grupos epóxido do gel	117
6.5.3.	Imobilização do ligando ao gel Epóxi – (CH ₂) ₄ – Sepharose™	117
6.6.	Cromatografia de Afinidade.....	118
6.6.1.	Ensaio na ausência de sal	118
6.6.2.	Ensaio com cloreto de sódio 0,25 M.....	119
6.6.3.	Ensaio com cloreto de sódio 0,5 M.....	120
6.6.4.	Ensaio com cloreto de sódio 0,75 M.....	121
6.6.5.	Ensaio com cloreto de sódio 1,0 M.....	122
6.6.6.	Ensaio com cloreto de sódio 1,25 M.....	122
6.6.7.	Ensaio com cloreto de sódio 1,5 M.....	123
6.6.8.	Ensaio com cloreto de sódio 1,75 M.....	124
6.6.9.	Ensaio com cloreto de sódio 2,0 M.....	125
6.6.10.	Ensaio com sulfato de amônio 2,25 M.....	125
6.7.	Análise das espécies eluídas por electroforese	127
7.	CONCLUSÕES	129
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	131
9.	APÊNDICES.....	132
9.1.	Plasmídeo pVAX1-LacZ	132
9.2.	Marcador de Pesos Moleculares.....	132
9.3.	Valores obtidos para todos os ensaios do ponto 6.3.....	133
9.4.	Espectros obtidos para o cloreto de berberina	135
9.4.1.	Espectro UV/Visível	135
9.4.2.	Espectro IV	135
9.4.3.	Espectro de RMN ¹ H.....	136
9.5.	Espectros do produto obtido segundo a abordagem 1	137
9.5.1.	Espectro IV	137
9.5.2.	Espectro RMN ¹ H	138
9.6.	Espectros do produto obtido segundo a abordagem 7	139
9.6.1.	Espectro UV/Visível	139
9.6.2.	Espectro IV	139
9.6.3.	Espectro RMN ¹ H	140
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
11.	REFERÊNCIAS CIBERGRÁFICAS	148

1. LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Designação
AT	Adenina – Timina
BrEt	Brometo de Etídeo
CCF	Cromatografia em Camada Fina
DAPI	4',6 – diamidino – 2 – fenilindol
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, Desoxirribonucleic Acid)
FID	Do inglês, Fluorescent Intercalator Displacement
FPLC	Do inglês, Fast Protein Liquid Chromatography
GC	Guanina – Citosina
GFP	Do inglês, Green Fluorescent Proteín
His6	Fragmento com 6 resíduos de histidina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, Human Immunodeficiency Virus)
If	Intensidade de fluorescência
IMAC	Cromatografia de Afinidade por Imobilização de Metal (do inglês, Immobilized Metal Affinity Chromatography)
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Kb	Mil pares de bases, kilo bases
LT	Laranja de Tiazole
mRNA	RNA mensageiro
MS-ESI	Do inglês, Mass Spectrometry-Electrospray Ionization
pb	Pares de bases
pDNA	DNA plasmídico
PEG	Polietilenoglicol
PEI	Polietilenimina
ppm	Partes por milhão
PVP	Polivinilpirrolidona
R _f	Factor de retardação (do inglês, Retardation factor)

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês, Ribonucleic Acid)
RNase	Ribonuclease A
RPBS	Ressonância Plasmática com Biossensor de Superfície
rpm	Rotações por minuto
SDFA	Sistemas de Duas Fases Aquosas
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
TG	Terapia Génica
TGH	Terapia Génica Humana
u.a.	Unidades arbitrárias
UV	Ultravioleta
WCB	Banco de Células (do inglês, Working Cell Bank)
δ	Desvio químico
Δ	Refluxo
η	Rendimento
λ	Comprimento de onda

2. RESUMO

As Terapias Moleculares, como a Terapia Génica e as Vacinas de DNA, estão a criar um aumento da procura de grandes quantidades de DNA plasmídico (pDNA) puro. Apesar de já estarem disponíveis vários métodos, baseados em protocolos da biologia molecular, para a purificação de plasmídeos, a grande maioria não são apropriados para o uso em larga escala. Para além disso, esses protocolos usam com frequência reagentes tóxicos, os quais impedem a sua utilização para a purificação de produtos terapêuticos.

Já os métodos baseados na afinidade usados até agora, parecem ser bastante promissores, contudo a maior parte faz uso de macrobiomoléculas de preços elevados, que impedem a sua utilização extensiva.

Sabe-se que são várias as moléculas que ligam ao DNA com uma especificidade elevada, como certos antibióticos e agentes anticancerígenos. É o caso das moléculas focadas neste estudo: a neomicina e a berberina. Desta forma, estes ligandos representam uma boa alternativa para a aplicação a protocolos de purificação por afinidade.

Tendo esse objectivo em mente, as afinidades de ligação entre as moléculas acima mencionadas e um pDNA modelo (pVax1LacZ), foram avaliadas, recorrendo à técnica de titulação fluorimétrica desenvolvida por Strothkamp. A titulação do pDNA com brometo de etídio (BrEt) foi seguida através da intensidade de fluorescência, na ausência e presença de diferentes concentrações dos ligandos em estudo. Aos dados obtidos foi aplicado o método de Scatchard, para assim se determinar o efeito de cada um dos compostos na ligação do BrEt ao pDNA. As constantes de ligação de cada composto foram depois calculadas para diferentes concentrações de cloreto de sódio. Os resultados obtidos mostram que o antibiótico que apresenta a constante de afinidade mais elevada é a berberina, a uma concentração de cloreto de sódio 1,0 M, podendo assim ser um ligando promissor para a purificação de pDNA por afinidade.

O suporte escolhido para os ensaios de cromatografia de afinidade foi o Epóxi – (CH₂)₄ – Sepharose™, contudo a berberina não contém grupos hidroxílicos funcionais para poder ser directamente imobilizada. Desta forma, foram realizados estudos visando a clivagem do seu grupo metilenodióxido para a obtenção de um catecol, alcançando-se os melhores resultados através do uso de tricloreto de alumínio, como activador. Porém, em vez de um único composto, foi obtida uma mistura de quatro produtos, derivados da hidrólise dos grupos metóxido. Ainda assim, procedeu-se à imobilização da mistura ao suporte e analisou-se a interacção do gel obtido com o pDNA. Estudou-se também a influência da concentração de sal no perfil cromatográfico. Os resultados obtidos mostram que, para todas as concentrações de sal, a amostra foi imediatamente eluída após a injeção, sem qualquer retenção na coluna. Este pode ter sido consequência de uma possível baixa densidade de ligandos na coluna ou ao facto da constante de afinidade calculada não representar a verdadeira afinidade existente entre a berberina e o pDNA. O facto de a derivatização ter sido realizada com quatro compostos diferentes, pode também ter sido responsável pela má retenção.

Uma vez que esta foi a primeira vez que um antibiótico foi usado como ligando para a purificação de pDNA, criou-se um campo de investigação promissor e pouco explorado, que poderá melhorar e simplificar os protocolos já existentes, para além de, num futuro próximo, poder ser usado para implementar esta abordagem cromatográfica à purificação, em larga escala, de vectores plasmídicos para serem usados nas terapias moleculares.

Palavras – chave: cromatografia de afinidade; DNA plasmidico; berberina; neomicina; ligandos de afinidade

ABSTRACT

Molecular therapies such as gene therapy and DNA vaccines are creating an increasing demand for high quantities of purified plasmids. Although several methods based on molecular biology protocols are available for the purification of plasmids, most of them are not suitable to use in large scale. In addition they frequently use toxic reagents, which prevent their utilization for the purification of therapeutic products.

Affinity methods appear to be very promising but currently most of them use expensive macromolecular biomolecules which prevent their wide application.

It is known that several molecules, like certain antibiotics and anticancer agents, bind DNA with high specificity, molecules like the ones focused on this study: neomycin and berberine. In this way, these ligands represent a good choice for the application on affinity purification procedures.

For this purpose, the binding affinities of the aboved-described DNA interacting compounds, to a model plasmid DNA (pVax1LacZ), were evaluated using the fluorimetric titration technique developed by Strothkamp. Titration of pDNA with ethidium bromide was followed by fluorescence intensity in the absence and presence of different concentrations of the compounds under study. From this data the Scatchard plot was employed to determine the effect of each compound in ethidium bromide binding. Affinity constants for each compound were then calculated for different sodium chloride concentrations. The results showed that berberine has the highest pDNA binding constant, using 1,0 M sodium chloride concentration, thus being a promising ligand for pDNA affinity purification.

The chosen support for the affinity chromatography assays was the Epóxi – (CH₂)₄ – Sepharose™, since berberine does not have any hydroxilic group to be directly immobilised. In this way, studies to cleave the metilenodioxy group of berberine were performed and a catechol was obtained using aluminium chloride as a catalyzer. However, instead of a single compound, it was obtained a mixture of four different catechols, were the metoxy groups of berberine were also hydrolysed. However, the immobilization of the mixture compounds was performed and the interation between pDNA and the obtained chromatographic gel was analysed. The influence of the mobile phase composition on the chromatographic behaviour was also studied. The

experimental chromatographic results showed an immediate elution of the sample after injection, without any retention on the column, for all salt concentrations tested. This may be due to a possible low ligand density in the column or the affinity constant calculated doesn't represent the real affinity between berberine and pDNA. The fact that de derivatization was made with four different molecules may also be responsible for the poor retention.

Since it was the first time that an antibiotic was used for pDNA purification, it opened a promising unexplored field that could be able to improve and simplify currently available protocols and could, in the near future, be used to implement this chromatographic approach in the large scale purification of plasmids vectors for molecular therapies.

Keywords: affinity chromatography; plasmid DNA; berberine; neomycin; affinity ligands

3. INTRODUÇÃO

3.1. Terapias Moleculares

Em finais dos anos 70 e início de 80, a subclonagem de genes de mamíferos em plasmídeos procariotas e bacteriófagos, abriu as portas a técnicas baseadas na tecnologia de DNA recombinante e de clonagem genética (Flotte, 2007). Este facto, assim como o aumento da quantidade e qualidade dos dados genómicos surgidos durante a década de 90, contribuíram para definir alguns factores genéticos causadores de patologias, bem como, para explorar o potencial de novas terapias, baseadas na engenharia genética (Rubanyi, 2001).

A conclusão do Projecto do Genoma Humano (McIlwain, 2000), abriu caminho para uma melhor compreensão das doenças genéticas. Uma grande variedade de genes, com capacidade de corrigir fenótipos de doença, têm vindo a ser identificados, para ser agora possível produzir DNA manipulado, com capacidade de transportar um gene terapêutico em quantidades suficientes para ensaios clínicos (Li e Ma, 2001).

Neste momento, é teoricamente possível tratar doenças de origem genética, seja por administração de cópias “saudáveis” dos genes mutados ou promovendo uma resposta imunitária, pela administração de genes que codificam antigénios específicos (Brown *et al*, 2001). O uso prático destes conhecimentos depende da capacidade em manipular e substituir os genes defeituosos, ou em inserir outros que codifiquem a proteína correcta (Thomas e Klibanov, 2003).

Nesta perspectiva, as Terapias Moleculares como a Terapia Génica (TG) e as Vacinas de DNA têm, de forma crescente, sido estabelecidas como alternativas promissoras aos tratamentos clássicos (Pfeifer e Verma, 2001).

3.1.1. Terapia Génica

A Terapia Génica Humana (TGH) é uma das novas abordagens terapêuticas que emergiram da revolução da Biologia Molecular e da Biotecnologia, há cerca de uma década (Rubanyi, 2001; Stribley *et al*, 2002).

A TGH tem-se destacado no campo da medicina e ciências farmacêuticas (Park *et al*, 2006), primariamente devido ao facto de ter como objectivo, tratar ou eliminar a causa da doença e não os sintomas (Mountain, 2000).

Os objectivos da TGH são alcançados utilizando os genes como agentes terapêuticos, através da introdução de genes exógenos, segmentos de gene ou oligonucleótidos, nas células alvo afectadas pela patologia (Thomas e Klibanov, 2003). O organismo ou tecido receptor adquire a capacidade de, ele próprio, sintetizar o agente terapêutico, utilizando a informação cedida (Rome *et al*, 2007). O objectivo é reparar o genoma, substituindo a região defeituosa pela correcta, introduzindo novos genes ou modificando a expressão dos existentes (van Gaal *et al*, 2006).

A TGH representa uma forma inovadora de entrega de agentes terapêuticos, fazendo, para esse fim, uso dos avanços técnicos e científicos da microbiologia, virologia, química orgânica, biologia molecular e celular, bioquímica, genética e engenharia genética, entre outros (Rubanyi, 2001).

Comparando-a com outras formas de terapia, a TGH origina efeitos biológicos mais duradouros e um tratamento selectivo, nas células e tecidos afectados. Desta forma, poderão ser verificados melhoramentos substanciais no rácio terapêutico e na taxa de cura de doenças que, neste momento, não são tratáveis ou são de difícil tratamento.

A terapia Génica (TG) tem também a importante vantagem de ser uma tecnologia abrangente, aplicável a uma vasta miríade de patologias (Mountain, 2000; Rubanyi, 2001). São exemplo disso, desordens autossómicas recessivas de um só gene, desordens autossómicas dominantes, várias formas de cancro, SIDA e outras doenças infecciosas, condições inflamatórias e dor intratável (Flotte, 2007).

A TG consiste em múltiplos e complexos processos biológicos que ocorrem no organismo, simplificados na figura 1.

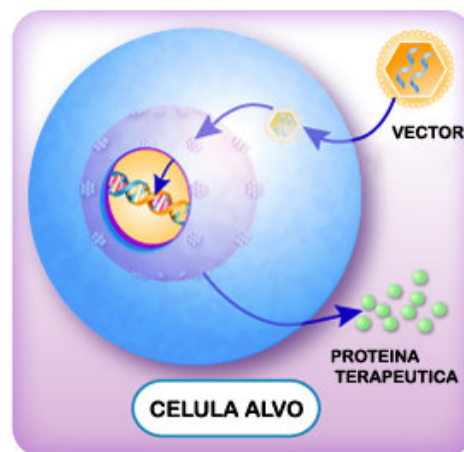


Fig. 1 – Pontos principais no mecanismo da TG
(Adaptado de <http://www.thejcdp.com/issue027/karthideyan/03karthikeyan.htm>)

O processo tem início com a introdução de um vector apropriado (viral, não viral, baseado em células ou sintético) que transporta o transgene para o organismo, a nível local (injecção directa no tecido) ou para a corrente sanguínea (entrega sistémica). O vector necessita depois de “encontrar” o tecido alvo, entrar nas células e atravessar o citoplasma, para alcançar e entrar no núcleo. Uma vez aí, o transgene terapêutico é transcrito e o mRNA resultante traduzido, originando a proteína terapêutica. Esta pode apenas substituir uma proteína deficiente ou actuar num receptor (ou receptores), seja na própria célula que a produziu (mecanismo autócrino), em células vizinhas (mecanismo parácrino) ou em locais mais afastados, depois de entrar na corrente sanguínea (mecanismo endócrino). Por fim, após interagir com o seu receptor, a

proteína induz um efeito biológico apropriado, desencadeando os benefícios terapêuticos (Rubanyi, 2001).

Existem duas formas distintas de TG, a TG Somática e a TG Germinativa, contudo, nos dias de hoje, a mais comum é a Somática. Esta envolve a introdução e expressão de genes recombinantes em células somáticas, com o objectivo de melhorar os efeitos da doença. A TG Somática é determinada pela adição de sequências de DNA essenciais ou terapêuticas, em vez de reparar ou remover os genes defeituosos (Stribley *et al*, 2002).

Em contraste, a TG Germinativa, afecta as células reprodutivas e tem como objectivo eliminar a doença. A TG Somática afecta uma única geração, enquanto que a TG Germinativa afecta as gerações seguintes (Stribley *et al*, 2002).

A TG Germinativa tem sido aplicada com sucesso em plantas e outros animais, contudo questões éticas, têm impedido a sua aplicação em pacientes humanos (Stribley *et al*, 2002).

3.1.1.1. Estratégias para a Terapia Génica

Devido à imensa diversidade de doenças, é necessário que exista uma igual diversidade de estratégias para a TG, pois não é possível aplicar um único protocolo a todas as doenças (Stribley *et al*, 2002).

Uma vez que a TG pode ser usada para tratar defeitos genéticos, incluindo erros de metabolismo congénitos, cancro ou uma infecção viral, na qual é indicada uma causa genética, os mecanismos da doença e células alvo devem ser explorados antes de se estabelecer um protocolo (Stribley *et al*, 2002).

Os benefícios requeridos pela TG podem variar segundo o resultado final desejado e tendo este em conta, os protocolos da TG podem ser classificados de correctivos ou citotóxicos (Stribley *et al*, 2002). As diferenças entre ambos estão resumidas na tabela I.

Tabela I – Estratégias para a TG (Adaptado de Stribley *et al*, 2002)

Característica	TG Correctiva	TG Citotóxica ou “Suicida”
Definição	Correcção de um defeito genético nas células alvo	Destruição das células alvo
Objectivo	Transferir os genes directamente para as células alvo, para corrigir o defeito genético	Transferir os genes para as células alvo, os quais iniciam a destruição celular
Patologias sob investigação	Doenças associadas a um único gene, incluindo síndromas de imunodeficiência, fibrose cística e distrofia muscular Tumores malignos como o carcinoma ovarino	Tumores malignos como o cancro da mama e dos ovários e o carcinoma do endométrio

*

Para a implementação de um protocolo de TG, devem ter-se em conta duas estratégias possíveis de administração genética, a transferência *in vivo* e *ex vivo* (Mountain, 2000; Stribley *et al*, 2002).

Na tabela II estão resumidas algumas características destes dois tipos de transferência.

Tabela II – Estratégias para administração genética na TG (Adaptado de Stribley *et al*, 2002)

Característica	TG <i>in vivo</i>	TG <i>ex vivo</i>
Definição	Administração directa do gene ou vector no órgão alvo ou no paciente	Colheita e cultura das células dos pacientes com transferência <i>in vitro</i> e reintrodução das células transfectadas
Células alvo	Pode ser aplicada a todo o tipo de células	Linfócitos, células da medula óssea, hepatócitos, células estaminais do cordão umbilical, tumores e fibroblastos da pele
Patologias sob investigação	Desordens genéticas associadas a um só gene, doença coronária arterial, tumores malignos	Imunodeficiências severas, hemoglobinopatias, displasia cervical e tumores malignos
Vantagens	Com os vectores apropriados é atingida uma expressão genética estável	A baixa eficiência de transfecção é ultrapassada com grandes volumes de vector e exposição prolongada
Desvantagens	Baixa eficiência de transfecção Dificuldades na transferência do gene para as células alvo Preocupações relacionadas com a segurança dos vectores Possível transfecção de células que não as alvo	Expressão instável do transgene Possível rejeição celular

A transferência *in vivo* envolve a administração directa do vector que contém o transgene, no órgão ou células do doente. Assim sendo, não é específica para um paciente e a integração permanente do gene recombinante pode não ocorrer ou não ser a desejável, observando-se expressão dos produtos do gene até as sequências serem degradadas e eliminadas das células. Tem, contudo, algumas vantagens, como o baixo custo, boa logística e possibilidade de ser realizada em infra-estruturas reduzidas (Mountain, 2000; Stribley *et al*, 2002).

A abordagem *in vivo* é, normalmente, a única opção viável para o tratamento de tecidos, para os quais as células individuais não possam ser cultivadas em quantidades suficientes, ou a cultura de células não possa ser reimplantada (Thomas e Klibanov, 2003).

A abordagem *ex vivo* envolve a colheita e cultura de células de pacientes, após biopsia cirúrgica. As células são depois cultivadas *in vitro*, para que se dê uma transferência genética eficiente. Finalmente, as células são seleccionadas, expandidas e reintroduzidas no paciente. Para evitar rejeição pelo sistema imunitário do hospedeiro, são sempre usadas células retiradas do mesmo paciente (Stribley *et al*, 2002; Thomas e Klibanov, 2003).

A eficiência da administração *ex vivo* depende de uma introdução permanente dos genes recombinantes nas células alvo, o que por sua vez, origina uma expressão permanente do produto do agente terapêutico (Stribley *et al*, 2002).

Esta abordagem oferece a vantagem de uma transferência genética mais eficiente e a possibilidade de propagação celular, para assim gerar doses celulares superiores. Contudo, apresenta algumas desvantagens importantes, como o facto de ser específica para um único paciente, e ter custos elevados, uma vez que, a manipulação celular aumenta as dificuldades de manufactura e de controlo de qualidade (Mountain, 2000).

A figura 2 demonstra de forma simples o mecanismo das diferentes estratégias da TG.

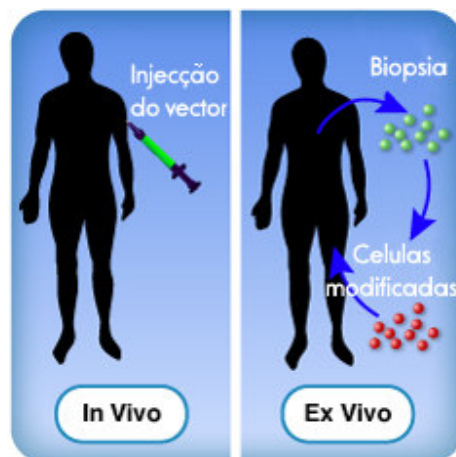


Fig. 2 – Mecanismo das estratégias *in vivo* e *ex vivo*
(Adaptado de <http://www.thejcdp.com/issue027/karthideyan/03karthikeyan.htm>)

3.1.1.2. Sistemas de Transferência Genética

O principal objectivo da TG é desenvolver um método que transporte o transgene de forma eficiente e selectiva, e com um mínimo de toxicidade, até às células alvo, onde será alcançada uma expressão genética apropriada (Li e Huang, 2000; Gao *et al*, 2007).

De um modo geral, um vector deve obedecer a algumas condições, nomeadamente, ser seguro, estável, fácil de produzir em grandes quantidades e, quando administrado *in vivo*, ser capaz de alcançar uma expressão genética eficiente e específica (Li e Ma, 2001). Contudo, são três os critérios a seguir na escolha do vector ideal: a) deve proteger o transgene contra a degradação pelas nucleases, na matriz intercelular, b) deve transportar o transgene através da membrana plasmática, para o núcleo das células alvo e c) não deve ter qualquer efeito prejudicial (Gao *et al*, 2007).

Tendo em conta a importância do veículo, grande parte da investigação relacionada com a TG foca a construção de vectores. Ainda assim, os vectores mais comuns debatem-se com uma falta de especificidade para as células alvo, nas abordagens *in vivo*, com uma expressão a longo prazo ineficiente e baixos rácios de transferência e expressão. Para além disso, deve ainda ser considerada a capacidade do vector em “empacotar” os genes de tamanho considerável e a imunogenicidade deste (Stribley *et al*, 2002).

Desta forma, um sistema de transporte ideal para a TG deverá ser injectável, ter alvos específicos *in vivo*, ser regulável, ter capacidade para manter a expressão a longo prazo e não ser imunogénico (Stribley *et al*, 2002).

*

Existem três tipos principais de vectores: virais, não virais e híbridos.

Uma grande variedade de vírus está a ser adaptada a vectores, mas os mais avançados são os retrovírus, adenovírus e os vírus adeno-associados. Está também a ser feito um grande esforço para desenvolver vacinas, a partir dos poxvírus e herpes simplex vírus (Mountain, 2000).

Uma vez que os vírus desenvolveram mecanismos extremamente eficientes e especializados para inserir o seu material genético no das células hospedeiras, as abordagens baseadas nestas estruturas são especialmente eficientes em transferir os genes terapêuticos e em permitir uma expressão a longo prazo (Johnson-Saliba e Jans, 2001; Gao *et al*, 2007).

Para poderem ser utilizados como vectores, parte das sequências codificadoras dos vírus são substituídas pelas dos genes terapêuticos (Li e Ma, 2001). Contudo, estes vectores podem desencadear uma resposta imunitária aguda, neutralizando o vírus e destruindo o DNA terapêutico (Johnson-Saliba e Jans, 2001). Para além disso, a possibilidade de activação de oncogenes, revelada em alguns ensaios clínicos da TG, levantam questões de segurança relativamente à utilização de vectores virais. As limitações no tamanho do transgene, que os vírus recombinantes podem transportar, e questões

relacionadas com a sua produção, levaram à substituição dos vectores virais por abordagens alternativas (Gao *et al*, 2007). É o caso das abordagens não virais, que incluem métodos físicos de transferência de “naked DNA” e o uso de veículos químicos como os polímeros, lípidos, detergentes, e tecnologias baseadas em péptidos (van Gaal *et al*, 2006).

Os vectores não virais apresentam vantagens em termos de simplicidade de uso, facilidade de produção em larga escala, com baixo custo, e inexistência de respostas imunitárias específicas (Niidome e Huang, 2002). Para além disso, os vectores não virais não têm limitação no tamanho do DNA a transportar e podem ser ligados a compostos específicos, dirigindo selectivamente o vector para tecidos ou células alvo (Park *et al*, 2006).

Ainda que tenha sido alcançado um progresso significativo na ciência básica e aplicações de vários sistemas não virais, a maioria dessas abordagens é ainda menos eficiente que os vectores virais, especialmente na TG *in vivo* (Gao *et al*, 2007).

Os vectores híbridos ou quiméricos são uma possibilidade promissora para a transferência genética artificial. Estes vectores podem ser agrupados em duas categorias: a primeira corresponde a uma composição única com componentes dos dois sistemas, viral e não viral, especificamente, uma incorporação de proteínas da cápside viral em lipossomas, formando os virossomas; a segunda categoria envolve a preparação de cada vector separadamente, combinando-os no momento da sua utilização, como é o caso da mistura de lipoplexos ou poliplexos, com vectores adenovirais ou vírus inactivos (Li e Ma, 2001).

*

Nos dias de hoje, não existe um vector único que encerre em si todas as características desejáveis e cada tipo tem as suas vantagens e desvantagens. Aumentar a eficiência e especificidade dos vectores não virais, através da introdução, por meios químicos, de elementos estruturais presentes nos vírus, é uma estratégia atractiva para o futuro (Thomas e Klibanov, 2003).

3.1.1.2.1. Vectores não virais

Recentemente, têm sido desenvolvidas novas abordagens para vectores não virais, que se aproximam aos virais no que respeita à eficiência de transferência e expressão (Li e Ma, 2001).

A base dos sistemas não virais é o DNA plasmídico (pDNA), que pode ser utilizado livre, complexado com lípidos ou com polímeros. Desta forma, estes sistemas consistem, geralmente, em quatro categorias: i) uso de “naked DNA” por métodos físicos, ii) vectores baseados em lípidos, como é o caso de lípidos catiónicos rearranjados em lipossomas e complexados com DNA (lipoplexos), iii) vectores baseados em polímeros, que correspondem a polímeros catiónicos complexados com DNA (poliplexos) ou vesículas poliméricas complexadas com DNA e iv) uma

combinação de lípidos e polímeros catiónicos, complexados com DNA (lipopolíplexos) (Brown *et al*, 2001; Park *et al*, 2006).

O DNA plasmídico pode também sofrer complexação com partículas de metais pesados, como o ouro, para ser depois introduzido no interior das células, por métodos físicos (Johnson-Saliba e Jans, 2001). Mais recentemente surgiram os cromossomas artificiais, como nova abordagem de vector não viral (Stribley *et al*, 2002).

Ainda que grande parte dos estudos sobre TG não viral foquem a optimização do vector e os seus mecanismos de entrada nas células, não tem sido dada a devida atenção ao plasmídeo ou à fracção DNA do vector. A optimização do plasmídeo pode originar níveis prolongados de expressão e portanto, desempenhar um papel importante na compensação no que respeita à eficiência de transfecção (van Gaal *et al*, 2006).

*

As vantagens e limitações de cada método não viral estão sumariadas na tabela III.

Tabela III – Vantagens e limitações das abordagens não virais (Adaptado de Gao *et al*, 2007)

Método	Via da transferência genética	Vantagens	Limitações
Injecção	Intratecidular	Segurança e simplicidade	Eficiência baixa
“Gene Gun”	Tópica	Boa eficiência	Danificação do tecido em algumas aplicações
Electroporação	Tópica e intratecidular	Eficiência elevada	Necessidade de um procedimento cirúrgico para as aplicações não tóxicas
Hidrodinâmica	Sistémica e intravascular	Eficiência elevada e simplicidade	Possível necessidade de procedimentos cirúrgicos
Ultrasons	Tópica e sistémica	Bom potencial para transferência local	Baixa eficiência <i>in vivo</i>
Lípidos catiónicos	Tópica, intratecidular, sistémica e pelas vias aéreas	Eficiência elevada <i>in vitro</i>	Actividade <i>in vivo</i> limitada e respostas imunológicas agudas
Polímeros catiónicos	Tópica, intratecidular, sistémica e pelas vias aéreas	Eficiência elevada <i>in vitro</i>	Toxicidade celular e respostas imunológicas agudas
Híbridos de Polímeros /Lípidos	Intratecidular, sistémica e pelas vias aéreas	Baixa toxicidade	Baixa actividade <i>in vivo</i>

É importante referir que, as aplicações terapêuticas dos vectores não virais na TG são limitadas, apesar do progresso na produção de vectores e do estudo da biologia de transfecção. É necessário continuar com o esforço para melhorar os sistemas existentes e para desenvolver novos métodos de transferência genética não viral, mais seguros e eficientes. Para obter um melhor sistema, é essencial identificar os parâmetros críticos limitantes dos sistemas já existentes (Gao *et al*, 2007).

3.2. Preparação de DNA plasmídico

Os rápidos avanços nos campos das vacinas de DNA e da TG, originaram um aumento da exigência de grandes quantidades de DNA plasmídico recombinante (Li *et al*, 2007), uma vez que 25% das abordagens utilizam este tipo de molécula (Hanora *et al*, 2006). Para além disso, a eficiência da transferência genética, baseada em DNA plasmídico, é relativamente baixa (Li *et al*, 2007), já que só um em cada mil moléculas de pDNA, introduzidas nas células, alcançam o núcleo e são expressas. Desta forma, é cada vez mais urgente desenvolver metodologias de produção e purificação do DNA em larga escala (Deshmukh e Lali, 2005).

De um modo geral, o processo de manufactura de DNA plasmídico inclui os seguintes passos (figura 3): construção do plasmídeo, crescimento celular, extracção por lise celular, recuperação primária e vários passos de purificação (Hanora *et al*, 2006; Li *et al*, 2007).

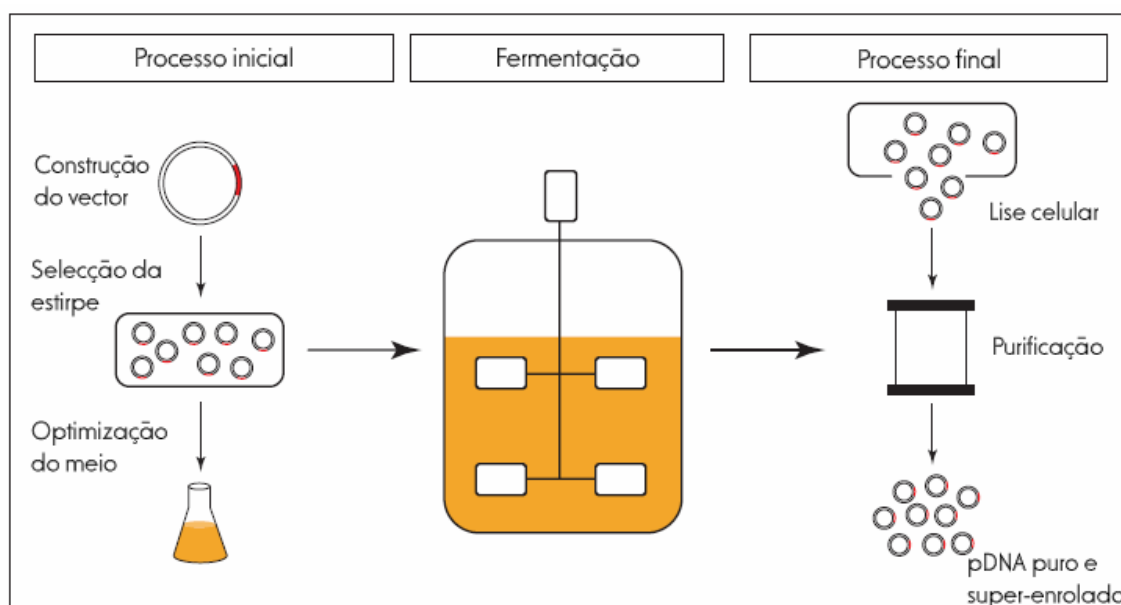


Fig. 3 – Passos no processo de manufactura do pDNA
(Adaptado de Ferreira *et al*, 2000)

Um processo deste tipo deverá ser capaz de produzir o produto aos níveis requeridos de quantidade, pureza, eficiência e segurança (Deshmukh e Lali, 2005).

3.2.1. Produção de DNA plasmídico

Para a produção, em larga escala, de DNA plasmídico para uso terapêutico, há que respeitar três pontos importantes. Em primeiro lugar, a substância terapêutica produzida, deverá ser de alta qualidade e livre de componentes bacterianos contaminantes. Em segundo lugar, o processo deverá produzir quantidades aceitáveis, por volume de cultura, a um preço aceitável. Finalmente, todo o processo deverá respeitar as guias reguladoras específicas para este fim (Urthaler *et al*, 2005a).

Desta forma, as propriedades físico-químicas do pDNA têm um impacto importante nos factores técnicos de produção e na qualidade do produto. A carga dos polinucleótidos é altamente negativa sob condições fisiológicas e devido ao seu tamanho e forma, são muito sensíveis a choques (Urthaler *et al*, 2005a).

Os plasmídeos são moléculas de DNA circular, de dupla cadeia, que correspondem a cerca de 1% do conteúdo total das células bacterianas hospedeiras (Sandberg *et al*, 2004). Os específicos para uso como vectores na TG, têm um tamanho médio de 5 – 10 Kpb, que corresponde a um peso molecular de 3300 – 6600 KDa, e um raio hidrodinâmico de cerca de 150 – 250 nm (Tiainen *et al*, 2007a).

Os plasmídeos existem em três diferentes isoformas, a super-enrolada, a circular aberta e a linear (figura 4).

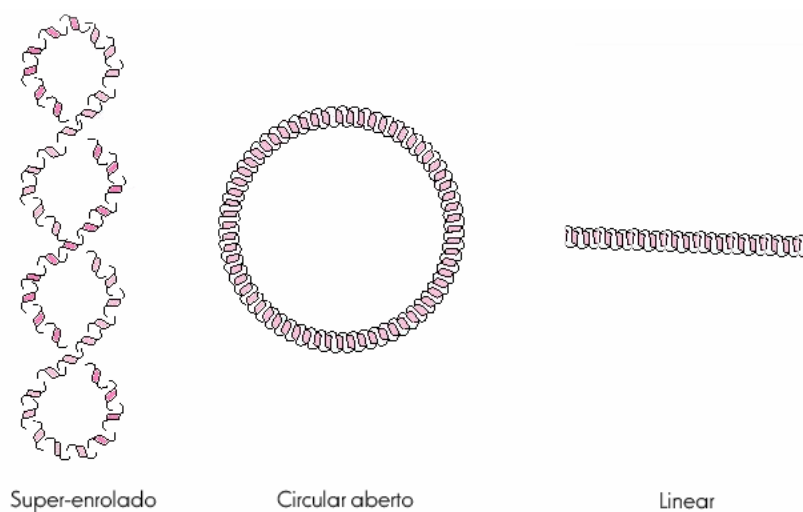


Fig. 4 – Diferentes isoformas do pDNA
(Adaptado de http://darwin.nmsu.edu/~blyons/BCHE_397/DNA_Breakage.htm)

A super-enrolada é considerada a mais apropriada para aplicações terapêuticas, sendo por isso a isoforma ideal. As restantes isoformas de pDNA derivam da primeira, após ruptura de ligações e cadeias (Urthaler *et al*, 2005a).

Comercialmente, os plasmídeos podem ser encontrados numa grande variedade de espécies bacterianas, onde se “comportam” como se se tratassem de unidades

genéticas internas adicionais, replicando-se independentemente do cromossoma bacteriano. Dependem, contudo, das enzimas e proteínas do hospedeiro, para uma transcrição e replicação bem sucedidas (Qiagen, 2001).

Por vezes, os plasmídeos contêm genes que codificam determinadas enzimas, que podem ser vantajosas para a célula hospedeira. Essas enzimas podem estar envolvidas na resistência ou produção de antibióticos, resistência a toxinas do ambiente ou produção de toxinas pela própria bactéria (Qiagen, 2001).

Uma vez purificado, o pDNA pode ser usado numa grande variedade de aplicações como sequenciação, expressão de proteínas, transfecção e TG (Qiagen, 2001). Na figura 5 está representado o mecanismo geral da “vida” de uma destas estruturas, desde a construção, até à administração.

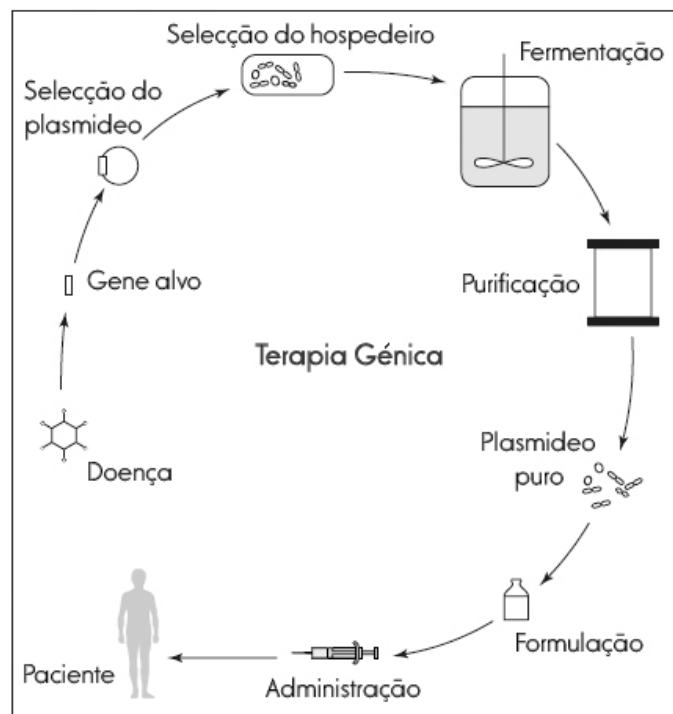


Fig. 5 – Do gene ao paciente: rota do pDNA
(Adaptado de Prazeres *et al*, 1999)

Os plasmídeos usados na área da medicina são então compostos por vários componentes genéticos: ① uma origem de replicação procariota, a qual permite a sua propagação no hospedeiro; ② um promotor eucariota, que controla a expressão da proteína terapêutica; ③ um gene específico, que codifica a proteína terapêutica e ④ um gene de resistência a um antibiótico, que permite uma propagação selectiva nas bactérias (Wang *et al*, 2004). Desta forma, o primeiro passo na construção destas estruturas passa pela introdução de cada um destes componentes genéticos no “esqueleto” plasmídico. Subsequentemente, é estabelecido um banco de células contendo o plasmídeo, para criar um inoculo uniforme para a fermentação (Przybylowski *et al*, 2007).

Estabelecer bancos de células, tanto primários como os “Working Cell Banks” (WCB), é um dos passos críticos na produção do pDNA. Estes são culturas microbiológicas puras, totalmente compostas por células hospedeiras, transformadas com um plasmídeo específico. As culturas devem ser exaustivamente caracterizadas, no que toca à sua viabilidade, pureza, estabilidade do pDNA e gene alvo, bem como as suas características cinéticas (velocidade de crescimento e tempo de duplicação) (Vázquez *et al*, 2005).

Não existe consenso na escolha das características mais convenientes do genótipo ou fenótipo da estirpe bacteriana, para a produção de pDNA em larga escala. A preferência pela *E. coli* está baseada, principalmente, na sustentabilidade da estabilidade do plasmídeo, na sua densidade celular elevada, na baixa probabilidade em promover modificações genéticas na molécula de plasmídeo e a sua compatibilidade com futuros passos de purificação (Vázquez *et al*, 2005). Para além disso, a *E. coli* produz, maioritariamente, a isoforma do pDNA mais compacta, a super-enrolada. Ainda assim, as restantes isoformas, bem como a forma desnaturada, podem aparecer, devido a mudanças conformacionais que ocorrem no interior das bactérias, ou durante o processamento da biomassa (Sousa *et al*, 2005).

Entre as estirpes de *E. coli* mais usadas encontram-se, a TG1, XL-1 *Blue*, JM109, DH5 α e DH10 β (Vázquez *et al*, 2005).

*

Existem alguns parâmetros chave no processo de fermentação, como a densidade celular, o número de plasmídeos retidos e o rendimento, os quais são fortemente influenciados, pela estirpe hospedeira, pelo método de fermentação, pela composição do meio de crescimento e pelo momento da colheita (Urthaler *et al*, 2005a).

A *E. coli* é cultivada em frascos com agitação ou em biorreactores (Voß *et al*, 2003), usando, normalmente, simples formulações de meios como o Luria Bertrami (LB) ou “Brain Heart Infusion” (Prather *et al*, 2003).

A formulação do meio de cultura pode influenciar dramaticamente a performance do processo microbiológico. A *E. coli* é um microorganismo que cresce tanto em meios orgânicos complexos, como em meios quimicamente definidos, baseados em sais, com uma fonte de carbono orgânico. O tipo e concentração dos compostos usados na composição do meio de cultura, dita a quantidade de biomassa produzida, influenciando o rendimento na produção de plasmídeo. Para além disso, é provável que a composição do meio afecte os sistemas regulatórios dos microorganismos e portanto, também afectará o número de cópias do plasmídeo (Prather *et al*, 2003).

Após a fermentação, quase todos os passos da lise requerem que se use uma fracção concentrada de células, produzida por microfiltração ou centrifugação. Para além de concentrar, este passo, remove a maior parte do meio de cultura, o qual pode interferir nos processos de lise e purificação (Prather *et al*, 2003).

O ponto crítico do processo de extração/purificação é a ruptura das células bacterianas (Li *et al*, 2007). Neste passo, são libertados todos os componentes intracelulares, incluindo o pDNA, RNA, DNA genómico, proteínas e endotoxinas (Ferreira *et al*, 2000). Assim sendo, é um passo crucial para a produção do pDNA, determinando tanto a quantidade de DNA plasmídico que entra no processo de purificação, como a dificuldade do mesmo, primariamente devido à complexidade da matriz e das impurezas libertadas (O'Mahony *et al*, 2005).

A ruptura celular pode ser alcançada de várias formas, mas o método mais popular baseia-se na lise alcalina celular. A principal desvantagem desta abordagem, tendo em conta a futura automatização do processo, é incluir múltiplos passos de centrifugação. Estes não são facilmente incorporados num processo automatizado, impedindo que a lise alcalina passe a fazer parte de uma abordagem de preparação de pDNA em larga escala (Li *et al*, 2007).

Após o processo de lise, algum pDNA super-enrolado é convertido noutras isoformas. Para além disso, o DNA genómico pode sofrer fragmentação, complicando os passos de recolha e purificação do pDNA, principalmente se os fragmentos produzidos forem comparáveis, em tamanho, ao pDNA (Prather *et al*, 2003; Meacle *et al*, 2004).

3.2.2. Purificação de DNA Plasmídico

Após a lise, é importante remover proteínas e DNA hospedeiro, antes dos passos de purificação subsequentes. Para além disso, a clarificação e concentração, aumentam a fracção de pDNA na solução. A remoção de moléculas de peso molecular elevado, como o RNA, é uma das preocupações na execução deste passo. A presença de nucleases endógenas, no final da lise alcalina, pode ser vantajoso para remover esse tipo de moléculas (Ferreira *et al*, 2000).

Grande parte dos processos de produção de pDNA, usam um passo de precipitação do DNA plasmídico. Álcoois, nomeadamente o etanol e o isopropanol, são agentes de precipitação de DNA bastante usados para separar essas moléculas de outras, consideradas impurezas. Para além dos álcoois, o polietilenoglicol, detergentes catiónicos, alguns sais, como o cloreto de lítio e o cloreto de cálcio, e outras moléculas, são usados para remover a grande maioria dos contaminantes, em procedimentos de larga escala, sem recorrer a abordagens mais caras, como as separações cromatográficas (Prather *et al*, 2003).

Outras operações pré-cromatográficas geralmente usadas são, a filtração por membrana e sistemas de duas fases aquosas (Duarte *et al*, 2007).

Só após a obtenção de um lisado clarificado, é que se realizam um ou mais passos de purificação (Urthaler *et al*, 2005a).

Existem vários protocolos e kits comerciais para purificar o pDNA, à escala laboratorial. Tradicionalmente, recorre-se ao uso de técnicas de ultra-centrifugação de gradiente de densidade, com sacarose ou cloreto de cézio e brometo de etídio, contudo, este método não é adequado para a purificação, em larga escala de plasmídeo terapêutico (Deshmukh e Lali, 2005; Duarte *et al*, 2007).

Para além de serem metodologias demoradas e difíceis de transpor para uma escala industrial, envolvem o uso de solventes, químicos tóxicos (cloreto de cézio, brometo de etídio, fenol e clorofórmio) ou enzimas de origem animal (ribonuclease A, lisozima e proteínaze K), que não são aprovados, nem recomendados, pelas agências reguladoras (Eon-Duval e Burke, 2004; Deshmukh e Lali, 2005). É também importante referir que, nestes casos, a remoção de impurezas chave, tais como, o DNA cromossómico, RNA, proteínas e endotoxinas, é quase sempre insuficiente (Eon-Duval e Burke, 2004).

Para ultrapassar estas dificuldades, têm surgido várias abordagens, a maioria das quais inclui um passo cromatográfico de alta resolução (Duarte *et al*, 2007).

Outras técnicas usadas nos processos de larga escala incluem, precipitação selectiva, usando agentes como a spermina e spermidina, ultrafiltração, extracção em sistemas poliméricos de duas fases aquosas (Sandberg *et al*, 2004; Urthaler *et al*, 2005a; Hanora *et al*, 2006), filtração tangencial, adsorção em nitrocelulose (Wang *et al*, 2004) e electroforese capilar (Zhou *et al*, 2005).

Após os passos de purificação, é necessário concentrar o pDNA, bem como trocar soluções e tampões indesejados. Este passo pode ser alcançado usando técnicas baseadas em ultrafiltração em membrana. Finalmente, o DNA plasmídico pode ser precipitado na presença de etanol ou isopropanol, recolhido por centrifugação e ressuspendido numa solução tampão específica. A filtração estéril é, geralmente, o último passo na produção de pDNA, sendo depois armazenado a -20°C (Wang *et al*, 2004).

Desta forma, os protocolos de purificação deverão ser robustos e compatíveis com uma produção em larga escala, bem como purificar a isoforma super-enrolada do pDNA de forma reprodutível e selectiva (Sandberg *et al*, 2004).

A figura 6 mostra, de forma simples, todo o processo de produção de pDNA, desde a cultura de células, até à purificação.

