



Universidade da Beira Interior

**Novas Abordagens para a Purificação de Plasmídeos em
Sistemas de Duas Fases Aquosas**

Andreia Daniela da Silva Oliveira

Covilhã

2009

UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

**Novas Abordagens para a Purificação de Plasmídeos em
Sistemas de Duas Fases Aquosas**

Andreia Daniela da Silva Oliveira

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

Orientadores:

Professora Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomaz

Centro de Investigação das Ciências da Saúde da Universidade da Beira
Interior

Professor Doutor João Carlos Ramos Nunes Marcos

Departamento de Química da Universidade do Minho

AGRADECIMENTOS

Queria agradecer aos meus orientadores Prof. Doutora Cândida Tomaz da Universidade da Beira Interior, pela disponibilidade e incentivo dados, e Prof. Doutor João Carlos Marcos da Universidade do Minho, por toda a ajuda, explicações e conselhos dados no decorrer do trabalho.

Ao Prof. Doutor José Alberto Martins e ao Prof. Doutor António Gil Fortes pela ajuda nas experiências realizadas e na interpretação de resultados.

Aos meus colegas de laboratório da Universidade do Minho por me terem recebido com os braços abertos, por toda a ajuda de laboratório oferecida, pela simpatia e apoio dado, e principalmente por me terem aturado durante meses.

Aos meus amigos de muito longe que me ouviram, apoiaram e incentivaram sempre que precisei.

À minha família por todo o apoio, incentivo, paciência, e compreensão que demonstraram.

Andreia Oliveira

ÍNDICE

Índice de Figuras.....	VII
Índice de Tabelas.....	XI
Abreviaturas.....	1
Resumo.....	3
Abstract.....	5
1. Introdução.....	7
1.1. Terapia Génica.....	9
1.1.1. Tipos de Vectores Utilizados na Terapia Génica.....	9
1.1.2. DNA plasmídico como Vector na Terapia Génica.....	10
1.1.3. Optimização da Produção de Plasmídeos em Larga Escala.....	12
1.2. Purificação do DNA Plasmídico.....	12
1.2.1. Processos de Purificação de DNA Plasmídico.....	12
1.2.2. Recuperação Celular.....	13
1.2.3. Lise Celular, Clarificação e Concentração.....	14
1.2.4. Purificação Final.....	15
1.2.5. Processos Cromatográficos.....	15
1.3. Sistemas de Duas Fases Aquosas.....	18
1.3.1. Estratégias Práticas para o Desenvolvimento de Processos de Recuperação Primária usando S DFA.....	21
1.3.1.1. Caracterização Físico-Química do Solutos.....	21
1.3.1.2. Selecção do Tipo de S DFA.....	22
1.3.1.3. Diagrama de Fases.....	25
1.3.1.4. Selecção dos Parâmetros do Sistema.....	26
1.3.1.5. Influência dos Parâmetros do Sistema na Recuperação/Purificação do Produto.....	27
1.3.2. Integração do Processo de S DFA.....	28
1.3.3. Aplicações dos Sistemas de Duas Fases Aquosas.....	30
1.3.4. Recuperação de Material Genético com S DFA.....	31
1.3.5. Ligandos de Afinidade do pDNA para Sistemas de Duas Fases Aquosas.....	33
1.3.5.1. Berenil como Ligando de Afinidade para o DNA.....	33

2. Objectivo.....	35
3. Material e Métodos.....	39
3.1. Reagentes.....	41
3.1.1. Plasmídeo pVAX1LacZ.....	41
3.1.2. Meios de Cultura.....	41
3.1.3. Lise Alcalina e Purificação de Plasmídeos.....	41
3.1.4. Electroforese em Gel de Agarose.....	42
3.1.5. Determinação de RNA por Fluorescência.....	42
3.1.6. Método do DNS.....	43
3.1.7. Purificação do Clorofórmio.....	43
3.1.8. Outros Reagentes.....	43
3.2. Equipamento.....	46
3.3. Métodos.....	47
3.3.1. Construção do Banco de Células e Cultura de Bactéria.....	47
3.3.2. Lise Alcalina.....	48
3.3.3. Purificação do Plasmídeo.....	49
3.3.4. Determinação da Concentração de DNA Plasmídico.....	50
3.3.5. Grau de Pureza do DNA plasmídico.....	50
3.3.6. Electroforese em Gel de Agarose.....	50
3.3.7. Determinação das Binodais.....	51
3.3.8. Sistemas de Duas Fases Aquosas.....	51
3.3.9. Determinação da Concentração de PEG 3350 nos Sistemas pelo Índice de Refracção.....	52
3.3.10. Determinação da Concentração de Reppal nos Sistemas pelo Método do DNS.....	53
3.3.11. Determinação da Concentração de Reppal nos Sistemas pela Rotação Óptica.....	55
3.3.12. Método de Bradford para Determinação da Concentração de Proteína nos Sistemas.....	56
3.3.13. Determinação da Concentração de RNA nos Sistemas por Fluorescência.....	56
3.3.14. Determinação da Concentração de pDNA nos Sistemas por Fluorescência.....	58

3.3.15. Determinação da Concentração de pDNA nos Sistemas por HPLC.....	59
3.3.16. Reacção do PEG 2000 activado com o Berenil.....	60
3.3.16.1. Activação do PEG 2000.....	60
3.3.16.2. Reacção do PEG 2000 activado com o Berenil.....	60
3.3.17. Reacção do PEG-Epóxico com o Berenil na presença de Carbonato de Sódio 1M.....	61
3.3.17.1. Modificação do PEG 2000.....	61
3.3.17.2. Reacção do PEG-Epóxico com o Berenil.....	62
3.3.18. Reacção do PEG-Epóxico com o Berenil na presença de Tampão Fosfato 10 mM pH 5.56.....	62
4. Resultados e Discussão.....	63
4.1. Cultura de Células.....	65
4.2. Purificação do DNA plasmídico.....	65
4.3. Determinação das Curvas Binodais.....	66
4.3.1. Sistemas PEG 1000/Reppal.....	66
4.3.2. Sistemas PEG 3350/Reppal.....	67
4.3.3. Sistemas PEG 8000/Reppal.....	68
4.3.4. Sistemas Dextrano 10000/PEG 3350.....	69
4.4. Determinação das Linhas de Ligação.....	70
4.5. Partição do DNA Plasmídico nos Sistemas.....	73
4.5.1. Sistema 13%Dextrano 10000/10%PEG 3350 com Concentrações de Cloreto de Sódio entre 0 e 1,5 molal.....	74
4.5.2. Sistemas 6,6% PEG 3350/12,7% Dextrano 100000 com Concentrações de Cloreto de Sódio entre 0 e 2 molal.....	77
4.5.3. Sistemas 16% Reppal/14% PEG 1000 com Concentrações de Cloreto de Sódio entre 0 e 0,5 molal.....	81
4.5.4. Sistema 12%Reppal/9%PEG 3350 com Concentrações de Cloreto de Sódio entre 0 e 0,5 molal.....	84
4.5.5. Sistemas 12% Reppal/7% PEG 8000 com Concentração de Cloreto de Sódio entre 0 e 1 molal.....	88
4.5.6. Sistemas 12%Reppal/9%PEG 3350 com Concentrações de Cloreto de Amónio entre 0 e 0,5 molal.....	91

4.5.7. Sistemas 12%Reppal/9% PEG 3350 com Concentrações de Citrato de Sódio entre 0 e 0,5 molal.....	95
4.5.8. Sistemas 12%Reppal/9% PEG 3350 com Concentrações de Sulfato de Sódio entre 0 e 0,5 molal.....	98
4.6. Determinação da Concentração das Proteínas.....	102
4.6.1. Determinação da Concentração de Proteínas no Lisado.....	102
4.6.2. Determinação da Concentração de Proteínas em Sistemas 12,7% Dextrano 100/6,6% PEG 3350 com Concentrações de Cloreto de Sódio entre 0 e 2 molal.....	102
4.6.3. Determinação da Concentração de Proteínas em Sistemas 12,7% Dex 100/6,6% PEG 3350 com Concentrações de Sulfato de Amônio entre 0 e 2 molal.....	104
4.6.4. Determinação da Concentração de Proteínas em Sistemas 13% Dex 10/10% PEG 3350 com Concentrações de Cloreto de Sódio entre 0 e 2 molal.....	105
4.6.5. Determinação da Concentração de Proteínas em Sistemas 12% Reppal/9% PEG 3350 com Concentrações de Cloreto de Sódio entre 0 e 2 molal.....	106
4.6.6. Determinação da Concentração de Proteínas em Sistemas 12% Reppal/7% PEG 8000 com Concentrações de Cloreto de Sódio entre 0 e 2 molal.....	107
4.7. Quantificação do RNA por Fluorescência.....	108
4.8. Ligação do PEG ao Berenil.....	109
5. Conclusões.....	111
6. Anexo.....	115
6.1. Plasmídeo pVAX1-LacZ.....	117
6.2. Curvas de Calibração.....	117
6.2.1. Curva de Calibração do PEG obtida pelo Índice de Refracção.....	117
6.2.2. Curva de Calibração do Reppal obtida pelo Índice de Refracção.....	118
6.2.3. Curva de Calibração da Glucose pelo Método do DNS.....	118
6.2.4. Curva de Calibração do Reppal pelo Método do DNS.....	119
6.2.5. Curva de Calibração do Reppal pela Rotação Óptica.....	119
6.2.6. Curva de Calibração do DNA com as Fases para Sistemas Reppal/PEG 1000.....	120
6.2.7. Curva de Calibração do DNA com as Fases para Sistemas Reppal/PEG 3350.....	120

6.2.8. Curva de Calibração do DNA com as Fases para Sistemas Reppal/PEG 8000.....	121
6.2.9. Curva de Calibração do DNA com as Fases para Sistemas Dextrano 10/PEG 3350.....	121
6.2.10. Curva de Calibração do DNA com as Fases para Sistemas Dextrano 100/PEG 3350.....	122
6.2.11. Curva de Calibração do DNA por HPLC.....	122
6.2.12. Curva de Calibração do DNA por Fluorescência.....	123
6.2.13. Curva de Calibração obtida para a determinação da concentração de proteínas no lisado.....	123
6.2.14. Curva de Calibração obtida para a determinação da concentração de proteínas no lisado, com soluções de lise alcalina como brancos.....	124
6.2.15. Curva de Calibração do RNA.....	124
6.2.16. Curva de Calibração do RNA para a Fase Superior.....	125
6.2.17. Curva de Calibração do RNA para a Fase Inferior.....	125
7. Bibliografia.....	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Terapia Génica: do gene para o paciente.....	11
Figura 2 – Passos unitários mais habituais nos processos de purificação para a produção de pDNA em larga escala.....	13
Figura 3 – Esquema simplificado da separação de biomoléculas por métodos de duas fases aquosas.....	19
Figura 4 – Ilustração de um diagrama de fases.....	20
Figura 5 – Esquema da reciclagem da fase de um SDFA contendo um polímero termossensível (óxido de etileno/óxido de propileno).....	24
Figura 6 – Representação gráfica dos três métodos usados para determinar a binodal.....	26
Figura 7 – Esquema comparando os passos antes e depois da integração do processo de SDFA com a disrupção celular.....	29
Figura 8 – Integração do processo de SDFA.....	30
Figura 9 – Estrutura Química do Berenil	34
Figura 10 – PEG 2000 activado.....	60
Figura 11 – PEG-Epóximo.....	61
Figura 12 – Curva de crescimento da bactéria <i>Escherichia coli</i> DH5a em meio LB.....	65
Figura 13 – Electroforese em gel de agarose a 1% das amostras obtidas durante a purificação do pDNA utilizando o kit <i>Plasmid Mega</i> da Qiagen.....	66
Figura 14 – Curva Binodal PEG 1000/Reppal, sem e com cloreto de sódio.....	67
Figura 15 – Curva Binodal PEG 3350/Reppal, sem e com cloreto de sódio.....	68
Figura 16 – Curva Binodal PEG 8000/Reppal, sem e com cloreto de sódio.....	69
Figura 17 – Curva Binodal PEG 3350/Dextrano 10000, sem e com cloreto de sódio.....	70
Figura 18 – Gráfico com as linhas de ligação obtidas pelo método do DNS e pelo Índice de Refracção.....	71

Figura 19 – Gráfico com as linhas de ligação obtidas pela Rotação Óptica e pelo Índice de Refracção.....	72
Figura 20 – Electroforese em gel de agarose a 1% das amostras dos sistemas 13% Dextrano 10000/10% PEG 3350 com várias concentrações de cloreto de sódio.....	74
Figura 21 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Dex 10 com diferentes concentrações de cloreto de sódio por fluorescência.....	76
Figura 22 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Dex 10 com diferentes concentrações de cloreto de sódio por HIC.....	77
Figura 23 – Electroforese em gel de agarose a 1% das amostras dos sistemas 6,6% PEG 3350/12,7% Dextrano 100000 com várias concentrações de cloreto de sódio.....	78
Figura 24 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Dex 100 com diferentes concentrações de cloreto de sódio por fluorescência.....	79
Figura 25 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Dex 100 com diferentes concentrações de cloreto de sódio por HIC.....	80
Figura 26 – Electroforese em gel de agarose a 1% das amostras dos sistemas 16%Reppal/14% PEG 1000 com várias concentrações de cloreto de sódio.....	81
Figura 27 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 1000/Reppal com diferentes concentrações de cloreto de sódio por fluorescência.....	83
Figura 28 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 1000/Reppal com diferentes concentrações de cloreto de sódio por HIC.....	84
Figura 29 – Electroforese em gel de agarose a 1% dos sistemas 12% Reppal/9% PEG 3350 com várias concentrações de cloreto de sódio.....	85
Figura 30 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Reppal com diferentes concentrações de cloreto de sódio por fluorescência.....	86
Figura 31 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Reppal com diferentes concentrações de cloreto de sódio por HIC.....	87
Figura 32 – Electroforese em gel de agarose a 1% com as amostras dos sistemas 12%Reppal/7% PEG 8000 com várias concentrações de cloreto de sódio.....	88
Figura 33 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 8000/Reppal com diferentes concentrações de cloreto de sódio por fluorescência.....	90

Figura 34 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 8000/Reppal com diferentes concentrações de cloreto de sódio por HIC.....	91
Figura 35 – Electroforese em gel de agarose a 1% com as amostras dos sistemas 12%Reppal/9% PEG 3350 com várias concentrações de cloreto de amónio.....	92
Figura 36 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Reppal com diferentes concentrações de cloreto de amónio por fluorescência.....	93
Figura 37 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Reppal com diferentes concentrações de cloreto de amónio por HIC.....	94
Figura 38 – Electroforese em gel de agarose a 1% com as amostras dos sistemas 12%Reppal/9% PEG 3350 com várias concentrações de citrato de sódio.....	95
Figura 39 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Reppal com diferentes concentrações de citrato de sódio por fluorescência.....	97
Figura 40 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Reppal com diferentes concentrações de citrato de sódio por HIC.....	98
Figura 41 – Electroforese em gel de agarose a 1% com as amostras dos sistemas 12%Reppal/9% PEG 3350 com várias concentrações de sulfato de sódio.....	99
Figura 42 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Reppal com diferentes concentrações de sulfato de sódio por fluorescência.....	100
Figura 43 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Reppal com diferentes concentrações de sulfato de sódio por HIC.....	101
Figura 44 – Gráfico do coeficiente de partição (K) versus concentração de NaCl (molal) para sistemas Dextrano 100/PEG 3350 com lisado.....	103
Figura 45 – Gráfico do coeficiente de partição (K) versus concentração de NaCl (molal) para sistemas Dextrano 100/PEG 3350 com soluções de lise alcalina.....	104
Figura 46 – Gráfico do coeficiente de partição (K) versus concentração de sulfato de amónio (molal) para sistemas Dextrano 100/PEG 3350 com sulfato de amónio.....	105
Figura 47 – Gráfico do coeficiente de partição (K) versus concentração de NaCl (molal) para sistemas Dextrano 10/PEG 3350 com cloreto de sódio.....	106

Figura 48 – Gráfico do coeficiente de partição (K) versus concentração de NaCl (molal) para sistemas Reppal/PEG 3350 com cloreto de sódio.....	107
Figura 49 – Gráfico do coeficiente de partição (K) versus concentração de NaCl (molal) para sistemas Reppal/PEG 8000 com cloreto de sódio.....	108
Figura 50 – Mapa do Plasmídeo pVAX1 [®] -LacZ.....	117
Figura 51 – Curva de Calibração do PEG obtida pelo Índice de Refracção.....	117
Figura 52 – Curva de Calibração do Reppal obtida pelo Índice de Refracção.....	118
Figura 53 – Curva de Calibração da Glucose pelo Método do DNS.....	118
Figura 54 – Curva de Calibração do Reppal pelo Método do DNS.....	119
Figura 55 – Curva de Calibração do Reppal pela Rotação Óptica.....	119
Figura 56 – Curva de Calibração do DNA com as fases para sistemas Reppal/PEG 1000.....	120
Figura 57 – Curva de Calibração do DNA com as fases para sistemas Reppal/PEG 3350.....	120
Figura 58 – Curva de Calibração do DNA com as fases para sistemas Reppal/PEG 8000.....	121
Figura 59 – Curva de Calibração do DNA com as fases para sistemas Dextrano 10/PEG 3350.....	121
Figura 60 – Curva de Calibração do DNA com as fases para sistemas Dextrano 100/PEG 3350.....	122
Figura 61 – Curva de Calibração do DNA por HPLC.....	122
Figura 62 – Curva de Calibração do DNA por fluorescência.....	123
Figura 63 – Curva de Calibração obtida para a determinação da concentração de proteínas no lisado.....	123
Figura 64 – Curva de Calibração obtida para a determinação da concentração de proteínas no lisado, com soluções de lise alcalina como brancos.....	124
Figura 65 – Curva de Calibração do RNA.....	124
Figura 66 – Curva de Calibração do RNA para a fase superior.....	125
Figura 67 – Curva de Calibração do RNA para a fase inferior.....	125

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Contaminantes, parâmetros e métodos usados para determinação da pureza e qualidade do pDNA.....	16
Tabela 2 – Composição dos diferentes tampões utilizados na lise alcalina e na purificação do DNA plasmídico.....	42
Tabela 3 – Reagentes utilizados na preparação dos meios líquidos das fermentações.....	43
Tabela 4 – Reagentes utilizados nos métodos de lise alcalina e na purificação do DNA plasmídico.....	44
Tabela 5 – Reagentes utilizados na preparação dos sistemas de duas fases aquosas.....	44
Tabela 6 – Reagentes utilizados na Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência.....	45
Tabela 7 – Reagentes utilizados nas tentativas de síntese do PEG-Berenil.....	45
Tabela 8 – Outros reagentes.....	46
Tabela 9 – Material e Equipamento utilizado no trabalho experimental.....	46
Tabela 10 – Concentrações Finais dos Polímeros nos SDFA (% (w/w)).....	51
Tabela 11 – Composição adicionada a cada tubo de ensaio utilizado na realização da curva de calibração para a glucose.....	53
Tabela 12 – Composição adicionada a cada tubo de ensaio utilizado na determinação da concentração de Reppal nas fases superior e inferior.....	55
Tabela 13 – Diluições efectuadas na preparação da Curva de Calibração do RNA.....	58
Tabela 14 – Concentrações de plasmídeo obtidas por fluorescência para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Dex10 com cloreto de sódio.....	75
Tabela 15 – Concentrações de plasmídeo obtidas por HIC para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Dextrano 10 com cloreto de sódio.....	76
Tabela 16 – Concentrações de plasmídeo obtidas por fluorescência para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Dex100 com cloreto de sódio.....	79
Tabela 17 – Concentrações de plasmídeo obtidas por HIC para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Dextrano 100 com cloreto de sódio.....	80

Tabela 18 – Concentrações de plasmídeo obtidas por fluorescência para as diferentes fases em sistemas PEG 1000/Reppal com cloreto de sódio.....	82
Tabela 19 – Concentrações de plasmídeo obtidas por HIC para as diferentes fases em sistemas PEG 1000/Reppal com cloreto de sódio.....	83
Tabela 20 – Concentrações de plasmídeo obtidas por fluorescência para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Reppal com cloreto de sódio.....	86
Tabela 21 – Concentrações de plasmídeo obtidas por HIC para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Reppal com cloreto de sódio.....	87
Tabela 22 – Concentrações de plasmídeo obtidas por fluorescência para as diferentes fases em sistemas PEG 8000/Reppal com cloreto de sódio.....	89
Tabela 23 – Concentrações de plasmídeo obtidas por HIC para as diferentes fases em sistemas PEG 8000/Reppal com cloreto de sódio.....	91
Tabela 24 – Concentrações de plasmídeo obtidas por fluorescência para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Reppal com cloreto de amônio.....	93
Tabela 25 – Concentrações de plasmídeo obtidas por HIC para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Reppal com cloreto de amônio.....	94
Tabela 26 – Concentrações de plasmídeo obtidas por fluorescência para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Reppal com citrato de sódio.....	96
Tabela 27 – Concentrações de plasmídeo obtidas por HIC para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Reppal com citrato de sódio.....	97
Tabela 28 – Concentrações de plasmídeo obtidas por fluorescência para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Reppal com sulfato de sódio.....	100
Tabela 29 – Concentrações de plasmídeo obtidas por HIC para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Reppal com sulfato de sódio.....	101

ABREVIATURAS

A₂₆₀: Absorvância a 260 nm

Abs: Absorvância

AT: Adenina Timina

BSA: Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)

DEPC: Diethyl pyrocarbonate (Dietilpirocarbonato)

Dex: Dextrano

Dex 10: Dextrano com peso molecular de 10000

Dex 100: Dextrano com peso molecular de 100000

DMSO: Dimethyl sulfoxide (Dimetilsulfóxido)

DNA: Desoxirribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)

DNS: 3,5-Dinitrosalicylic acid (Ácido 3,5-dinitrosalicílico)

DO: Densidade óptica

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido Etilenodiaminotetraacético)

EO: Ethylene oxide (Óxido de Etileno)

gDNA: DNA genómico

HIC: Hydrophobic Interaction Chromatography (Cromatografia de Interação Hidrofóbica)

HMDI: Hexamethylene Diisocyanate (Diisocianato de hexametileno)

HM-EOPO: Hydrophobically Modified Random Copolymer of Ethylene Oxide and Propylene Oxide (Co-polímero de Óxido de Etileno e Óxido de Propileno Modificado Hidrofobicamente)

HPLC: High-performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

HPS: Hydroxypropyl Starch (Hidroxipropilamido)

LB: Luria Bertani

mRNA: RNA mensageiro

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacção em Cadeia pela Polimerase)

pDNA: DNA plasmídico

PEG: Polyethylene Glycol (Polietilenoglicol)

PO: Propylene Oxide (Óxido de Propileno)

pPEI: PEGylated Polyethyleimine (Polietilenimina peguilada)

Abreviaturas

Reppal: nome comercial do Hidroxipropilamido

RNA: Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico)

RNase: Ribonuclease A

Rpm: Rotações por minuto

SDFA: Sistemas de Duas Fases Aquosas

SDS: Sodium dodecil sulfate (Dodecilsulfato de Sódio)

TAE: Tampão Tris-Acetato-EDTA

TE: Tampão Tris-EDTA

TG: Terapia Génica

UV: Ultravioleta

WCB: Working Cell Bank (Banco de Células)

RESUMO

A necessidade cada vez mais frequente de DNA plasmídico (pDNA) para ser usado em Terapia Génica e vacinas de DNA levou à procura de novos meios de recuperação e purificação de plasmídeos que possam ser utilizados em larga escala. Os Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFAs) têm sido testados para esse fim pois são uma técnica fácil, simples e eficaz. Contudo, devido à sua baixa selectividade, têm sido maioritariamente utilizados nos passos iniciais da purificação. Os sistemas Dextrano (Dex)/Polietilenoglicol (PEG) são os melhores estudados mas apresentam a desvantagem do Dextrano ser um polímero de elevado custo. O Hidroxipropilamido (HPS) tem sido utilizado como substituto para o Dex, baixando o custo da operação cerca de sete vezes, contudo nunca foi utilizado para a purificação de pDNA. Nos SDFAs também se têm utilizado ligandos de afinidade para o pDNA, de modo a aumentar a afinidade do pDNA para a fase do PEG, havendo assim uma maior percentagem de recuperação do produto. Contudo, os ligandos normalmente utilizados têm a desvantagem de serem caros, tendo anteriormente sido estudados alguns antibióticos como potenciais ligandos de afinidade para o pDNA. Dos antibióticos estudados, o Berenil revelou-se o mais promissor pois apresenta uma elevada constante de afinidade para o pDNA.

Assim, o principal objectivo deste trabalho consistiu em testar sistemas HPS/PEG para a recuperação de pDNA e na utilização do Berenil como ligando de afinidade sendo para isso necessário ligá-lo ao PEG.

A partição do pDNA e do RNA em vários sistemas HPS/PEG foi estudada através de electroforeses em gel de agarose e a determinação da concentração de pDNA nas fases dos sistemas foi realizada por fluorescência e cromatografia de interacção hidrofóbica. A influência de vários sais no comportamento do pDNA e do RNA foi igualmente avaliada.

Assim, em sistemas com HPS e lisado, o pDNA precipita na interfase dos sistemas e o RNA particiona maioritariamente para a fase superior. O pDNA puro em sistemas com HPS particiona da fase superior para a fase inferior, com o aumento da concentração de sal, verificando-se portanto a influência da elevada concentração de sais presentes nas soluções de lise alcalina.

Resumo

Verifica-se que, com a substituição do Dex por HPS, o comportamento do pDNA altera-se no S DFA. Para sistemas com Dex e pDNA puro, o pDNA particiona para a fase inferior dos sistemas, independentemente da concentração de sal presente. Contudo em sistemas com HPS, o pDNA tende a particionar para a fase superior dos sistemas, passando para a fase inferior com o aumento da concentração de sal.

Todos os sais estudados influenciam de igual modo o comportamento do pDNA puro nos sistemas, fazendo com que ele particione da fase superior para a fase inferior, podendo estes ser usados para melhorar a separação entre o pDNA e os seus contaminantes.

A ligação do Berenil ao PEG utilizando diferentes protocolos não foi conseguida, tendo-se obtido, em todas as reacções realizadas, os reagentes de partida.

Palavras-Chave: Plasmídeos, S DFA, Polietilenoglicol, Hidroxipropilamido, Berenil.

ABSTRACT

The need of larger amounts of plasmid DNA (pDNA) to be used in Gene Therapy and DNA vaccines has led to the search of new means of recovery and purification of pDNA that can be used in large scale. Aqueous Two-Phase Systems (ATPS) have been tested to achieve this end since they are an easy, simple and effective technique. However given their low selectivity they have been mainly used in the first purification steps. Dextran (Dex)/Polyethylene glycol (PEG) systems are the best studied systems but have the disadvantage of Dex being an expensive polymer. Hydroxypropyl starch (HPS) has been used as a substitute of Dex, lowering the overall cost but it was never used to purify pDNA. In ATPS pDNA affinity ligands have also been used to increase pDNA affinity towards the PEG phase, thus increasing product recovery yield. However due to the high cost of the ligands normally used, the affinity of several antibiotics to pDNA has been previously determined. From those, Berenil has demonstrated potential to be used as an affinity ligand given its high affinity constant towards pDNA.

So the main goal of this work was to test HPS/PEG systems to recover plasmid DNA and to use Berenil as an affinity ligand for which is needed to attach it to PEG.

pDNA and RNA partition in several HPS/PEG systems was studied through agarose gel electrophoresis and pDNA concentration was determined by fluorescence and hydrophobic interaction chromatography. The influence of several salts in pDNA and RNA behaviour was also assessed.

In systems containing HPS and lysate, pDNA precipitates in the interface and RNA partition to the top phase. Pure pDNA in HPS systems partitions from the top to the bottom phase with the increase of salt concentration, thus indicating the influence of high salt concentration present in alkaline lysis solutions.

Substituting Dex with HPS, pDNA behaviour changes in the ATPS. In Dex and pure pDNA systems, pDNA partitions to the bottom phase, independently of salt concentration present. However, in HPS systems, pDNA partitions to the top phase, and moves to the bottom phase with the increase of salt in the system.

All the studied salts influence equally pure pDNA behavior in the systems, moving it from the top to the bottom phase. These salts can be used to better separate pDNA from their contaminants.

Abstract

The attachment of Berenil and PEG using different protocols was not achieved. In all the reactions prepared, start compounds were obtained separately.

Keywords: Plasmid DNA, ATPS, Polyethylene glycol, Hydroxypropyl starch, Berenil.

1. Introdução

1.1. Terapia Génica

A Terapia Génica (TG) propõe-se modificar o repertório genético (Theodossiou *et al.*, 1997), através da introdução de ácidos nucleicos em células humanas para restaurar, cancelar, aumentar ou introduzir uma função bioquímica (Sun *et al.*, 2003; Gore, 2003). O conceito surgiu no princípio dos anos 80 do século passado, tendo posteriormente causado grande impacto os primeiros resultados obtidos em mamíferos (Nichols, 1988). Contudo, o primeiro ensaio clínico em humanos apenas foi realizado em 1990. Desde então têm-se registado importantes avanços, podendo no futuro, vir a ter uma grande importância na área da Medicina (Park *et al.*, 2006; Mountain, 2000).

Actualmente estão a ser testadas em humanos terapias baseadas em DNA para o tratamento do melanoma metastático, isquémia e cancro dos pulmões (Vical, 2008; Sanofi-Aventis, 2008; NovaRx, 2008). Também na área da Medicina Veterinária, várias terapias utilizando DNA já foram licenciadas (Kutzler e Weiner, 2008). Por outro lado, vacinas terapêuticas ou preventivas baseadas em DNA, podem ser utilizadas para doenças virais, bacterianas ou parasitárias, além de ter possíveis aplicações no tratamento de diferentes tipos de cancro (Williams *et al.*, 2009; Kutzler e Weiner, 2008).

1.1.1. Tipos de Vectores Utilizados na Terapia Génica

A aplicação da TG é mediada por um vector que é introduzido no organismo, entra nas células do tecido alvo e alcança o núcleo. No núcleo, o gene contido no vector plasmídico é transcrito em RNA mensageiro (mRNA), que posteriormente dá origem a um produto terapêutico. Este poderá substituir algum composto em falta no organismo ou actuará depois num ou mais receptores, provocando uma reacção biológica, com subsequentes benefícios terapêuticos (Rubanyi, 2001). Vectores utilizados para a entrega do gene no organismo podem ser divididos em vectores virais e não virais.

Os vectores virais são vírus geneticamente modificados por substituição e inactivação total ou parcial dos genes dos vírus por genes terapêuticos, de modo a provocar o efeito biológico desejado, infectando apenas as células alvo (Parasrampuri, 1998). Têm como principal vantagem, a sua elevada eficiência de transfecção (Mountain, 2000).

Todavia estes vectores virais começaram a provocar reacções imunológicas e toxicológicas nos doentes tratados com estes vectores, assim como o aparecimento de tumores, devido à alteração da actividade de genes supressores de tumores (Anderson, 1998; Luo e Saltzman, 2000). A limitação do tamanho de plasmídeo que pode ser inserido e o processo de produção destes, constituem outras desvantagens dos vectores virais (Mountain, 2000).

Por estas razões, começaram a ser utilizados em TG vectores não virais, que apresentam em termos comerciais, de produção e de futura aplicação algumas vantagens em relação aos vectores virais (Mountain, 2000).

Os vectores não virais são mais fáceis de fabricar e provocam menos reacções imunológicas. Contudo, a transfecção do pDNA (pDNA) nas células alvo é baixa (Crystal, 1995). Portanto, ao serem usados estes tipos de vectores não virais em TG, os procedimentos terapêuticos vão demorar mais tempo e vão necessitar de uma maior quantidade de pDNA para que se possam ter os resultados desejados (Ledley, 1995). Porém, está a ser realizada investigação para otimizar os vectores não virais, de modo a que a percentagem de transfecção aumente para valores análogos aos alcançados com os vectores virais (Marquet *et al.*, 1995; Mintzer e Simanek, 2009).

1.1.2. DNA plasmídico como Vector na Terapia Génica

Os plasmídeos são moléculas de DNA circular e extra-cromossomal que contêm vários genes codificantes de funcionalidades não essenciais ao organismo, mas importantes em condições específicas (Summers, 1996). Estes, por terem uma replicação independente da dos cromossomas, têm sido utilizados em várias aplicações (Sambrook *et al.*, 1989).

Os plasmídeos apresentam-se em três formas topológicas (Balagurumoorthy *et al.*, 2008):

- Na forma super-enrolada (sc – “supercoiled”), com as cadeias enroladas sobre si mesmas numa estrutura altamente ordenada e altamente compacta;
- Na forma circular aberta (oc – “open circular”), quando sofre desnaturação e começa a desenrolar, não tendo as cadeias sofrido qualquer corte;
- E na forma linear, encontrando-se com as pontas livres porque ambas as cadeias de DNA sofreram cortes.

Normalmente os plasmídeos têm um comprimento entre 5 a 20 Kb ($3,3 \times 10^6$ – $13,2 \times 10^6$ Da), sendo moléculas extremamente grandes. São incorporados em bactérias ou leveduras, como a *Escherichia coli* ou a *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente, e são produzidos à medida que as bactérias ou leveduras crescem por fermentação. Após crescimento e extracção, os plasmídeos encontram-se na forma super-enrolada, existindo também em menor quantidade na forma circular e, muito raramente, na forma linear (Warringer e Blomberg, 2006; Prazeres *et al.*, 1999) (Figura 1).

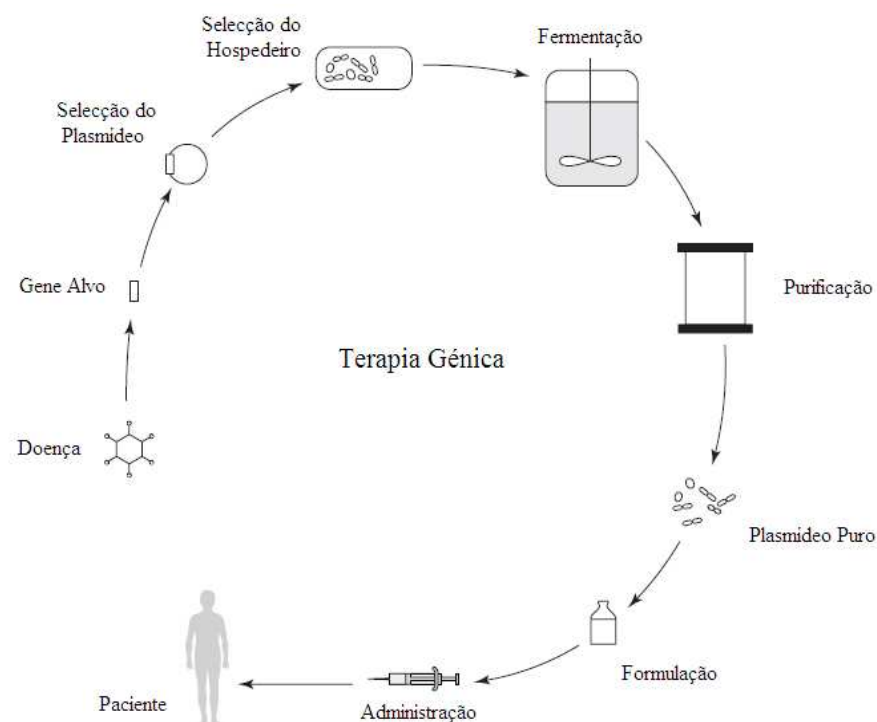


Figura 1 – Terapia Génica: do gene para o paciente (Adaptado de: Prazeres *et al.*, 1999).

O pDNA na forma super-enrolada é o que apresenta actividade biológica máxima e, portanto, será o utilizado em futuras aplicações médicas e farmacêuticas (Iuliano *et al.*, 2002).

Assim, os plasmídeos futuramente utilizados para TG apresentam várias características, de modo a que sejam veículos eficazes para a entrega de genes nas células alvo, nomeadamente (Vázquez *et al.*, 2005):

- Elevado número de cópias;
- Promotor com baixa homologia com sequências de mamíferos;

- Pequeno tamanho, apenas com sequências essenciais à sua função;
- Estabilidade genética;
- Gene de resistência a um antibiótico, como marcador de seleção;
- Mecanismos simples de transferência.

1.1.3. Otimização da Produção de Plasmídeos em Larga Escala

À medida que mais terapias e vacinas utilizando pDNA são aprovadas para ensaios clínicos, existe um aumento da necessidade de produzir grandes quantidades de pDNA de elevada qualidade e de grau farmacêutico (Bower e Prather, 2009).

Assim, há a necessidade de otimização de processos de fermentação, pois na produção de pDNA em laboratório, em geral, são obtidas quantidades muito baixas de plasmídeo (5-40 mg/L) (Prather *et al.*, 2003), que não são suficientes para serem utilizadas em aplicações terapêuticas.

Os processos e meios de fermentação necessitam de ser cuidadosamente otimizados para obtenção de um rendimento e de um plasmídeo de boa qualidade (Williams *et al.*, 2009). Portanto, para otimizar a produção do plasmídeo é importante ter em conta o plasmídeo usado, a escolha da estirpe a ser usada na produção do plasmídeo e a definição de determinados parâmetros para a cultura de células, como a temperatura, o pH, a fonte de carbono e azoto e a taxa de crescimento das células (Thiry e Cingolani, 2002).

1.2. Purificação do DNA Plasmídico

1.2.1. Processos de Purificação de DNA Plasmídico

Para se obter o plasmídeo purificado é necessário fazer-se a cultura de células, e posteriormente a lise celular de modo a obter-se o pDNA que se encontra no interior das células. Contudo o lisado obtido contém muitas impurezas e contaminantes, como por exemplo, RNA, endotoxinas, DNA genómico (gDNA) e proteínas, que necessitam de ser removidos para se obter o pDNA puro. Esta purificação pode ser realizada por vários métodos, normalmente por cromatografia (Diogo *et al.*, 2005). Na figura 2 encontram-se os diferentes passos realizados para a obtenção de pDNA puro.

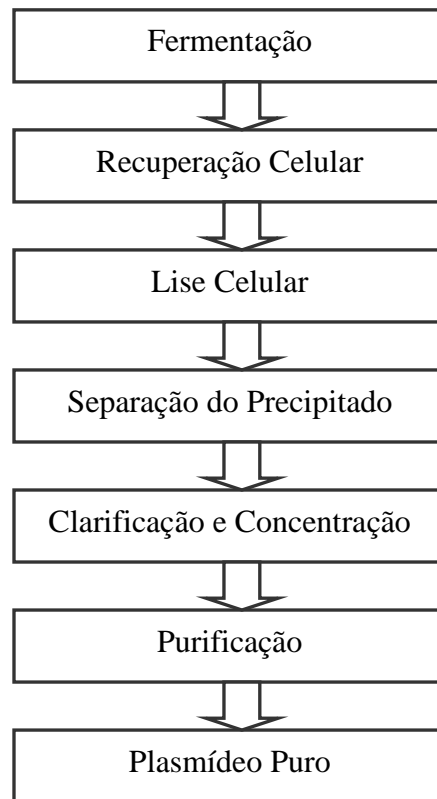


Figura 2 – Passos unitários mais habituais nos processos de purificação para a produção de pDNA em larga escala. (Adaptado de: Diogo *et al.*, 2005)

1.2.2. Recuperação Celular

Após a cultura de células das bactérias com o plasmídeo inserido, é necessário fazer uma recuperação celular, que começa com a realização de uma centrifugação, em que se obtém um sedimento e um sobrenadante, sendo este o meio de cultura das bactérias. O sobrenadante obtido é descartado, enquanto o sedimento é usado para passos posteriores, pois contém as células com o plasmídeo e as impurezas a ser removidas.

