



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências Exactas

Síntese de Cianinas para Aplicação como Ligandos em Cromatografia de Afinidade

Diana Patrícia Dias Almeida

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
2º Ciclo de estudos

Orientador: Prof. Doutor Renato E. F. Boto
Co-orientadora: Prof. Doutora Fani Sousa

Covilhã, Outubro de 2011

Dedicatória

Dedico a minha dissertação aos meus mais que tudo. Para a minha mãe que sempre esteve presente nos momentos que mais precisei. Ao meu padrinho por me incentivar e ser o meu modelo de dedicação, força, e luta. Aos meus irmãos que nunca me deixaram desistir e aos meus sobrinhos por me animarem sempre que mais necessitei.

Agradecimentos

Agradeço, antes de mais, ao Prof. Doutor Renato Boto que me orientou de forma incansável e paciente. O meu muito obrigada pelas horas de dedicação à minha tese.

À Prof. Doutora Fani Sousa pelo apoio e conhecimentos que me transmitiu, sempre tão dedicadamente.

Aos meus pais pelo amor incondicional, essencial para o meu equilíbrio. Por todos os conselhos, que me ajudaram a atingir esta meta. Aos meus irmãos por me apoiarem e me levantarem do chão sempre que caí. Aos meus sobrinhos porque, sem saberem, me deram a motivação necessária para ser um melhor modelo para eles. Ao meu tio por acompanhar desde sempre a minha caminhada. Profundamente agradecida à minha família por todos os sacrifícios realizados em prol da minha educação.

Aos meus amigos que sempre estiveram do meu lado, aqueles que se encontraram no mesmo barco este ano e pelo apoio mútuo que sentimos. À Susana, à Tânia, à Marta e ao Mário pela amizade que me conferiu ânimo nos momentos mais complicados.

Não posso deixar de referir todos os elementos do laboratório de síntese Orgânica, pela amizade e constante incentivo, partilhados nas longas horas no laboratório, sempre num bom ambiente de trabalho, partilha e entreajuda. Ao responsável pelo projecto, Paulo Almeida, às professoras Susana e Sílvia, e aos colegas Liliana e Nuno. Foi, e é um prazer a vossa companhia.

Muito obrigada a todos, que de alguma forma participaram nesta minha etapa.

Resumo

A descoberta da mauveína por Perkin em 1856 marcou a indústria de síntese de corantes. Desde então, as cianinas têm vindo a ser sintetizadas com diversos fins, devido às características especiais que estas apresentam. Estas características passam pela elevada eficiência de fluorescência e coeficiente de extinção molar; a larga escala de comprimento de onda (c.d.o.) de absorção máxima; a facilidade em realizar a sua síntese; e a sua estabilidade relativamente elevada. Com aplicações em áreas como a biomédica e a fotodinâmica (entre outras), notou-se que a aplicação de cianinas enquanto ligandos em cromatografia de afinidade é na actualidade um processo pouco explorado.

A presente dissertação de mestrado, intitulada Síntese de Cianinas para Aplicação como Ligandos em Cromatografia de Afinidade, pretende verificar as interacções estabelecidas entre as indocarbocianinas sintetizadas e proteínas padrão na técnica de cromatografia de afinidade. Numa primeira fase realizou-se a síntese de três indocarbocianinas, na qual se realiza a introdução de grupos no azoto do núcleo base do indole presente em ambos os terminais das cianinas. Posteriormente, após caracterização dos compostos, realizou-se a imobilização das indocarbocianinas numa matriz polimérica, a celulose, realizando-se o estudo da interacção, de proteínas padrão, por cromatografia de afinidade. A técnica utilizada pretende verificar as interacções estabelecidas entre as indocarbocianinas como ligandos catiónicos, e proteínas padrão, lisozima, albumina sérica bovina (BSA) e α -quimotripsina, em diferentes condições (iónicas, pH e hidrofóbicas), com o objectivo de separar as proteínas em diferentes condições de eluição.

Neste trabalho serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na síntese das indocarbocianinas bem como o seu comportamento como ligandos em cromatografia de afinidade.

Palavras-chave

Cianinas; Indocarbocianinas; Imobilização; Cromatografia de Afinidade; pH; Força iónica.