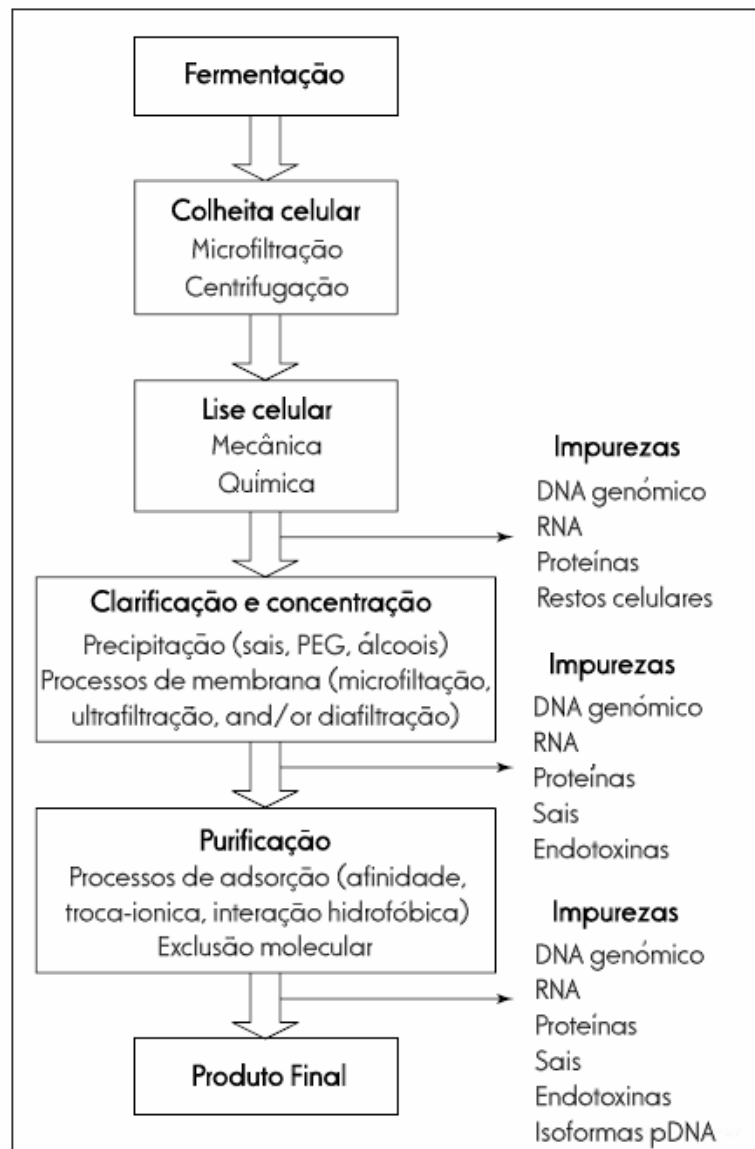


Fig. 6 – Processo de produção de pDNA
(Adaptado de Ferreira *et al*, 2000)

3.2.2.1. Técnicas cromatográficas

Sendo a cromatografia um método de alta resolução, é normalmente a técnica de purificação de pDNA escolhida, devido à sua capacidade em fornecer um produto, com os níveis de pureza requeridos, para uso na TG (Tiainen *et al*, 2007b).

Têm sido usados vários tipos de cromatografia para purificar o pDNA, baseados nas diferenças de tamanho, carga, hidrofobicidade e afinidade, de diferentes moléculas numa mistura (Tan *et al*, 2007). Assim sendo, entre eles encontra-se a cromatografia de troca iônica, exclusão molecular, interação hidrofóbica, afinidade, interação tiofílica, filtração em gel (Sandberg *et al*, 2004; Deshmukh e Lali, 2005; Duarte *et al*, 2007), cromatografia de fase reversa, de hidroxipatite (Hanora *et al*, 2006), de adsorção girolítica e sílica de fase reversa (Darby e Hine, 2005; Urthaler *et al*, 2005b).

Estas metodologias baseiam-se, tanto em leito fixo standard, como em novas abordagens como os monólitos, leito expandido e em leito móvel simulado (Duarte *et al*, 2007).

*

O tamanho e as propriedades químicas da molécula de ácido nucleico alvo (carga e hidrofobicidade), a acessibilidade das bases dos nucleótidos aos ligandos e as restrições topológicas, impostas pela forma super-enrolada, são exploradas para determinar a interacção do ácido nucleico com o suporte sólido, com o objectivo de isolar e purificar selectivamente o pDNA (Ferreira *et al*, 2000).

Os requerimentos de um suporte cromatográfico para a separação do pDNA, são diferentes dos da separação de proteínas recombinantes, técnica esta bem mais comum, uma vez que estas duas classes de macromoléculas diferem significativamente nas suas propriedades físico-químicas. Os plasmídeos têm sempre carga negativa, são macromoléculas de grande tamanho e a sua forma assemelha-se a uma longa fibra (Urthaler *et al*, 2005b).

Também deverá ter-se em conta que, uma molécula grande como o pDNA, adsorve só às partículas superficiais dos suportes. Consequentemente, a capacidade de uma coluna está, normalmente, na ordem das centenas de microgramas por mililitro de suporte cromatográfico, comparada com os 200 mg por mililitro no caso das proteínas. Para além das impurezas, os suportes devem também ter capacidade para separar as isoformas indesejáveis do pDNA (Urthaler *et al*, 2005a).

3.2.2.1.1. Cromatografia de Troca Iónica

A cromatografia de troca iónica continua a ser o processo mais comum na purificação de biomoléculas, devido à sua robustez, à rápida separação que origina, ao facto de ser um processo livre de solventes e à existência de uma grande variedade de suportes utilizados a nível industrial (Hanora *et al*, 2006).

A natureza polianiónica dos ácidos nucleicos pode ser explorada por cromatografia de troca iónica e, uma vez que a carga global dessas moléculas depende do número de bases que as constitui (uma carga negativa por base), o perfil de eluição esperado segue por ordem crescente de tamanho molecular. Contudo, já foram observadas inversões no comportamento de eluição esperado, em cromatografia de troca aniónica de DNA de cadeia dupla, em diversas fases estacionárias (Ferreira *et al*, 2000).

Foi sugerido que, alguns fragmentos de DNA sofrem um atraso na eluição, devido ao elevado conteúdo de bases AT, o que poderia indicar que o perfil de eluição é dependente da sequência. Ainda assim, uma análise detalhada revelou que nem sempre isso acontece, mas que a ligação dos ácidos nucleicos ao suporte é, por seu lado,

favorecida por uma óptima interacção com a curvatura dos poros das partículas da matriz. Desta forma, tem sido proposto que a separação é dependente da conformação (Ferreira *et al*, 2000).

A flexibilidade do ácido nucleico promove um melhor "encaixe" nos poros, permitindo que mais cargas interajam com a fase sólida, originando factores de retenção mais elevados. A boa separação das isoformas super-enrolada e relaxada do pDNA, com cromatografia de troca aniónica apoia essa hipótese. O pDNA super-enrolado é mais compacto, apertado e arqueado, que a isoforma relaxada, apresentando uma densidade de carga superior e portanto, um melhor encaixe na curvatura dos poros do suporte (Ferreira *et al*, 2000).

A figura 7 representa as possíveis interacções entre as diferentes isoformas do pDNA e os poros da matriz estacionária.

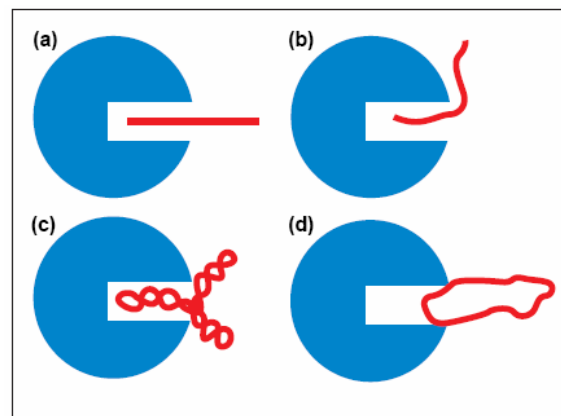


Fig. 7 – Representação das interacções possíveis entre o poro das partículas da matriz e pDNA (a) linear, (b) dobrado, (c) super-enrolado e (d) circular relaxado (Adaptado de Ferreira *et al*, 2000)

Neste tipo de cromatografia, é comum que gradientes longos melhorem a resolução dos componentes a separar. Apesar de as variações no gradiente não afectarem substancialmente a separação de fragmentos de DNA de baixo peso molecular, é importante manter um gradiente mais fraco, aquando da separação de moléculas de altos pesos moleculares. A remoção das impurezas das preparações de pDNA é também melhorada com o uso de um gradiente mais fraco (Ferreira *et al*, 2000).

Uma vez que o DNA plasmídico tem carga negativa, a cromatografia de troca iónica é muito útil para o separar das impurezas chave, como o DNA cromossómico, endotoxinas, proteínas, entre outras (Przybylowski *et al*, 2007), contudo, a separação do RNA por este método, é insuficiente. Desta forma, a adição de ribonuclease A (RNase) é um procedimento comum, originando a degradação e separação eficientes do RNA (Eon-Duval e Burke, 2004; Przybylowski *et al*, 2007). No entanto, para além dos custos elevados envolvidos, existem algumas preocupações em relação ao uso da RNase, já que é purificada a partir do pâncreas bovino e, nos dias de hoje, as autoridades reguladoras

recomendam que se evitem todos os materiais dessa origem, para a produção de compostos terapêuticos (Eon-Duval e Burke, 2004).

3.2.2.1.2. Cromatografia de Interação Hidrofóbica

A aplicação da cromatografia de interação hidrofóbica, para a purificação de pDNA, baseia-se no facto de as impurezas (ácidos nucleicos de cadeia simples) terem uma hidrofobicidade superior à do pDNA de cadeia dupla. O pDNA e o DNA genómico desnaturados, fragmentos de cadeias simples de RNA, bem como lipopolissacarídeos, são mais hidrofóbicos que o pDNA super-enrolado. Desta forma, todos esses contaminantes são retidos na matriz e separados do pDNA, que não se liga ao suporte cromatográfico (Diogo *et al*, 2005). O pDNA super-enrolado só é capturado pelo suporte, em condições de altas concentrações salinas (Tan *et al*, 2007).

Pode então dizer-se que, os factores que mais afectam o tempo de retenção dos ácidos nucleicos nas colunas de interação hidrofóbica são, o tamanho da molécula de DNA, a sua estrutura secundária e a composição em bases. Os efeitos do tamanho na interação com as colunas, dependem da composição em bases. Por exemplo, uma desnaturação parcial da dupla cadeia, numa zona rica em bases AT, origina regiões de cadeia simples, que levam à exposição das bases aos ligandos das colunas e, conseqüentemente, a um aumento da força da interação hidrofóbica (Ferreira *et al*, 2000).

Existem vários tipos de suportes que podem ser utilizados nas colunas de cromatografia de interação hidrofóbica, para a purificação de pDNA. O primeiro a ser descrito baseava-se num gel de Sepharose, derivatizado com 1,4-butanodioldiglicildiéter (Diogo *et al*, 2000).

3.2.2.1.3. Cromatografia de Afinidade

A Cromatografia de afinidade é definida como uma técnica de cromatografia líquida, que faz uso de interações biológicas específicas, para a separação e análise de diferentes espécies numa amostra. Exemplos dessas interações incluem a ligação das enzimas aos substratos ou dos anticorpos aos respectivos antígenos (Hage, 1999).

O uso desta abordagem cromatográfica requer que primeiro se obtenha um agente de ligação, conhecido como o ligando de afinidade, que interage selectivamente com a espécie desejada e que esse ligando seja depois imobilizado num suporte sólido, ficando pronto a ser usado na separação e quantificação de biomoléculas (Hage, 1999).

O ligando imobilizado é o factor chave, que determina o sucesso de qualquer método cromatográfico de afinidade (Hage, 1999).

*

A cromatografia de afinidade foi desenvolvida com base na formação de hélices triplas entre os oligonucleótidos ligados ao suporte sólido e sequências específicas, introduzidas nas moléculas de plasmídeo (Ferreira *et al*, 2000).

Tudo indica que os suportes deste tipo de cromatografia, têm maior afinidade para as conformações de pDNA super-enroladas, para além de proporcionarem uma boa separação do DNA genómico e RNA. Contudo, este método não é o ideal para a separação de impurezas, tais como as endotoxinas (Ferreira *et al*, 2000), para além de ser limitado a certas sequências de DNA (Darby *et al*, 2007).

A baixa capacidade dos suportes usados na purificação de afinidade de tripla hélice, constitui um problema tecnológico, que faz desta, uma abordagem economicamente inviável (Ferreira *et al*, 2000).

Tendo isto em conta, uma das preocupações dos investigadores tem sido encontrar ligandos que aumentem a cinética de ligação do DNA aos suportes cromatográficos de afinidade.

O uso de proteínas que ligam ao DNA por meio de uma sequência específica, é uma boa e lógica alternativa. Exemplos disso são as proteínas “zinc-finger”, que ligam a sequências específicas de DNA, imobilizando o pDNA nas colunas. Contudo, a ligação proteína – DNA pode ser tão forte, que transforma a eluição subsequente do DNA em algo quase impraticável (Darby *et al*, 2007).

Entretanto, já foi descrita uma abordagem que permite a recuperação de sequências de DNA que contenham operadores “Lac”, através de uma proteína repressora do *Lac*. Depois de se verificar a capacidade da proteína LacI em capturar plasmídeos, que contenham várias combinações de operadores *Lac*, foi demonstrado que essa mesma proteína, quando fundida com um fragmento de polihistidina 6 (His6) e “Green Fluorescent Protein” (GFP), pode ser usada na purificação por afinidade desse tipo de DNA. A proteína LacI permite a libertação independente do pDNA do suporte, via um mecanismo aleatório. A libertação simultânea da proteína é prevenida, fazendo a eluição com um análogo da halolactose (Darby e Hine, 2005). Desta forma, o DNA plasmídico pode ser purificado directamente a partir do lisado celular, usando o complexo LacI – His6 – GFP como ligando de afinidade, sem a necessidade de um tratamento com RNase A (Darby *et al*, 2007).

*

Mais recentemente, foi descrita uma nova forma de purificação do pDNA, directamente a partir dos lisados celulares, baseada em suportes de histidina – agarose (Sousa *et al*, 2006).

Os suportes com ligandos de histidina têm sido usados na purificação de proteínas, contudo, a sua aplicação na separação de DNA é relativamente recente. Nestes casos, o gel de agarose usado, combina as características hidrofóbicas suaves de um braço epoxi, com um ligando de histidina de pseudo - afinidade (Sousa *et al*, 2005). O mecanismo de interacção do suporte com o DNA, parece assim envolver interacções hidrofóbicas e interacções não específicas de bioreconhecimento das bases dos ácidos

nucleicos com o ligando histidina. Estudos envolvendo estas interações, provaram que, usando um gradiente de sulfato de amônio, a isoforma circular aberta do pDNA é eluída, enquanto que a super-enrolada interage com os ligandos de histidina (Sousa *et al*, 2007). Assim sendo, os suportes cromatográficos de histidina – agarose conseguem separar, de forma eficiente, a isoforma superenrolada de pDNA circular aberto (Sousa *et al*, 2005). A interação diferencial das diferentes isoformas do pDNA com o suporte histidina – agarose, parece ser consequência de deformações induzidas pelas cadeias “torcidas” do pDNA super-enrolado, que permitem que as bases se exponham mais que na isoforma circular aberta. Assim, a conformação, topologia e estrutura do pDNA, têm uma influência significativa na interação com as colunas e, conseqüentemente, controlam a selectividade e pureza obtidas (Sousa *et al*, 2007).

A alta resolução obtida com este tipo de suporte indica que este método é potencialmente aplicável à separação de pDNA, à escala preparativa e analítica, vocacionada para a utilização destas moléculas na TG e vacinas de DNA (Sousa *et al*, 2005).

A aplicação da matriz arginina-agarose na purificação de plasmídeos mostrou também uma interação específica entre o ligando de arginina e a isoforma superenrolada. Esta interação de afinidade parece envolver outros tipos de interação, para além das electrostáticas (Sousa *et al*, 2008).

*

A cromatografia de Afinidade por Imobilização de Metal (IMAC, do inglês Immobilized Metal Affinity Chromatography) tem tido uma aplicação recente na purificação de DNA (Prather *et al*, 2003).

A IMAC baseia-se nas interações de afinidade entre iões metálicos, imobilizados num suporte, através de compostos quelantes, e as moléculas alvo, permitindo uma separação eficiente dessas moléculas, dos restantes componentes da mistura (Tan *et al*, 2007).

Existem já alguns exemplos no campo de purificação de proteínas, como o uso do Ni²⁺ - ácido nitrilotriacético, ligado a um suporte de histidina e o Cu²⁺ - ácido iminodiacético, ambos demonstrando uma boa eficiência na remoção de endotoxinas das soluções (Tan *et al*, 2007).

A preferência na interação com os iões imobilizados segue a seguinte ordem: endotoxinas > RNA > pDNA. As endotoxinas são então os compostos que mais fortemente se ligam ao suporte, inibindo a ligação do RNA, que por sua vez interfere com a ligação do pDNA (Tan *et al*, 2007). Conseqüentemente, as cadeias de DNA danificado e o RNA ligam-se ao suporte, enquanto que o pDNA é eluído, permitindo que esta abordagem lide com quantidades consideráveis de pDNA (Prather *et al*, 2003).

Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ e Fe³⁺, encontram-se entre os iões metálicos que já foram usados neste tipo de cromatografia (Tan *et al*, 2007).

A IMAC tem sido explorada unicamente à escala laboratorial, contudo, considerando que se trata de um procedimento cromatográfico de fluxo constante, os problemas envolvidos no aumento de escala desta abordagem deverão ser mínimos (Prather *et al*, 2003; Tan *et al*, 2007).

3.2.2.1.4. Cromatografia de exclusão molecular

A grande maioria das purificações em larga escala de pDNA, para uso na TG e vacinas de DNA, baseiam-se na cromatografia de exclusão molecular. Esta abordagem pode ser usada para remover sais, tampões e compostos de baixo peso molecular, de solução de plasmídeo, sendo eficiente na remoção de endotoxinas (Wang *et al*, 2004).

A cromatografia de exclusão molecular explora o raio hidrodinâmico dos compostos, para fraccionar as diferentes moléculas de DNA e separar o RNA, proteínas e endotoxinas. Os ácidos nucleicos de elevado peso molecular, incluindo o DNA genómico e pDNA, são excluídos ou eluídos perto do limite de exclusão do suporte. Por outro lado, os compostos de baixo peso molecular, como o RNA, endotoxinas e proteínas, são retidos na coluna (Ferreira *et al*, 2000).

Os suportes mais populares, usados nas colunas de exclusão molecular são o Superose 6 e o Sephacryl S1000. O primeiro permite que as moléculas de DNA de grande tamanho, incluindo o DNA genómico e o pDNA, sejam separados das impurezas com eficiência, contudo, a remoção consequente do DNA genómico e o isolamento do pDNA é extremamente difícil. A separação destes dois tipos de DNA pode ser alcançada usando matrizes com poros de maior tamanho, como o Sephacryl S1000, obtendo-se pDNA super-enrolado praticamente puro (Ferreira *et al*, 2000).

Na cromatografia de exclusão molecular, a separação eficiente entre o pDNA e proteínas contaminantes só é alcançada, se forem injectados pequenos volumes de cada vez. Estes podem ser aumentados se a amostra estiver concentrada, com reduzidos níveis de impurezas. Assim sendo, esta abordagem cromatográfica deverá ser um dos últimos passos de purificação na produção de pDNA (Ferreira *et al*, 2000).

3.2.2.1.5. Cromatografia de Interação Tiofílica

Já foram identificadas várias estruturas aromáticas tioéster que, quando ligadas a um suporte cromatográfico, como a agarose ou Sepharose de alta performance, têm capacidade para separar diferentes isoformas de pDNA, bem como o RNA e outros contaminantes celulares. Esta separação ocorre através de uma combinação de técnicas cromatográficas, promovidas por sais e eluições por gradiente de cloreto de sódio (Sandberg *et al*, 2004).

A interacção entre os polinucleótidos e o meio cromatográfico é dependente da estrutura, permitindo uma purificação selectiva da isoforma de pDNA desejada. Para além disso, a co-eluição de contaminantes, como proteínas e endotoxinas, pode ser evitada aplicando um gradiente linear de cloreto de sódio (Sandberg *et al*, 2004).

Apesar de tudo, o mecanismo de ligação entre o pDNA super-enrolado e o ligando aromático tioéster, ainda não é claro. Tem sido sugerido que a estrutura do anel

aromático poderá participar numa interação hidrofóbica intercalante com a forma super-enrolada de dupla hélice, do pDNA (Sandberg *et al*, 2004).

Os protocolos de purificação baseados nesta abordagem cromatográfica, permitem a preservação da integridade estrutural do DNA plasmídico, originando preparações homogêneas de pDNA super-enrolado. As características únicas deste tipo de cromatografia, determinam que pode ser usada em processos de purificação para a produção de pDNA super-enrolado, de acordo com as estritas normas impostas pelas autoridades reguladoras (Sandberg *et al*, 2004).

3.2.2.1.6. Suportes Cromatográficos

A grande maioria das matrizes cromatográficas existentes para a purificação de pDNA, são usadas tradicionalmente na purificação de proteínas, geralmente com poros de diâmetro inferior a 30 nm. Sendo os ácidos nucleicos moléculas de maior tamanho, apresentam baixas capacidades de ligação a estas matrizes, pois são excluídos do interior das partículas, ligando-se unicamente à sua superfície externa (Deshmukh e Lali, 2005; Tiainen *et al*, 2007a).

Para que haja um uso efectivo das técnicas cromatográficas para a purificação de pDNA, deverão ser desenvolvidos novos tipos de suportes, com alta capacidade e produtividade (Tiainen *et al*, 2007a). Uma das formas para o conseguir, consiste em aumentar a superfície disponível, através da perfuração das unidades da matriz, originando poros de grande tamanho, que tenham capacidade para acomodar as moléculas de plasmídeo. Esta abordagem já se demonstrou bem sucedida, originando matrizes com boas capacidades de ligação ao pDNA (Tiainen *et al*, 2007b).

Outro tipo de metodologia, usa pequenos suportes não porosos que, apesar de apresentarem uma capacidade satisfatória, partículas de pequeno tamanho podem causar pressão na coluna (Tiainen *et al*, 2007b).

Para além do tipo de leito cromatográfico, também são usados vários formatos de matriz. Foram já sugeridas várias abordagens baseadas em adsorventes com propriedades especiais, que vão de encontro às exigências associadas com a captura, purificação e análise de moléculas de grande tamanho. Exemplos incluem partículas de pequeno tamanho, membranas, monólitos, entre outros (Tiainen *et al*, 2007a).

Os adsorventes de membrana têm mostrado uma excelente capacidade de ligação ao plasmídeo, devido a uma elevada área de superfície, que mantém um contacto directo com o fluxo que atravessa as colunas (Tiainen *et al*, 2007a). A pressão ao longo da coluna é reduzida, permitindo um aumento dos rácios do fluxo e por consequência, um aumento na produtividade. Os problemas associados às membranas são a distribuição

de fluxo uniforme, volumes mortos relativamente elevados e a passagem para a larga escala (Urthaler *et al*, 2005b).

Os suportes monolíticos representam um novo tipo de fase estacionária, que difere dos restantes na sua estrutura (Branovic *et al*, 2004). Um monólito é uma fase contínua, constituída por uma peça única de um material orgânico ou inorgânico, altamente poroso. Neste tipo de matriz, a fase móvel é forçada a passar pelos poros de grandes dimensões, sendo esta a característica mais importante destes suportes (Danquah e Forde, 2007). Como consequência, o transporte é conseguido por convecção, reduzindo dramaticamente o longo tempo de difusão requerido pelos suportes cromatográficos convencionais. Desta forma, o processo de separação é praticamente independente dos processos de difusão (Urthaler *et al*, 2005b).

Para além disso, os poros de grandes dimensões permitem a penetração das moléculas de pDNA na área da superfície interna, facilitando a acessibilidade das moléculas de plasmídeo aos locais activos de ligação, no interior da resina, minimizando a pressão nas colunas (Danquah e Forde, 2007).

Existem três tipos de suportes monolíticos disponíveis a nível comercial: monólitos baseados em gel de sílica, em poliacrilamida e baseados em géis orgânicos rígidos (Urthaler *et al*, 2005b).

Uma das desvantagens dos materiais monolíticos é a limitada área de superfície das paredes dos poros e conseqüentemente, uma quantidade também limitada de grupos funcionais disponíveis na superfície dos mesmos (Hanora *et al*, 2006).

Foram entretanto desenvolvidos outros tipos de suportes, como os baseados em agarose super porosa (Tiainen *et al*, 2007a), os de matrizes rígidas celulósicas, “cross-linked” superporosas, aplicadas à cromatografia de interacção hidrofóbica (Deshmukh e Lali, 2005) e um novo tipo de suporte para a cromatografia de troca aniónica, baseado em microfibras de sílica não porosa (Tiainen *et al*, 2007b).

3.2.2.2. Sistemas de Duas Fases Aquosas

O sistema de duas fases aquosas (SDFAs) é uma abordagem simples, com um forte potencial como passo de recuperação primário, na purificação de pDNA (Kepka *et al*, 2004), tendo provado ser uma ferramenta valiosa para separar e purificar misturas de outras biomoléculas (Rosa *et al*, 2007a).

A extracção usando este sistema é resultado de uma incompatibilidade mútua de dois polímeros ou um polímero e um sal, acima de certas concentrações (Rosa *et al*, 2007b). Variando o peso molecular do polímero, a sua concentração, o pH, a temperatura e a força iónica da solução, obtêm-se diferentes tipos de sistemas, cuja manipulação determina a resolução e rendimentos obtidos (Sinha *et al*, 2000; Azevedo *et al*, 2007).

Existem diferentes tipos de SDFAs, que têm sido aplicados na purificação de DNA plasmídico, tais como, polietileno glicol (PEG) – fosfato, PEG – citrato, PEG – sulfato de

amónio e copolímeros – dextrano, e em todos eles se têm obtido bons rendimentos, com remoção dos maiores contaminantes, como as proteínas e o RNA (Duarte *et al*, 2007).

Os SDFAs formam-se porque, a partir de determinadas concentrações críticas dos seus componentes, ocorre a alteração da estrutura da água dando origem a duas fases imiscíveis. Cada uma das fases é mais rica num dos componentes, mas ambas contêm os dois. Variando a concentração de sal e/ou o peso molecular do polímero, permite-se que o DNA plasmídico se acumule numa das fases, e grande parte das impurezas na outra, possibilitando a sua separação (Kepka *et al*, 2004). Por exemplo, usando sistemas como o PEG600 – K₂HPO₄ e PEG600 – (NH₄)₂SO₄, é possível processar lisados e obter a maior parte do pDNA na fase rica em sal, ou seja, a fase inferior. Por sua vez, as impurezas ficam na fase superior, rica em PEG600. Deste processo resulta uma remoção de 98% do RNA e proteínas e 68% das endotoxinas (Gomes *et al*, 2008).

Pode recorrer-se a um processo de extracção multi-passos, no qual a fase inferior, que contém o pDNA, é extraída várias vezes, a partir da formação de novas e distintas fases, usando sempre uma nova fase superior. Esta estratégia, para além de aumentar a pureza do pDNA, minimiza os efeitos de diluição (Gomes *et al*, 2008).

As condições de extracção devem ser cuidadosamente seleccionadas, uma vez que elevadas diferenças de composição entre a fase superior e inferior reduzem dramaticamente o rendimento, por acumulação do pDNA na interface (Trindade *et al*, 2005).

A maior desvantagem deste tipo de sistemas recai na difícil separação do pDNA do polímero, ou da solução salina, dependendo de onde é recolhido, originando possíveis problemas para os passos de purificação subsequentes, como a cromatografia (Kepka *et al*, 2004).

Os SDFAs podem ser tornados mais selectivos por adição de um ligando específico da biomolécula alvo, que se irá acumular numa das fases e, conseqüentemente, as biomoléculas acumulam-se na fase que contém o ligando (Rosa *et al*, 2007b). Este método tem sido exaustivamente usado na purificação de proteínas, mas a sua utilização na purificação de plasmídeos está ainda em fase embrionária, apesar do grande número de compostos que poderiam ser usados como ligandos do DNA. Um exemplo é a Polietileneimina (PEI), uma vez que tem uma alta afinidade para o pDNA. A utilização deste polímero, permite também uma condensação simultânea do pDNA, sob a forma de poliplexos, adequados para a TG (Duarte *et al*, 2007).

As vantagens dos SDFAs são bem conhecidas e incluem, simplicidade técnica, baixo custo, biocompatibilidade e contacto interfacial elevado (Duarte *et al*, 2007; Gomes *et al*, 2008). Contudo, uma desvantagem da maior parte dos sistemas polímero – sal, deriva do facto de os desperdícios gerados terem uma grande concentração de iões amónio ou fosfato. Este pormenor traduz-se num impacto ambiental extremamente negativo, causado pelo elevado potencial eutrófico destes iões. Esta desvantagem pode ser

ultrapassada usando um sal não tóxico ou biodegradável, como o citrato de sódio (Gomes *et al*, 2008).

3.3. Ligandos do DNA de dupla cadeia

A interacção de ligandos com o DNA de cadeia dupla é fundamental para vários processos intracelulares, como a transcrição e a tradução (Sischka *et al*, 2005).

Nos últimos anos, os factores que governam a afinidade e especificidade da ligação de várias pequenas moléculas ao DNA, têm sido estudados extensivamente. Estes estudos levaram à descoberta de uma série de moléculas que ligam ao DNA por diferentes mecanismos, exercendo dessa forma, a sua actividade biológica (Sinha *et al*, 2006).

O verdadeiro interesse no estudo deste tipo de interacções é descobrir a sua possível aplicação terapêutica como, por exemplo, no tratamento do cancro (Sinha *et al*, 2006; Nguyen *et al*, 2007).

A molécula de DNA é alvo de várias drogas de acção anti-tumoral, que formam complexos moleculares, covalentes e não covalentes, quando ligam ao “menor” ou “maior groove”. As primeiras a surgir pertencem à família dos agentes alcalinos, que ligam ao DNA através de ligações covalentes (Dolenc *et al*, 2005). Existem no entanto, numerosas drogas que se ligam a outros tipos de estruturas de ácidos nucleicos, como por exemplo, ao DNA de cadeia simples, RNA de cadeia dupla e simples, duplexos¹ de RNA/DNA, entre outros (Hendry *et al*, 2007).

Compreender as características que contribuem para o reconhecimento do DNA por ligandos de pequenas dimensões, ou complexos metálicos, é crucial para o desenvolvimento de fármacos, cujo alvo é a molécula de DNA (Spillane *et al*, 2007).

Para além da aplicação directa deste tipo de conhecimentos no mundo clínico, o estudo da interacção do DNA com determinados ligandos, pode ser aplicado à purificação de DNA (por exemplo o pDNA) para uso posterior, nomeadamente na TG. A ligação dessas pequenas moléculas a suportes cromatográficos, por exemplo, é uma abordagem promissora para a purificação de pDNA de grau farmacêutico.

¹ É comum encontrar-se duplexes ou o singular duplex, contudo, neste trabalho optou-se pela forma portuguesa constante nos manuais escolares: duplexo e duplexos.

3.3.1. Ligação de pequenas moléculas ao DNA

Devido à complexa estrutura do DNA de dupla hélice, são possíveis diferentes modos de ligação aos ligandos. Para além da ligação covalente, existem várias modalidades de ligação não covalente, específica ou não, como a intercalação entre pares de bases, bis-intercalação, ligação ao “minor groove”, ligação ao “major Groove” e uma combinação das mencionadas (Sischka *et al*, 2005). Destes, os mais comuns são a intercalação e a ligação ao “minor groove” (Tseng *et al*, 2005).

Certos agentes anticancerígenos requerem interacções covalentes com o DNA para exercerem os seus efeitos citotóxicos. É o caso da cisplatina, oxaliplatina, mitomicina C, entre outros. Muitos deles pertencem ao subgrupo dos agentes alquilantes, que têm como alvo a posição N7 dos resíduos de guanina, expostos no “major groove” da dupla hélice. O “minor groove” pode também ser alvo destas pequenas moléculas, especialmente aquelas que reagem com o grupo exocíclico 2-amino, dos resíduos de guanina (David-Cordonnier *et al*, 2005).

*

A intercalação é caracterizada por uma ligação não covalente entre o ligando e pares de bases adjacentes, através da interacção com as orbitais π desses mesmos pares de bases, normalmente combinados com ligações de hidrogénio. A intercalação estende e pode por vezes desenrolar, as duplas cadeias de DNA, exercendo um enorme impacto na estrutura do nucleossoma. Para além disto, os grupos laterais das zonas de intercalação de alguns ligandos, podem também influenciar o processo de ligação, causando comportamentos de selectividade de sequência (Sischka *et al*, 2005).

As moléculas intercalantes são tipicamente catiões planos, com anéis aromáticos fundidos, que deslizam entre os pares de bases da molécula de DNA, preenchendo o espaço formado entre eles, quando a hélice é alongada e parcialmente desenrolada. Este tipo de moléculas interage com os pares de bases adjacentes através de forças de Van der Waals, associadas a uma estabilização electrostática (Sinha *et al*, 2006).

Tendo em conta os mecanismos biológicos, a intercalação é hoje aceite como o modo central de acção de certos antibióticos e drogas anticancerígenas, como a actinomicina D, o topotecan, a berberina e o berenil (Sinha *et al*, 2006; Hendry *et al*, 2007).

Moléculas candidatas a drogas, que contenham duas fracções planas, têm particular interesse, uma vez que podem intercalar, simultaneamente, dois locais na dupla cadeia da molécula de DNA. Estes bis-intercalantes ligam ao DNA com uma força superior, aumentando a especificidade na ligação a sequências genéticas específicas (Hendry *et al*, 2007).

A intercalação também faz parte dos processos através dos quais, certos compostos genotóxicos danificam o DNA, como é o caso dos benzopirenos. Contudo, nem todas as

moléculas têm efeitos citotóxicos. Uma grande percentagem de pequenas moléculas, tanto drogas como químicos com uma grande variedade de actividades biológicas, intercalam o DNA sem provocarem efeitos nocivos. É o caso de certas vitaminas, hormonas, antagonistas hormonais, antipsicóticos, antidepressivos e antihistamínicos (Hendry *et al*, 2007).

Na prática, durante uma intercalação, os pares de bases não permanecem perfeitamente alinhados, para além de apresentarem diferentes rotações e flexões. A geometria exacta dos locais de intercalação, bem como da molécula de DNA, é influenciada por vários factores, incluindo o pH, a força iónica, catiões em solução, grau de hidratação, estruturas secundária e terciária e proteínas cromossómicas, como as enzimas nucleares, receptores e factores de transcrição. A forma, tamanho, flexibilidade conformacional e características físico-químicas de um ligando intercalante, também afectam o local de intercalação (Hendry *et al*, 2007).

*

Existe uma vasta miríade de compostos, naturais e sintéticos, que ligam à dupla hélice do DNA de forma não intercalante. Esta ligação é possível uma vez que, grande parte das moléculas que se ligam ao DNA, possuem grupos funcionais catiónicos, complementares em tamanho a um dos “grooves” do DNA, têm um sistema de anéis aromáticos, ou uma combinação de ambos. São exemplo disso, antibióticos como a netropsina e a distamicina (Biclawski *et al*, 2000).

Compostos que ligam ao “minor groove” do DNA, constituem uma ferramenta importante para estudar as interacções da ligação ligando/DNA. Em alguns casos, a interacção ligando/DNA origina uma distorção estrutural do ácido nucleico, que impede a replicação e a transcrição (Nelson *et al*, 2007).

Nos dias de hoje, os ligandos que ligam de uma forma não covalente ao “minor groove” têm atraído uma atenção considerável no mundo da investigação, uma vez que possuem uma especificidade pronunciada para a sequência do DNA (Dolenc *et al*, 2005).

A ligação selectiva a sequências ricas em bases AT (adenina – timina), por ligações de Van der Waals, pontes de hidrogénio e interacção electrostática, é característica dos ligandos do “minor groove”. Os ligandos do “major groove” também ligam ao DNA através de interacções electrostáticas (Sischka *et al*, 2005).

As moléculas que ligam ao “minor groove” apresentam várias características que as distinguem dos agentes intercalantes ou dos alquilantes do “major groove”, tais como a estrutura e carga. Os primeiros contêm uma estrutura que corresponde à curvatura do “minor groove” da cadeia de DNA: sistemas de anéis aromáticos não fundidos, em forma de arco com terminações básicas funcionais (Bartulewicz *et al*, 2002; Sinha *et al*, 2006). As suas cargas catiónicas fornecem a afinidade necessária para a ligação ao túnel de potencial negativo do “groove”. Para além disso, muitos ligandos possuem átomos de hidrogénio, que se envolvem na ligação (Bartulewicz *et al*, 2002).

As drogas que ligam ao DNA desta forma, interferem com a ligação específica de proteínas reguladoras, por mudarem a curvatura natural do DNA, ou por romperem o nucleossoma de forma selectiva (Sischka *et al*, 2005).

*

O desenvolvimento de agentes que têm como alvo estruturas de DNA de cadeia quádrupla, é uma extensão recente no desenvolvimento de agentes terapêuticos. Esse tipo de estruturas podem surgir em importantes regiões do DNA celular, como nos telómeros cromossómicos, bem como nos promotores oncogénicos, e foi já demonstrado que, fazer destes quadruplexos alvos de pequenas moléculas, pode comportar uma actividade anticancerígena (Nguyen *et al*, 2007). O primeiro composto obtido que tem como alvo estas estruturas, foi o CX-3543 (Lim *et al*, 2005).

3.3.1.1. Agentes Terapêuticos

São várias as pequenas moléculas, de acção terapêutica, que ligam ao DNA. Alguns desses compostos vão ser enumerados de seguida, bem como algumas das suas características.

3.3.1.1.1. Antibióticos derivados de Poliamidas Polipirrole

Poliamidas compostas por N-metilpirrole, N-metilimidazole e um número crescente de análogos estruturais, ligam ao “minor groove” do DNA de uma forma selectiva e previsível, em termos sequenciais (Tse *et al*, 2003).

Existem vários factores que contribuem para o sucesso da ligação das poliamidas ao DNA, como as ligações de hidrogénio, curvatura das moléculas, forças de Van der Waals e grupos terminais carregados (Woods *et al*, 2002).

Muito do que se conhece sobre a forma em que os ligandos do “minor groove” interagem com o DNA é baseado em estudos dos antibióticos polipirrole, distamicina A e netropsina (Nelson *et al*, 2007).

As estruturas de ambos os antibióticos podem ser analisadas na figura 8.

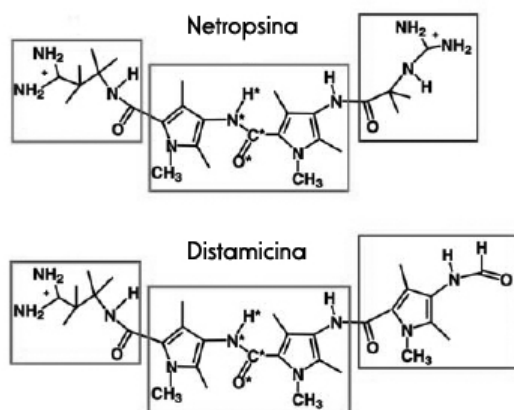


Fig. 8 – Estrutura química da netropsina e distamicina. As caixas rectangulares definem os sub-grupos atômicos usados para definir as caudas e o corpo da molécula (Adaptado de Dolenc *et al*, 2006)

Tendo em conta a sua forma curva, tanto a distamicina A como a netropsina, têm capacidade para interagir com o “minor groove” do DNA, uma vez que essa mesma forma coincide com a topologia do DNA de cadeia dupla (Nelson *et al*, 2007), (figura 9).

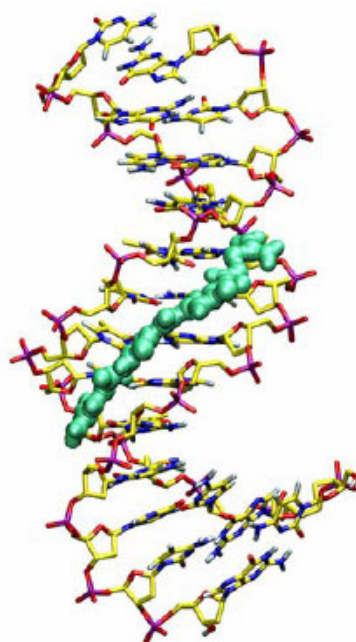


Fig. 9 – Complexo formado entre a netropsina e uma fracção da dupla cadeia de DNA $d((CG)_2A_3(CG)_2)-d((CG)_2T_3(CG)_2)$ (Adaptado de Dolenc *et al*, 2006)

Desta forma, estes dois antibióticos, bem como outros compostos derivados, têm sido referidos como ligandos “shape-selective” (selectivos de forma) (Nelson *et al*, 2007).

Na interacção do DNA com as moléculas de distamicina e de netropsina, estão envolvidas, pelo menos, quatro pares de bases AT. A introdução de um par de bases

GC (Guanina – Citosina) numa zona rica em bases AT, perturba a ligação dessas moléculas, principalmente da netropsina, primariamente devido aos grupos exocíclicos 2-amino da guanina, que funcionam como autênticos obstáculos à ligação (Dolenc *et al*, 2005).

Numerosos estudos de ligação envolvendo estes dois antibióticos, mostraram que ambas as moléculas exibem uma razão de ligação ao “minor groove” de 1:1, considerando sequências de DNA com 4 – 5 pares de bases AT sucessivas. No entanto, por vezes, quando os locais de ligação contêm um par GC e 4AT ou até os cinco pares de bases AT, podem acomodar simultaneamente duas moléculas de distamicina (Lah e Vesnaver, 2004).

3.3.1.1.2. Antibióticos antineoplásticos derivados das bactérias *Streptomyces*

Alguns dos antibióticos antineoplásticos produzidos a partir do género de bactérias *Streptomyces* são conhecidos por ligarem, com maior ou menor afinidade, ao DNA. É o caso, por exemplo, da Bleomicina, Actinomicina, Neomicina, Kanamicina e Equinomicina.

O sulfato de neomicina pertence a uma classe de compostos conhecidos como antibióticos aminoglicosídicos. É um antibiótico de largo espectro, produzido por fermentação das *Streptomyces fradiae* (Clarot *et al*, 2005). Já a kanamicina é um complexo com propriedades antibióticas, produzido a partir das *Streptomyces kanamycetius* (Puius *et al*, 2006).

A neomicina é constituída por seis grupos amina primários, distribuídos por três dos quatro açúcares, criando uma rede de grupos amino carregados positivamente, com capacidade para ceder átomos de hidrogénio, sob condições fisiológicas (Robinson e Wang, 1996). Na figura 10 está representada a estrutura deste antibiótico.

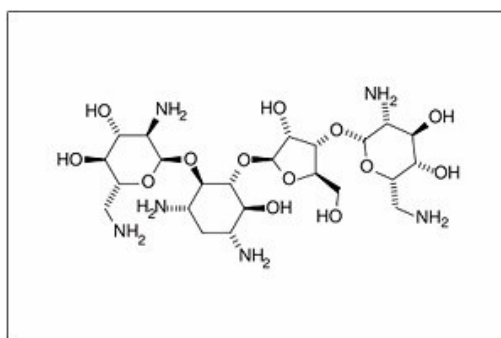


Fig. 10 – Estrutura molecular da neomicina

(Adaptado de <http://www.onlinepharmacycatalog.com/category/common-drugs-and-medications/antibiotics/neosporin-bacitracin-neomycin-polymyxin-b/>)

Pensa-se que a neomicina adere às bases guanina no “major groove” da dupla hélice, por um mecanismo de intercalação (Robinson e Wang, 1996).

*

A actinomicina D (figura 11) é um dos antibióticos mais usados e conhecidos, tanto a nível clínico, como de investigação, e liga à dupla cadeia de DNA com uma orientação antiparalela. É isolado a partir da *Streptomyces parvulus* e apresenta uma forte actividade anticancerígena, já que funciona como inibidor da transcrição, tanto *in vivo* como *in vitro* (Li *et al*, 2006).

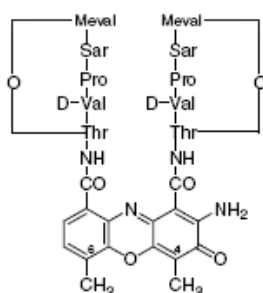


Fig. 11 – Estrutura molecular da actinomicina D
(Adaptado de Li *et al*, 2006)

O modo de ligação da actinomicina D é a intercalação: o cromóforo insere-se entre os pares de bases do DNA, enquanto que os dois anéis lacto-penta-peptídicos encaixam no “minor groove”. A ligação é dependente e específica da sequência de bases, requerendo a presença de pares de bases GC (Li *et al*, 2006).

3.3.1.1.3. Diamidinas aromáticas

As diamidinas aromáticas, como o berenil, pentamidina, furamidina, CGP 40215A, entre outros, têm uma excelente actividade contra uma miríade de infecções graves, causadas pelo *Pneumocystis carinii*, actividade essa consequência da sua forma de ligação ao DNA (Nguyen *et al*, 2004).

Todas as diamidinas aromáticas biologicamente activas, estudadas até agora, ligam ao “minor groove” do DNA pelas sequências ricas em bases AT (Nguyen *et al*, 2004). As estruturas dos complexos formados entre o berenil, pentamidina ou furamidina, com as sequências $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$, revelam que todos eles ligam ao “minor groove” na sequência central AATT, ilustrando uma estequiometria de 1:1 (Boger *et al*, 2001; Nguyen *et al*, 2004).

A furamidina, bem como outras diamidinas relacionadas, também conseguem ligar ao DNA por intercalação, às sequências ricas em bases GC, contudo, esta é uma interacção secundária e relativamente fraca, comparada com o modo de ligação primário às bases AT (Nguyen *et al*, 2004).

Na figura 12 está ilustrada a estrutura de alguns destes antibióticos. A sua forma de ligação ao DNA está, por sua vez, ilustrada na figura 13.

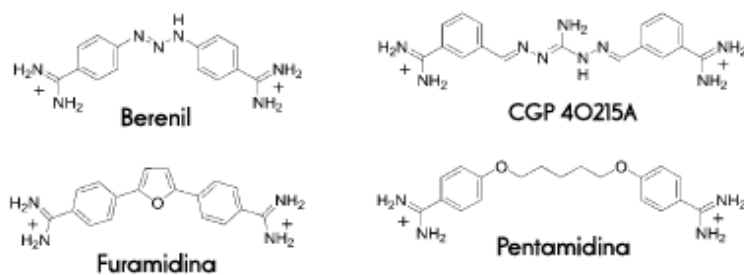


Fig. 12 – Estrutura molecular de algumas diamidinas aromáticas (Adaptado de Nguyen *et al*, 2004)

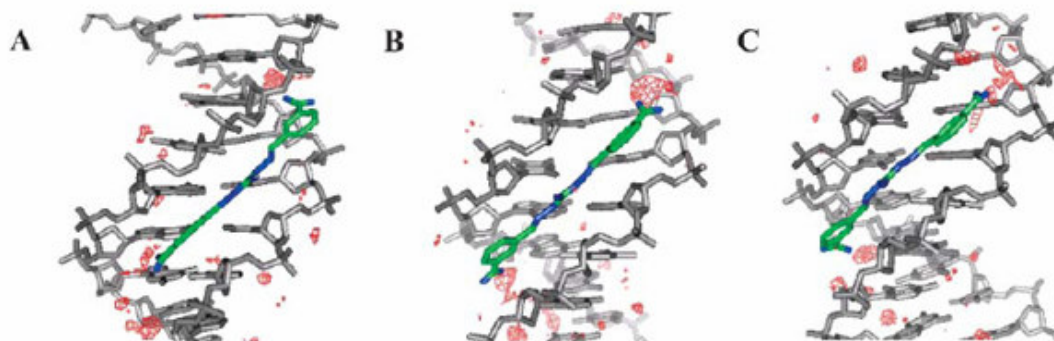


Fig. 13 – Complexos formados entre o DNA e o CGP 40215A. As zonas a vermelho correspondem a moléculas de água. (A) O ligando forma ligações de hidrogénio directas com o oxigénio da trionina; (B) Os grupos amidina não formam pontes de hidrogénio directas com as bases, observando-se moléculas de água a mediar a interacção em ambas as extremidades do ligando; (C) Quando o ligando se desloca para a outra extremidade, são observados efeitos opostos ao de (A).