Posteriormente, o sedimento é ressuspensão numa solução tampão contendo ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e glucose ou sacarose. O EDTA actua como agente quelante, removendo cálcio e magnésio da membrana celular, destabilizando a sua estrutura, de modo a que a lise ocorra mais facilmente. Também ajuda na redução da actividade de nucleases dependentes de magnésio, prevenindo desta maneira a degradação do plasmídeo. A glucose ou sacarose adicionada protege o plasmídeo da quebra por agitação (Prazeres *et al.*, 1999).

1.2.3. Lise Celular, Clarificação e Concentração

Apesar de métodos mecânicos de lise celular, como sonicação e homogeneização, entre outros, terem sido testados (Carlson *et al.*, 1995), o processo mais utilizado consiste numa variação do procedimento de lise alcalina, descrito por Birnhoim e Doly (Birnhoim e Doly, 1979). O método implica o uso de hidróxido de sódio com o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) para desintegrar as células e libertar o plasmídeo na forma super-enrolada, sendo este um passo crucial na produção de pDNA e onde ocorrem mais problemas (Prazeres *et al.*, 1999).

A adição do hidróxido de sódio com o SDS é utilizada para solubilizar as membranas celulares, promover a desnaturação irreversível das proteínas e ácidos nucleicos, assim como a desnaturação reversível do plasmídeo (Prazeres e Ferreira, 2003). Este passo deve ser realizado sob agitação suave de modo a evitar extremos de pH locais que podem causar a desnaturação irreversível do plasmídeo. A agitação suave também garante a lise eficaz e completa de toda a população de células, assim como mantém o gDNA com o maior peso molecular possível, para maximizar a precipitação em passos posteriores. Por todas estas razões, este passo é crucial para uma lise alcalina eficaz (Marquet *et al.*, 1995; Prazeres *et al.*, 1998; Rush e Warner, 1970; Stephenson *et al.*, 1993).

Posteriormente a este passo, ocorre a adição de uma solução de neutralização ácida com alto conteúdo de sal (normalmente acetato de potássio) e ácido acético. Esta solução provoca a formação de agregados de gDNA e de complexos SDS-proteínas, tendo o sal a função de manter o pH entre 5 e 6. Após a adição da solução de neutralização, os precipitados e os agregados floculantes são removidos por centrifugação e filtração (Theodossiou *et al.*, 1997).

A clarificação e a concentração são necessárias para remover proteínas da estirpe hospedeira e alguns ácidos nucleicos ainda existentes. Estes processos são realizados utilizando uma elevada concentração de acetato de amónio, que provoca a precipitação destas proteínas e ácidos nucleicos (Prazeres *et al.*, 1999).

No lisado final ainda existem RNA e endotoxinas que serão removidos nos passos seguintes de purificação do pDNA (O'Mahony *et al.*, 2005).

1.2.4. Purificação Final

Neste passo de purificação final, a maioria das impurezas ainda existentes (RNA, fragmentos de gDNA, endotoxinas e isoformas do plasmídeo) são removidas de modo a obter-se finalmente o plasmídeo puro na forma super-enrolada (Prazeres *et al.*, 1999).

Em pequena escala, ultracentrifugação por gradiente de densidade com sacarose ou brometo de etídeo e uma mistura clorofórmio/fenol eram dos métodos mais utilizados. Contudo, em larga escala, estes métodos tornavam-se caros, demorados e os compostos usados eram tóxicos. Assim, tem havido um desenvolvimento de novas técnicas de purificação, nomeadamente cromatográficas, em que a separação é baseada na propriedades físicas e químicas dos compostos a separar (Diogo *et al.*, 2005). Outras técnicas em estudo para recuperação e purificação de plasmídeos são os Sistemas de Duas Fases Aquosas (Trindade *et al.*, 2005).

1.2.5. Processos Cromatográficos

A cromatografia é importante no processo de produção de pDNA terapêutico, tanto na purificação, como na monitorização da qualidade do pDNA. O produto final de um processo cromatográfico terá de cumprir todas as especificações recomendadas pelas agências reguladoras, ou seja, os contaminantes presentes terão de estar em quantidades mínimas ou indetectáveis (Tabela 1) e deverá existir 90% de plasmídeo na forma super-enrolada (Diogo *et al.*, 2005).

Os tipos de cromatografia que têm sido usados na purificação final do pDNA incluem cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de troca iónica, cromatografia líquida de fase reversa, cromatografia de exclusão molecular e cromatografia de afinidade.

Tabela 1 – Contaminantes, parâmetros e métodos usados para determinação da pureza e qualidade do pDNA.

Contaminantes	Parâmetros	Método
gDNA	< 0,05 µg/µg pDNA	Real-Time PCR (Vilalta <i>et al.</i> , 2002)
Proteínas	Indetectável	Método do BCA (ácido bicinconínico) (Freitas <i>et al.</i> , 2009)
RNA	Indetectável	Fluorescência (Schmidt e Ernst, 1995)
Endotoxinas	< 0,1 EU/µg pDNA	Kinetic QCL LAL Assay (Sousa <i>et al.</i> , 2009)

A cromatografia de interação hidrofóbica separa as biomoléculas consoante a hidrofobicidade. Uma vez que o pDNA, o RNA e as endotoxinas têm diferentes hidrofobicidades, apresentam diferentes tempos de retenção neste tipo de cromatografia (Iuliano *et al.*, 2002; Diogo *et al.*, 2002). O RNA e o gDNA, moléculas com apenas uma cadeia, e as endotoxinas têm um carácter hidrofóbico elevado, enquanto o pDNA apresenta baixa hidrofobicidade, pois a maioria das suas bases encontram-se protegidas dentro da dupla hélice (Freitas *et al.*, 2009). Diogo *et al.* (1999; 2002) descreveu a separação de pDNA super-enrolado das outras impurezas sob condições não desnaturantes, assim como a separação das diferentes formas de plasmídeo desnaturado, usando uma coluna de interação hidrofóbica (epoxi-Sepharose®). Contudo, já anteriormente se tinham utilizado as propriedades hidrofóbicas da nitrocelulose em cromatografia (Rush e Warner, 1970) e processos de filtração (Levy *et al.*, 2000) de modo a conseguir-se separar DNA de cadeia simples, RNA e proteínas, de DNA de cadeia dupla.

A cromatografia de troca iónica usada na purificação do pDNA consegue separar o plasmídeo dos restantes contaminantes devido às interações entre os grupos fosfato carregados negativamente do pDNA e os ligandos carregados positivamente na superfície da matriz (Thompson, 1986), sendo uma das mais usadas para a captura e purificação de pDNA. Tem como vantagens a rápida separação, a grande variedade de fases estacionárias e a não utilização de solventes orgânicos (Eon-Duval e Burke, 2004).

A cromatografia líquida de fase reversa baseia-se nas interações hidrofóbicas entre o soluto e a fase estacionária não polar. No caso do pDNA, as interações ocorrem entre as bases aromáticas hidrofóbicas do plasmídeo e os ligandos hidrofóbicos da matriz. A separação ocorre em função da hidrofobicidade das moléculas a separar. O principal inconveniente é eluição com solventes orgânicos (Colote *et al.*, 1986).

A cromatografia de exclusão molecular separa as moléculas com base no seu tamanho, saindo da coluna por ordem decrescente de tamanhos moleculares. Tem sido usada para a purificação em grande escala de plasmídeos, normalmente para separar DNA de RNA (Ferreira *et al.*, 1997; Prazeres *et al.*, 1999; Stadler *et al.*, 2004), contudo a eficácia de separação é inferior a outros métodos (Kasai, 1993). Assim, são necessários mais passos com este tipo de cromatografia para se obter pDNA super-enrolado puro (Li *et al.*, 2007).

A cromatografia de afinidade usa um agente específico de ligação (ligando) para purificar as biomoléculas baseado na sua função biológica ou estrutura química (Lowe *et al.*, 2001; Kanoun *et al.*, 1986; Schiel *et al.*, 2006). Este tipo de cromatografia separa as moléculas pela interação reversível entre a molécula alvo e o seu ligando específico, acoplado à matriz. O ligando escolhido para ser acoplado vai variar de acordo com as propriedades moleculares das biomoléculas (Jungbauer e Hahn, 2004; Mallik e Hage, 2006).

Vários tipos de ligandos podem ser usados na cromatografia de afinidade de plasmídeos:

- Iões metálicos, como o níquel (Ni) ou o cobre (Cu), já foram utilizados para a purificação do pDNA directamente do lisado (Murphy *et al.*, 2003; Nastasijevic *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2007);
- Oligonucleotidos que formam uma tripla hélice com o pDNA também foram utilizados nesse sentido, tendo conseguido reduzir o RNA, endotoxinas e gDNA em apenas um passo (Wils *et al.*, 1997; Schluep e Cooney, 1998);
- Proteínas, como a proteína de dedo de zinco ou a proteína lacI, foram usadas para o isolamento de pDNA (Woodgate *et al.*, 2002; Hasche e Voß, 2005; Forde *et al.*, 2006);
- Aminoácidos, como a histidina ou a arginina, foram utilizados em matrizes de modo a isolar o pDNA na sua forma super-enrolada (Sousa *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2008).

Contudo a separação e purificação de plasmídeo por processos cromatográficos tem as suas limitações (Diogo *et al.*, 2005):

- As semelhanças físicas e químicas entre as impurezas e o pDNA resultam em baixa selectividade e na presença de impurezas juntamente com o pDNA;
- A elevada viscosidade das soluções impede o fluxo através da coluna;
- O elevado tamanho do pDNA faz com que o processo seja demorado, que haja baixa recuperação do produto e que a coluna não tenha capacidade para o pDNA.

Assim, para se conseguir o elevado grau de pureza necessário para a utilização do pDNA para procedimentos terapêuticos, é necessária a combinação de dois passos cromatográficos ou a combinação de um passo cromatográfico com outra técnica (Stadler *et al.*, 2004), como por exemplo Sistemas de Duas Fases Aquosas (Trindade *et al.*, 2005).

1.3. Sistemas de Duas Fases Aquosas

Os Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFAs) são um método de separação líquido-líquido que tem sido utilizado na recuperação e purificação de uma variedade de produtos biológico, incluindo proteínas (Mayerhoff *et al.*, 2004), material genético (Frerix *et al.*, 2005), nanopartículas (Helfrich *et al.*, 2005), produtos de baixa massa molecular (Cisneros *et al.*, 2004), células (Edahiro *et al.*, 2005) e organelos celulares (Sturesson *et al.*, 1990) e que poderá ser utilizada para a separação das diferentes isoformas do pDNA (Frerix *et al.*, 2007).

Esta técnica tem como principais vantagens (Albertsson, 1986):

- Ser fácil de manipular;
- Fácil aumentar a escala;
- Simples e eficaz;
- Biocompatível.

Os SDFAs formam-se quando compostos incompatíveis como alguns polímeros (polietilenoglicóis, dextrano, polipropilenoglicóis, etc.) e sais (fosfatos, sulfatos,

citratos, etc.) são misturados em água acima de certas concentrações críticas, conduzindo à formação de duas fases aquosas (Albertsson, 1986) (Figura 3).

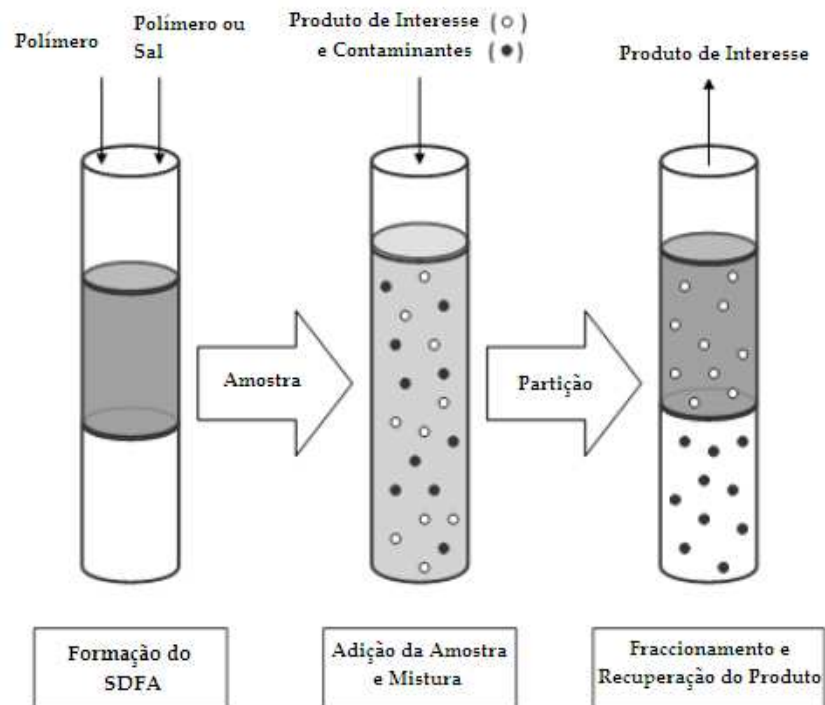


Figura 3 – Esquema simplificado da separação de biomoléculas por métodos de duas fases aquosas (Adaptado de Benavides *et al.*, 2008).

Os primeiros estudos realizados com SDFAs tiveram início no final dos anos 50 e início dos anos 60, quando Albertsson (Albertsson, 1961) evidenciou o enorme potencial da utilização deste método na recuperação de compostos biológicos. Este processo pode ser integrado e intensificado quando se utilizam várias estratégias de SDFAs, que optimizadas podem ser utilizadas em grande escala (Benavides e Rito-Palomares, 2008; Rito-Palomares, 2004).

Os SDFAs podem ser caracterizados por um diagrama de fases (Figura 4) que é constituído por uma linha curva que separa a zona em que os componentes se misturam (região de uma fase) e a zona em que os componentes se tornam imiscíveis (região de duas fases), que se denomina por binodal, e por várias outras linhas que se denominam por linhas de ligação e que representam as várias composições totais do sistema e cujas extremidades (nodos) representam a composição das fases superior e inferior.

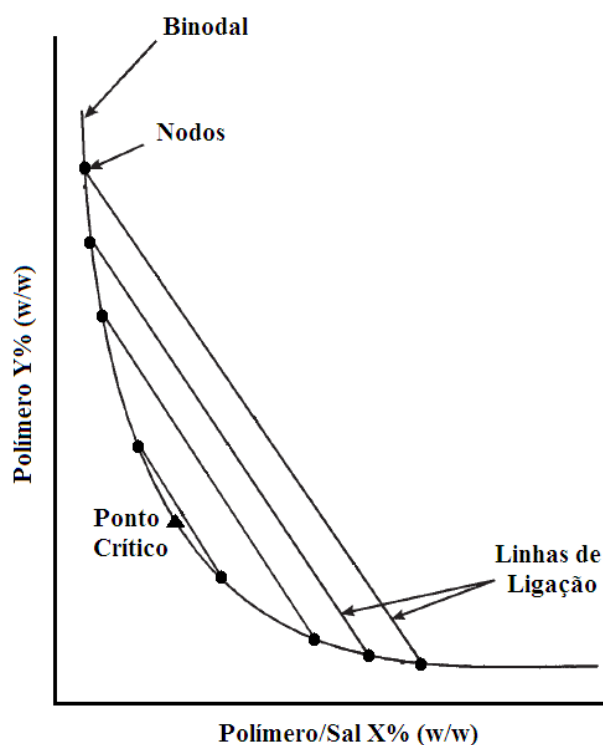


Figura 4 – Ilustração de um diagrama de fases (Adaptado de: Hatti-Kaul, 2000)

Qualquer composição total representada por pontos da mesma linha de ligação dá origem a sistemas de duas fases aquosas com as mesmas composições de equilíbrio, mas com diferentes razões de fases. Faz também parte do diagrama de fases o chamado ponto crítico. No ponto crítico, a composição e os volumes das duas fases são teoricamente iguais. Este é geralmente obtido através da extrapolação, até à binodal, da linha que passa pelos pontos médios das linhas de ligação (Albertsson, 1986).

O coeficiente de partição (K) é normalmente usado para avaliar a extensão da partição das biomoléculas nos SDFA com polímeros (Mazzola *et al.*, 2008).

Quando se adiciona uma solução a um SDFA, esta distribui-se entre as fases em equilíbrio, e este fenómeno pode ser quantificado pelo coeficiente de partição, K , geralmente definido como o quociente entre a concentração do soluto na fase superior e a concentração do mesmo na fase inferior (Albertsson, 1986). Assim:

$$K = \frac{C_s}{C_i}$$

em que “C” representa a concentração do polímero ou sal, “s” fase superior e “i” fase inferior.

Quando o K é significativamente divergente para a biomolécula alvo (por exemplo pDNA) e para outra biomolécula (por exemplo RNA ou proteínas) presente no sistema, a extração é melhor. Ou seja, os valores de K maiores que uma unidade indicam a eficiência da partição no sistema de duas fases aquosas (Mazzola *et al.*, 2008).

1.3.1. Estratégias Práticas para o Desenvolvimento de Processos de Recuperação Primária usando SDFA

As estratégias práticas para o desenvolvimento de processos de recuperação utilizando SDFA podem ser divididas em vários passos fundamentais:

- Caracterização físico-química do soluto;
- Seleção do tipo de SDFA;
- Diagrama de Fases;
- Seleção dos parâmetros do sistema;
- Influência dos parâmetros do sistema na recuperação/purificação do produto.

Os parâmetros do sistema dizem respeito às características (massa molecular do polímero, comprimento da linha de ligação e pH) do sistema de extração, enquanto os parâmetros do processo referem-se ao modo como a recuperação é feita (amostra, passos de extração consecutivos, etc.) (Benavides e Rito-Palomares, 2008).

1.3.1.1. Caracterização Físico-Química do Solute

As propriedades físico-químicas do soluto influenciam fortemente o seu comportamento de partição no SDFA, sendo as três mais determinantes a massa molecular, o ponto isoelétrico (carga da superfície electroquímica) e o carácter hidrofóbico. Os parâmetros dos sistemas, como a massa molecular dos polímeros e o comprimento da linha de ligação devem pois ser escolhidos em função dessas propriedades. Assim, o primeiro passo a ser realizado é a caracterização físico-química

da amostra onde se encontra o produto de interesse e os contaminantes (Albertsson, 1986).

A caracterização do produto e dos contaminantes pode já ter sido descrita anteriormente e, assim, ser facilmente obtida em artigos ou livros já publicados. Se a informação disponível não englobar todos os parâmetros necessários, podem ser realizados estudos no sentido de preencher as lacunas de informação. Para isso, utiliza-se (Benavides e Rito-Palomares, 2008):

- Electroforese (PAGE nativa, SDS-PAGE, focagem isoelétrica e electroforese 2D);
- Cromatografia (Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) com uma grande variedade de colunas de separação e sistemas de detecção).

Após a caracterização do soluto, a escolha do tipo de S DFA será feita de modo a conseguir separar-se o produto de interesse, dos contaminantes presentes na amostra.

1.3.1.2. Seleção do Tipo de S DFA

Em geral, os tipos de S DFA podem ser divididos em:

- polímero-compostos de baixo peso molecular;
- polímero-polímero.

Dos sistemas polímero-compostos de baixo peso molecular, os sistemas polímero-sal são os mais utilizados, principalmente pelo baixo custo dos sais, pelo extenso conhecimento e caracterização destes sistemas e pela sua estabilidade na formação de fases (Albertsson, 1986). S DFA com sulfatos (Trindade *et al.*, 2005; Antov *et al.*, 2006; Mohamadi e Omidinia, 2007), citratos (Rahimpour *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 2009; Tubio *et al.*, 2009) e fosfatos (Lima *et al.*, 2002; Chouyyok *et al.*, 2009; Luechau *et al.*, 2009b) têm sido utilizados. Contudo, determinados sais (como os fosfatos) podem apresentar algumas limitações, particularmente em termos ambientais (Venâncio *et al.*, 1996; Cunha *et al.*, 2000). Outros compostos de baixo peso molecular, usados neste tipo de sistema, podem ser a glucose, o glicerol, o álcool propílico, entre outros (Albertsson, 1986).

Normalmente, os sistemas polímero-polímero são usados se o preço do produto de interesse compensa o custo total dos polímeros nestes sistemas (Rito-Palomares,

2004), sendo o sistema PEG-Dextrano o mais utilizado e o mais extensamente descrito e caracterizado (Albertsson, 1986).

Contudo, existe uma limitação associada aos SDFA para a separação de biomoléculas, usados à escala industrial, que é o elevado preço dos polímeros. O custo destes reagentes pode ascender a 74% do custo total de produção (Datar, 1986). O Dextrano, cadeia de monómeros de glucose, o polímero mais comumente usado juntamente com o PEG, é obtido por fermentação da bactéria *Leuconostoc mesenteroides*, em meios contendo sacarose como fonte de carbono (Albertsson, 1986; Coelho *et al.*, 2002). Neste processo, a bactéria usada produz a enzima extracelular dextransucrase, que posteriormente vai converter o excesso de sacarose em dextrano e frutose. O dextrano obtido é posteriormente fraccionado, o que torna o processo caro (Coelho *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, um elevado número de polímeros tem sido utilizado para substituir o Dextrano. Um dos polímeros mais utilizado como alternativa é o hidroxipropilamido, que está disponível comercialmente com o nome de Reppal PES100 e de Aquaphase PPT (Tjerneld *et al.*, 1986; Venâncio *et al.*, 1993; Venâncio e Teixeira, 1995; Almeida *et al.*, 1998; Chaves *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2003). A utilização deste polímero no sistema formado com o PEG, permite baixar cerca de 7 vezes o custo da operação (Tjerneld *et al.*, 1986) e tem ainda a vantagem de ser biodegradável (Sturesson *et al.*, 1990). Apesar deste polímero ser consideravelmente menos caro que o Dextrano, tem a desvantagem de ser altamente polidisperso (Cunha *et al.*, 2000) e de serem necessárias elevadas concentrações de polímero para se conseguir a separação de fases, quando o Dextrano é substituído por Reppal PES100 (Farkas *et al.*, 1996).

Venâncio (Venâncio *et al.*, 1995) introduziu também os galactomananos (goma de guar, Solvitose Gum Ofa e farinha de alfarroba) como polímeros não purificados alternativos. Contudo os sistemas resultantes apresentam elevada viscosidade, tornando a sua manipulação mais difícil.

Uma outra possível alternativa ao sistema PEG-Dextrano, é a utilização de sistemas onde os polímeros possam ser reciclados, como os polímeros termossensíveis. Estes podem ser usados juntamente com outros, como o Dextrano, o hidroxipropilamido, ou com sais (Harris *et al.*, 1991). São sistemas vantajosos devido ao baixo custo dos polímeros usados e à possibilidade de reciclagem dos mesmos (Berggren *et al.*, 1995).

Nestes sistemas, quando as soluções com polímeros termossensíveis são aquecidas acima de uma temperatura crítica, a solubilidade do polímero diminui e formam-se duas fases, uma contendo maioritariamente água, enquanto a outra é composta pelo polímero. A temperatura à qual a solução começa a turvar, havendo a separação em duas fases, é denominada por ponto de turbidez. Este depende da concentração do polímero termossensível presente em solução (Johansson *et al.*, 1999).

Assim, como noutros SDFAs, as características dos sistemas podem ser modificadas. Alterando o polímero usado e a concentração deste, o pH, o sal adicionado e a concentração deste, a temperatura e o tempo de termoseparação consegue obter-se a separação entre o produto de interesse e os contaminantes (Hatti-Kaul, 2000).

Dos vários tipos de polímeros termossensíveis existentes, destacam-se:

- PEG (Saeki *et al.*, 1976);
- copolímeros de óxido de etileno (EO) e óxido de propileno (PO) (Figura 5) (Harris *et al.*, 1991; Alred *et al.*, 1992, 1994; Persson *et al.*, 1998; Persson *et al.*, 1999a; Zhu *et al.*, 2002; Kepka *et al.*, 2003);
- HM-EOPO (EO-PO modificado hidrofobicamente) (Persson, 1999b).

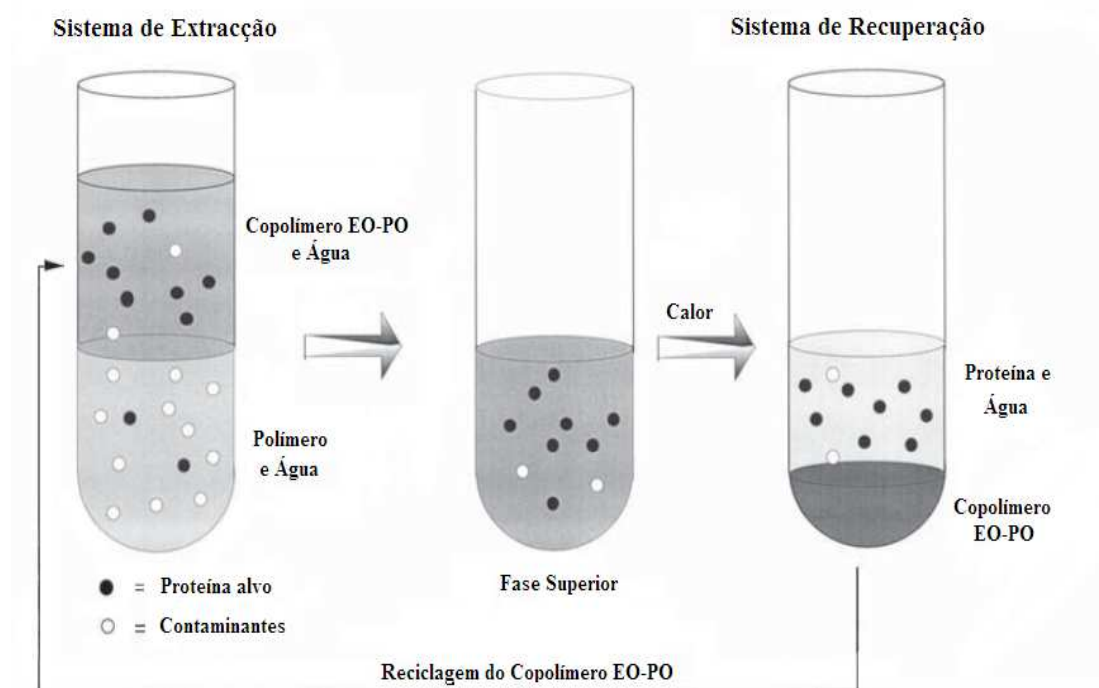


Figura 5 – Esquema da reciclagem da fase de um SDFa contendo um polímero termossensível (óxido de etileno/óxido de propileno) (Adaptado de: Persson *et al.*, 2000).

O PEG (polietilenoglicol) é um polímero termossensível, contudo não é usado no processo de termoseparação, pois o seu ponto de turbidez encontra-se acima dos 100°C (Saeki *et al.*, 1976). Por exemplo, para o PEG 20000 em água, a temperatura à qual se obtém uma solução turva é de 112°C (Sjöberg *et al.*, 1989). Normalmente usa-se uma mistura de óxido de etileno (EO) e óxido de propileno (PO), sendo o ponto de turbidez mais baixo (Johansson *et al.*, 1993) e, portanto, sendo esta mistura usada para a separação de fases induzida pela temperatura (Berggren *et al.*, 1995; Cunha *et al.*, 1998; Persson *et al.*, 2000).

1.3.1.3. Diagrama de Fases

Uma vez que a selecção do sistema tenha sido feita, é necessário um diagrama de fases. Assim, começa-se pela determinação da binodal do S DFA que pode ser feita experimentalmente por um de três métodos conhecidos (Albertsson, 1986; Hatti-Kaul, 2000).

Um dos métodos é o método do ponto de turbidez, onde um polímero/sal X é adicionado a um polímero Y. A solução é repetidamente levada abaixo e acima do ponto de turbidez, pela adição de pequenas quantidades de água. A binodal encontra-se entre estes dois pontos (mostrado pela linha em “zig zag” na Figura 6).

O outro método consiste em titulações turbidimétricas, onde uma série de sistemas (●, Figura 6) são preparados e titulados até que se forma um sistema de uma fase – a binodal encontra-se acima deste ponto (▲, Figura 6), em que as duas fases passam a ser apenas uma.

O último método consiste na determinação dos nodos (■, Figura 6) dos sistemas, que é conseguido pela preparação de uma série de sistemas em diferentes linhas de ligação (----●----, Figura 6) e analisando a concentração dos componentes nas fases superior e inferior. Para a determinação das composições das fases, são necessários tantos métodos independentes quanto os componentes que se vão distribuir entre as fases. Em sistemas aquosos com dois polímeros, as técnicas mais usadas são a determinação do índice de refração (Venâncio *et al.*, 1993) e da rotação óptica (polarimetria) (Cunha *et al.*, 2000).

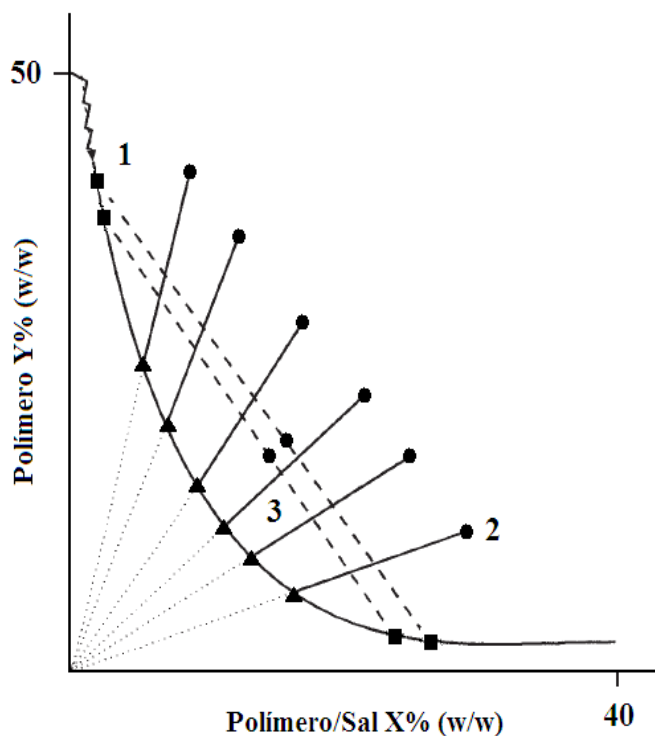


Figura 6 – Representação gráfica dos três métodos usados para determinar a binodal (Adaptado de: Hatti-Kaul, 2000).

1.3.1.4. Seleção dos Parâmetros do Sistema

O primeiro parâmetro a seleccionar é o valor do pH. Este tem de se encontrar acima do ponto isoeléctrico (pI) ou pKa do composto alvo. Contudo não deverá estar mais do que quatro a cinco unidades acima, pois os contaminantes poderão convergir para a fase de recuperação (Nerli *et al.*, 2001; Benavides e Rito-Palomares, 2008).

De seguida, escolhe-se o sal formador da fase inferior, no caso de sistemas polímero/sal. Os sais inorgânicos normalmente usados são fosfatos, sulfatos, citratos, etc. Na escolha do sal tem de se ter em conta o pH escolhido no passo anterior. Sistemas com fosfato são estáveis a pH acima de 7 (Rito-Palomares *et al.*, 2001), enquanto sistemas com sulfato são recomendados para valores abaixo de 6,5.

Outro parâmetro que influencia é a massa molecular do polímero usado. Esta tem de ser escolhida consoante o peso molecular do produto alvo e o seu carácter hidrofílico. Normalmente, para se recuperarem produtos com elevada massa molecular (> 10000 g/mol) e hidrofílicos, utiliza-se PEG com massa molecular abaixo de 4000

g/mol. Para compostos com baixa massa molecular (< 10000 g/mol) e hidrofóbicos, utiliza-se PEG com massa molecular acima de 6000 g/mol.

O último parâmetro que deverá ser escolhido é a temperatura. Em sistemas polímero-sal, a concentração de polímero e de sal usada para a formação de duas fases, será menor quanto maior for a temperatura. No caso de sistemas polímero-polímero, o aumento da temperatura leva a um aumento da concentração de polímeros necessária para a obtenção de duas fases aquosas (Albertsson, 1986).

Se quando se combinam estes quatro parâmetros a recuperação do produto não acontecer ou for insatisfatória, então terá de se realizar um estudo da influência de cada parâmetro no produto de interesse. A escolha dos parâmetros adequados irá aumentar a recuperação e/ou purificação do produto.

Se o sistema polímero-sal utilizado não for capaz de promover uma recuperação aceitável do composto alvo, deverá recorrer-se a uma mudança no tipo de S DFA utilizado. Assim, poderá escolher-se um sistema polímero-polímero ou um sistema alternativo. A escolha de um novo sistema levará à construção de novos diagramas de fase (se não estiverem já descritos) e à escolha de novos parâmetros do sistema.

Contudo, se a recuperação do produto é alcançada, uma melhor caracterização da influência dos parâmetros do sistema deverá ser realizada para aumentar o desempenho do processo. Assim, parâmetros como amostra adicionada ao sistema, adição de sais, adição de compostos e até o uso de vários passos de S DFA deverão ser analisados (Benavides e Rito-Palomares, 2008).

1.3.1.5. Influência dos Parâmetros do Sistema na Recuperação/Purificação do Produto

Para melhorar o processo de recuperação é necessário caracterizar a influência dos parâmetros no processo. A quantidade de amostra adicionada ao sistema é um dos parâmetros que influencia a recuperação do produto. Uma amostra de 10% (w/w) é o recomendado inicialmente. Amostras até 40% (w/w) podem ser usadas, contudo uma maior quantidade iria sobrecarregar o sistema (Albertsson, 1986).

A adição de sais neutros ao S DFA também pode ser usada para aperfeiçoar o processo. O cloreto de sódio (NaCl) tem sido utilizado para promover a migração do composto para a fase do polímero em sistemas polímero-sal, assim como para deslocar

os compostos da interfase para uma das fases. Contudo, pode causar desnaturação de compostos biológicos (Hatti-Kaul, 2000).

Outra maneira envolve a adição de compostos como a ureia, o metanol ou o etanol. Todos estes compostos são capazes de causar o aumento da recuperação e/ou purificação do produto (Rämsch *et al.*, 1999; Rämsch *et al.*, 2000; Cisneros *et al.*, 2004).

O uso de vários passos de S DFA consecutivos pode também servir para aumentar a recuperação do produto (Duarte *et al.*, 2007). Os vários S DFA usados podem ser do mesmo tipo ou de diferentes tipos, dependendo do composto que se quer obter. Ao usar-se diferentes S DFA, os parâmetros têm de ser definidos de modo a alcançar-se o melhor desempenho.

1.3.2. Integração do Processo de S DFA

À medida que se desenvolvem novos produtos biotecnológicos para a área da saúde, é necessário formular novas estratégias para recuperar o produto presente nas culturas de células, de modo a conseguir um elevado rendimento e a pureza necessária para ser utilizado com fins terapêuticos. A integração do processo por S DFA visa conseguir a recuperação do produto pretendido, sem a necessidade de usar mais do que um método para tal.

Assim, existem várias formas de integrar o processo de S DFA com outras técnicas de recuperação e purificação do biomoléculas terapêuticas. Uma forma é a reacção ocorrer dentro do S DFA e o produto ser libertado para o sistema. Como a reacção ocorre numa fase do sistema e o produto de interesse particiona para a fase oposta, consegue-se obter o produto parcialmente purificado sem haver necessidade de se realizar um passo para a produção e outro para a recuperação do produto (Kaul e Mattiasson, 1991; Hatti-Kaul, 2000).

Os S DFAs também podem ser utilizados para recolher o produto extracelular em fermentações, após a sua formação e excreção, visto que a fermentação e o produto se encontram em fases opostas. Como o produto é retirado à medida que é formado, não vai ocorrer a inibição da fermentação pelo produto nem ocorre baixa produtividade volumétrica. Apesar de este método ter vantagem e simplificar o processo de purificação, ainda tem limitações (Banik *et al.*, 2003).

Rito-Palomares e Lyddiatt (2002) mencionaram a utilização de SDFAs juntamente com a disrupção celular para a recuperação de proteínas intracelulares (Figura 7). Assim, em vez de se realizarem dois passos separados de disrupção celular e posterior extracção do produto por SDFAs, a disrupção celular é realizada dentro dos SDFAs e o produto de interesse é recuperado numa das fases, enquanto os contaminantes (RNA, proteínas, restos celulares) ficam na fase oposta.

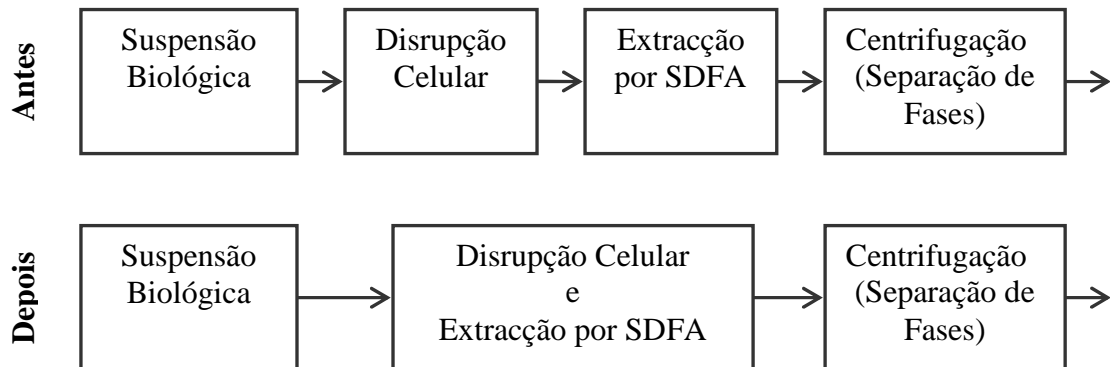


Figura 7 – Esquema comparando os passos antes e depois da integração do processo de SDFAs com a disrupção celular (Adaptado de: Rito-Palomares e Lyddiatt, 2002).

Os SDFAs normalmente são usados para a recuperação primária, obtendo-se o produto parcialmente purificado (Figura 8). Trindade *et al.* (Trindade *et al.*, 2005) descreveu o uso de SDFAs para substituir vários passos de precipitação antes de um passo cromatográfico. Neste caso, o SDFAs é utilizado para recuperar e purificar parcialmente o pDNA. Outros SDFAs foram testados para purificar pDNA a partir de uma cultura celular (Kepka *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2002; Rahimpour *et al.*, 2006).