Abstract

Perkin's mauve discovery in 1856 changed the dyes synthesis industry. Since this discovery, cyanines have been synthesized with several purposes, due to their special characteristics. These characteristics are such as: their fluorescence efficiency and molar extinction coefficient; their large range of wavelength of maximum absorption; their easy synthesis; and their relatively elevated stability. Applied to fields such as biomedical and photodynamic (between others), the lack of cyanine's exploration as ligands at the process of affinity chromatography was noticed.

This master's dissertation entitled Synthesis of Cyanine for Application as Ligands in Affinity Chromatography, intends to verify the interactions established between the synthesized indocarbocyanines and standard proteins through the technique of affinity chromatography. At the first stage of the investigation we preceded to the synthesis of three indocarbocyanines, during which took place the introduction of groups in the nitrogen of the indole's core base present in both ends of the cyanine. Later, after characterization of the compounds, indocarbocyanines were immobilized into a polymer matrix, cellulose, carrying out the study of the standard proteins interaction, through affinity chromatography technique. This technique aims to verify the interactions established between the indocarbocyanines as cationic ligands, and standard proteins, lysozyme, bovine serum albumin (BSA) and α -chymotrypsin, in different conditions (ionic, hydrophobic and pH), attempting to separate the proteins in different elution conditions.

This paper will present and discuss the results obtained from the synthesis of indocarbocyanines as well as their behavior as ligands in affinity chromatography.

Keywords

Cyanine; Indocarbocyanine; Immobilization; Affinity Chromatography; pH; ionic strength.

Índice

Capítulo 1 - Cianinas como ligandos em Cromatografia de afinidade	2
1.1 Cianinas.....	2
1.1.1 As Cianinas como corantes e sua constituição	2
1.1.2 Características e Aplicações	5
1.1.3 Síntese de cianinas.....	6
1.2 Cromatografia	10
1.2.1 Cromatografia de afinidade	12
1.2.1.1 A matriz	13
1.2.1.2 Imobilização dos ligandos na matriz.....	14
1.2.1.3 O Ligando.....	15
1.3 Cromatografia de afinidade com corantes como ligandos.....	16
Capítulo 2 - Materiais e Métodos/ Procedimentos Experimentais.....	18
2.1 Materiais utilizados	18
2.2 Procedimentos experimentais.....	19
2.2.1 Síntese de Indocarbocianinas e imobilização do corante à celulose	19
2.2.1.1 Síntese dos sais quaternários precursores das Indocarbocianinas.....	19
2.2.1.2 Síntese de indocarbocianinas	20
2.2.1.3 Imobilização das Indocarbocianinas na celulose	22
2.2.2 Cromatografia de afinidade das matrizes com indocarbocianinas	23
Capítulo 3 - Resultados/ Discussão dos Resultados	26
3.1 Síntese de indocarbocianinas.....	27
3.2 Cromatografia de afinidade com indocarbocianinas como ligandos	32
Conclusão.....	42
Referências bibliográficas.....	45

Índice de Esquemas

Esquema 1 - Síntese de monometinocianinas simétricas e assimétricas	6
Esquema 2 - Síntese de alguns tipos de cianina	7
Esquema 3 - Síntese de carbocianinas simétricas	8
Esquema 4 - Síntese de carbocianinas pelo método da difenilformamida.	9
Esquema 5 - Síntese das indocarbocianinas.	27

Índice de Figuras

Figura 1 - Constituição de um corante polimetino.	3
Figura 2 - Esquema da estrutura geral de uma cianina.....	4
Figura 3 - Representação dos 5 tipos de cromatografia.	11
Figura 4 - Representação do processo de Cromatografia de afinidade.	12
Figura 5 - Representação dos intervenientes da cromatografia de afinidade.	13
Figura 6 - Representação da celulose, projecção de Haworth.....	14
Figura 7 - Estratégia de imobilização do ligando ao suporte, através do braço espaçador. ...	15
Figura 8 - Estratégia de imobilização do ligando ao suporte, através dos conjugados braço espaçador-ligando.....	15
Figura 9 - Condições de derivatização da celulose.....	22
Figura 10 - Constituição das matrizes.	32
Figura 11 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 1. Ligação: tampão Tris-HCl 10mM a pH 8; Eluição: tampão Tris-HCl 10 mM com 1 M de NaCl a pH 8. Em A injeção de 34 μ L de lisozima (25 mg/ mL); Em B injeção de 34 μ L de lisozima (12,5 mg/ mL).	33
Figura 12 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 4. Ligação: tampão Tris-HCl 10mM a pH 8; Eluição: tampão Tris-HCl 10 mM com 1 M de NaCl a pH 8. Injeção de 34 μ L de lisozima (18,75 mg/ mL)	33
Figura 13 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 1. Ligação: tampão Tris-HCl 10mM a pH 8; Eluição: tampão Tris-HCl 10 mM com 1 M de NaCl a pH 8. Injeção de 34 μ L de BSA (12,5 mg/ mL)	34
Figura 14 - Cromatografia de afinidade realizada nas matrizes 1 e 4. Ligação: tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8; Eluição: tampão Tris-HCl 10 mM com 1 M de NaCl a pH 8. A refere-se ao ensaio com a matriz 1 - injeção de 34 μ L de α -quimotripsina (12,5 mg/mL); Em B está presente a matriz 4 - injeção de 34 μ L de a quimotripsina (18,75 mg/mL).....	34
Figura 15 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 1. Ligação: tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8; Eluição: tampão Tris-HCl 10 mM com 0,1 M de NaCl a pH 8. Em A - injeção	