(Adaptado de Nguyen *et al*, 2004)

Estes compostos penetram profundamente no “groove” e encaixam entre as suas paredes. As suas amidinas formam ligações de hidrogénio com os grupos timidina-O₂ e/ou adenina-N₃, nas extremidades das bases do “groove” (Nguyen *et al*, 2004). Os anéis aromáticos adoptam uma conformação isohelical, alinhando-se de forma paralela às paredes do “minor groove”, de modo a contactarem com as adeninas do mesmo (Boger *et al*, 2001).

A curvatura dos compostos é também uma característica crucial para a formação dos complexos antibiótico/DNA, e para que a ligação ao “minor groove” seja forte. As

diamidinas, bem como outros ligandos do “minor groove”, ou igualam a curvatura do “groove”, quando em solução, ou têm capacidade para adoptar uma conformação de baixa energia, de modo a conseguirem complementar a forma do “groove” no complexo. Os compostos que tenham uma curvatura muito pequena ou muito grande, não conseguem otimizar os contactos com o “minor groove”, apresentando portanto, afinidades de ligação reduzidas (Nguyen *et al*, 2004).

3.3.1.1.4. Alcalóides Isoquinolinos

Existem vários alcalóides isoquinolinos, como a hernandezina, talfoetidina, protopina e berberina, sendo este último o mais importante (Alexandrova, *et al* 2000; Hu *et al*, 2008).

A berberina está presente num vasto número de plantas clinicamente importantes, incluindo a *Coptis chinensis*, *Phellodendron japonicum*, *Berberis aquifolium* e *Berberis aristata*. Extractos destas plantas têm sido usados no tratamento de várias doenças como a gastroenterite e desencadeiam vários efeitos farmacológicos, incluindo anti-bacteriano, anti-cancerígeno (Hu *et al*, 2008) e hipolipidémico (Kong *et al*, 2004).

Este alcalóide liga ao DNA de dupla cadeia de forma não covalente e com uma excelente afinidade, contudo o modo de ligação ainda não é totalmente claro. A primeira forma de ligação sugerida foi a intercalação parcial. Contudo, estudos de espectros de fluorescência sugeriram que a berberina seria um ligando do “minor groove” e não um intercalante. Mais tarde, foi sugerido que este antibiótico só ligava a tripletos poli (dA) – [poli (dT)]₂ do DNA. Finalmente, estudos mais recentes revelaram que os alcalóides desenrolam a dupla cadeia do DNA aproximadamente 11°, o que é consistente com uma interacção por intercalação (Mazzini *et al*, 2003).

No seguimento desses estudos, foi sugerido que a interacção dos alcalóides com o DNA, pode ser descrito por uma intercalação parcial da molécula do ligando com os pares de bases, enquanto que os seus anéis aromáticos se encaixam no “minor groove” do duplexo, ligados a sequências ricas em bases AT (Mazzini *et al*, 2003; Qin *et al*, 2007). Alguns autores acreditam que esta última forma é a preferencial, sugerindo até que a intercalação *per se* não existe (Mazzini *et al*, 2003).

Na figura 14 está representada a estrutura da berberina, assim como a sua forma de ligação à dupla cadeia de DNA.

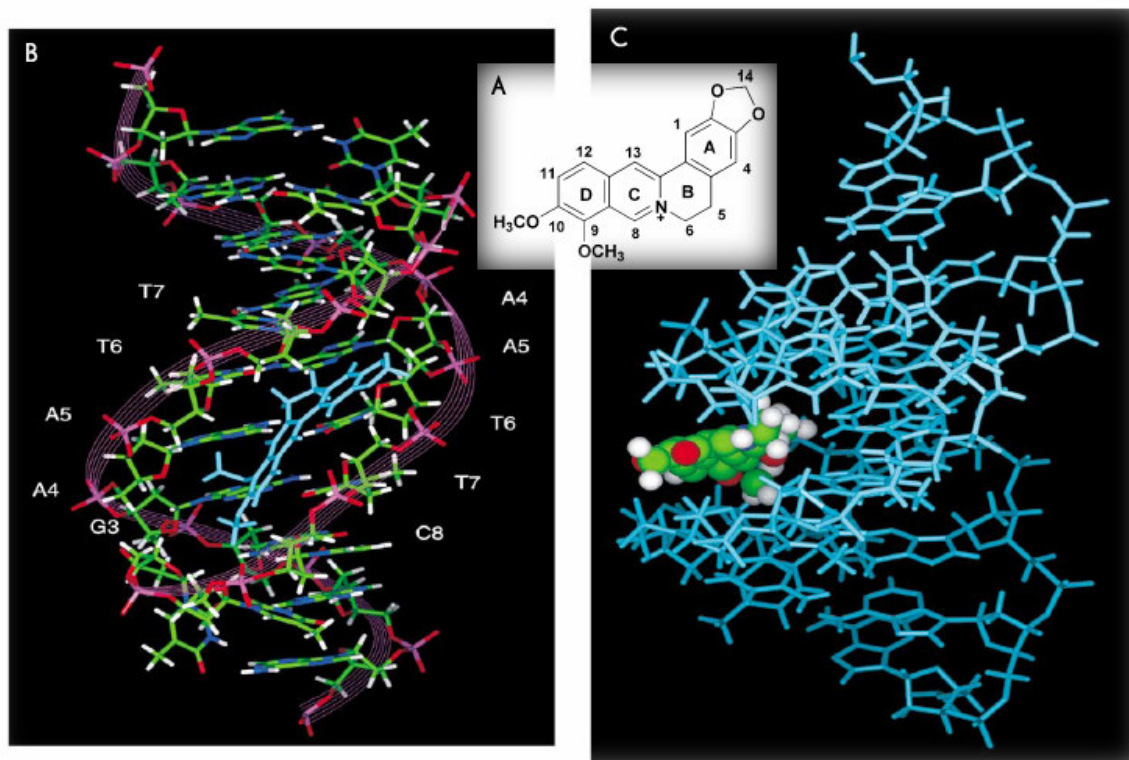


Fig. 14 – (A) Estrutura molecular da berberina. (B) e (C) Modelo molecular do complexo formado entre o DNA e a berberina. A simetria da dupla hélice é destruída pela presença do ligando. (B) Visão frontal e (C) Visão da berberina localizada no “minor groove”
(Adaptado de Mazzini *et al*, 2003)

Na berberina, os hidrogénios dos carbonos 5,6 e 8, bem como os dos grupos metóxido, estão localizados num dos lados da molécula, exibindo contactos com os hidrogénios das adeninas do “minor groove”, enquanto que os dos carbonos 11 e 12, do lado oposto da molécula, contactam com os hidrogénios da ribose e citidina. Os hidrogénios do anel A exibem por sua vez, interacções com os prótons da ribose (Mazzini *et al*, 2003).

Desta forma, a molécula de berberina, quando ligada ao DNA, fica localizada no “minor groove”, ao nível dos pares de bases A₄T₇ e A₅T₆ (Chen *et al*, 2005), como se pode observar na figura 14. A sua fracção convexa fica encaixada na hélice, apresentando o átomo de azoto carregado positivamente, junto à superfície aniónica da cadeia de DNA. O anel aromático A e o grupo metilenodióxido ficam numa posição externa em relação à hélice (Mazzini *et al*, 2003).

As interacções iónicas não específicas entre a molécula de antibiótico, carregada positivamente, e a superfície aniónica do nucleótido, têm um papel importante no processo de ligação, contudo, não são suficientes para a formação dos complexos (Mazzini *et al*, 2003).

A berberina, bem como outros alcalóides, apresenta os dois tipos de estequiometria de ligação mais comuns, 1:1 e 1:2, independentemente dos rácios moleculares dos complexos DNA/alcalóide (Chen *et al*, 2005). Quando esses complexos

estão em solução, não apresentam uma única estrutura, pelo contrário, as cadeias fosfodiéster permitem pequenos movimentos e desta forma, existem várias conformações, ligeiramente diferentes. A estrutura será então uma média ponderada de todas essas conformações (Mazzini *et al*, 2003).

3.3.1.1.5. Outros tipos de antibióticos

A cromomicina A₃ é um potente antibiótico antitumoral, pertencente ao grupo dos ácidos aureólicos, que também incluem a plicamicina, mitramicina e olivomicina. Estes antibióticos ligam a sequências ricas em bases GC do “minor groove” da dupla cadeia de DNA, inibindo as polimerases do DNA e do RNA e por conseguinte, inibem a expressão genética (Imoto *et al*, 2004).

Outras moléculas que também ligam preferencialmente a sequências ricas em bases GC são os antibióticos antracilina, dos quais faz parte a daunomicina. Estes antibióticos estão entre as drogas mais efectivas na quimioterapia e ligam ao DNA por intercalação (Qu *et al*, 2001).

Os compostos de amónio bisquaternário heterocíclico são uma classe de ligandos sintéticos do “minor groove”, relacionados com as poliamidinas, que ligam ao DNA de forma não covalente, a sequências ricas em bases AT (Nelson *et al*, 2007).

A duocarmicina A é um membro da classe de antibióticos antitumorais, que contém um anel de ciclopropano reactivo. A fracção ciclopropil alquila o N3 da adenina, na extremidade 3' de sequências de três ou mais adeninas ou timinas consecutivas, na dupla cadeia de DNA (Yamamoto *et al*, 1993).

3.3.1.2. Agentes não terapêuticos

3.3.1.2.1. Azul-de-metileno

O azul-de-metileno (figura 15) é um corante poliaromático do grupo fenotiazine, usado para corar ácidos nucleicos. Para além disso, é usado extensivamente como agente fotosensibilizador para a inactivação fotodinâmica de vírus de RNA como o HIV, hepatite B e C (Sinha *et al*, 2006).

O modo predominante de ligação deste composto ao DNA é a intercalação, principalmente a bases GC. O azul-de-metileno tem também alguma afinidade, principalmente devido a interações electrostáticas, para o DNA de cadeia simples, poli (rA) e poli (rG) (Sinha *et al*, 2006).

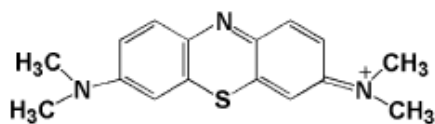


Fig. 15 – Estrutura molecular do azul-de-metileno
(Adaptado de Sinha *et al*, 2006)

3.3.1.2.2. Brometo de Etídio

O brometo de etídio (BrEt) (figura 16) é uma droga fenantrínica, que forma complexos metacromáticos solúveis com os ácidos nucleicos (Sinha *et al*, 2006).

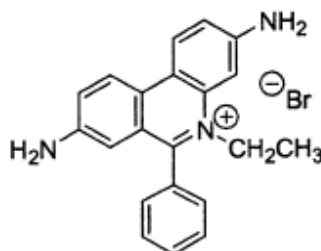


Fig. 16 – Estrutura molecular do BrEt
(Adaptado de Boger e Tse, 2001)

O seu mecanismo de interacção com os ácidos nucleicos, nomeadamente o DNA, tem sido estudado extensivamente e há consenso quando se diz que a sua forma primária de ligação é a intercalação clássica, enquanto que a ligação secundária ocorre através de mecanismos de empilhamento (Sinha *et al*, 2006).

3.3.1.2.3. Laranja de Tiazole

O laranja de tiazole (LT) (figura 17) é um membro da família das cianinas assimétricas, e é o resultado de um design meticuloso para desenvolver um corante efectivo para a análise reticulocítica (Boger e Tse, 2001).

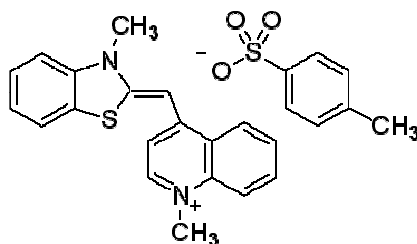


Fig. 17 – Estrutura molecular do LT
(Adaptado de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/TablePage/17895463>)

O LT liga à dupla cadeia de DNA através de uma bis-intercalação selectiva, onde cada cromóforo é “ensandwichado” entre dois pares de bases num local (5'-CpT-3'): (5'-ApG-3') (Bunkenborg *et al*, 2000).

3.3.2. Técnicas usadas para avaliar a afinidade da ligação entre ligandos e o DNA

Tem sido usado um vasto número de técnicas, químicas e físicas, para estudar a ligação ligando/DNA, desde simples medições da absorção de UV e das temperaturas de fusão, até métodos informativos como a espectrometria de ressonância magnética nuclear, raios X, espectrometria de massa, dicroísmo circular, “gel footprinting”, diálise de equilíbrio, electroforese capilar (Chaltin *et al*, 2003; Zhou *et al*, 2007), “fluorescent intercalator displacement” (FID) (Boger *et al*, 2001) e titulação fluorimétrica (Strothkamp e Strothkamp, 1994).

Técnicas como o “footprinting”, clivagem por afinidade e espectrometria de ressonância magnética, são das mais comuns para estabelecer as propriedades da ligação de pequenas moléculas ao DNA. Contudo, são abordagens extremamente demoradas e não são aplicáveis a ensaios com muitas amostras em simultâneo, para além de requererem conhecimentos especializados em certos procedimentos bioquímicos (Tse e Boger, 2004; Spillane *et al*, 2007). Desta forma, estabelecer um perfil de ligação ao DNA, incluindo locais de possível ligação e todos aqueles onde a ligação não ocorre, é praticamente impossível (Tse *et al*, 2003).

Os raios X, a espectrometria de massa e o dicroísmo circular, não são técnicas apropriadas para a análise de pequenas quantidades de amostra, sendo também bastante elaboradas, requerendo equipamentos dispendiosos (Zhou *et al*, 2007).

Recentemente foi desenvolvida uma técnica promissora, baseada na hidrólise da endonuclease I (Yao *et al*, 2007), contudo requer conhecimentos práticos laboratoriais avançados, o que não é compatível com uma aplicação rotineira, para além de ser restrita para a avaliação da selectividade de quadruplexos de DNA vs cadeias simples (Monchaud *et al*, 2008).

3.3.2.1. Titulação fluorimétrica

Quando ligado por intercalação ao DNA, o BrEt apresenta uma intensidade de fluorescência (I_f) 20 a 100 vezes superior que na sua forma livre. Assim sendo, é possível quantificar esta ligação, monitorizando a fluorescência de uma solução DNA – BrEt (Strothkamp e Strothkamp, 1994).

A intensidade de fluorescência observada (I_f) a um dado instante de uma determinada solução, é igual à soma das intensidades das espécies em solução. Se o BrEt é a única substância fluorescente nas condições experimentais, então I_f pode ser definida por:

$$I_f = I_{lig} + I_{liv} \quad (1)$$

onde I_{lig} é a intensidade de fluorescência do BrEt ligado e I_{liv} a intensidade do composto livre. I_{lig} e I_{liv} são funções da concentração do BrEt ligado (c_b) e do livre (c_f):

$$I_f = k_b c_b + k_f (c_{total} - c_b) \quad (2)$$

As constantes k_b e k_f são determinadas experimentalmente, c_{total} é controlado e c_b é determinado a partir da monitorização de I_f , como mostra a expressão 3:

$$c_b = \frac{I_f - k_f c_{total}}{k_b - k_f} \quad (3)$$

Assim que a concentração do BrEt ligado seja conhecida, a ligação deste pode ser descrita pela equação de Scatchard (somente aplicada a sistemas com locais de ligação idênticos e independentes):

$$\frac{r}{c_f} = nK - rK \quad (4)$$

Onde K é a constante intrínseca de ligação do BrEt, r é o rácio da quantidade de BrEt em relação à concentração de DNA, n é o valor máximo de r e c_f é a concentração livre de BrEt (Strothkamp e Strothkamp, 1994).

A partir do gráfico de r/c_f , determinado experimentalmente, versus r , obtém-se o valor de n (o número máximo de locais de ligação por par de bases), através da intersecção da recta com o eixo dos xx . Para além disso, obtém-se também a constante de ligação intrínseca, K , que corresponde ao declive da recta (Strothkamp e Strothkamp, 1994).

A ligação do BrEt pode ser estudada na presença de um ligando do DNA, para se verificar se a sua presença afecta essa ligação, e de que forma. A partir dos dados assim obtidos, pode calcular-se a constante de ligação do ligando ao DNA. Na presença de um

inibidor competitivo (ligando), o valor aparente de K (K_{obs}) diminui à medida que a sua concentração aumenta. Numa inibição competitiva, a fracção de locais de ligação ocupados pelo ligando e pelo BrEt, depende das suas concentrações e constantes de ligação. Quando a recta intersecta o eixo dos xx a $[BrEt] = \infty$ e portanto, todos os locais de ligação contêm esse composto, independentemente da concentração do ligando (Strothkamp e Strothkamp, 1994).

Adicionando um inibidor/ligando competitivo a uma análise Scatchard, obtém-se a seguinte relação:

$$K_{obs} = \frac{K}{1 + K'c'_f} \quad (5)$$

onde K' é a constante de ligação do ligando e c'_f é a concentração do ligando livre. Rearranjando a expressão 5, obtém-se a equação de uma recta:

$$\frac{1}{K_{obs}} = \frac{K'}{K}c'_f + \frac{1}{K} \quad (6)$$

A partir do seu declive, e como o valor de K é conhecido, calcula-se facilmente o valor da constante de ligação do ligando ao DNA (Strothkamp e Strothkamp, 1994).

3.3.2.2. “Fluorescent intercalator displacement”

O FID é uma técnica não destrutiva, usada para estabelecer a afinidade de ligação, selectividade de sequência e estequiometria de ligação do DNA a vários tipos de ligandos (Tse e Boger, 2004). Esta metodologia baseia-se no deslocamento do BrEt, ou LT, de cadeias simples de desoxiligonucleótidos, as hairpins (Boger *et al*, 2001).

Na figura 18 está exemplificado o processo geral desta técnica.

Uma placa com 96 poços, onde cada poço contém uma sequência individual. A placa pode conter uma variedade de possíveis sequências para testar um único agente, ou uma sequência seleccionada, para testar uma variedade de ligandos.

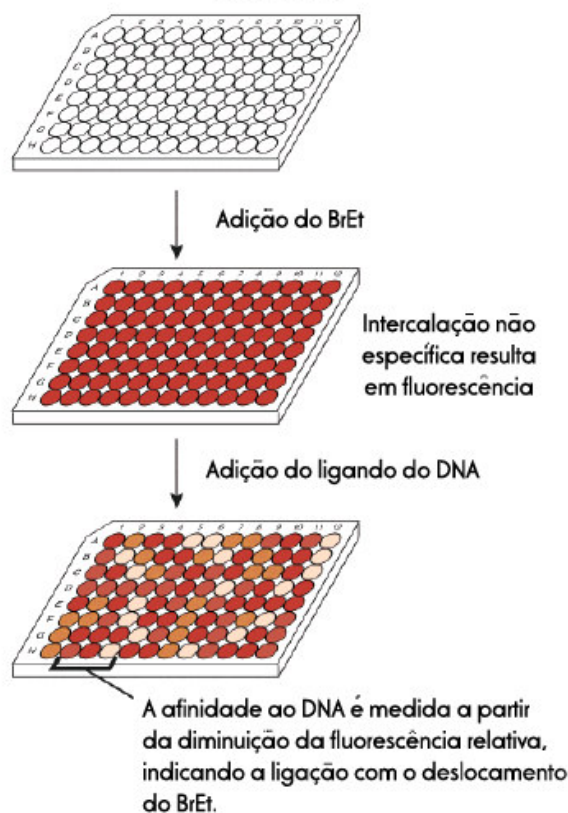


Fig. 18 – O FID
(Adaptado de Tse e Boger, 2004)

Hairpins contendo as sequências completas dos quatro ou cinco pares de bases (136 e 512 hairpins respectivamente), são distribuídas pelos poços de placas de 96 poços, e tratadas com a substância intercalante (BrEt ou LT), observando-se um aumento da fluorescência após a ligação desta ao DNA. A adição de um composto ligando do DNA, origina uma diminuição da fluorescência, devido ao deslocamento da substância intercalante, ligada às moléculas de hairpin. A percentagem da diminuição da fluorescência está directamente relacionada com a quantidade de DNA que se liga às moléculas de ligando, provendo afinidades de ligação relativas e ordens de ligação, a todas as sequências de pares de bases. O perfil resultante define, em alta resolução, a selectividade de sequência do composto/ligando (Boger *et al*, 2001).

A partir do deslocamento quantitativo do BrEt, é possível obter-se uma curva de titulação, útil para estabelecer constantes e estequiometria de ligação. O gráfico da mudança de fluorescência vs a concentração do composto/ligando, corresponde a uma curva de titulação, a partir da qual se pode calcular a estequiometria, pois esta

corresponde à intersecção das rectas que constituem as porções anterior e posterior à saturação (Tse e Boger, 2004).

Até agora, o FID tem sido validado através do estudo da ligação e selectividade de vários agentes, ligandos do “minor groove” às sequências AT, incluindo a distamicina, netropsina, berenil e DAPI (4',6 – diamidino – 2 – fenilindol) (Lewis e Long, 2006).

O aumento da fluorescência provocado pela ligação do BrEt à dupla cadeia de DNA, é cerca de 20 vezes, variando de sequência para sequência. Para os comprimentos de onda de excitação e emissão usados (545 nm e 595 nm respectivamente), não só se verifica um aumento da fluorescência inferior ao ideal, como a sensibilidade do ensaio deixa algo a desejar. Para além disso, a estes comprimentos de onda, a fluorescência de alguns dos ligandos pode interferir nos resultados dos ensaios (Boger *et al*, 2001).

Desta forma, o laranja de tiazole é uma alternativa promissora como intercalante nos ensaios do FID, principalmente pelas seguintes razões: ① os seus máximos de excitação e emissão são distintos dos do BrEt (509 nm e 527 nm respectivamente), ② o aumento da fluorescência, após intercalação com o DNA, excede o provocado pela ligação do BrEt (aproximadamente 3000 vezes) e ③ demonstra uma menor dependência da sequência da cadeia de DNA, mas ainda assim, com uma boa afinidade (Tse e Boger, 2004).

Contudo, nem tudo são vantagens no que toca ao uso do LT nos ensaios do FID. A afinidade muito elevada pode introduzir erros, potencialmente derivados de uma ligação competitiva mais efectiva (Boger *et al*, 2001).

*

O FID tem provado ser uma técnica relativamente barata, rápida, precisa, confiável, relativamente simples e de alta resolução, que permite estabelecer afinidades de ligação de pequenas moléculas ao DNA, bem como as sequências específicas envolvidas na ligação (Boger e Tse, 2001; Tse *et al*, 2003). Acima de tudo, estas características ilustram que, a partir desta técnica se obtêm facilmente informações sobre pequenas moléculas, ligandos do DNA, que não são acessíveis por outros meios. O FID constitui uma alternativa e uma técnica complementar, que define de uma forma exaustiva, a selectividade da ligação dos ligandos ao DNA (Tse *et al*, 2003).

Contudo, esta técnica apresenta algumas desvantagens. O FID não é aplicável a todas moléculas que interagem com o DNA, principalmente devido à presença de fluoróforos nos ligandos, que interferem na leitura da fluorescência (Chaltin *et al*, 2003).

Com a excepção da leitura inicial, a percentagem de fluorescência diminui ligeiramente com o tempo/leitura, indicando algum nível de “photobleaching”. Ainda assim, não existem grandes alterações na percentagem de fluorescência relativa, dentro de cada grupo de amostras, indicando que os “rankings” qualitativos não são afectados (Boger *et al*, 2001).

Mas a maior desvantagem do FID é a competição indirecta, que ocorre quando o local de ligação do ligando é diferente do do intercalante (BrEt ou LT), originando constantes de ligação falsamente baixas (Monchaud *et al*, 2008).

3.3.2.3. Outras técnicas

A Ressonância Plasmática com Biossensor de Superfície (RPBS) é uma técnica que permite a análise quantitativa da ligação de pequenas moléculas a oligonucleótidos, de superfície imobilizada, via variações do índice refractivo (Monchaud *et al*, 2008).

Este método e os seus protocolos, baseiam-se na propriedade comum do índice refractivo ou mudança de massa, ao nível do sensor de superfície bioespecífico, aquando da formação de complexos. A partir desta metodologia, pode obter-se uma caracterização dinâmica do processo de interacção (Nguyen *et al*, 2007).

Para além da extraordinária sensibilidade, a característica que define este tipo de ressonância é o facto de permitir a determinação de parâmetros de interacção, tanto termodinâmicos (constante de equilíbrio, estequiometria e Energia de Gibbs), como cinéticos (Monchaud *et al*, 2008).

Apesar de tudo, como a RPBS se baseia num sistema para o qual, vários parâmetros têm de ser cuidadosamente controlados: selecção do “chip”, força iónica da solução, temperatura, solução tampão, todo o cuidado é pouco aquando da análise dos dados recolhidos (Monchaud *et al*, 2008).

*

A Espectrometria de Massa “Electrospray Ionization” (MS-ESI) emergiu como uma técnica poderosa para seleccionar compostos que interagem com o DNA por ligações não covalentes. Esta técnica permite o cálculo directo da estequiometria de todos os complexos formados, incluindo as espécies menores. A quantificação das espécies de DNA ligadas ou livres, permite a determinação directa da quantidade de ligando ligado, das constantes de ligação no equilíbrio e por conseguinte, da selectividade por comparação com diferentes alvos (Monchaud *et al*, 2008).

A MS-ESI não requer oligonucleótidos modificados, permitindo que se use uma grande variedade de moléculas de DNA. Contudo, o electrospray é incompatível com a presença de sais alcalinos na amostra, sendo portanto necessário substituir o cloreto de sódio ou o cloreto de potássio por acetato de amónio. Este facto origina duas limitações: ❶ é necessário aplicar um “desalting” aos oligonucleótidos, para a análise das estruturas de DNA com mais de cinquenta bases, e ❷ em alguns casos, a estrutura dos quadruplexos altamente polimórficos, pode ser diferente em acetato de amónio relativamente ao cloreto de sódio ou potássio. Para além disto, a MS-ESI requer conhecimentos específicos e equipamentos relativamente dispendiosos (Monchaud *et al*, 2008).

*

A diálise competitiva também permite a análise da associação de pequenas moléculas com várias formas de ácidos nucleicos, de um modo quase ilimitado. Esta metodologia baseia-se na associação, em equilíbrio, de um possível ligando, quando dialisado com um painel seleccionado de estruturas de DNA, provendo um acesso directo a parâmetros quantitativos dessa associação (Monchaud *et al*, 2008).

Adaptado para testes de várias amostras em simultâneo, este protocolo tem algumas desvantagens: tem uma preparação dos ácidos nucleicos muito demorada, para além de depender das propriedades espectroscópicas do ligando (fluorescência, absorvância UV /Vis) (Monchaud *et al*, 2008).

4. OBJECTIVO

O objectivo deste trabalho de investigação foi testar a possibilidade de utilizar pequenas moléculas, com afinidade para o DNA, como ligandos em cromatografia de afinidade, na purificação de pDNA para TG.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Material biológico

A estirpe bacteriana utilizada foi a *Escherichia coli* DH5 α , conservada em crio-tubos a -80 °C, numa solução de 30% (v/v) de glicerol e 70% (v/v) de meio de cultura. Esta estirpe corresponde a células competentes, transformadas com o plasmídeo pVAX1-LacZ[®] de 6050 pares de bases (Invitrogene[™]), possuindo como marca selectiva o gene de resistência à kanamicina. (Ver figura A1 do Apêndice 9.1)

5.2. Reagentes

Os passos de Lise e Purificação do Plasmídeo foram efectuados usando o Kit Plasmid Maxi da Quiagen[®], onde todos os reagentes, excepto o isopropanol, foram fornecidos.

Na tabela IV estão especificados os diferentes reagentes, usados em cada um dos restantes passos do trabalho experimental.

Tabela IV – Dados dos reagentes usados no trabalho experimental

	Reagentes	Grau de pureza (%)	Fornecedor
Processo de Pré-Fermentação e Fermentação Celulares	LB agar	—	USB
	Triptona	—	Sigma
	Extracto de Levedura	—	Merck
	Dihidrogeno fosfato de potássio	99	Sigma
	Fosfato de potássio monobásico	99	Riedel – de Haën
	Sulfato de Kanamicina	—	Calbiochem
Electroforese em Gel de Agarose	Agarose	—	GibcoBRL Life Technologies
	Ácido acético	100	Merck
	EDTA	—	Sigma
	Azul de Bromofenol	—	Sigma
Determinação das constantes de ligação entre ligandos e pDNA	Trissulfato de Neomicina sal Hidratado	—	Sigma Aldrich

Clivagem da ligação acetal da berberina	Diclorometano	—	José M. Vaz Pereira S.A.
	Éter Etilico	99,5	Riedel – de Haën
	Tricloreto de Alumínio	> 98	Merck
	Acetonitrilo	99,7	Lab. Scan Analytical Science
	Ácido Fórmico	98 - 100	Merck
	Pentacloreto de Fósforo	95	Merck
	Sulfato de sódio	≥ 99	Sigma
	Tolueno	99,7	Merck
Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	(Metil Sulfóxido) – d6, 99,5+ atom % D (DMSO)	—	Sigma Aldrich
Espectro de Infravermelho (IV)	Brometo de Potássio	99	Sigma Aldrich
Preparação do Suporte Cromatográfico Epóxi – (CH ₂) ₄ – Sepharose	Borohidreto de sódio	95	Riedel – de Haën
	Sepharose™ CL-6B	—	Amersham Pharmacia Biotech
	1,4-bis-(2,3-epóxi-propóxido) de butilo	62	Sigma
	Tiosulfato de sódio	> 99	Fluka
Ensaio no “Fast Protein Liquid Chromatography” (FPLC®)	Sulfato de amónio	99	Panreac
Outros reagentes e Reagentes Comuns	Etanol Absoluto	99,8	Riedel – de Haën
	Clorofórmio	—	Pronalab
	Hidróxido de Sódio	98	Sigma Aldrich
	Metanol	—	Pronalab
	Cloreto de Berberina	—	Sigma Aldrich
	Brometo de Etídeo	—	aMRESCO
	Isopropanol	99,8	Panreac
	Cloreto de Sódio	99,5	Panreac
	Tripton X-100	—	Sigma
	Tris-Base	99,5	Riedel – de Haën
	Glicerol	86 - 88	Riedel – de Haën
	Ácido Clorídrico	37	Riedel – de Haën

Todos os sais utilizados são de grau analítico e as respectivas soluções aquosas foram preparadas em água destilada, purificada pelo sistema Millipore.

O marcador de pesos moleculares utilizado na análise das amostras por electroforese em gel de agarose foi o 1 Kb DNA Ladder da Invitrogene™. (Ver figura A2 do Apêndice 9.2)

5.3. Material e Equipamentos

Na tabela V estão especificados todos os equipamentos usados ao longo do trabalho experimental.

As determinações da absorvância, para controlo do crescimento celular nas fermentações, foram efectuadas em células de plástico com um percurso óptico de 1 cm.

Por sua vez, as determinações para calcular a concentração do pDNA foram efectuadas em células de quartzo, também com um percurso óptico de 1 cm.

Já as leituras da fluorescência foram efectuadas em cuvettes de plástico descartáveis, específicas para esse tipo de leitura, também elas com um percurso óptico de 1 cm.

Foram usadas células de vidro, com um percurso óptico de 1cm, na determinação dos espectros UV/Visível.

As Cromatografias de Camada Fina (CCF) foram executadas em placas pré-revestidas com sílica gel da Macherey – Nagel Alugram® SIL G/UV₂₅₄ de 0,2 mm. Foi também usado papel de filtro da Macherey – Nagel de 125 mm e papel indicador pH universal Nahita. A filtração das soluções a usar no sistema FPLC® foi realizada com filtros de membrana de nylon 100/PK Nylaflo™, 0,2 µm – 90 mm, da PALL.

Ao longo do trabalho foi também utilizado material de uso corrente a nível laboratorial, de vidro, plástico e metal.

Tabela V – Dados dos equipamentos usados no trabalho experimental

Material/Equipamento	Características
Agitadores vórtex	J. P. Selecta
Balanças	Adam Equipment co Ltd ADP; Máx.110g ; Divisão: 0,001 g
	Sartorius CP225D Max. 220 g; Divisão: 0,01 mg
Medidor de pH	Metrohm 744 pH meter

Micropipetas		Eppendorf	
		Gibson – Pipetman	
Placas de aquecimento com Agitação		J. P. Selecta Agimatic – E 1600 rpm	
Placas de agitação		SBS Magnéticoagitador A - 01	
		J. P. Selecta ASINCRO 10000	
Autoclave		AJC Uniclave 88	
Estufa		J. P. Selecta INCUDIGIT	
Incubadora orbital		ABALAB Agitorb200	
Centrífuga		Sigma 3-18K Sartorius	
Sistema de Electroforese	Unidades Horizontais	Biorad Mini-Sub Cell GT	
	Fonte de Alimentação	Biorad POWER PAC Basic	
	Sistema de Imagem	Vilber Lourmat Câmara CV-A50	
	Software	BioCapt Versão 10.02	
Espectrofluorímetro	Equipamento	Horiba Jobin Yvon FluoroMax 4	
	Software	FluorEssence vs 2.1.0.0 Horiba Jobin Yvon Powered by Origin 7.5878	
Espectrofotómetros	UV/Visível Feixe simples	Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer	
	UV/Visível Feixe duplo	Equipamento	Helios α UNICAM
		Software	Vision Scan 3.40 Unicam Limited
Espectrómetro IV	Equipamento	Mattson 5000 FTIR Spectrometer UNICAM	
	Software	WinFirst 3.97 Mattson Instruments	
Espectrómetro de Ressonância Magnética Nuclear	Equipamento	Brücker ACP 250-P (250.13 e 62.90 MHz) / Brüker ARX 400 Avance (400.13 e 100.61 MHz)	
	Software	MestRe – C 4.8.6.0	
Bomba de Vácuo		EDWARDS 3	
Manta de Aquecimento		J. P. Selecta	
Rota Vapores	Equipamento	Büchi Rotavapor R – 114	
	Banho	Büchi Waterbath B – 480	
	Bomba de Vácuo	Büchi Vacuum Controller B - 721	
Ultrasons		J. P. Selecta Ultrasons – H	
Lâmpada UV para visualização das CCFs		Vibber LourMat	

Banho com agitação		Grant OLS 200
“Fast Protein Liquid Chromatography” (FPLC®)	Controlador LCC-501 Plus	Amersham Pharmacia Biotech
	Bombas P-500	
	Detector de condutividade	
	Unidade óptica UV-1	
	Registador REC 112	
	Colector de fracções FRAC-100	
	Coluna 1,5 cm x 10 cm	

Na descrição dos compostos, os dados obtidos para o IV são indicados pela seguinte ordem: estado físico da amostra [KBr (em pastilha de brometo de potássio)], frequência do máximo de uma banda de absorção ($\nu_{\text{máx}}$ em cm^{-1}), tipo de banda [F (forte), m (média), f (fraca) ou l (larga)] e atribuição a um grupo de átomos na molécula. Sempre que a um grupo de átomos esteja atribuída mais que uma banda, de tipos diferentes, as mesmas são caracterizadas individualmente.

No caso dos resultados obtidos para o RMN ^1H , a ordem é a seguinte: solvente, desvio químico (δ em ppm), intensidade relativa (nH, como número de prótons), multiplicidade do sinal [s (singleto), d (duplete) e t (tripleto)], constante de acoplamento (J , em Hz) e atribuição do próton na molécula.

5.4. Soluções, Meios de Cultura e Géis

5.4.1. Soluções

5.4.1.1. Solução de KH_2PO_4 170 mM + K_2HPO_4 720 mM

- Para um volume de 300 ml:
- 7,011 g de KH_2PO_4
 - 38,003 g de K_2HPO_4
 - Água destilada até perfazer o volume

5.4.1.2. Tampão de Reutilização das Colunas Qiagen®

- Para um volume de 50 ml:
- 8,855 g de NaCl (3M)
 - 75 μl de Tripton X-100 (0,15%)
 - Água destilada até perfazer o volume

5.4.1.3. Tampão de ressuspensão Tris-HCl 10 mM pH=8,0

- Para um volume de 250 ml:
- 0,306 g de Tris-Base
 - Água destilada até perfazer o volume
 - Acertou-se o pH para 8,0

5.4.1.4. Tampão de migração TAE 1x, pH=8,0 (Pré-Preparado)

- 40 mM Tris-Base
- 20 mM Ácido Acético
- 1 mM EDTA
- Água destilada até perfazer o volume requerido
- Acertou-se o pH para 8,0

5.4.1.5. Gel "Loading Buffer" (Pré-Preparado)

- 0,25% Azul de Bromofenol
- 30% Glicerol

5.4.1.6. Tampão Tris-HCl 0,05 M pH=7,5

- Para um volume de 500 ml:
- 3,044 g de Tris-Base
 - Água destilada até perfazer o volume
 - Acertou-se o pH para 7,5

5.4.1.7. Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl XM pH=7,5

5.4.1.7.1. Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,25 M pH=7,5

- Para um volume de 500 ml:
- 3,044 g de Tris-Base
 - 7,378 g de NaCl
 - Água destilada até perfazer o volume
 - Acertou-se o pH para 7,5

5.4.1.7.2. Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,5 M pH=7,5

- Para um volume de 500 ml:
- 3,044 g de Tris-Base
 - 14,756 g de NaCl
 - Água destilada até perfazer o volume
 - Acertou-se o pH para 7,5

5.4.1.7.3. Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,75 M pH=7,5

- Para um volume de 500 ml:
- 3,044 g de Tris-Base
 - 22,136 g de NaCl
 - Água destilada até perfazer o volume
 - Acertou-se o pH para 7,5

5.4.1.7.4. Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 1,0 M pH=7,5

- Para um volume de 100 ml:
- 0,609 g de Tris-Base
 - 5,903 g de NaCl
 - Água destilada até perfazer o volume
 - Acertou-se o pH para 7,5

5.4.1.7.5. Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 1,25 M pH=7,5

- Para um volume de 500 ml:
- 3,044 g de Tris-Base
 - 36,894 g de NaCl
 - Água destilada até perfazer o volume
 - Acertou-se o pH para 7,5

5.4.1.7.6. Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 1,5 M pH=7,5

- Para um volume de 500 ml:
- 3,044 g de Tris-Base
 - 44,273 g de NaCl
 - Água destilada até perfazer o volume
 - Acertou-se o pH para 7,5

5.4.1.7.7. Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 1,75 M pH=7,5

- Para um volume de 500 ml:
- 3,044 g de Tris-Base
 - 51,652 g de NaCl
 - Água destilada até perfazer o volume
 - Acertou-se o pH para 7,5

5.4.1.7.8. Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 2,0 M pH=7,5

- Para um volume de 500 ml:
- 3,044 g de Tris-Base
 - 59,030 g de NaCl
 - Água destilada até perfazer o volume
 - Acertou-se o pH para 7,5

5.4.1.7.9. Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 2,5 M pH=7,5

- Para um volume de 50 ml:
- 0,304 g de Tris-Base
 - 7,308 g de NaCl
 - Água destilada até perfazer o volume
 - Acertou-se o pH para 7,5

5.4.1.7.10. Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 3,0 M pH=7,5

- Para um volume de 50 ml:
- 0,304 g de Tris-Base
 - 8,855 g de NaCl
 - Água destilada até perfazer o volume
 - Acertou-se o pH para 7,5

5.4.1.7.11. Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 3,5 M pH=7,5

- Para um volume de 50 ml:
- 0,304 g de Tris-Base
 - 10,330 g de NaCl
 - Água destilada até perfazer o volume
 - Acertou-se o pH para 7,5

5.4.1.7.12. Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 4,0 M pH=7,5

- Para um volume de 50 ml:
- 0,304 g de Tris-Base
 - 11,806 g de NaCl
 - Água destilada até perfazer o volume
 - Acertou-se o pH para 7,5

5.4.1.8. Tampão Tris-HCl 0,05 M + (NH₃)₂SO₄ 2,25 M pH=7,5

- Para um volume de 100 ml:
- 0,609 g de Tris-Base
 - 30,032 g de (NH₃)₂SO₄
 - Água destilada até perfazer o volume
 - Acertou-se o pH para 7,5

5.4.1.9. Soluções de Brometo de Etídio (BrEt)

Nota: Para preparar as soluções de BrEt, determinou-se primeiro a concentração exacta da solução stock, diluindo 100X e medindo a absorvância a 480 nm, sabendo que $\epsilon = 5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Absorvância = $\epsilon l [\text{BrEt}]$, onde l é o percurso óptico). Ambas as soluções foram preparadas em Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl XM pH=7,5. Foi preparada uma solução de BrEt por cada concentração de tampão.

5.4.1.9.1. Solução A – Solução de BrEt 0,3 mM

- Para um volume de 5 ml:
- Volume específico da solução stock
 - Tampão até perfazer o volume

5.4.1.9.2. Solução B – Solução de BrEt 3,0 μM

- Para um volume de 10 ml:
- 100 μl de Solução A
 - Tampão até perfazer o volume

5.4.1.10. Soluções de DNA plasmídico

Nota: A preparação destas soluções esteve condicionada à concentração da solução de pDNA, obtida após cada passo de lise e purificação (Solução Mãe). Ambas as soluções foram preparadas em Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl XM pH=7,5. Foi preparada uma solução de pDNA por cada concentração de tampão.

5.4.1.10.1. Solução C – Solução de pDNA 3,0 mM

Para um volume de 2 ml: ◦ Volume específico da “Solução Mãe”
◦ Tampão até perfazer o volume

5.4.1.10.2. Solução D – Solução de pDNA 30 µM

Para um volume de 10 ml: ◦ Volume específico da “Solução Mãe”
◦ Tampão até perfazer o volume

5.4.1.10.3. Solução de pDNA 300 µg/ml

Para um volume de 500 µl: ◦ Volume específico da “Solução Mãe”
◦ Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 1,0 M pH=7,5 até perfazer o volume

5.4.1.11. Soluções de ligandos/Antibióticos (Solução E)

Nota: Algumas das soluções de ligando não puderam ser preparadas nos Tampões Tris-HCl 0,05 M + NaCl XM pH=7,5 por problemas de dissolução, sendo preparadas em água destilada. Foi preparada uma solução de ligando por cada concentração de tampão.

5.4.1.11.1. Solução de cloreto de Berberina 1,0 mM

Para um volume de 25 ml: ◦ 9,3 mg de cloreto de berberina
◦ Água destilada até perfazer o volume
(uma vez que é insolúvel na solução tampão)

5.4.1.11.2. Solução de Trissulfato de Neomicina 100 mM

- Para um volume de 10 ml:
- 2,2722 g de trissulfato de neomicina
 - Tampão até perfazer o volume

5.4.1.12. Solução de HCl 5%

- Para um volume de 50 ml:
- 6,8 ml de solução HCl 37%
 - Água destilada até perfazer o volume

5.4.1.13. Solução de HCl 15%

- Para um volume de 50 ml:
- 20,3 ml de solução HCl 37%
 - Água destilada até perfazer o volume

5.4.1.14. Solução de HCl 6N

- Para um volume de 50 ml:
- 24,84 ml de solução HCl 37%
 - Água destilada até perfazer o volume

5.4.1.15. Solução de HCl 0,01 M

- Para um volume de 200 ml:
- 0,166 ml de solução HCl 37%
 - Água destilada até perfazer o volume

5.4.1.16. Solução de NaOH 2N

- Para um volume de 50 ml:
- 4,057 g de NaOH
 - Água destilada até perfazer o volume

5.4.1.17. Solução de NaOH 1,0 M

- Para um volume de 50 ml:
- 2,0408 g de NaOH
 - Água destilada até perfazer o volume

5.4.1.18. Solução de NaOH 0,6 M + 2 mg de borohidreto de sódio por ml

- Para um volume de 50 ml:
- 1,224 g de NaOH
 - 100 mg de borohidreto de sódio
 - Água destilada até perfazer o volume

5.4.1.19. Solução de NaOH 0,1 M

- Para um volume de 200 ml:
- 0,816 g de NaOH
 - Água destilada até perfazer o volume

5.4.1.20. Solução de eluição para Cromatografia de Camada Fina: Clorofórmio + Metanol 20%

- Para um volume de 500 ml:
- 400 ml de clorofórmio
 - 100 ml de metanol

5.4.1.21. Solução de Ácido Fórmico 70%

- Para um volume de 50 ml:
- 35,4 ml de Ácido Fórmico
 - Água destilada até perfazer o volume

5.4.1.22. Solução de tiosulfato de sódio 1,3 M

- Para um volume de 100 ml:
- 20,762 g de tiosulfato de sódio
 - Água destilada até perfazer o volume

5.4.1.23. Solução de etanol 20%

- Para um volume de 250 ml:
- 50,1 ml de solução etanol 99,8
 - Água destilada até perfazer o volume

5.4.1.24. Solução de ligando (Berberina hidrolizada) 10 mg/ml

- Para um volume de 25 ml:
- 250 mg de ligando
 - Água destilada até perfazer o volume
 - Acertou-se o pH para 9

5.4.1.25. Solução de cloreto de Berberina 5 mg/ml

- Para um volume de 10 ml:
- 50 mg de cloreto de berberina
 - Água destilada até perfazer o volume
 - Acertou-se o pH para 9

5.4.2. Meios de Cultura

5.4.2.1. Meio sólido LB (Luria-Bertani) – Agar 35 g/l + Kanamicina 30 µg/ml

- Para um volume de 100 ml:
- 3,5 g de LB - Agar
 - Água destilada até perfazer o volume
 - 100 µl de Solução kanamicina 30 mg/ml (Pré-Preparada)

5.4.2.2. Meio líquido TB (“Terrific Broth”)

- Triptona 1,2% (p/v)
- Extracto de Levedura 2,4% (p/v)
- Sais: KH_2PO_4 17 mM + K_2HPO_4 72 mM
- Glicerol 55 mM
- Kanamicina 30 µg/ml (Pré-Preparada)

- Para um volume de 50 ml:
- 0,6 g de Triptona
 - 1,2 g de Extracto de Levedura
 - 5 ml de Solução KH_2PO_4 170mM + K_2HPO_4 720mM
 - 200 µl de Glicerol
 - Água destilada até perfazer o volume
 - 50 µl de Solução kanamicina 30 mg/ml

5.4.3. Géis

5.4.3.1. Gel de Agarose a 1% + BrEt 0,5 µg/ml

- Para um volume de 40 ml:
- 0,4 g de Agarose
 - Tampão TAE 1x até perfazer o volume
 - 1 minuto no microondas
 - 40 µl de Solução de BrEt 0,5 mg/ml (Pré-Preparada), depois de arrefecido

5.5. Fermentação Celular

Nota: De modo a garantir as condições assépticas necessárias para o crescimento das bactérias recombinadas, os meios de cultura, erlenmeyers, todo o material que entrou em contacto com a cultura de bactérias, e todo aquele que iria entrar em contacto com meios estéreis e com os meios em crescimento, foi esterilizado em autoclave, à pressão de 1 bar, a 121°C, durante 20 minutos. De forma a manter a esterilidade do meio de fermentação, todas as adições aos meios foram efectuadas à chama, bem como as manipulações do microrganismo (inoculação e recolha de amostras). A adição da kanamicina foi efectuada após a autoclavagem, para evitar a degradação do antibiótico.