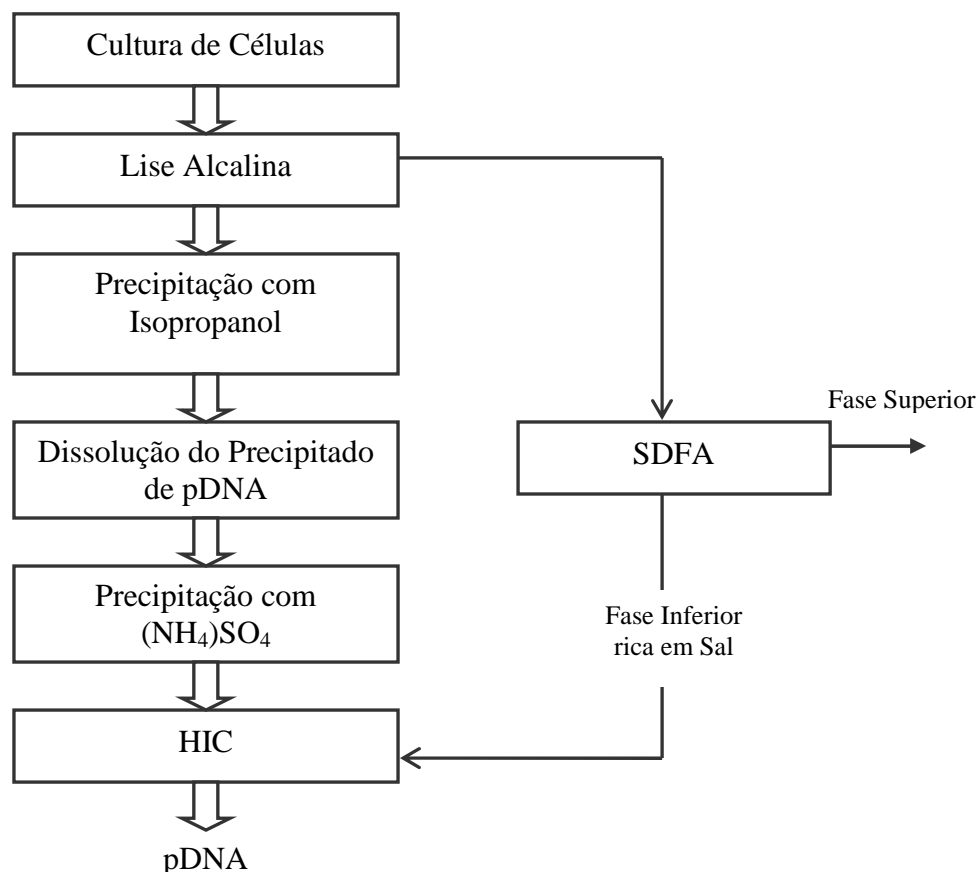


Figura 8 – Integração do processo de SDFa. Um único passo de SDFa conseguiu substituir dois passos de precipitação, usados para a recuperação primária do pDNA (Adaptado de: Trindade *et al.*, 2005).

1.3.3. Aplicações dos Sistemas de Duas Fases Aquosas

Nos últimos anos os SDFa têm sido desenvolvidos e aplicados em vários processos biotecnológicos (Kula *et al.*, 1982; Albertsson, 1986). As áreas mais importantes de aplicação são a extração e a purificação de proteínas, a recuperação de células e fragmentos celulares, e o estudo das interações entre biomoléculas (Cabral e Aires-Barros, 1993).

As vantagens que têm contribuído para o sucesso do uso dos SDFa são:

- Diminuição do tempo das experiências
- Aplicação de elevados volumes
- Facilidade no aumento de escala
- Utilização de equipamento usado na extração líquido-líquido clássica
- Possibilidade de operação em contínuo

- Possibilidade de operação à temperatura ambiente

Também economicamente os SDFAs apresentam vantagens, quando comparados com outros métodos de extracção (Kroner *et al.*, 1984; Harsa, 1991).

Os SDFAs têm sido utilizados em várias aplicações:

- Fraccionamento de células em subpopulações de modo a obter informações sobre as mesmas, que são importantes para a investigação bioquímica e medicina (Walter *et al.*, 1985; Walter e Johansson, 1994);
- Determinação de características físico-químicas de proteínas, assim como as suas alterações conformacionais (Walter e Johansson, 1994);
- Detecção e quantificação de interacções biomoleculares (Walter *et al.*, 1985);
- Recuperação do produto de interesse em Biotecnologia, concentrando-o (Albertsson, 1986);
- Isolamento de proteínas de meios simples e complexos (Hustedt *et al.*, 1985; Jordan e Vilter, 1991);
- Recuperação de proteínas membranares (Sanchez-Ferrer *et al.*, 1989; Ramehneier *et al.*, 1991);
- Isolamento rápido de DNA (Cole, 1991);
- Extracção de bioprodutos de baixo peso molecular, como aminoácidos (Sikdar *et al.*, 1991);
- Aumento da produtividade de processos biotecnológicos através de bioconversões extractivas (Hatti-Kaul, 2000).

1.3.4. Recuperação de Material Genético com SDFAs

É importante a criação de novos métodos de recuperação e purificação de pDNA para serem utilizados em TG e vacinas de DNA, assim como na área da Genómica (estudo do genoma dos organismos) e da Engenharia Genética (manipulação dos genes de um organismo). Para este efeito o uso de SDFAs tem sido investigado e com resultados promissores.

O primeiro estudo realizado com este objectivo foi realizado por Ribeiro *et al.* (2002) que descreveu o uso de um SDFAs PEG-hidrogenofosfato de potássio para o

isolamento de pDNA a partir de um lisado. Variando a massa molecular do PEG e a quantidade de lisado adicionada ao sistema, obtiveram um rendimento superior a 67% usando sistemas com PEG 1000, tendo contudo havido co-particionamento do RNA com o plasmídeo. Em sistemas com PEG 600, o RNA foi encontrado maioritariamente na interfase, as proteínas não foram detectadas na fase inferior e o DNA genómico foi reduzido 7,5 vezes. Tanto nos sistemas com PEG 1000 e PEG 600 os melhores resultados foram obtidos com 40% (w/w) de lisado.

Kepka *et al.* (2003) referiu o uso de um SDFA termoseparável com óxido de etileno/óxido de propileno e dextrano para a purificação primária de pDNA. Obteve uma recuperação completa do plasmídeo na fase superior do sistema, enquanto a maioria das impurezas (RNA e proteínas) se encontravam na fase inferior. Variando os parâmetros do sistema ainda conseguiram reduzir 4 vezes a perda de plasmídeo. Além da recuperação do plasmídeo, ainda conseguiram a reciclagem do polímero usado, sendo este um ponto importante para processos de larga escala.

Trindade *et al.* (2005) referiu o uso de um SDFA PEG-sulfato como primeiro passo para a recuperação do vector de pDNA, onde o lisado de células de *E. coli* foi directamente adicionado ao sistema. O processo resultou na recuperação completa do pDNA, e permitiu uma concentração de três vezes do produto de interesse. De modo a conseguir a intensificação do processo, a quantidade de lisado adicionado ao sistema de extracção foi aumentado de 20 a 40% (w/w), resultando num rendimento de 85% e um factor de concentração de 8 vezes.

Duarte *et al.* (2007) referiu um método para a preparação de poliplexos (complexos formados quando o pDNA está ligado a polímeros catiónicos) a partir de lisados bacterianos usando SDFA. O processo desenvolvido pelos autores consistia em dois passos consecutivos de SDFA, seguidos de ultrafiltração permitindo a integração da purificação do plasmídeo e a preparação de poliplexos num único procedimento. No primeiro passo o sistema PEG-sulfato de amónio, anteriormente descrito, foi utilizado para remover a maior parte dos contaminantes. No segundo passo, foi utilizado um polímero catiónico (polietilenimina) derivatizado com PEG (pPEI) como ligando de afinidade para se ligar ao plasmídeo em sistemas PEG-Dextrano. Os poliplexos foram obtidos com um rendimento de 100% após os dois passos de extracção, enquanto o RNA e as proteínas contaminantes foram completamente removidos. Embora a remoção do PEG e dextrano por ultrafiltração tenha conduzido a um substancial diminuição do rendimento em pDNA, ficou demonstrada a possibilidade desta aplicação.

Luechau *et al.* (2009a) referiu o uso de um SDFa constituído por PEG 300 e fosfato de potássio dibásico para a captura primária de ácidos nucleicos de elevado peso molecular. Os autores conseguiram uma solução de pDNA livre de proteínas, tendo obtido um rendimento de 89,5%. Porém, o RNA de baixo peso molecular foi apenas parcialmente removido. Pelos resultados obtidos, o sistema usado poderá ser um bom processo alternativo para o processamento de pDNA.

1.3.5. Ligandos de Afinidade do pDNA para Sistemas de Duas Fases Aquosas

Na purificação de pDNA também têm sido utilizados ligandos em conjunto com as técnicas normalmente usadas neste processo (Costioli *et al.*, 2003). No presente trabalho já se mencionou o uso destes ligandos nos processos cromatográficos, contudo estes também podem ser utilizados em SDFa. A aplicação destes ligandos tenta superar determinadas limitações encontradas, principalmente nos processos cromatográficos (Labrou e Clonis, 1994).

Os ligandos de afinidade podem ser de diferentes tipos: anticorpos, proteínas, nucleotídeos, metais, péptidos, DNA e DNA com sequências específicas, entre outros (Labrou e Clonis, 1994). Contudo têm de ter uma elevada afinidade para uma sequência específica dentro do pDNA de modo a que ocorra a separação do plasmídeo dos contaminantes do lisado (Hasche e Voß, 2005; Costioli *et al.*, 2003).

Todavia os ligandos utilizados na purificação por afinidade são caros e existe a necessidade de procurar e investigar a utilização de novos ligandos mais baratos, apesar de estes poderem ter menos afinidade para o pDNA que os ligandos mais caros utilizados até agora (Hasche e Voß, 2005; Costioli *et al.*, 2003; Rege *et al.*, 2004).

Para esse efeito antibióticos, como a berberina, o berenil, a neomicina e a actinomicina, têm sido estudados como possíveis ligandos para a purificação de pDNA (Tente, 2008; Nunes, 2008).

1.3.5.1. Berenil como Ligando de Afinidade para o DNA

O berenil (1,3-bis(4'-amidino)phenyl)triazene, diminazene aceturato ou 4,4'-(1-triazene-1,3-diil)bis(benzamidina)) (Figura 9) é uma droga que se liga ao DNA, normalmente utilizada no tratamento da tripanossomiase bovina (Clausen *et al.*, 1999) e da leishmaniose (Burri *et al.*, 1996) em Medicina Veterinária.

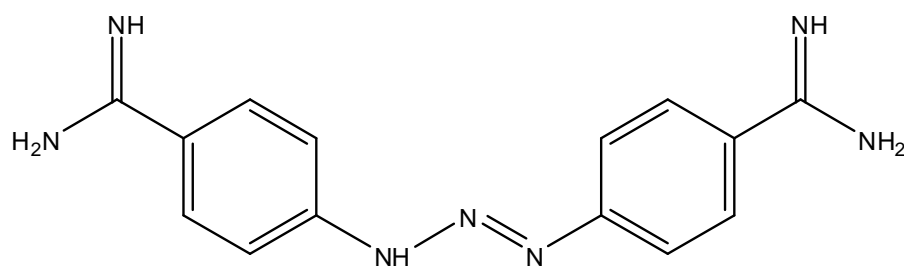


Figura 9 – Estrutura Química do Berenil (Adaptado de González *et al.*, 1999)

Esta droga reconhece e liga-se a sequências de DNA ricas em AT, podendo ligar-se igualmente, com menos frequência, a sequências ricas em CG. Pode inibir também a actividade da topoisomerase (Barceló *et al.*, 2001). Ao ligar-se ao DNA desta maneira, o berenil pode interferir em processos biológicos fundamentais, tais como a transcrição e a replicação (Abreu *et al.*, 2008).

Recentemente, foram realizados estudos de afinidade com o berenil (Tente, 2008) concluindo-se que para uma concentração de 1 M de cloreto de sódio, apresenta uma elevada constante de ligação ($12849,00 \text{ M}^{-1}$) ao pDNA, e que esta constante diminui substancialmente para concentrações abaixo ou acima deste sal.

Devido a esta elevada afinidade que o berenil tem para o DNA, pensa-se que poderá ter potencial para ser utilizado como ligando de afinidade nos processos de purificação de pDNA, nomeadamente em SDFA, de modo a separar esta biomolécula de todas as restantes impurezas existentes no lisado.

2. Objetivo

O objectivo deste trabalho foi testar duas novas abordagens para purificar DNA plasmídico em Sistemas de Duas Fases Aquosas. Uma das abordagens consistiu em testar a utilização de Hidroxipropilamido como substituto do Dextrano nestes sistemas. A outra abordagem consistiu na utilização do Berenil como ligando de afinidade para os plasmídeos em SDFA de modo a aumentar a sua selectividade.

3. Material e Métodos

3.1. Reagentes

3.1.1. Plasmídeo pVAX1LacZ

Foi utilizado como modelo o plasmídeo pVAX1LacZ de 6050 pares de bases, desenvolvido pela Invitrogen™, contendo como marca selectiva o gene de resistência à kanamicina (Anexo 6.1.). O hospedeiro foi a estirpe da bactéria *Escherichia coli* DH5 α , conservada em tubos criogénicos a -80°C, em 50% (v/v) de glicerol.

3.1.2. Meios de Cultura

A bactéria foi cultivada em meio LB (Luria Bertani) com a adição de kanamicina (concentração final 30 μ g/mL). O meio foi preparado misturando em 1000 mL:

- 5 g de Extracto de Levedura
- 10 g de Triptona
- 5 g de Cloreto de Sódio (NaCl)

Após completa dissolução de todos os componentes, o pH foi acertado a 7,4 como NaOH. Em seguida, foi esterilizado a 121°C, durante 20 minutos. A solução de kanamicina concentrada (1 mg/mL) foi esterilizada com um filtro de seringa de 0,2 μ m.

3.1.3. Lise Alcalina e Purificação de Plasmídeos

Na lise alcalina e purificação do plasmídeo utilizaram-se várias soluções tampão. Para a lise alcalina, realizada para posterior purificação de pDNA através de um kit, utilizaram-se os tampões P1, P2 e P3 e para a purificação do pDNA utilizaram-se os tampões QBT, QC e QF. Para a lise alcalina, realizada para posteriormente se obter o lisado para estudos de partição, utilizaram-se as soluções 1, 2 e 3.

Após a purificação, o plasmídeo foi colocado num tampão de ressuspensão. O tampão usado foi o tampão TE pH 8,0, com a seguinte composição: 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA.

Material e Métodos

Na tabela 2 é indicada a composição dos tampões utilizados na lise alcalina e na purificação do plasmídeo.

Tabela 2 – Composição dos diferentes tampões utilizados na lise alcalina e na purificação do DNA plasmídico.

Tampão	Composição
Tampão P1	50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNase A
Tampão P2	200 mM NaOH; 1% (p/v) SDS
Tampão P3	3,0 M acetato de potássio, pH 5.5
Solução 1	500 mM de glucose; 10 mM de EDTA; 25 mM Tris-HCl, pH 8.0
Solução 2	200 mM de NaOH; 1% (p/v) SDS
Solução 3	3 M acetato de potássio; 11,5% ácido acético
Tampão QBT	750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH 7.0; 15% isopropanol (v/v); 0,15% Triton X-100
Tampão QC	1,0 M NaCl; 50 mM MOPS pH 7.0; 15% isopropanol (v/v)
Tampão QF	1,25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8.5; 15% isopropanol (v/v)

3.1.4. Electroforese em Gel de Agarose

Nas electroforeses em gel de agarose a 1%, utilizou-se TAE com a seguinte composição: 40 mM Tris-base, 20 mM de ácido acético e 1 mM EDTA pH 8.0.

As amostras de pDNA foram misturadas com *loading buffer* composto por 0,25% azul de bromofenol e 30% glicerol.

3.1.5. Determinação de RNA por Fluorescência

Para a determinação do RNA por fluorescência foram necessários dois tampões. Um tampão TE com 10 mM de Tris-HCl pH 7.5 e 1 mM EDTA e um tampão de digestão de DNase 10X composto por Tris-HCl 200 mM livre de nucleases pH 7.5, contendo 100 mM de MgCl₂ e 20 mM de CaCl₂.

3.1.6. Método do DNS

Neste método utilizou-se uma solução de Ácido Dinitrosalicílico (DNS) preparada do seguinte modo: dissolveram-se 5 g de ácido dinitrosalicílico em 100 mL de NaOH 2M 80°C. Dissolveram-se 150 g de tartarato de sódio e potássio em 250 mL de água desionizada. Aqueceu-se até dissolverem. Misturaram-se as duas soluções e adicionou-se água desionizada até ao volume final de 500 mL. A solução foi armazenada a 4°C até ser utilizada.

3.1.7. Purificação do Clorofórmio

O clorofórmio utilizado foi previamente purificado por lavagem com água, recolha e secagem da fase orgânica com cloreto de cálcio e destilado, sob atmosfera de azoto.

3.1.8. Outros Reagentes

De seguida, são especificados alguns reagentes utilizados no trabalho experimental e ainda não mencionados. Todos os sais utilizados são de grau analítico e as respectivas soluções aquosas preparadas em água filtrada no sistema de purificação de água da Millipore, modelo Elix[®].

Tabela 3 – Reagentes utilizados na preparação dos meios líquidos das fermentações.

Reagentes	Grau de Pureza (%)	Fornecedor
Sulfato de Kanamicina	99	Sigma
Glicerol	98	Fluka
Triptona	-	BD
Extracto de Levedura	-	BD

Material e Métodos

Tabela 4 – Reagentes utilizados nos métodos de lise alcalina e na purificação do DNA plasmídico.

Reagentes	Grau de Pureza (%)	Fornecedor
Isopropanol	99,8	VWR
EDTA	99	Sigma
Glucose	99	Sigma
RNase A	-	Qiagen
Cloreto de Sódio	99,5	Acros Organics
Triton X-100	-	Sigma
Tris Base	99,5	Sigma
Brometo de Etídeo	98	Sigma
Azul de Bromofenol	-	Sigma
Glicerol	98	Fluka
Agarose	-	Sigma

Tabela 5 – Reagentes utilizados na preparação dos sistemas de duas fases aquosas.

Reagentes	Grau de Pureza (%)	Fornecedor
Reppal PES 100	-	Reppe
PEG 1000	-	Sigma
PEG 3350	-	Sigma
PEG 8000	-	Sigma
Dextrano 10000	-	Amersham Biosciences
Cloreto de Sódio	99	Acros Organics
Sulfato de Sódio	-	Fisher Scientific
Citrato de Sódio	99	M & B
Cloreto de Amónio	99,8	Pronalab

Tabela 6 – Reagentes utilizados na Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência.

Reagentes	Grau de Pureza (%)	Fornecedor
Sulfato de Amônio	99,5	Merck
Tris Base	99,5	Sigma
Ácido Clorídrico	98	Merck

Tabela 7 – Reagentes utilizados nas tentativas de síntese do PEG-Berenil.

Reagentes	Grau de Pureza (%)	Fornecedor
Clorofórmio	99,2	Absolve
Cloreto de Cálcio	-	José Vaz Pereira
PEG 2000	-	Aldrich
Diisocianato de hexametileno	99	Acros Organics
Berenil	90	Sigma
Éter dietílico	100	VWR
Clorofórmio Deuterado	99,80	Euriso-Top
Tolueno	99,95	José Vaz Pereira
BF ₃ .OEt ₂	48	Acros Organics
Epiclorohidrina	98	Acros Organics
Hidróxido de sódio	98,56	Fischer Scientific
Carbonato de Sódio Anidro	99,5	Pronalab
Sulfato de Magnésio Anidro	97	Pancreac
TFA	99	Acros Organics
D ₂ O	-	Merck
Hidrogenofosfato de Sódio	99	Merck
Dihidrogenofosfato de Sódio	99	Merck

Tabela 8 – Outros reagentes.

Reagentes	Grau de Pureza (%)	Fornecedor
Reagente de Coomassie	-	BioRad
Albumina Sérica Bovina	96	Sigma
Cloreto de Magnésio	99	Acros Organics
Cloreto de Cálcio	96	Acros Organics
Ácido Dinitrosalicílico (DNS)	99	Pancreac
Tartarato de Sódio e Potássio	99	Absolve

3.2. Equipamento

Para além do material de uso corrente no laboratório, foram usados vários outros equipamentos na elaboração deste trabalho experimental.

Tabela 9 – Material e Equipamento utilizado no trabalho experimental.

Material/Equipamento	Características
Centrífuga	Hermle, modelo Z36HK
Incubadora Orbital	Infors AG, modelo Minitron
Refractómetro	Bellingham + Stanley Limited
Autoclave	Uniclave 88
Polarímetro	Optical Activity Ltd
Espectrofotómetro	Jasco, modelo 7850
Espectrofotómetro UV-Vísivel	Varian, modelo 50 MPR, com software Microplate Reader

Fluorímetro		Biotek, modelo Synergy™ Multi-Detection Microplate Reader
Sistema de HPLC	HPLC	Waters 600E, da Millipore
	Detector Espectrofotométrico	UV SPD-6A, da Shimadzu
	Registador	Chromatopac C-R6A, da Shimadzu
	Coluna de HPLC	Source™ 15PHE/100PE da GE Healthcare
Sistema de Electroforese	Unidade horizontal	Amersham Biosciences
	Fonte de Alimentação	Amersham Pharmacia Biotech
	Sistema de Imagem	Gel Doc™ XR 170-8170 da BioRad, com câmara acoplada
	Software	Quantity One 4.6
Ultrasonic Cleaner		Fungilab

3.3. Métodos

3.3.1. Construção do Banco de Células e Cultura de Bactéria

A bactéria *Escherichia coli* DH5 α , conservada em tubos criogénicos a -80°C, foi inoculada (500 μ L) em 25 mL de meio LB com 30 μ g/mL de kanamicina, num erlenmeyer de 100 mL. A cultura da bactéria foi efectuada numa incubadora orbital a 37°C e agitação de 220 rpm, durante 14 horas. No final, leu-se a densidade óptica a 600 (DO₆₀₀) e retirou-se cultura de células suficiente para inocular 250 mL de meio LB, em

erlenmeyers de 1000 mL, para que a densidade óptica (DO) final fosse de aproximadamente 0,3, calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$DO_{\text{pré-fermentação}} \times V_{\text{pré-fermentação}} = (V_{\text{pré-fermentação}} + V_{\text{fermentação}}) \times DO_{\text{fermentação}}$$

A cultura em erlenmeyer foi novamente efectuada numa incubadora orbital a 37°C e agitação de 220 rpm. Foram retiradas amostras da cultura de células de hora a hora e foi construído um gráfico de crescimento celular. Quando as células se encontravam na fase exponencial de crescimento, parou-se o crescimento celular e o meio celular foi distribuído por tubos criogénicos (1 mL de meio juntamente com 1 mL de glicerol), sendo posteriormente conservados a -80°C. Este banco de células é designado por *Working Cell Bank* (WBC). Sempre que foi necessário fazer o crescimento para a produção de lisado ou para a purificação de pDNA, as células foram retiradas de um dos tubos do WBC para inocular os meios de fermentação.

As culturas de bactéria para serem utilizadas posteriormente, foram realizadas da mesma forma que o banco de células: foi feita uma pré-fermentação através de um pré-inóculo à temperatura e agitação já referidas; retirou-se volume de pré-inóculo para que a DO inicial fosse de 0,3 e realizou-se o crescimento das células em erlenmeyers de 1000 mL. Contudo, o crescimento celular foi apenas parado no final da fase exponencial indicado pelo abrandamento do aumento da densidade óptica. As células foram depois recolhidas por centrifugação a 6000 rpm, durante 10 minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento guardado a -20°C para posteriormente se fazer a lise alcalina e a purificação do pDNA.

3.3.2. Lise Alcalina

Para efectuar a lise alcalina das células presentes em 500 mL de meio de fermentação e purificar o plasmídeo, procedeu-se de acordo com as instruções do kit *Plasmid Mega* da Qiagen, descritas de seguida.

O sedimento das células obtidas da fermentação foi ressuspensão em 50 mL de uma solução tampão P1, agitando para facilitar a ressuspensão das células. Após a obtenção de uma solução homogénea, procedeu-se à lise alcalina das células, adicionando-se lentamente às paredes do frasco 50 mL de solução tampão P2. Agitou-se

lentamente, 4-6 vezes por inversão do frasco e deixou-se repousar 5 minutos à temperatura ambiente.

Em seguida, adicionou-se às paredes do frasco 50 mL de solução tampão P3, previamente arrefecido a 4°C, para neutralizar a solução e precipitar o DNA genómico (gDNA). Agitou-se lentamente 4-6 vezes por inversão do tubo e colocou-se o frasco a repousar no gelo durante 30 minutos, de forma a acelerar a precipitação.

O lisado obtido foi clarificado por centrifugação durante 30 minutos, a 20000 × g e à temperatura de 4°C, com o objectivo de se obter uma solução homogénea e límpida. O sobrenadante resultante foi transferido para um frasco de centrífuga de 250 mL e foi novamente centrifugado a 20000 × g, durante 15 minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante obtido foi aplicado nas colunas de purificação da Qiagen, para obtenção de plasmídeo puro.

Para se obter o lisado que posteriormente iria ser utilizado para os estudos de partição do pDNA e do RNA, começou por se suspender as células resultantes de 250 mL de cultura, com densidade óptica de 3,0, em 12,5 mL de solução 1. De seguida, colocou-se a solução num banho de gelo e adicionaram-se lentamente 12,5 mL de solução 2, com agitação suave durante cerca de 10 minutos. Por fim, neutralizou-se a solução com 9,4 mL de solução 3. Centrifugou-se a 15000 × g durante 20 minutos a 4°C. No final, retirou-se o sobrenadante para um tubo de fundo cónico de 50 mL, tendo-se assim obtido o lisado.

3.3.3. Purificação do Plasmídeo

As colunas de purificação foram equilibradas por adição de 35 mL de tampão QBT. Seguidamente, adicionou-se o lisado à coluna de purificação e juntou-se um total de 200 mL de tampão QC. Adicionaram-se 35 mL de tampão QF e recolheu-se o eluato para um tubo de centrífuga de 50 mL inserido em gelo.

Em seguida, adicionaram-se 24,5 mL de isopropanol para que ocorresse a precipitação do DNA e centrifugou-se a 15000 × g, durante 30 minutos, à temperatura de 4°C. Desprezou-se o sobrenadante.

Lavou-se o sedimento com 7 mL de etanol a 70%. De seguida, centrifugou-se novamente a 15000 × g, durante 10 minutos, à temperatura de 4°C. Desprezou-se

novamente o sobrenadante e deixou-se secar ao ar o sedimento, durante 10-20 minutos de modo a remover os vestígios de etanol. Após a volatilização do etanol, o pDNA foi dissolvido em 2 mL de tampão de ressuspensão (Tampão TE pH 8.0).

3.3.4. Determinação da Concentração de DNA Plasmídico

A concentração de pDNA na amostra purificada foi determinada através da absorvância a 260 nm (A_{260}), sabendo que uma unidade de absorvância corresponde a 50 µg/mL de pDNA.

3.3.5. Grau de Pureza do DNA plasmídico

O grau de pureza do pDNA foi determinado através da razão entre a absorvância a 260 nm e a absorvância a 280 nm. Considerou-se que o pDNA tinha um apreciável grau de pureza quando a razão entre as absorvâncias se encontrava entre 1.8 e 2.0.

3.3.6. Electroforese em Gel de Agarose

As amostras de pDNA, resultantes da lise alcalina e da purificação, foram analisadas por electroforese horizontal em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo a 0,5 µg/mL.

Após a preparação do gel e da aplicação de um pente para a formação dos poços, deixou-se polimerizar à temperatura ambiente. Depois de decorrida a polimerização, foi retirado o pente e o gel foi imerso na solução tampão de TAE 1x, que funciona como tampão de corrida.

A uma amostra 10 µL de pDNA diluída no Tampão TE adicionaram-se 2 µL de *loading buffer*, sendo o volume injectado em cada poço de 10 µL. Seguidamente, foram introduzidas as amostras nos poços do gel e procedeu-se à montagem do sistema de electroforese. Deixou-se correr a electroforese a uma diferença de potencial de 60 V, durante 1 hora. Após esse tempo, o gel foi retirado do tampão de migração e analisado num sistema de aquisição de imagem com o programa Quantity One 4.6.

3.3.7. Determinação das Binodais

Para a determinação das curvas binodais pesaram-se para tubos com fundo cônico de 15 mL, vários SDFAs, com diferentes composições de polímeros e registou-se o peso final nos tubos. Após pesagem os tubos, foi adicionada água desionizada até que a mistura se tornou límpida, ou seja, até que se obteve um sistema de apenas uma fase. Os tubos foram novamente pesados e a diferença de água adicionada foi registada. Depois de se saber a quantidade de água adicionada, determinou-se a concentração final dos polímeros após a adição da água. Esta concentração final obtida representa um ponto na curva binodal.

3.3.8. Sistemas de Duas Fases Aquosas

Os SDFAs foram preparados a partir de soluções iniciais de Reppal, PEG (1000, 3350 e 8000) e Dextrano (10000 e 100000). A tabela seguinte mostra as concentrações finais de cada sistema usado.

Tabela 10 – Concentrações Finais dos Polímeros nos SDFAs (% (w/w)).

	PEG 1000	PEG 3350	PEG 8000
Reppal	16% Reppal 14% PEG	12% Reppal 9% PEG	12% Reppal 7% PEG
Dextrano 10	-	13% Dex 10 10% PEG	-
Dextrano 100	-	12,7% Dex 100 6,6% PEG	-

Os sistemas com lisado continham 20% (w/w) de lisado, enquanto nos sistemas com pDNA puro adicionou-se plasmídeo de modo a obter-se uma concentração final de 25 µg/mL.

Os sistemas foram testados com concentrações de cloreto de sódio entre 0 e 2 molal, variando consoante as experiências que estavam a ser realizadas. Nos sistemas com citrato de sódio, sulfato de sódio e cloreto de amónio as concentrações sal variaram entre 0 a 0,5 molal.

Todos os sistemas preparados foram centrifugados a 4500 rpm, durante 15 minutos para acelerar a separação das fases. Ao fim deste tempo, separaram-se as fases superior e inferior com a ajuda de uma micropipeta e de uma agulha de 1 mL, respectivamente.

3.3.9. Determinação da Concentração de PEG 3350 nos Sistemas pelo Índice de Refracção

Para a determinação da concentração de PEG 3350 nos sistemas, através do índice de refração, começou por se preparar uma curva de calibração para o PEG 3350 e outra para o Reppal. Esta é necessária para a determinação da contribuição do Reppal no índice de refração das diferentes fases dos sistemas de forma a calcular a concentração de PEG 3350.

Para a curva de calibração do PEG 3350 prepararam-se soluções de PEG 3350 com concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 % (%/mL). De seguida, leu-se o índice de refração de cada uma no refractómetro. Com os valores obtidos traçou-se um gráfico do índice de refração versus concentração (Anexo 6.2.1.) e retirou-se a equação da recta.

Para a curva de calibração do Reppal prepararam-se soluções de Reppal com concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 % (%/mL). De seguida, leu-se o índice de refração de cada uma no refractómetro e com os valores obtidos, traçou-se um gráfico do índice de refração versus concentração (Anexo 6.2.2.) e retirou-se a equação da recta.

Após a realização das curvas de calibração do PEG e do Reppal escolheu-se um sistema perto da curva binodal. Após pesagem dos respectivos componentes do sistema, centrifugou-se durante 15 minutos, a 4500 rpm, e separaram-se as duas fases do sistema.

De seguida, retirou-se 1 mL da fase superior, colocou-se a fase no aparelho e leram-se os valores de índice de refração. Limpou-se o refractómetro com água destilada e executou-se o mesmo procedimento para a fase inferior.

Substituindo os valores obtidos nas equações das curvas de calibração do PEG 3350 e do Reppal foi possível obter a concentração de PEG 3350 na fase superior e na fase inferior do sistema.

3.3.10. Determinação da Concentração de Reppal nos Sistemas pelo Método do DNS

Para a determinação das melhores condições a utilizar para o cálculo da concentração de Reppal nos SDFAs, construiu-se uma curva de calibração para a glucose. Assim, começou por se preparar 50 mL de solução padrão de glucose com concentração de 2000 µg/mL. Marcaram-se 6 tubos de ensaio e adicionaram-se os seguintes reagentes (em mL):

Tabela 11 – Composição adicionada a cada tubo de ensaio utilizado na realização da curva de calibração para a glucose

TUBO	1	2	3	4	5	6
Solução de Glucose (2000 µg/mL)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Água	3,0	2,8	2,6	2,4	2,2	2,0
DNS	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Aqueceram-se os tubos em banho de água em ebulição, durante 5 minutos. Ao fim deste tempo, retiraram-se para um segundo suporte e introduziram-se numa tina com água fria. Transferiu-se o conteúdo do tubo 1 para uma proveta de 25 mL e lavou-se com duas ou três porções de água destilada; transferiram-se as lavagens para a proveta e perfizeram-se os 25 mL com água. Em seguida, colocou-se a totalidade da solução resultante num copo marcado com o número 1 e procedeu-se do mesmo modo com os restantes tubos. Leu-se a absorvância de todas as soluções, a 540 nm, utilizando a solução 1 como branco, e traçou-se a recta padrão de absorvância em função da concentração de glucose nos tubos iniciais (Anexo 6.2.3.).

Após a obtenção da curva da glucose pelo método do DNS preparou-se uma solução inicial de Reppal de 20 mg/mL. Esta solução foi hidrolisada adicionando a 5 mL da mesma, 1 mL de ácido sulfúrico 1,5 M e aquecendo em banho de água, durante 15 minutos. Arrefeceu-se com água corrente e adicionaram-se 2 mL de NaOH 10% (solução tem de estar neutra). Transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL e perpez-se com água destilada, obtendo-se assim o Reppal hidrolisado 15 minutos.

Antes de se iniciar a determinação da concentração de Reppal nos sistemas, foi necessário realizar uma curva de calibração. Para isso, marcaram-se 6 tubos de ensaio e adicionaram-se as mesmas quantidades presentes na Tabela 11, substituindo a solução de glucose pela solução de Reppal hidrolisado. O procedimento seguinte foi realizado da mesma maneira, descrita no ponto anterior.

Traçou-se uma recta padrão de absorvância, em função da concentração de Reppal nos tubos iniciais. Procedeu-se do mesmo modo para a hidrólise do Reppal durante 30, 45, 60 e 90 minutos.

Assim se determinaram as condições experimentais em que os resultados eram mais semelhantes à curva da glucose (Anexo 6.2.4.) e calculou-se a concentração de Reppal nas fases dos sistemas.

Para a determinação da concentração de Reppal na Fase Superior, ou fase rica em PEG, retirou-se 1 mL de fase e adicionou-se água desionizada de modo a completar 5 mL. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico 1.5 M e colocou-se esta mistura num banho de água em ebulição, durante 1 hora e 30 minutos. De seguida, arrefeceu-se com água corrente e adicionaram-se 2 mL de NaOH 10% (solução final tem de estar neutra). Transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL e perpez-se com água destilada.

Para o cálculo da concentração de Reppal na Fase Inferior, ou fase rica em Reppal, retirou-se 0,1 mL de fase e adicionou-se água desionizada, de modo a completar 5 mL. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico 1.5 M e colocou-se esta mistura num banho de água em ebulição, durante 1 hora e 30 minutos. De seguida, arrefeceu-se com água corrente e adicionaram-se 2 mL de NaOH. Transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL e perpez-se com água destilada.

Marcaram-se 3 tubos de ensaio e adicionaram-se reagentes (quantidades em mL) indicados na Tabela 12:

Tabela 12 – Composição adicionada a cada tubo de ensaio utilizado na determinação da concentração de Reppal nas fases superior e inferior

Tubo	Branco	Fase Superior	Fase Inferior
Amostra	0	1,0	1,0
Água	3,0	2,0	2,0
DNS	1,0	1,0	1,0

De seguida, procedeu-se do modo já descrito anteriormente. Os valores obtidos foram substituídos na equação da curva de calibração do Reppal e, deste modo, obteve-se a concentração de Reppal na fase superior e na fase inferior.

3.3.11. Determinação da Concentração de Reppal nos Sistemas pela Rotação Óptica

Inicialmente, prepararam-se soluções de Reppal com concentrações de 0, 1, 5, 10, 15, 20 % (w/v) para um volume total de 20 mL para construção de uma curva de calibração. De seguida, para a determinação da rotação óptica do Reppal em cada solução, colocou-se 1 mL de cada solução na célula de amostra do polarímetro, esperaram-se 10 minutos pela estabilização da leitura e leu-se o valor obtido. Após a leitura de todas as soluções de Reppal, traçou-se um gráfico da rotação óptica versus concentração (w/v) (Anexo 6.2.5.) e obteve-se a equação da recta.

A preparação de uma curva de calibração para o PEG não foi necessária pois este polímero não apresenta rotação óptica.

Para a determinação da concentração de Reppal nas fases, prepararam-se os sistemas escolhidos, centrifugaram-se os tubos de fundo cónico de 15 mL, durante 15 minutos, a 4500 rpm e retiraram-se as fases superior e inferior para eppendorfs, com a ajuda de uma micropipeta de 1 mL e uma seringa de 1 mL, respectivamente.

Devido à elevada viscosidade do Reppal, realizou-se a diluição das fases inferiores, colocando 0,5 mL de fase mais 0,5 mL de água desionizada. Após realizadas as diluições das fases inferiores, colocou-se 1 mL de fase na célula de amostra do polarímetro e esperou-se 10 minutos até a leitura estabilizar.

Com as curvas de calibração realizadas anteriormente, com os valores obtidos e tendo em conta as diluições realizadas, obteve-se a concentração de Reppal em cada fase do sistema.

3.3.12. Método de Bradford para Determinação da Concentração de Proteína nos Sistemas

Para o método de Bradford começou por se preparar uma solução de Albumina Sérica Bovina (BSA) de 24 µg/mL para depois ser utilizada na preparação dos padrões da curva de calibração para cada sistema com lisado. Sistemas sem lisado foram igualmente preparados para servirem de branco nas curvas de calibração.

Assim, para cada sistema com lisado preparou-se uma curva de calibração que continha sistema branco e concentrações de 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 µg/mL de BSA, que foram preparadas a partir da solução de 24 µg/mL de BSA (Anexo 6.2.13.).

A todas as amostras e brancos adicionaram-se 200 µL de reagente de Coomassie da BioRad. Agitou-se e deixou-se reagir durante 10 minutos. Posteriormente, retiraram-se 300 µL de cada amostra para um poço na microplaca.

As microplacas foram lidas com um espectrofotómetro UV-visível a 595 nm. Os dados obtidos foram exportados para o Microsoft Excel para serem tratados.

3.3.13. Determinação da Concentração de RNA nos Sistemas por Fluorescência

Antes do início das experiências de determinação da concentração de RNA, todo o material que iria entrar em contacto com as amostras foi esterilizado e todo o material que não pôde ser esterilizado, foi limpo com o reagente RNase Away da marca Invitrogen, que degrada RNases e outros contaminantes do DNA. A realização deste procedimento foi extremamente importante, pois o RNA é facilmente degradado pelas RNases que se encontram nas nossas mãos.

Inicialmente preparou-se o tampão TE (tampão de ensaio) que foi usado para a diluição do reagente Quant-iT™ RiboGreen® e para a diluição das amostras de RNA. Assim, preparou-se água livre de nucleases tratando água destilada e desionizada com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC), incubando por várias horas a 37°C, e autoclavando por, pelo menos, 15 minutos para esterilizar a água e eliminar o DEPC. De seguida,

preparou-se uma solução de trabalho de TE 1X, diluindo o tampão concentrado 20 vezes com água livre de nucleases.

De referir que o DEPC é um carcinogénico suspeito e deve ser tratado com cuidado. Os componentes contendo aminas, como o Tris, reagem rapidamente com o DEPC pelo que só devem ser adicionados à água tratada, depois do DEPC ser removido pelo calor. Esta eliminação é também importante para prevenir a carboxietilação das amostras de RNA.

De seguida, preparou-se uma solução de trabalho aquosa de reagente Quant-iT™ RiboGreen® diluindo uma alíquota da solução concentrada stock de DMSO em TE, 200 vezes, dependendo do número de ensaios a serem realizados.

Como o reagente Quant-iT™ RiboGreen® também se liga ao DNA, de seguida eliminou-se o DNA presente nas amostras, podendo isto ser realizado pelo pré-tratamento da amostra com DNase livre de RNase, assegurando que toda a fluorescência da amostra é devida à ligação do reagente ao RNA. Para isso, preparou-se tampão de digestão de DNase 10X. Juntou-se 0,11 volume de tampão de digestão de DNase 10X a cada amostra contendo DNA e, posteriormente, adicionaram-se ~5 unidades de DNase I livre de RNase por µg de DNA estimado na amostra. Incubou-se a amostra a 37°C durante 90 minutos.