de 34 µL de lisozima (12,5 mg/ mL); Em B - injeção de 34 µL de α-quimotripsina (12,5 mg/ mL).	35
Figura 16 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 1. Ligação: tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8; Eluição parcial: tampão Tris-HCl 10 mM com 10 mM de NaCl a pH 8; Eluição parcial: tampão Tris-HCl 10 mM com 1 M de NaCl a pH 8. Em A - injeção de 34 µL de lisozima (12,5 mg/ mL); Em B - injeção de 34 µL de α-quimotripsina (12,5 mg/ mL) ..	36
Figura 17 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 1. Ligação: tampão Tris-HCl 10mM a pH 8; Eluição: tampão acetato 10mM a pH4. Injeção de 34 µL de BSA (12,5 mg/ mL).	37
Figura 18 - Cromatografia de afinidade realizada em colunas descartáveis com a matriz 1. Ligação: Tampão Tris-HCl 10mM a pH 8; Eluição: tampão acetato 10mM a pH4. Em A - injeção de 34 µL de lisozima (12,5 mg/ mL); Em B - injeção de 34 µL de α-quimotripsina (12,5 mg/ mL).	37
Figura 19 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 1. Ligação: Tampão Tris-HCl 10mM a pH 8; Eluição parcial: Tris-HCl 10mM a pH 7; Eluição: Tris-HCl 10mM a pH 8. Em A - injeção de 34 µL de lisozima (12,5 mg/ mL); Em B - injeção de 34 µL de α-quimotripsina (12,5 mg/ mL).	38
Figura 20 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 1. Ligação: Solução de Sulfato de amônio 1,5M a pH 8; Eluição: Tris-HCl 10mM a pH 8. Injeção de 34 µL de BSA (12,5 mg proteína/ mL de solução de Sulfato de amônio 1,5M a pH8)	39
Figura 21 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 1. Ligação: Solução de Sulfato de amônio 1,5M a pH 8; Eluição: Tris-HCl 10mM a pH 8. Em A - Injeção de 34 µL de lisozima (12,5 mg proteína/ mL de solução de Sulfato de amônio 1,5M a pH8); Em B - Injeção de 34 µL de α-quimotripsina (12,5 mg proteína/ mL de solução de Sulfato de amônio 1,5M a pH8).	39

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Grupos de corantes polimetino.....	3
Tabela 2 - Classificação dos métodos cromatográficos.....	10
Tabela 3 - Dados físicos e espectroscópicos das indocarbocianinas sintetizadas.	31

Lista de Acrónimos

arom - Aromático
BSA - Albumina sérica bovina
c.c.f. - Cromatografia de camada fina
c.d.o. - comprimento de onda
CD - Compact disc
¹³C RMN - Ressonância magnética nuclear de carbono
d - Duplete
DMF - *N,N*- dimetilformamida
DMSO *d*₆ - Dimetilsulfóxido hexadeuterado
FTIR - Espectroscopia de IV por Transformada de Fourier
¹H RMN - Ressonância magnética nuclear de próton
IV - Infravermelho
IUPAC - International Union of Pure and applied Chemistry
m - Multiplete
NaOAc - Acetato de Sódio
p.f. - Ponto de fusão
Q - Quantidade de corante ligado à celulose
s - Singleto
SA - Sulfato de amónio
t - tripleto
UV/ Vis - Ultravioleta/ Visível
δ - Desvio químico
Δ - Aquecimento
ε - Coeficiente de extinção molar
η - Rendimento
J - Constante de acoplamento
λ_{max} - Comprimento de onda do máximo de absorção
ν_{max} - frequência de máximo de absorção de uma banda