1. Depois de autoclavado, o erlenmeyer com o meio LB-Agar arrefeceu-se em água corrente e, junto à chama, juntou-se a kanamicina.
2. Espalharam-se 5 placas de Petri semi-abertas à volta da chama, e o meio LB-Agar foi vertido no seu interior, de modo a que todas ficassem com quantidades semelhantes. Esperaram-se alguns minutos para solidificar e as placas que não iriam ser utilizadas, foram armazenadas a 4°C.
3. As células com o plasmídeo, retiradas dos tubos criogénicos do WCB, plaquearam-se em meio LB – Agar sólido (35 g/l), com 30 µg/ml de kanamicina. O crescimento foi efectuado durante a noite, numa estufa à temperatura de 37°C, até se observar a formação de colónias crescidas.

5.5.1. Pré-Fermentação

1. Com uma ansa devidamente esterilizada, e junto à chama, retiraram-se algumas colónias das placas e inocularam-se em 50 ml de meio TB, com 30 µg/ml de kanamicina, num erlenmeyer de 250 ml.
2. O crescimento efectuou-se numa incubadora orbital, a 37°C e com agitação de 250 rpm, até as células terem atingido uma densidade óptica de aproximadamente 2,6, a 600 nm.

5.5.2. Fermentação

1. Após a densidade óptica aceitável ter sido atingida, inoculou-se um volume específico da pré-fermentação em 250 ml de meio TB, com 30 µg/ml de kanamicina, num erlenmeyer de 1000 ml (a fermentação iniciou-se com uma DO de aproximadamente 0,2).
2. O crescimento efectuou-se “over night”, numa incubadora orbital a 37°C e com agitação de 250 rpm, até as células terem atingido uma densidade óptica superior a 2,6, a 600 nm.
3. As células separaram-se do meio de cultura por centrifugação a 5445 x g, durante 25 minutos, à temperatura 4°C. O sobrenadante descartou-se e o sedimento armazenou-se a -20°C, para ser posteriormente usado no passo de lise e purificação.

5.6. Reutilização das Colunas de Purificação Qiagen®

(Técnica adaptada de Chang et al, 1999)

1. As colunas foram lavadas com água destilada. Entretanto preparou-se o tampão de reutilização.
2. Cada coluna foi equilibrada 2 a 3 vezes com tampão.

5.7. Lise Alcalina e purificação do Plasmídeo

Nota1: Estes passos foram efectuados por adaptação do protocolo constante no Kit Plasmid Maxi da Quiagen®.

A) Colheita e lise da cultura de bactérias

1. Ao sedimento resultante de 250 ml de meio de fermentação, adicionaram-se 2x10 ml de uma solução Tampão P1 (50 mM Tris-Cl; pH=8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A), levando-se ao vórtex para facilitar a ressuspensão das células.
2. Após a obtenção de uma mistura homogénea, adicionaram-se lentamente às paredes do frasco, 2x10 ml de solução Tampão P2 (200 mM NaOH; 1% (p/v) SDS). Homogeneizou-se lentamente 4 a 6 vezes e deixou-se repousar 5 minutos, à temperatura ambiente.

3. Adicionaram-se lentamente às paredes do frasco 2x10 ml de solução Tampão P3 (3,0 M de acetato de potássio, pH=5,5), previamente arrefecida, e homogeneizou-se lentamente 4 a 6 vezes, colocando-se depois o frasco a repousar no gelo durante 20 minutos, de modo a acelerar a precipitação.

B) “Clearing” do lisado bacterial

4. A solução obtida centrifugou-se a 18000 g durante 30 minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante transferiu-se para tubos de fundo redondo, e centrifugou-se a 18000g durante 15 minutos, à temperatura de 4°C.
5. As colunas de purificação equilibraram-se por adição de 2x10 ml de Tampão QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS; pH=7,0; 15% isopropanol (v/v); 0,15% triton X – 100 (v/v)).
6. Adicionou-se todo o sobrenadante a cada coluna e deixou-se eluir. Adicionaram-se depois 2x (2x30) ml de Tampão QC (10 M NaCl; 50 mM MOPS pH=7; 15% isopropanol (v/v)) e deixou-se eluir novamente.
7. Adicionaram-se 2x15 ml de Tampão QF (1,25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl; pH=8,5; 15% isopropanol (v/v)), recolhendo-se o eluato para novos tubos de fundo redondo, que se inseriram depois no gelo.

C) Precipitação, lavagem e redissolução do DNA plasmídico

8. Em seguida, adicionaram-se 2x (0,7 x volume de todo o QF recolhido) de isopropanol (2x10,5ml) para precipitação do DNA. Homogeneizou-se lentamente 4 a 6 vezes e centrifugou-se a 16000 g, durante 30 minutos, à temperatura de 4°C.
9. O sobrenadante descartou-se e os frascos deixaram-se abertos durante cerca de 5 minutos, invertidos sobre papel absorvente, de modo a remover os vestígios de isopropanol.
10. O DNA plasmídico redissolveu-se em 1 ml de Tampão de Ressuspensão Tris-HCl 10 mM, pH=8,0 e analisou-se em electroforese em gel de agarose 1%.

Nota2: A concentração da solução de pDNA puro obtida, foi determinada a partir da leitura da absorvância desta solução a 260 nm, lida numa célula de quartzo, considerando-se que $\epsilon = 13000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e Absorvância = $\epsilon l [\text{pDNA}]$, onde l é o percurso óptico.

5.8. Electroforese em Gel de Agarose

1. As separações efectuaram-se em 40 ml de gel de agarose a 1%, corados com uma solução de brometo de etídio a 0,5 µg/ml, em tampão TAE 1x.
2. Após a preparação do gel, este foi vertido na unidade horizontal adequada, aplicou-se um pente para a formação dos poços e deixou-se polimerizar à temperatura ambiente.
3. Depois de decorrida a polimerização, retirou-se o pente e o gel imergiu-se em Tampão de Migração TAE 1x.
4. As amostras (35 µl) prepararam-se, sendo cada uma constituída por 5 µl de Gel "loading buffer" e 30 µl de amostra (diluída para 20 µg/ml e 50 µg/ml em Tris-HCl 10 mM, pH=8,0).

Nota: Para comparação e identificação das amostras em análise aplicou-se, a todos os géis, um marcador de pesos moleculares.

5. As amostras introduziram-se nos poços do gel, procedendo-se depois à montagem do sistema de electroforese.
6. A electroforese deixou-se correr a uma diferença de potencial de 100 V, durante 40 a 50 min.
7. Após decorrido esse tempo, o gel retirou-se do tampão de migração, fotografou-se e analisou-se.

5.9. Determinação das Constantes de Ligação entre Ligandos e pDNA

(Técnica adaptada de Strothkamp and Strothkamp, 1994)

5.9.1. Determinação do comprimento de onda de emissão máximo para o BrEt

1. Colocaram-se 2,2 ml de Tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl XM pH=7,5, 0,1 ml de Solução C e 50 µl de Solução A, numa cuvette de fluorescência. Esta colocou-se no espectrofluorímetro e a excitação definiu-se para 525 nm, a fenda (slit) de excitação para 5 nm e a de emissão para 3 nm.

2. O varrimento fez-se entre 560 e 640 nm e o máximo de emissão foi determinado. Esse valor foi utilizado para os ensaios seguintes.

5.9.2. Determinação do parâmetro k_f

1. Colocaram-se 2,5 ml de Solução B numa cuvette e determinou-se a Intensidade de Fluorescência (I_f). Adicionaram-se 20 μ l de Solução A e determinou-se novamente a I_f .
2. As adições de 20 μ l de Solução A repetiram-se 4 vezes, com leitura da respectiva I_f . Construiu-se um gráfico de I_f em função da concentração de BrEt, dando uma recta com declive k_f .

Nota: Neste ponto poderia ter-se determinado se existia interferência do ligando com o BrEt, adicionando 50 μ l de Solução E à cuvette e observando se existiria alteração significativa da I_f .

5.9.3. Determinação do parâmetro k_b

1. Colocaram 2,4 ml de Solução B numa cuvette, à qual se adicionaram depois 50 μ l de Solução C. A I_f determinou-se e a adição de Solução C repetiu-se, até não se observar aumento deste parâmetro.
2. Adicionaram-se 20 μ l de Solução A e o procedimento do ponto anterior (adição de Solução C) repetiu-se. A adição de Solução A e o restante procedimento, repetiram-se, pelo menos mais 3 vezes, de forma a obter 5 concentrações diferentes de BrEt.

Nota: Se a I_f subisse muito rapidamente, o volume de adição de Solução A reduzir-se-ia para 10 μ l.

3. Construiu-se um gráfico de I_f em função da concentração de BrEt, dando uma recta, com declive k_b . A concentração de BrEt calculou-se no primeiro ponto em que a I_f se manteve constante.

5.9.4. Determinação dos parâmetros de ligação entre o BrEt e o pDNA

1. Colocaram-se 2,7 ml de Solução D numa cuvette e determinou-se o I_f . Esta solução titulou-se com volumes de 20 μ l de Solução A. O I_f determinou-se após cada adição. Calculou-se o valor de BrEt ligado (c_b) para cada adição, pela seguinte expressão:

$$c_b = \frac{I_f - k_f c_{\text{total}}}{k_b - k_f}$$

A partir deste valor puderam determinar-se os parâmetros de ligação pela equação de Scatchard:

$$\frac{r}{c_f} = nK - rK \quad \text{em que}$$

$$r = \frac{c_b}{[\text{pDNA}]} \quad \text{e} \quad c_f = c_{\text{total}} - c_b$$

Onde K é a constante intrínseca de ligação do BrEt, r é o rácio da quantidade de BrEt em relação à concentração de DNA, n é o valor máximo de r e c_f é a concentração livre de BrEt.

Assim, um gráfico de r/c_f em função de r é uma recta com declive K. A intersecção do eixo dos x ($r/c_f=0$) é o valor de n.

5.9.5. Determinação dos parâmetros de ligação entre o pDNA e o ligando

1. O ponto 5.9.4. repetiu-se para vários valores de concentração de ligando, ou seja, a experiência anterior repetiu-se com a adição prévia de volumes de 75 μl , 150 μl , 225 μl , 300 μl e 375 μl de Solução E.

Se o ligando apresentou um comportamento competitivo relativamente ao BrEt, a constante de ligação foi determinada por:

$$\frac{1}{K_{\text{obs}}} = \frac{K'}{K} c'_t + \frac{1}{K}$$

Onde K' e c'_t são, a constante de ligação do ligando ao pDNA e a concentração total do ligando, respectivamente. K_{obs} é a constante de ligação entre BrEt e pDNA.

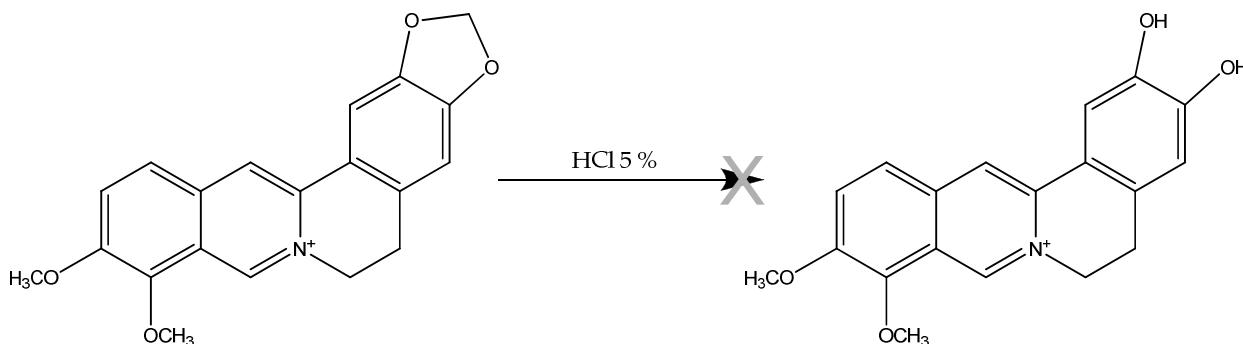
Assim, um gráfico de $1/K_{\text{obs}}$ em função de c'_t é um recta com declive K'/K , a partir do qual, se pode calcular facilmente o valor de K' .

Nota: Já que a solução de berberina foi preparada em água destilada, aquando da adição dos volumes desta à cuvette, adicionou-se também o mesmo volume de uma solução tampão, com o dobro da concentração de NaCl da solução tampão usada para preparar as restantes soluções. Desta forma, a concentração de sal na cuvette manteve-se a esperada para o estudo.

5.10. Imobilização do ligando ao suporte cromatográfico

5.10.1. Clivagem da ligação acetal (grupo metilenodióxido) da berberina

5.10.1.1. Abordagem 1 – Clivagem com HCl 5%

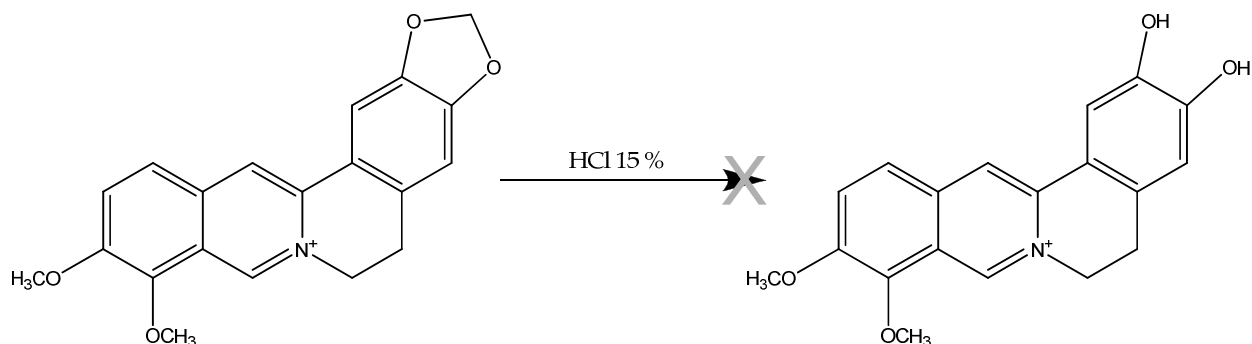


Esquema reaccional 1 - Clivagem da berberina usando HCl 5%

Juntaram-se 388,8 mg (≈ 1 mmol) de cloreto de berberina a 10 ml de uma solução aquosa de HCl 5% e a mistura agitou-se à temperatura ambiente durante 1 hora e 25 min., colocando-se depois a 50°C durante 6 horas e 15 min. Uma vez que, após 4 horas a mistura reaccional não estava homogênea, adicionaram-se 15 ml de acetonitrilo. Verificou-se por CCF [após neutralização de alíquota, diclorometano/metanol 20% (ver ponto 5.11)] que o composto obtido apresentava algumas diferenças relativamente ao material de partida.

O precipitado obtido filtrou-se, lavou-se com água destilada, para retirar o HCl, e com éter etílico, para retirar restos água, e secou-se sob vácuo. Obtiveram-se por este método 230,7 mg de um sólido amorfo amarelo, que se verificou ser a berberina. IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) 3046, 3025 (f, f, C-H_{arom}), 1601, 1505, 1479 (m, F, m, C=C_{arom}), 1422, 1334 (f, m, C-C_{arom}), 1422, 1389, 1277 (f, F, F, C-O_{alif}), 1422, 1389, 1334, 1277, 1231 (f, F, m, F, F C-N), 1389 (F, C-C_{alif}), 1059 (f, C-O-C) cm^{-1} ; RMN ^1H δ (DMSO-*d*₆) 3,20 (2H, s, ArCH₂), 4,06 (3H, s, CH₃), 4,09 (3H, s, CH₃), 4,94 (2H, s, N⁺-CH₂), 6,17 (2H, s, O-CH₂-O), 7,08 (1H, s, ArH), 7,78 (1H, s, ArH), 7,99 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, ArH), 8,19 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, ArH), 8,97 (1H, s, ArH), 9,91 (1H, s, ArH) ppm.

5.10.1.2. Abordagem 2 – Clivagem com HCl 15%

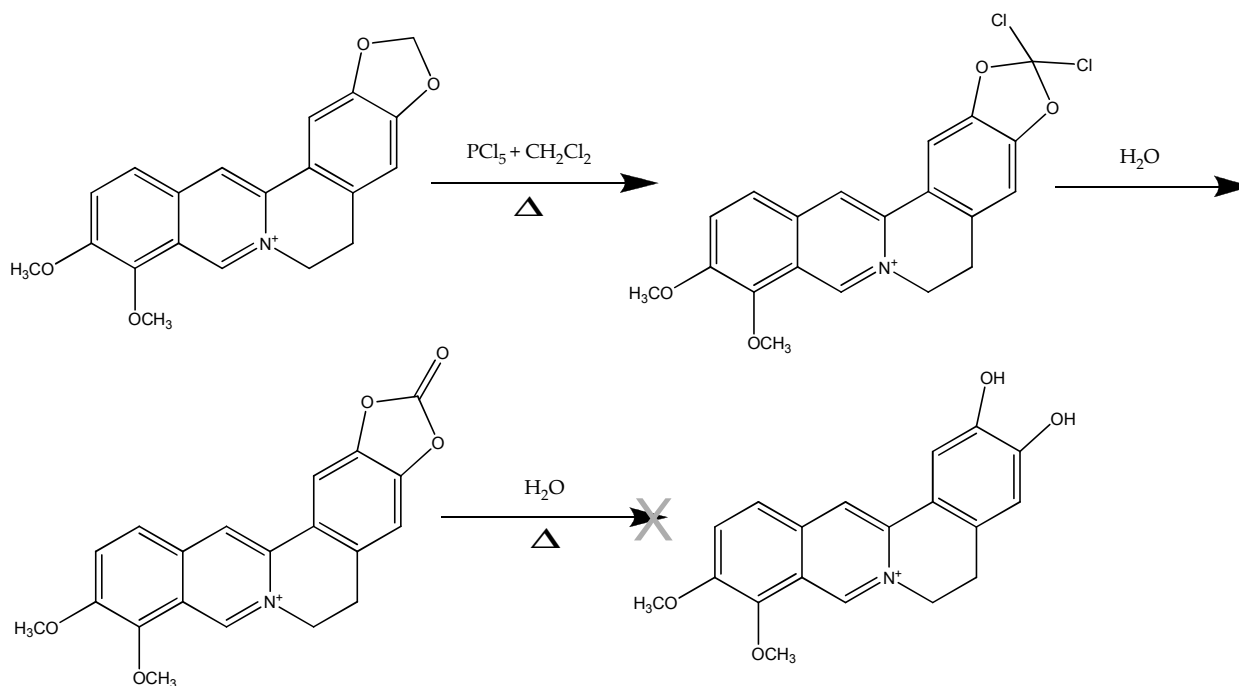


Esquema reaccional 2 - Clivagem da berberina usando HCl 15%

A uma suspensão constituída por 371,5 mg (≈ 1 mmol) de cloreto de berberina e 10 ml de uma solução aquosa de HCl 15%, adicionaram-se 15 ml de acetonitrilo. A mistura aqueceu-se até se verificar a dissolução da berberina, colocando-se depois, com agitação, a 50°C durante 15 horas e 15 min. Verificou-se por CCF, ao fim desse período, [após neutralização de aliquota, diclorometano/metanol 20% (ver ponto 5.11)], que a mistura reaccional era essencialmente constituída por berberina.

5.10.1.3. Abordagem 3 – Clivagem com PCl_5 como activador

(Técnica adaptada de Trammell, 1978)

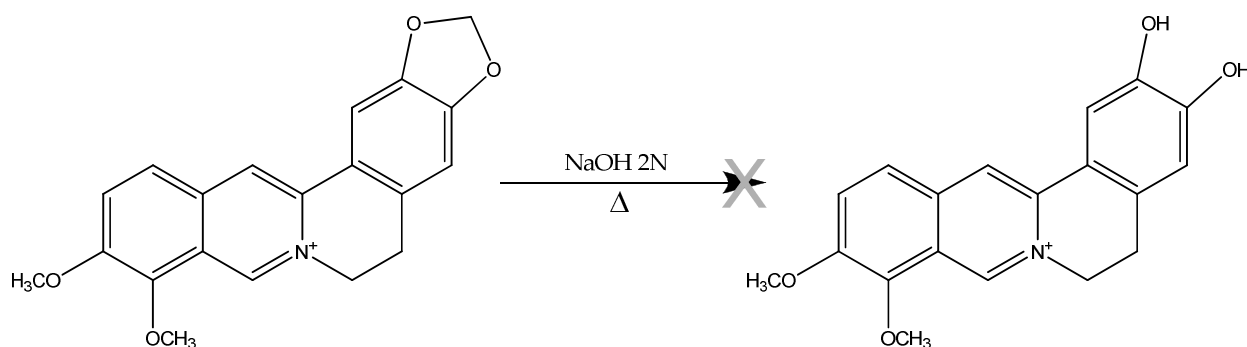


Esquema reaccional 3 - Clivagem da berberina usando PCl_5 como activador

A uma suspensão constituída por 383,1 mg (≈ 1 mmol) de cloreto de berberina e 125 ml de diclorometano, adicionaram-se, com agitação, 1,082 g (≈ 5 mmol) de pentacloreto de fósforo e a mistura aqueceu-se a 40°C , durante um período de 18 horas, após o qual se adicionou um pouco de água ao meio reaccional. Verificou-se depois, por CCF [diclorometano/metanol 20% (ver ponto 5.11)], que a mistura reaccional era essencialmente constituída por berberina.

5.10.1.4. Abordagem 4 – Clivagem com NaOH 2N

(Técnica adaptada de Kobayashi, 1978)

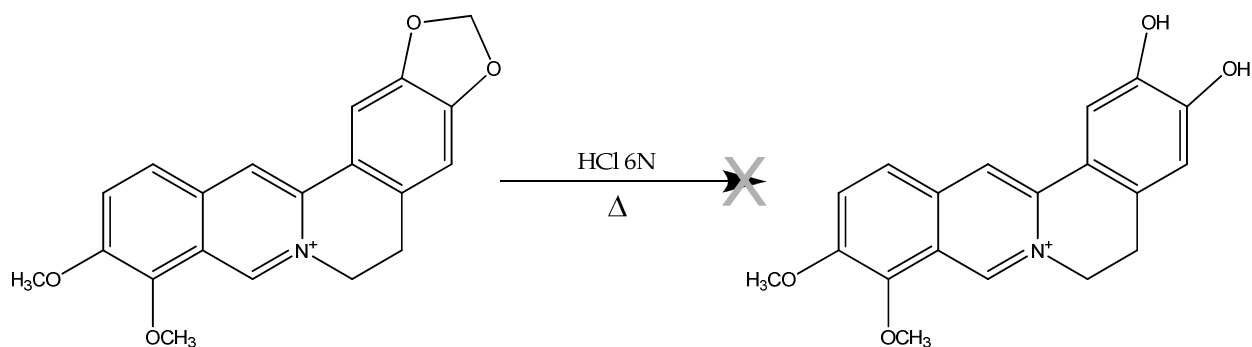


Esquema reaccional 4 - Clivagem da berberina usando NaOH 2N

Juntaram-se, com agitação, 20,1 mg ($\approx 0,05$ mmol) de cloreto de berberina a 10 ml de uma solução aquosa de NaOH 2N. A mistura colocou-se em refluxo, a 90°C , durante 8 horas e 40 min. Ao fim desse período verificou-se, por CCF [diclorometano/metanol 20% (ver ponto 5.11)], que a mistura reaccional era essencialmente constituída por berberina.

5.10.1.5. Abordagem 5 – Clivagem com HCl 6N

(Técnica adaptada de Ogura e Tsuchihashi, 1971)



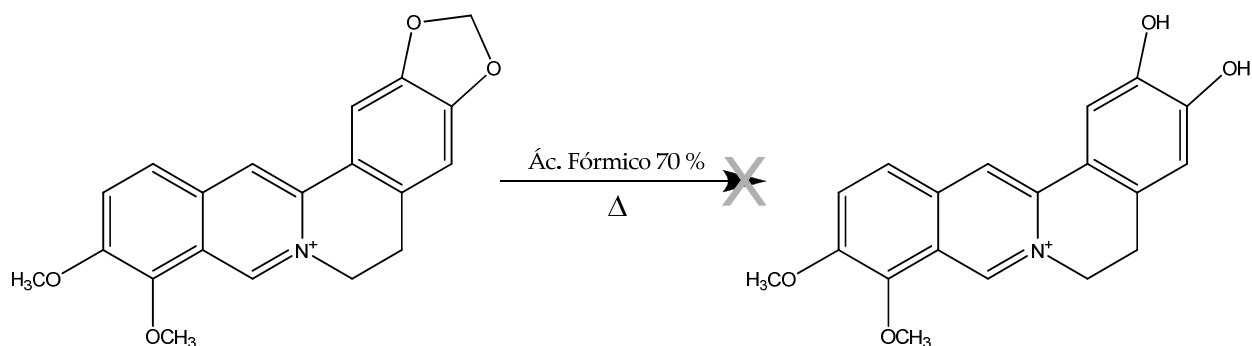
Esquema reaccional 5 - Clivagem da berberina usando HCl 6N

Juntaram-se, com agitação, 21,6 mg ($\approx 0,05$ mmol) de cloreto de berberina a 10 ml de uma solução aquosa de HCl 6N. A mistura colocou-se em refluxo, a 90°C, durante 8 horas e 40 min., colocando-se depois à temperatura ambiente, ainda com agitação, durante mais 61 horas. O meio reaccional neutralizou-se com solução aquosa de NaOH 2N, operação esta realizada com agitação e num banho de gelo.

O precipitado assim obtido foi filtrado, lavou-se com água destilada, para retirar o HCl, e com éter etílico, para retirar a água, e secou-se sob vácuo. Verificou-se depois por CCF [diclorometano/metanol 20% (ver ponto 5.11)], que a mistura reaccional era essencialmente constituída por berberina.

5.10.1.6. Abordagem 6 – Clivagem com Ácido Fórmico 70%

(Técnica adaptada de Ismael, 1997)

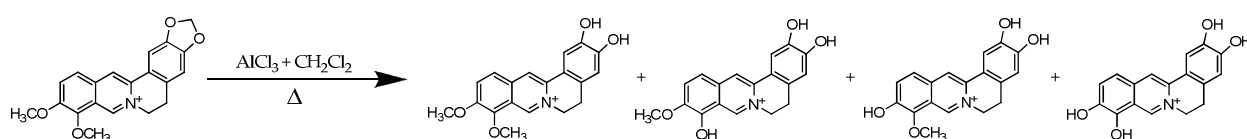


Esquema reaccional 6 - Clivagem da berberina usando ácido fórmico

Uma mistura de 100,5 mg ($\approx 0,27$ mmol) de cloreto de berberina e 2,9 ml de solução aquosa de ácido fórmico 70% aqueceu-se a refluxo, a 50°C, durante 2 horas, colocando-se depois em refluxo durante 14 horas e 40 min. Ao fim desse período verificou-se, por CCF [após neutralização de aliquota, diclorometano/metanol 20% (ver ponto 5.11)], que a mistura reaccional era essencialmente constituída por berberina.

5.10.1.7. Abordagem 7 – Clivagem com AlCl₃ como activador

(Técnica adaptada de Perruchon, 2003)



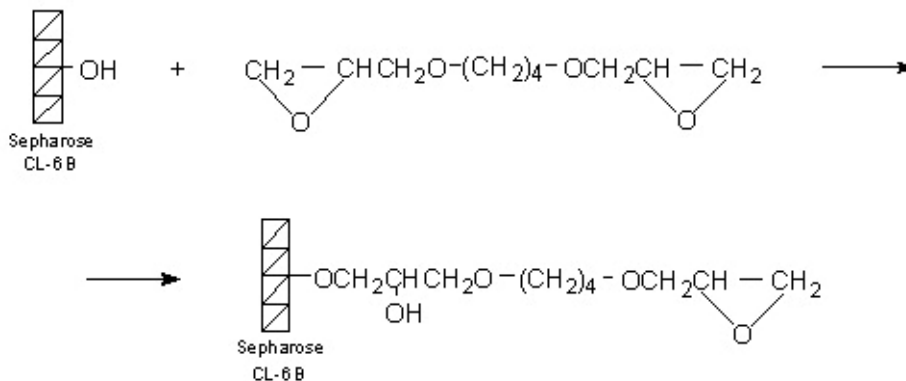
Esquema reaccional 7 – Clivagem da berberina usando AlCl₃ como activador

A uma suspensão constituída por 1,5 g (≈ 4 mmol) de cloreto de berberina e cerca de 164 ml de diclorometano, adicionaram-se, com agitação, 2,9 g ($\approx 0,02$ mol) de tricloreto de alumínio. A mistura refluxo-se durante 81 horas. Ao fim desse período verificou-se, por CCF [diclorometano/metanol 20% (ver ponto 5.11)] que a reacção estava completa.

O precipitado assim obtido foi filtrado, lavado com éter etílico e dissolvido em metanol. À solução anterior adicionou-se acetonitrilo (duas vezes o volume de metanol) e por evaporação do metanol obteve-se um precipitado laranja, que se filtrou e secou sob vácuo. Obtiveram-se 1,605 g de um sólido amorfo laranja; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) 3376 (l, O-H), 1606 (f, C=C_{arom}) cm⁻¹; RMN ¹H δ (DMSO-*d*₆) 2,97 (2H, s, ArCH₂), 3,97 (3H, s, CH₃), 4,00 (3H, s, CH₃), 4,77 (2H, s, N⁺-CH₂), 6,33 (1H, s, ArH), 7,08 (1H, s, ArH), 7,63 (1H, d, J= 9,3 Hz, ArH), 7,96 (1H, d, J= 8,8 Hz, ArH), 8,49 (1H, s, ArH), 9,70 (1H, s, ArH) ppm.

5.10.2. Preparação do Suporte Cromatográfico Epóxi – (CH₂)₄ – Sepharose™

(Técnica adaptada de Sundberg e Porath, 1974)



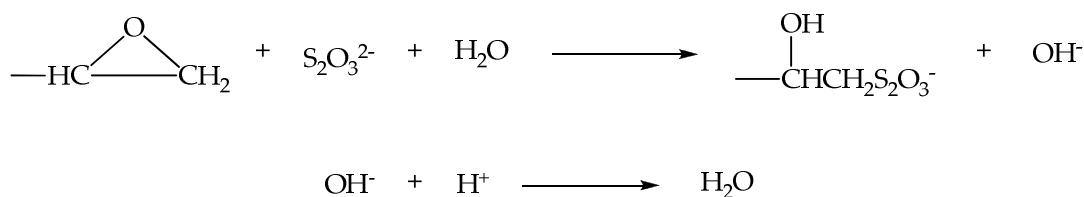
Esquema reaccional 8 – Imobilização de 1,4-bis-(2,3-epóxi-propóxido) de butilo em Sepharose™ CL-6B

1. A 10 g de Sepharose™ CL-6B (originou 10 g de gel), previamente lavadas com água destilada, juntaram-se 10 ml de 1,4-bis-(2,3-epóxi-propóxido) de butilo e 10 ml de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,6 M, contendo 2 mg de borohidreto de sódio por ml.
2. A suspensão agitou-se durante 8 horas a uma temperatura de 25°C. Ao fim desse período, a mesma filtrou-se a vácuo e lavou-se com grandes volumes de água destilada.
3. O gel guardou-se a 4°C em água destilada.

Nota: Procedeu-se à determinação quantitativa dos grupos epóxido (ponto 5.10.3).

5.10.3. Determinação quantitativa dos grupos epóxido do gel Epóxi – (CH₂)₄ – Sepharose™

(Técnica adaptada de Sundberg e Porath, 1974)

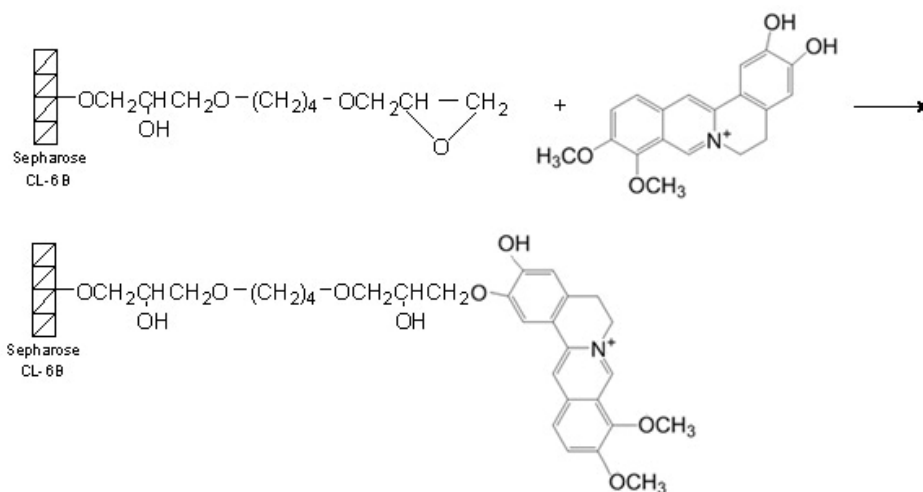


Esquema reaccional 9 – Reacção entre um grupo epóxido e o tiosulfato e titulação com HCl

1. A 100 mg de gel, adicionaram-se 5 ml de água destilada (pH=7) e 15 ml de uma solução aquosa de tiosulfato de sódio 1,3 M.
2. A mistura anterior titulou-se com uma solução aquosa de HCl 0,01 M até a reacção cessar (até pH=7).
3. Calculou-se a quantidade de grupos epóxido presentes no gel, relacionando-a com o volume de solução HCl 0,01 M gasto na titulação (Esquema reaccional 9).
4. O gel filtrou-se e colocou-se na estufa, a 40°C, de forma a se obter uma massa de gel seco.

5.10.4. Imobilização do ligando ao gel Epóxi – (CH₂)₄ – Sepharose™

(Técnica adaptada de GE Healthcare, 2006)



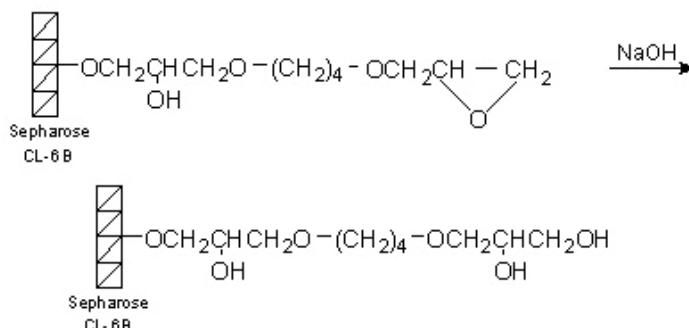
Esquema reaccional 10 – Imobilização do ligando ao gel Epóxi – (CH₂)₄ - Sepharose™

1. Ressuspenderam-se 2 g de gel em solução aquosa de ligando 10 mg/ml até esta cobrir a superfície do gel.
2. A suspensão colocou-se em agitação durante 24 horas, num banho a 25 – 40°C. Ao fim desse período, a mesma lavou-se com água destilada.
3. O gel guardou-se a 4°C, em água destilada.

Nota: Uma vez que o ligando é colorido, foi relativamente fácil verificar se foi ou não imobilizado no suporte. Foi também realizada uma imobilização paralela com beberina, que funcionou como branco.

5.10.5. Inativação dos grupos epóxido livres

(Técnica adaptada de Sundberg e Porath, 1974)



Esquema reaccional 11 – Inativação dos grupos epóxido livres com NaOH

1. O gel resultante do ponto anterior suspendeu-se em 20 ml de uma solução aquosa de NaOH 1,0M e a mistura deixou-se em repouso durante a noite, à temperatura de 4°C.
2. O gel filtrou-se, lavou-se com água destilada e guardou-se a 4°C (em água destilada).

5.11. Cromatografia de Camada Fina

1. Num tubo de amostra colocou-se um pouco da amostra a analisar e esta dissolveu-se num pequeno volume de um solvente orgânico específico (metanol, clorofórmio ou acetonitrilo). No caso das misturas reaccionais em meio aquoso (soluções de HCl): neutralizou-se uma pequena quantidade da solução, saturando-se depois com NaCl; a amostra extraiu-se com clorofórmio, a fase orgânica retirou-se para um novo tubo e secou-se com Na₂SO₄.
2. Recolheu-se um pouco da amostra com um tubo capilar e com este tocou-se na superfície da placa de CCF (devidamente identificada).

Nota: No caso das misturas reaccionais, aplica-se sempre o material de partida (controlo), a amostra de mistura reaccional e uma mistura dos dois.

3. As placas eluíram-se com uma solução de eluição de clorofórmio + metanol 20% e analisaram-se sob luz ultravioleta de 254 e 365 nm.

5.12. Preparação das amostras para construção do espectro de RMN ¹H

1. Dissolveram-se cerca de 10 – 20 mg de amostra numa pequena quantidade de DMSO. Sempre que a amostra se não dissolveu na totalidade, filtrou-se usando uma pipeta de pasteur e um pouco de algodão.
2. A solução colocou-se num tubo apropriado.

Nota: Os espectros de RMN ¹H foram realizados por um técnico especializado.

5.13. Espectros de Infravermelho (IV)

Nota: Antes de cada ensaio, todo o material é limpo com clorofórmio seco.

1. Limpou-se e montou-se todo o material necessário para preparar a amostra.
2. As amostras prepararam-se misturando brometo de potássio com uma pequena quantidade de amostra. A mistura reduziu-se depois a um pó fino e a partir deste, prepararam-se os discos de amostra.
3. Os espectros foram determinados.

5.14. Espectros UV/Visível

1. O solvente usado para todas as amostras e branco foi o metanol.
2. Os espectros foram traçados na zona do visível e UV.

5.15. Cromatografia de Afinidade no sistema FPLC[®]

1. A coluna empacotou-se com 2 g de gel ligando – Epóxi – (CH₂)₄ – Sepharose[™], montou-se no sistema e lavou-se com água destilada.
2. A coluna foi equilibrada com soluções tampão Tris-HCl 0,05 M, pH=7,5 com diferentes concentrações de NaCl ou Tampão Tris-HCl 0,05 M + (NH₃)₂SO₄ 2,25 M pH=7,5

3. Injectaram-se 200 ou 100 μl de amostra: solução de pDNA 150, 300 ou 600 $\mu\text{g/ml}$, previamente purificado (ponto 5.7).
4. Procedeu-se à eluição das espécies retidas na coluna por diminuição da força iónica do eluente. Usou-se para esse fim a solução tampão Tris-HCl 0,05 M pH=7,5.
5. Recolheram-se fracções de 0,5 ml e o seu conteúdo foi analisado por electroforese em gel de agarose 1%.

Notas:

O caudal utilizado em todos os passos foi de 0,4 ml/min.

A força iónica das amostras ajustou-se através da adição de sal, de forma a se obter uma concentração igual à do tampão usado, aquando da sua adsorção ao suporte cromatográfico.

Após cada ensaio a coluna foi lavada com uma solução de NaOH 0,1 M e água destilada. Os tampões e água destilada foram filtrados e desgaseificados antes de usados no sistema.

Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Produção e purificação do DNA plasmídico

Este passo foi repetido inúmeras vezes, para se obter pDNA em quantidades suficientes para a sua utilização nos passos posteriores. Em todas elas se verificou um bom crescimento celular, corroborado pelas densidades ópticas obtidas nas fermentações (crescimento “over night”).

O crescimento celular foi efectuado em erlenmeyer, e a purificação realizada com o Kit Plasmid Maxi da Quiagen®.

Na tabela VI estão apresentados os dados obtidos neste passo do trabalho experimental.

Tabela VI – Média das densidades ópticas das fermentações, no final do crescimento e concentração de pDNA obtido após purificação

Fermentação		pDNA	
Volume (mL)	Densidade óptica (nº de balões)	Concentração (M)	Volume (mL)
125	0,688 (1)	$1,029 \times 10^{-3}$	1,0
500	10,2 (2)	$1,47 \times 10^{-3}$	3
750	10,09 (3)	$1,57 \times 10^{-3}$	2,5
500	9,26 (2)	$1,498 \times 10^{-3}$	1,5
500	8,86 (2)	$1,85 \times 10^{-3}$	1,5
500	10,41 (2)	$2,809 \times 10^{-3}$	1,5
500	9,56 (2)	$2,377 \times 10^{-3}$	1,5
500	5,49 (2)	$2,437 \times 10^{-3}$	1,5
750	7,87 (3)	$2,669 \times 10^{-3}$	2,0
500	9,98 (2)	$2,482 \times 10^{-3}$	1,5
500	9,99 (2)	$2,796 \times 10^{-3}$	1,5
750	9,27 (3)	$3,496 \times 10^{-3}$	2,0
750	9,54 (3)	$4,415 \times 10^{-3}$	2,0
750	9,91 (3)	$4,75 \times 10^{-3}$	2,0
750	9,60 (3)	$3,958 \times 10^{-3}$	2,0

Uma vez que era necessário obter-se uma concentração de pDNA superior a $1,5 \times 10^{-3}$ M, a partir da terceira fermentação, a ressuspensão do pDNA, obtido de 250 mL de fermentação, passou a ser feita em 0,5 mL de Tampão de Ressuspensão Tris-HCl 10mM, pH=8,0.

6.2. Seleção positiva do DNA plasmídico

Uma vez que o plasmídeo pVAX1-LacZ[®] possui um gene de resistência à kanamicina, todas as culturas (placas de crescimento e meios) foram preparadas com uma quantidade específica desse antibiótico. A presença deste nos meios, permite assim seleccionar as bactérias que tenham incorporado o vector/plasmídeo, o qual lhes confere resistência a esse antibiótico.

As bactérias que não contêm plasmídeo têm tendência a ter um crescimento superior, relativamente às restantes, devido a uma taxa de crescimento mais elevada, uma viabilidade superior e/ou uma densidade celular também superior. A perda do pDNA das células é possível, devido ao facto dos plasmídeos se replicarem de forma autónoma, em relação ao DNA do hospedeiro, o que origina também algumas das isoformas indesejáveis. Estes factos levam a uma distribuição desigual do vector para as células filhas, após divisão células (O'Mahony *et al*, 2007).

Assim sendo, a estratégia de optimização consiste em encontrar formas para que o máximo de bactérias retenha o plasmídeo, mas num número não muito elevado, para restringir o consumo de energia e nutrientes. Uma forma de assegurar ambos os aspectos, passa então por incorporar um gene de resistência a antibióticos no vector. As bactérias que não contenham o plasmídeo, não conseguem sobreviver num meio de cultura que contenha o antibiótico. Ainda assim, a selecção por esta via, pode não originar uma produção elevada de pDNA nas bactérias (O'Mahony *et al*, 2007).

6.3. Electroforese de controlo

Após a extracção/purificação do pDNA, foram realizadas algumas electroforeses de controlo, todas elas com resultados semelhantes. Assim, e a título de exemplo, de seguida é apresentada somente uma delas (figura 19).

Antes de ser aplicada, a amostra foi diluída para uma concentração de 20 mg/mL.

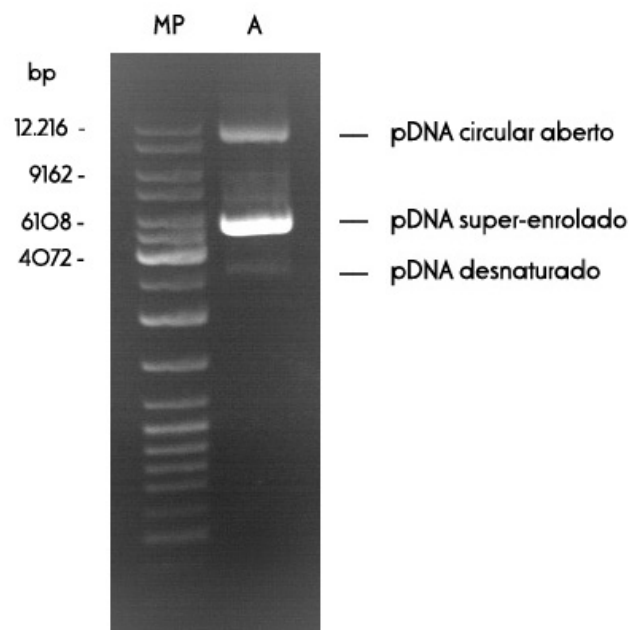


Fig. 19 – Fotografia do gel de electroforese de visualização do pDNA obtido numa das extracções/purificações, em gel de agarose 1%, com brometo de etídio como revelador. MP – Marcador de pesos moleculares da Invitrogene™ (ver apêndice 9.2); A – Amostra

Observando a figura 19 pode constatar-se que a isoforma de pDNA predominante, após o passo de lise e purificação, é a super-enrolada de cadeia dupla, ou seja a isoforma intacta e ideal para os ensaios seguintes.

A quantidade de pDNA circular aberto é bastante baixa e a forma desnaturada está presente em quantidades mínimas, pelo que se pode inferir que os passos de produção/extracção/purificação foram ultrapassados com algum sucesso.

6.4. Constantes de ligação entre ligandos e pDNA

Todos os gráficos e análise estatística presentes neste ponto, foram executados recorrendo ao software Microsoft® Office Excel 2003.

6.4.1. Cálculo dos parâmetros necessários para determinar as constantes de ligação

Os parâmetros cruciais para a determinação das constantes de ligação entre o pDNA e os ligandos são o k_f , k_b e K , sendo este último a constante de ligação entre o pDNA e o BrEt.

De seguida vai ser exemplificado o cálculo de cada um deles para a concentração de NaCl 1,0 M (concentração do sal no tampão usado), sendo os restantes valores, correspondentes às outras concentrações, apresentados em tabela e gráfico, no ponto 6.3.1.4.

6.4.1.1. Determinação do parâmetro k_f

Após o seguimento do protocolo constante no ponto 5.9.2., calculou-se a concentração de BrEt, na solução presente na cuvette, a cada medição. Esses dados, bem como a intensidade de fluorescência correspondente, estão apresentados na tabela VII.

Tabela VII – Dados para a determinação do k_f correspondentes à concentração 1,0 M de NaCl

Volume das soluções de BrEt (na cuvette)	Concentração da solução de BrEt a cada medição (M)	Intensidade de Fluorescência (If) (unidades arbitrárias – u.a.)
2,5 mL Solução B	$3,0 \times 10^{-6}$	$2,1006 \times 10^5$
+ 20 μ L Solução A	$5,357 \times 10^{-6}$	$3,8722 \times 10^5$
+ 20 μ L Solução A	$7,677 \times 10^{-6}$	$5,5202 \times 10^5$
+ 20 μ L Solução A	$9,961 \times 10^{-6}$	$7,1227 \times 10^5$
+ 20 μ L Solução A	$1,22 \times 10^{-5}$	$8,5317 \times 10^5$
+ 20 μ L Solução A	$1,44 \times 10^{-5}$	$1,01158 \times 10^6$

A partir dos dados da tabela anterior constrói-se um gráfico (1) de If em função da concentração de BrEt. Este corresponde a uma recta de calibração, cujo declive corresponde por sua vez ao k_f .