No final, diluiu-se a amostra pelo menos 10 vezes em TE, para diminuir os efeitos dos sais do tampão de digestão no procedimento do ensaio de Quant-iT™ RiboGreen® e, por fim, realizou-se o ensaio com este reagente.

Tendo todas as soluções preparadas e o DNA eliminado das amostras, preparou-se uma curva de calibração para o RNA. Para isso, o padrão de RNA ribossomal, providenciado a 100 µg/mL no Kit de ensaios Quant-iT™ RiboGreen® foi diluído 50 vezes em TE para fazer a solução de trabalho de 2 µg/mL. De seguida diluiu-se a solução de 2 µg/mL de RNA em eppendorfs (Tabela 13) e adicionou-se 1,0 mL de solução de trabalho aquosa apropriada de reagente Quant-iT™ RiboGreen®, para depois transferir para microplacas, como mostrado na tabela 13. Misturou-se bem e incubou-se durante 2 a 5 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Desta mistura retiraram-se 290 µL para cada poço da microplaca. De seguida, mediu-se a fluorescência da amostra usando um fluorímetro com leitor de microplacas (excitação ~480 nm, emissão ~520 nm). Estes ensaios foram realizados em triplicado para se obterem resultados mais fiáveis.

Material e Métodos

No final, subtraiu-se o valor da fluorescência do branco a cada uma das amostras e usaram-se os dados para preparar uma curva de calibração da fluorescência versus concentração de RNA (ng/mL). A equação da curva de calibração obtida foi usada para determinar a concentração de RNA nas fases dos sistemas.

Tabela 13 – Diluições efectuadas na preparação da Curva de Calibração do RNA.

Volume de TE (µL)	Volume de solução de RNA 2 µg/mL (µL)	Volume de Reagente Ribogreen diluído 200 vezes (µL)	Concentração Final de RNA no Ensaio do Quant-iT Ribogreen®
0	1000	1000	1000 ng/mL
500	500	1000	500 ng/mL
900	100	1000	100 ng/mL
980	20	1000	20 ng/mL
1000	0	1000	Branco

Para a determinação da concentração de RNA nas amostras, retiraram-se 140 µL da amostra diluída e adicionaram-se 150 µL de reagente Quant-iTTM RiboGreen[®]. Misturou-se bem e incubou-se durante 2 a 5 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Mediu-se a fluorescência das amostras usando os parâmetros que correspondem àqueles usados para realizar a curva de calibração.

No final, subtraiu-se o valor da fluorescência do branco a todas as amostras e determinou-se a concentração de RNA das amostras, através da equação da curva de calibração, determinada anteriormente. Todos os ensaios realizados foram efectuados em triplicado.

3.3.14. Determinação da Concentração de pDNA nos Sistemas por Fluorescência

Para a determinação da concentração de DNA nos sistemas por fluorescência construiu-se uma curva de calibração. Assim, preparou-se uma solução de trabalho obtida por diluição do reagente Quant-iTTM dsDNA Broad-Range Assay Kit BR 1:200 em tampão Quant-iTTM dsDNA BR. De seguida, colocaram-se 200 µL de solução de

trabalho em cada poço da microplaca e adicionaram-se 20 μL de cada solução de plasmídeo para a curva de calibração aos poços e misturou-se bem. A curva de calibração foi realizada utilizando concentrações de plasmídeo de 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Todos estes ensaios foram realizados em triplicado.

A fluorescência foi medida usando um fluorímetro com leitor de microplacas (excitação/emissão máxima de $\sim 510/527$ nm).

Com os valores obtidos preparou-se a curva de calibração da fluorescência versus concentração do plasmídeo ($\mu\text{g/mL}$) (Anexo 6.2.12.) e obteve-se a equação da curva de calibração.

Para a determinação da concentração de DNA nas fases procedeu-se de igual modo. Contudo, neste caso as soluções de plasmídeo foram substituídas pelas amostras das fases e os valores de fluorescência foram usados para a determinação da concentração de pDNA, com a ajuda da equação da curva de calibração obtida anteriormente.

3.3.15. Determinação da Concentração de pDNA nos Sistemas por HPLC

Para a determinação da concentração de pDNA por HPLC, mais especificamente por cromatografia de interacção hidrofóbica (HIC), começou-se novamente pela preparação de uma curva de calibração, efectuando-se várias diluições da solução concentrada de pDNA de modo a obter soluções com concentração de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Todas as diluições foram efectuadas com tampão TE.

De seguida, injectaram-se no HPLC, 20 μL de cada uma das soluções. Os resultados ficaram registados e através da área dos picos foi obtida uma curva de calibração (Anexo 6.2.11.). A equação da curva foi utilizada posteriormente para determinar a concentração de pDNA nas fases dos sistemas.

Determinou-se a concentração de plasmídeo no lisado para se calcular a percentagem de plasmídeo que fica em cada uma das fases. Assim, começou por se realizar uma diluição de 1:2 do lisado. Desta solução diluída, 20 μL foram injectados no HPLC. Com a equação da curva de calibração, anteriormente obtida, e com a área do pico determinou-se a concentração de plasmídeo no lisado.

Para a quantificação de pDNA nas fases dos vários sistemas procedeu-se de igual modo, tendo-se realizado, sempre que necessário, diluições das fases.

3.3.16. Reacção do PEG 2000 activado com o Berenil

3.3.16.1. Activação do PEG 2000

A activação do PEG foi efectuada de acordo com o procedimento descrito na literatura (Petersen *et al.*, 2002).

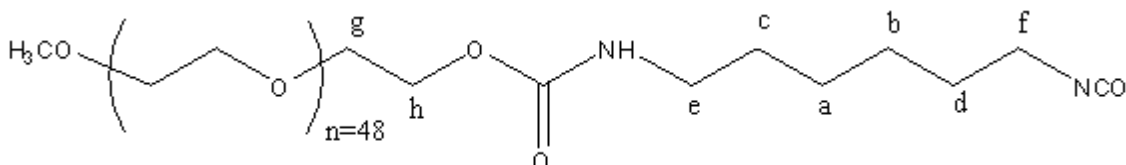


Figura 10 – PEG 2000 activado

A uma solução de PEG 2000 (4 g; $2,0 \times 10^{-3}$ moles) em clorofórmio (10 mL) foi adicionado diisocianato de hexametileno (HMDI) (15 mL; 0,1 moles) em clorofórmio (20 mL). A solução resultante ficou sob agitação, em refluxo, durante 16 horas, sob atmosfera de azoto. Adicionou-se éter dietílico em largo excesso, formando-se um sólido que foi redissolvido em clorofórmio e precipitado novamente pela adição de éter dietílico em largo excesso. Este procedimento de dissolução-precipitação foi repetido mais duas vezes, obtendo-se o produto na forma de um sólido branco (5,100 g), com um rendimento de 78%. O espectro de ¹H-RMN indicou a formação do composto pretendido.

δ_H (300 MHz, CDCl₃) 1.3 (m, 4H, *a* + *c*), 1.49 (m, 4H, *b* + *d*), 3.16 (m, 4H, *e* + *f*), 3.38 (s, 3H, OCH₃), 3.42 (m, 2H, *g*), 3.65 (s, 192 H, OCH₂CH₂O), 3.85 (t, 2H, *h*)

3.3.16.2. Reacção do PEG 2000 activado com o Berenil

A uma solução de berenil (0,250 g; $4,85 \times 10^{-4}$ moles) em clorofórmio purificado (30 mL), foi adicionado PEG activado (1,051 g; $4,85 \times 10^{-4}$ moles). A solução resultante foi agitada à temperatura de 65°C, durante 17 horas, sob atmosfera de azoto. A solução foi arrefecida à temperatura ambiente e o clorofórmio foi parcialmente evaporado até uma redução de 1/3 do volume inicial. A solução resultante foi precipitada por adição

de éter dietílico frio (200 mL), obtendo-se um sólido (1,124 g) que foi filtrado e lavado com éter dietílico. O espectro de ^1H -RMN indicou não ter ocorrido reacção.

3.3.17. Reacção do PEG-Epóxico com o Berenil na presença de Carbonato de Sódio 1M

3.3.17.1. Modificação do PEG 2000

O PEG 2000 começou por ser modificado seguindo o método descrito por Ulbrich *et al.* (1964) e Lin *et al.* (2000).

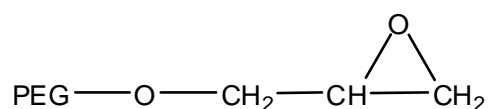


Figura 11 – PEG-Epóxico

A uma solução de PEG 2000 (6 g; 3×10^{-3} moles) em tolueno previamente destilado (30 mL) foi adicionado gota-a-gota trifluoreto de boro (0,380 mL; 3×10^{-3} moles) e epíclorohidrina (0,235 mL; 6×10^{-3} moles). A solução foi deixada sob agitação à temperatura ambiente durante 48 horas. Após este período, foi adicionado gota-a-gota à mistura uma solução de hidróxido de sódio a 40% (0,120 g; 3×10^{-3} moles). A solução resultante ficou sob agitação ligeira, durante 5 horas, ao fim das quais foi decantada e posteriormente precipitada com éter dietílico (30 mL). O sólido obtido foi filtrado, redissolvido em tolueno (20 mL) e precipitado novamente por adição de éter dietílico (30 mL). Este processo de dissolução-precipitação foi repetido mais duas vezes, obtendo-se um sólido branco (0,821 g). O espectro de ^1H -RMN indicou a formação do produto pretendido.

δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) (sinais característicos da formação do epóxico) 2.75 (m, 2H, CH_2O), 3.29 (d, 2H, OCH_2CH), 3.98 (m, 1H, CH)

3.3.17.2. Reacção do PEG-Epóximo com o Berenil

Uma solução de PEG-epóximo (0,050 g; $2,415 \times 10^{-5}$ moles) e de berenil (0,124 g; $2,415 \times 10^{-4}$ moles) em carbonato de sódio 1M (10 mL), foi agitada à temperatura de 65°C durante 24 horas.

Após este período, adicionou-se à solução água destilada (50 mL) e clorofórmio (50 mL) e extraiu-se a fase orgânica. Este processo foi repetido mais três vezes.

As fases orgânicas combinadas foram lavadas com água destilada (50 mL); a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de magnésio anidro e a solução obtida foi filtrada e o clorofórmio foi evaporado, obtendo-se um sólido cor-de-laranja.

A fase aquosa foi decantada e filtrada sob vácuo, obtendo-se um sólido cor-de-laranja (0,246 g).

Os espectros de ^1H -RMN de ambos os sólidos indicaram que não ocorreu reacção.

3.3.18. Reacção do PEG-Epóximo com o Berenil na presença de Tampão Fosfato 10 mM pH 5.56

A uma mistura de PEG-epóximo (0,050 g; $2,415 \times 10^{-5}$ moles) e berenil (0,124 g; $2,415 \times 10^{-4}$ moles) foi adicionado tampão fosfato 10 mM pH 5,56 (10 mL). A solução resultante foi agitada à temperatura de 65°C durante 24 horas.

Após este período, adicionou-se à solução, água destilada (50 mL) e clorofórmio (50 mL). Extraiu-se a fase inferior (ou orgânica); este processo foi repetido mais três vezes.

Os extractos orgânicos combinados foram lavados com água destilada (50 mL) e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de magnésio anidro e filtrada. O clorofórmio foi evaporado, tendo-se obtido um sólido cor-de-laranja (0,027 g).

O espectro de ^1H -RMN indicou apenas a presença dos reagentes de partida.

4. Resultados e Discussão

4.1. Cultura de Células

A primeira etapa deste trabalho consistiu na cultura de células de *Escherichia coli* DH5 α em meio LB. As células contêm o plasmídeo pVax1LacZ que irá ser utilizado como modelo para os estudos subsequentes. Ao longo da cultura foram retiradas amostras e determinada a D.O. a 600 nm para seguir o crescimento celular (Figura 12).

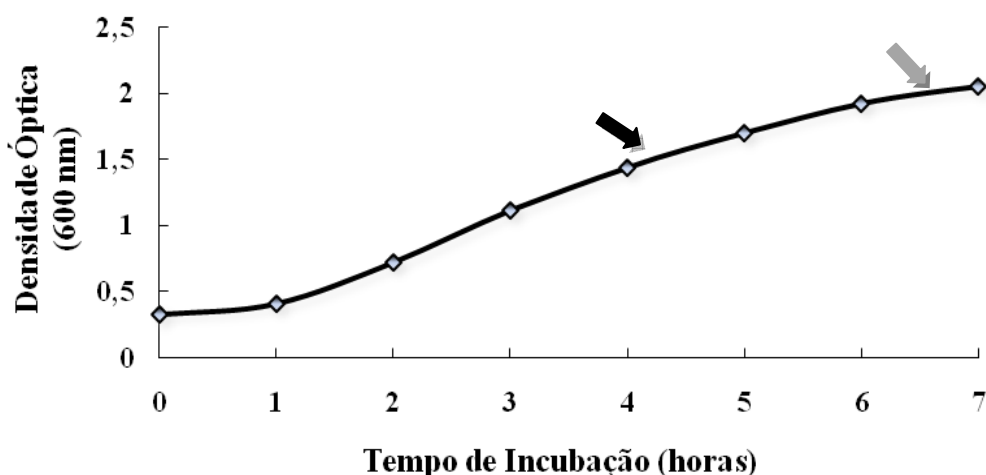


Figura 12 – Curva de crescimento da bactéria *Escherichia coli* DH5 α em meio LB. Legenda: **seta preta** – paragem do crescimento para obtenção das células para o WBC; **seta cinzenta** – paragem do crescimento para recolha das células para obtenção do plasmídeo puro.

Para a preparação do banco de células, a cultura foi interrompida e as amostras recolhidas durante a fase exponencial de crescimento (Figura 12, seta preta). Para obtenção de células posteriormente utilizadas na lise alcalina e purificação do plasmídeo, o crescimento celular foi interrompido no fim da fase exponencial de crescimento e as células recolhidas por centrifugação (Figura 12, seta cinzenta).

4.2. Purificação do DNA plasmídico

A segunda etapa deste trabalho consistiu na obtenção de pDNA puro para utilização como padrão e para estudo da sua partição em SDFAs. Foi utilizado o kit

comercial *Plasmid Mega* da Qiagen[®], tendo-se obtido entre 388-733 µg de pDNA por 500 mL de cultura. Na Figura 13 apresenta-se a análise das amostras obtidas durante um processo de purificação típico.

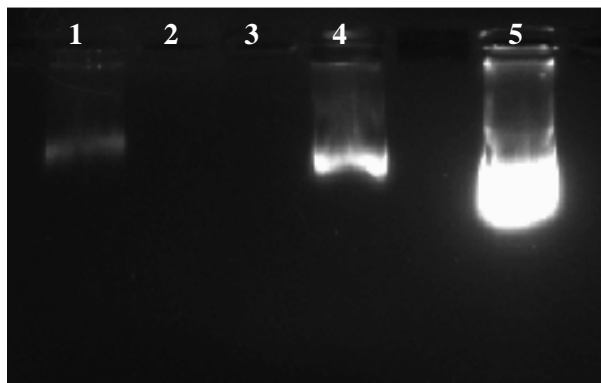


Figura 13 – Electroforese em gel de agarose a 1% das amostras obtidas durante a purificação do pDNA utilizando o kit *Plasmid Mega* da Qiagen. Legenda: Linha 1: após a lise alcalina; Linha 2: após a adição do sobrenadante à coluna; Linha 3: após a adição do Buffer QC à coluna; Linha 4: após a adição do Buffer QF à coluna; Linha 5: plasmídeo puro após todos os passos de purificação terem sido executados.

4.3. Determinação das Curvas Binodais

Para determinação da partição do pDNA em sistemas PEG/Reppal, construíram-se as curvas binodais para cada sistema para podermos seleccionar o sistema adequado para ser utilizado nesses estudos.

4.3.1. Sistemas PEG 1000/Reppal

Inicialmente, determinou-se a curva binodal de um sistema com PEG com peso molecular de 1000 e Reppal. Em seguida, determinou-se a curva binodal deste sistema, mas com cloreto de sódio, para se verificar se a presença deste modificava a linha binodal. Na figura 14 apresentam-se as curvas obtidas.

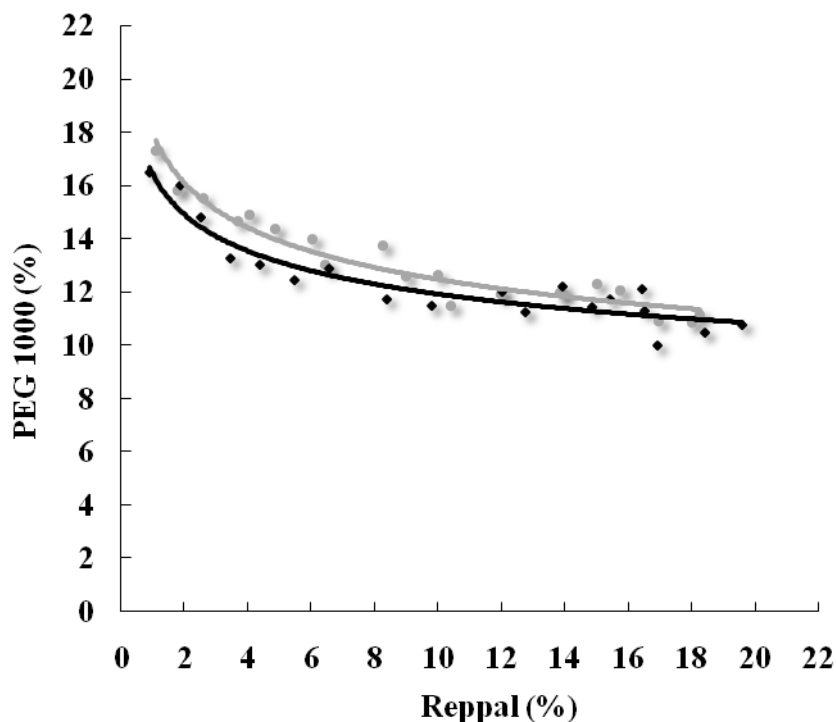


Figura 14 – Curva Binodal PEG 1000/Reppal, sem e com cloreto de sódio. Legenda: — Sistemas com NaCl; — Sistemas sem NaCl.

Como se pode constatar a presença de cloreto de sódio altera a linha binodal de sistemas PEG 1000/Reppal, sendo necessária uma maior quantidade de PEG 1000 para a mesma percentagem de Reppal.

Após a determinação da curva binodal dos sistemas PEG 1000/Reppal, tentou escolher-se um sistema para ser usado posteriormente para a determinação da partição do plasmídeo, em que o volume das duas fases formadas fosse aproximadamente igual. Depois de testados vários sistemas foi escolhido, o sistema 16% Reppal/14% PEG 1000 para estudos futuros.

4.3.2. Sistemas PEG 3350/Reppal

De seguida, determinou-se a curva binodal para sistemas com PEG com um peso molecular maior que 1000. O PEG escolhido foi o de peso molecular de 3350. Para este sistema, determinou-se novamente a curva binodal com e sem cloreto de sódio para verificar a influencia deste neste sistema (Figura 15).

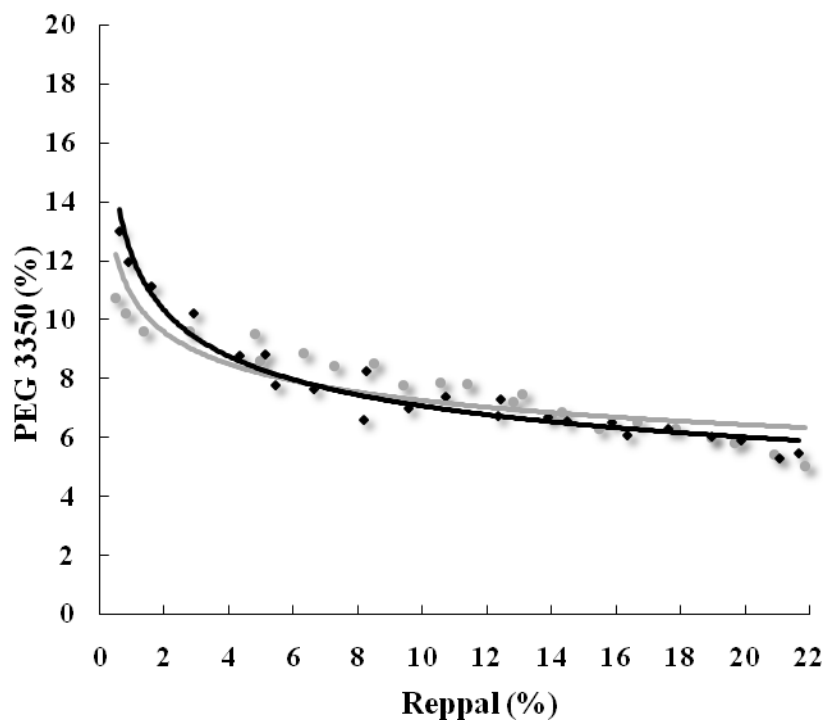


Figura 15 – Curva Binodal PEG 3350/Reppal, sem e com cloreto de sódio. Legenda: — Sistemas com NaCl; — Sistemas sem NaCl.

Neste caso a presença de cloreto de sódio parece não alterar muito a linha binodal de sistemas PEG 3350/Reppal. De referir que a dispersão de pontos observada nestes sistemas deve-se principalmente ao facto de as soluções dos dois polímeros utilizados serem muito viscosas e de, por vezes, ser difícil ver a separação de fases nitidamente.

Como anteriormente após a determinação da curva binodal dos sistemas PEG 3350/Reppal, tentou escolher-se um sistema para ser utilizado nos estudos de partição e purificação. Depois de vários sistemas serem testados, o sistema 12%Reppal/9% PEG 3350.

4.3.3. Sistemas PEG 8000/Reppal

Por fim, determinou-se a curva binodal para sistemas PEG 8000/Reppal na ausência e na presença de cloreto de sódio (Figura 16).

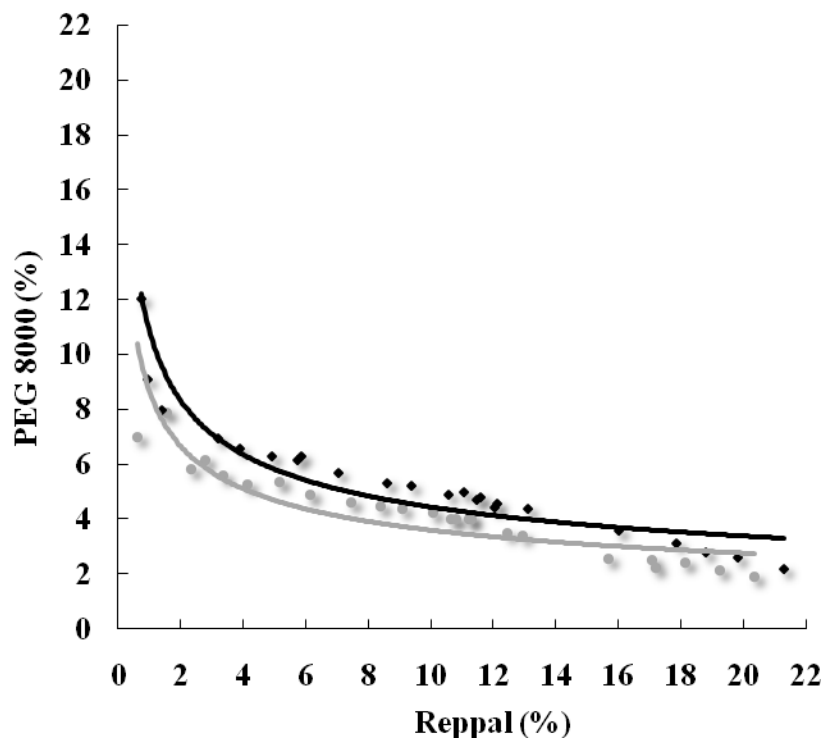


Figura 16 – Curva Binodal PEG 8000/Reppal, sem e com cloreto de sódio. Legenda: — Sistemas com NaCl; — Sistemas sem NaCl.

Neste sistema o cloreto de sódio altera a binodal sendo necessária uma menor quantidade de PEG 8000 para a mesma percentagem de Reppal.

Mais uma vez após a determinação da curva binodal dos sistemas PEG 8000/Reppal, testaram-se vários sistemas tendo sido escolhido o sistema 12%Reppal/7% PEG 8000 para ser usado nos estudos futuros.

4.3.4. Sistemas Dextrano 10000/PEG 3350

Como o Reppal é utilizado frequentemente como substituto do Dextrano, por este apresentar um custo elevado, determinamos igualmente a curva binodal para sistemas Dextrano 10000/PEG 3350 para verificar se os sistemas apresentavam o mesmo comportamento e se a presença de sal influenciava de algum modo a curva binodal (Figura 17).

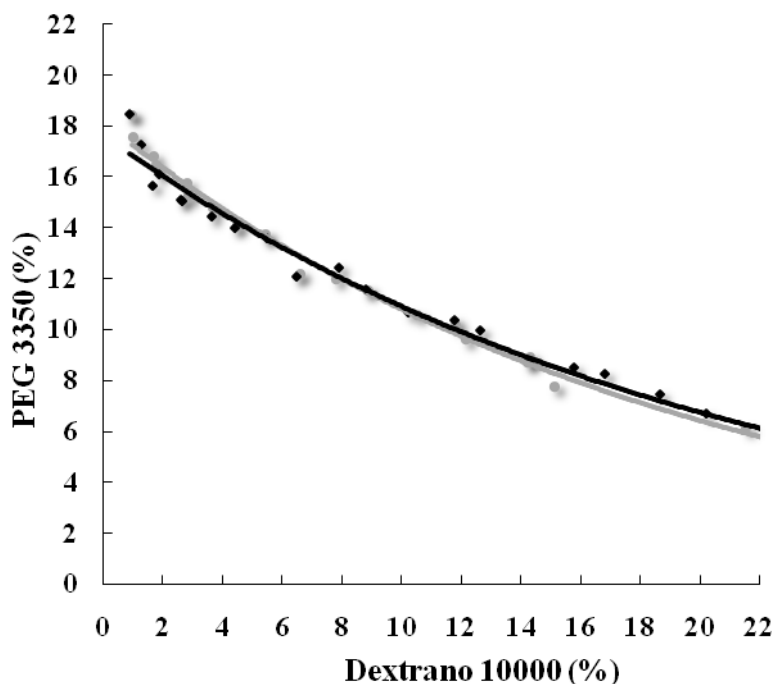


Figura 17 – Curva Binodal PEG 3350/Dextrano 10000, sem e com cloreto de sódio.
Legenda: — Sistemas com NaCl; — Sistemas sem NaCl.

Nesta figura pode constatar-se que as binodais são diferentes das obtidas para os sistemas PEG/Reppal, o que eventualmente poderá originar uma diferente partição do plasmídeo, isto apesar do Reppal e do Dextrano serem similares. Observa-se igualmente que a presença de cloreto de sódio não altera as curvas binodais dos sistemas Dextrano 10000/PEG 3350.

Após a determinação da curva binodal dos sistemas Dextrano/PEG 3350, tentou escolher-se igualmente um sistema para ser usado posteriormente. Depois de vários sistemas ensaios, foi seleccionado o sistema 13%Dextrano/10% PEG 3350 por apresentar uma razão entre as fases aproximadamente igual.

4.4. Determinação das Linhas de Ligação

Após a determinação das curvas binodais, determinaram-se as linhas de ligação dos diferentes sistemas, analisando a composição de cada fase.

As primeiras linhas de ligação a serem determinadas foram as dos sistemas Reppal/PEG 3350, tendo sido determinada a concentração de Reppal pelo método do DNS e a concentração de PEG pelo Índice de Refracção.

Inicialmente preparou-se o sistema 16%Reppal/9%PEG 3350 e determinou-se as concentrações dos polímeros nas fases. Os valores da composição de cada uma das fases definem uma recta que passa próximo do valor da composição total do sistema (Figura 18, - - - - ■). Assim foram determinadas as composições da fase superior e inferior para mais dois sistemas sobre esta recta (sistema 20%Reppal/8%PEG ◆ e sistema 30%Reppal/4% PEG ●). Contudo, ao contrário do que seria de esperar, as rectas definidas pelas novas composições não são sobreponíveis à recta inicial e num dos casos (····· ●) os três pontos não definem uma recta. Além disso, em nenhum dos casos, as composições das fases superiores e inferior coincidem ou se aproximam dos valores anteriormente determinados para a binodal (Figura 18).

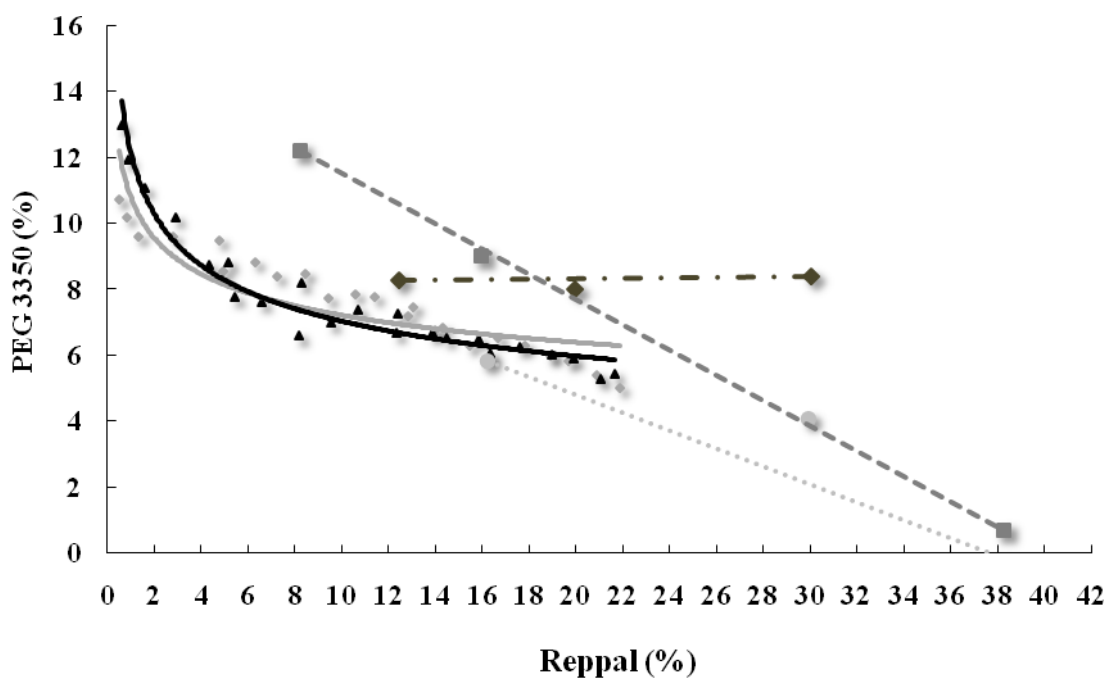


Figura 18 – Gráfico com as linhas de ligação obtidas pelo método do DNS e pelo Índice de Refracção. Legenda: — Sistemas com NaCl; — Sistemas sem NaCl; - - - - ■ Sistema 16% Reppal/9%PEG 3350; - · - · ◆ Sistema 20%Reppal/8% PEG 3350; ····· ● Sistema 30% Reppal/4% PEG 3350.

Em face dos resultados obtidos, concluiu-se que o método de determinação da concentração de Reppal não deverá ser o mais adequado. Assim testou-se outro método para a determinação da concentração de Reppal nas fases dos sistemas, a medição da rotação óptica específica do Reppal (polarimetria).

Foram preparados novos sistemas e a concentração dos polímeros nas fases foram determinados com o novo método. O primeiro sistema a ser preparado foi o 16%Reppal/9%PEG 3350, como no método anterior, tendo os outros sistemas sido escolhidos após se ter obtido a recta conseguida através dos valores da composição de cada uma das fases. Como anteriormente os sistemas escolhidos encontram-se sobre essa recta. Posteriormente uniu-se os valores da concentração de polímeros nas fases superiores e inferiores através de uma linha de tendência e obteve-se o seguinte gráfico (Figura 19).

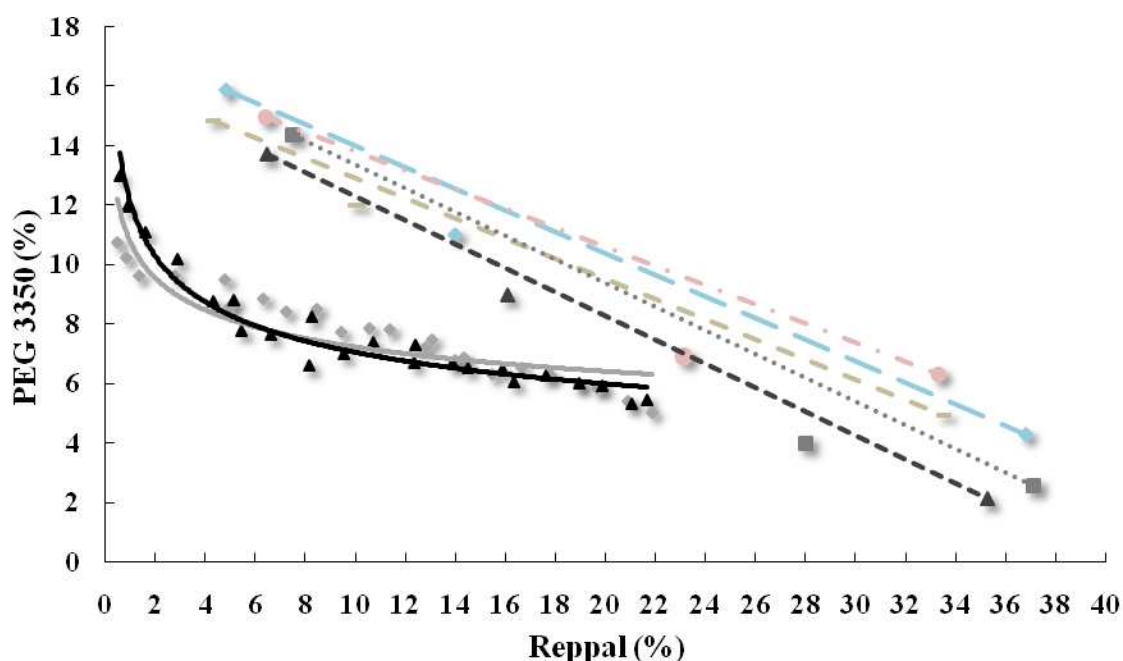


Figura 19 – Gráfico com as linhas de ligação obtidas pela Rotação Óptica e pelo Índice de Refracção. Legenda: — Sistemas com NaCl; — Sistemas sem NaCl; ■ Sistema 28%Reppal/5% PEG 3350; — — ◆ Sistema 14% Reppal/11% PEG 3350; - - - - ▲ Sistema 16%Reppal/9% PEG 3350; - - - - ■ Sistema 10% Reppal/12% PEG 3350; - - - - ● Sistema 23% Reppal/7% PEG 3350.

Embora os resultados sejam mais coerentes utilizando polarimetria para a determinação da concentração de Reppal nas fases, as rectas definidas pelas composições das fases superiores e inferiores dos sistemas estão muito afastadas da composição total do sistema. Apesar de mais próximas, as composições das fases superiores e inferior ainda estão bastante afastadas dos valores anteriormente determinados para a binodal.

Assim, ambos os métodos utilizados não se revelaram fiáveis para a determinação das linhas de ligação.

4.5. Partição do DNA Plasmídico nos Sistemas

De seguida, a partição do pDNA nos sistemas previamente escolhidos foi estudada. Primeiro foram realizadas electroforeses para visualizar onde se encontrava o pDNA e o RNA, e de seguida determinou-se a concentração de DNA e RNA nas diferentes fases dos sistemas por fluorescência e por HIC.

A quantificação do DNA teve como objectivo determinar a concentração de plasmídeo nas fases, de modo a estabelecer a percentagem de plasmídeo que particiona para a fase superior e para a fase inferior, assim como a percentagem de plasmídeo que precipita na interfase do sistema.

Inicialmente foi utilizado um método baseado na fluorescência (Quant-iT™) para a determinação da concentração de plasmídeo nas fases. Prepararam-se as curvas de calibração para os diferentes sistemas estudados, tendo-se preparado para cada sistema uma curva para a fase superior e outra para a fase inferior, constando as respectivas curvas dos Anexos 6.2.6. a 6.2.10.. De seguida prepararam-se os sistemas e o protocolo para a determinação da concentração de plasmídeo por fluorescência foi seguido.

Como os resultados obtidos por fluorescência não davam para calcular a percentagem de plasmídeo que particiona para cada fase, talvez devido à influência dos sais ou até do próprio polímero utilizados nos sistemas, fez-se a determinação da concentração de plasmídeo por HIC.

Após a determinação da concentração de plasmídeo nos sistemas contendo apenas pDNA puro por dois métodos diferentes, determinou-se a concentração de plasmídeo no lisado.

Inicialmente a determinação da concentração de plasmídeo no lisado foi realizada por fluorescência, tendo-se obtido uma concentração de 11,2 µg/mL de plasmídeo no lisado. Como os valores de plasmídeo no lisado eram muito baixos quando comparados com os normalmente obtidos (30-50 µg/mL), tentou-se confirmar

por HIC os resultados obtidos. Assim, por HIC, obteve-se uma concentração de 2,4 $\mu\text{g/mL}$ de plasmídeo no lisado.

Apesar da divergência de valores entre os dois métodos, que pode ser explicada pelo facto de a fluorescência ser uma técnica muito mais sensível que a HIC, a concentração de plasmídeo no lisado é muito baixa. Uma nova cultura de células foi realizada e tendo-se determinado novamente a concentração de plasmídeo presente no lisado posteriormente obtido. Como os valores de plasmídeo continuavam a ser demasiado baixos em todas as experiências com lisado, a partição do plasmídeo foi apenas avaliada por electroforese em gel de agarose, uma vez que nenhum dos outros métodos é suficientemente sensível para quantificar o plasmídeo.

4.5.1. Sistema 13%Dextrano 10000/10%PEG 3350 com Concentrações de Cloreto de Sódio entre 0 e 1,5 molal

Prepararam-se sistemas 13%Dextrano 10000/10% PEG 3350 com várias concentrações de cloreto de sódio, tendo-se obtido os géis de agarose presentes na Figura 20.