Capítulo 1 - Cianinas como ligandos em cromatografia de afinidade

1.1 Cianinas

1.1.1 As Cianinas como corantes e sua constituição

Desde a época pré-histórica que têm vindo a ser utilizados corantes naturais orgânicos e inorgânicos. Existem até referências à existência de hieroglifos egípcios antigos que continham descrições da extracção natural de corantes e suas aplicações. O que marcou a indústria de síntese de corantes foi a descoberta da mauveína por W.H. Perkin em 1856 [1, 2]. No mesmo ano foi obtida em laboratório uma substância colorida pela mão de C.G. Williams, que tendo em conta a sua cor azul se denominou cianina (do grego Kyanos) [1].

Os corantes são matérias que em contacto directo com uma substância, lhe aferem cor. Os corantes são caracterizados pela sua capacidade de absorver luz visível (400 a 700 nm), sendo essa a razão pela qual estas substâncias apresentam cor [1, 3]. Podem ser classificados de acordo com a sua estrutura ou de acordo com os métodos pelos quais estes são aplicados ao substrato. Nenhum dos sistemas de classificação é satisfatório no individual, uma vez que um corante com uma determinada constituição pode ser utilizado em diferentes aplicações [2, 4]. Griffiths classificou os corantes segundo uma teoria básica suportada nas origens electrónicas da cor em quatro classes [5]:

1. Cromogéneos doador-aceitador
2. Cromogéneos tipo cianina
3. Cromogéneos polieno
4. Cromogéneos $n \rightarrow \pi^*$

O sistema mais adequado para efectuar a classificação das cianinas está relacionado com a sua estrutura química, sistema adoptado pela Colour Index, no qual estão incluídos diversos corantes. Este método apresenta diversas vantagens, tais como, permitir identificar e agrupar corantes com propriedades idênticas, obtendo-se um número controlável de grupos (aproximadamente 12) e, é uma classificação utilizada quer pelo químico que realiza a síntese dos compostos, bem como pelo tecnólogo que os utiliza. Como exemplo de grupos de mais interesse encontram-se as classes de corantes azo, antraquinona e polimetino [4, 6, 7].

Os corantes polimetino são caracterizados por conterem na sua constituição uma cadeia de grupos metino ($-CH=$) e um sistema conjugado de ligações duplas, que se apresentam geralmente em conformação trans como é possível verificar na figura 1 [1, 8, 9].

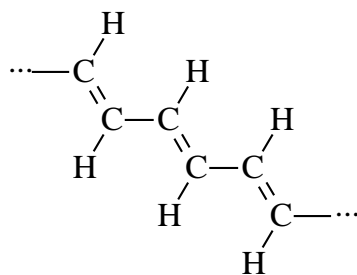


Figura 1 - Constituição de um corante polimetino.

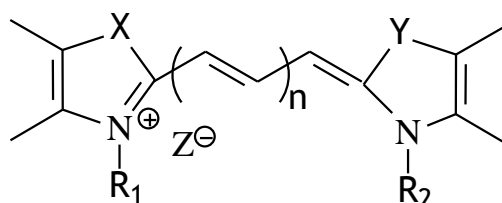
Existe uma correlação entre a cor e a constituição dos compostos orgânicos. Os átomos de carbono do grupo metino podem ser substituídos por outros grupos para além dos átomos de Hidrogénio, ou constituir parte de sistemas de heterocíclicos [1]. Os corantes mono- e polimetino contêm um grupo dador de electrões e um aceitador de electrões em lados opostos das cadeias metino. De acordo com os grupos dador e aceitador de electrões, podemos classificar os corantes polimetino, que contêm na sua constituição átomos de azoto, em cianinas, hemicianinas, streptocianinas e oxonol tal como se pode verificar na tabela 1 [1, 8].

Tabela 1 - Grupos de corantes polimetino.