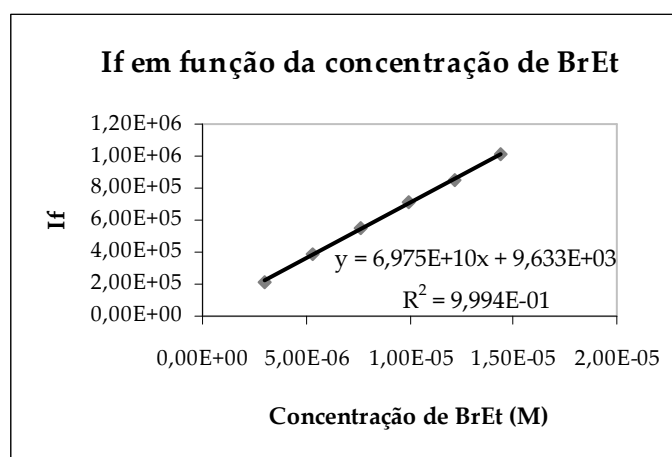


Gráfico 1 – Gráfico de If em função da concentração de BrEt para a concentração de 1,0 M de NaCl

Desta forma, o k_f é $6,975 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$.

Como se pode observar, a If aumenta, de forma linear, com o aumento da concentração de BrEt.

6.4.1.2. Determinação do parâmetro k_b

Após o seguimento do protocolo constante no ponto 5.9.3., calculou-se a concentração de BrEt, na solução presente na cuvette. Esses dados, bem como a intensidade de fluorescência correspondente, estão apresentados na tabela VIII.

Tabela VIII – Dados para a determinação do k_b correspondentes à concentração 1,0 M de NaCl

Volume das soluções de BrEt (na cuvette)	Concentração da solução de BrEt (M)	Intensidade de Fluorescência (If) (u.a.)
2,4 mL Solução B + 6x 50 μ L Solução C	$2,67 \times 10^{-6}$	$3,39321 \times 10^6$
+ 20 μ L Solução A + 50 μ L Solução C	$4,77 \times 10^{-6}$	$5,79158 \times 10^6$
+ 20 μ L Solução A + 50 μ L Solução C	$6,76 \times 10^{-6}$	$7,72939 \times 10^6$
+ 20 μ L Solução A + 50 μ L Solução C	$8,66 \times 10^{-6}$	$9,28886 \times 10^6$
+ 20 μ L Solução A + 50 μ L Solução C	$1,05 \times 10^{-5}$	$1,05187 \times 10^7$

A partir dos dados da tabela anterior constrói-se um gráfico (2) de If em função da concentração de BrEt. Este corresponde a uma recta de calibração, cujo declive corresponde por sua vez ao k_b .

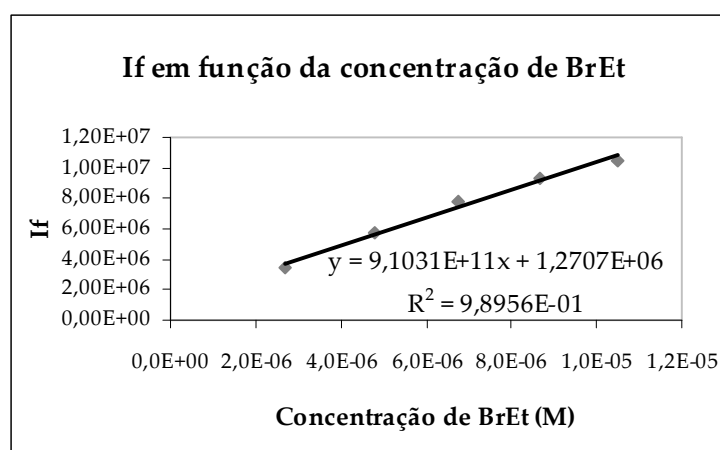


Gráfico 2 – Gráfico de If em função da concentração de BrEt para a concentração de 1,0 M de NaCl

Desta forma, o k_b é $9,1031 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$.

6.4.1.3. Determinação dos parâmetros de ligação entre o BrEt e o pDNA

Após o seguimento do protocolo constante no ponto 5.9.4., obtiveram-se os seguintes valores (Tabela IX).

Tabela IX – Valores para a determinação da constante de ligação do BrEt ao pDNA (K), correspondentes à concentração 1,0 M de NaCl

Volume (cuvette) (mL)	[DNA] (M)	[EtBr] (M)	If (u.a.)	c _b (M)	r	c _f (M)	r/c _f (M ⁻¹)
2,7	3,00E-05	—	—	—	—	—	—
2,72	2,98E-05	2,21E-06	2,30E+06	2,56E-06	0,085855	-3,51E-07	-244727
2,74	2,96E-05	4,38E-06	3,71E+06	4,05E-06	0,137086	3,27E-07	4,19E+05
2,76	2,93E-05	6,52E-06	4,68E+06	5,02E-06	0,171184	1,50E-06	1,14E+05
2,78	2,91E-05	8,63E-06	5,42E+06	5,73E-06	0,196794	2,90E-06	6,79E+04
2,8	2,89E-05	1,07E-05	5,99E+06	6,24E-06	0,215788	4,47E-06	4,83E+04
2,82	2,87E-05	1,28E-05	6,51E+06	6,68E-06	0,232612	6,08E-06	3,82E+04
2,84	2,85E-05	1,48E-05	6,89E+06	6,97E-06	0,24454	7,81E-06	3,13E+04
2,86	2,83E-05	1,68E-05	7,23E+06	7,21E-06	0,254412	9,58E-06	2,66E+04
2,88	2,81E-05	1,88E-05	7,53E+06	7,40E-06	0,26306	1,14E-05	2,32E+04
2,9	2,79E-05	2,07E-05	7,78E+06	7,54E-06	0,269863	1,32E-05	2,05E+04
2,92	2,77E-05	2,26E-05	8,02E+06	7,67E-06	0,276386	1,49E-05	1,85E+04
2,94	2,76E-05	2,45E-05	8,19E+06	7,71E-06	0,27982	1,68E-05	1,67E+04

A partir dos dados da tabela anterior construiu-se um gráfico (3) de r/c_f em função de r obtendo-se uma recta, cujo declive corresponde por sua vez ao K (constante de ligação do BrEt ao pDNA).

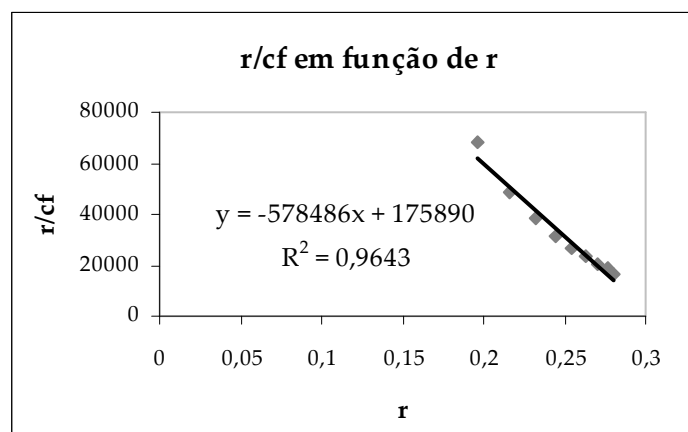


Gráfico 3 – Gráfico de r/c_f em função de r para a concentração de 1,0 M de NaCl

Desta forma, o K é 578486 M^{-1} .

6.4.1.4. Determinação dos parâmetros para as diferentes concentrações de NaCl

Os parâmetros para as restantes concentrações de sal foram determinados exactamente da mesma forma. Assim, para evitar que a apresentação se torne repetitiva, esses valores serão unicamente apresentados na tabela X e gráfico 4.

Tabela X – Parâmetros usados para calcular as constantes de ligação, para todas as concentrações de NaCl

Concentração de NaCl (M)	k_f (M^{-1})	k_b (M^{-1})	Constante de ligação do BrEt ao pDNA (M^{-1})
0,5	$7,6162 \times 10^{10}$	$9,4653 \times 10^{11}$	607554
0,75	$7,1886 \times 10^{10}$	$9,0238 \times 10^{11}$	408286
1,0	$6,975 \times 10^{10}$	$9,1031 \times 10^{11}$	578486
1,25	$7,7444 \times 10^{10}$	$9,6512 \times 10^{11}$	420876
1,5	$7,0434 \times 10^{10}$	$8,8369 \times 10^{11}$	403556
1,75	$7,6629 \times 10^{10}$	$9,348 \times 10^{11}$	396799
2,0	$7,0299 \times 10^{10}$	$8,6652 \times 10^{11}$	367914

No gráfico 4 estão representadas as rectas referentes a todas as concentrações de NaCl, cujo declive é a constante de ligação do BrEt ao pDNA (K). No gráfico 5 está representada a variação da constante de ligação do BrEt com a concentração de cloreto de sódio.

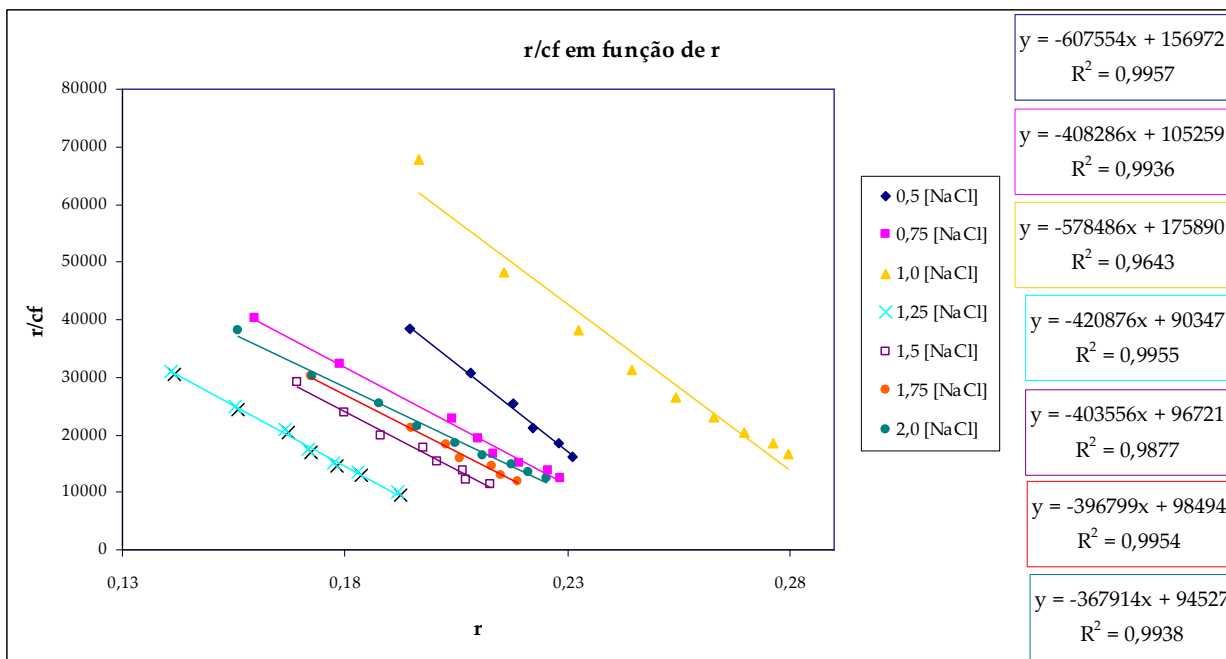


Gráfico 4 – Gráfico resumo de r/c_f em função de r para todas as concentrações de NaCl

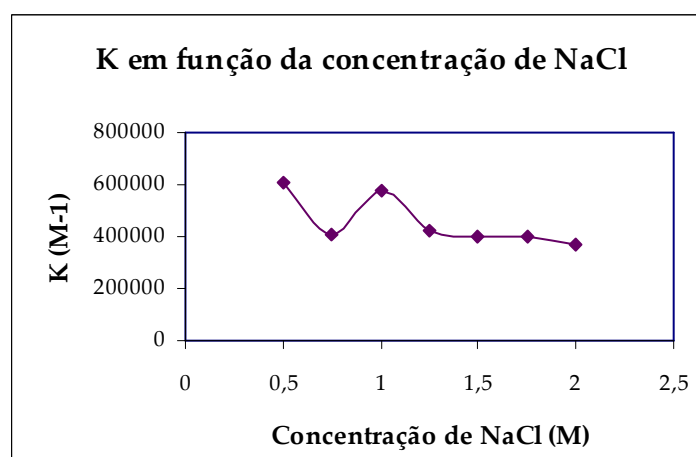


Gráfico 5 – Variação da constante de ligação do BrEt ao pDNA com a concentração de NaCl

Analisando a tabela X, pode observar-se que, os valores mais elevados para os parâmetros k_f e k_b foram obtidos com a concentração 1,25 M de NaCl.

Já K sofreu outro tipo de variação. Observando a tabela X e o gráficos 4 e 5, pode constatar-se que o valor mais alto de K foi obtido com uma concentração de sal de 0,5 M, sendo o valor mais baixo correspondente à concentração 2,0 M. Contudo, a constante não sofreu uma diminuição gradual, à medida que a concentração de NaCl aumentou, uma vez que se verificou um aumento para 1,0 M. A partir desta última concentração até 2,0 M, verificou-se uma diminuição gradual no valor de K .

Desta forma, a afinidade do BrEt para o pDNA diminui com o aumento da concentração de sal, ou seja com o aumento das forças electrostáticas no meio. Este facto é facilmente explicado se se considerar que o BrEt se liga ao DNA por intercalação,

forma esta dependente de forças de Van der Waals e de uma estabilização electrostática (Sinha *et al*, 2006). Uma vez que, a geometria dos locais de intercalação, bem como da molécula de pDNA, é influenciada pela força iónica e catões em solução (Hendry *et al*, 2007), e tendo em conta a forte componente electrostática entre o BrEt e o DNA, à medida que a concentração de NaCl aumenta, essa interacção electrostática diminui, assim como a constante de ligação.

O número máximo de locais de ligação por par de bases (n) pode ser calculado, para cada concentração, recorrendo à equação 4 do ponto 3.3.2.1 da introdução teórica, e aos dados de cada uma das rectas apresentadas no gráfico 4. Os respectivos valores estão apresentados na tabela seguinte.

Tabela XI – Relação entre o número máximo de locais de ligação por par de bases e a concentração de sal

Concentração de NaCl (M)	n
0,5	0,2584
0,75	0,2578
1,0	0,3041
1,25	0,2147
1,5	0,2397
1,75	0,2482
2,0	0,2569

Para a maior parte das concentrações, o valor de n é de cerca de 0,25 sendo apenas claramente superior no caso da concentração 1,0 M de NaCl, e inferior para 1,25 M.

Isto indica que, o número de locais disponíveis para a ligação com o BrEt, é superior no caso da concentração de sal 1,0 M, sendo esta portanto, a concentração ideal para se estudar a ligação na presença de um ligando.

Apesar de as diferenças serem mínimas, podem afectar, ainda que de uma forma subtil, o cálculo do valor das constantes de ligação dos ligandos ao pDNA.

6.4.2. Determinação das constantes de ligação entre o pDNA e a neomicina

Mais uma vez, para evitar que a apresentação se torne cansativa, os valores apresentados de seguida são os obtidos para a concentração 1,0 M de NaCl. Para além disso, como para cada concentração foram realizados três ensaios, os valores apresentados correspondem a apenas um deles, neste caso, ao primeiro. Os restantes valores, correspondentes às outras concentrações e ensaios, serão apresentados em tabelas e gráfico, no ponto 6.4.2.3.

6.4.2.1. Determinação dos parâmetros de ligação entre o pDNA e a neomicina

Após o seguimento do protocolo constante no ponto 5.9.5., obtiveram-se os seguintes valores para o primeiro ensaio (Tabelas XII - XVI). Em cada um dos casos, o K obtido corresponde à constante de ligação do BrEt ao pDNA, na presença de um determinado volume de ligando, neste caso a neomicina.

6.4.2.1.1. Na presença de 75 μ L de neomicina 100 mM

Tabela XII – Valores para a determinação da constante de ligação do BrEt ao pDNA (K), na presença de 75 μ L de neomicina 100 mM, correspondentes ao 1º ensaio da concentração 1,0M de NaCl

Volume (cuvette) (mL)	[DNA] (M)	[EtBr] (M)	If (u.a.)	c_b (M)	r	c_f (M)	r/ c_f (M ⁻¹)
2,775	3,00E-05	—	—	—	—	—	—
2,795	2,98E-05	2,15E-06	1,85E+06	2,03E-06	0,068064	1,19E-07	5,70E+05
2,815	2,96E-05	4,26E-06	2,94E+06	3,14E-06	0,106124	1,12E-06	9,44E+04
2,835	2,94E-05	6,35E-06	3,65E+06	3,82E-06	0,130085	2,53E-06	5,14E+04
2,855	2,92E-05	8,41E-06	4,32E+06	4,44E-06	0,152221	3,97E-06	3,84E+04
2,875	2,9E-05	1,04E-05	4,81E+06	4,86E-06	0,167692	5,58E-06	3,01E+04
2,895	2,88E-05	1,24E-05	5,19E+06	5,14E-06	0,178627	7,30E-06	2,45E+04
2,915	2,86E-05	1,44E-05	5,51E+06	5,36E-06	0,187704	9,05E-06	2,07E+04
2,935	2,84E-05	1,64E-05	5,74E+06	5,47E-06	0,192786	1,09E-05	1,77E+04
2,955	2,82E-05	1,83E-05	5,96E+06	5,58E-06	0,197933	1,27E-05	1,56E+04
2,975	2,8E-05	2,02E-05	6,19E+06	5,69E-06	0,203459	1,45E-05	1,41E+04
2,995	2,78E-05	2,2E-05	6,37E+06	5,75E-06	0,206734	1,63E-05	1,27E+04
3,015	2,76E-05	2,39E-05	6,49E+06	5,74E-06	0,207706	1,81E-05	1,14E+04

A partir dos dados da tabela anterior construiu-se um gráfico (6) de r/c_f em função de r , obtendo-se uma recta, cujo declive corresponde ao K (constante de ligação do BrEt ao pDNA).

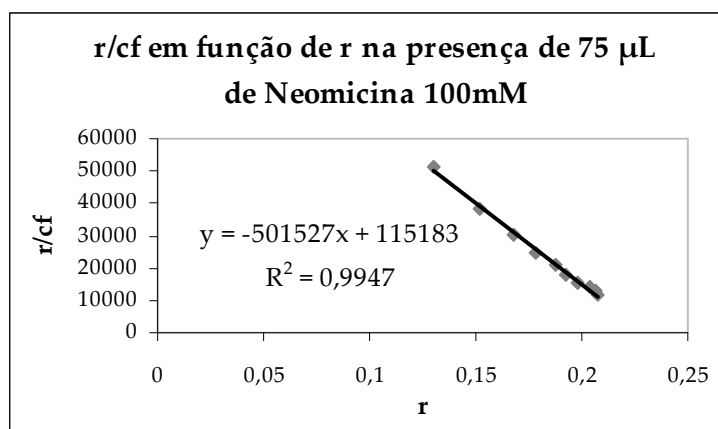


Gráfico 6 – Gráfico de r/c_f em função de r , para o 1º ensaio da concentração de 1,0 M de NaCl, na presença de 75 µL de neomicina 100 mM

Desta forma, o K , na presença de 75 µL de neomicina 100 mM, foi 501527 M^{-1} .

6.4.2.1.2. Na presença de 150 µL de neomicina 100 mM

Tabela XIII – Valores para a determinação da constante de ligação do BrEt ao pDNA (K), na presença de 150 µL de neomicina 100 mM, correspondentes ao 1º ensaio da concentração 1,0M de NaCl

Volume (cuvette) (mL)	[DNA] (M)	[EtBr] (M)	If (u.a.)	c_b (M)	r	c_f (M)	r/c_f (M^{-1})
2,85	3,00E-05	—	—	—	—	—	—
2,87	2,98E-05	2,09E-06	1,74E+06	1,90E-06	0,063696	1,93E-07	3,30E+05
2,89	2,96E-05	4,15E-06	2,83E+06	3,03E-06	0,102302	1,13E-06	9,09E+04
2,91	2,94E-05	6,19E-06	3,46E+06	3,61E-06	0,122774	2,58E-06	4,76E+04
2,93	2,92E-05	8,19E-06	4,08E+06	4,18E-06	0,143136	4,01E-06	3,57E+04
2,95	2,9E-05	1,02E-05	4,55E+06	4,57E-06	0,157826	5,60E-06	2,82E+04
2,97	2,88E-05	1,21E-05	5,01E+06	4,96E-06	0,172299	7,16E-06	2,41E+04
2,99	2,86E-05	1,4E-05	5,26E+06	5,09E-06	0,178083	8,95E-06	1,99E+04
3,01	2,84E-05	1,59E-05	5,50E+06	5,23E-06	0,183948	1,07E-05	1,72E+04
3,03	2,82E-05	1,78E-05	5,71E+06	5,31E-06	0,188227	1,25E-05	1,50E+04
3,05	2,8E-05	1,97E-05	5,91E+06	5,40E-06	0,192731	1,43E-05	1,35E+04

3,07	2,79E-05	2,15E-05	6,12E+06	5,50E-06	0,197565	1,60E-05	1,24E+04
3,09	2,77E-05	2,33E-05	6,24E+06	5,48E-06	0,198211	1,78E-05	1,11E+04

A partir dos dados da tabela anterior construiu-se um gráfico (7) de r/c_f em função de r , obtendo-se uma recta, cujo declive corresponde ao K (constante de ligação do BrEt ao pDNA).

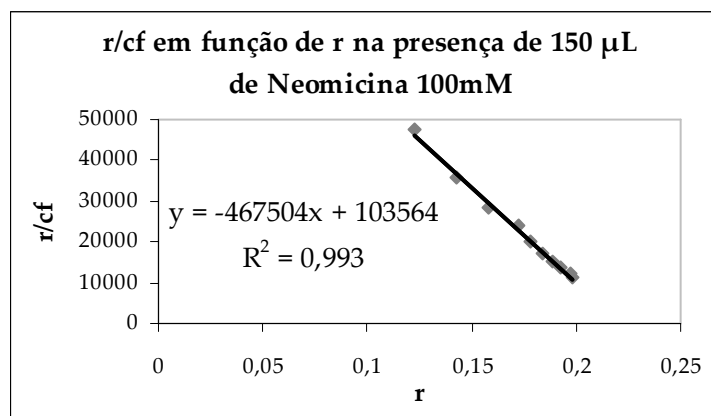


Gráfico 7 – Gráfico de r/c_f em função de r , para o 1º ensaio da concentração de 1,0 M de NaCl, na presença de 150 μ L de neomicina 100 mM

Desta forma, o K , na presença de 150 μ L de neomicina 100 mM, foi 467504 M^{-1} .

6.4.2.1.3. Na presença de 225 μ L de neomicina 100 mM

Tabela XIV – Valores para a determinação da constante de ligação do BrEt ao pDNA (K), na presença de 225 μ L de neomicina 100 mM, correspondentes ao 1º ensaio da concentração 1,0M de NaCl

Volume (cuvette) (mL)	[DNA] (M)	[EtBr] (M)	If (u.a.)	c_b (M)	r	c_f (M)	r/c_f (M^{-1})
2,925	3,00E-05	—	—	—	—	—	—
2,945	2,98E-05	2,04E-06	1,52E+06	1,64E-06	0,0549	4,02E-07	1,37E+05
2,965	2,96E-05	4,05E-06	2,63E+06	2,80E-06	0,094561	1,25E-06	7,57E+04
2,985	2,94E-05	6,03E-06	3,43E+06	3,58E-06	0,121645	2,45E-06	4,96E+04
3,005	2,92E-05	7,99E-06	3,98E+06	4,08E-06	0,139549	3,91E-06	3,57E+04
3,025	2,9E-05	9,92E-06	4,39E+06	4,40E-06	0,151685	5,52E-06	2,75E+04
3,045	2,88E-05	1,18E-05	4,81E+06	4,74E-06	0,164424	7,08E-06	2,32E+04
3,065	2,86E-05	1,37E-05	5,10E+06	4,94E-06	0,172382	8,77E-06	1,97E+04

3,085	2,84E-05	1,56E-05	5,36E+06	5,09E-06	0,178824	1,05E-05	1,71E+04
3,105	2,83E-05	1,74E-05	5,62E+06	5,24E-06	0,18556	1,21E-05	1,53E+04
3,125	2,81E-05	1,92E-05	5,80E+06	5,31E-06	0,188944	1,39E-05	1,36E+04
3,145	2,79E-05	2,1E-05	6,00E+06	5,40E-06	0,193444	1,56E-05	1,24E+04
3,165	2,77E-05	2,27E-05	6,14E+06	5,42E-06	0,195382	1,73E-05	1,13E+04

A partir dos dados da tabela anterior construiu-se um gráfico (8) de r/c_f em função de r , obtendo-se uma recta, cujo declive corresponde ao K (constante de ligação do BrEt ao pDNA).

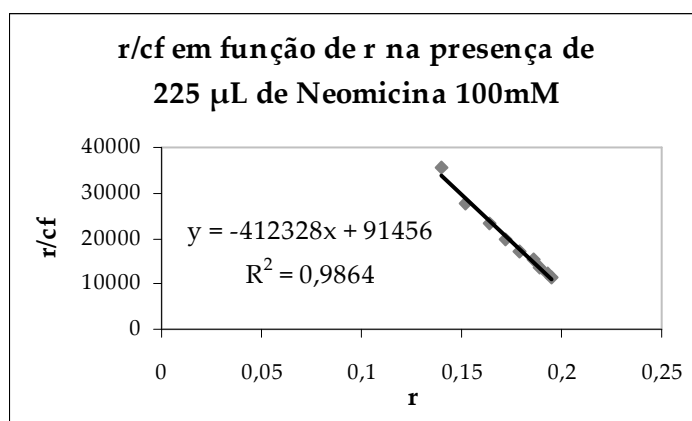


Gráfico 8 – Gráfico de r/c_f em função de r , para o 1º ensaio da concentração de 1,0 M de NaCl, na presença de 225 µL de neomicina 100 mM

Desta forma, o K , na presença de 225 µL de neomicina 100 mM, foi 412328 M^{-1} .

6.4.2.1.4. Na presença de 300 μ L de neomicina 100 mM

Tabela XV – Valores para a determinação da constante de ligação do BrEt ao pDNA (K), na presença de 300 μ L de neomicina 100 mM, correspondentes ao 1º ensaio da concentração 1,0M de NaCl

Volume (cuvette) (mL)	[DNA] (M)	[EtBr] (M)	If (u.a.)	c_b (M)	r	c_f (M)	r/ c_f (M ⁻¹)
3	3,00E-05	—	—	—	—	—	—
3,02	2,98E-05	1,99E-06	1,48E+06	1,59E-06	0,053415	3,95E-07	1,35E+05
3,04	2,96E-05	3,95E-06	2,47E+06	2,61E-06	0,088078	1,34E-06	6,57E+04
3,06	2,94E-05	5,88E-06	3,20E+06	3,32E-06	0,112832	2,56E-06	4,40E+04
3,08	2,92E-05	7,79E-06	3,75E+06	3,82E-06	0,130627	3,98E-06	3,29E+04
3,1	2,9E-05	9,68E-06	4,25E+06	4,25E-06	0,146432	5,43E-06	2,70E+04
3,12	2,88E-05	1,15E-05	4,25E+06	4,10E-06	0,142023	7,44E-06	1,91E+04
3,14	2,87E-05	1,34E-05	4,97E+06	4,80E-06	0,1676	8,57E-06	1,96E+04
3,16	2,85E-05	1,52E-05	5,14E+06	4,85E-06	0,170383	1,03E-05	1,65E+04
3,18	2,83E-05	1,7E-05	5,47E+06	5,09E-06	0,179986	1,19E-05	1,51E+04
3,2	2,81E-05	1,88E-05	5,62E+06	5,13E-06	0,182456	1,36E-05	1,34E+04
3,22	2,8E-05	2,05E-05	5,81E+06	5,21E-06	0,186369	1,53E-05	1,22E+04
3,24	2,78E-05	2,22E-05	6,00E+06	5,29E-06	0,190477	1,69E-05	1,13E+04

A partir dos dados da tabela anterior construiu-se um gráfico (9) de r/ c_f em função de r, obtendo-se uma recta, cujo declive corresponde ao K (constante de ligação do BrEt ao pDNA).

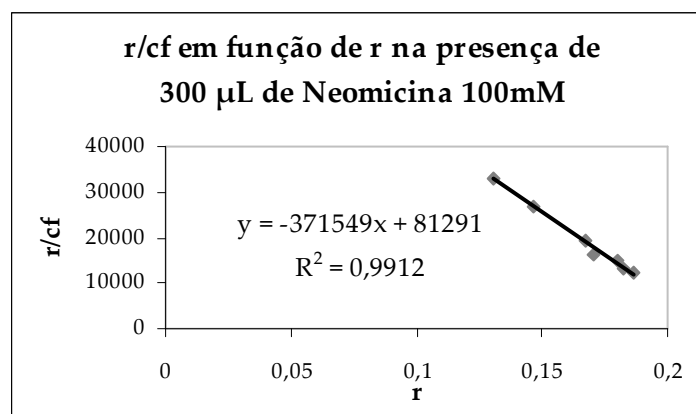


Gráfico 9 – Gráfico de r/ c_f em função de r, para o 1º ensaio da concentração de 1,0 M de NaCl, na presença de 300 μ L de neomicina 100 mM

Desta forma, o K, na presença de 300 μL de neomicina 100 mM, foi 371549 M^{-1} .

6.4.2.1.5. Na presença de 375 μL de neomicina 100 mM

Tabela XVI – Valores para a determinação da constante de ligação do BrEt ao pDNA (K), na presença de 375 μL de neomicina 100 mM, correspondentes ao 1º ensaio da concentração 1,0M de NaCl

Volume (cuvette) (mL)	[DNA] (M)	[EtBr] (M)	If (u.a.)	c_b (M)	r	c_f (M)	r/c_f (M^{-1})
3,075	3,00E-05	—	—	—	—	—	—
3,095	2,98E-05	1,94E-06	1,52E+06	1,65E-06	0,05544	2,86E-07	1,94E+05
3,115	2,96E-05	3,85E-06	2,47E+06	2,61E-06	0,088279	1,24E-06	7,13E+04
3,135	2,94E-05	5,74E-06	3,24E+06	3,38E-06	0,114715	2,37E-06	4,85E+04
3,155	2,92E-05	7,61E-06	3,78E+06	3,87E-06	0,132244	3,74E-06	3,54E+04
3,175	2,91E-05	9,45E-06	4,18E+06	4,19E-06	0,144226	5,26E-06	2,74E+04
3,195	2,89E-05	1,13E-05	4,55E+06	4,48E-06	0,155055	6,79E-06	2,28E+04
3,215	2,87E-05	1,31E-05	4,81E+06	4,63E-06	0,161489	8,43E-06	1,92E+04
3,235	2,85E-05	1,48E-05	5,08E+06	4,81E-06	0,16865	1,00E-05	1,68E+04
3,255	2,83E-05	1,66E-05	5,28E+06	4,91E-06	0,17308	1,17E-05	1,48E+04
3,275	2,82E-05	1,83E-05	5,54E+06	5,07E-06	0,179915	1,33E-05	1,36E+04
3,295	2,8E-05	2E-05	5,73E+06	5,15E-06	0,183948	1,49E-05	1,24E+04
3,315	2,78E-05	2,17E-05	5,86E+06	5,17E-06	0,185815	1,65E-05	1,12E+04

A partir dos dados da tabela anterior construiu-se um gráfico (10) de r/c_f em função de r, obtendo-se uma recta, cujo declive corresponde ao K (constante de ligação do BrEt ao pDNA).

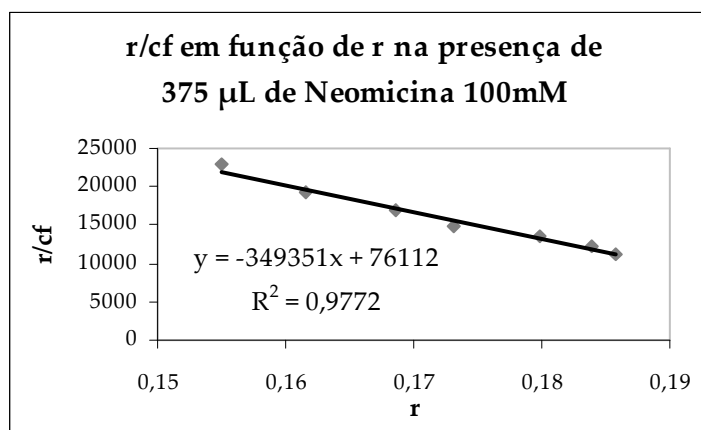


Gráfico 10 – Gráfico de r/c_f em função de r , para o 1º ensaio da concentração de 1,0 M de NaCl, na presença de 375 µL de neomicina 100 mM

Desta forma, o K , na presença de 375 µL de neomicina 100 mM, foi 349351 M⁻¹.

6.4.2.2. Determinação da constante de ligação

A partir dos valores obtidos no ponto 6.4.2.1. e um vez que o ligando neomicina apresentou um comportamento competitivo relativamente ao BrEt (diminuição gradual de K com o aumento do volume de ligando), a constante de ligação do mesmo ao pDNA (K') foi determinada através da equação apresentada no ponto 5.9.5.

Tabela XVII – Dados para a determinação da constante de ligação da neomicina ao pDNA (K'), correspondentes ao 1º ensaio da concentração 1,0M de NaCl

Volume de neomicina (µL)	[Neomicina] (c'_t) (M)	K (K_{obs}) (M ⁻¹)	1/ K (M)
0	0	578486	1,72865E-06
75	2,70E-03	501527	1,99391E-06
150	5,26E-03	467504	2,13902E-06
225	7,69E-03	412328	2,42525E-06
300	0,01	371549	2,69144E-06
375	1,20E-02	349351	2,86245E-06

A partir dos dados da tabela anterior construiu-se um gráfico (11) de $1/K_{obs}$ em função de c'_t , onde K_{obs} é K e c'_t a concentração total de neomicina. Este corresponde a uma recta com declive K'/K , a partir do qual, se pode calcular facilmente o valor de K' (ponto 5.9.5.).

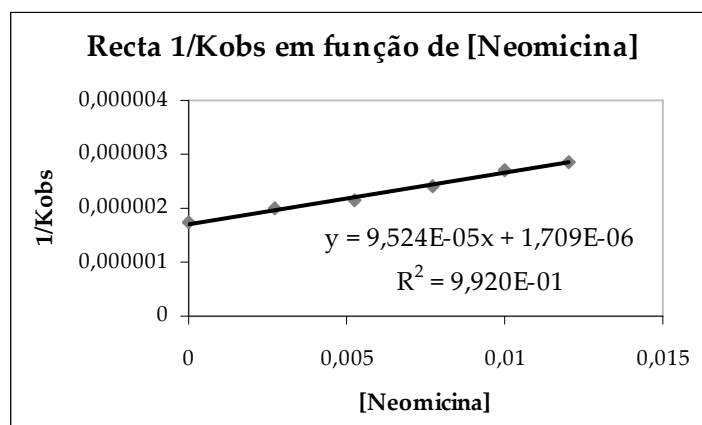


Gráfico 11 – Gráfico de $1/K_{obs}$ em função de [neomicina], para o 1º ensaio da concentração de 1,0 M de NaCl

Desta forma, o K' é $55,73 \text{ M}^{-1}$.

6.4.2.3. Valores da constante de ligação da neomicina ao pDNA, obtidos em todos os ensaios e para todas as concentrações de NaCl

Os valores obtidos, para os restantes ensaios e concentrações de sal, foram determinados exactamente da mesma forma que o descrito anteriormente. Assim sendo, esses valores serão unicamente apresentados nas tabelas e gráfico seguintes.

Tabela XVIII – Valores de K e K' obtidos para a neomicina, para cada um dos ensaios e concentrações de sal

Concentração de NaCl (M)	Ensaio	Declives das rectas correspondentes a cada um dos volumes de antibiótico usados					Constante de ligação do antibiótico ao pDNA (M^{-1})
		75 μL	150 μL	225 μL	300 μL	375 μL	
0,5	1ºEnsaio	531154	449179	401960	372733	337489	67,36
	2ºEnsaio	698938	438682	402273	354818	332354	68,95
	3ºEnsaio	543904	435486	410118	356388	337141	66,39
0,75	1ºEnsaio	378136	336118	307659	294084	275883	41,12
	2ºEnsaio	371575	333924	318434	296679	308112	37,36
	3ºEnsaio	372806	340288	329373	288094	279186	40,36
1,0	1ºEnsaio	501527	467504	412328	371549	349351	55,73
	2ºEnsaio	531395	418069	392681	362947	379635	58,06
	3ºEnsaio	496043	464128	418552	384238	325967	53,38

1,25	1ºEnsaio	321954	289036	288715	254774	242889	62,46
	2ºEnsaio	350557	320761	326414	260167	280780	59,83
	3ºEnsaio	448767	328544	376293	258861	244216	62,63
1,5	1ºEnsaio	379766	344474	324133	298527	288211	35,35
	2ºEnsaio	356701	327632	309435	291840	279291	35,56
	3ºEnsaio	363435	335360	306267	284404	276533	39,55
1,75	1ºEnsaio	382237	371275	354133	347053	338769	14,54
	2ºEnsaio	380051	376770	368991	389706	360228	10,0
	3ºEnsaio	376645	363099	353320	340494	328276	16,65
2,0	1ºEnsaio	398082	350821	347274	339447	335812	7,95
	2ºEnsaio	358096	349114	335854	328798	325738	10,85
	3ºEnsaio	492603	357749	346773	340331	336770	7,83

Na tabela e gráfico seguintes está apresentada, de forma simples, a variação da constante de ligação da neomicina com a concentração de cloreto de sódio. Uma vez que foram obtidos três valores diferentes para cada concentração, o parâmetro estatístico mais apropriada para representar esses mesmos valores é a mediana.

Tabela XIX – Mediana das constantes de ligação da neomicina ao pDNA

Concentração de NaCl (M)	Mediana das constantes de ligação da neomicina ao pDNA (M ⁻¹)
0,5	67,36
0,75	40,36
1	55,73
1,25	62,46
1,5	35,56
1,75	14,54
2	7,95

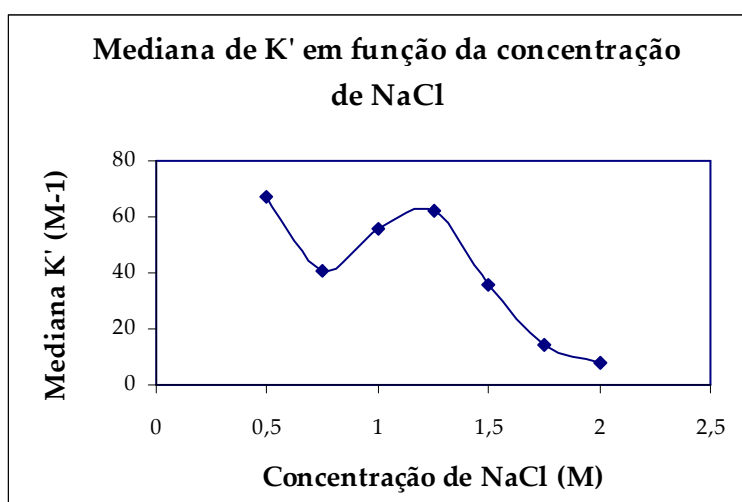


Gráfico 12 – Variação da constante de ligação da Neomicina ao pDNA com a concentração de NaCl

Observando a tabela XVIII, pode constatar-se que, em geral, os valores da constante de ligação do BrEt ao pDNA, na presença de neomicina, vão diminuindo à medida que a quantidade de antibiótico aumenta. Sabendo que a percentagem da diminuição da fluorescência está directamente relacionada com a quantidade de DNA que se liga às moléculas de ligando, em vez de ao BrEt, essa diminuição é indicativa do comportamento competitivo da neomicina em relação ao BrEt, ou seja, a neomicina é um ligando efectivo do DNA, ainda que não muito forte.

Como a intensidade da força da ligação é especulada através da sua constante, quanto maior o seu valor, mais forte é a ligação. Assim, uma vez que a constante de ligação da neomicina ao pDNA nunca ultrapassa os 70 M^{-1} (comparados, por exemplo com os K do BrEt representados na tabela X), pode concluir-se que este é um ligando fraco do DNA.

Analisando as tabelas XVIII e XIX e o gráfico 12, pode observar-se que a neomicina tem uma maior afinidade para o pDNA, quando a concentração de sal é 0,5 M e 1,25 M. Contudo, os valores obtidos para a concentração de 0,5 M devem ser abordados com algum cuidado, já que esta concentração se encontra perto do limite em que a neomicina se consegue ligar ao DNA de forma apropriada. Desta forma, será mais prudente dizer que a concentração de cloreto de sódio ideal para a ligação deste ligando ao pDNA é 1,25 M.

A partir de 1,25 M até 2,0 M, verifica-se uma diminuição gradual da constante de ligação, ou seja, a afinidade da neomicina ao pDNA diminui com o aumento da concentração de sal, ou seja com o aumento das forças electrostáticas no meio.

Uma vez que a neomicina se liga ao DNA por um mecanismo de intercalação (Robinson e Wang, 1996), dependente de forças de Van der Waals e de uma forte estabilização electrostática (Sinha *et al*, 2006) entre as duas moléculas, e já que a geometria dos locais de intercalação, bem como da molécula de pDNA, é influenciada pela força iónica e catiões em solução (Hendry *et al*, 2007), à medida que a concentração de cloreto de sódio aumenta, as interacções electrostáticas diminuem, assim como a constante de ligação.

Os valores da constante de ligação obtidos para a concentração 2,0 M são tão baixos, e susceptíveis a tantas variações e interferências, uma vez que já se encontram na margem de erro do ensaio. Este facto é facilmente constatado através das características das rectas obtidas para essa concentração (rectas não apresentadas no trabalho): valores de r abaixo dos 0,97 e com menos de cinco pontos, curvas em vez de rectas, etc.

6.4.3. Determinação das constantes de ligação entre o pDNA e a berberina

Uma vez mais e tal como foi feito para a neomicina, para evitar que a apresentação se torne cansativa, os valores apresentados de seguida são os obtidos para a concentração 1,0 M de NaCl. Para além disso, como para cada concentração foram realizados três ensaios, os valores apresentados correspondem a apenas um deles, neste caso, ao primeiro. Os restantes valores, correspondentes às outras concentrações e ensaios, serão apresentados em tabelas e gráfico, no ponto 6.4.3.3.

6.4.3.1. Determinação dos parâmetros de ligação entre o pDNA e a berberina

Após o seguimento do protocolo constante no ponto 5.9.5., obtiveram-se os seguintes valores para o primeiro ensaio (Tabelas XX - XXIV). Em cada um dos casos, o K obtido corresponde à constante de ligação do BrEt ao pDNA, na presença de um determinado volume de ligando, neste caso a berberina.

6.4.3.1.1. Na presença de 75 μ L de berberina 1 mM

Tabela XX – Valores para a determinação da constante de ligação do BrEt ao pDNA (K), na presença de 75 μ L de berberina 1 mM, correspondentes ao 1º ensaio da concentração 1,0M de NaCl

Volume (cuvette) (mL)	[DNA] (M)	[EtBr] (M)	If (u.a.)	c _b (M)	r	c _f (M)	r/c _f (M ⁻¹)
2,775	3,00E-05	—	—	—	—	—	—
2,795	2,98E-05	2,15E-06	1,92E+06	2,11E-06	0,070694	4,10E-08	1,72E+06
2,815	2,96E-05	4,26E-06	3,27E+06	3,54E-06	0,119596	7,26E-07	1,65E+05
2,835	2,94E-05	6,35E-06	4,13E+06	4,38E-06	0,149318	1,96E-06	7,60E+04
2,855	2,92E-05	8,41E-06	4,90E+06	5,13E-06	0,176077	3,27E-06	5,38E+04
2,875	2,9E-05	1,04E-05	5,42E+06	5,58E-06	0,192812	4,85E-06	3,97E+04
2,895	2,88E-05	1,24E-05	5,91E+06	5,99E-06	0,208452	6,44E-06	3,24E+04
2,915	2,86E-05	1,44E-05	6,28E+06	6,28E-06	0,219855	8,13E-06	2,70E+04
2,935	2,84E-05	1,64E-05	6,61E+06	6,50E-06	0,229305	9,85E-06	2,33E+04
2,955	2,82E-05	1,83E-05	6,90E+06	6,69E-06	0,237449	1,16E-05	2,05E+04
2,975	2,8E-05	2,02E-05	7,10E+06	6,77E-06	0,242	1,34E-05	1,81E+04
2,995	2,78E-05	2,2E-05	7,33E+06	6,89E-06	0,247821	1,51E-05	1,64E+04
3,015	2,76E-05	2,39E-05	7,53E+06	6,97E-06	0,252548	1,69E-05	1,49E+04

A partir dos dados da tabela anterior construiu-se um gráfico (13) de r/c_f em função de r , obtendo-se uma recta, cujo declive corresponde ao K (constante de ligação do BrEt ao pDNA).

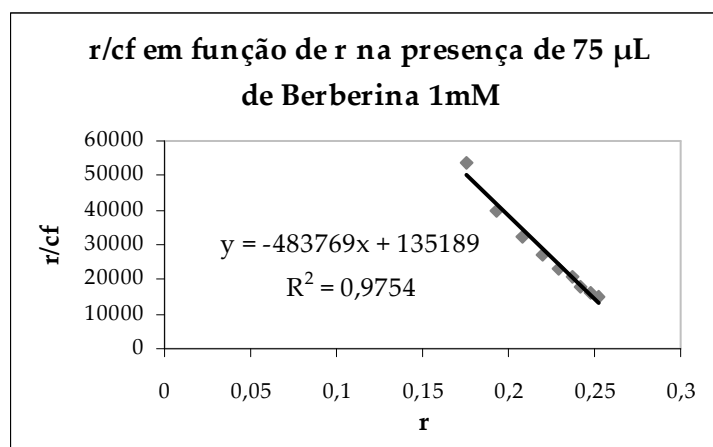


Gráfico 13 – Gráfico de r/c_f em função de r , para o 1º ensaio da concentração de 1,0 M de NaCl, na presença de 75 µL de berberina 1 mM

Desta forma, o K , na presença de 75 µL de berberina 1 mM, foi 483769 M^{-1} .