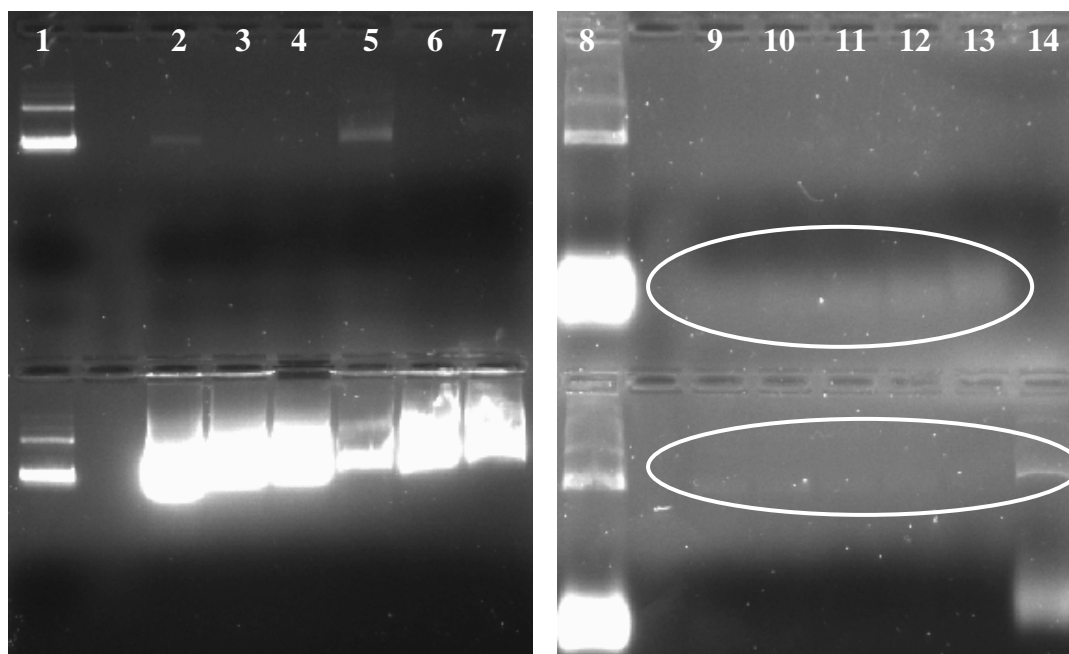


Figura 20 – Electroforese em gel de agarose a 1% das amostras dos sistemas 13% Dextrano 10000/10% PEG 3350 com várias concentrações de cloreto de sódio. Legenda: Linhas 2-7: Experiências com pDNA puro; Linhas 9-14: Experiências com lisado; Linha 1: DNA plasmídico; Linha 2 e 9: 0 molal; Linha 3 e 10: 0.1 molal; Linha 4

e 11: 0.25 molal; Linha 5 e 12: 0.5 molal; Linha 6 e 13: 1.0 molal; Linha 7 e 14: 1.5 molal; Linha 8: Lisado. Nos ensaios com SDFa, as corridas da parte superior do gel correspondem à fase superior e as da parte inferior à fase inferior.

Nos sistemas com apenas pDNA, linhas 2 a 7, o pDNA encontra-se sempre na fase inferior dos sistemas, independentemente da concentração de cloreto de sódio presente.

Nos sistemas com lisado, linhas 9 a 14, o pDNA aparece na fase inferior em todos os sistemas numa pequena percentagem, tornando-se visível a uma concentração de 1,5 molal de cloreto de sódio. O RNA encontra-se na fase superior destes sistemas até 1,0 molal de NaCl, aparecendo na fase inferior a uma concentração de 1,5 molal de cloreto de sódio.

De seguida determinou-se por fluorescência a concentração de plasmídeo nas fases dos sistemas com pDNA puro, tendo-se obtido os valores presentes na tabela 14 e a figura 21, para mais fácil compreensão do comportamento do plasmídeo no sistema.

Tabela 14 – Concentrações de plasmídeo obtidas por fluorescência para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Dex10 com cloreto de sódio.

Concentração de Sal	Fase Superior	Fase Inferior
0	0,171	4,166
0,1	0,177	2,253
0,25	0,099	2,487
0,5	0,107	-1,279
1	0,099	1,538
1,5	0,082	0,353

Todos os valores obtidos por fluorescência são coerentes com a electroforese realizada, encontrando-se a maior parte do plasmídeo na fase inferior. O valor negativo para 0,5 molal de NaCl da fase inferior deve-se possivelmente a um erro experimental.

Dos valores obtidos pode também concluir-se que existe uma diminuição da concentração de plasmídeo na fase inferior com o aumento da concentração de sal. Contudo esta não se reflecte no aumento da concentração na fase superior. O que leva a pensar que ou o plasmídeo se acumula na interfase ou esta diminuição é um artefacto motivado pela interferência do NaCl na determinação do plasmídeo.

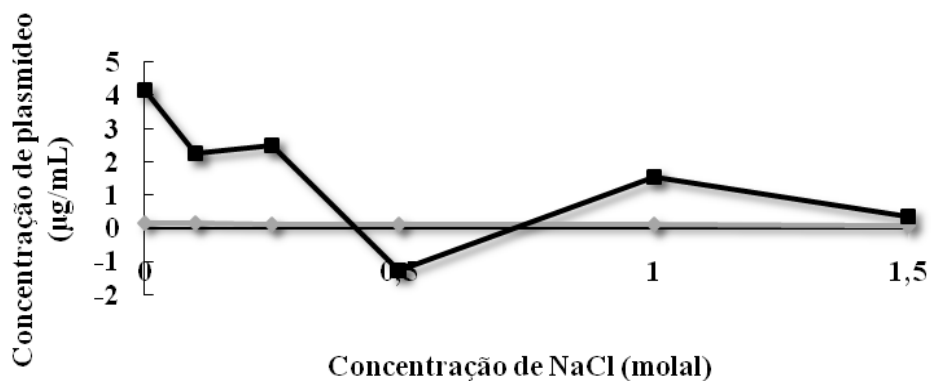


Figura 21 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Dex 10 com diferentes concentrações de cloreto de sódio por fluorescência. Legenda: ◊ Fase superior; ■ Fase inferior.

De seguida determinou-se a concentração de plasmídeo por HIC, encontrando-se na tabela 15 as concentrações de plasmídeo em cada fase dos sistemas PEG 3350/Dextrano 10.

Tabela 15 – Concentrações de plasmídeo obtidas por HIC para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Dextrano 10 com cloreto de sódio.

Concentração de Sal	Fase Superior	Fase Inferior
0	0	68,462
0,1	0,387	65,682
0,25	0	70,219
0,5	0	32,292
1,0	0	59,971
1,5	0	57,412

Para ver mais facilmente o comportamento do plasmídeo nos sistemas obteve-se o gráfico presente na figura 22.

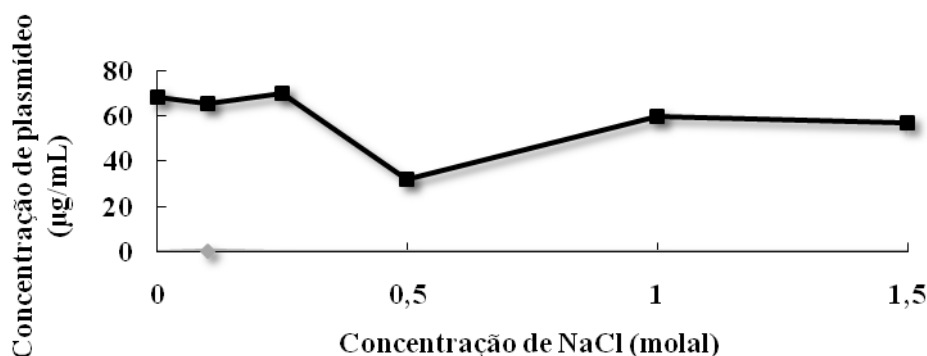


Figura 22 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Dex 10 com diferentes concentrações de cloreto de sódio por HIC. Legenda: —●— Fase superior; —■— Fase inferior.

Os dados obtidos por HIC revelam também como anteriormente uma tendência de diminuição da concentração de plasmídeo na fase inferior com o aumento de concentração de NaCl mas muito menos intensa do que nos dados obtidos por fluorescência. Como anteriormente, esta diminuição não é acompanhada por aumento de concentração na fase superior. Além disso, o valor absoluto da concentração de plasmídeo na fase inferior é muito superior (17 a 161 x) quando determinada por este método

Assim, podemos concluir que o NaCl não influencia a partição do plasmídeo nestes sistemas, sendo as diferenças observadas devidas provavelmente a interferência deste sal com os métodos utilizados.

4.5.2. Sistemas 6,6% PEG 3350/12,7% Dextrano 100000 com Concentrações de Cloreto de Sódio entre 0 e 2 molal

Prepararam-se os sistemas e obteve-se os géis presentes na Figura 23.

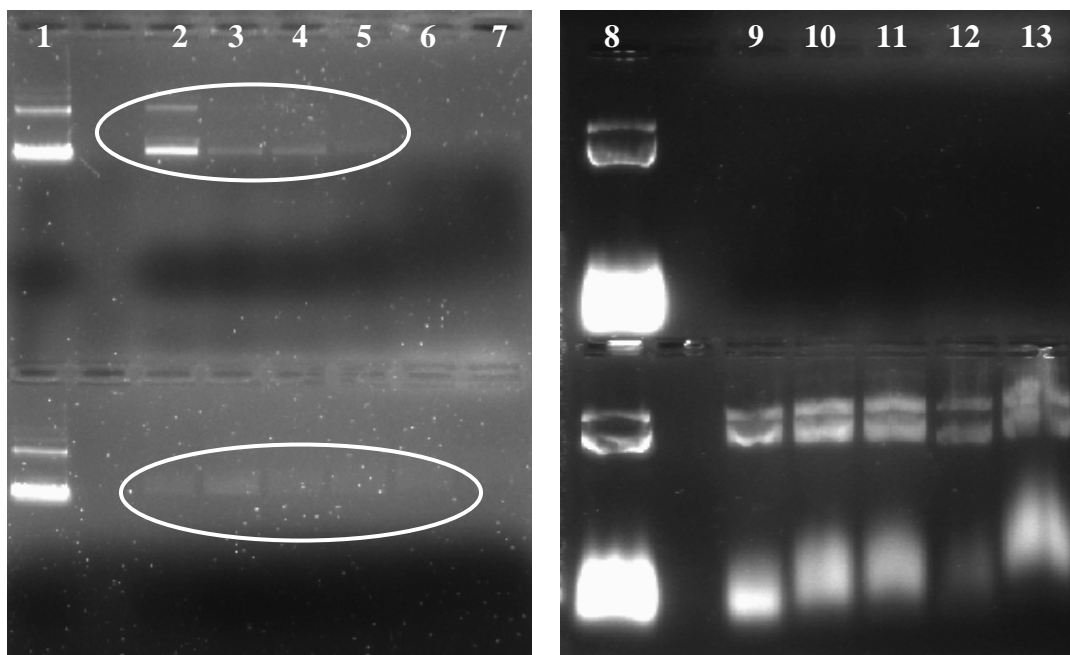


Figura 23 – Electroforese em gel de agarose a 1% das amostras dos sistemas 6,6% PEG 3350/12,7% Dextrano 100000 com várias concentrações de cloreto de sódio. Legenda: Linhas 2-7: Experiências com pDNA puro; Linhas 9-14: Experiências com lisado; Linha 1: DNA plasmídico; Linha 2 e 9: 0 molal; Linha 3 e 10: 0.1 molal; Linha 4 e 11: 0.25 molal; Linha 5 e 12: 0.5 molal; Linha 6 e 13: 1.0 molal; Linha 7: 1.5 molal; Linha 8: Lisado.

Nos sistemas com pDNA, linhas 2 a 7, o pDNA é visível em ambas as fases. Contudo encontra-se em maior concentração na fase superior até concentrações de 0,25 molal de NaCl, sendo visível nas fases inferiores em pequenas quantidades. Para concentrações acima dos 0,5 molal de NaCl, o pDNA não é visível em nenhuma das fases.

Nos sistemas com lisado, linhas 9 a 13, o pDNA e o RNA são ambos visíveis na fase inferior dos sistemas. A adição de NaCl parece não ter qualquer efeito na partição do pDNA e do RNA, parecendo apenas influenciar a migração das amostras durante a electroforese.

Após determinação da concentração do plasmídeo por fluorescência nas fases obteve-se os valores presentes na tabela 16 e a figura 24.

Tabela 16 – Concentrações de plasmídeo obtidas por fluorescência para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Dex100 com cloreto de sódio.

Concentração de Sal	Fase Superior	Fase Inferior
0	28,551	9,598
0,1	-0,086	9,598
0,25	0,172	6,66
0,5	0,172	8,233
1,0	-0,086	8,026
1,5	-0,0143	6,245

Estes resultados estão concordantes com a electroforese obtida anteriormente. Apenas na ausência de NaCl temos maior concentração de plasmídeo na fase superior do que na fase inferior. Mesmo para a mais baixa concentração de NaCl (0,1 molal), o plasmídeo é indetectável na fase superior. Contudo, a sua concentração na fase inferior não aumenta o que, como anteriormente, poderá significar que este se acumula na interfase ou que a presença de NaCl interfere com a sua detecção. A mesma interferência poderá estar a acontecer na fase superior onde alguns dos valores são negativos

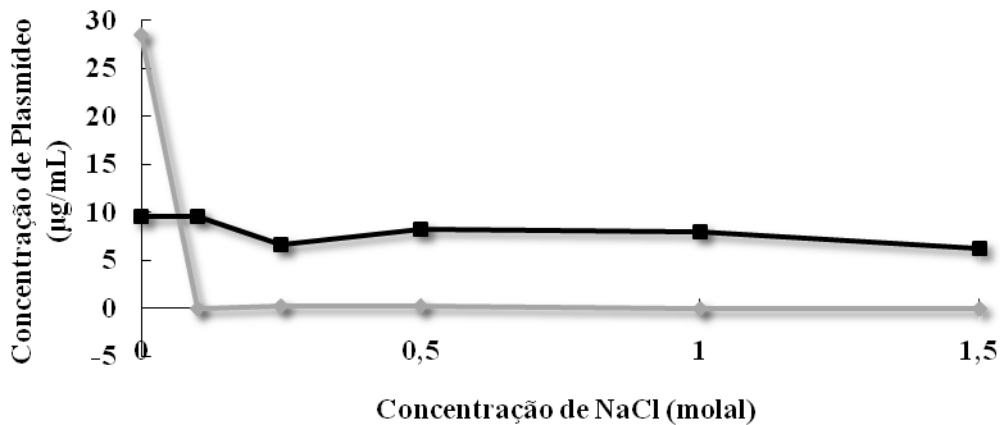


Figura 24 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Dex 100 com diferentes concentrações de cloreto de sódio por fluorescência. Legenda: \blacktriangle Fase superior; \blacksquare Fase inferior.

Na tabela 17 encontram-se as concentrações de plasmídeo em cada fase dos sistemas PEG 3350/Dextrano 100, quando a determinação foi realizada por HIC.

Tabela 17 – Concentrações de plasmídeo obtidas por HIC para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Dextrano 100 com cloreto de sódio.

Concentração de Sal	Fase Superior	Fase Inferior
0	16,59	8,839
0,1	0,056	57,077
0,25	1,204	66,035
0,5	0	83,038
1,0	0	50,37
1,5	0	49,307

Para ver mais facilmente o comportamento do plasmídeo nos sistemas obteve-se o gráfico presente na figura 25.

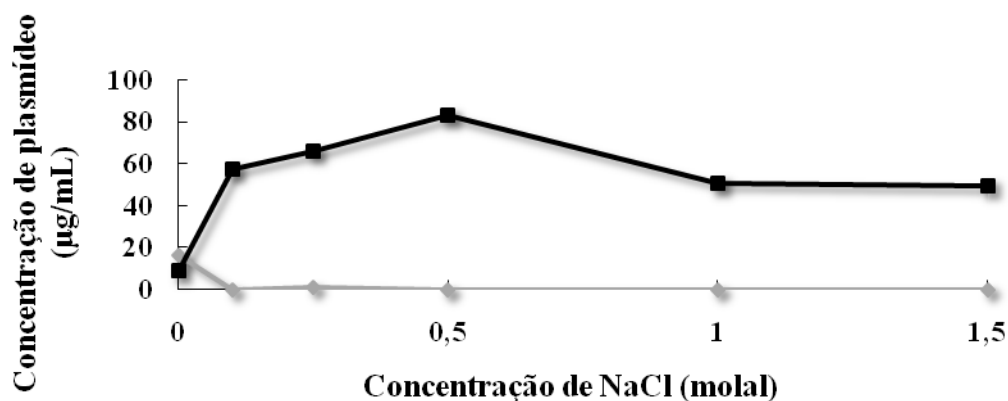


Figura 25 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Dex 100 com diferentes concentrações de cloreto de sódio por HIC. Legenda: Fase superior; Fase inferior.

Os resultados obtidos por HIC estão concordantes com os registados pelos outros métodos. Contudo, a diminuição da concentração de plasmídeo na fase superior com o aumento da concentração de NaCl é acompanhada por um aumento na fase inferior. Assim, podemos concluir que a presença de NaCl direcciona o plasmídeo da fase superior para a inferior. Estes dados são confirmados pelas experiências com lisado, que tem elevada concentração salina em que tanto o pDNA como o RNA se apresentam na fase inferior.

4.5.3. Sistemas 16% Reppal/14% PEG 1000 com Concentrações de Cloreto de Sódio entre 0 e 0,5 molal

Prepararam-se sistemas 16%Reppal/14% PEG 1000 com concentrações de cloreto de sódio entre 0 e 0,5 molal e obteve-se o gel de electroforese presente na Figura 26 após separação das fases.

De referir que o pH da solução de PEG 1000 foi acertado para 8,0 porque as amostras das fases não corriam nas electroforeses com o pH ácido. De referir igualmente que as fases inferiores dos sistemas com lisado foram diluídas, isto porque, após várias electroforeses realizadas, se ter concluído que o pDNA tem uma afinidade tão elevado para o Reppal, que o brometo de etídeo adicionado não se consegue ligar ao pDNA, se conseguindo visualizar onde se encontra o plasmídeo sob a luz UV.

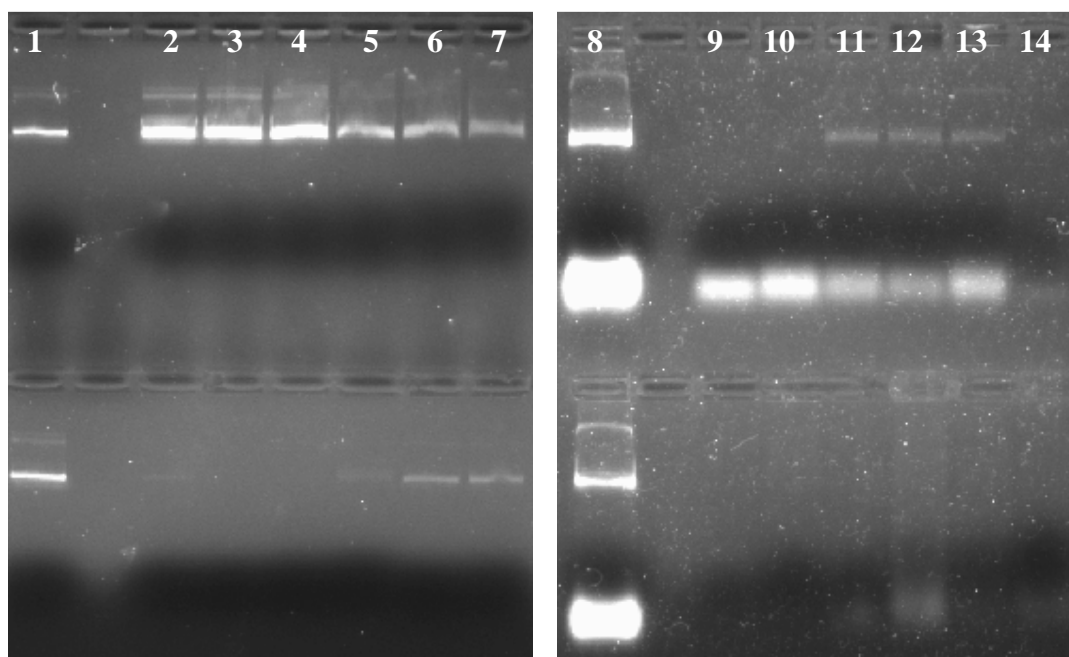


Figura 26 – Electroforese em gel de agarose a 1% das amostras dos sistemas 16%Reppal/14% PEG 1000 com várias concentrações de cloreto de sódio. Legenda: Linhas 2-7: Experiências com pDNA puro; Linhas 9-14: Experiências com lisado; Linha 1: DNA plasmídico puro; Linha 2 e 9: 0 molal; Linha 3 e 10: 0.1 molal; Linha 4 e 11: 0.2 molal; Linha 5 e 12: 0.3 molal; Linha 6 e 13: 0.4 molal; Linha 7 e 14: 0.5 molal; Linha 8: Lisado.

Resultados e Discussão

Nos sistemas com pDNA, linhas 2 a 7, o pDNA é sempre visível na fase superior. Contudo, verifica-se que com o aumento da concentração de NaCl este vai particionando para a fase inferior em pequenas quantidades.

Nos sistemas com lisado, linhas 9 a 14, o plasmídeo é visível na fase superior quando a concentração de NaCl se encontra entre 0,2 e 0,4 molal. Como o pDNA nos restantes sistemas não se encontra em nenhuma das fases, pensa-se que poderá ter precipitado na interfase. Em relação ao RNA, este encontra-se na fase superior em todos os sistemas, parecendo mover-se para a fase inferior com o aumento da concentração de NaCl.

Assim a partição do plasmídeo e do RNA nestes sistemas está dependente da concentração de sal presente. Comparando o comportamento do plasmídeo nos sistemas com pDNA puro e com lisado, conclui-se que os sais presentes nas soluções de lise alcalina influenciam também a partição de plasmídeo.

Posteriormente determinou-se a concentração de plasmídeo por fluorescência e por HIC. Os valores presentes na tabela 18 e na figura 27 são referentes aos resultados obtidos por fluorescência enquanto os presentes na tabela 19 e na figura 28 são referentes aos obtidos por HIC.

Tabela 18 – Concentrações de plasmídeo obtidas por fluorescência para as diferentes fases em sistemas PEG 1000/Reppal com cloreto de sódio.

Concentração de Sal	Fase Superior	Fase Inferior
0	3,094	-1,216
0,1	2,992	-1,261
0,2	0,583	-1,222
0,3	-0,745	-0,509
0,4	-0,085	-0,816
0,5	-0,372	-0,582

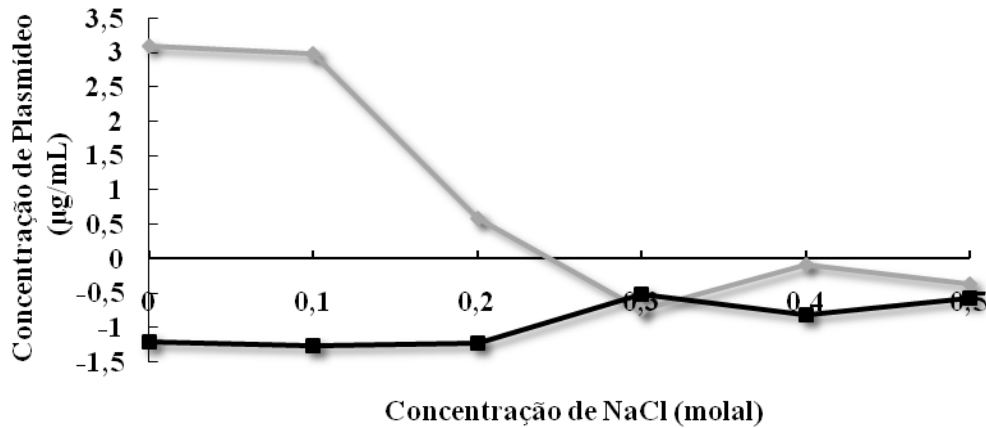


Figura 27 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 1000/Reppal com diferentes concentrações de cloreto de sódio por fluorescência. Legenda: —◆— Fase superior; —■— Fase inferior.

Os valores obtidos por fluorescência são concordantes com os resultados obtidos por electroforese em gel de agarose, visualizando-se uma elevada concentração de pDNA na fase superior dos sistemas entre 0 e 0,2 molal de NaCl. Verifica-se igualmente, na fase inferior, um aumento da concentração de plasmídeo com o aumento da concentração de sal. Como anteriormente, a obtenção de valores negativos para a concentração de plasmídeo nas fases poderá dever-se a uma possível interferência do sal ou a uma possível acumulação do pDNA na interfase dos sistemas.

Tabela 19 – Concentrações de plasmídeo obtidas por HIC para as diferentes fases em sistemas PEG 1000/Reppal com cloreto de sódio.

Concentração de Sal	Fase Superior	Fase Inferior
0	40,591	0
0,1	35,282	0
0,2	20,075	0,428
0,3	9,939	17,736
0,4	14,202	10,986
0,5	12,197	15,026

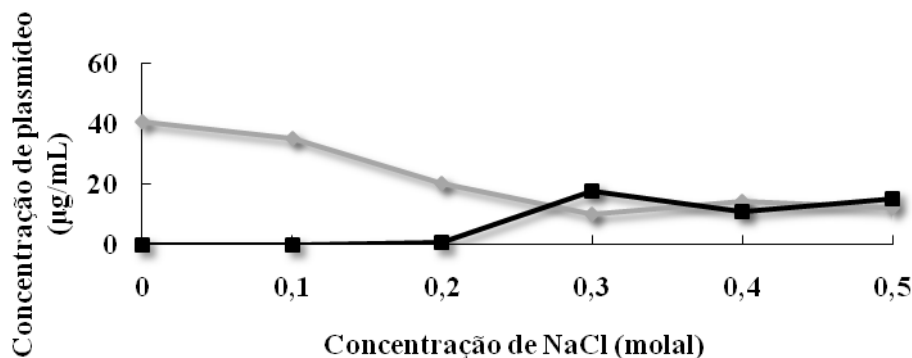


Figura 28 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 1000/Reppal com diferentes concentrações de cloreto de sódio por HIC. Legenda: —●— Fase superior; —■— Fase inferior.

Os resultados obtidos por HIC são concordantes com os resultados previamente obtidos por electroforese e fluorescência. Verifica-se novamente a influência da concentração do sal presente nos sistemas, direccionando o plasmídeo da fase superior para a fase inferior à medida que a concentração de sal aumenta. Podemos concluir também que ocorre, como nos sistemas com Dextrano, uma interferência do sal no método por fluorescência, visto que por HIC foi possível obter valores positivos e muito superiores àqueles obtidos pelo outro método.

4.5.4. Sistema 12%Reppal/9%PEG 3350 com Concentrações de Cloreto de Sódio entre 0 e 0,5 molal

Prepararam-se sistemas com 12%Reppal/9% PEG 3350 e adicionou-se a estes 0, 0,1, 0,25 e 0,5 molal de cloreto de sódio. Centrifugou-se os sistemas e separaram-se as fases. De seguida realizou-se uma electroforese e obteve-se os resultados presentes na Figura 29.

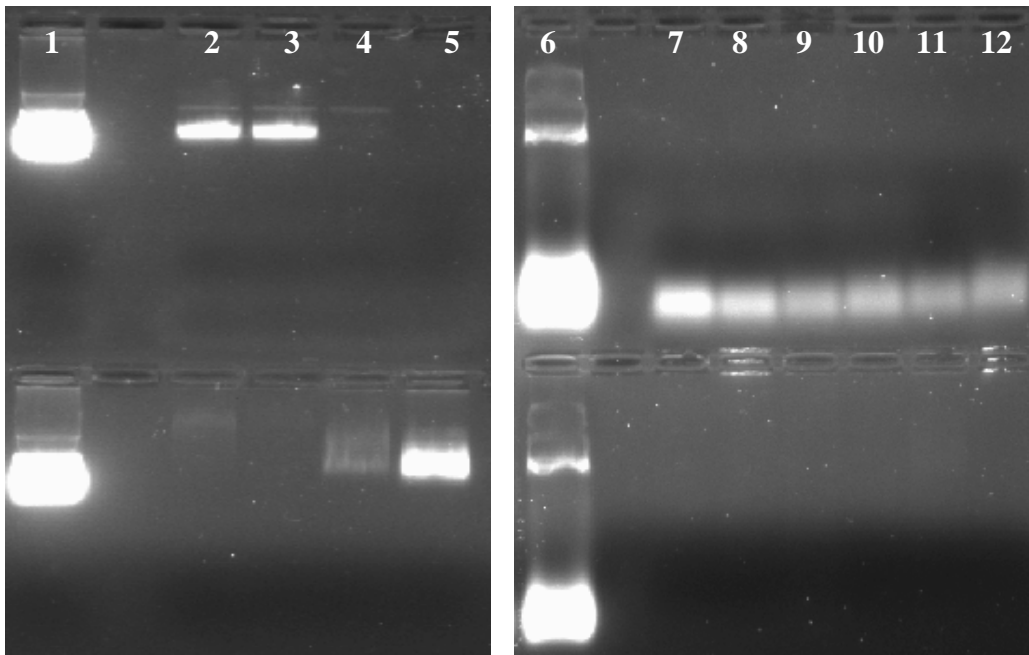


Figura 29 – Electroforese em gel de agarose a 1% dos sistemas 12% Reppal/9% PEG 3350 com várias concentrações de cloreto de sódio. Legenda: Linhas 2-7: Experiências com pDNA puro; Linhas 9-14: Experiências com lisado; Linha 1: DNA plasmídico; Linha 2 e 7: 0 molal; Linha 3 e 8: 0.1 molal; Linha 4: 0.25 molal; Linha 5 e 12: 0.5 molal; Linha 6: lisado; Linha 9: 0.2 molal; Linha 10: 0.3 molal; Linha 11; 0.4 molal.

Nos sistemas com pDNA, linhas 2 a 5, para concentrações de NaCl entre 0 e 0,1 molal o pDNA particiona para a fase superior dos sistemas. Aumentando a concentração do sal para concentrações superior a 0,25 molal, o pDNA particiona para a fase inferior dos sistemas. Para uma concentração de 0,25 molal de NaCl, o pDNA precipita quase na sua totalidade na interfase, aparecendo na fase inferior do sistema em pequena quantidade.

Nos sistemas com lisado, linhas 7 a 12, o pDNA não é visível em nenhuma das fases. Isto poderia acontecer por duas razões: o pDNA precipitar na interfase dos sistemas ou encontrar-se na fase inferior, sendo neste caso necessário realizar uma diluição da fase. Contudo, só com a determinação da concentração de plasmídeo é que seria possível confirmar estes resultados, o que não foi possível fazer. Em relação ao RNA, este particiona maioritariamente para a fase superior, sendo possível concluir igualmente que ocorre precipitação deste na interfase.

Após a realização das electroforeses, a determinação da concentração do plasmídeo foi feita. Na tabela 20 encontram-se os valores obtidos por fluorescência.

Resultados e Discussão

Como aconteceu para os sistemas PEG 1000/Reppal e para os sistemas com Dex anteriormente, os valores negativos obtidos parecem ser uma influência do sal no método de fluorescência utilizado.

Tabela 20 – Concentrações de plasmídeo obtidas por fluorescência para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Reppal com cloreto de sódio.

Concentração de Sal	Fase Superior	Fase Inferior
0	0,785	-1,775
0,1	-1,576	-0,315
0,2	-1,593	1,295
0,3	-1,611	-1,42
0,4	-1,635	-1,012
0,5	-1,612	-1,372

Construiu-se um gráfico para ver qual o comportamento do plasmídeo com o aumento da concentração de sal, tendo sido obtida a figura 30.

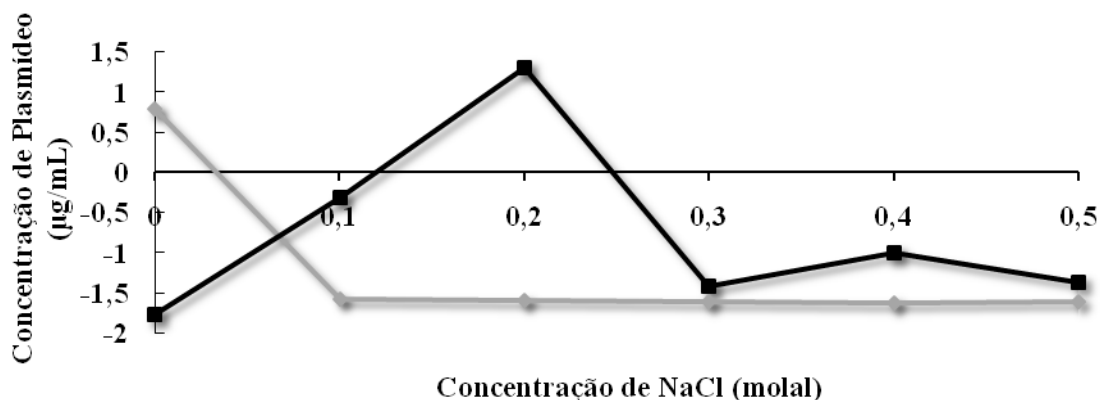


Figura 30 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Reppal com diferentes concentrações de cloreto de sódio por fluorescência. Legenda: —◆— Fase superior; —■— Fase inferior.

Comparando os valores de fluorescência com a electroforese realizada, estes resultados não são totalmente concordantes, verificando-se a presença de pDNA na fase superior para uma concentração de NaCl de 0,1 molal nas electroforeses enquanto por fluorescência este encontra-se na fase inferior. Apesar desta divergência nos resultados, que poderá ser resultado da interferência do sal, os restantes resultados são

concordantes, verificando-se a movimentação do pDNA da fase superior para a inferior com o aumento da concentração de sal.

Na tabela 21 encontram-se as concentrações de plasmídeo em cada fase dos sistemas PEG 3350/Reppal com cloreto de sódio por HIC enquanto na figura 31 encontra-se o gráfico para melhor visualizar-se o comportamento do plasmídeo nos sistemas.

Tabela 21 – Concentrações de plasmídeo obtidas por HIC para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Reppal com cloreto de sódio.

Concentração de Sal	Fase Superior	Fase Inferior
0	23,573	0,56
0,1	0,157	33,825
0,2	3,213	32,584
0,3	0	2,138
0,4	0	17,43
0,5	1,712	17,085

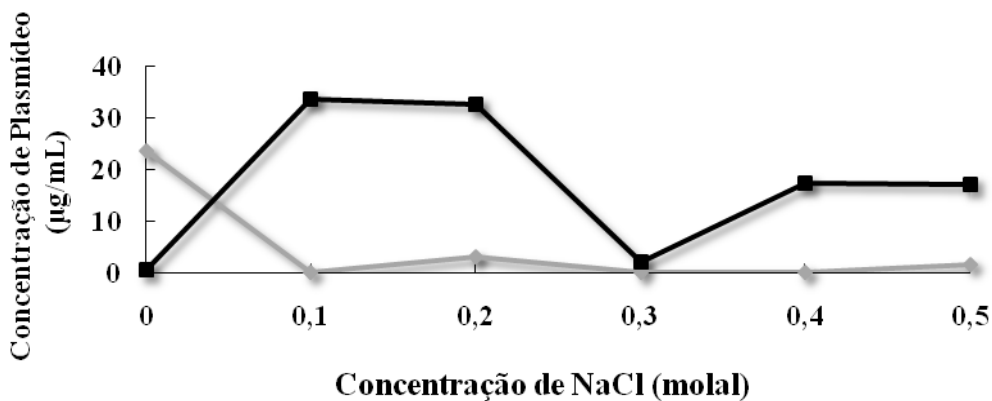


Figura 31 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Reppal com diferentes concentrações de cloreto de sódio por HIC. Legenda: —◆— Fase superior; —■— Fase inferior.

Os resultados obtidos por HIC são concordantes com os obtidos por fluorescência, continuam a existir a discrepância para o sistema com 0,1 molal de NaCl, não sendo portanto este resultado uma influência do sal no sistema. Tal como nos outros métodos verifica-se a influência do sal nestes sistemas, fazendo com que o pDNA

particiona da fase superior para a fase inferior nos sistemas com pDNA e fazendo com que o pDNA precipite na interfase para sistemas com lisado.

Comparando-se o sistema PEG 3350/Reppal com os sistemas Dex/PEG 3350, verifica-se uma alteração na partição do pDNA e do RNA nos sistemas, obtendo-se nos sistemas com Reppal uma partição do pDNA e do RNA para fases diferentes dos sistemas, não acontecendo o mesmo em sistemas com Dex (pDNA e RNA encontram-se na mesma fase). Assim a substituição do Dex por Reppal influencia o modo como o pDNA se comporta dentro do sistema.

4.5.5. Sistemas 12% Reppal/7% PEG 8000 com Concentração de Cloreto de Sódio entre 0 e 1 molal

Após a preparação de sistemas 12%Reppal/7%PEG 8000, obteve-se a electroforese em gel de agarose presente na Figura 32.

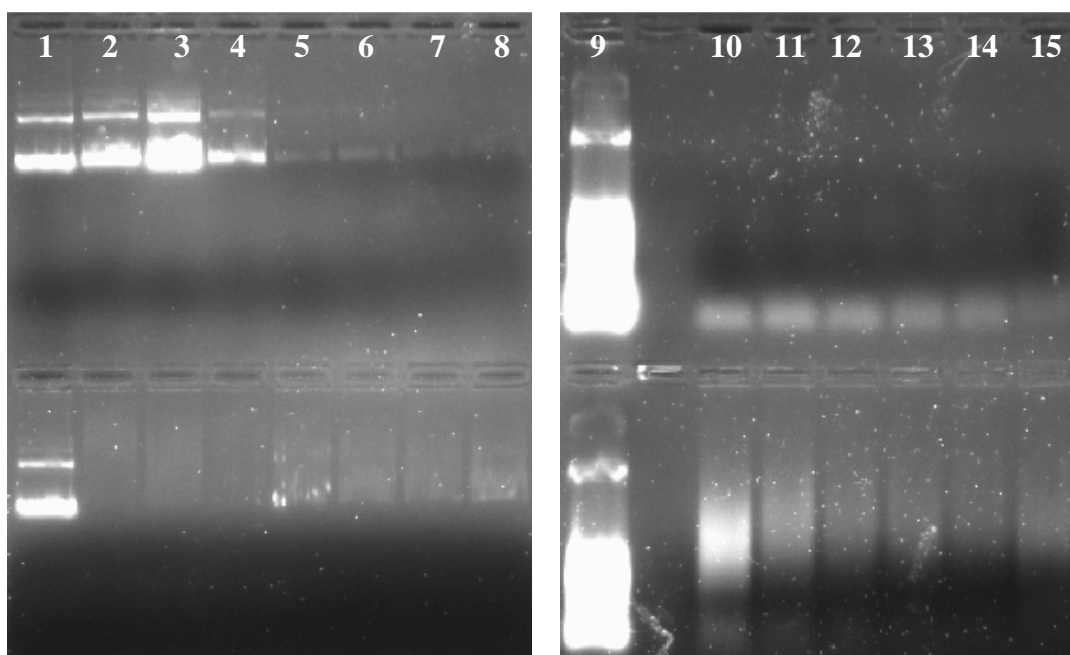


Figura 32 – Electroforese em gel de agarose a 1% com as amostras dos sistemas 12%Reppal/7% PEG 8000 com várias concentrações de cloreto de sódio. Legenda: Linhas 2-7: Experiências com pDNA puro; Linhas 9-14: Experiências com lisado; Linha 1: DNA plasmídico; Linha 2: 0 molal; Linha 3: 0.1 molal; Linha 4: 0.2 molal; Linha 5: 0.4 molal; Linha 6: 0.6 molal; Linha 7: 0.8 molal; Linha 8: 1.0 molal; Linha 9: lisado; Linha 10: 0 molal; Linha 11: 0.1 molal; Linha 12: 0.2 molal; Linha 13: 0.3 molal; Linha 14: 0.4 molal; Linha 15: 0.5 molal.

Nos sistemas com pDNA, linhas 2 a 8, o pDNA particiona para a fase superior até 0,2 molal de NaCl. Contudo a partir desta concentração particiona para a fase inferior do sistema mas não totalmente, possivelmente precipitando na interfase. Em todas as fases inferiores dos sistemas, o pDNA encontra-se presente em pequena quantidade.

Nos sistemas com lisado, linhas 10 a 15, o RNA fica maioritariamente na fase superior, contudo aparece também na fase inferior dos sistemas e possivelmente também precipita na interfase. O pDNA não aparece em nenhuma das fases, devendo ter precipitado na interfase dos sistemas.

Posteriormente a concentração de plasmídeo em cada fase foi determinada, tendo-se obtido os valores presentes na tabela 22 quando se utilizou o método por fluorescência.