Nome do grupo	Fórmula geral	Exemplo
Cianina		
Hemicianina		
Streptocianina		
Oxonol		

Os corantes polimetínicos da família das cianinas, podem ainda ser classificados de acordo com os grupos metino. Logo se o composto tiver 1 grupo metino entre a ligação dos anéis heterocíclicos (n=0) este subgrupo chamar-se-á cianina; se na sua constituição tiver 3 grupos metino entre a ligação dos anéis heterocíclicos (n=1) terá o nome de carbocianina e no caso de conter 5 grupos (n=2) denomina-se dicarbocianina, etc [1].

Os corantes cianina são os corantes polimetínicos mais conhecidos. São derivados fluorescentes que começaram a gerar interesse pelas suas características únicas e aplicações práticas [8, 10]. Uma molécula de cianina simples pode ser definida como um sal mono-ácido, no qual dois átomos de azoto, dos dois núcleos heterocíclicos, estão ligados por uma cadeia de ligações duplas conjugadas de átomos de carbono de número ímpar, como se pode verificar na figura 2 [8, 11].



X = Y ou X ≠ Y = S, Se, O, C(CH₃)₂, -CH=C, ...
 Z = I, Br, Cl, Tos, ClCO₄, ...
 R = alquilo ou alquil substituído
 n = 0, 1, 2, 3...

Figura 2 - Esquema da estrutura geral de uma cianina

De acordo com a definição, cada composto é considerado como um híbrido de ressonância de duas estruturas catiónicas, sendo que não existe forma de representar uma estrutura em separado. Para simplificar a estrutura é normalmente apresentada como possuindo um átomo de azoto terciário e um outro quaternário, sendo que a carga positiva não se encontra somente num dos átomos de azoto, mas sim ao longo da cadeia [11, 12].

As cianinas podem também conter na sua constituição um grupo carboxílico, que torna estes corantes reactivos e potencialmente capazes de se ligarem covalentemente a macromoléculas contendo grupos hidroxilo (por exemplo celulose ou agarose), por um método de esterificação [11, 13]. Esta ligação de macromoléculas contendo grupos hidroxilo à cianina, resulta na formação de um suporte que pode estabelecer interacções específicas (hidrofóbicas, iónicas e π-π) com diversas moléculas, podendo então estes suportes ser utilizados em técnicas de purificação como é o caso da cromatografia de afinidade [11].

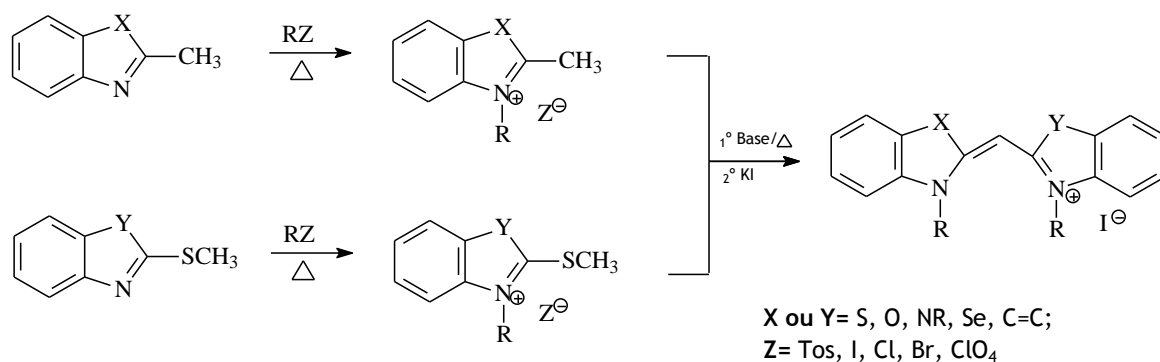
1.1.2 Características e Aplicações

As Cianinas começaram a gerar interesse, principalmente pela sua característica inigualável, que se baseia em transmitir sensibilidade à luz a emulsões de halogeneto de prata numa região do espectro no qual o haleto de prata geralmente não é sensível, o que permitiu a estes corantes dominar o campo da fotografia e outras sofisticadas áreas de aplicação de corantes desde 1856 [8]. Para além disso, apresentam ainda atributos importantes, tais como elevada eficiência de fluorescência e coeficiente de extinção molar, larga escala de c.d.o. de absorção máxima (absorve radiação no espectro electromagnético desde o ultravioleta até ao infravermelho), são de fácil síntese, e apresentam estabilidade relativamente elevada [9, 10]. Este facto conduziu à utilização destes corantes como sensibilizadores espectrais [14], material de gravação de “Compact disc” (CD) [15], aplicações biomédicas [16-18], terapia fotodinâmica [19, 20], utilizam-se também em tintas industriais, agente anti-tumoral e como sondas para os sistemas biológicos, como por exemplo detecção de DNA [21], entre outras aplicações [8, 10, 22, 23]. A aplicação destes corantes como ligandos em cromatografia de afinidade apenas recentemente começou a ser investigada [11]. As indocarbocianinas, apresentam características, tais como, elevada solubilidade em solventes, permitem cristalização, oferecem estabilidade térmica, e têm elevada reflectância [24], o que as torna importantes para síntese. Têm vindo a ser utilizadas como sondas de transições de fase lipídicas e potenciais de membrana e para medição dos coeficientes de difusão translacional em membranas [25].