6.4.3.1.2. Na presença de 150 µL de berberina 1 mM

Tabela XXI – Valores para a determinação da constante de ligação do BrEt ao pDNA (K), na presença de 150 µL de berberina 1 mM, correspondentes ao 1º ensaio da concentração 1,0M de NaCl

Volume (cuvette) (mL)	[DNA] (M)	[EtBr] (M)	If (u.a.)	c_b (M)	r	c_f (M)	r/c_f (M^{-1})
2,85	3,00E-05	—	—	—	—	—	—
2,87	2,98E-05	2,09E-06	1,88E+06	2,06E-06	0,069176	2,98E-08	2,32E+06
2,89	2,96E-05	4,15E-06	3,10E+06	3,34E-06	0,11297	8,10E-07	1,39E+05
2,91	2,94E-05	6,19E-06	3,94E+06	4,18E-06	0,142265	2,01E-06	7,09E+04
2,93	2,92E-05	8,19E-06	4,61E+06	4,81E-06	0,164707	3,38E-06	4,87E+04
2,95	2,9E-05	1,02E-05	5,15E+06	5,29E-06	0,182419	4,88E-06	3,74E+04
2,97	2,88E-05	1,21E-05	5,60E+06	5,66E-06	0,196586	6,46E-06	3,04E+04
2,99	2,86E-05	1,4E-05	5,99E+06	5,95E-06	0,20825	8,09E-06	2,57E+04
3,01	2,84E-05	1,59E-05	6,28E+06	6,15E-06	0,216483	9,80E-06	2,21E+04
3,03	2,82E-05	1,78E-05	6,58E+06	6,35E-06	0,224925	1,15E-05	1,96E+04

3,05	2,8E-05	1,97E-05	6,82E+06	6,48E-06	0,231025	1,32E-05	1,75E+04
3,07	2,79E-05	2,15E-05	7,06E+06	6,61E-06	0,237378	1,49E-05	1,59E+04
3,09	2,77E-05	2,33E-05	7,23E+06	6,66E-06	0,240805	1,66E-05	1,45E+04

A partir dos dados da tabela anterior construiu-se um gráfico (14) de r/c_f em função de r , obtendo-se uma recta, cujo declive corresponde ao K (constante de ligação do BrEt ao pDNA).

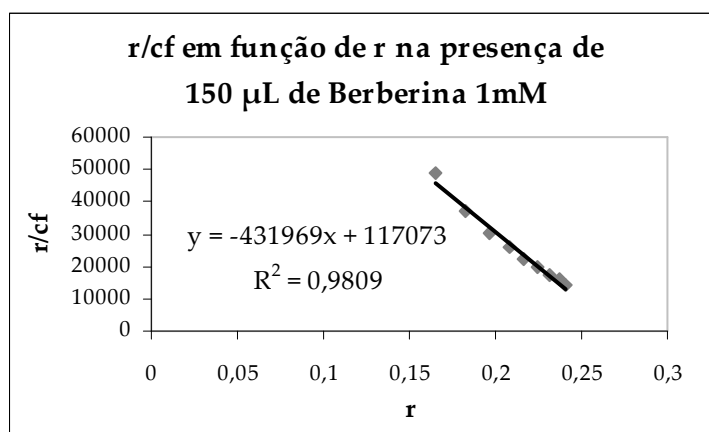


Gráfico 14 – Gráfico de r/c_f em função de r , para o 1º ensaio da concentração de 1,0 M de NaCl, na presença de 150 μ L de berberina 1 mM

Desta forma, o K , na presença de 150 μ L de berberina 1 mM, foi 431969 M^{-1} .

6.4.3.1.3. Na presença de 225 μ L de berberina 1 mM

Tabela XXII – Valores para a determinação da constante de ligação do BrEt ao pDNA (K), na presença de 225 μ L de berberina 1 mM, correspondentes ao 1º ensaio da concentração 1,0M de NaCl

Volume (cuvette) (mL)	[DNA] (M)	[EtBr] (M)	If (u.a.)	c_b (M)	r	c_f (M)	r/c_f (M^{-1})
2,925	3,00E-05	—	—	—	—	—	—
2,945	2,98E-05	2,04E-06	1,70E+06	1,86E-06	0,062285	1,81E-07	3,43E+05
2,965	2,96E-05	4,05E-06	2,86E+06	3,06E-06	0,103545	9,83E-07	1,05E+05
2,985	2,94E-05	6,03E-06	3,69E+06	3,89E-06	0,132483	2,14E-06	6,20E+04
3,005	2,92E-05	7,99E-06	4,35E+06	4,51E-06	0,154533	3,47E-06	4,45E+04
3,025	2,9E-05	9,92E-06	4,84E+06	4,93E-06	0,169968	4,99E-06	3,41E+04

3,045	2,88E-05	1,18E-05	5,41E+06	5,46E-06	0,189308	6,37E-06	2,97E+04
3,065	2,86E-05	1,37E-05	5,78E+06	5,74E-06	0,200453	7,96E-06	2,52E+04
3,085	2,84E-05	1,56E-05	6,11E+06	5,97E-06	0,209997	9,59E-06	2,19E+04
3,105	2,83E-05	1,74E-05	6,44E+06	6,22E-06	0,219935	1,12E-05	1,97E+04
3,125	2,81E-05	1,92E-05	6,59E+06	6,25E-06	0,222524	1,30E-05	1,72E+04
3,145	2,79E-05	2,1E-05	6,89E+06	6,46E-06	0,23141	1,45E-05	1,59E+04
3,165	2,77E-05	2,27E-05	7,07E+06	6,52E-06	0,2353	1,62E-05	1,45E+04

A partir dos dados da tabela anterior construiu-se um gráfico (15) de r/c_f em função de r , obtendo-se uma recta, cujo declive corresponde ao K (constante de ligação do BrEt ao pDNA).

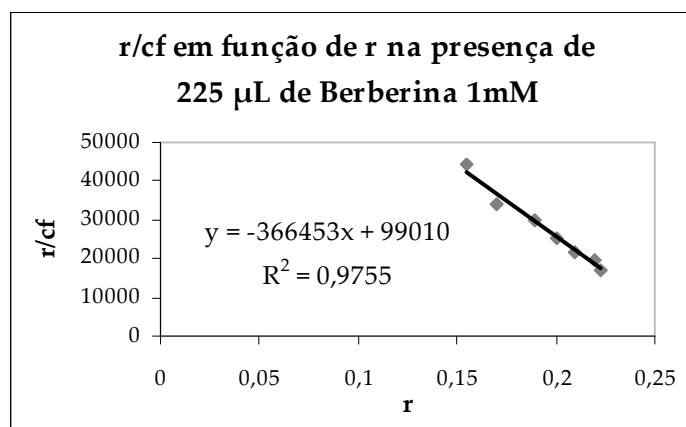


Gráfico 15 – Gráfico de r/c_f em função de r , para o 1º ensaio da concentração de 1,0 M de NaCl, na presença de 225 μ L de berberina 1 mM

Desta forma, o K , na presença de 225 μ L de berberina 1 mM, foi 366453 M^{-1} .

6.4.3.1.4. Na presença de 300 μL de berberina 1 mM

Tabela XXIII – Valores para a determinação da constante de ligação do BrEt ao pDNA (K), na presença de 300 μL de berberina 1 mM, correspondentes ao 1º ensaio da concentração 1,0M de NaCl

Volume (cuvette) (mL)	[DNA] (M)	[EtBr] (M)	If (u.a.)	c_b (M)	r	c_f (M)	r/c_f (M^{-1})
3	3,00E-05	—	—	—	—	—	—
3,02	2,98E-05	1,99E-06	1,73E+06	1,89E-06	0,063409	9,71E-08	6,53E+05
3,04	2,96E-05	3,95E-06	2,93E+06	3,15E-06	0,106561	7,93E-07	1,34E+05
3,06	2,94E-05	5,88E-06	3,74E+06	3,96E-06	0,134575	1,92E-06	6,99E+04
3,08	2,92E-05	7,79E-06	4,38E+06	4,56E-06	0,156174	3,23E-06	4,84E+04
3,1	2,9E-05	9,68E-06	4,92E+06	5,06E-06	0,174125	4,62E-06	3,77E+04
3,12	2,88E-05	1,15E-05	5,35E+06	5,40E-06	0,187355	6,13E-06	3,05E+04
3,14	2,87E-05	1,34E-05	5,73E+06	5,71E-06	0,199103	7,67E-06	2,60E+04
3,16	2,85E-05	1,52E-05	6,04E+06	5,93E-06	0,208087	9,26E-06	2,25E+04
3,18	2,83E-05	1,7E-05	6,28E+06	6,06E-06	0,214171	1,09E-05	1,96E+04
3,2	2,81E-05	1,88E-05	6,54E+06	6,23E-06	0,221404	1,25E-05	1,77E+04
3,22	2,8E-05	2,05E-05	6,75E+06	6,33E-06	0,22631	1,42E-05	1,60E+04
3,24	2,78E-05	2,22E-05	6,93E+06	6,40E-06	0,230406	1,58E-05	1,46E+04

A partir dos dados da tabela anterior construiu-se um gráfico (16) de r/c_f em função de r, obtendo-se uma recta, cujo declive corresponde ao K (constante de ligação do BrEt ao pDNA).

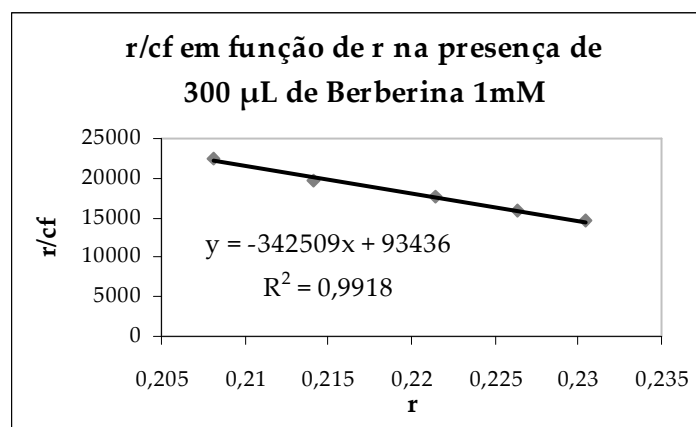


Gráfico 16 – Gráfico de r/c_f em função de r, para o 1º ensaio da concentração de 1,0 M de NaCl, na presença de 300 μL de berberina 1 mM

Desta forma, o K, na presença de 300 μL de berberina 1 mM, foi 342509 M^{-1} .

6.4.3.1.5. Na presença de 375 μL de berberina 1 mM

Tabela XXIV – Valores para a determinação da constante de ligação do BrEt ao pDNA (K), na presença de 375 μL de berberina 1 mM, correspondentes ao 1º ensaio da concentração 1,0M de NaCl

Volume (cuvette) (mL)	[DNA] (M)	[EtBr] (M)	If (u.a.)	c_b (M)	r	c_f (M)	r/c_f (M^{-1})
3,15	3,00E-05	—	—	—	—	—	—
3,17	2,98E-05	1,89E-06	1,60E+06	1,75E-06	0,058666	1,44E-07	4,08E+05
3,19	2,96E-05	3,76E-06	2,70E+06	2,90E-06	0,097865	8,63E-07	1,13E+05
3,21	2,94E-05	5,61E-06	3,51E+06	3,71E-06	0,125916	1,90E-06	6,63E+04
3,23	2,93E-05	7,43E-06	4,14E+06	4,31E-06	0,147316	3,12E-06	4,72E+04
3,25	2,91E-05	9,23E-06	4,65E+06	4,76E-06	0,163721	4,47E-06	3,66E+04
3,27	2,89E-05	1,1E-05	5,10E+06	5,15E-06	0,178338	5,86E-06	3,05E+04
3,29	2,87E-05	1,28E-05	5,48E+06	5,46E-06	0,190048	7,31E-06	2,60E+04
3,31	2,85E-05	1,45E-05	5,83E+06	5,73E-06	0,200868	8,77E-06	2,29E+04
3,33	2,84E-05	1,62E-05	6,09E+06	5,90E-06	0,208001	1,03E-05	2,02E+04
3,35	2,82E-05	1,79E-05	6,36E+06	6,08E-06	0,215513	1,18E-05	1,82E+04
3,37	2,8E-05	1,96E-05	6,61E+06	6,24E-06	0,222396	1,33E-05	1,67E+04
3,39	2,79E-05	2,12E-05	6,79E+06	6,31E-06	0,226521	1,49E-05	1,52E+04

A partir dos dados da tabela anterior construiu-se um gráfico (17) de r/c_f em função de r, obtendo-se uma recta, cujo declive corresponde ao K (constante de ligação do BrEt ao pDNA).

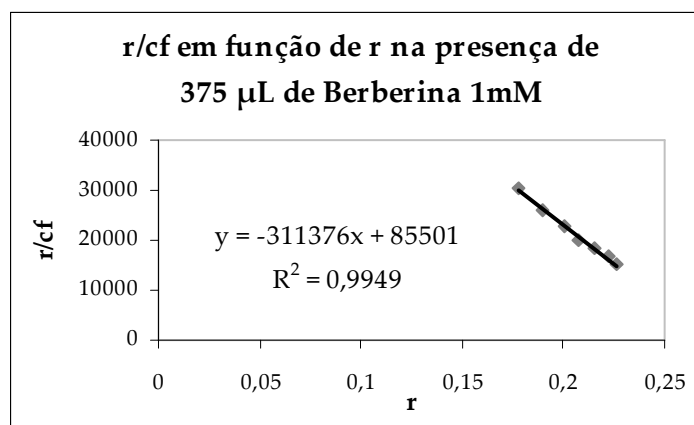


Gráfico 17 – Gráfico de r/cf em função de r, para o 1º ensaio da concentração de 1,0 M de NaCl, na presença de 375 µL de berberina 1 mM

Desta forma, o K, na presença de 375 µL de berberina 1 mM, foi 311376 M⁻¹.

6.4.3.2. Determinação da constante de ligação

A partir dos valores obtidos no ponto 6.4.3.1. e um vez que o ligando berberina apresentou um comportamento competitivo relativamente ao BrEt (diminuição gradual de K com o aumento do volume de ligando), a constante de ligação do mesmo ao pDNA (K') foi determinada através da equação apresentada no ponto 5.9.5.

Tabela XXV – Dados para a determinação da constante de ligação da berberina ao pDNA (K'), correspondentes ao 1º ensaio da concentração 1,0M de NaCl

Volume de berberina (µL)	[Berberina] (c't) (M)	K (K _{obs}) (M ⁻¹)	1/K (M)
0	0	578486	1,72865E-06
75	2,70E-05	483769	2,0671E-06
150	5,26E-05	431969	2,31498E-06
225	7,69E-05	366453	2,72886E-06
300	1,00E-04	342509	2,91963E-06
375	1,22E-04	311376	3,21155E-06

A partir dos dados da tabela anterior constrói-se um gráfico (18) de 1/K_{obs} em função de c't, onde K_{obs} é K e c't a concentração total de berberina. Este corresponde a uma recta com declive K'/K, a partir do qual, se pode calcular facilmente o valor de K' (ponto 5.9.5.).

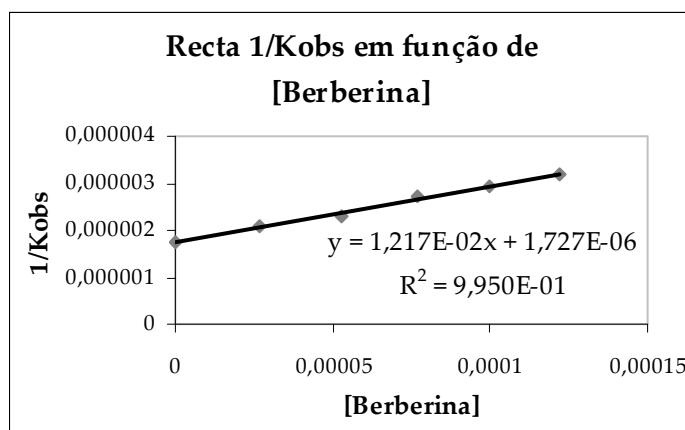


Gráfico 18 – Gráfico de $1/K_{obs}$ em função de [berberina], para o 1º ensaio da concentração de 1,0 M de NaCl

Desta forma, o K' é $7046,90 \text{ M}^{-1}$.

6.4.3.3. Valores da constante de ligação da berberina ao pDNA, obtidos em todos os ensaios e para todas as concentrações de NaCl

Os valores obtidos, para os restantes ensaios e concentrações de sal, foram determinados exactamente da mesma forma que o descrito anteriormente. Assim sendo, esses valores serão unicamente apresentados nas tabelas e gráfico seguintes.

Tabela XXVI – Valores de K e K' obtidos para a berberina, para cada um dos ensaios e concentrações de sal

Concentração de NaCl (M)	Ensaio	Declives das rectas correspondentes a cada um dos volumes de antibiótico usados					Constante de ligação do antibiótico ao pDNA (M^{-1})
		75 μL	150 μL	225 μL	300 μL	375 μL	
0,5	1ºEnsaio	539926	542488	428087	410675	397800	4446,80
	2ºEnsaio	797798	476751	429804	411286	384027	4691,02
	3ºEnsaio	558902	517732	456016	433496	395849	4431,30
0,75	1ºEnsaio	350420	319838	301809	282258	259866	4333,07
	2ºEnsaio	353809	329977	298437	283211	268527	4141,66
	3ºEnsaio	491019	331477	332751	292014	270419	4069,11
1,0	1ºEnsaio	483769	431969	366453	342509	311376	7046,90
	2ºEnsaio	459142	398398	351178	331871	298094	7193,08
	3ºEnsaio	467583	437051	377065	349273	297692	7110,86

1,25	1ºEnsaio	452842	334832	309619	285410	278665	4258,49
	2ºEnsaio	374744	330511	297835	280140	267994	4816,21
	3ºEnsaio	367516	341991	315847	312618	272827	4307,18
1,5	1ºEnsaio	333640	293178	270183	200324	232206	5758,41
	2ºEnsaio	364041	324639	286855	264495	240358	5780,08
	3ºEnsaio	352625	301160	280734	258931	237697	5634,03
1,75	1ºEnsaio	353443	327563	290916	277543	251809	4664,0
	2ºEnsaio	378567	301472	289208	259309	244115	5199,36
	3ºEnsaio	357391	310502	286065	270726	243119	5120,0
2,0	1ºEnsaio	317395	291671	271676	247296	232219	4634,68
	2ºEnsaio	325358	296455	264292	248966	238007	4572,68
	3ºEnsaio	323840	296090	265424	243214	236421	4734,72

Na tabela e gráfico seguintes está apresentada, de forma simples, a variação da constante de ligação da berberina com a concentração de cloreto de sódio. Uma vez que foram obtidos três valores diferentes para cada concentração, a modalidade estatística mais apropriada para representar esses mesmos valores é a mediana.

Tabela XXVII – Mediana das constantes de ligação da berberina ao pDNA

Concentração de NaCl (M)	Mediana das constantes de ligação da berberina ao pDNA (M ⁻¹)
0,5	4446,8
0,75	4141,66
1	7110,86
1,25	4307,18
1,5	5758,41
1,75	5120,0
2	4634,68

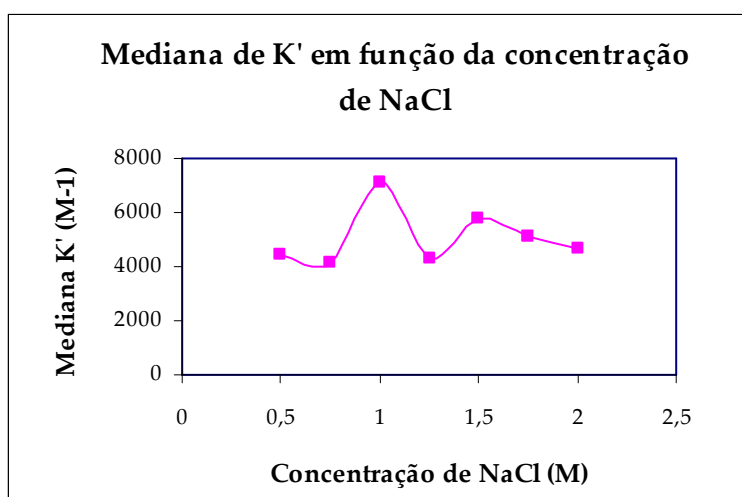


Gráfico 19 – Variação da constante de ligação da berberina ao pDNA com a concentração de NaCl

Observando a tabela XXVI, pode constatar-se que os valores da constante de ligação do BrEt ao pDNA, na presença de berberina e tal como aconteceu no caso da neomicina, em geral vão diminuindo à medida que a quantidade de antibiótico aumenta, contudo neste caso, a diminuição é mais acentuada.

Uma vez que a percentagem da diminuição da fluorescência está directamente relacionada com a quantidade de DNA que se liga às moléculas de ligando, essa diminuição é indicativa do comportamento competitivo desse ligando em relação ao BrEt, ou seja, a berberina é um ligando efectivo do DNA.

Como a intensidade da força da ligação é traduzida através da sua constante, quanto maior o seu valor, mais forte é a ligação. Assim, a berberina pode considerar-se um bom ligando do DNA, já que a sua constante de ligação ao pDNA é relativamente elevada ($K_{\text{máx}}$ de $7110,86 \text{ M}^{-1}$), comparando-a, por exemplo, com a ordem numérica da constante de ligação da neomicina ($K_{\text{máx}}$ de $67,36 \text{ M}^{-1}$).

Analisando as tabelas XXVI e XXVII e o gráfico 19, pode constatar-se que a berberina tem uma maior afinidade para o pDNA, quando a concentração de sal no tampão é $1,0 \text{ M}$, observando-se um segundo pico, ainda que menor, para a concentração $1,5 \text{ M}$. A partir desta concentração até ao $2,0 \text{ M}$, verifica-se uma diminuição gradual da constante de ligação, ou seja, a afinidade da berberina ao pDNA diminui com o aumento da concentração para $1,75 \text{ M}$ e finalmente $2,0 \text{ M}$, quando as forças electrostáticas no meio estão já bastante elevadas.

Tendo em conta que o mecanismo de interacção entre a berberina e o DNA se baseia numa intercalação parcial (Mazzini *et al*, 2003; Qin *et al*, 2007), e que as interacções iónicas não específicas entre ela, carregada positivamente, e a superfície aniónica do nucleótido, carregada negativamente, têm um papel importante no processo de ligação (Mazzini *et al*, 2003), essa diminuição da constante com a concentração de cloreto de sódio é facilmente explicada: à medida que a concentração de sal aumenta, as interacções electrostáticas diminuem, assim como a constante de ligação.

Contudo, a diminuição da constante a partir da concentração $1,75 \text{ M}$ não deve ser totalmente explicada através deste facto. Aquando da realização dos ensaios com as duas concentrações mais elevadas de sal, verificou-se uma leve precipitação da berberina no interior da cuvette, principalmente nos ensaios com uma maior quantidade de antibiótico. Desta forma, e uma vez que a quantidade de berberina disponível para se ligar ao pDNA diminuiu devido à precipitação, os valores de K são superiores aos devidos, enquanto que os de K' são falsamente inferiores. Assim sendo, é necessário algum cuidado quando os valores obtidos para as concentrações $1,75$ e $2,0 \text{ M}$ são examinados, já que podem não corresponder aos reais.

Para as concentrações inferiores a $1,0 \text{ M}$ de NaCl verifica-se também uma diminuição do valor de K' (não gradual), ou seja, uma diminuição da afinidade da berberina ao pDNA.

6.4.4. Comparação dos resultados obtidos para a neomicina e a berberina

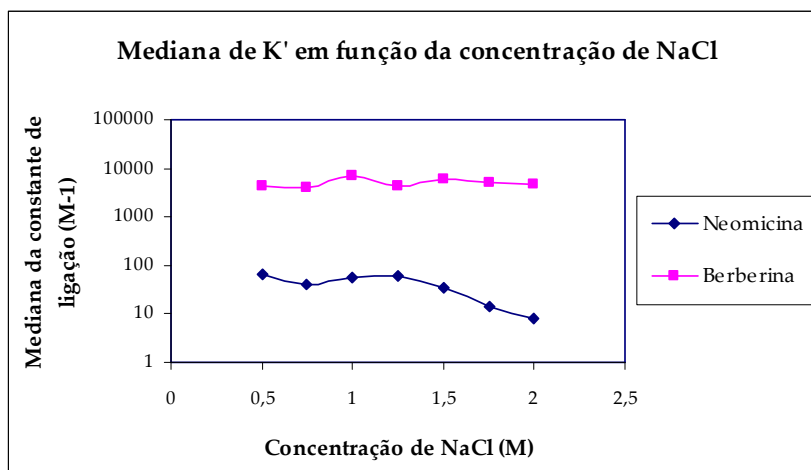


Gráfico 20 – Comparação da grandeza dos valores das constantes de ligação de ambos os antibióticos ao pDNA

Observando o gráfico 20 pode constatar-se que a berberina é um ligando do DNA bastante mais forte que a neomicina, uma vez que as suas constantes de ligação são bastante superiores (para a comparação de todos os parâmetros em estudo ver tabela AI no Apêndice 9.3).

Apesar de ambos os antibióticos interagirem com o pDNA de forma semelhante, através de um mecanismo de intercalação, o seu comportamento, perante as variações de sal no tampão, difere ligeiramente.

As óbvias diferenças estruturais entre as duas moléculas, determinam um comportamento diferente, tanto perante o pDNA, como com as diferentes concentrações de NaCl, bem como uma diferente forma de ligação. Essas diferenças podem também dever-se ao facto de a berberina interagir através de uma intercalação parcial (forma mais aceite): os seus anéis aromáticos encaixam-se no “minor groove” do duplexo, ligados a sequências ricas em bases AT (Mazzini *et al*, 2003; Qin *et al*, 2007).

Já a neomicina (ver gráfico 12) apresenta um comportamento típico de uma substância intercalante, em tudo semelhante ao apresentado pelo BrEt (ver gráfico 5).

Os picos de afinidade da neomicina e do BrEt para com o pDNA são observados sensivelmente à mesma concentração de sal e, em ambos os casos, a constante de ligação diminui com o aumento das forças electrostáticas em solução.

Estudos realizados com a tetraciclina demonstraram que a afinidade de ligação ao DNA diminui substancialmente com o aumento da concentração de cloreto de sódio, facto este atribuído à baixa acessibilidade dos locais de ligação do DNA, na presença dos catiões Na⁺. Para além disso, a molécula de DNA sofre mudanças conformacionais quando a concentração desse sal aumenta, nomeadamente uma diminuição no

emparelhamento das bases, o que pode reduzir a extensão de intercalação da droga (Khan e Musarrat, 2003).

Apesar de uma maneira geral, esses estudos corroborarem os resultados dos dois casos estudados, as moléculas apresentam diferenças estruturais significativas, que afectam o comportamento na ligação ao DNA, bem como perante as mudanças conformacionais do DNA, desencadeadas pela variação na concentração de sal.

É certo que a intercalação de algumas moléculas com o DNA, promove alterações na estrutura secundária do duplexo (Khan e Musarrat, 2003), contudo, e uma vez que as duas moléculas estudadas apresentam diferenças estruturais significativas, essas alterações serão de modo e de intensidade distintos.

*

Os ensaios anteriores tiveram como objectivo, seleccionar o melhor ligando para uso posterior nos ensaios de cromatografia de afinidade, ou seja, o ligando mais adequado para imobilizar no suporte de purificação. Desta forma, de entre os antibióticos estudados, o mais promissor foi a berberina, pois foi o que apresentou as maiores constantes de ligação ao pDNA.

6.5. Imobilização do ligando à coluna de purificação

O objectivo deste passo experimental foi ligar o ligando berberina ao suporte cromatográfico escolhido, o epóxi – (CH₂)₄ – sepharose™, para assim se proceder aos ensaios de purificação de pDNA por cromatografia de afinidade.

Observando a estrutura da berberina (ver figura 14), pode constatar-se que a ligação directa entre o suporte e o ligando não é viável, pela inexistência de grupos funcionais susceptíveis de reagirem, directa ou indirectamente, com suportes cromatográficos. Desta forma, procedeu-se à clivagem do grupo metilenodióxido (acetal) do ligando, para assim se originarem dois grupos funcionais hidroxílicos aromáticos, em posição *orto*, isto é, um catecol.

6.5.1. Clivagem da ligação acetal da berberina

Os acetais e os cetais são éteres que possuem um grupo 1,1 – diéter terminal ou interno, respectivamente (Sandler e Karo, 1972), pelo que contêm dois oxigénios alcóxido ligados ao mesmo carbono. Tal como os outros éteres, os acetais e cetais são resistentes a bases e vários outros reagentes, mas são clivados por ácidos (Morrison e Boyd, 1996b), originando 1,2 dióis por hidrólise.

Sendo a berberina um acetal, neste estudo foram testadas algumas formas clássicas de clivagem para este tipo de moléculas. No entanto, e uma vez que se trata de um

acetal derivado do formaldeído, e portanto fácil de preparar, mas extremamente difícil de clivar, este não foi um passo fácil e linear.

Os acetais cíclicos são mais resistentes à hidrólise que os seus análogos alifáticos (McClelland *et al*, 1993), pelo que só uma das abordagens testadas originou resultados prometedores, através do uso de tricloreto de alumínio como activador (abordagem 7).

Os produtos obtidos nas várias experiências foram analisados por UV/Visível, IV e RMN ^1H , e os seus dados comparados com os respectivos espectros do cloreto de berberina (ver apêndice 9.4). A caracterização espectroscópica do cloreto de berberina está representada na tabela XXVIII.

Tabela XXVIII – Caracterização física e espectroscópica do cloreto de berberina

Estrutura		
Aspecto		Sólido amorfo amarelo
$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)		428
$\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1})	Segundo Strekal <i>et al</i> , 2007	1629, 1600, 1558, 1506, 1481 (C=C _{arom}) 1424, 1390, 1331, 1271, 1230 (C-N) 1423, 1335 (C-C _{arom}) 1390, 1271 (C-O _{alif}) 1390 (C-C _{alif}) 1035 (C-O-C)
	Obtidos experimentalmente	1599, 1504, 1480 (m, F, m, C=C _{arom}) 1389, 1332, 1272, 1232 (F, m, F, m, C-N) 1389, 1272 (F, F C-O _{alif}) 1389 (F, C-C _{alif}) 1332 (m, C-C _{arom}) 1036 (m, C-O-C)
RMN ^1H δ (ppm) (DMSO- <i>d</i> ₆)		3,19 (2H, t, $J = 5,0$ Hz, ArCH ₂) 4,08 - 4,08 (6H, s, CH ₃) 4,94 (2H, t, $J = 6,3$ Hz, N ⁺ -CH ₂) 6,16 (2H, s, O-CH ₂ -O) 7,07 (1H, s, ArH) 7,77 (1H, s, ArH) 7,99 (1H, d, $J = 10,0$ Hz, ArH) 8,18 (1H, d, $J = 10,0$ Hz, ArH) 8,96 (1H, s, ArH) 9,90 (1H, s, ArH)

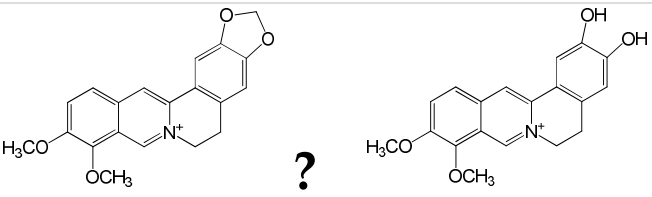
6.5.1.1. Abordagem 1 – Clivagem com HCl 5%

No início da reacção, o meio reaccional não se apresentava homogéneo, já que o cloreto de berberina é insolúvel na maioria dos solventes e soluções, e a solução solvente (HCl 5%) neste caso não foi excepção.

De forma a tornar o meio homogéneo, para potencializar o decorrer da reacção, adicionou-se acetonitrilo e colocou-se novamente a 50°C. Duas horas após esta adição, observou-se a formação de um precipitado floculento de cor amarela que, apesar de semelhante ao material de partida (berberina), apresentava um factor de retardação (R_f) ligeiramente diferente nas CCFs, numa posição inferior. Esse atraso na eluição representa o comportamento esperado para uma substância mais polar que o material de partida, como é o caso do catecol, derivado da clivagem do grupo metilenodióxido da berberina. Contudo, após a caracterização do material obtido por IV e RMN ^1H (ver apêndice 9.5), constatou-se que o produto obtido era a berberina.

As características espectroscópicas do produto obtido são apresentadas na tabela XXIX.

Tabela XXIX – Caracterização física e espectroscópica do produto obtido segundo a abordagem 1

Estrutura	
Aspecto	Sólido amorfo amarelo
$\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1})	3046, 3025 (f, f, C-H _{arom}) 1601, 1505, 1479 (m, F, m, C=C _{arom}) 1422, 1334 (f, m, C-C _{arom}) 1422, 1389, 1277 (f, F, F, C-O _{alif}) 1422, 1389, 1334, 1277, 1231 (f, F, m, F, F C-N) 1389 (F, C-C _{alif}) 1059 (f, C-O-C)
RMN ^1H δ (ppm) (DMSO- d_6)	3,20 (2H, s, ArCH ₂) 4,06 (3H, s, CH ₃) 4,09 (3H, s, CH ₃) 4,94 (2H, s, N ⁺ -CH ₂) 6,17 (2H, s, O-CH ₂ -O) 7,08 (1H, s, ArH) 7,78 (1H, s, ArH) 7,99 (1H, d, $J=9,0$ Hz, ArH) 8,19 (1H, d, $J=9,0$ Hz, ArH) 8,97 (1H, s, ArH) 9,91 (1H, s, ArH)

Tendo em conta que o esqueleto de ambas moléculas é igual, não é estranho que ambas apresentem um espectro de IV quase sobreponível. Para além disso, a absorção dos grupos hidroxilo dos álcoois e fenóis, quando estes estão presentes a concentrações elevadas, origina uma banda larga na zona dos $3200 - 3550 \text{ cm}^{-1}$ (Solomons, 1996), que é exactamente o que se pode visualizar na figura A6 (apêndice 9.5).

Contudo, se duas substâncias têm espectros de IV idênticos, são idênticas em milhares de diferentes propriedades físicas (como a absorção da radiação em milhares de diferentes valores de frequência), pelo que quase de certeza que se trata do mesmo composto (Morrison e Boyd, 1996a).

Desta forma, a análise do espectro de IV não permite, por si só, tirar conclusões acerca da identidade estrutural do composto obtido, após a clivagem da berberina segundo a abordagem 1.

Comparando os dados do espectro de RMN ^1H representados na tabela XXIX, com os da berberina (tabela XXVIII), pode constatar-se que o produto obtido é a berberina de partida, uma vez que ambos os espectros são praticamente sobreponíveis. Para além disso, se a clivagem do grupo metilenodióxido tivesse ocorrido com sucesso, o singlete a 6,17 ppm deveria estar ausente do espectro de RMN ^1H , o que não se verifica.

Desta forma, a abordagem estudada neste ponto não é viável para a clivagem do grupo metilenodióxido da berberina.

6.5.1.2. Abordagem 2 – Clivagem com HCl 15%

Esta abordagem foi em tudo semelhante à anterior, excepto a concentração de HCl e a adição prévia de acetonitrilo no início da reacção. Neste caso optou-se por uma concentração de ácido superior, para potencializar a clivagem do grupo acetal, uma vez que este tipo de estrutura é tradicionalmente hidrolisado por ácidos fortes (McClelland *et al*, 1993). O acetonitrilo serviu unicamente para homogeneizar o meio reaccional e facilitar a reacção.

Após 15 horas de reacção, e através dos resultados obtidos nas CCFs, foi possível constatar que não tinha ocorrido qualquer reacção. As “manchas” visualizáveis nas placas de cromatografia correspondiam unicamente ao cloreto de berberina, pelo que mais uma vez se pode concluir que esta abordagem não é viável para a clivagem da berberina.

6.5.1.3. Abordagem 3 – Clivagem com PCl₅ como activador

Esta técnica, adaptada de Trammell (1978), demonstrou originar resultados reproduzíveis na clivagem de acetais cíclicos. Contudo, o acetal presente na berberina, não foi susceptível de hidrólise.

Mais uma vez, a partir dos resultados obtidos nas CCFs, que foram sendo realizadas no decurso da reacção, se pode inferir que a referida não ocorreu, já que, ao fim de 18 horas de refluxo, o único composto existente no meio reaccional era o material de partida, sendo esta portanto, uma abordagem inviável para a clivagem da berberina.

Apesar de conterem grupos funcionais comuns, nem todas as moléculas se comportam da mesma forma, perante as mesmas condições reaccionais. A estrutura e outros grupos funcionais que as diferentes moléculas possam conter, interferem nesse tipo de comportamento, distinguindo-as nas suas propriedades físico-químicas e aplicação, pelo que abordagens promissoras para a clivagem de certas moléculas, pode não o ser para outras.

6.5.1.4. Abordagem 4 – Clivagem com NaOH 2N

Vulgarmente, os acetais são resistentes à clivagem básica (Morrison e Boyd, 1996b), contudo, Kobayashi (1978) apresentou uma técnica promissora para o conseguir fazer nessas condições.

Desta forma, foi usada uma vez mais, uma abordagem adaptada de uma técnica que já demonstrou resultados no campo da clivagem de acetais (Kobayashi, 1978), e mais uma vez, no caso em estudo, os resultados obtidos não foram os desejados.

Após quase 9 horas a 90°C, o único material que se encontrava no meio reaccional, visualizado através de CCF, era a berberina. Esta é portanto, uma abordagem inviável para a sua clivagem.

6.5.1.5. Abordagem 5 – Clivagem com HCl 6N

Esta técnica foi adaptada de um protocolo sugerido por Ogura e Tsuchihashi (1971) para a clivagem de acetais cíclicos.

Uma pequena quantidade de material de partida foi posto a 90°C, numa solução de HCl 6N, esperando-se que, com estas condições mais agressivas, fossem obtidos resultados reproduzíveis. Uma hora após o início da reacção, a CCF (do sólido em suspensão e meio reaccional) apresentava uma mancha, unicamente visível à luz ultravioleta, posicionada abaixo da mancha característica da berberina, exactamente onde seria de esperar o produto de clivagem. Contudo, as CCFs do sólido e águas mãe, obtidas após neutralização do meio e filtração do precipitado, não apresentavam essa “mancha”, que desapareceu após a neutralização.

Desta forma, esta é também uma abordagem inviável para se alcançar a clivagem da berberina.

6.5.1.6. Abordagem 6 – Clivagem com Ácido Fórmico 70%

Esta abordagem foi adaptada de Ismael (1997), a qual recorre ao ácido fórmico, como agente clivante. Contudo, após quase 17 horas de reacção, o único composto presente no meio reaccional era o material de partida. As manchas visualizáveis nas CCFs, ao longo e no fim da reacção, apresentavam um R_f igual ao da berberina, bem como o seu comportamento sob a luz UV.

Pode então concluir-se que esta, é também uma abordagem inviável para cumprir os objectivos propostos.

6.5.1.7. Abordagem 7 – Clivagem com $AlCl_3$ como activador

Esta técnica, adaptada de Perruchon (2003), usa um ácido de Lewis como catalizador numa reacção de clivagem de um acetal.

Neste caso, apesar de o meio reaccional não se apresentar homogéneo, algumas horas após o início da reacção, a sua cor mudou para uma tonalidade mais escura.

Para além disso, nas CCFs que foram sendo realizadas, começou a observar-se uma “mancha” alaranjada, com um factor de retardação (R_f) numa posição inferior à da berberina, assim como uma diminuição gradual da quantidade aparente de material de partida. O controlo desta diminuição foi facilitado, pela diferença apresentada entre as “manchas” dos dois compostos sob a luz UV de 254 nm.

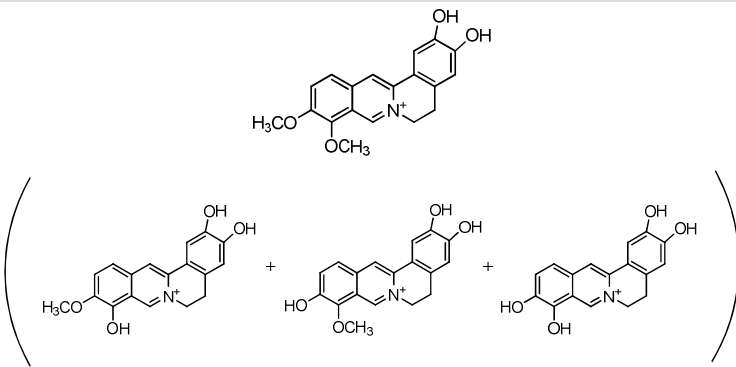
Assim que todo o material de partida reagiu (deixou de ser visualizado nas placas de CCF), procedeu-se ao isolamento do composto obtido por filtração.

Uma vez que o catalizador ($AlCl_3$) foi separado do meio reaccional com o produto de clivagem, contaminando-o, e sabendo que este era solúvel em acetonitrilo, ao contrário do produto, realizou-se uma extracção/purificação, por precipitação do produto nesse solvente.

A água e o metanol, foram os únicos solventes detectados para o sólido obtido, amorfo e de tonalidade laranja forte, dificultando um pouco a sua purificação, já que o catalizador e outras impurezas presentes, eram também solúveis nesses mesmos dois compostos. Mesmo após a precipitação com o acetonitrilo, o material obtido era uma mistura de vários compostos, incluindo certamente vestígios do catalizador, uma vez que se obteve uma quantidade de produto superior à esperada, se o composto obtido fosse somente berberina hidrolisada, facto este confirmado por IV e RMN 1H .

As características espectroscópicas da amostra assim obtida estão apresentadas na tabela XXX.

Tabela XXX – Caracterização física e espectroscópica do produto obtido segundo a abordagem 7

Estrutura	
Aspecto	Sólido amorfo laranja forte
$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	468
$\nu_{\text{máx}}$ (cm ⁻¹)	3376 (l, O-H) 1606 (f, C=C _{arom})
RMN ¹ H δ (ppm) (DMSO- <i>d</i> ₆)	2,97 (2H, s, ArCH ₂) 3,97 (3H, s, CH ₃) 4,00 (3H, s, CH ₃) 4,77 (2H, s, N ⁺ -CH ₂) 6,33 (1H, s, ArH) 7,08 (1H, s, ArH) 7,63 (1H, d, <i>J</i> = 9,3 Hz, ArH) 7,96 (1H, d, <i>J</i> = 8,8 Hz, ArH) 8,49 (1H, s, ArH) 9,70 (1H, s, ArH)

O máximo de absorção deste composto, na região do visível, ocorre a 468 nm (tabela XXX), cerca de 40 nm de deslocamento no espectro, em relação à berberina. Esse desvio, para uma zona de maiores comprimentos de onda, é típico do aparecimento dos grupos polares hidroxílicos. Chamado de desvio batocrômico, resulta da redução do nível de energia do estado excitado da molécula, devido à presença de ligações de hidrogénio entre os grupos hidroxilo.

Seria de esperar que o espectro de IV do produto de clivagem da berberina, fosse muito semelhante ao desta, uma vez que a estrutura base de ambas moléculas é igual, com a única diferença da presença de uma banda mais larga na zona dos 3200 – 3550 cm⁻¹, correspondente aos álcoois. Contudo, o espectro (figura A9 do apêndice 9.6) apresenta algumas grandes diferenças, principalmente na zona “fingerprint”, onde se observa uma quase total ausência de bandas.

Essas diferenças não são, contudo, fruto de estruturas distintas, mas sim da grande quantidade de impurezas e subprodutos presentes, resultantes da clivagem da berberina, que diluem bastante a amostra.

Assim, os dados do espectro de IV não permitem que se tirem conclusões acerca da identidade estrutural do composto em estudo.

Uma vez mais, e tal como aconteceu com o espectro de IV, a resolução do espectro de RMN ^1H (figura A10 do apêndice 9.6) foi comprometida pela grande quantidade de impurezas, presentes na amostra de composto analisado, alargando alguns picos e afectando o respectivo valor da integração.

De forma a se poderem visualizar os sinais dos diferentes prótons, a amostra foi concentrada e a imagem do espectro aumentada de forma exagerada, facto constatado pela largura e irregularidades de alguns picos, principalmente o referente à água (3,474 ppm).

Comparando os dados RMN ^1H do composto em questão com os da berberina, pode constatar-se que ocorreram alguns desvios importantes, resultantes de uma modificação na molécula. A quantificação desses desvios está representada na tabela seguinte.

Tabela XXXI – Desvios químicos dos prótons da molécula de berberina para o seu produto de clivagem

Protão	Berberina δ (ppm)	Produto δ (ppm)	Desvio $\Delta\delta$ (ppm)
2H, ArCH ₂	3,19	2,97	0,22
3H, CH ₃	4,08	3,97	0,11
3H, CH ₃	4,08	4,00	0,08
2H, N ⁺ -CH ₂	4,94	4,77	0,17
2H, O-CH ₂ -O	6,16	—	—
1H, s, ArH	7,07	6,33	0,74
1H, s, ArH	7,77	7,08	0,69
1H, d, ArH	7,99 ($J= 10,0$ Hz)	7,63 ($J= 9,3$ Hz)	0,36
1H, d, ArH	8,18 ($J= 10,0$ Hz)	7,96 ($J= 8,8$ Hz)	0,22
1H, s, ArH	8,96	8,49	0,47
1H, s, ArH	9,90	9,70	0,20

Em todos os prótons se observa um desvio para valores de δ inferiores, ou seja, para um campo magnético superior, demonstrando que todos sofreram uma blindagem, resultante da presença dos grupos nucleófilos hidroxílicos.

A presença destes é normalmente demonstrada por um pico pequeno e largo na zona dos 5 - 7 ppm, contudo, a sua posição não é fixa devido à presença de ligações de hidrogénio, que diminuem a densidade electrónica à volta do próton, as quais dependem por sua vez da concentração do álcool (Silverstein *et al*, 1991).

Os prótons que sofreram uma maior blindagem, foram os dois aromáticos cuja localização os coloca mais próximos dos grupos hidroxílicos, ou seja, quanto mais afastados destes, menor foi a intensidade da blindagem.

O sinal relativo aos dois prótons do grupo metilenodióxido, não está presente no espectro em estudo, o que significa que a clivagem se deu com sucesso.

Contudo, através da análise do espectro de RMN ^1H , pode sugerir-se que o produto obtido é uma mistura onde, além do composto derivado da hidrólise do grupo metilenodióxido, existem também compostos derivados da hidrólise parcial ou total dos ésteres metílicos. A estrutura desses compostos está representada na figura 20.

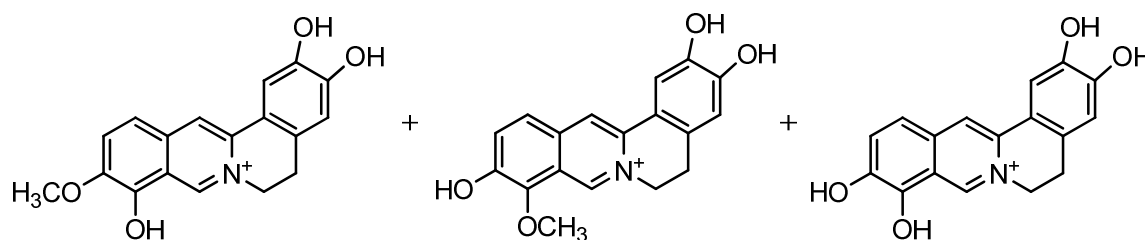


Fig. 20 – Outros produtos resultantes da clivagem da berberina

Assim, em futuras abordagens, e de maneira a evitar que os grupos metóxido sejam também clivados, deverão ser usadas condições de clivagem mais suaves, já que esta dupla clivagem pode pôr em causa a correlação entre a estrutura do ligando, o modo de ligação e a eventual interacção com a biomolécula alvo de separação, o pDNA.

6.5.2. Suporte Cromatográfico Epóxi – (CH₂)₄ – Sepharose™ e determinação quantitativa dos grupos epóxido do gel

O 1,4-bis-(2,3-epóxi-propóxido) de butilo é um reagente bifuncional, usado como agente activador da Sepharose™ ou como cadeia espaçadora, na derivatização dessa resina com diferentes tipos de ligandos (Tomaz, 2002).

Neste caso, o 1,4-bis-(2,3-epóxi-propóxido) de butilo foi imobilizado em Sepharose™ CL-6B, de forma a obter-se uma resina activada, para a posterior ligação do ligando (produto da hidrólise da berberina) e, aproveitando o comprimento da sua cadeia carbonada, funcionou também como braço espaçador do mesmo.