Tabela 22 – Concentrações de plasmídeo obtidas por fluorescência para as diferentes fases em sistemas PEG 8000/Reppal com cloreto de sódio.

Concentração de Sal	Fase Superior	Fase Inferior
0	1,047	-0,722
0,1	-1,457	-0,562
0,2	-1,643	0,444
0,3	-1,657	-0,724
0,4	-1,776	-0,548
0,5	-1,764	-0,503

Construiu-se novamente um gráfico para ver qual o comportamento do plasmídeo com o aumento da concentração de sal, tendo sido obtida a figura 33.

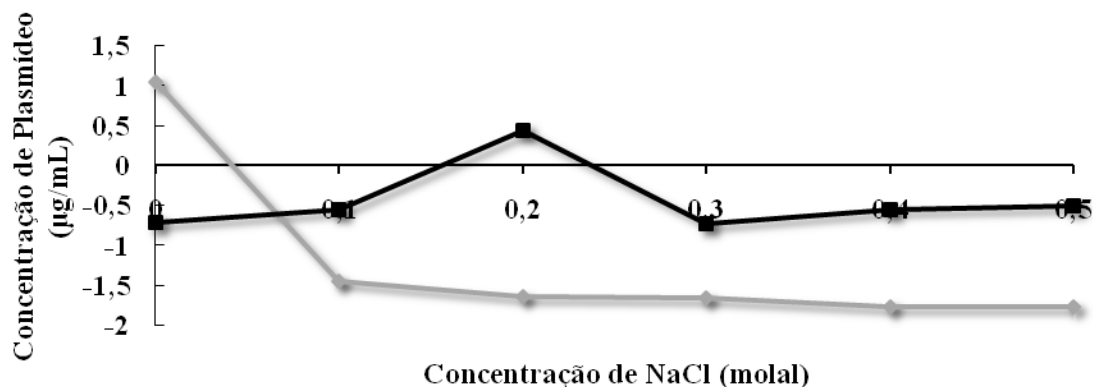


Figura 33 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 8000/Reppal com diferentes concentrações de cloreto de sódio por fluorescência. Legenda: —●— Fase superior; —■— Fase inferior.

Os resultados de fluorescência obtidos não são totalmente concordantes com os resultados obtidos por electroforese. Para as fases inferiores, os métodos são concordantes, verificando-se uma concentração de pDNA quase indetectável. Contudo, nas fases superiores, verifica-se uma divergência de resultados referentes aos dois valores mais baixos de NaCl. Por electroforese verifica-se uma elevada concentração de plasmídeo na fase superior dos sistemas, contudo, por fluorescência, para esses valores de NaCl, uma maior quantidade de pDNA encontra-se na fase inferior dos sistemas. Possivelmente esta divergência deverá dever-se ao sal adicionado aos sistemas. Para uma concentração nula de sal, ambos os métodos são concordantes, encontrando-se o pDNA na fase superior em elevada quantidade.

Determinando a concentração de plasmídeo por HIC obtiveram-se os valores presentes na tabela 23 e o gráfico presente na figura 34.

Tabela 23 – Concentrações de plasmídeo obtidas por HIC para as diferentes fases em sistemas PEG 8000/Reppal com cloreto de sódio.

Concentração de Sal	Fase Superior	Fase Inferior
0	30,136	0,964
0,1	3,658	0,86
0,2	0,923	0,262
0,3	0,0026	2,02
0,4	0	5,075
0,5	0	9,453

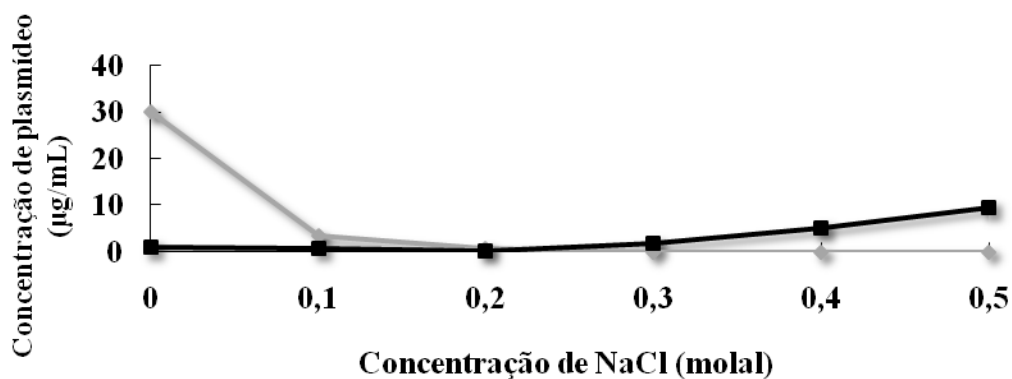


Figura 34 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 8000/Reppal com diferentes concentrações de cloreto de sódio por HIC. Legenda: ◐ Fase superior; ◑ Fase inferior.

Os resultados obtidos por HIC são concordantes com o resultados obtidos por electroforese em gel de agarose, podendo ser concluído que a concentração de sal adicionada influencia os valores obtidos pelo método de fluorescência. Assim verifica-se uma passagem do plasmídeo da fase superior para a fase inferior dos sistemas quando a concentração de sal aumenta, visualizando-se essa passagem entre 0,2 a 0,3 molal de NaCl.

4.5.6. Sistemas 12%Reppal/9%PEG 3350 com Concentrações de Cloreto de Amónio entre 0 e 0,5 molal

Prepararam-se novos sistemas 12%Reppal/9%PEG 3350 mas o cloreto de sódio foi substituído por outro sal, o cloreto de amónio (NH₄Cl), de modo a ver se o efeito era

o mesmo. Estes ensaios foram apenas realizados nos sistemas Reppal/PEG 3350 porque a adição de sal parece ter uma maior influência nestes sistemas.

No final da separação das fases retirou-se a interfase de um dos sistemas com lisado e colocou-se num poço do gel de electroforese (linha 9, Figura 35). Apesar de esta amostra conter partes das fases superior e inferior, foi utilizada para se verificar se de facto o pDNA precipita na interfase dos sistemas.

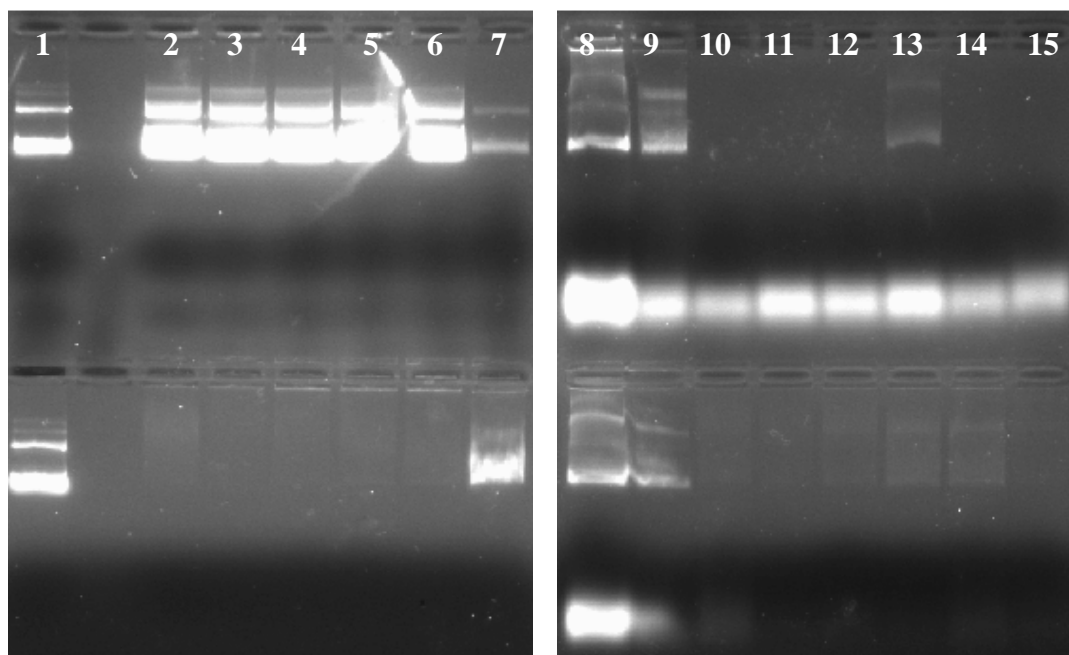


Figura 35 – Electroforese em gel de agarose a 1% com as amostras dos sistemas 12%Reppal/9% PEG 3350 com várias concentrações de cloreto de amónio. Legenda: Linhas 2-7: Experiências com pDNA puro; Linhas 9-14: Experiências com lisado; Linha 1: DNA plasmídico puro; Linha 2 e 10: 0 molal; Linha 3 e 11: 0.1 molal; Linha 4 e 12: 0.2 molal; Linha 5 e 13: 0.3 molal; Linha 6 e 14: 0.4 molal; Linha 7 e 15: 0.5 molal; Linha 8: Lisado; Linha 9: Interfase do sistema com 0 molal de sal e lisado.

Nos sistemas apenas com pDNA, linhas 2 a 7, o plasmídeo é sempre visível na fase superior dos sistemas. Contudo, com a adição de 0,5 molal de cloreto de amónio aos sistemas, parte do plasmídeo é também visível na fase inferior.

Nos sistemas com lisado, linhas 10 a 15, o RNA particiona sempre para a fase superior, contudo não na totalidade devendo precipitar na interfase dos sistemas. Em relação do pDNA, este particiona para a fase inferior em pequenas quantidades tendo a tendência a aumentar a sua concentração na fase inferior à medida que se aumenta a

concentração de sal no sistema. Porém parece precipitar quase na sua totalidade na interfase dos sistemas, como se pode confirmar pela linha 9 da figura 20.

De referir que, quando se separou as fases no sistema com lisado e 0,3 molal de cloreto de amónio, ao retirar-se a fase superior, parte da interfase foi retirada também, aparecendo pDNA na fase superior quando se realizou a electroforese.

Como para os sistemas anteriores, a determinação da concentração de plasmídeo foi inicialmente realizada por fluorescência, tendo-se obtido os valores presentes na tabela 24.

Tabela 24 – Concentrações de plasmídeo obtidas por fluorescência para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Reppal com cloreto de amónio.

Concentração de Sal	Fase Superior	Fase Inferior
0	-1,292	-1,881
0,1	-0,036	-1,929
0,2	-0,146	-1,922
0,3	0,264	-1,909
0,4	0,379	-1,845
0,5	-1,693	-0,37

Um gráfico foi preparado como anteriormente para melhor visualizar o comportamento do plasmídeo nos sistemas, tendo-se sido obtida a figura 36.

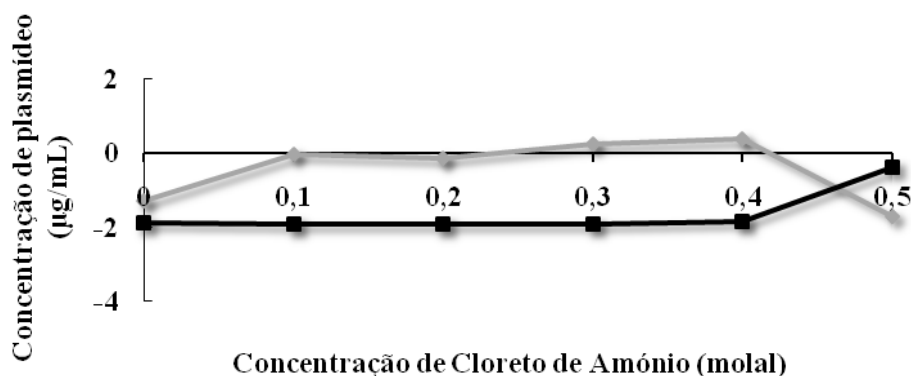


Figura 36 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Reppal com diferentes concentrações de cloreto de amónio por fluorescência. Legenda: —▲— Fase superior; —■— Fase inferior.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos na electroforese e os valores obtidos por fluorescências são concordantes, sendo visível a partição do pDNA da fase superior para a fase inferior quando é adicionada uma concentração de 0,5 molal de cloreto de amónio. Como tem vindo a acontecer em todas as determinações por fluorescência, este sal também parece influenciar os resultados obtidos.

Na tabela 25 encontram-se as concentrações de plasmídeo em cada fase dos sistemas PEG 3350/Reppal com cloreto de amónio após determinação por HIC. Na figura 37 encontra-se um gráfico para ser mais fácil interpretação dos resultados obtidos.

Tabela 25 – Concentrações de plasmídeo obtidas por HIC para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Reppal com cloreto de amónio.

Concentração de Sal	Fase Superior	Fase Inferior
0	29,514	0,148
0,1	27,451	0
0,2	31,8	0,204
0,3	29,642	0
0,4	27,873	0,51
0,5	0	41,819

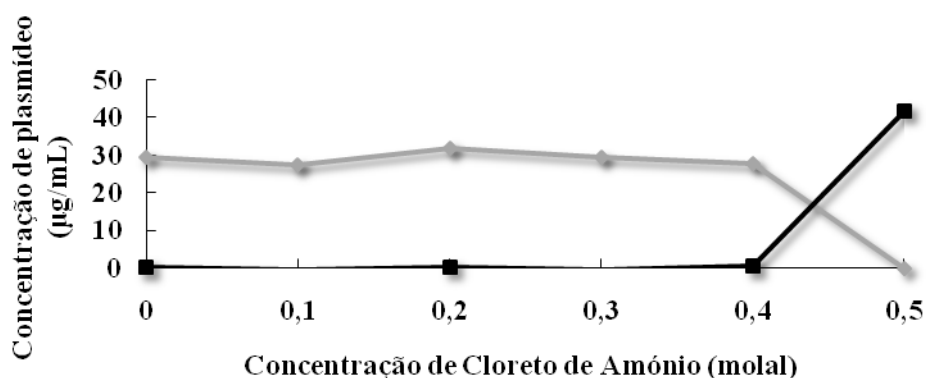


Figura 37 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Reppal com diferentes concentrações de cloreto de amónio por HIC. Legenda: —▲— Fase superior; —■— Fase inferior.

Excluindo os resultados de fluorescência, que não parecem ser fiáveis, os resultados obtidos pelos outros dois métodos são concordantes entre si. A concentração

de pDNA na fase superior mantém-se aproximadamente constante até à concentração de 0,4 molal de sal, enquanto na fase inferior é indetectável. Para a concentração mais elevada de sal (0,5 molal), detecta-se uma inversão, observando-se uma concentração mais elevada de pDNA na fase inferior que na fase superior.

Comparando a influência do cloreto de sódio e do cloreto de amónio nos sistemas, ambos influenciam a partição de pDNA, sendo necessária uma maior concentração de cloreto de amónio (0,5 molal) do que NaCl (0,25 molal) para que o pDNA particione da fase superior para a fase inferior.

4.5.7. Sistemas 12%Reppal/9% PEG 3350 com Concentrações de Citrato de Sódio entre 0 e 0,5 molal

Prepararam-se sistemas 12%Reppal/9%PEG 3350 com várias concentrações de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), para ver qual o efeito deste sal na partição do pDNA e do RNA. Este sal normalmente apresenta coeficientes de partição em sistemas PEG/Dextrano da mesma ordem de grandeza que o cloreto de sódio (Albertsson, 1986) e por essa razão é que foi escolhido. Prepararam-se sistemas apenas com pDNA e apenas com lisado para verificarmos qual as diferenças na partição, tendo-se obtido os géis presentes na Figura 38.

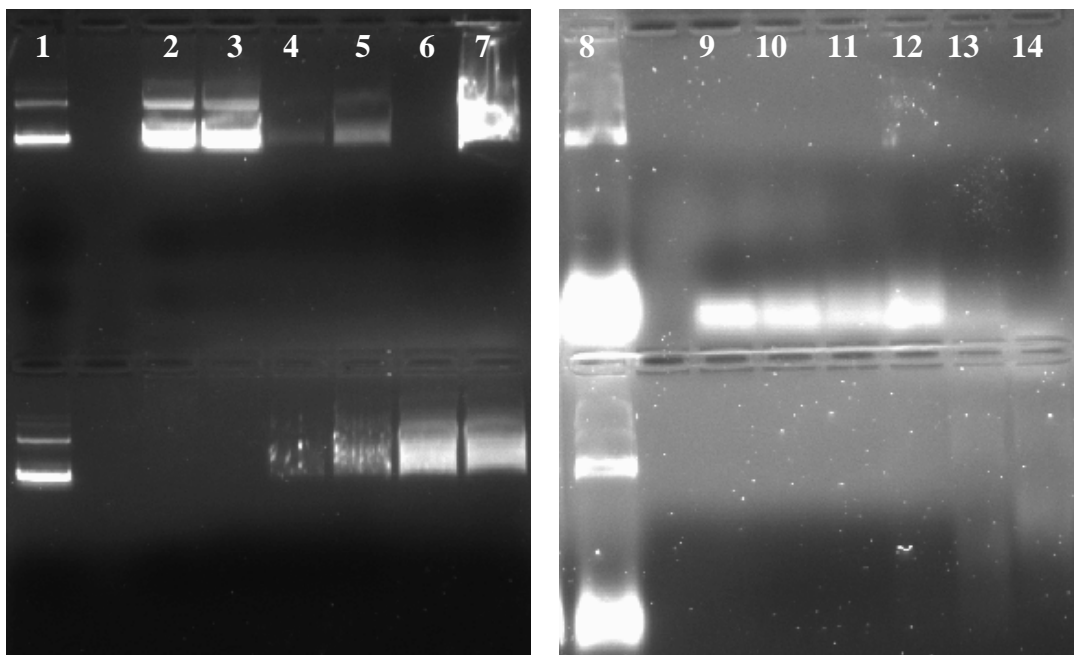


Figura 38 – Electroforese em gel de agarose a 1% com as amostras dos sistemas 12%Reppal/9% PEG 3350 com várias concentrações de citrato de sódio. Legenda:

Resultados e Discussão

Linhas 2-7: Experiências com pDNA puro; Linhas 9-14: Experiências com lisado; Linha 1: DNA plasmídico; Linha 2 e 9: 0 molal; Linha 3 e 10: 0.1 molal; Linha 4 e 11: 0.2 molal; Linha 5 e 12: 0.3 molal; Linha 6 e 13: 0.4 molal; Linha 7 e 14: 0.5 molal; Linha 8: Lisado.

Nos sistemas apenas com pDNA, linhas 2 a 7, o plasmídeo particiona para a fase superior até 0,3 molal de citrato de sódio, tendo a tendência a diminuir à medida que se aumenta a concentração de sal. De 0,2 molal até 0,5 molal de sal, o pDNA aparece na fase inferior dos sistemas, aumentando a quantidade de pDNA na fase à medida que se aumenta a concentração de sal nos sistemas. De referir que na fase superior do sistemas na linha 7, a fase superior foi contaminada com a interfase, verificando-se que uma elevada percentagem do plasmídeo precipita na interfase dos sistemas.

Nos sistemas com lisado, linhas 9 a 14, o RNA particiona para a fase superior até se adicionar 0,3 molal de citrato de sódio. O aumento da concentração de sal para uma concentração acima de 0,3 molal faz com que o RNA comece a particionar para a fase inferior em pequenas quantidades. Contudo pela intensidade das bandas, a maior percentagem de RNA deverá estar precipitada na interfase, teoria que deveria ter sido confirmada pela quantificação do RNA. Em relação ao pDNA, este não aparece em nenhuma das fases dos sistemas e portanto terá precipitado na interfase.

De seguida a concentração de plasmídeo nas fases foi determinada. Primeiro utilizou-se um método por fluorescência tendo-se obtido os valores presentes na tabela 26 e o gráfico presente na figura 39.

Tabela 26 – Concentrações de plasmídeo obtidas por fluorescência para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Reppal com citrato de sódio.

Concentração de Sal	Fase Superior	Fase Inferior
0	-1,104	-1,876
0,1	-0,049	-1,86
0,2	-1,584	-1,833
0,3	-1,617	-1,227
0,4	-1,65	-0,59
0,5	-1,662	-0,896

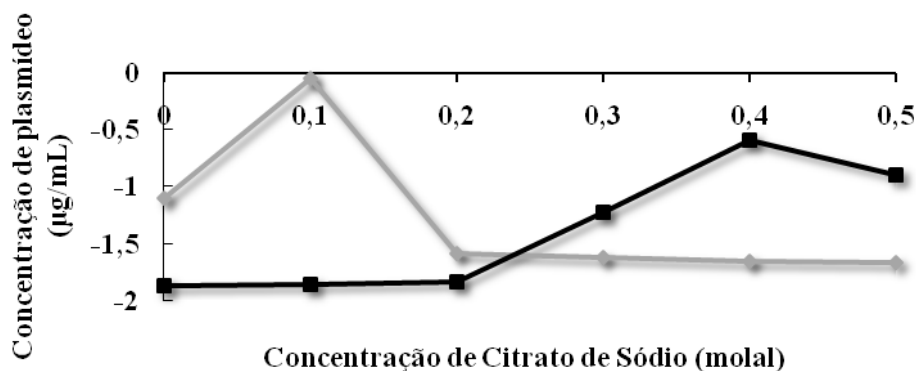


Figura 39 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Reppal com diferentes concentrações de citrato de sódio por fluorescência. Legenda: ◊ Fase superior; ■ Fase inferior.

Apesar de todos os valores serem negativos, a tendência apresentada para os resultados obtidos por fluorescência parece ser concordantes com os da electroforese. Como acontece na maioria dos sistemas Reppal/PEG 3350, verifica-se a partição do pDNA da fase superior para a fase inferior com o aumento da concentração de sal. Os valores negativos observados devem ser devidos à influência do citrato de sódio, como aconteceu com os outros sais

Depois determinou-se a concentração por HIC e obteve-se os valores presentes na tabela 27 e o gráfico presente na figura 40.

Tabela 27 – Concentrações de plasmídeo obtidas por HIC para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Reppal com citrato de sódio.

Concentração de Sal	Fase Superior	Fase Inferior
0	31,152	0,2
0,1	38,377	0,961
0,2	0,758	6,961
0,3	1,389	23,195
0,4	0	30,219
0,5	0	32,326

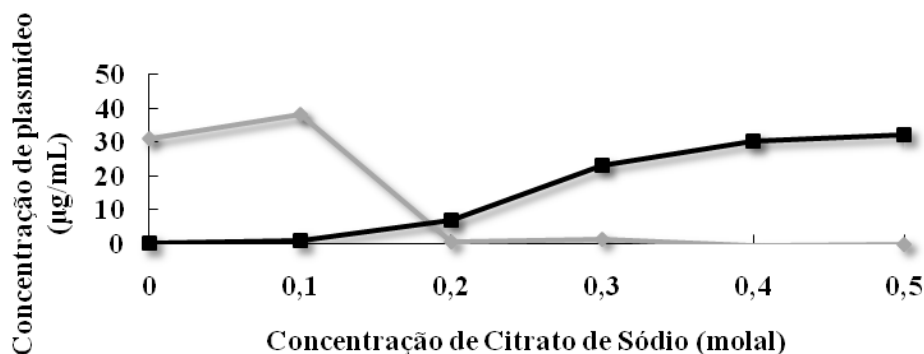


Figura 40 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Reppal com diferentes concentrações de citrato de sódio por HIC. Legenda: —○— Fase superior; —■— Fase inferior.

Pelos gráficos obtidos podemos concluir que os resultados obtidos por HIC são totalmente concordantes com os obtidos pelos outros métodos, sendo possível visualizar a partição do pDNA da fase superior para a fase inferior, sendo a concentração de 0,2 molal o ponto em que o pDNA passa de uma fase para a outra mas sendo apenas claramente determinado na fase inferior para 0,3 molal. Concluimos também que o sal influencia, não só o comportamento do pDNA no sistema, mas os valores obtidos por fluorescência, pois por HIC foi possível obter valores positivos de concentração.

Comparando o efeito deste sal com os anteriores, este apresenta um efeito na partição do pDNA mais parecida com o cloreto de sódio do que com o cloreto de amônio, direcionando o pDNA para a fase inferior com uma concentração de 0,2 molal.

4.5.8. Sistemas 12%Reppal/9% PEG 3350 com Concentrações de Sulfato de Sódio entre 0 e 0,5 molal

Prepararam-se sistemas 12%Reppal/9%PEG 3350 com várias concentrações de sulfato de sódio (Na_2SO_4), para ver qual o efeito deste sal na partição do pDNA e do RNA. Este sal normalmente influencia da mesma maneira que o cloreto de sódio e por essa razão é que foi escolhido. Seis dos sistemas preparados continham pDNA puro enquanto os restantes continham lisado. Após a centrifugação dos sistemas e a separação das fases obteve-se os géis presentes na Figura 41.

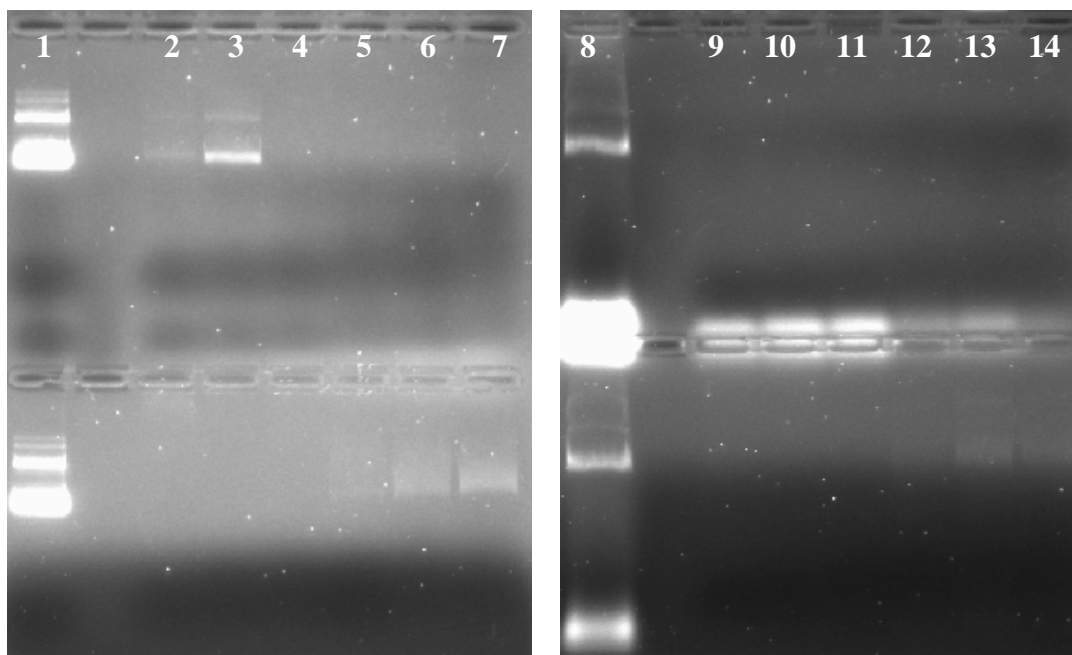


Figura 41 – Electroforese em gel de agarose a 1% com as amostras dos sistemas 12%Reppal/9% PEG 3350 com várias concentrações de sulfato de sódio. Legenda: Linhas 2-7: Experiências com pDNA puro; Linhas 9-14: Experiências com lisado; Linha 1: DNA plasmídico; Linha 2 e 9: 0 molal; Linha 3 e 10: 0.1 molal; Linha 4 e 11: 0.2 molal; Linha 5 e 12: 0.3 molal; Linha 6 e 13: 0.4 molal; Linha 7 e 14: 0.5 molal; Linha 8: Lisado.

Nos sistemas apenas com pDNA, linhas 2 a 7, o plasmídeo particiona para a fase superior para concentrações até 0,1 molal de sulfato de sódio. Para concentrações de 0,3 molal de sal, o pDNA particiona em pequenas quantidades para a fase inferior, aparecendo em maior quantidade na fase inferior com o aumento da concentração de sal. Para concentrações de 0,2 molal, o pDNA não aparece em nenhuma das fases, precipitando na interfase.

Nos sistemas com lisado, linhas 9 a 14, o RNA particiona para a fase superior em todos os sistemas, contudo à medida que se aumenta a concentração de sulfato de sódio a quantidade de RNA tende a diminuir, não aparecendo na fase inferior. Em relação ao pDNA, este aparece na fase inferior em pequena quantidade apenas para concentrações de sulfato de sódio de 0,4 e 0,5 molal. Com concentrações de sal entre 0 e 0,3 molal, o pDNA não aparece em nenhuma das fases, devendo precipitar na interfase dos sistemas.

Resultados e Discussão

Na tabela 28 encontram-se as concentrações de plasmídeo obtidas nas diferentes fases quando o método utilizado foi a fluorescência.

Tabela 28 – Concentrações de plasmídeo obtidas por fluorescência para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Reppal com sulfato de sódio.

Concentração de Sal	Fase Superior	Fase Inferior
0	-0,134	-1,882
0,1	0,285	-1,877
0,2	-1,606	-1,217
0,3	-1,63	-1,622
0,4	-1,496	-1,246
0,5	-1,665	-1,041

Construímos um gráfico para ver qual o comportamento do plasmídeo com o aumento da concentração de sal, tendo sido obtida a figura 42.

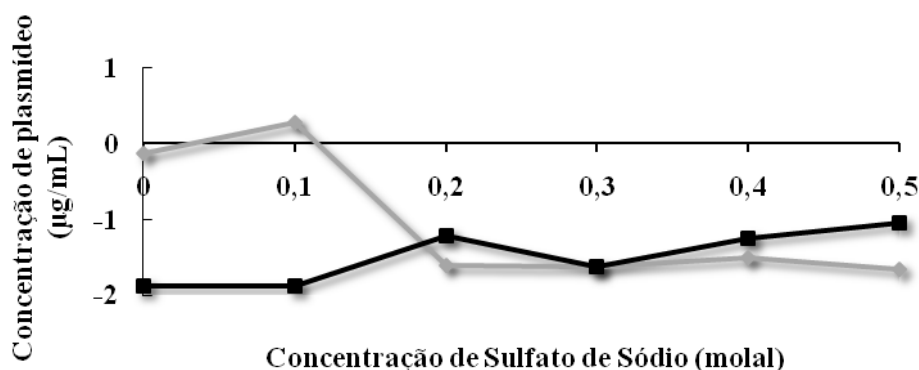


Figura 42 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Reppal com diferentes concentrações de sulfato de sódio por fluorescência. Legenda: —▲— Fase superior; —■— Fase inferior.

Como anteriormente, apesar de os valores obtidos por fluorescência serem quase todos negativos, a sua tendência revela concordância com resultados obtidos por electroforese. Isto é, a diminuição da concentração de pDNA na fase superior com o aumento da concentração de sulfato de sódio.

Na tabela 29 encontram-se as concentrações de plasmídeo em cada fase dos sistemas PEG 3350/Reppal com sulfato de sódio após determinação da concentração

por HIC. Na figura 43 encontra-se o gráfico obtido os valores obtidos de concentração de plasmídeo são comparados com a concentração de sal adicionado aos sistemas.

Tabela 29 – Concentrações de plasmídeo obtidas por HIC para as diferentes fases em sistemas PEG 3350/Reppal com sulfato de sódio.

Concentração de Sal	Fase Superior	Fase Inferior
0	24,947	0,2499
0,1	33,451	0
0,2	0,21	5,737
0,3	0,015	1,506
0,4	1,051	19,03
0,5	0	31,546

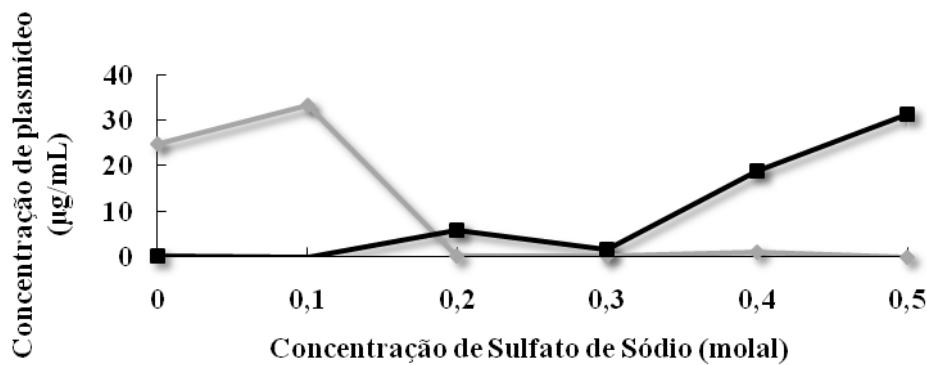


Figura 43 – Partição do plasmídeo puro em sistemas PEG 3350/Reppal com diferentes concentrações de sulfato de sódio por HIC. Legenda: —◆— Fase superior; —■— Fase inferior.

Pelos gráficos obtidos podemos concluir que os resultados obtidos por HIC são concordantes com os obtidos na electroforese e por fluorescência. As conclusões a tirar deste sistema são as mesmas já retiradas para outros sistemas PEG 3350/Reppal: o sal influencia os valores obtidos por fluorescência, interferindo com o método; o sal influencia a partição do pDNA nos sistemas; e o sulfato de sódio altera o comportamento do pDNA de igual forma que o cloreto de sódio e o citrato de sódio, passando o pDNA da fase superior para a inferior na presença de 0,2 molal de sal.

4.6. Determinação da Concentração das Proteínas

4.6.1. Determinação da Concentração de Proteínas no Lisado

Inicialmente começou por se determinar a concentração de proteínas total no lisado utilizado. Assim, após a separação dos sistemas e sabendo a concentração de proteínas total, poderíamos saber se houve precipitação de proteínas na interfase dos sistemas, além de sabermos se as proteínas se encontram maioritariamente na fase superior ou inferior.

Sabendo que a absorvância da amostra de lisado era de 0,5387 e que se realizou uma diluição de 1:10,64, a concentração total de proteínas no lisado é de 72,83 $\mu\text{g/mL}$.

Para determinar-se se as soluções utilizadas para lise alcalina poderiam influenciar os resultados obtidos para a determinação da concentração de proteínas, realizou-se uma curva de calibração com BSA, em que a água foi substituída por uma mistura das três soluções de lise alcalina utilizadas (Tabela 2), tendo-se obtido a curva de calibração presente em Anexo (6.2.14.). Sabendo que a absorvância da amostra de lisado era de -0,1613 e que se realizou uma diluição de 1:10,64, a concentração total de proteínas no lisado é de 70,88 $\mu\text{g/mL}$.

Tendo em conta os valores obtidos para a concentração de proteínas com as diferentes curvas de calibração conclui-se que as soluções de lise alcalina têm pouca influência nos valores obtidos.

4.6.2. Determinação da Concentração de Proteínas em Sistemas 12,7% Dextrano 100/6,6% PEG 3350 com Concentrações de Cloreto de Sódio entre 0 e 2 molal

Inicialmente começou por se preparar os sistemas 6,6% PEG 3350/12,7% Dextrano 100 com concentrações de cloreto de sódio entre 0 e 2 molal, todos contendo 20% (w/w) de lisado. Para cada sistema com lisado prepararam-se sistemas sem lisado para servirem como brancos na determinação da concentração de proteína. Depois de preparados todos os sistemas, estes foram centrifugados a 4500 rpm durante 15 minutos e as fases foram separadas.

Inicialmente preparou-se uma diluição de 1:10 das fases mas devido à dificuldade que havia na detecção das proteínas por ser uma diluição muito elevada, passou a usar-se uma diluição de 1:5. As leituras das amostras foram feitas em triplicado e utilizou-se a mediana dos valores obtidos, para maior fiabilidade.

Após a determinação da curva de calibração para cada sistema e de se ler as absorvâncias, calculou-se o valor da proteína e traçou-se um gráfico do coeficiente de partição versus concentração de NaCl (molal) (Figura 44).

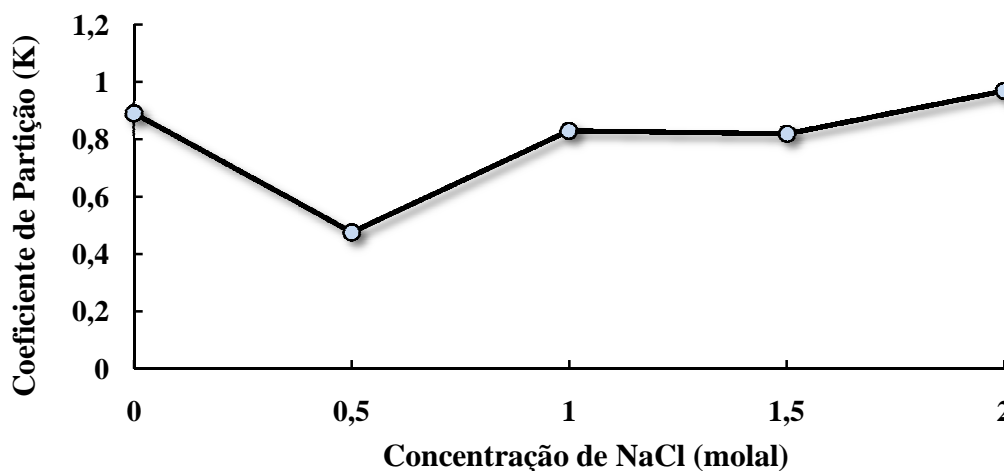


Figura 44 – Gráfico do coeficiente de partição (K) versus concentração de NaCl (molal) para sistemas Dextrano 100/PEG 3350 com lisado.

O coeficiente de partição para cada concentração de cloreto de sódio permite-nos saber se a proteína se encontra na fase superior ou inferior dos sistemas. Se o coeficiente de partição for maior que 1 então a maior parte das proteínas encontra-se na fase superior enquanto se este for menor que 1 as proteínas encontram-se maioritariamente na fase inferior dos sistemas.

Assim, pelo gráfico obtido, as proteínas concentram-se maioritariamente na fase inferior, observando-se também que a concentração de sal não parece influenciar o comportamento das proteínas nos sistemas.

Para sabermos se estes valores obtidos estão a ser influenciados pelas soluções de lise alcalina, prepararam-se sistemas 6,6% PEG 3350/12,7% de Dextrano 100 com várias concentrações de cloreto de sódio, tendo o lisado sido substituído por uma mistura das três soluções de lise alcalina. Para a curva de calibração prepararam-se

sistemas sem as soluções de lise alcalina. Após centrifugação e separação das fases, determinaram-se as absorvâncias e obteve-se o seguinte gráfico (Figura 45).

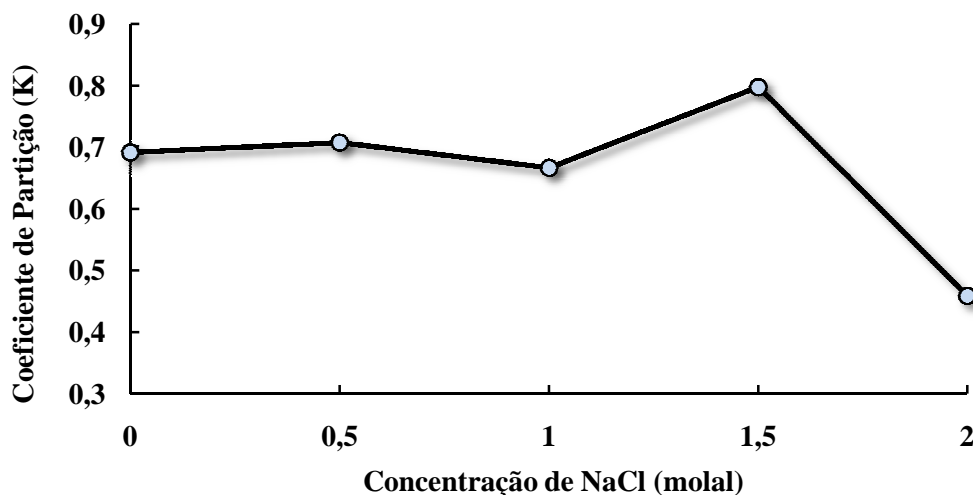


Figura 45 – Gráfico do coeficiente de partição (K) versus concentração de NaCl (molal) para sistemas Dextrano 100/PEG 3350 com soluções de lise alcalina.