1.1.3 Síntese de cianinas

A síntese de cianinas envolve várias etapas trata-se, de uma forma geral, de sequências de adição de reagentes nucleófilos e electrófilos, seguidas por desprotonações e remoções de grupos de saída. O nucleófilo é uma base metilénica derivada de um sal quaternário heterocíclico 2- ou 4-metilico na presença de um agente condensador básico e o electrófilo pode ser um ortoéster, aldeído ou outro [13, 26].

As monometinocianinas são habitualmente sintetizadas pelo método do tioalquilo. Este método, como se verifica no esquema 1, baseia-se na reacção de condensação entre dois sais quaternários heterocíclicos, em que um possui um grupo metilo reactivo e o outro, um grupo tioalquilo como grupo de saída. Este método permite a síntese de cianinas simétricas e assimétricas [23, 27].



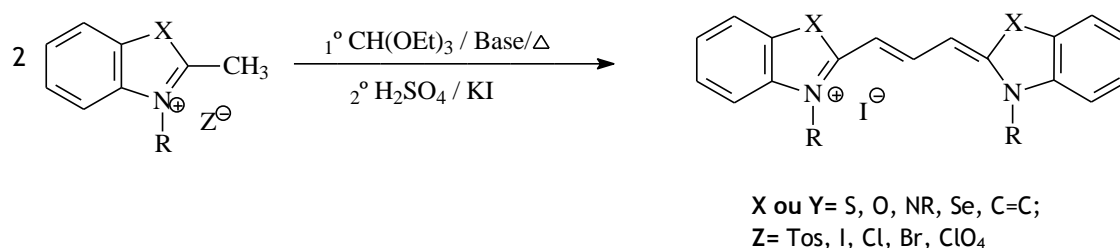
Esquema 1 - Síntese de monometinocianinas simétricas e assimétricas;

A síntese de cianinas básicas e tradicionais foi sumarizada por Venkataraman [27], podendo observar-se exemplos destas sínteses no esquema 2.

Nome da Cianina	Esquema alusivo da síntese das cianinas
Monometina	
Trimetina ($n=1$)	
Pentametina ($n=2$)	
Heptametina a ($n=3$)	

Esquema 2 - Síntese de alguns tipos de cianina [22].

As cianinas trimetino, também denominadas por carbocianinas, podem ser sintetizadas pelo método do ortoéster devido aos elevados rendimentos obtidos. O método do ortoéster, como se verifica no esquema 3 inicia-se com o aquecimento do sal quaternário contendo um grupo metilo reactivo, com um ortoéster, em piridina [23, 27].

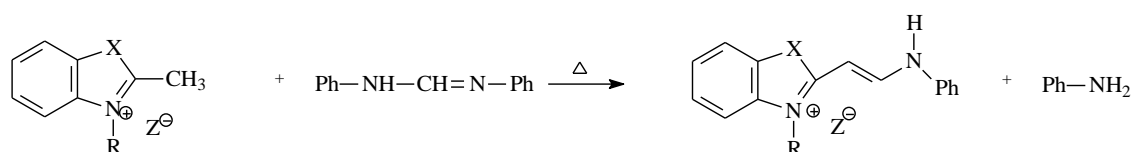


Esquema 3 - Síntese de carbocianinas simétricas;

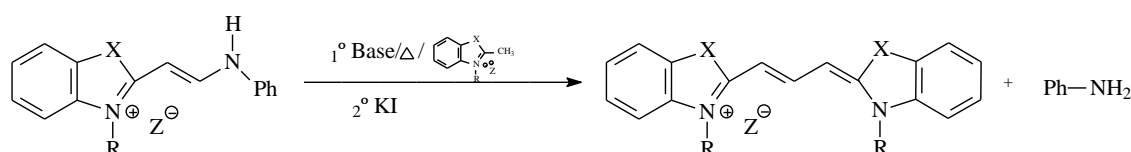
Quando se utilizam sais benzimidazole, utiliza-se fenol com trietilenamida em substituição da piridina uma vez que apresenta melhores rendimentos. Ao utilizar-se ortoésteres, ortoacetatos e ortopropionatos por exemplo, que são derivados de ácidos de maiores pesos moleculares, é permitida a introdução de grupos alquila na posição β da cadeia polimetínica [23, 27].