Após a imobilização, procedeu-se à determinação da quantidade de grupos epóxido presentes no gel, segundo a técnica presente no ponto 5.10.3. A partir do volume de titulante gasto, pôde calcular-se o número de moles presentes na massa de gel seco usado na titulação, que corresponde, aproximadamente, a 174,97 μmol/g de gel seco.

6.5.3. Imobilização do ligando ao gel Epóxi – (CH₂)₄ – Sepharose™

O gel Epóxi – (CH₂)₄ – Sepharose™ foi imobilizado com o produto de hidrólise, obtido a partir da abordagem 7.

Uma vez que o ligando apresenta uma tonalidade laranja forte (a pH 9 a solução é vermelha), foi relativamente fácil verificar a sua imobilização no suporte. Após a lavagem do gel ligando – Epóxi – (CH₂)₄ – Sepharose™ com uma grande quantidade de água destilada, e sabendo que o ligando é extremamente solúvel nesse solvente, o gel permaneceu colorido, demonstrando que o ligando foi imobilizado com sucesso.

Foi realizado, em simultâneo, um “branco” em que a imobilização foi feita com berberina. Este é também um composto colorido, de tonalidade amarelo forte, pelo que se a imobilização tivesse ocorrido com sucesso, o gel deveria ter adoptado uma cor amarela, contudo isso não se verificou.

Não foram assim efectuados ensaios de controlo com esta matriz não derivatizada, pois a quantidade de pDNA disponível para os ensaios de cromatografia era insuficiente. Sabe-se contudo que, uma vez que a berberina não foi imobilizada, a amostra não iria ser retida, sendo eluída logo após a injeção.

6.6. Cromatografia de Afinidade

Como já foi referido, a cromatografia de afinidade é uma técnica de cromatografia líquida, que faz uso de interações biológicas específicas, para a separação e análise de diferentes espécies numa amostra (Hage, 1999).

O uso desta abordagem cromatográfica requer que primeiro se obtenha um agente de ligação, conhecido como o ligando de afinidade, que interage selectivamente com a espécie desejada e que esse ligando seja depois imobilizado num suporte sólido, ficando pronto a ser usado na separação e quantificação de biomoléculas (Hage, 1999).

Tendo em conta esta informação, e após se verificar que a berberina é um bom ligando do pDNA, o seu uso na purificação por afinidade dessa biomolécula, parece ser uma abordagem promissora.

Para isso, não a berberina, mas o produto obtido da hidrólise do seu grupo metilenodióxido, foi imobilizado a um suporte sólido, o Epóxi – (CH₂)₄ – Sepharose™. O gel obtido foi depois empacotado numa pequena coluna e esta colocada no sistema FPLC®.

Uma vez que o ligando imobilizado é o factor chave, que determina o sucesso de qualquer método cromatográfico de afinidade (Hage, 1999), as possíveis falhas ocorridas durante a hidrólise ou derivatização do suporte, irão influenciar negativamente a técnica.

Foi inicialmente estudada a influência da concentração do sal cloreto de sódio na retenção do pDNA no suporte. A escolha deste sal baseou-se nos ensaios de afinidade realizados recorrendo à técnica de titulação fluorimétrica (pontos 5.9 e 6.4). Foi também realizado um ensaio com sulfato de amónio, a título experimental, uma vez que este é um sal muito usado na purificação deste tipo de biomolécula, e aquele que possibilita um maior incremento na tenção superficial das soluções.

Após os ensaios de cromatografia de afinidade, as amostras injectadas e recolhidas foram analisadas quanto à sua composição, por electroforese em gel de agarose 1%.

Os cromatogramas foram tratados recorrendo ao software SigmaScan® Pro 5.0.

6.6.1. Ensaio na ausência de sal

Foi inicialmente testada a influência da ausência de sal na ligação do pDNA ao suporte cromatográfico. Desta forma a solução eluente usada para a retenção foi o tampão tris-HCl 0,05 M pH = 7,5. Para a eluição usou-se o tampão tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,5 M pH = 7,5. A concentração de amostra usada foi de 300 µg/ml, tendo sido injectados 200 µl da mesma.

Os resultados (figura 21) mostram que após a injeção da amostra, o pDNA é imediatamente eluído, sem apresentar qualquer nível retenção na coluna.

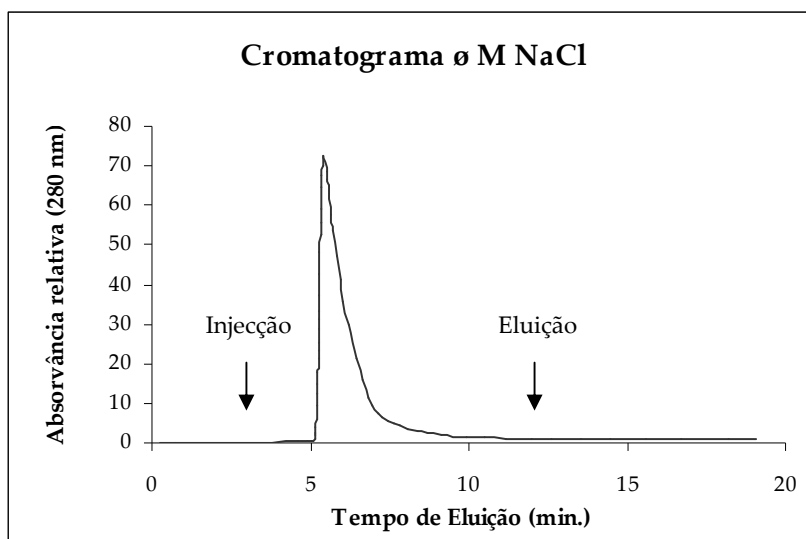


Fig. 21 – Cromatograma obtido após injeccção de 200 μ l de soluccção pDNA a 300 μ g/ml: tampão tris-HCl 0,05 M + NaCl 0 M pH = 7,5

Neste caso, a inexistência de retenccção na coluna pode ficar a dever-se às fracas interacçōes electrostáticas do meio, que nāo foram suficientes para promover a ligaçāo do pDNA ao ligando imobilizado. Desta forma, um aumento da molaridade do sal na fase mōvel, poderā determinar uma retenccção superior.

6.6.2. Ensaio com cloreto de sōdio 0,25 M

Neste caso, foi obtido o perfil cromatogrāfico usando a soluccção tampão tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,25 M pH = 7,5. Para a eluiçāo usou-se o tampão tris-HCl 0,05 M pH=7,5. Foram injectados 100 μ l de amostra com uma concentraçāo de 300 μ g/ml. O perfil obtido pode observar-se na figura 22.

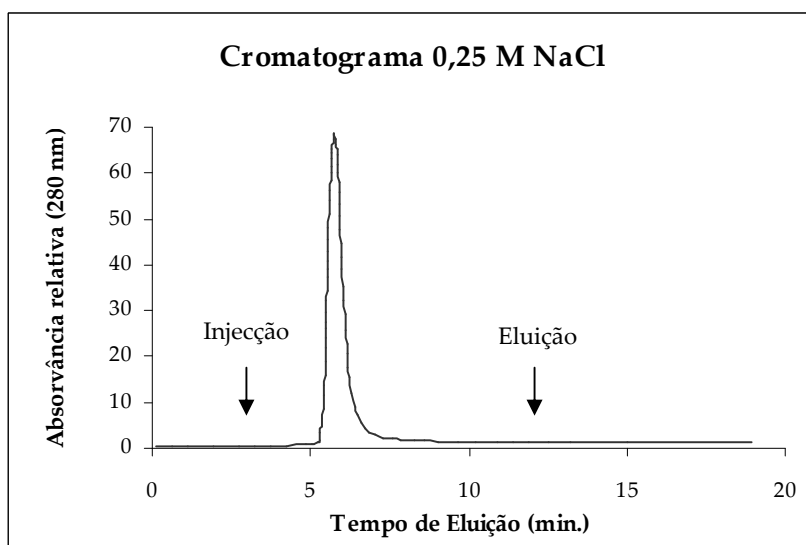


Fig. 22 – Cromatograma obtido após injeccção de 100 μ l de soluccção pDNA a 300 μ g/ml: tampão tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,25 M pH = 7,5

Como se pode visualizar na figura 22, o perfil cromatográfico obtido para esta concentração de cloreto de sódio é muito semelhante ao obtido para a total ausência desse sal: após a sua injeção, a amostra foi imediatamente eluída, sem se observar qualquer tipo de retenção na coluna.

Mais uma vez, este facto pode ser justificado pelas fracas interacções presentes na coluna, impossibilitando que o pDNA se ligasse ao ligando.

6.6.3. Ensaio com cloreto de sódio 0,5 M

A concentração de cloreto de sódio 0,5 M foi uma das usadas aquando do estudo da afinidade da berberina, durante os ensaios de titulação fluorimétrica, contudo a constante obtida foi baixa.

Foram injectados 200 μ l de amostra de pDNA a uma concentração de 600 μ g/ml e a eluição feita uma vez mais com tampão tris-HCl 0,05 M pH = 7,5.

O perfil obtido é o apresentado na figura 23.

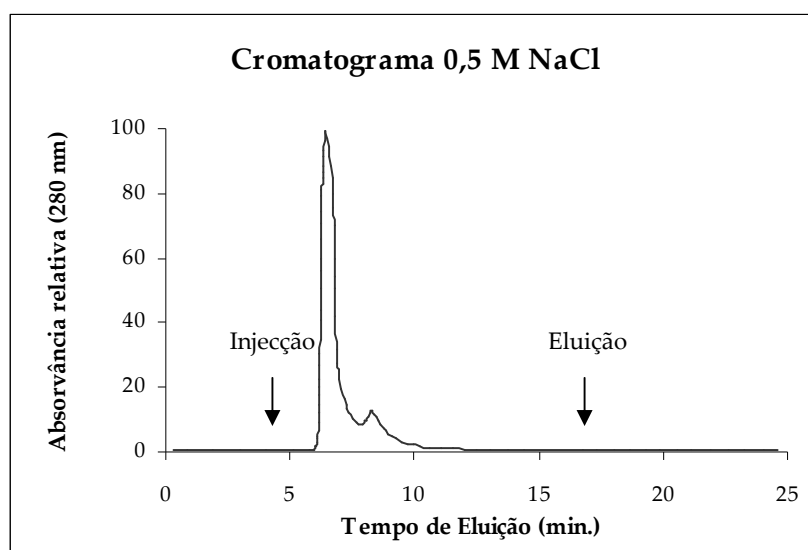


Fig. 23 – Cromatograma obtido após injeção de 200 μ l de solução pDNA a 600 μ g/ml: tampão tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,5 M pH = 7,5

Apesar de a amostra ter sido novamente eluída imediatamente após a sua injeção, o perfil obtido apresenta um segundo e pequeno pico, que os perfis anteriores não exibiam. Esse pico pode ter sido resultado de um atraso na eluição de uma das isoformas do pDNA presentes na solução, sendo possível que a coluna tenha possibilitado essa separação.

Apesar de tudo, a amostra não foi retida na coluna, facto este possivelmente devido, não só às fracas forças electrostáticas do meio, mas também à incapacidade da coluna em suportar a concentração (muito elevada) ou quantidade de amostra

injectada. Outra possibilidade será a baixa densidade de ligandos imobilizados no suporte.

6.6.4. Ensaio com cloreto de sódio 0,75 M

Continuando o estudo da influência da concentração de cloreto de sódio na ligação do pDNA ao suporte cromatográfico, passou-se à concentração de 0,75 M. Desta forma, foi usado o tampão tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,75 M pH = 7,5 e para a eluição o tris-HCl 0,05 M pH = 7,5.

Foram injectados 200 μ l de amostra a 150 μ g/ml e o perfil obtido está apresentado na figura 24.

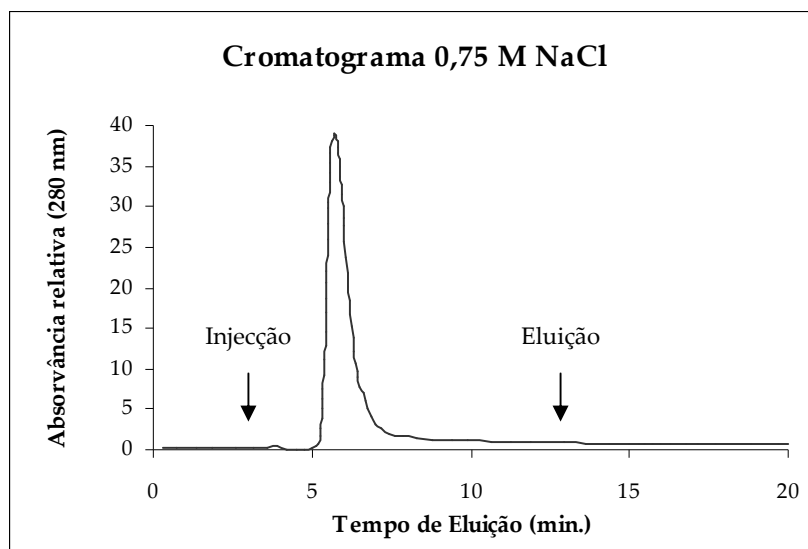


Fig. 24 – Cromatograma obtido após injeção de 200 μ l de solução pDNA a 150 μ g/ml: tampão tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,75 M pH = 7,5

O perfil cromatográfico apresentado na figura anterior é novamente semelhante ao obtido na ausência de sal ou com a concentração de 0,25 M, sem a presença do pequeno segundo pico. Desta forma, a amostra injectada foi imediatamente eluída, sem se verificar qualquer tipo de retenção ou atraso das espécies na coluna.

6.6.5. Ensaio com cloreto de sódio 1,0 M

Esta foi a concentração à qual se obteve a constante de afinidade superior, sendo por isso a mais prometedora para se obterem resultados positivos nos ensaios de cromatografia de afinidade. Foram para isso injectados 200 μ l de amostra com uma concentração de 300 μ g/ml. O tampão usado na eluição foi novamente o tris-HCl 0,05 M pH = 7,5.

O cromatograma obtido está representado na figura 25.

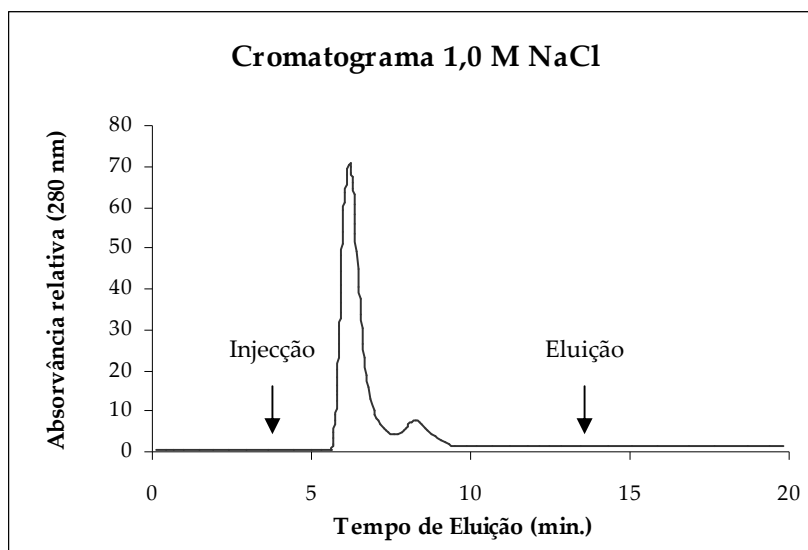


Fig. 25 – Cromatograma obtido após injeção de 200 μ l de solução pDNA a 300 μ g/ml: tampão tris-HCl 0,05 M + NaCl 1,0 M pH = 7,5

Tal como o verificado no caso da concentração 0,5 M, também aqui se observa um pequeno segundo pico, contudo, o resto do perfil é também semelhante ao obtido com essa concentração, sem se verificar qualquer retenção na coluna. Apesar do pequeno atraso de uma fracção da amostra, as espécies foram eluídas aquando da injeção, tal como sucedeu com todos os casos anteriores.

Apesar de 1,0 M ser a concentração à qual a ligação do pDNA ao ligando é máxima, não se observa qualquer diferença de comportamento no que toca à interacção da amostra com a coluna de purificação.

6.6.6. Ensaio com cloreto de sódio 1,25 M

Neste caso, foi obtido o perfil cromatográfico usando a concentração de sal 1,25 M (solução tampão tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,25 M pH = 7,5). Para a eluição usou-se o tampão tris-HCl 0,05 M pH = 7,5.

Foram injectados 100 μ l de amostra de pDNA com uma concentração de 300 μ g/ml.

O perfil obtido pode observar-se na figura seguinte.

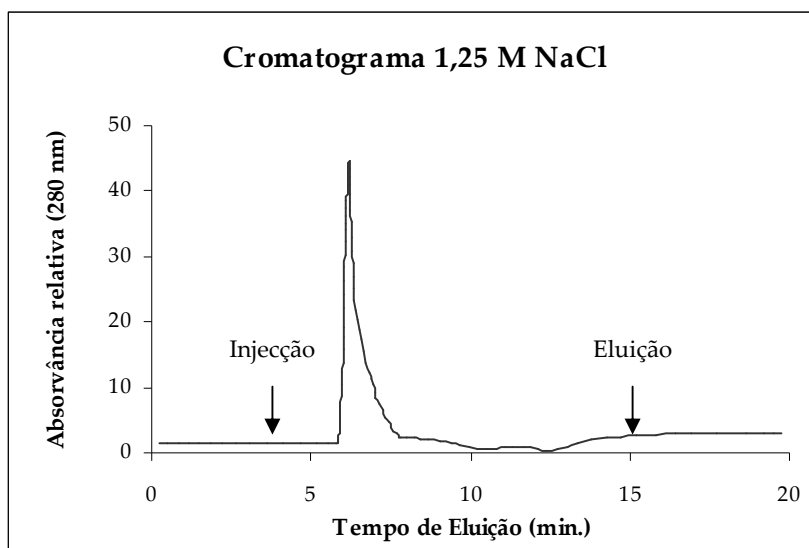


Fig. 26 – Cromatograma obtido após injeccção de 100 μ l de soluccção pDNA a 300 μ g/ml: tampão tris-HCl 0,05 M + NaCl 1,25 M pH = 7,5

Observando a figura 26 pode constatar-se que a amostra foi, uma vez mais, eluída logo após a sua injeccção, observando-se um único pico, correspondente à eluiçção da totalidade de amostra injectada.

6.6.7. Ensaio com cloreto de sódio 1,5 M

O cromatograma obtido para a concentraçção de 1,5 M está representado na figura 27. Neste caso foram injectados 100 μ l de amostra com uma concentraçção de 300 μ g/ml. A eluiçção foi feita usando, como nos pontos anteriores, o tampão tris-HCl 0,05 M pH = 7,5.

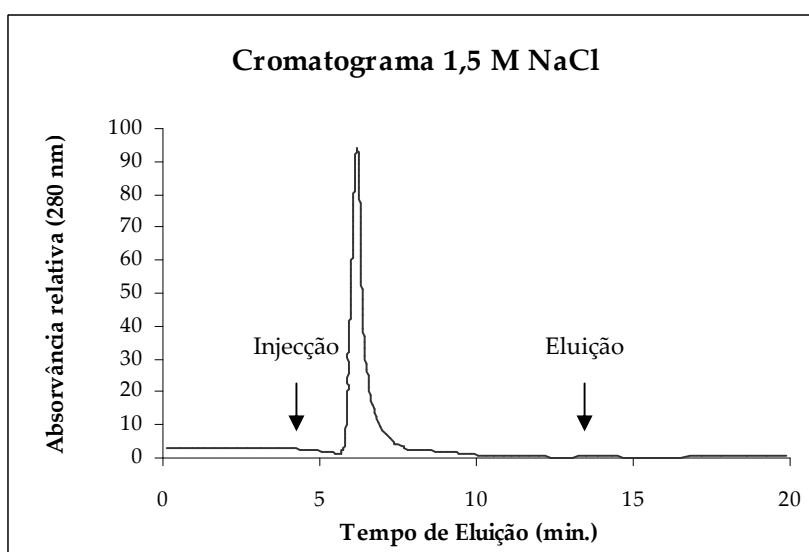


Fig. 27 – Cromatograma obtido após injeccção de 100 μ l de soluccção pDNA a 300 μ g/ml: tampão tris-HCl 0,05 M + NaCl 1,5 M pH = 7,5

A esta concentração corresponde também uma constante de afinidade, entre o pDNA e a berberina, de um valor considerável, contudo, o perfil cromatográfico não apresenta quaisquer sinais de retenção ou até atraso na eluição.

A razão para a qual a amostra foi imediatamente eluída, pode dever-se a uma baixa densidade de ligandos ou à baixa capacidade da coluna, em reter as espécies a purificar.

6.6.8. Ensaio com cloreto de sódio 1,75 M

Continuando o estudo da influência da concentração de cloreto de sódio na ligação do pDNA ao suporte cromatográfico, passou-se à concentração de 1,75 M. Desta forma, foi usado o tampão tris-HCl 0,05 M + NaCl 1,75 M pH = 7,5 e para a eluição o tris-HCl 0,05 M pH = 7,5.

Foram injectados 100 μ l de amostra de pDNA a 300 μ g/ml e o perfil obtido está apresentado na figura 28.

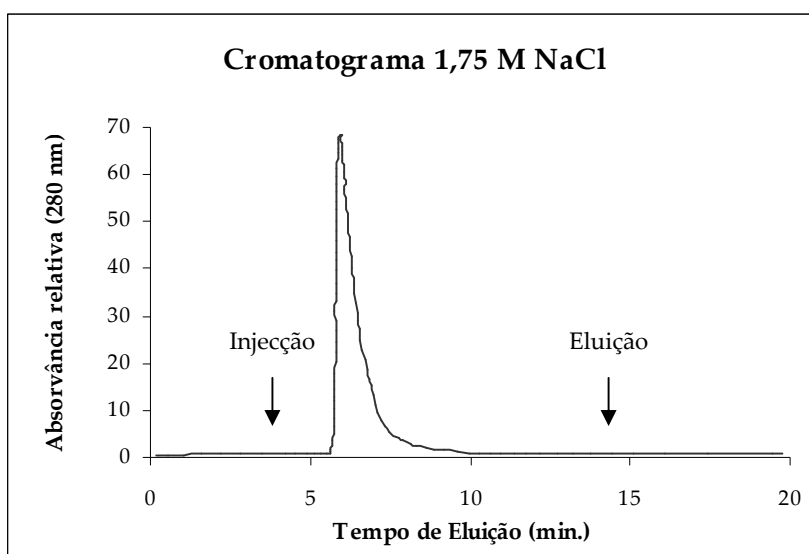


Fig. 28 – Cromatograma obtido após injeção de 100 μ l de solução pDNA a 300 μ g/ml: tampão tris-HCl 0,05 M + NaCl 1,75 M pH = 7,5

Analisando a figura anterior pode observar-se, mais uma vez, que o pDNA foi eluído logo após a sua injeção na coluna, não se observando qualquer tipo de retenção ou atraso na eluição.

6.6.9. Ensaio com cloreto de sódio 2,0 M

O perfil cromatográfico obtido para a concentração de 2,0 M está representado na figura 29. Para a sua obtenção, foram injectados na coluna cromatográfica 100 µl de amostra de concentração 300 µg/ml. O tampão de eluição usado foi o tris-HCl 0,05 M pH = 7,5.

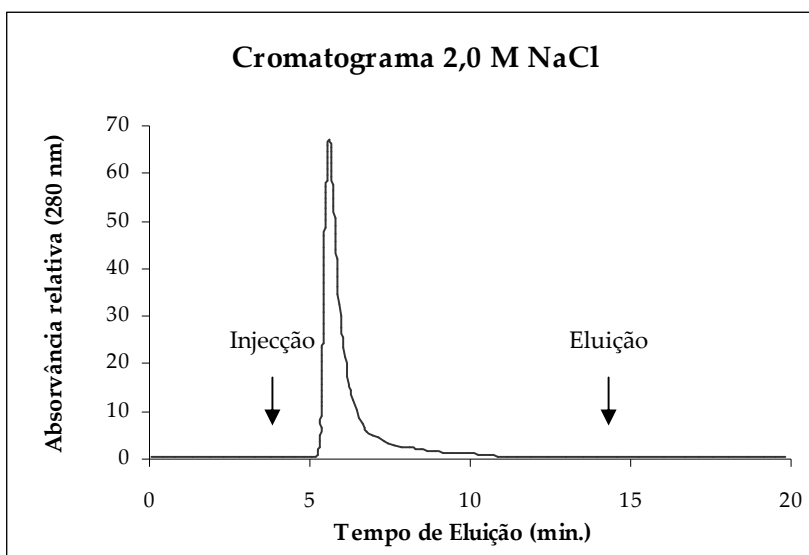


Fig. 29 – Cromatograma obtido após injeccção de 100 µl de solução pDNA a 300 µg/ml: tampão tris-HCl 0,05 M + NaCl 2,0 M pH = 7,5

Uma vez mais se pode observar que a amostra foi imediatamente eluída, após a sua injeccção, sem retenção ou atraso na eluição de qualquer espécie.

6.6.10. Ensaio com sulfato de amónio 2,25 M

Este ensaio foi realizado unicamente a título experimental, já que o sulfato de amónio não foi usado nos ensaios de determinação das constantes de afinidade.

Foram, neste caso, injectados 100 µl de amostra com uma concentração de 300µg/ml, sendo utilizados os tampões Tris-HCl 0,05 M + (NH₃)₂SO₄ 2,25 M pH=7,5 para a equilibrar a coluna e o tampão tris-HCl 0,05 M pH = 7,5 para a eluição. O cromatograma obtido é o apresentado na figura seguinte.

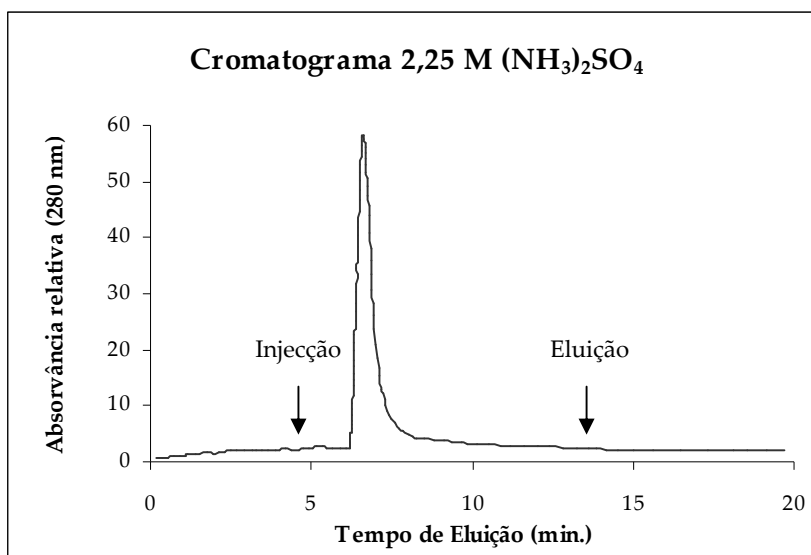


Fig. 30 – Cromatograma obtido após injeção de 100 μ l de solução pDNA a 300 μ g/ml: tampão tris-HCl 0,05 M + $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ 2,25 M pH = 7,5

Como se pode verificar, o cromatograma da figura 30 apresenta um perfil semelhante aos obtidos com o cloreto de sódio, onde se pode constatar que não houve retenção de qualquer espécie na coluna de purificação.

*

Desta forma os resultados obtidos podem dever-se a uma baixa densidade de ligandos na coluna, que foi insuficiente para permitir que a separação ocorresse, ou a afinidade existente entre a berberina e o pDNA não foi, apesar dos elevados valores da constante de afinidade, também suficientemente elevada. A constante de afinidade calculada pode, eventualmente, não demonstrar a real afinidade, existente entre a berberina e o pDNA.

Para além disso, uma vez que o ligando imobilizado no suporte cromatográfico não correspondia a um só composto, mas possivelmente a quatro (ponto 6.5.1.7 e figura 20), é provável que o pDNA não se tenha ligado, por incompatibilidade estrutural com essas novas moléculas, uma vez que os grupos metóxido determinam os contactos com os hidrogénios das adeninas do “minor groove” (Mazzini *et al*, 2003).

Uma outra hipótese pode basear-se no facto de, ao ligar o produto de clivagem da berberina ao suporte, a molécula tenha adoptado uma posição e/ou conformação diferentes daquelas que permitem a sua ligação às moléculas de pDNA, já que continham grupos hidroxílicos, noutras posições, passíveis de se ligarem. Após essa ligação, é possível que alguma fracção da molécula, importante para a ligação com o pDNA, tenha ficado inacessível.

6.7. Análise das espécies eluídas por electroforese

Após os ensaios de cromatografia de afinidade, as amostras recolhidas foram concentradas e o seu conteúdo analisado por electroforese em gel de agarose 1%.

Uma vez que foram usadas amostras de pDNA provenientes de duas extracções/purificações distintas, foram aplicadas no gel, amostras de ambas as soluções, diluídas para 30 mg/ml.

Durante os ensaios de cromatografia de afinidade constatou-se que, à excepção das concentrações 0,5 e 1,0 M, todas as outras apresentam um perfil cromatográfico idêntico, pelo que só algumas das amostras recolhidas foram analisadas por electroforese: picos das concentrações 0,25, 0,5 e 1,0 M.

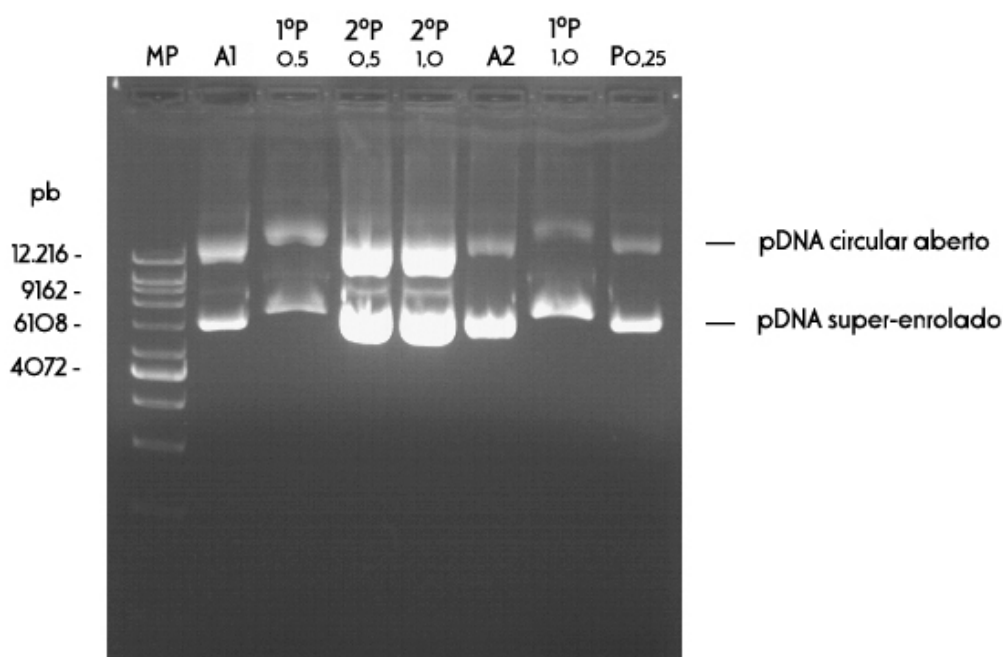


Fig. 31 – Fotografia do gel de electroforese de visualização das espécies eluídas, em gel de agarose 1%, com brometo de etídio como revelador.

MP – Marcador de pesos moleculares da Invitrogene™ (ver apêndice 9.2); A1 – Amostra $4,75 \times 10^{-3}$ M; 1ºP (0,5+1,0) – Soma dos 1ºs picos das concentrações 0,5 e 1,0 M de NaCl; 2ºP 0,5 – 2º pico da concentração 0,5 M de NaCl; 2ºP 1,0 – 2º pico da concentração 1,0 M de NaCl; A2 – Amostra $3,958 \times 10^{-3}$ M; 1ºP 1,0 – 1º Pico da concentração 1,0 M NaCl; P0,25 – Pico da concentração 0,25 M de NaCl

Observando a figura 31 pode constatar-se que todas as amostras eluídas são semelhantes entre si e com as amostras injectadas, sendo constituídas por pDNA circular aberto e super-enrolado. Desta forma, prova-se o que foi inferido com os cromatogramas: que as amostras não sofreram qualquer tipo de separação das espécies que as constituem.

Apesar do pequeno atraso na eluição, os constituintes do primeiro e segundo picos das concentrações 0,5 e 1,0 M são exactamente os mesmos, pelo que o segundo pico não

corresponde à separação de uma espécie diferente. Neste caso, poderá ter ocorrido retenção de uma pequena fracção da amostra, sendo eluída quase de seguida.

Comparando o comportamento das amostras após a electroforese, constatam-se diferenças entre as de 0,5 e 1,0 M e as restantes, pois essas apresentam um ligeiro atraso na “corrida”.

Ambas as amostras A1 e A2 continham grandes quantidades de pDNA circular aberto, principalmente a A1, uma vez que se encontravam armazenadas (-80°C) há quase três meses.

7. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objectivo, o desenvolvimento de uma técnica de afinidade para a purificação de DNA plasmídico, aproveitando a excelente afinidade de certas moléculas, neste caso antibióticos, para com essa biomolécula.

O facto de, nos dias de hoje, a purificação de pDNA se basear principalmente noutros tipos de interação, que não a afinidade, faz desta abordagem uma aplicação promissora na purificação da biomolécula que é a base da TG não viral.

Para concretizar os objectivos, o trabalho subdividiu-se em quatro fases: produção e extracção de DNA plasmídico; estudos de afinidade de dois ligandos, os antibióticos neomicina e berberina, para com o pDNA, e escolha do mais promissor; preparação do ligando para a sua posterior ligação a uma matriz cromatográfica, o Epóxi – (CH₂)₄ – Sepharose™; e finalmente, ensaios de separação de pDNA por cromatografia de afinidade, usando o suporte – Epóxi – (CH₂)₄ – Sepharose™ com a berberina como ligando de afinidade.

Para o estudo da afinidade entre os dois antibióticos e o pDNA usou-se uma técnica de titulação fluorimétrica, que se baseou na diminuição da fluorescência do BrEt por ligação competitiva dos ligandos ao ácido nucleico. Esta técnica provou ser uma forma simples e relativamente precisa de calcular as constantes de afinidade entre a neomicina e a berberina, e o pDNA.

A afinidade de ambos os ligandos foi também testada a diferentes concentrações de cloreto de sódio, nas soluções tampão usadas no decorrer da técnica fluorimétrica.

Dos dois ligandos, o que provou ser mais promissor para a sua aplicação em cromatografia de afinidade foi a berberina, uma vez que foi o que apresentou as constantes de afinidade mais elevadas. Tendo em conta as diferentes concentrações de sal estudadas, a constante de afinidade máxima verificou-se a 1,0 M.

Depois de escolhida a berberina como o ligando, procedeu-se ao estudo da sua ligação a um suporte cromatográfico. Assim, determinou-se qual o melhor suporte a usar, tendo em conta a estrutura da berberina, investigou-se de que forma se poderia potencializar a derivatização e que tipo de modificações a molécula de ligando deveria sofrer para que a mesma fosse possível.

O suporte escolhido foi o Epóxi – (CH₂)₄ – Sepharose™, contudo a ligação directa entre este e o ligando não era possível, pela inexistência de grupos funcionais susceptíveis de reagirem, directa ou indirectamente, com os grupos reactivos respectivos. Procedeu-se assim à clivagem do grupo metilenodióxido (acetal) da berberina, para se obter um catecol, com dois grupos funcionais hidroxílicos aromáticos, os quais reagem facilmente com o suporte, promovendo a imobilização do ligando.

Contudo, a berberina mostrou ser extremamente resistente à clivagem, e só através do uso de tricloreto de alumínio, como activador da reacção, é que se obtiveram

resultados promissores. Porém, foram vários os produtos de clivagem obtidos, gerados da clivagem total ou parcial dos ésteres metílicos da molécula.

Apesar de tudo, procedeu-se à imobilização do ligando ao suporte seleccionado, passo este que decorreu com sucesso.

Após a imobilização, foram realizados ensaios de cromatografia de afinidade, com variação da concentração de sal.

Sabendo que o 1,0 M foi o valor ao qual a afinidade da berberina com o pDNA foi máxima, esperava-se que pelo menos a essa concentração se obtivessem resultados positivos, no entanto, verificou-se que as amostras foram imediatamente eluídas após a sua injeção.

Apesar da existência de um segundo pico nas concentrações 0,5 e 1,0 M, este revelou, por electroforese em gel de agarose, conter exactamente as mesmas espécies que estavam presentes no primeiro pico, ou no pico único das restantes concentrações. Desta forma, não se verificou, em nenhuma das concentrações, qualquer tipo de separação selectiva ou retenção das espécies na coluna cromatográfica, observando-se unicamente um pequeno atraso na eluição da amostra, nos dois casos mencionados anteriormente.

São vários os factores que podem ter impedido que a amostra fosse retida na coluna:

- A densidade de ligandos na coluna pode não ter sido suficiente para possibilitar a devida separação e retenção das espécies.

- Apesar de a constante de afinidade entre o pDNA e a berberina apresentar um valor elevado, pode ainda assim não ser suficiente para possibilitar a retenção das espécies na coluna, ou pode não representar a real afinidade existente entre as duas estruturas.

- O produto imobilizado ao suporte cromatográfico corresponde a uma mistura de quatro compostos, um derivado da clivagem do grupo metilenodióxido, e os restantes, resultantes dessa clivagem e da hidrólise total ou parcial dos grupos metóxido. Desta forma, é possível que o pDNA não se tenha ligado, por incompatibilidade estrutural com essas novas moléculas, já que os grupos metóxido são determinantes na ligação ao pDNA.

- Os produtos imobilizados ao suporte podem ter adoptado uma posição diferente daquela que permite a sua ligação às moléculas de pDNA, principalmente devido ao facto de existirem mais grupos hidroxílicos em jogo. Uma vez que estes são o ponto de ligação das moléculas ao suporte, a mistura de compostos pode ter originado, por sua vez, uma mistura de conformações e formas de ligação ao mesmo, sendo possível que fracções da molécula tenham ficado inacessíveis para se ligarem ao pDNA.

*

Apesar dos resultados obtidos, esta abordagem, que visa a purificação de pDNA terapêutico por cromatografia de afinidade, beneficiando da afinidade de pequenas

moléculas como os antibióticos, é bastante promissora. Para além de usar uma forma cromatográfica pouco comum neste tipo de purificação, o facto de aproveitar a afinidade que certas moléculas têm para o pDNA, faz dela uma técnica muito mais específica e desta forma, mais eficaz.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

É certo que todos os trabalhos apresentam problemas, tendo-se sempre em mente que determinados passos poderiam ter sido feitos de outra forma, e este não foi excepção, principalmente tratando-se de um trabalho totalmente novo e em fase embrionária. Assim, existem algumas medidas, modificações ou até pequenos detalhes, que deverão ser considerados no futuro.

Por exemplo, seria interessante usar outro método, diferente do de Scatchard, para o cálculo das constantes de afinidade, sabendo, ainda assim, que este é específico para o cálculo de constantes de afinidade entre ligandos e biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos.

Outra sugestão seria fazer os ensaios de afinidade usando outro sal, como por exemplo o sulfato de amónio, e estudar a influência que o mesmo poderia causar na afinidade dos ligandos ao pDNA.

Deveriam também testar-se outros antibióticos, com uma constante de ligação superior, e cuja estrutura permitisse a imobilização directa a um suporte cromatográfico, sem necessidade de modificação química. Desta forma, evitar-se-iam passos, como o de clivagem, realizados neste trabalho experimental, que por vezes originam produtos diferentes do pretendido.

Finalmente, e ainda considerando a berberina como ligando, deverão de futuro, ser usadas condições mais suaves para alcançar a clivagem do grupo metilenodioxido, para evitar a hidrólise dos grupos metóxido. Apesar do processo ser mais demorado, a uma temperatura mais baixa (ou ambiente) poderá evitar-se a formação de subprodutos que interferem negativamente, tanto no processo de imobilização do ligando na coluna, como na própria de separação cromatográfica.