Comparando os valores dos coeficientes de partição obtidos para as duas experiências chegou-se à conclusão que as soluções de lise alcalina parecem influenciar os valores obtidos e que o método utilizado pode não ser o melhor para a determinação da concentração de proteínas nestes sistemas.

4.6.3. Determinação da Concentração de Proteínas em Sistemas 12,7% Dex 100/6,6% PEG 3350 com Concentrações de Sulfato de Amônio entre 0 e 2 molal

Prepararam-se sistemas 6,6% PEG 3350/12,7% Dextrano 100, substituindo o cloreto de sódio por sulfato de amônio, para melhor verificar qual a influência de vários sais nestes sistemas. Após a determinação das absorvâncias obteve-se o seguinte gráfico referente à partição das proteínas nestes SDFA (Figura 46).

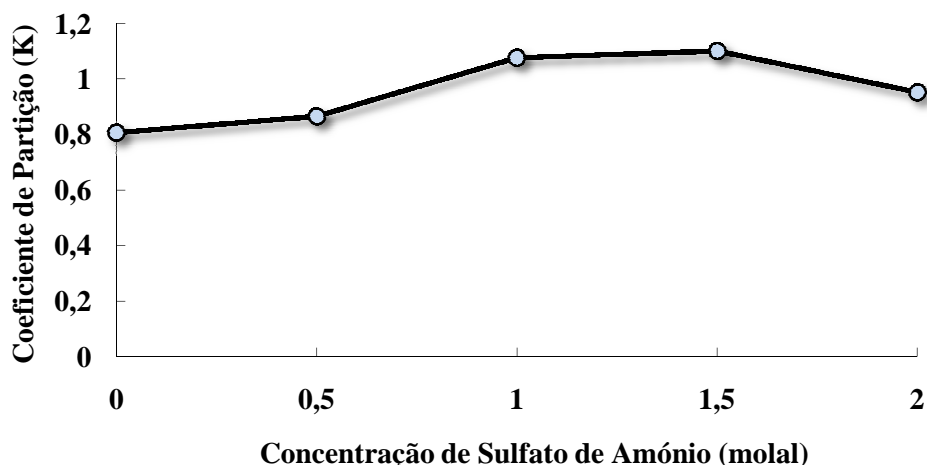


Figura 46 – Gráfico do coeficiente de partição (K) versus concentração de sulfato de amônio (molal) para sistemas Dextrano 100/PEG 3350 com sulfato de amônio.

Ao substituir-se o cloreto de sódio por sulfato de amônio podemos verificar que o coeficiente de partição aumenta com o aumento da concentração de sulfato de amônio, com a exceção da concentração de 2 molal. Este resultado pode ser um erro experimental e não um efeito do sal adicionado. Assim, com o aumento da concentração de sulfato de amônio nos sistemas PEG 3350/Dex 100, as proteínas particionam da fase inferior para a fase superior dos sistemas. Portanto, face aos resultados obtidos, podemos concluir que o NaCl não influencia a partição das proteínas enquanto o sulfato de amônio influencia.

4.6.4. Determinação da Concentração de Proteínas em Sistemas 13% Dex 10/10% PEG 3350 com Concentrações de Cloreto de Sódio entre 0 e 2 molal

Prepararam-se sistemas 13% Dex 10/10% PEG 3350 com várias concentrações de cloreto de sódio, todos contendo 20% (w/w) de lisado. Após a determinação das absorvâncias obteve-se o seguinte gráfico com os coeficientes de partição para cada sistema (Figura 47).

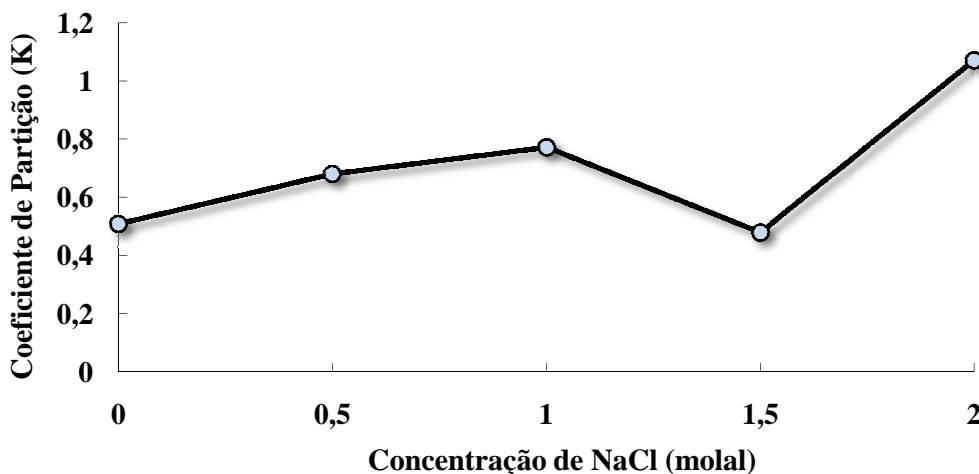


Figura 47 – Gráfico do coeficiente de partição (K) versus concentração de NaCl (molal) para sistemas Dextrano 10/PEG 3350 com cloreto de sódio.

Ao substituir-se o Dextrano 100 pelo Dextrano 10 podemos verificar que o coeficiente de partição aumenta com o aumento da concentração de cloreto de sódio, com a exceção da concentração de 1,5 molal, que poderá ser um erro experimental e não um efeito do sal adicionado. Assim, com o aumento da concentração de cloreto de sódio nos sistemas PEG 3350/Dex 10, as proteínas deslocam-se da fase inferior para a fase superior dos sistemas.

Assim o NaCl influencia a partição das proteínas em sistemas PEG 3350/Dex 10 mas não em sistemas com Dex 100, tendo portanto o peso molecular deste polímero influência no comportamento das proteínas nos sistemas.

4.6.5. Determinação da Concentração de Proteínas em Sistemas 12% Reppal/9% PEG 3350 com Concentrações de Cloreto de Sódio entre 0 e 2 molal

Prepararam-se sistemas 12% Reppal/9% PEG 3350 com várias concentrações de cloreto de sódio, todos com 20% (w/w) de lisado. Após determinação da concentração de proteínas em cada fase, obteve-se o seguinte gráfico de coeficiente de partição versus concentração de NaCl (Figura 48).

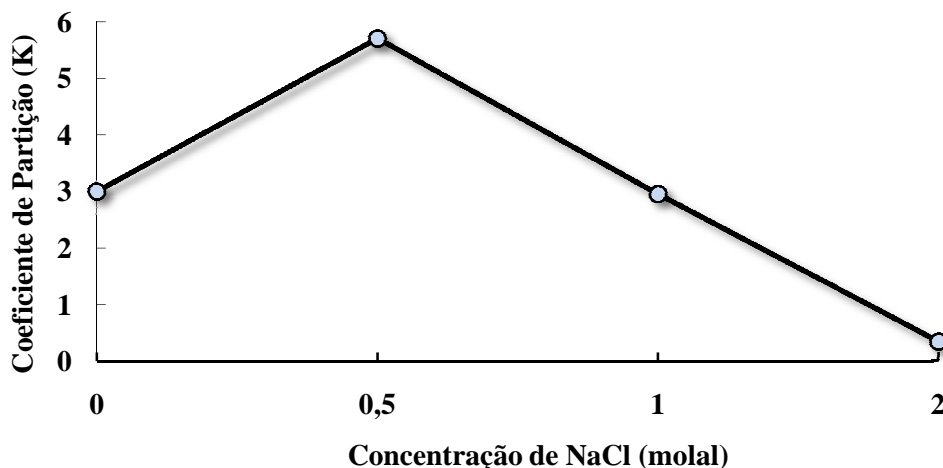


Figura 48 – Gráfico do coeficiente de partição (K) versus concentração de NaCl (molal) para sistemas Reppal/PEG 3350 com cloreto de sódio.

Pelo gráfico obtido podemos concluir que as proteínas ficam maioritariamente na fase superior até 1 molal de NaCl. A partir desta concentração, as proteínas particionam para a fase inferior, encontrando-se maioritariamente nesta fase. Contudo como os resultados não são muito lineares, pensa-se que o método não será o melhor para a determinação da concentração de proteínas em sistemas PEG/Reppal.

4.6.6. Determinação da Concentração de Proteínas em Sistemas 12% Reppal/7% PEG 8000 com Concentrações de Cloreto de Sódio entre 0 e 2 molal

Para confirmar se o método era ou não adequado, prepararam-se sistemas 12% Reppal/9% PEG 8000 com várias concentrações de cloreto de sódio e com 20% (w/w) de lisado, tendo-se obtido o seguinte gráfico de coeficiente de partição versus concentração de NaCl (molal) (Figura 49).

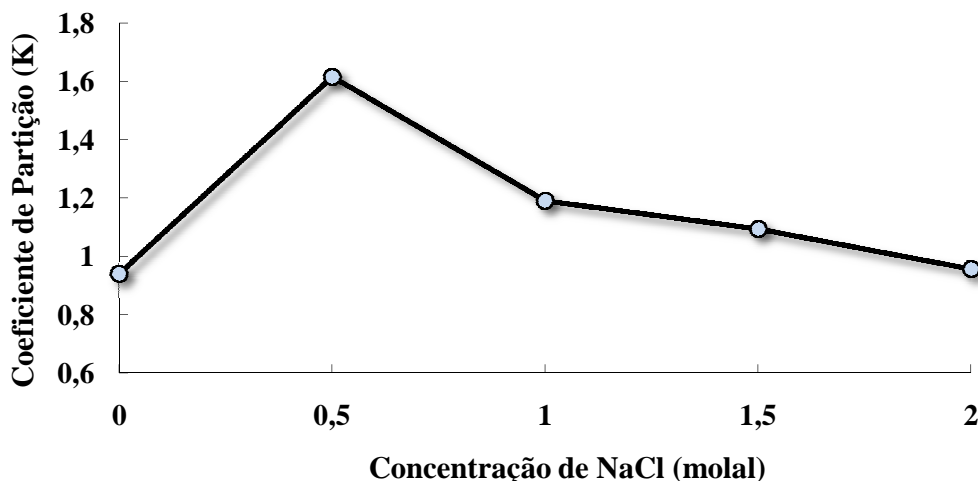


Figura 49 – Gráfico do coeficiente de partição (K) versus concentração de NaCl (molal) para sistemas Reppal/PEG 8000 com cloreto de sódio.

Conseguimos, através do gráfico obtido, concluir que com o aumento de cloreto de sódio as proteínas tendem a particionar da fase superior para a fase inferior dos sistemas. O valor obtido para a concentração de 0 molal de NaCl poderá ser um erro experimental ou mesmo um problema do método.

Contudo como os resultados continuaram a ser pouco coerentes e lineares, o método utilizado não é o mais adequado e portanto não foram realizadas mais determinações das concentrações das proteínas.

4.7. Quantificação do RNA por Fluorescência

A quantificação do RNA por fluorescência foi utilizada para determinar a concentração de RNA na fase superior e na fase inferior dos sistemas.

Inicialmente preparou-se uma curva de calibração de modo a determinarmos a concentração total de RNA no lisado, para que posteriormente se pudesse calcular rendimentos, tendo-se obtido a curva de calibração presente em Anexo (6.2.15.). Assim, sabendo que a intensidade de fluorescência obtida é de 5194 e tendo em conta as diluições realizadas, obteve uma concentração total de RNA no lisado de 1987,816 ng/mL.

Após determinação da concentração total de RNA no lisado tentou-se determinar a concentração de RNA nas fases dos sistemas. Para isso realizou-se duas curvas de

calibração do RNA, uma para a fase superior e outra para a fase inferior, para sistemas Reppal/PEG 3350, tendo-se obtido as curvas em anexo (6.2.16. e 6.2.17.).

As curvas de calibração obtidas posteriormente seriam utilizadas para a determinação da concentração de RNA nas fases dos sistemas mas, ao realizar-se a determinação da concentração de plasmídeo no lisado, foi verificado, como referido anteriormente, que esta era muito baixa e assim não se realizou também a determinação do RNA nos lisados.

4.8. Ligação do PEG ao Berenil

Foram realizadas várias tentativas de ligação do Berenil ao PEG, contudo em nenhuma delas alcançou-se os resultados pretendidos, tendo-se obtido sempre os compostos de partida.

O PEG foi modificado de dois modos diferentes de modo a aumentar a sua reactividade. O primeiro consistiu na sua reacção com o HMDI de forma a termos um grupo isocianato numa das extremidades do PEG. A segunda modificação foi realizada de modo a formar um epóxido numa das extremidades, tornando deste modo o PEG mais reactivo.

As condições experimentais das reacções de ligação do PEG ao Berenil também foram alteradas. Na primeira reacção testada a ligação foi tentada usando o mesmo protocolo que se utiliza para ligar o PEG à pPEI. A segunda testada utilizava carbonato de sódio 1M como base mas a reacção continuou a não funcionar. O terceiro procedimento testado envolvia a utilização de tampão fosfato 10 mM pH 5,56. Um pH tão baixo foi utilizado pelo facto do berenil apresentar diferente comportamento em solução com pHs ácidos e básicos. Contudo, e apesar de várias condições experimentais terem sido testadas, não se conseguiu obter o PEG ligado ao Berenil.

O Berenil apresenta uma estrutura com quatro possíveis locais de ligação, tornando difícil de prever qual o local de ligação ao PEG. Artigos que mencionam o berenil não fazem qualquer referência à reactividade deste. Assim, antes de se tentar ligar o PEG e o Berenil por outros métodos, deverá ser realizado um estudo extensivo sobre a reactividade do berenil, para mais facilmente ajustar as condições experimentais para ligar estas duas moléculas.

5. Conclusões

Cada vez mais os plasmídeos têm sido utilizados em testes clínicos de TG e vacinas de DNA, e assim é previsível, que num futuro próximo, novos métodos de purificação sejam necessários para produzir elevadas quantidades destas biomoléculas em grande escala e a um custo razoável.

Os SDFA são um método de separação que tem sido utilizado na recuperação e purificação de biomoléculas com êxito, em que são utilizados sais e polímeros biocompatíveis com os produtos que se quer recuperar. Os sistemas mais extensamente estudados são os sistemas Dextrano/PEG, contudo estes têm a desvantagem do Dextrano ser um polímero caro. O Hidroxipropilamido (HPS) tem sido usado como substituto deste na recuperação e purificação de biomoléculas, contudo nunca foi utilizado para a recuperação de plasmídeos.

Outros sistemas usados têm ligandos de afinidade que, ao serem acoplados ao PEG, aumentam a afinidade do produto de interesse para a fase com PEG, sendo assim mais facilmente purificado. A afinidade do antibiótico Berenil para o pDNA foi determinada anteriormente tendo sido obtido resultados promissores.

O objectivo deste trabalho consistia no estudo de duas novas abordagens para a purificação de plasmídeos em SDFA, sendo uma delas o estudo de sistemas HPS/PEG e a outra a ligação do Berenil ao PEG para posterior purificação de plasmídeos.

A partição do pDNA e do RNA foi estudada nos sistemas HPS/PEG através de electroforeses em gel de agarose. Foi determinada a concentração de pDNA em cada fase por fluorescência e HIC. Foi também determinada a concentração de proteínas nas fases utilizando o método de Bradford. A influência de vários sais na partição do pDNA e do RNA foi estudada.

A partição do pDNA é diferente em sistemas HPS/PEG e em sistemas Dex/PEG. Em sistemas com HPS, o pDNA tende a particionar da fase superior para a fase inferior com o aumento da concentração de sal. Nos sistemas com Dex 10, o pDNA particiona para a fase inferior do sistema, independentemente da concentração de sal. Já nos sistemas com Dex 100, apesar de estes apresentarem um comportamento semelhante aos sistemas com HPS, o pDNA tende a particionar para ambas as fases do sistema, precipitando também na interfase. Assim, a substituição do Dex pelo HPS influencia o comportamento do pDNA.

A utilização de PEG com diferentes pesos moleculares também influencia o comportamento do pDNA no sistema, principalmente em sistemas contendo lisado. Em sistemas PEG 3350 e PEG 8000, o pDNA precipita na interfase dos sistemas, enquanto

em sistemas com PEG 1000, o pDNA particiona para a fase superior dos sistemas para concentrações de cloreto de sódio entre 0,2 e 0,5 molal. O peso molecular do PEG não tem qualquer influência na partição do RNA, encontrando-se este sempre na fase superior do sistema.

A presença de sais e a concentração destes influencia igualmente a partição do pDNA. Todos os sais estudados a partir de uma concentração crítica fazem com que o pDNA puro se desloque da fase superior para a fase inferior do sistema. O cloreto de sódio, o sulfato de sódio e o citrato de sódio fazem com o pDNA particione da fase superior para a inferior com uma concentração de 0,2 molal, enquanto o cloreto de amónio faz o mesmo efeito com 0,5 molal. Também as soluções de lise alcalina, compostas por uma elevada concentração de sal, influenciam a partição do pDNA e do RNA nos sistemas, verificando-se que a partição do pDNA é diferentes quando se utiliza pDNA puro ou lisado.

Assim, tendo em conta todos os resultados obtidos, podemos concluir que o Hidroxipropilamido demonstra potencial como substituto do Dextrano para a purificação de pDNA por SDFa, conseguindo-se obter em fases opostas do sistema o pDNA e o RNA, havendo contudo muito trabalho a ser realizado com estes sistemas

O outro objectivo deste trabalho, a ligação do Berenil ao PEG, não foi atingido. Alterando as condições experimentais utilizadas e modificando o PEG de duas maneiras diferentes para aumentar a sua reactividade, não foi possível ligar o Berenil ao PEG, tendo-se obtido sempre apenas os reagentes de partida. Portanto a reactividade do Berenil deverá ser estudada antes de se realizar qualquer outra tentativa de ligação ao PEG.

Como não se conseguiu realizar toda a caracterização dos sistemas Reppal/PEG e não se conseguiu obter o Berenil ligado ao PEG seria interessante no futuro:

- Estudar a reactividade do Berenil antes de tentar novamente ligá-lo ao PEG;
- Optimizar o método de determinação da concentração de pDNA em sistemas com Reppal;
- Determinar a concentração de RNA nas diferentes fases dos sistemas;
- Determinar a concentração de gDNA nas diferentes fases dos sistemas;
- Determinar a afinidade do pDNA para o Reppal.

6. Anexo

6.1. Plasmídeo pVAX1-LacZ

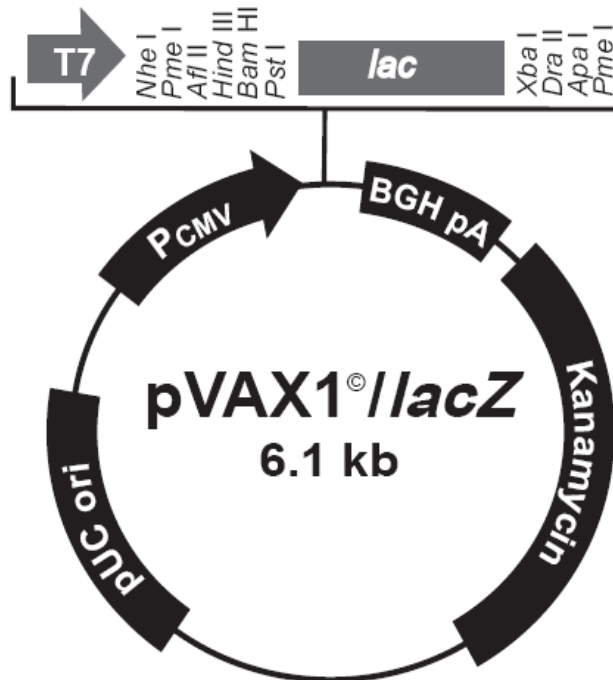


Figura 50 – Mapa do Plasmídeo pVAX1[®]-LacZ.

6.2. Curvas de Calibração

6.2.1. Curva de Calibração do PEG obtida pelo Índice de Refracção

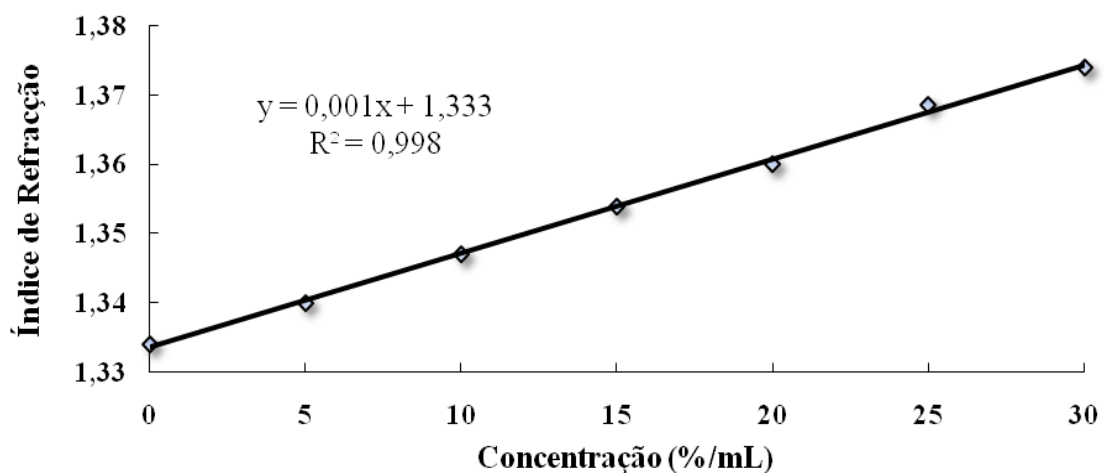


Figura 51 – Curva de Calibração do PEG obtida pelo Índice de Refracção.

6.2.2. Curva de Calibração do Reppal obtida pelo Índice de Refracção.

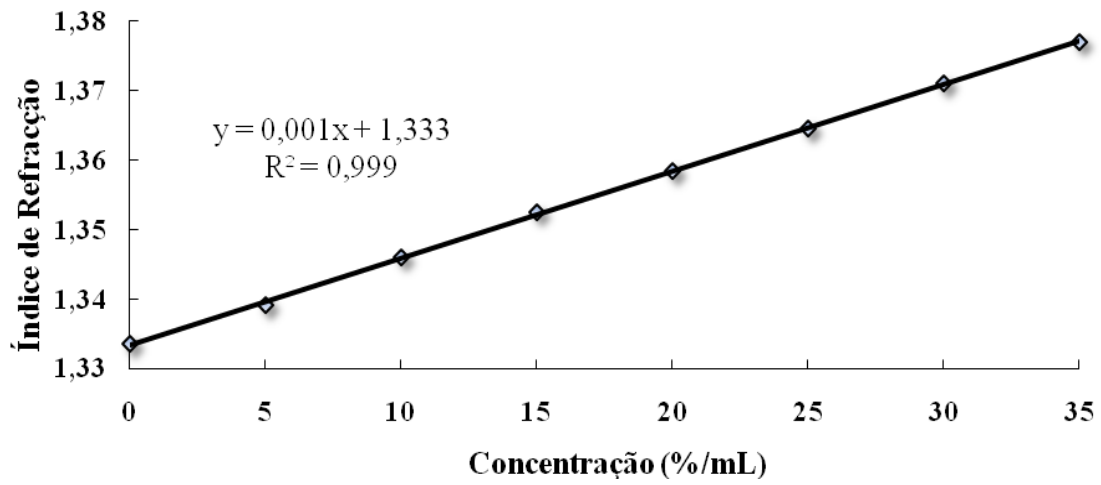


Figura 52 – Curva de Calibração do Reppal obtida pelo Índice de Refracção.

6.2.3. Curva de Calibração da Glucose pelo Método do DNS.

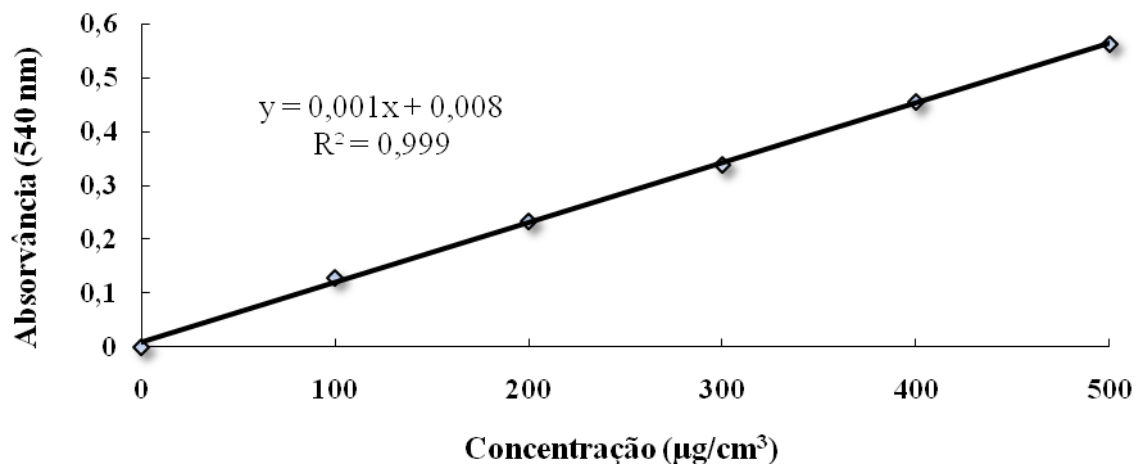


Figura 53 – Curva de Calibração da Glucose pelo Método do DNS.

6.2.4. Curva de Calibração do Reppal pelo Método do DNS.

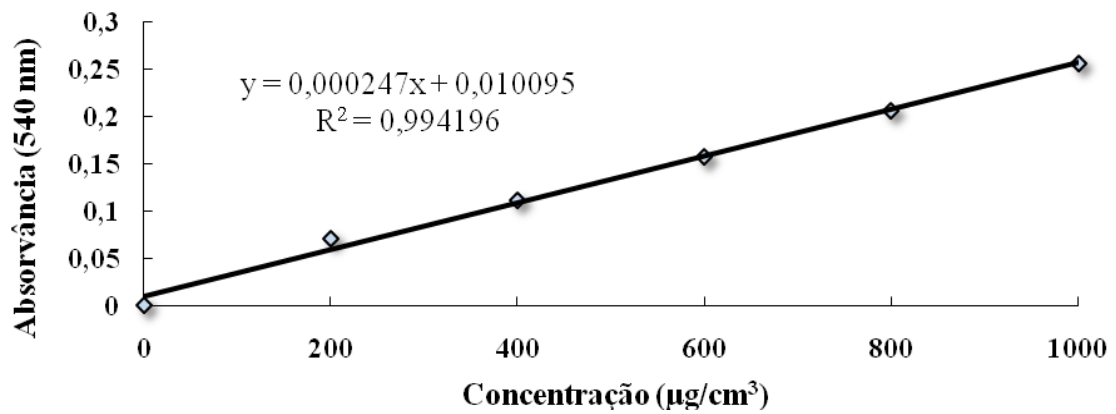


Figura 54 – Curva de Calibração do Reppal pelo Método do DNS.

6.2.5. Curva de Calibração do Reppal pela Rotação Óptica.

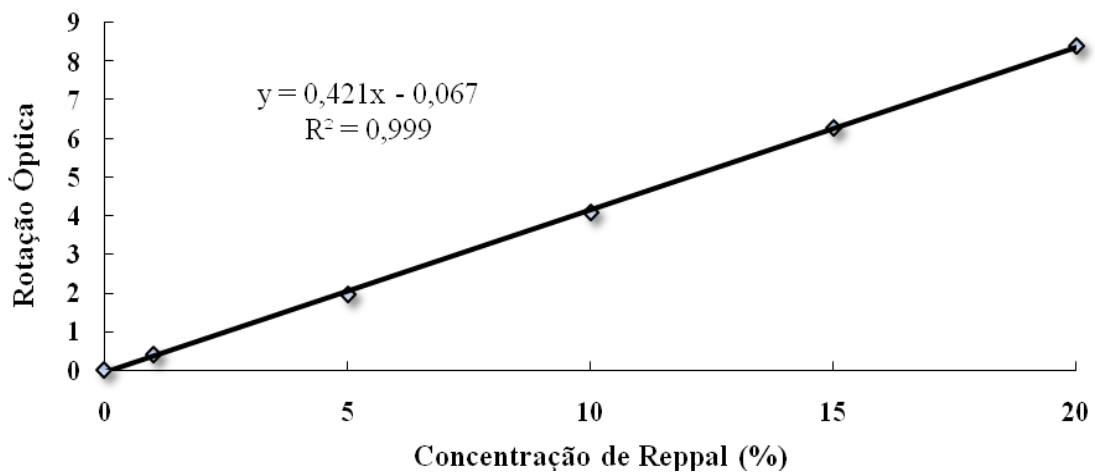


Figura 55 – Curva de Calibração do Reppal pela Rotação Óptica.

6.2.6. Curva de Calibração do DNA com as Fases para Sistemas Reppal/PEG 1000.

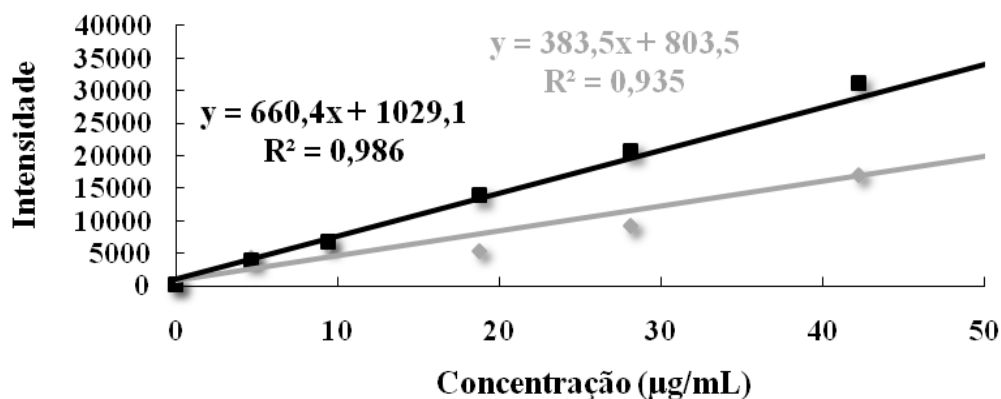


Figura 56 – Curva de Calibração do DNA com as fases para sistemas Reppal/PEG 1000. Legenda: — Fase Superior; — Fase Inferior.

6.2.7. Curva de Calibração do DNA com as Fases para Sistemas Reppal/PEG 3350.

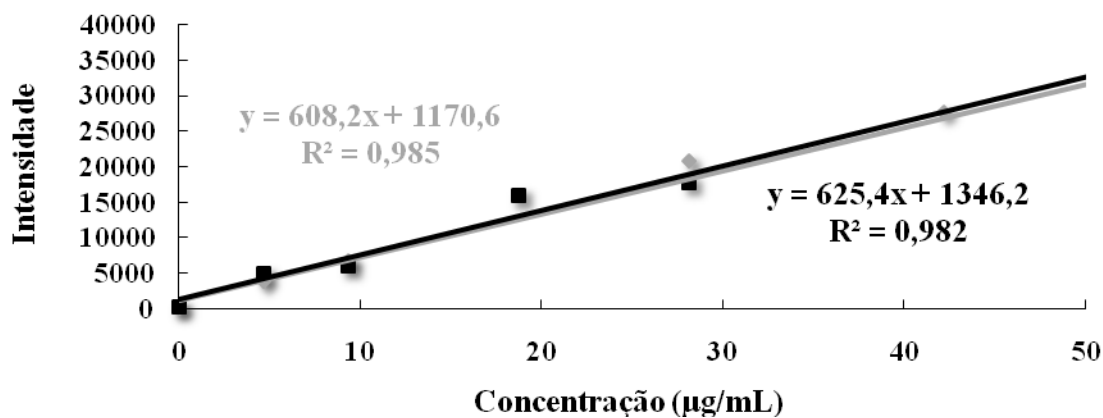


Figura 57 – Curva de Calibração do DNA com as fases para sistemas Reppal/PEG 3350. Legenda: — Fase Superior; — Fase Inferior.

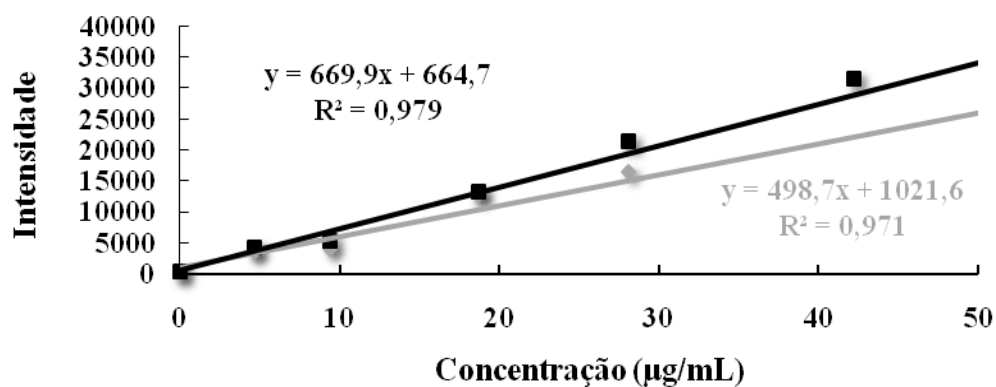
6.2.8. Curva de Calibração do DNA com as Fases para Sistemas Reppal/PEG 8000.

Figura 58 – Curva de Calibração do DNA com as fases para sistemas Reppal/PEG 8000. Legenda: — Fase Superior; — Fase Inferior.

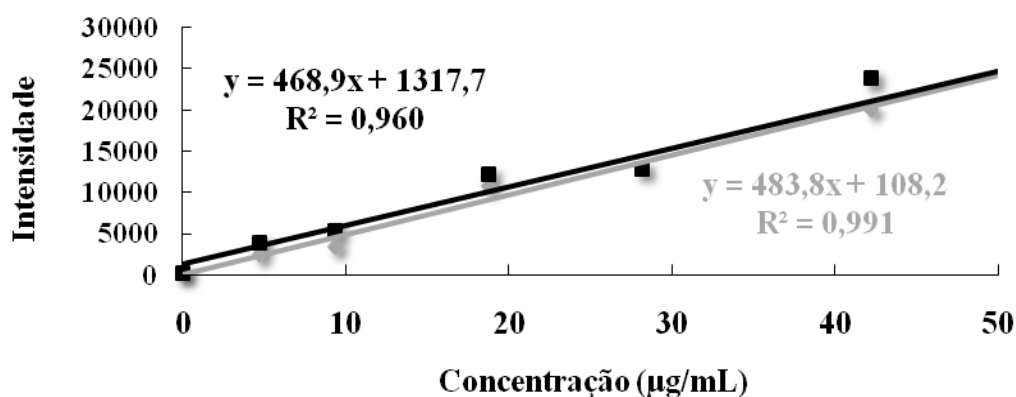
6.2.9. Curva de Calibração do DNA com as Fases para Sistemas Dextrano 10/PEG 3350.

Figura 59 – Curva de Calibração do DNA com as fases para sistemas Dextrano 10/PEG 3350. Legenda: — Fase Superior; — Fase Inferior.

6.2.10. Curva de Calibração do DNA com as Fases para Sistemas Dextrano 100/PEG 3350.

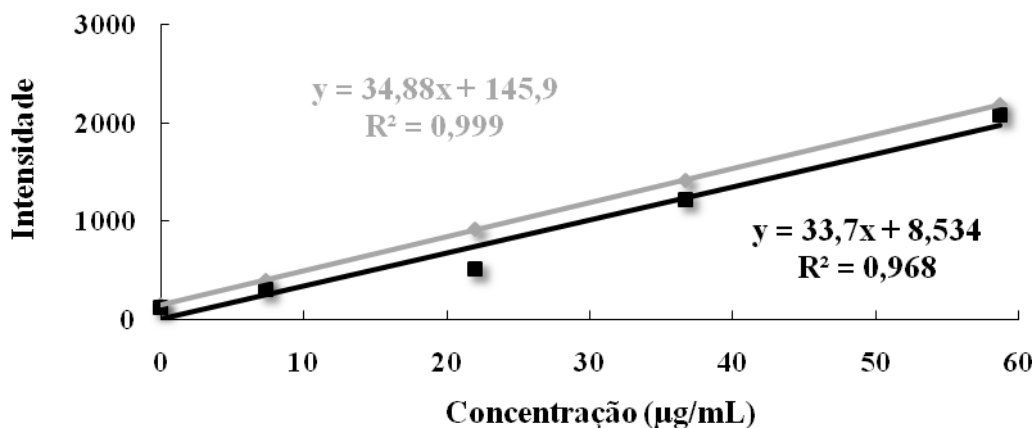


Figura 60 – Curva de Calibração do DNA com as fases para sistemas Dextrano 100/PEG 3350. Legenda: — Fase Superior; — Fase Inferior.

6.2.11. Curva de Calibração do DNA por HPLC.

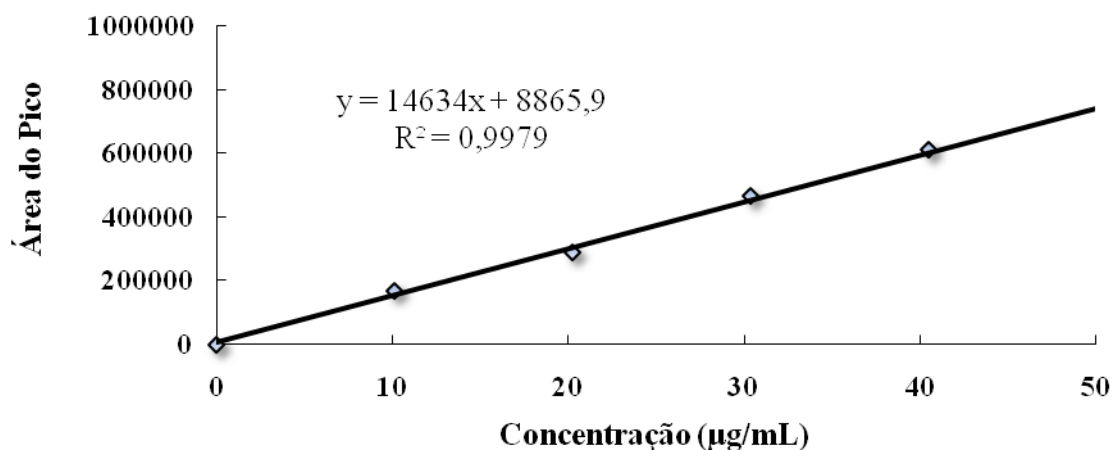
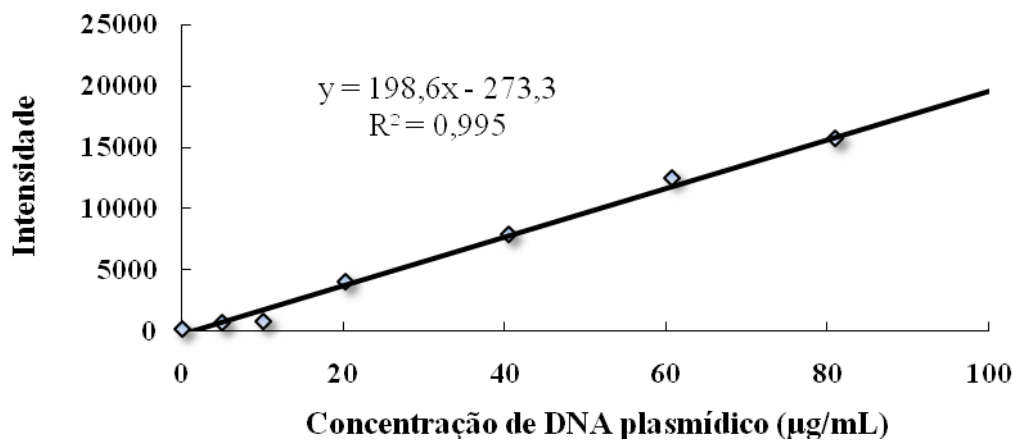
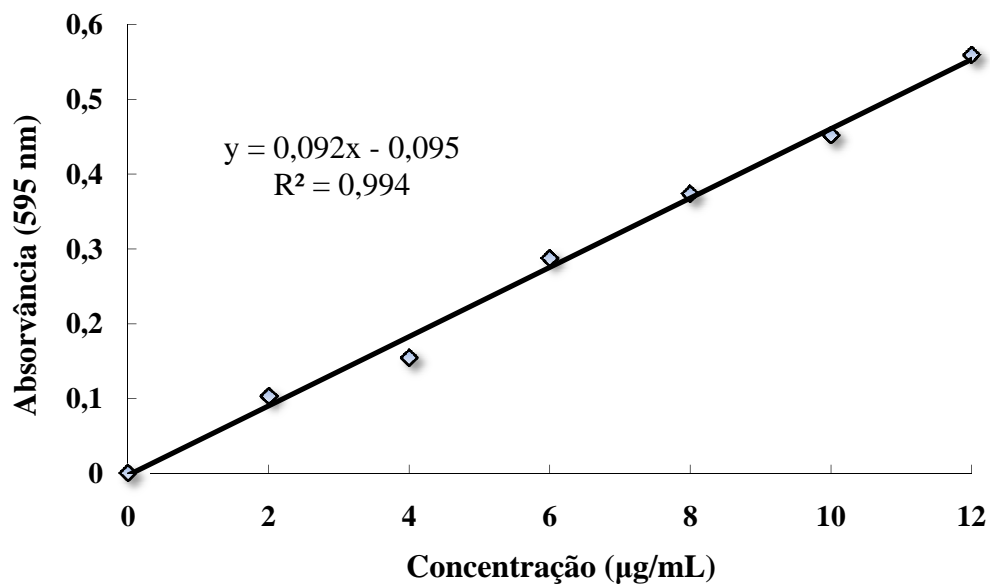


Figura 61 – Curva de Calibração do DNA por HPLC.