As carbocianinas podem também ser sintetizadas pelo método da difenilformamida, no qual, como podemos verificar no esquema 4 em 1., ocorre condensação do sal quaternário heterocíclico 2-metilsubstituído com a difenilformamida, originando um sal anilinovinilo. Por condensação deste sal quaternário obtido com o mesmo sal quaternário de partida, obtem-se uma carbocianina simétrica em 2.a). No caso de se pretender obter uma cianina assimétrica em 2.b), realiza-se condensação do sal obtido com um sal diferente [23, 27].

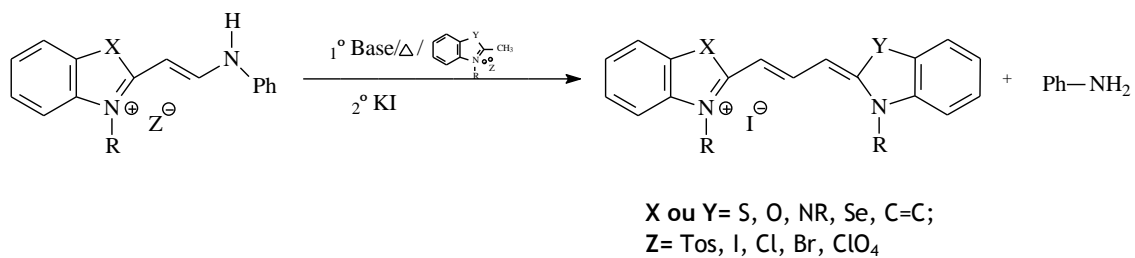
1.



2.a)



2.b)



Esquema 4 - Síntese de carbocianinas pelo método da difenilformamida.

Relativamente às cianinas pentametina podem ser sintetizadas por um método semelhante com um passo intermédio, como poderemos verificar no esquema 2, podendo-se obter também cianinas assimétricas. Neste último caso obtêm-se algumas cianinas simétricas como subprodutos. As cianinas heptametina são sintetizadas por um método similar [23, 27].

1.2 Cromatografia

O termo cromatografia (do grego: *chroma*, cor + *graphein*, grafia) surgiu pelas mãos do botânico Russo Mikhail Tswett, que em 1903, descreveu a separação dos pigmentos das folhas da planta, em solução, pelo uso de adsorventes sólidos. A este processo de separação chamou cromatografia, devido principalmente a obtenção de bandas coloridas que se formaram nos adsorventes [28-30].

Segundo as normas da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) a cromatografia é definida como um método usado primariamente para a separação de componentes de uma amostra, no qual os componentes estão distribuídos entre duas fases, sendo uma estacionária e a outra móvel. A fase estacionária pode ser sólida ou um líquido suportado num sólido ou num gel. Esta fase pode ser empacotada numa coluna, espalhada como uma camada, ou distribuída na forma de filme, etc. A fase móvel pode ser líquida ou gasosa [31]. O principal objectivo em todos os métodos cromatográficos é obter a separação individual dos componentes numa determinada amostra [32, 33]. Esta técnica envolve no geral os seguintes passos:

1. Equilíbrio das fases
2. Adsorção ou retenção de uma ou várias substâncias na fase estacionária;
3. Separação da substância adsorvida pela fase móvel;
4. Recuperação das substâncias por fluxo contínuo da fase móvel, ou eluição;
5. Análise qualitativa e quantitativa da substância eluída [34].

Este método de separação baseia-se na diferença de velocidade relativa que cada componente de uma mistura apresenta num meio poroso (fase estacionária) sob a influência de alguns solventes ou gases (fase móvel) [34]. Dependendo das fases móvel e estacionária usadas, a separação ocorre pela combinação de dois ou mais factores, como taxa de migração, acção capilar, adsorção medida, etc. Assim, os métodos cromatográficos podem ser classificados segundo as fases estacionária e móvel utilizadas como poderemos verificar na tabela 2 [30, 31, 34].