9. APÊNDICES

9.1. Plasmídeo pVAX1-LacZ

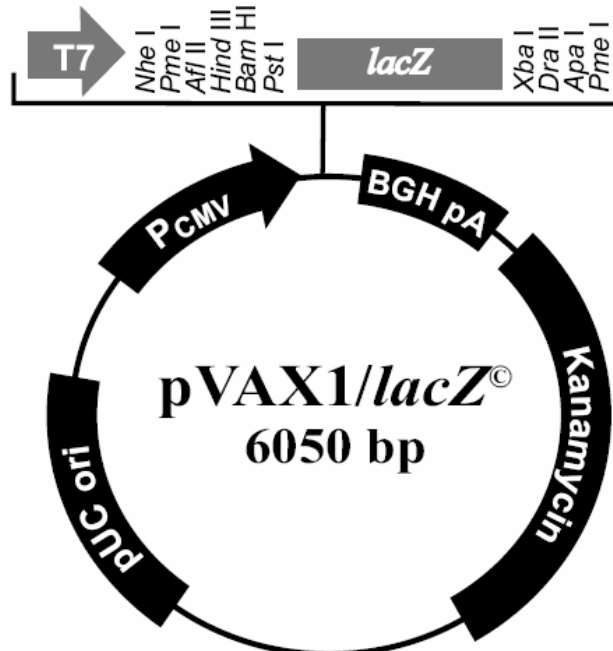


Fig. A1 – Plasmídeo pVAX1-LacZ[®] e suas características
(Fonte: <http://www.invitrogen.com>)

9.2. Marcador de Pesos Moleculares

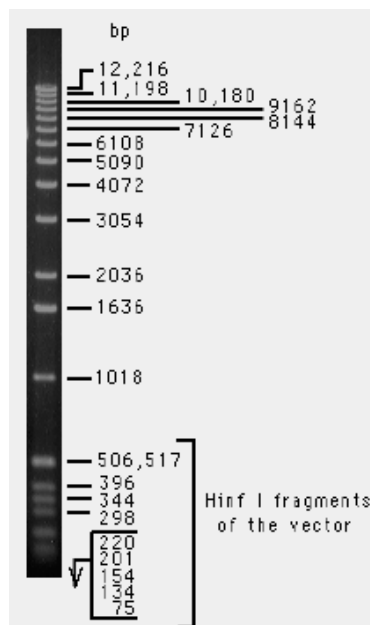


Fig. A2 – Marcador de pesos moleculares 1 Kb DNA Ladder em gel de agarose
0,9 %, 0,5 µg/banda, revelado com BrEt
(Fonte: <http://www.invitrogen.com>)

9.3. Valores obtidos para todos os ensaios do ponto 6.3

Tabela AI – Valores de K e K' obtidos para os dois antibióticos

Concentração de NaCl (M)	Constante de ligação do BrEt ao pDNA (M ⁻¹)	Antibiótico		Declives das rectas correspondentes a cada um dos volumes de antibiótico usados					Constante de ligação do antibiótico ao pDNA (M ⁻¹)
				75 µL	150 µL	225 µL	300 µL	375 µL	
0,5	607554	Neomicina	1ºEnsaio	531154	449179	401960	372733	337489	67,36
			2ºEnsaio	698938	438682	402273	354818	332354	68,95
			3ºEnsaio	543904	435486	410118	356388	337141	66,39
		Berberina	1ºEnsaio	539926	542488	428087	410675	397800	4446,80
			2ºEnsaio	797798	476751	429804	411286	384027	4691,02
			3ºEnsaio	558902	517732	456016	433496	395849	4431,30
0,75	408286	Neomicina	1ºEnsaio	378136	336118	307659	294084	275883	41,12
			2ºEnsaio	371575	333924	318434	296679	308112	37,36
			3ºEnsaio	372806	340288	329373	288094	279186	40,36
		Berberina	1ºEnsaio	350420	319838	301809	282258	259866	4333,07
			2ºEnsaio	353809	329977	298437	283211	268527	4141,66
			3ºEnsaio	491019	331477	332751	292014	270419	4069,11
1,0	578486	Neomicina	1ºEnsaio	501527	467504	412328	371549	349351	55,73
			2ºEnsaio	531395	418069	392681	362947	379635	58,06
			3ºEnsaio	496043	464128	418552	384238	325967	53,38
		Berberina	1ºEnsaio	483769	431969	366453	342509	311376	7046,90
			2ºEnsaio	459142	398398	351178	331871	298094	7193,08
			3ºEnsaio	467583	437051	377065	349273	297692	7110,86

1,25	420876	Neomicina	1ºEnsaio	321954	289036	288715	254774	242889	62,46
			2ºEnsaio	350557	320761	326414	260167	280780	59,83
			3ºEnsaio	448767	328544	376293	258861	244216	62,63
		Berberina	1ºEnsaio	452842	334832	309619	285410	278665	4258,49
			2ºEnsaio	374744	330511	297835	280140	267994	4816,21
			3ºEnsaio	367516	341991	315847	312618	272827	4307,18
1,5	403556	Neomicina	1ºEnsaio	379766	344474	324133	298527	288211	35,35
			2ºEnsaio	356701	327632	309435	291840	279291	35,56
			3ºEnsaio	363435	335360	306267	284404	276533	39,55
		Berberina	1ºEnsaio	333640	293178	270183	200324	232206	5758,41
			2ºEnsaio	364041	324639	286855	264495	240358	5780,08
			3ºEnsaio	352625	301160	280734	258931	237697	5634,03
1,75	396799	Neomicina	1ºEnsaio	382237	371275	354133	347053	338769	14,54
			2ºEnsaio	380051	376770	368991	389706	360228	10,0
			3ºEnsaio	376645	363099	353320	340494	328276	16,65
		Berberina	1ºEnsaio	353443	327563	290916	277543	251809	4664,0
			2ºEnsaio	378567	301472	289208	259309	244115	5199,36
			3ºEnsaio	357391	310502	286065	270726	243119	5120,0
2,0	367914	Neomicina	1ºEnsaio	398082	350821	347274	339447	335812	7,95
			2ºEnsaio	358096	349114	335854	328798	325738	10,85
			3ºEnsaio	492603	357749	346773	340331	336770	7,83
		Berberina	1ºEnsaio	317395	291671	271676	247296	232219	4634,68
			2ºEnsaio	325358	296455	264292	248966	238007	4572,68
			3ºEnsaio	323840	296090	265424	243214	236421	4734,72

9.4. Espectros obtidos para o cloreto de berberina

9.4.1. Espectro UV/Visível

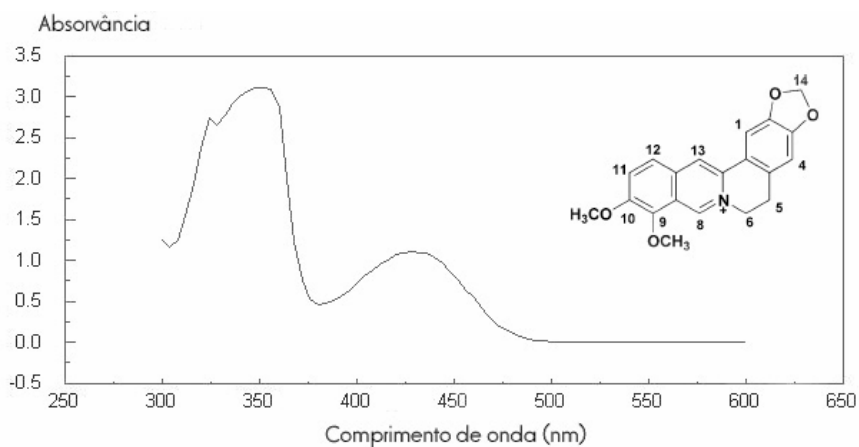


Fig. A3 – Espectro UV/Visível do cloreto de berberina e respectiva estrutura

9.4.2. Espectro IV

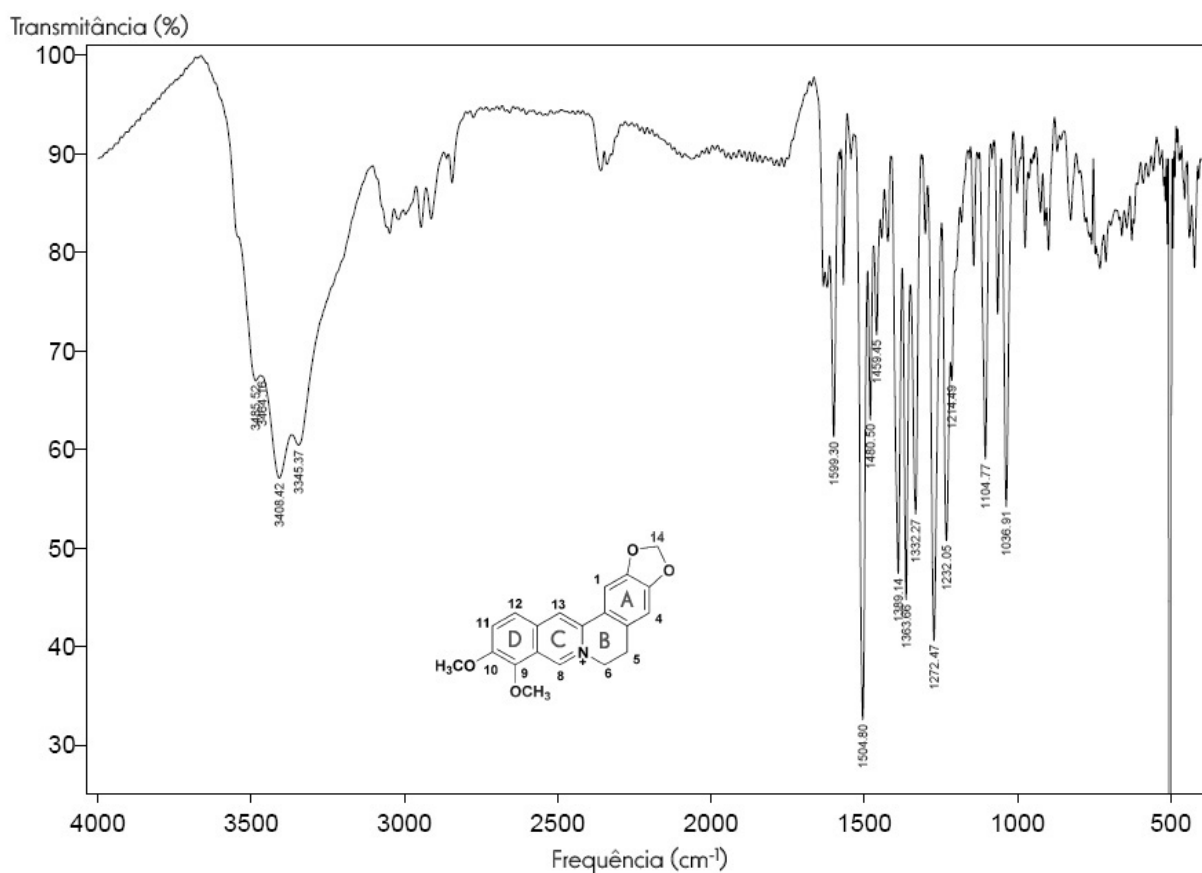


Fig. A4 – Espectro de IV do cloreto de berberina e respectiva estrutura

9.4.3. Espectro de RMN ^1H

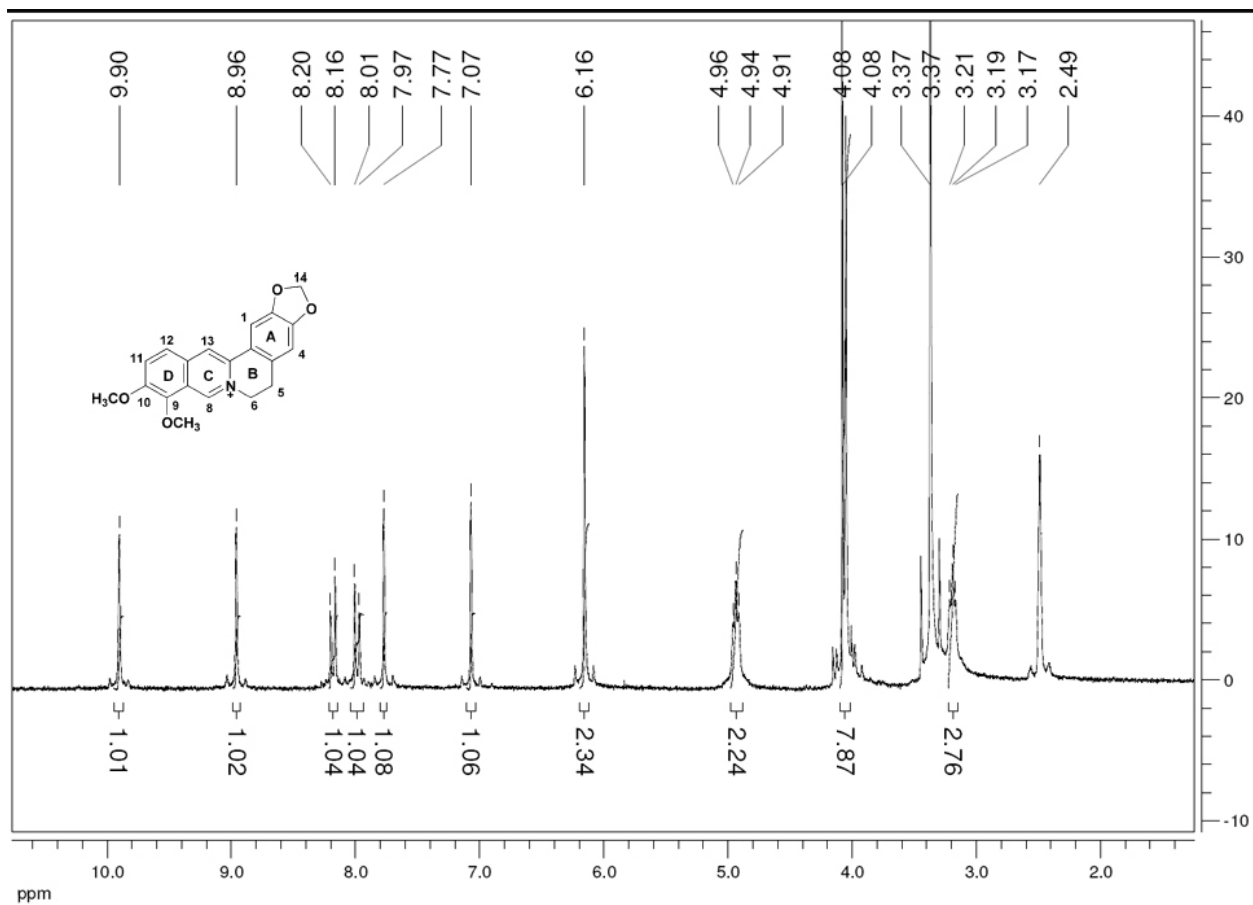


Fig. A5 - Espectro de RMN ^1H do cloreto de berberina em DMSO e respectiva estrutura

9.5. Espectros do produto obtido segundo a abordagem 1

9.5.1. Espectro IV

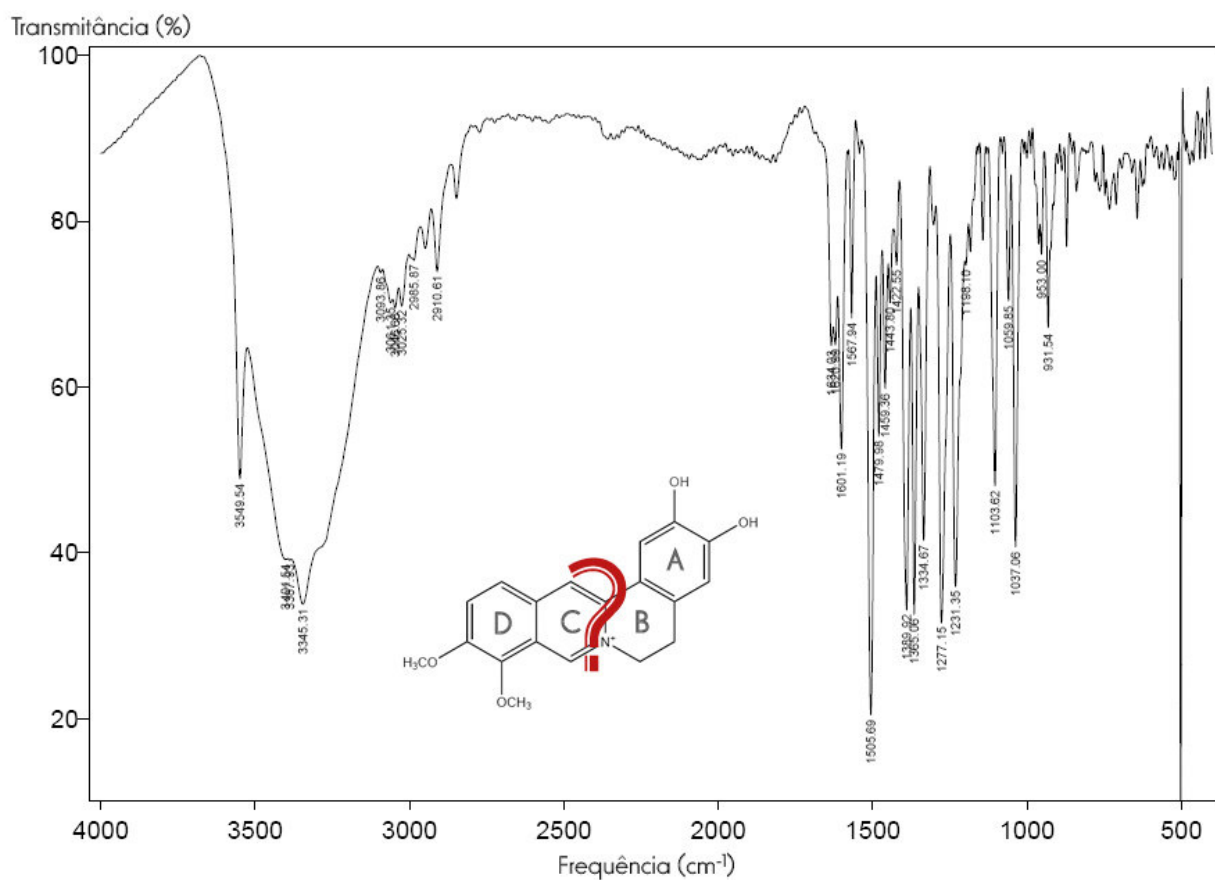


Fig. A6 - Espectro de IV do composto obtido da clivagem da berberina segundo a abordagem 1

9.5.2. Espectro RMN ^1H

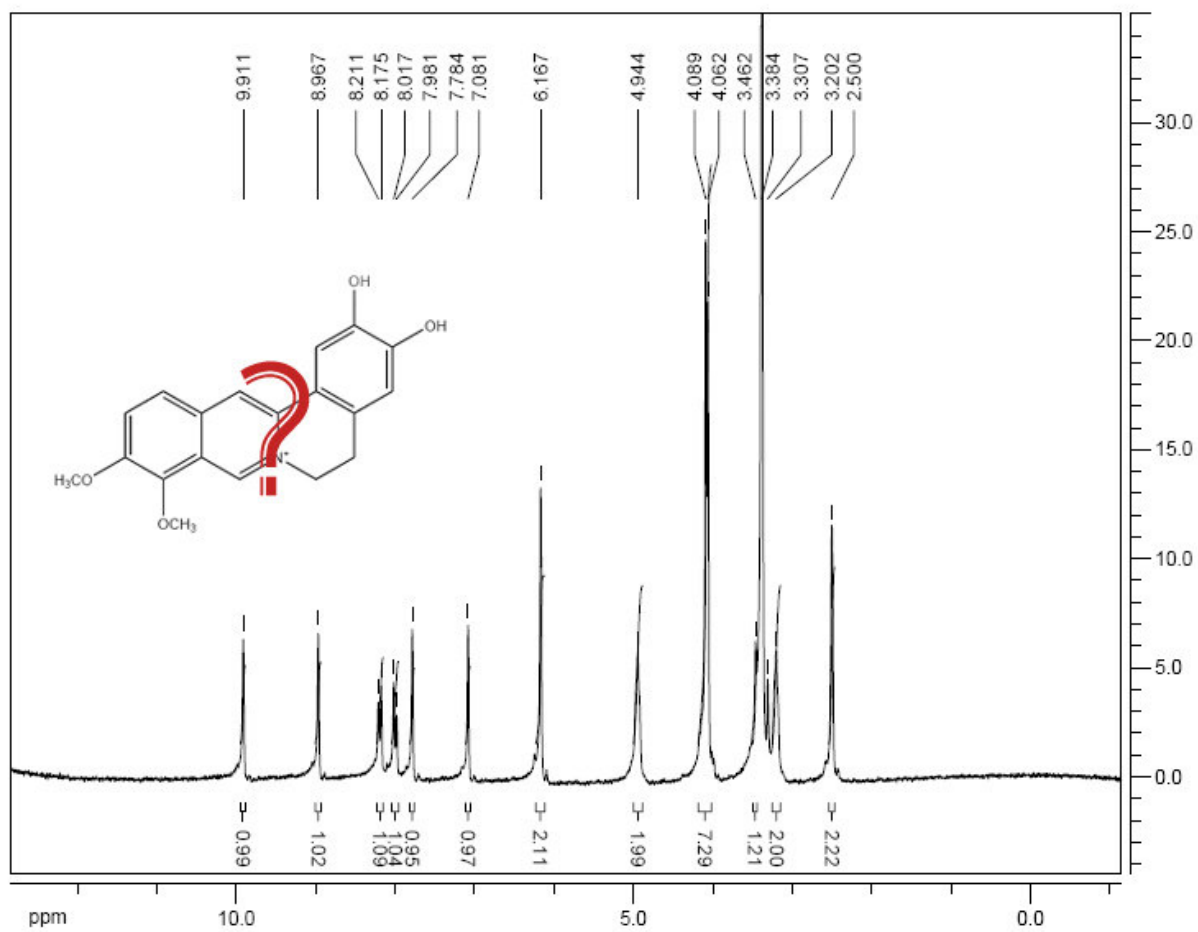


Fig. A7 - Espectro de RMN ^1H (em DMSO) do composto obtido da clivagem da berberina segundo a abordagem 1

9.6. Espectros do produto obtido segundo a abordagem 7

9.6.1. Espectro UV/Visível

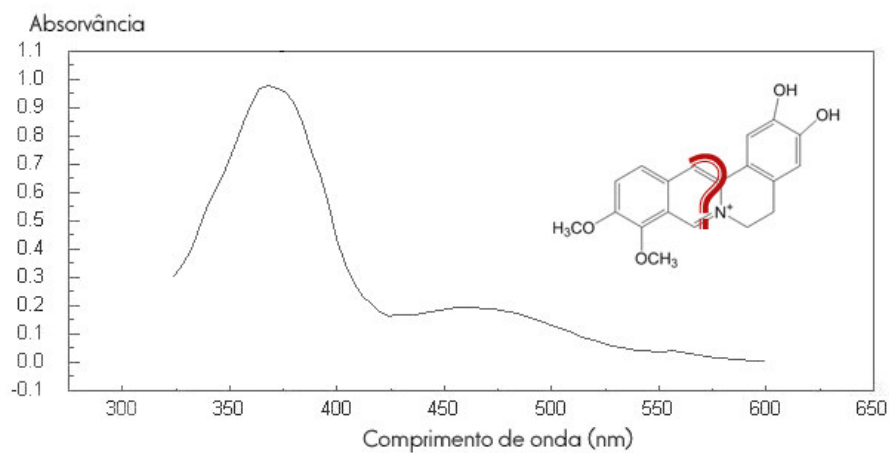


Fig. A8 – Espectro UV/Visível do produto de clivagem e respectiva estrutura

9.6.2. Espectro IV

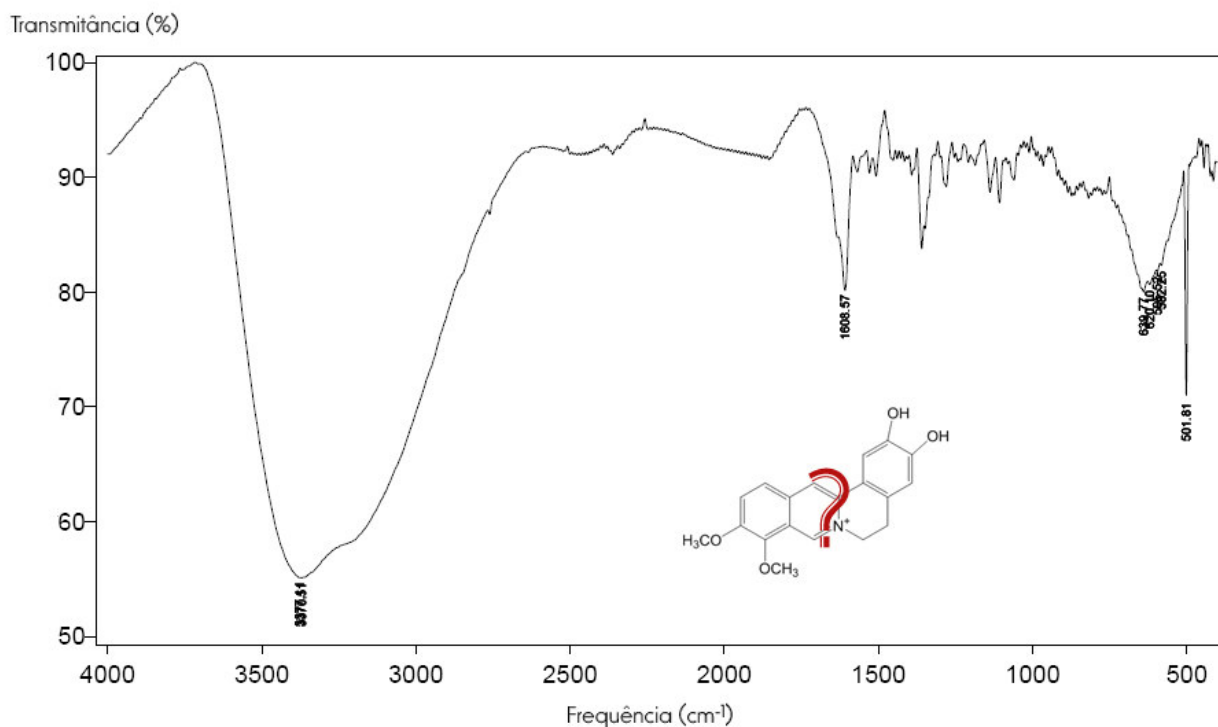


Fig. A9 - Espectro de IV do composto obtido da clivagem da berberina segundo a abordagem 7

9.6.3. Espectro RMN ^1H

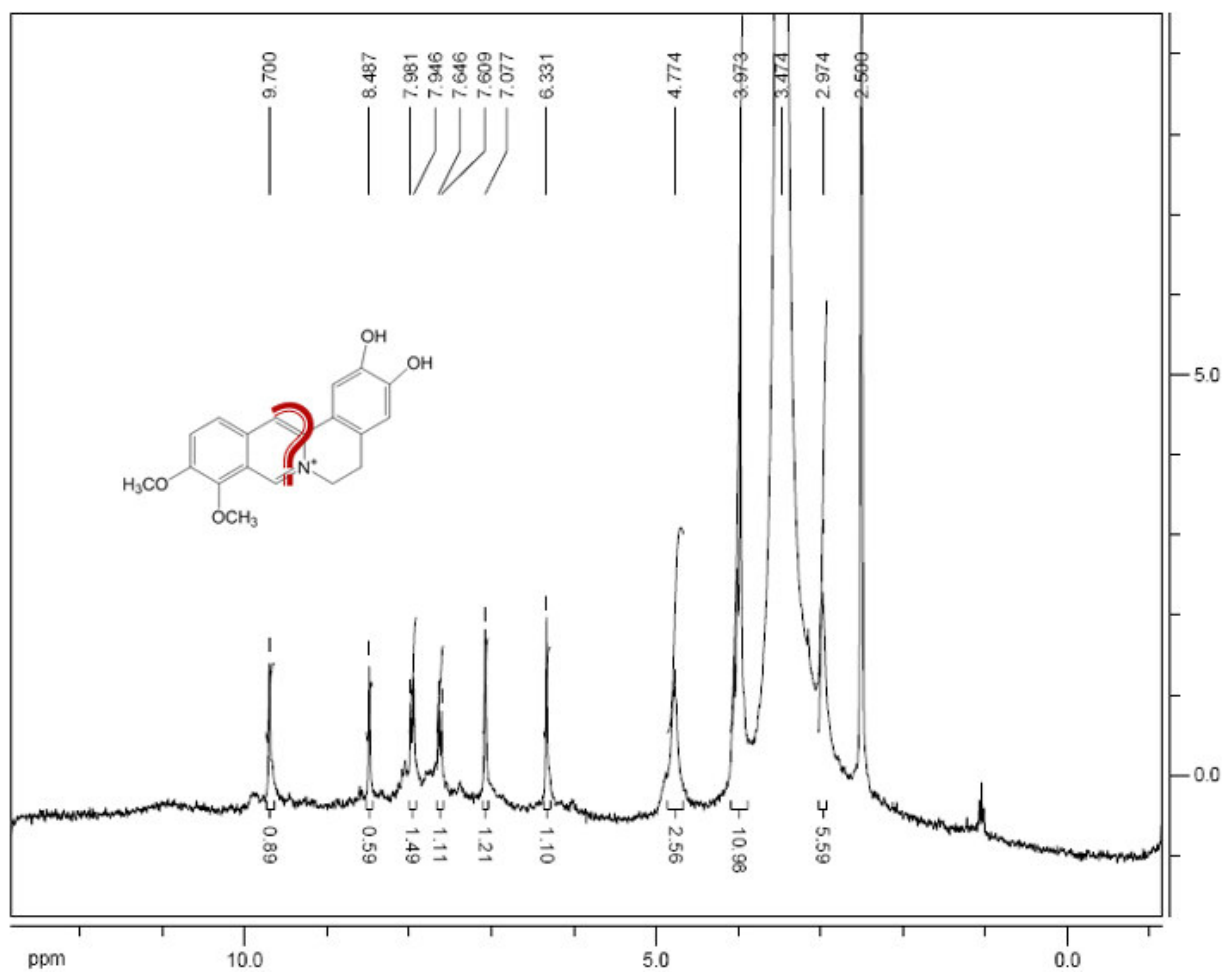


Fig. A10 - Espectro de RMN ^1H (em DMSO) do composto obtido da clivagem da berberina segundo a abordagem 7

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandrova R., Varadinova T., Velcheva M., Génova P. e Sainova I. "Cytotoxic effect of isoquinoline alkaloids on tumor cell lines", *Experimental Pathology and Parasitology*, Vol. 4: 8-14 (2000).
- Azevedo A.M., Rosa P.A.J., Ferreira I.F. e Aires-Barros M.R. "Optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies", *Journal of Biotechnology*, Vol. 132(2): 209-217 (2007).
- Bartulewicz D., Bielawski K. e Bielawska A. "Carbocyclic analogues of netropsin and distamycin: DNA – binding properties and inhibition of DNA topoisomerases", *Archiv der Pharmazie*, Vol. 335(9): 422-426 (2002).
- Bielawski K., Bielawska A., Bartulewicz D. e Rózański A. "Molecular modelling of the interaction of carbocyclic analogues of netropsin and distamycin with d(CGCGAATTCGCG)₂", *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 47(3): 855-866 (2000).
- Boger D.L., Fink B.E., Brunette S.R., Tse W.C. e Hendrick M.P. "A simple, high – resolution method for establishing DNA binding affinity and sequence selectivity", *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 123(25): 5878-5891 (2001).
- Boger D.L. e Tse W.C. "Thiazole orange as the fluorescent intercalator in a high resolution FID assay for determining DNA binding affinity and sequence selectivity of small molecules", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 9(9): 2511-2518 (2001).
- Branovic K., Forcic D., Ivancic J., Strancar A., Barut M., Gulija T.K., Zgorelec R. e Mazuran R. "Application of short monolithic columns for fast purification of plasmid DNA", *Journal of Chromatography B*, Vol. 801(2): 331-337 (2004).
- Brown M.D., Schätzlein A.G. e Uchegbu I.F. "Gene delivery with synthetic (non viral) carriers", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 229(1-2): 1-21 (2001).
- Bunkenborg J., Gadjev N.I., Deligeorgiev T. e Jacobsen J.P. "Concerted intercalation and minor groove recognition of DNA by a homodimeric thiazole orange dye", *Bioconjugate Chemistry*, Vol. 11(6): 861-867 (2000).
- Chaltin P., Borgious F., Van Aerschot A. e Herdewijn P. "Comparison of library screening techniques used in the development of dsDNA ligands", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 13(1): 47-50 (2003).
- Chen W.H., Qin Y., Cai Z., Chan C.L., Luo G.A., Jiang Z.H. "Spectrometric studies of cytotoxic protoberberine alkaloids binding to double-stranded DNA", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 13(5): 1859-1866 (2005).
- Clarot I., Regazzeti A., Auzeil N., Laadani F., Citton M., Netter P. e Nicolas A. "Analysis of neomycin sulfate and framycetin sulfate by high-performance liquid chromatography using evaporative light scattering detection", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1087(1-2): 236-244 (2005).
- Danquah M.K. e Forde G.M. "The suitability of DEAE-C1 active groups on customized poly(GMA – co – EDMA) continuous stationary phase for fast enzyme – free isolation of plasmid DNA", *Journal of Chromatography B*, Vol. 853(1-2): 38-46 (2007).
- Darby R.A.J., Forde G.M., Slater N.K.H. e Hine A.V. "Affinity purification of plasmid DNA

- directly from crude bacterial cell lysates", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 98(5): 1103-1108 (2007).
- Darby R.A.J. e Hine A.V. "LacI – mediated sequence – specific affinity purification of plasmid DNA for therapeutic applications", *The FASEB Journal*, Vol. 19(7): 801-803 (2005).
- David – Cordonnier M.H., Laine W., Lansiaux A., Rosu F., Colson P., de Pauw E., Michel S., Tillequin F., Koch M., Hickman J.A., Pierré A. e Bailly C. "Covalent binding of antitumor benzoacronycines to double – stranded DNA: Unique consequences of a novel DNA – bonding mechanism", *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol. 4(1): 71-80 (2005).
- Deshmukh N.R. e Lali A.M. "Adsorptive purification of pDNA on superporous rigid cross – linked cellulose matrix", *Jornal of Chromatography B*, Vol. 818(1): 5-10 (2005).
- Diogo M.M., Queiroz J.A., Monteiro G.A., Martins S.A.M., Ferreira G.N.M. e Prazeres D.M.F. "Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 68(5): 576-583 (2000).
- Diogo M.M., Queiroz J.A. e Prazeres D.M.F. "Chromatography of plasmid DNA", *Jornal of Chromatography A*, Vol. 1069(1): 3-22 (2005).
- Dolenc J., Baron R., Oostenbrink C., Koller J. e van Gunsteren W.F. "Configurational entropy change of netropsin and distamycin upon DNA minor – groove binding", *Biophysical Journal*, Vol. 91(4): 1460-1470 (2006).
- Dolenc J., Oostenbrink C., Koller J. e van Gunsteren W.F. "Molecular dynamics simulations and free energy calculations of netropsin and distamycin binding to an AAAAA DNA binding site", *Nucleic Acids Research*, Vol. 33(2): 725-733 (2005).
- Duarte S.P., Fortes A.G., Prazeres D.M.F. e Marcos J.C. "Preparation of plasmid DNA polyplexes from alkaline lysates by a two – step aqueous two – phase extraction process", *Jornal of Chromatography A*, Vol. 1164(1-2): 105-112 (2007).
- Eon-Duval A. e Burke G. "Purification of pharmaceutical – grade plasmid DNA by anion – Exchange chromatography in a RNase – free process", *Jornal of Chromatography B*, Vol. 804(2): 327-335 (2004).
- Ferreira G.N.M., Monteiro G.A., Prazeres D.M.F. e Cabral J.M.S. "Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications", *Trends in Biotechnology*, Vol. 18(9): 380-388 (2000).
- Flotte T.R. "Gene Therapy: The first two decades and the current sate-of-the-art", *Jornal of Cellular Physiology*, Vol. 213(2): 301-305 (2007).
- Gao X., Kim K.S. e Liu D. "Nonviral Gene Delivery: What we know and what is next", *The AAPS Journal*, Vol. 9(1): E92-104 (2007).
- GE Healthcare "Epoxy-activated Sepharose 6B Guide", *Wikströms*, Sweden (2006).
- Gomes G.A., Azevedo A.M., Aires-Barros M.R. e Prazeres D.M.F. "Purification of plasmid DNA with aqueous two phase systems of PEG 600 and sodium citrate/ammonium sulfate", Accepted for publication in *Separation and Purification Technology* (2008).
- Hage D.S. "Affinity Chromatography: A Review of Clinical Applications", *Clinical Chemistry*, Vol. 45(5): 593-615 (1999).

- Hanora A., Savina I., Plieva F.M., Izumrudov V.A., Mattiasson B. e Galaev I.Y. "Direct capture of plasmid DNA from non – clarified bacterial lysate using polycation – grafted monoliths", *Journal of Biotechnology*, Vol. 123(3): 343-355 (2006).
- Hendry L.B., Mahesh V.B., Bransome Jr. E.D. e Ewing D.E. "Small molecule intercalation with double stranded DNA: Implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals", *Mutation Research*, Vol. 623(1-2): 53-71 (2007).
- Hu J.P., Nishishita K., Sakai E., Yoshida H., Kato Y., Tsukuba T., Okamoto K. "Berberine inhibits RANKL-induced osteoclast formation and survival through suppressing the NF-kappaB and Akt pathways", *The European Journal of Pharmacology*, Vol. 580(1-2): 70-79 (2008).
- Imoto S., Haruta Y., Watanabe K. e Sasaki S. "New DNA binding ligands as a model of chromomycin A₃", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 14(19): 4855-4859 (2004).
- Ismael M.I.G.C. "Síntese de sistemas bioativos insaturados em hidratos de carbono", *Tese de Doutorado*, Universidade da Beira Interior – Covilhã (1997).
- Johnson-Saliba M. e Jans D.A. "Gene Therapy: Optimizing DNA Delivery to the Nucleus", *Current Drug Targets*, Vol. 2: 371-399 (2001).
- Kepka C., Rhodin J., Lemmens R., Tjerneld F. e Gustavsson P.E. "Extraction of plasmid DNA from *Escherichia coli* cell lysate in a thermoseparating aqueous two – phase system", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1024(1-2): 95-104 (2004).
- Khan M.A. e Musarrat J. "Interactions of tetracycline and its derivatives with DNA in vitro in presence of metal ions", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 33(1-3): 49-56 (2003).
- Kobayashi S., Kihara M. and Yamahara Y. "Cleavage of the methylenedioxy group with sodium methoxide in dimethyl sulfoxide", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 26(10): 3113-3116 (1978).
- Kong W., Wei J., Abidi P., Lin M., Inaba S., Li C., Wang Y., Wang Z., Si S., Pan H., Wang S., Wu J., Wang Y., Li Z., Liu J. e Jiang J.D. "Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins", *Nature Medicine*, Vol. 10(12): 1344-1351 (2004).
- Lah J. e Vesnaver G. "Energetic diversity of DNA minor – groove recognition by small molecules displayed through some model ligand – DNA systems", *Journal of Molecular Biology*, Vol. 342(1): 73-89 (2004).
- Lewis M.A. e Long E.C. "Fluorescent intercalator displacement analyses of DNA binding by the peptide – derived natural products netropsin, actinomycin, and bleomycin", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 14(10): 3481-3490 (2006).
- Lim J.K.C., Rice W.G., Schwaebe M.K., Siddiqui-Jain A., Trent K.B., Whitten J.P., Hurley L.H. e von Hoff D.D. "Clinical development of CX-3543, a novel multi-targeting antitumor agent", *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 23(16s): 3206 (2005).
- Li H., Peng X., Leonard P. e Seela F. "Binding of actinomycin C₁ (D) and actinomin to base – modified oligonucleotide duplexes with parallel chain orientation", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 14(12): 4089-4100 (2006).

- Li S. e Huang L. "Nonviral gene therapy: promises and challenges", *Gene Therapy*, Vol. 7(1): 31-34 (2000).
- Li S. e Ma Z. "Nonviral Gene Therapy", *Current Gene Therapy*, Vol. 1(2): 201-226 (2001).
- Li X., Jin H., Wu Z., Rayner S., Yin J., Yu Y., Zhang W., He Z., Wnag C. e Wang B. "An automated process to extract plasmid DNA by alkaline lysis", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 75(5): 1217-1223 (2007).
- Mazzini S., Bellucci M.C. e Mondelli R. "Mode of binding of the cytotoxic alkaloid berberine with the double helix oligonucleotide D(AAGAATTCTT)₂", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 11(4): 505-514 (2003).
- Mcclelland R.A., Watada B. e Lew C.S.Q. "Reversibility of the Ring-opening Step in the Acid Hydrolysis of Cyclic Acetophenone Acetals", *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*, Vol. 2(10): 1723-1727 (1993).
- McIlwain C. "World leaders heap praise on human genome landmark", *Nature*, Vol. 405(6790): 983-984 (2000).
- Meacle F.J., Lander R., Shamlou P.A. e Titchener-Hooker N.J. "Impact of engineering flow conditions on plasmid DNA yield and purity in chemical cell lysis operations", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 87(3): 293-302 (2004).
- Monchaud D., Allain C., Bertrand H., Smargiasso N., Rosu F., Gabelica V., De Cian A., Mergny J.L. e Teulade – Fichou M.P. "Ligands playing musical chairs with G – quadruplex DNA: A rapid and simple displacement assay for identifying selective G – quadruplex binders", Accepted for publication in *Biochimie* (2008).
- Morrison R. e Boyd R. "Capítulo 17 – Espectroscopia e Estrutura", em: *Química Orgânica*, 13^a Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa (1996a).
- Morrison R. e Boyd R. "Capítulo 18 – Aldeídos e Cetonas. Adição Nucleófila", em: *Química Orgânica*, 13^a Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa (1996b).
- Mountain A. "Gene Therapy: the first decade", *Trends in Biotechnology*, Vol. 18(3): 119-128 (2000).
- Nelson S.M., Ferguson L.R. e Denny W.A. "Non – covalent ligand/DNA interactions: Minor groove binding agents", *Mutation Research*, Vol. 623(1-2): 24-40 (2007).
- Nguyen B., Hamelberg D., Bailly C., Colson P., Stanek J., Brun R., Neidle S. e Wilson W.D. "Characterization of a novel DNA minor – groove complex", *Biophysical Journal*, Vol. 86(2): 1028-1041 (2004).
- Nguyen B., Tanious F.A. e Wilson D. "Biosensor – surface plasmon resonance: Quantitative analysis of small molecule – nucleic acid interactions", *Methods*, Vol. 42(2): 150-161 (2007).
- Niidome T. e Huang L. "Gene Therapy Progress and Prospects: Nonviral vectors", *Gene Therapy*, Vol. 9(24): 1647-1652 (2002).
- Ogura K. e Tsuchihashi G.-i. "A versatile reagent for aldehyde synthesis. Methyl methylthiomethyl sulfoxide", *Tetrahedron Letters*, Vol. 12(34): 3151-3154 (1971).
- O'Mahony K., Freitag R., Hilbrig F., Müller P. e Schumacher I. "Proposal for a better integration of bacterial lysis into the production of plasmid DNA at large scale", *Journal of*

- Biotechnology*, Vol. 119(2): 118-132 (2005).
- O'Mahony K., Freitag R., Hilbrig F., Müller P. e Schumacher I. "Strategies for high titre plasmid DNA production in *Escherichia coli* DH5 α ", *Process Biochemistry*, Vol. 42: 1039-1049 (2007).
- Park T.G., Jeong J.H. e Kim S.W. "Current status of polymeric gene delivery systems", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 58(4): 467-486 (2006).
- Perruchon S. "Studies of Flavonoids properties for Cosmetics via Structure-Function Relationship", *Ph.D. Thesis*, University of Rennes I (2003).
- Pfeifer A. e Verma I.M. "Gene Therapy: Promises and Problems", *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, Vol. 2: 177-211 (2001).
- Prather K.J., Sagar S., Murphy J. e Chartrain M. "Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification", *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 33: 865-883 (2003).
- Prazeres D.M.F., Ferreira G.N.M., Monteiro G.A., Cooney C.L. e Cabral J.M.S. "Large – scale production of pharmaceutical – grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks", *Trends in Biotechnology*, Vol. 17(4): 169-174 (1999).
- Puius Y.A., Stievater T.H. e Srikrishnan T. "Crystal structure, conformation, and absolute configuration of kanamycin A", *Carbohydrate Research*, Vol. 341(17): 2871-2875 (2006).
- Qiagen "Bench Guide - Protocols, hints, and tips for molecular biology labs" (2001).
- Qin Y., Chen W.H., Pang J.Y., Zhao Z.Z., Liu L. e Jiang Z.H. "DNA-binding affinities and sequence specificities of protoberberine alkaloids and their demethylated derivatives: a comparative study", *Chemistry & biodiversity*, Vol. 4(2): 145-153 (2007).
- Qu X., Wan C., Becker H.C., Zhong D. e Zewail A.H. "The anticancer drug – DNA complex: Femtosecond primary dynamics for anthracycline antibiotics function", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 98(25): 14212-14217 (2001).
- Robinson H. e Wang A.H.J. "Neomycin, spermine and hexaammincobalt(III) share common structural motifs in converting B- to A-DNA", *Nucleic Acids Research*, Vol. 24(4): 676-682 (1996).
- Rome C., Couillaud F. e Moonen C.T.W. "Gene expression and gene therapy imaging", *European Journal of Radiology*, Vol. 17(2): 305-319 (2007).
- Rosa P.A.J., Azevedo A.M. e Aires-Barros M.R. "Application of central composite design to the optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1141(1): 50-60 (2007a).
- Rosa P.A.J., Azevedo A.M., Ferreira I.F., de Vries J., Korporaal R., Verhoef H.J., Visser T.J. e Aires-Barros M.R. "Affinity partitioning of human antibodies in aqueous two-phase systems", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1162(1): 103-113 (2007b).
- Rubanyi G.M. "The future of human gene therapy", *Molecular Aspects of Medicine*, Vol. 22(3): 113-142 (2001).
- Sandberg L.M., Bjurling A., Busson P., Vasi J. e Lemmens R. "Thiophilic interaction chromatography for supercoiled plasmid DNA purification", *Journal of Biotechnology*, Vol. 109(1-2): 193-199 (2004).

- Sandler S.R. e Karo W. "Chapter 1 – Acetals and Ketals", em: *Organic Functional Group Preparations*, Vol. 12-III de Organic Chemistry, A series of monographs, Academic Press, Nova York (1972).
- Silverstein R.M., Bassler G.C. e Morrill T.C. "Chapter Four – Proton Magnetic Resonance Spectrometry", em *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York (1991).
- Sinha J., Dey P.K. e Panda T. "Aqueous two-phase: the system of choice for extractive fermentation", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 54(4): 476-486 (2000).
- Sinha R., Islam M., Bhadra K., Kumar G.S., Banerjee A. E Maiti M. "The binding of DNA intercalating and non – intercalating compounds to A – form and protonated form of poly(rC)·poly(rG): Spectroscopic and viscometric study", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 14(3): 800-814 (2006).
- Sischka A., Toensing K., Eckel R., Wilking S.D., Sewald N., Ros R. e Anselmetti D. "Molecular mechanisms and kinetics between DNA and DNA binding ligands", *Biophysical Journal*, Vol. 88(1): 404-411 (2005).
- Solomons T.W.G. "Chapter 13. Spectroscopic methods of structure determination", em *Organic Chemistry*, 6th Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York (1996).
- Sousa F., Freitas, S. Azzoni, A.R., Prazeres D.M.F. e Queiroz J.A. "Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Vol. 45(Pt3): 131-140 (2006).
- Sousa F., Matos T., Prazeres D.M.F. e Queiroz J.A. "Specific recognition of supercoiled plasmid DNA in arginine affinity chromatography", *Analytical Biochemistry*, Vol. 374(2): 432-434 (2008).
- Sousa F., Prazeres D.M.F. e Queiroz J.A. "Circular dichroism investigation of the effect of plasmid DNA structure on retention in histidine chromatography", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 467(2): 154-162 (2007).
- Sousa F., Tomaz C.T., Prazeres D.M.F. e Queiroz J.A. "Separation of supercoiled and open circular plasmid DNA isoforms by chromatography with a histidine – agarose support", *Analytical Biochemistry*, Vol. 343(1): 183-185 (2005).
- Spillane C.B., Smith J.A., Morgan J.L. e Keene F.R. "DNA affinity binding studies using a fluorescent dye displacement technique: the dichotomy of the binding site", *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, Vol. 12(6): 819-824 (2007).
- Strekal N.D., Motevich I.G., Nowicky J.W. e Maskevich S.A. "IR absorption and surface - enhanced raman spectra of the isoquinoline alkaloid berberine", *Journal of Applied Spectroscopy*, Vol. 74(1): 31-36 (2007).
- Stribley J.M., Rehman K.S., Niu H. e Christman G.M. "Gene Therapy and reproductive medicine", *Fertility & Sterility*, Vol. 77(4): 645-657 (2002).
- Strothkamp K.G. e Strothkamp R.E. "Fluorescent measurements of ethidium binding to DNA", *Journal of Chemical Education*, Vol. 71(1): 77-79 (1994).
- Sundberg L. e Porath J. "Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography. I. Attachment of group – containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional

- oxiranes", *Journal of Chromatography*, Vol. 90(1): 87-98 (1974).
- Tan L., Lai W.B., Lee C.T., Kim D.S. e Choe W.S. "Differential interactions of plasmid DNA, RNA and endotoxin with immobilised and free metal ions", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1141(2): 226-234 (2007).
- Thomas M. e Klibanov A.M. "Non – Viral gene therapy: polycation – mediated DNA delivery", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 62(1): 27-34 (2003).
- Tiainen P., Gustavsson P.E., Ljunglöf A. e Larsson P.O. "Superporous agarose anion exchangers for plasmid isolation", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1138(1-2): 84-94 (2007a).
- Tiainen P., Gustavsson P.E., Månsson M.O. e Larsson P.O. "Plasmid purification using non – porous anion – exchange silica fibres", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1149(2): 158-168 (2007b).
- Tomaz C.A.T. "Separação e purificação de celulases por cromatografia de interação hidrofóbica", *Tese de Doutorado*, Universidade da Beira Interior – Covilhã (2002).
- Trammell G.L. "The total synthesis of (\pm)-paupehenone", *Tetrahedron Letters*, Vol. 19(18): 1525-1528 (1978).
- Trindade I.P., Diogo M.M., Prazeres D.M.F. e Marcos J.C. "Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two – phase extraction and hydrophobic interaction chromatography", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1082(2): 176-184 (2005).
- Tseng Y.D., Ge H., Wang X., Edwardson J.M., Waring M.J., Fitzgerald W.J. e Henderson R.M. "Atomic force microscopy study of the structural effects induced by echinomycin binding to DNA", *Journal of Molecular Biology*, Vol. 345(4): 745-758 (2005).
- Tse W.C. e Boger D.L. "A fluorescent intercalator displacement assay for establishing DNA binding selectivity and affinity", *Accounts of Chemical Research*, Vol. 37(1): 61-69 (2004).
- Tse W.C., Ishii T. e Boger D.L. "Comprehensive high – resolution analysis of hairpin polyamides utilizing a fluorescent intercalator displacement (FID) assay", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 11(20): 4479-4486 (2003).
- Urthaler J., Buchinger W. e Necina R. "Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy", *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 52(3): 703-711 (2005a).
- Urthaler J., Schlegl R., Podgornik A., Strancar A., Jungbauer A., e Necina R. "Application of monoliths for plasmid DNA purification – Development and transfer to production", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1065(1): 93-106 (2005b).
- van Gaal E.V.B., Hennink W.E., Crommelin D.J.A. e Mastrobattista E. "Plasmid Engineering for Controlled and Sustained Gene Expression for Nonviral Gene Therapy", *Pharmaceutical Research*, Vol. 23(6): 1053-1074 (2006).
- Vázquez R., Brito J.E., Pérez M., Silva R., Seralena A., Dueñas-Carrera S., Frontela M.C. e Herrera A.M. "Plasmid DNA production for gene therapy and therapeutic or preventive vaccination in humans: a challenge for the pharmaceutical industry", *Biotechnología Aplicada*, Vol. 22: 251-255 (2005).
- Voß C., Schmidt T., Schleaf M., Friehs K. e Flaschel E. "Production of supercoiled multimeric plasmid DNA for biopharmaceutical application", *Journal of Biotechnology*, Vol. 105(3): 205-213 (2003).

- Wang Z., Yuan Z. e Hengge U.R. "Processing of plasmid DNA with ColE1 – like replication origin", *Plasmid*, Vol. 51(3): 149-161 (2004).
- Woods C.R., Faucher N., Eschgfaller B., Bair K.W. e Boger D.L. "Synthesis and DNA binding properties of saturated distamycin analogues", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 12(18): 2647-2650 (2002).
- Yamamoto K., Sugiyama H. e Kawanishi S. "Concerted DNA recognition and novel site – specific alkylation by duocarmycin A with distamycin A", *Biochemistry*, Vol. 32(4): 1059-1066 (1993).
- Yao Y., Wang Q., Hao Y.H. e Tan Z. "An exonuclease I hydrolysis assay for evaluating G-quadruplex stabilization by small molecules", *Nucleic Acids Res.*, Vol. 35(9): e68 (2007).
- Zhou P., Yu S., Liu Z., Hu J. e Deng Y. "Electrophoretic separation of DNA using a new matrix in uncoated capillaries", *Jornal of Chromatography A*, Vol. 1083(1-2): 173-178 (2005).
- Zhou X., Shen Z., Li D., He X. e Lin B. "Study of interactions between actinomycin D and oligonucleotides by microchip electrophoresis and ESI – MS", *Talanta*, Vol. 72(2): 561-567 (2007).

11. REFERÊNCIAS CIBERGRÁFICAS

http://darwin.nmsu.edu/~blyons/BCHE_397/DNA_Breakage.htm

<http://www.invitrogen.com>

<http://www.onlinepharmacycatalog.com/category/common-drugs-and-medications/antibiotics/neosporin-bacitracin-neomycin-polymyxin-b/>

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/TabPage/17895463>

<http://www.thejcdp.com/issue027/karthideyan/03karthikeyan.htm>