6.2.12. Curva de Calibração do DNA por Fluorescência.**Figura 62** – Curva de Calibração do DNA por fluorescência.**6.2.13. Curva de Calibração obtida para a determinação da concentração de proteínas no lisado****Figura 63** – Curva de Calibração obtida para a determinação da concentração de proteínas no lisado.

6.2.14. Curva de Calibração obtida para a determinação da concentração de proteínas no lisado, com soluções de lise alcalina como brancos.

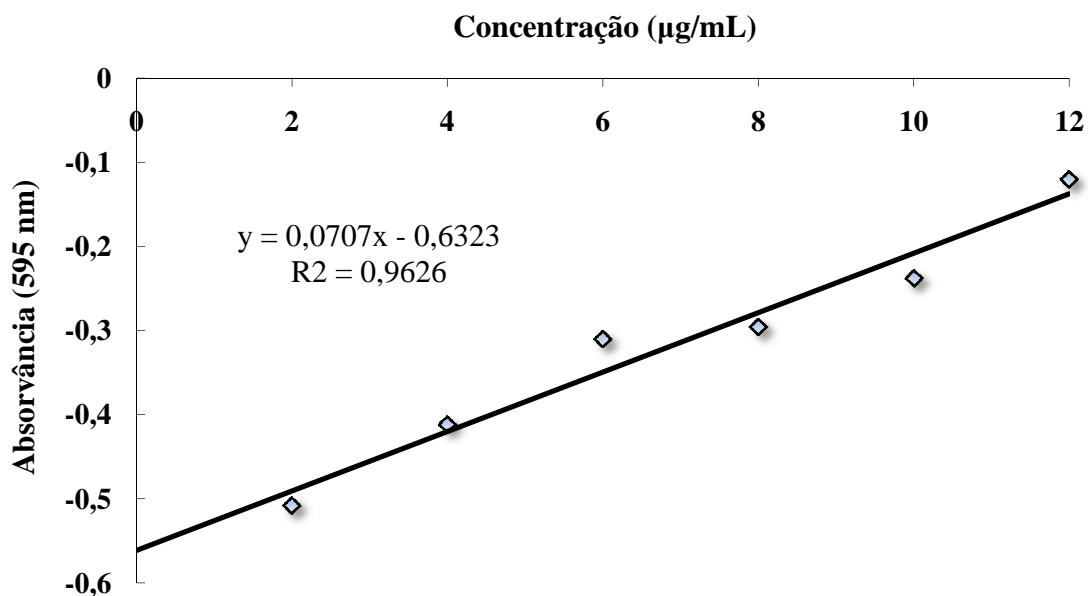


Figura 64 – Curva de Calibração obtida para a determinação da concentração de proteínas no lisado, com soluções de lise alcalina como brancos.

6.2.15. Curva de Calibração do RNA.

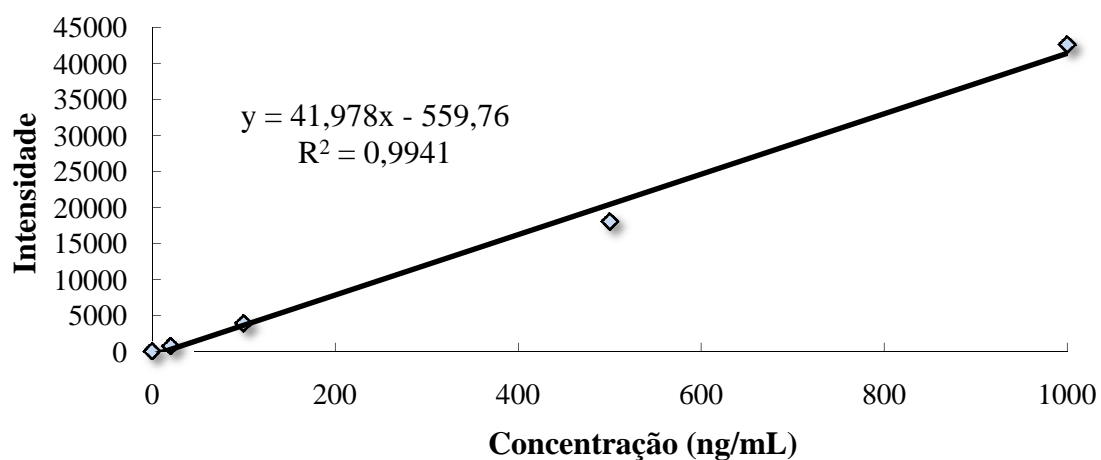
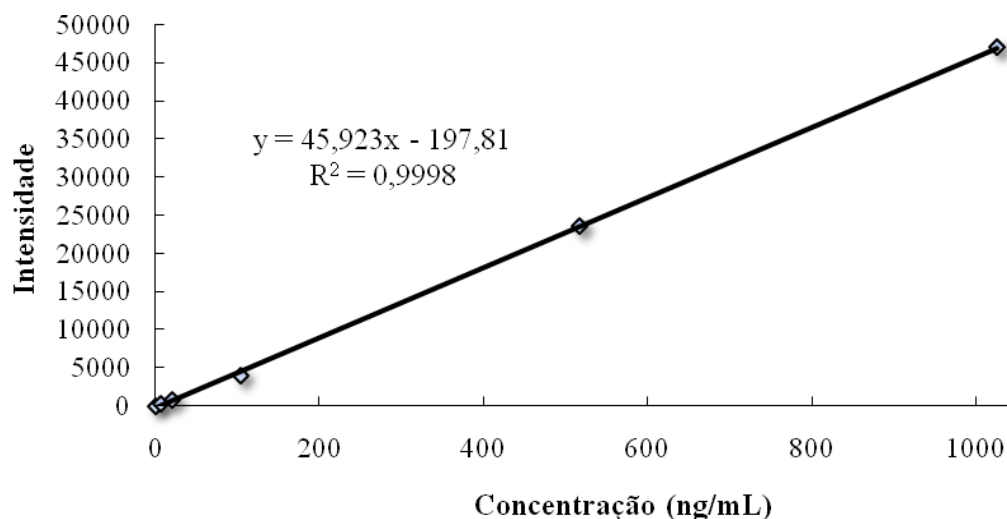
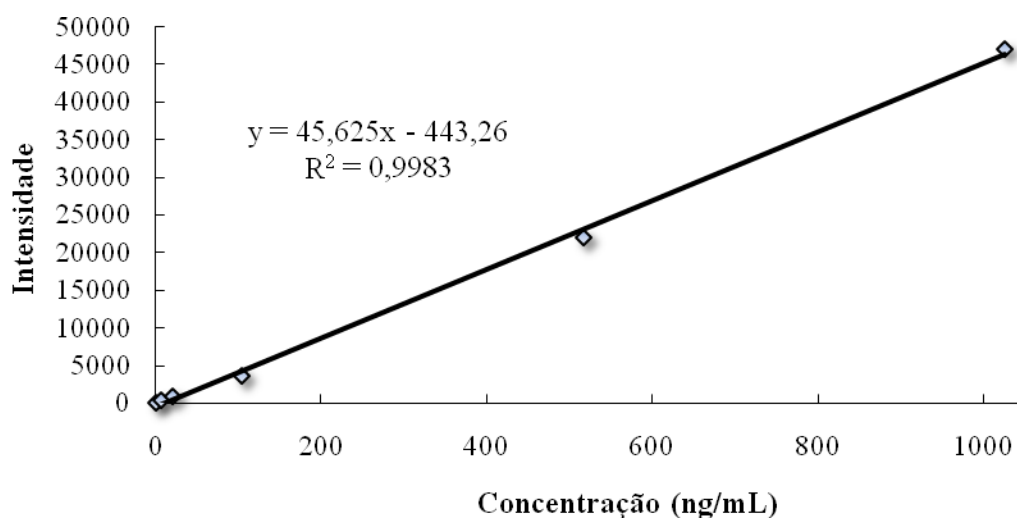


Figura 65 – Curva de Calibração do RNA.

6.2.16. Curva de Calibração do RNA para a Fase Superior**Figura 66** – Curva de Calibração do RNA para a fase superior.**6.2.17. Curva de Calibração do RNA para a Fase Inferior.****Figura 67** – Curva de Calibração do RNA para a fase inferior.

7. Bibliografia

Abreu F., Paula F., Ferreira D., Nascimento V., Santos A., Santoro M., Salas C., Lopes J., Goulart M. (2008). The Application of DNA-Biosensors and Differential Scanning Calorimetry to the Study of the DNA-Binding Agent Berenil. *Sensors*, vol. 8, pp. 1519-1538.

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

Albertsson P. (1961). Fractionation of particles and macromolecules in aqueous two-phase systems. *Biochemical Pharmacology*, vol. 5, pp. 351-358.

Almeida M., Venâncio A., Teixeira J., Aires-Barros M. (1998). Cutinase purification on poly(ethylene glycol)-hydroxypropyl starch aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, vol. 711, pp. 151-159.

Alred P., Tjerneld F., Kozlowski A., Harris M. (1992). Synthesis of dye conjugates of ethylene oxide-propylene oxide copolymers and application in temperature-induced phase partitioning. *Bioseparation*, vol. 2, pp. 363-373.

Alred P., Kozlowski A., Harris M., Tjerneld F. (1994). Application of temperature-induced phase partitioning at ambient temperature for enzyme purification. *Journal of Chromatography A*, vol 659, pp. 289-298.

Anderson W. (1998). Human gene therapy. *Nature*, vol. 392, pp. 25-30.

Antov M., Peričin D., Dašić M. (2006). Aqueous two-phase partitioning of xylanase produced by solid-state cultivation of *Polyporus squamosus*. *Process Biochemistry*, vol. 41, pp. 232-235.

Azevedo A., Gomes A., Rosa P., Ferreira I., Pisco A., Aires-Barros M. (2009). Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol-sodium citrate aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, vol. 65, pp. 14-21.

Balagurumoorthy P., Adelstein S., Kassis A. (2008). Method to eliminate linear DNA from mixture containing nicked circular, supercoiled, and linear plasmid DNA. *Analytical Biochemistry*, vol. 381, pp. 172–174.

Banik R., Santhiagu A., Kanari B., Sabarinath C., Upadhyay S. (2003). Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, vol. 19, pp. 337-348.

Barceló F., Ortiz-Lombardia M., Portugal J. (2001). Heterogenous DNA binding modes of berenil. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1519, pp. 175-184.

Benavides J., Rito-Palomares M. (2008). Practical experiences from the development of aqueous two-phase processes for the recovery of high value biological products. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 83, pp. 133-142.

Benavides J., Aguilar O., Lapizco-Encinas B., Rito-Palomares M. (2008). Extraction and Purification of Bioproducts and Nanoparticles using Aqueous Two-Phase Systems Strategies. *Chemical Engineering & Technology*, vol. 31, No. 6, pp. 838-845.

Berggren K., Johansson H., Tjerneld F. (1995). Effects of salts and the surface hydrophobicity of proteins on partitioning in aqueous two-phase systems containing thermoseparating ethylene oxide-propylene oxide copolymers. *Journal of Chromatography A*, vol. 718, pp. 67-79.

Birnhoim H., Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, vol. 7, pp. 1513-1523.

Bower D., Prather K. (2009). Engineering of bacterial strains and vectors for the production of plasmid DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 82, pp. 805-813.

Burri C., Bodley A., Shapiro T. (1996). Topoisomerases in kinetoplastids. *Parasitology Today*, vol. 12, pp. 226-231.

Cabral J., Aires-Barros M. (1993). Recovery processes for biological materials. *John Wiley and Sons*, pp. 290-302.

Carlson A., Signs M., Liermann L., Boor R., Jem K. (1995). Mechanical disruption of *Escherichia coli* for plasmid recovery. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 48, pp. 303-315.

Chaves A., Silveira E., Bezerra R., Moreira K., Lucena-Silva N., Abath F., Porto A., Cabral J., Lima-Filho J. (2002). Influence of partition parameters on a recombinant antigen of *Schistosoma mansoni* expressed on *E. coli* using poly(ethylene glycol)-hydroxypropyl starch aqueous two-phase system. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, vol. 18, pp. 645-648.

Chouyyok W., Wongmongkol N., Siwarungson N., Prichanont S. (2005). Extraction of alkaline protease using an aqueous two-phase system from cell free *Bacillus subtilis* TISTR 25 fermentation broth. *Process Biochemistry*, vol. 40, pp. 3514-3518.

Cisneros M., Benavides J., Brenes C., Rito-Palomares M. (2004). Recovery in aqueous two-phase systems of lutein produced by the green microalga *Chlorella protothecoides*. *Journal of Chromatography B*, vol. 807, pp. 105-110.

Clausen P., Waiswa C., Katunguka-Rwakishaya E., Schares G., Steuber S., Mehlitz D. (1999). Polymerase chain reaction and DNA probe hybridization to assess the efficacy of diminazene treatment in *Trypanosoma brucei*-infected cattle. *Parasitology Research*, vol. 85, pp. 206-211.

Coelho M., Azevedo D., Teixeira J., Rodrigues A. (2002). Dextran and fructose separation on an SMB continuous chromatographic unit. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 12, pp. 215-221.

Cole K. (1991). Preparation of plasmid and high molecular weight DNA by the use of salt-polymer two-phase extraction. *Biotechniques*, vol. 11, pp. 18-24.

Colote S., Ferraz C., Liautard J. (1986). Analysis and purification of plasmid DNA by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, vol. 154, pp. 15-20.

Costioli M., Fisch I., Garret-Flaudy F., Hilbrig F., Freitag R. (2003). DNA Purification by Triple-Helix Affinity Precipitation. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 81, pp.535-545.

Crystal R. (1995). Transfer of Genes to Humans: Early Lessons and Obstacles to Success. *Science*, vol. 270, pp. 404-410.

Cunha M., Tjerneld F., Cabral J., Aires-Barros M. (1998). Effect of electrolytes and surfactants on the thermoseparation of an ethylene oxide-propylene oxide random copolymer in aqueous solution. *Journal of Chromatography B*, vol. 711, pp. 53-60.

Cunha M., Cabral J., Tjerneld F., Aires-Barros M. (2000). Effect of salts and surfactants on the partitioning of *Fusarium solani* pisi cuttinase in aqueous two-phase systems of thermoseparating ethylene oxide/propylene oxide random copolymer and hydroxypropyl starch. *Bioseparation*, vol. 9, pp. 203-209.

Datar R. (1986). Economics of primary separation steps in relation to fermentation and genetic engineering. *Process Biochemistry*, vol. 21, pp. 19-26.

Diogo M., Queiroz J., Monteiro G., Prazeres D. (1999). Separation and Analysis of Plasmid Denatured Forms Using Hydrophobic Interaction Chromatography. *Analytical Biochemistry*, vol. 275, pp. 122-124

Diogo M., Queiroz J., Prazeres D. (2002). Studies on the retention of plasmid DNA and *Escherichia coli* nucleic acids by hydrophobic interaction chromatography. *Bioseparation*, vol. 10, pp. 211-220.

Diogo M., Queiroz J., Prazeres D. (2005). Chromatography of plasmid DNA. *Journal of Chromatography A*, vol. 1069, pp. 3-22.

Duarte S., Fortes A., Prazeres D., Marcos J. (2007). Preparation of plasmid DNA polyplexes from alkaline lysates by a two-step two-phase extraction process. *Journal of Chromatography A*, vol. 1164, pp. 105-112.

Edahiro J., Yamada M., Seike S., Kakigi Y., Miyanaga K., Nakamura M., Kanamori T., Seki M. (2005). Separation of Cultured Strawberry Cells Producing Anthocyanins in Aqueous Two-Phase System. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 100, pp. 449-454.

Eon-Duval A., Burke G. (2004). Purification of pharmaceutical-grade plasmid DNA by anion-exchange chromatography in an RNase-free process. *Journal of Chromatography B*, vol. 804, pp. 327-335.

Farkas T., Stålbrand H., Tjerneld F. (1996). Partitioning of β -mannanase and α -galactosidase from *Aspergillus niger* in Ucon/Reppal aqueous two-phase systems and using temperature-induced phase separation. *Bioseparation*, vol. 6, pp. 147-157.

Ferreira G., Cabral J., Prazeres D. (1997). A comparison of gel filtration chromatographic supports for plasmid purification. *Biotechnology Techniques*, vol. 11, pp. 417-420.

Forde G., Ghose S., Slater N., Hine A., Darby R., Hitchcock A. (2006). LacO-LacI interaction in affinity adsorption of plasmid DNA. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 95, pp. 67-75.

Freitas S., Santos J., Prazeres D. (2009). Plasmid purification by hydrophobic interaction chromatography using sodium citrate in the mobile phase. *Separation and Purification Technology*, vol. 65, pp. 95-104.

Frerix A., Müller M., Kula M., Hubbuch J. (2005). Scalable recovery of plasmid DNA based on aqueous two-phase separation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 42, pp. 57-66.

Frerix A., Geilenkirchen P., Müller M., Kula M., Hubbuch J. (2007). Separation of Genomic DNA, RNA, and Open Circular Plasmid DNA From Supercoiled Plasmid DNA by Combining Denaturation, Selective Renaturation and Aqueous Two-Phase Extraction. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 96, pp. 57-66.

Gomes G., Azevedo A., Aires-Barros M., Prazeres D. (2009). Purification of plasmid DNA with aqueous two phase systems of PEG 600 and sodium citrate/ammonium sulfate. *Separation and Purification Technology*, vol. 65, pp. 22-30.

González V., Fuerte M., Jiménez-Ruíz A., Alonso C., Pérez J. (1999). The Formation of DNA Interstrand Cross-Links by a Novel Bis-[Pt₂Cl₄(diminazene aceturate)₂]Cl₄.4H₂O Complex Inhibits the B to Z Transition. *Molecular Pharmacology*, vol. 55, pp. 770-777.

Gore M. (2003). Gene therapy can cause leukaemia: no shock, mild horror but a probe. *Gene Therapy*, vol. 10, pp. 4-4.

Harris P., Karlström G., Tjerneld F. (1991). Enzyme purification using temperature-induced phase formation. *Bioseparation*, vol. 2, pp. 237-246.

Harsa S. (1991). Studies on the ion-exchange of pectinase. *PhD thesis*. University of Reading, United Kingdom.

Hasche A., Voß C. (2005). Immobilisation of a repressor protein for binding of plasmid DNA. *Journal of Chromatography A*, vol. 1080, pp. 76-82.

Hatti-Kaul R. (2000). Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols. 1st ed., *Humana Press Inc.*, New Jersey.

Helfrich M., El-Kouedi M., Etherton M., Keating C. (2005). Partitioning and Assembly of Metal Particles and Their Bioconjugates in Aqueous Two-Phase Systems. *Langmuir*, vol. 21, pp. 8478-8486.

Hustedt H., Kroner K., Kula M. (1985). Applications of phase partitioning in biotechnology, em Partition in Aqueous Two-Phase Systems: Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology. *Academic*, Orlando, Florida, pp. 529-587.

Iuliano S., Fischer J., Chen M., Kelly W. (2002). Rapid analysis of a plasmid by hydrophobic-interaction chromatography with a non-porous resin. *Journal of Chromatography A*, vol. 972, pp. 77-86.

Johansson H., Persson J., Tjerneld F. (1999). Thermoseparating Water/Polymer System: A Novel One-Polymer Aqueous Two-Phase System for Protein Purification. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 66, pp. 247-257.

Johansson H., Karlström G., Tjerneld F. (1993). Experimental and theoretical study of phase separation in aqueous solutions of clouding polymers and carboxylic acids. *Macromolecules*, vol. 26, pp. 4478-4483.

Jordan P., Vilter, H. (1991). Extraction of proteins from materials rich in anionic mucilages: partition and fractionation of vanadate-dependent bromoperoxidases from the brown algae *Laminaria digitata* and *L. saccharina* in aqueous polymer two-phase systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1073, pp. 98-106.

Jungbauer A., Hahn R. (2004). Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology. *Journal of Separation Science*, vol. 27, pp. 767-778.

Kanoun S., Amourache L., Krishnan S., Vijayalakshmi M. (1986). New support for the large-scale purification of proteins. *Journal of Chromatography*, vol. 376, pp. 259-267.

Kasai K. (1993). Size-dependent chromatographic separation of nucleic acids. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*, vol. 618, pp. 203-221.

Kaul R., Mattiasson B. (1991). Extractive bioconversions in aqueous two-phase systems, em Extractive Bioconversions. *Marcel Dekker*, New York, pp. 173-188.

Kepka C., Collet E., Persson J., Ståhl Å., Lagerstedt T., Tjerneld F., Veide A. (2003). Pilot-scale extraction of an intracellular recombinant cutinase from *E. coli* cell homogenate using a thermoseparating aqueous two-phase system. *Journal of Biotechnology*, vol. 103, pp. 165-181.

Kepka C., Rhodin J., Lemmens R., Tjerneld F., Gustavsson P. (2004). Extraction of plasmid DNA from *Escherichia coli* cell lysate in a thermoseparating aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography A*, vol. 1024, pp. 95-104.

Kroner K., Hustedt H., Kula M. (1984). Extractive enzyme recovery: economic considerations. *Process Biochemistry*, vol. 19, pp. 170–179.

Kula M., Kroner K., Hustedt H. (1982). Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. *Advances in Biochemical Engineering*, vol. 24, pp. 73-118.

Kutzler M., Weiner D. (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics*, vol. 9, pp. 776-788.

Labrou N., Clonis Y. (1994). The affinity technology in downstream processing. *Journal of Biotechnology*, vol. 36, pp. 95-119.

Ledley F. (1995). Nonviral gene therapy: The promise of genes as pharmaceutical products. *Human Gene Therapy*, vol. 6, pp. 1129-1144.

Levy M., Collins I., Tsai J., Shamlou P., Ward J., Dunnill P. (2000). Removal of contaminant nucleic acids by nitrocellulose filtration during pharmaceutical-grade plasmid DNA processing. *Journal of Biotechnology*, vol. 76, pp. 197-205.

Li L., Liu Y., Sun M., Shao Y. (2007). Effect of salt on purification of plasmid DNA using size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, vol. 1139, pp. 228-235.

Lima A., Alegre R., Meirelles A. (2002). Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. *Carbohydrate Polymers*, vol. 50, pp. 63-68.

Lin D., Yao S., Mei L., Zhu Z. (2000). Preparation of Iminodiacetic Acid-Polyethylene Glycol for Immobilized Metal Ion Affinity Partitioning. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, vol. 8, pp. 310-314.

Lowe C., Lowe A., Gupta G. (2001). New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 49, pp. 561-574.

Luechau F., Ling T., Lyddiatt A. (2009a). Primary capture of high weight nucleic acids using aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, vol. 66, pp. 202-207.

Luechau F., Ling T., Lyddiatt A. (2009b). Partition of plasmid DNA in polymer-salt aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, vol. 66, pp. 397-404.

Luo D., Saltzman W. (2000). Synthetic DNA delivery systems. *Nature Biotechnology*, vol. 18, pp. 119-128.

Mallik R., Hage D. (2006). Affinity monolith chromatography. *Journal of Separation Science*, vol. 29, pp. 1686-1704.

Marquet M., Horn N., Meek J. (1995). Process development for the manufacture of plasmid DNA vectors for use in gene therapy. *BioPharm*, vol. 8, pp. 26-37.

Mayerhoff Z., Roberto I., Franco T. (2004). Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 18, pp. 217-223.

Mazzola P., Lopes A., Hasmann F., Jozala A., Penna T., Magalhaes P., Rangel-Yagui C., Pessoa Jr A (2008). Liquid-liquid extraction of biomolecules: and overview and update of the main techniques. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 83, pp. 143-157.

Mintzer M., Simanek E. (2009). Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Chemical Reviews*, vol. 109, pp. 259-302.

Mohamadi H., Omidinia E. (2007). Purification of recombinant phenylalanine dehydrogenase by partitioning in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, vol. 854, pp. 273-278.

Mountain A. (2000). Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnology*, vol. 18, pp. 119-128.

Murphy J., Jewell D., White K., Fox G., Willson R. (2003). Nucleic acid separations utilizing immobilized metal affinity chromatography. *Biotechnology Progress*, vol. 19, pp. 982-986.

Nastasijevic B., Becker N., Wurster S., Maher L. (2008). Sequence-specific binding of DNA and RNA to immobilized nickel ions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 366, pp. 420-425.

Nerli B., Espariz M, Picó G. (2001). Thermodynamic study of forces involved in bovine serum albumin and ovalbumin partitioning in aqueous two-phase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 72, pp. 468-474.

Nichols E. (1988). Human Gene Therapy. *Harvard University Press*, Cambridge, Massachusetts.

NovaRx Corporation (2008). Phase III Lucanix™ vaccine therapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) following frontline chemotherapy (STOP). In: ClinicalTrials.gov. U.S. National Library of Medicine. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00676507>. Accessed 12 Dec 2008.

Nunes C. (2008). Aplicação de antibióticos como ligandos em cromatografia de afinidade para purificação de DNA plasmídico. Dissertação de Mestrado, Universidade da Beira Interior.

O'Mahony K., Freitag R., Hilbrig F., Müller P., Schumacher I. (2005). Proposal for a better integration of bacterial lysis into the production of plasmid DNA at large scale. *Journal of Biotechnology*, vol. 119, pp. 118-132.

Parasrampuri D. (1998). Therapeutic delivery issues in gene therapy, part 1: Vectors. *BioPharm International*, vol. 11, pp. 38-45.

Park T., Jeong J., Kim S. (2006). Current status of polymeric gene delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol.58, pp. 467-486.

Persson J., Nyström L., Ageland H., Tjerneld F. (1998). Purification of recombinant apolipoprotein A-1_{Milano} expressed in *Escherichia coli* using aqueous two-phase extraction followed by temperature induced phase formation. *Journal of Chromatography B*, vol. 711, pp. 97-109.

Persson J., Johansson H., Tjerneld F. (1999a). Purification of protein and recycling of polymers in a new aqueous two-phase system using two thermoseparating polymers. *Journal of Chromatography A*, vol. 864, pp. 31-48.

Persson J., Nyström L., Ageland H., Tjerneld F. (1999b). Purification of recombinant and human apolipoprotein A-1 using surfactant micelles in aqueous two-phase systems: recycling of thermoseparating polymer and surfactant with temperature-induced phase separation. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 65, pp. 371-381.

Persson J., Kaul A., Tjerneld F. (2000). Polymer recycling in aqueous two-phase extractions using thermoseparating ethylene oxide-propylene oxide copolymers. *Journal of Chromatography B*, vol. 743, pp. 115-126.

Petersen H., Fechner P., Fischer D., Kissel T. (2002). Synthesis, Characterization, and Biocompatibility of Polyethylenimine-*graft*-poly(ethylene glycol) Block Copolymers. *Macromolecules*, vol. 35, pp. 6867-6874.

Prather K., Sagar S., Murphy J., Chartain M. (2003). Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 33, pp. 865-883.

Prazeres D., Ferreira G. (2003). Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Chemical Engineering Process*, vol. 43, pp. 609-624.

Prazeres D., Ferreira G., Monteiro G., Cooney C., Cabral J. (1999). Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy problems and bottlenecks. *Trends Biotechnology*, vol. 17, pp. 169-174.

Prazeres D., Schluep T., Cooney C. (1998). Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, vol. 806, pp. 31-45.

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

Ramehneier R., Terstappen G., Kula M. (1991). The partitioning of cholesterol oxidase in Triton X-114-based aqueous two-phase systems. *Bioseparation*, vol. 2, pp. 315-324.

Rämsch C., Kleinlanghorst L., Knieps E., Thömmes J., Kula M. (1999). Aqueous two-phase systems containing urea: influence on phase separation and stabilization of protein conformation by phase components. *Biotechnology Progress*, vol. 15, pp. 493-499.

Rämsch C., Kleinlanghorst L., Knieps E., Thömmes J., Kula M. (2000). Aqueous two-phase systems containing urea: influence of protein structure on protein partitioning. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 69, pp. 83-90.

Rege K., Hu S., Moore J., Dordick J., Cramer S. (2004). Chemoenzymatic Synthesis and High-Throughput Screening of an Aminoglycoside-Polyamine Library: Identification of High-Affinity Displacers and DNA-Binding Ligands. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, pp. 12306-12315.

Ribeiro S., Monteiro G., Cabral J., Prazeres D. (2002). Isolation of Plasmid DNA from Cell Lysates by Aqueous Two-Phase Systems. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 78, pp. 376-384.

Rito-Palomares M. (2004). Practical application of two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *Journal of Chromatography B*, vol. 807, pp. 3-11.

Rito-Palomares M., Lyddiatt A. (2002). Process integration using aqueous two-phase partition for the recovery of intracellular proteins. *Chemical Engineering Journal*, vol. 87, pp. 313-319.

Rito-Palomares M., Nuñez L., Amador A. (2001). Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoerythrin recovery from *Spirulina maxima*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 76, pp. 1273-1280.

Rodrigues L., Venâncio A., Teixeira J. (2003). Recovery of the proteose peptone component 3 from cheese whey in Reppal PES 100/polyethylene glycol aqueous two-phase systems. *Biotechnology Letters*, vol. 25, pp. 651-655.

Rubanyi G. (2001). The future of human gene therapy. *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 22, pp. 113-142.

Rush M., Warner R. (1970). Alkali Denaturation of Covalently Closed Circular Duplex Deoxyribonucleic Acid. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 245, pp. 2704-2708.

Saeki S., Kuwahara N., Nakata M., Kaneko M. (1976). Upper and lower critical solution temperatures in poly(ethylene glycol) solution. *Polymer*, vol. 17, pp. 685-689.

Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed., *CSH Laboratory Press Cold Spring Harbor*, N.Y.

Sanchez-Ferrer A., Bru R., Garcia-Carmona F. (1989). Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiology*, vol. 91, pp. 1481-1487.

Sanofi-Aventis (2008). Efficacy and safety of XRP0038/NV1FGF in critical limb ischemia patients with skin lesions (TAMARIS). In: ClinicalTrials.gov. U.S. National Library of Medicine. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00566657>. Accessed 12 Dec 2008.

Schiel J., Mallik R., Soman S., Joseph K., Hage D. (2006). Applications of silica supports in affinity chromatography. *Journal of Separation Science*, vol. 29, pp. 719-737.

Schluep T., Cooney C. (1998). Purification of plasmids by triplex affinity interaction. *Nucleic Acids Research*, vol. 26, pp. 4524-4528.

Shmidt D., Ernst J. (1995). A Fluorometric Assay for the Quantification of RNA in Solution with Nanogram Sensitivity. *Analytical Biochemistry*, vol. 232, pp. 144-146.

Sikdar S., Cole K., Stewart R., Szlag D., Todd P., Cabezas H. (1991). Aqueous two-phase extractions in bioseparations: an assessment. *Biotechnology Techniques*, vol. 9, pp. 253-256.

Sjöberg Å., Karlström G., Tjerneld F. (1989). Effects on the cloud point of aqueous poly(ethylene glycol) solutions upon addition of low molecular weight saccharides. *Macromolecules*, vol. 22, pp. 4512-4516.

Sousa F., Tomaz C., Prazeres D., Queiroz J. (2005). Separation of supercoiled and open circular plasmid DNA isoforms by chromatography with histidine-agarose support. *Analytical Biochemistry*, vol. 343, pp. 183-185.

Sousa F., Matos T., Prazeres D., Queiroz J. (2008). Specific recognition of supercoiled plasmid DNA in arginine affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, vol. 374, pp. 432-434.

Sousa F., Prazeres D., Queiroz J. (2009). Improvement of transfection efficiency by using supercoiled plasmid DNA purified with arginine affinity chromatography. *The Journal of Gene Medicine*, vol. 11, pp. 79-88.

Stadler J., Lemmens R., Nyhammar T. (2004). Plasmid DNA purification. *The Journal of Gene Medicine*, vol. 6, pp. S54-S66.

Stephenson D., Norman F., Cumming R. (1993). Shear thickening of DNA in SDS lysates. *Bioseparation*, vol. 3, pp. 285-289.

Sturesson S., Tjerneld F., Johansson G. (1990). Partition of macromolecules and cell particles in aqueous two-phase systems based on hydroxypropyl starch and poly(ethylene glycol). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 26, pp. 281-295.

Summers, D. (1996). *The Biology of Plasmids*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Sun J., Anand-Jawa V., Chatterjee S., Wong Jr K. (2003). Immune responses to adeno-associated virus and its recombinant vectors. *Gene Therapy*, vol. 10, pp. 964-976.

Tan L., Lai W., Lee C., Kin D., Choe W. (2007). Differential interactions of plasmid DNA, RNA and endotoxin with immobilised and free metal ions. *Journal of Chromatography A*, vol. 1141, pp. 226-234.

Tente T. (2008). Seleção de ligandos naturais para a purificação de DNA plasmídico por métodos de afinidade. Dissertação de Mestrado, Universidade da Beira Interior.

Theodossiou I., Collins I., Ward J., Thomas O., Dunnill P. (1997). The processing of plasmid based gene from *Escherichia coli*. Primary recovery by filtration. *Bioprocess Engineering*, vol. 16, pp. 175-183.

Thiry M., Cingolani D. (2002). Optimizing scale-up fermentation processes. *Trends in Biotechnology*, vol. 20, pp. 103-105.

Thompson J. (1986). A Review of High-Performance Liquid Chromatography in Nucleic Acids Research. III. Isolation, Purification, and Analysis of Supercoiled Plasmid DNA. *BioChromatography*, vol. 1, pp. 68-80.

Tjerneld F., Berner S., Cajarville A., Johansson G. (1986). New aqueous two-phase systems based on hydroxypropyl starch useful in enzyme purification. *Enzyme Microbiology Technology*, vol. 8, pp. 417-423.

Trindade I., Diogo M., Prazeres D., Marcos J. (2005). Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1082, pp. 176-184.

Tubio G., Picó G., Nerli B. (2009). Extraction of trypsin from bovine pancreas by applying polyethyleneglycol/sodium citrate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, vol. 877, pp. 115-120.

Ulbrich V., Makes J., Marrecek M. (1964). Identifizierung der Glycidylather Bis-Phenyl- and Bis- α -alkyl(aryl)ather Desglycerins. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, vol. 29, pp. 1466.

Vázquez R., Brito J., Pérez M., Silva R., Seralena A., Dueñas-Carrera S., Frontela M., Herrera A. (2005). Plasmid DNA production for gene therapy and therapeutic or preventive vaccination in humans: a challenge for the pharmaceutical industry. *Biotecnología Aplicada*, vol. 22, pp. 251-255.

Venâncio A., Teixeira J. (1995). Protein mass transfer studies on a spray column using the PEG-Reppal PES 100 aqueous two-phase system. *Bioprocess Engineering*, vol. 13, pp. 251-255.

Venâncio A., Almeida C., Teixeira J. (1996). Enzyme purification with aqueous two-phase systems: comparison between systems composed of pure polymers and systems composed of crude polymers. *Journal of Chromatography B*, vol. 680, pp. 131-136.

Venâncio A., Almeida C., Domingues L., Teixeira J. (1995). Protein partition on a derivative guar gum based aqueous two-phase system. *Bioseparation*, vol. 5, pp. 253-258.

Venâncio A., Teixeira J., Mota M. (1993). Evaluation of Crude Hydroxypropyl Starch As a Bioseparation Aqueous-Two-Phase-Forming Polymer. *Biotechnology Progress*, vol. 9, pp. 635-638.

Vical (2008). A Phase 3 pivotal trial comparing Allovectin-7® alone vs. chemotherapy alone in patients with stage 3 or stage 4 melanoma. In: ClinicalTrials.gov. U.S. National Library of Medicine. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00395070>. Accessed 12 Dec 2008.

Vilalta A., Whitlow V., Martin T. (2002). Real-Time PCR Determination of *Escherichia coli* Genomic DNA Contamination in Plasmid Preparations. *Analytical Biochemistry*, vol. 301, pp. 151-153.

Walter H., Johansson G. (1994). Methods in Enzimology: Aqueous Two-Phase Systems. *Academic*, San Diego, California.

Walter H., Brooks D., Fischer D. (1985). Partition in Aqueous Two-Phase Systems. Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology. *Academic*, Orlando, Florida.

Warringer J., Blomberg A. (2006). Evolutionary constraints on yeast protein size. *BMC Evolutionary Biology*, vol. 6, pp. 61-70.

Williams J., Carnes A., Hodgson C. (2009). Plasmid DNA vaccine design: Impact on efficacy safety and upstream production. *Biotechnology Advances*, vol. 27, pp. 353-370.

Wils P., Escriou V., Warnery A., Lacroix F., Lagneaux D., Ollivier M., Crouzet J., Mayaux J., Scherman D. (1997). Efficient purification of plasmid DNA for gene transfer using triple-helix affinity chromatography. *Gene Therapy*, vol. 4, pp. 323-330.

Woodgate J., Palfrey D., Nagel D., Hine A., Slater N. (2002). Protein-mediated isolation of plasmid DNA by zinc finger-glutathione S-transferase affinity linker. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 79, pp. 450-456.

Zhu J., Wei D., Cao X. (2002). Effects of hydrophobicity of ethylene oxide-propylene oxide copolymers on phase diagrams of aqueous two-phase systems and partition behaviors of cephalexin and 7-aminodeacetoxyphalosporanic acid. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, vol. 10, pp. 240-243.