Tabela 2 - Classificação dos métodos cromatográficos

Natureza da fase móvel	Natureza da fase Estacionária	Nome
Gás	Sólido	Cromatografia gás-sólido
	Líquido	Cromatografia gás-líquido
Líquido	Sólido	Cromatografia líquido-sólido
	Líquido	Cromatografia líquido-líquido

Os métodos cromatográficos podem também ser classificados de acordo com as interacções dominantes entre a fase estacionária e a substância que se pretende separar [28].

Por exemplo a cromatografia de troca iónica (em 3 da figura 3) baseia-se em interações iónicas entre a fase estacionária e a molécula que se pretende isolar [28, 35]. Existem ainda outros tipos de cromatografia em que a separação do composto é dependente das suas propriedades biológicas e físico-químicas nomeadamente, e como poderemos verificar na figura 3, em 1 está presente cromatografia de filtração em gel, cromatografia de interações hidrofóbicas em 2, em 4 cromatografia de afinidade (com corantes, iões metálicos imobilizados, bioafinidade), e de fase reversa em 5. Estas técnicas baseiam-se no tamanho molecular, características bioespecíficas e hidrofobicidade [28, 35-37].

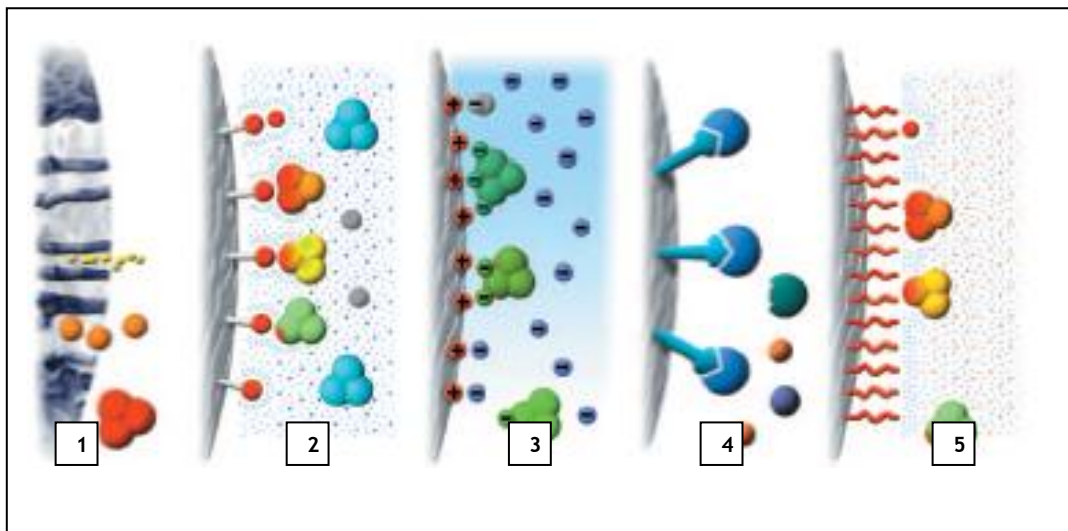


Figura 3 - Representação dos 5 tipos de cromatografia.

O desenvolvimento e optimização de técnicas e métodos de separação e purificação de proteínas têm vindo a gerar grande interesse, pois cada vez se torna mais importante a obtenção de um produto com maior grau de purificação, verificando-se ser uma abordagem crucial para evoluir na investigação biomédica e biotecnológica [36, 38, 39]. A cromatografia tem dominado o ramo da purificação proteica, devido ao seu elevado poder de resolução [36].

1.2.1 Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade foi introduzida por Cuatrecasa *et al.* em 1968, e desde então, tem vindo a ser utilizada em diversas áreas. É um método de separação de macromoléculas e baseia-se nas propriedades de ligação específica e reversível entre a molécula a ser isolada e uma molécula fixa numa coluna, através de um reconhecimento molecular de elevada especificidade [40-43].

Na figura 4, podemos verificar o processo de cromatografia de afinidade, que se baseia no reconhecimento da molécula alvo por uma molécula específica, designada de ligando. Este ligando é imobilizado num suporte insolúvel, denominado matriz, que é um material polimérico apresentado geralmente na forma de esferas ou membrana [42, 44].

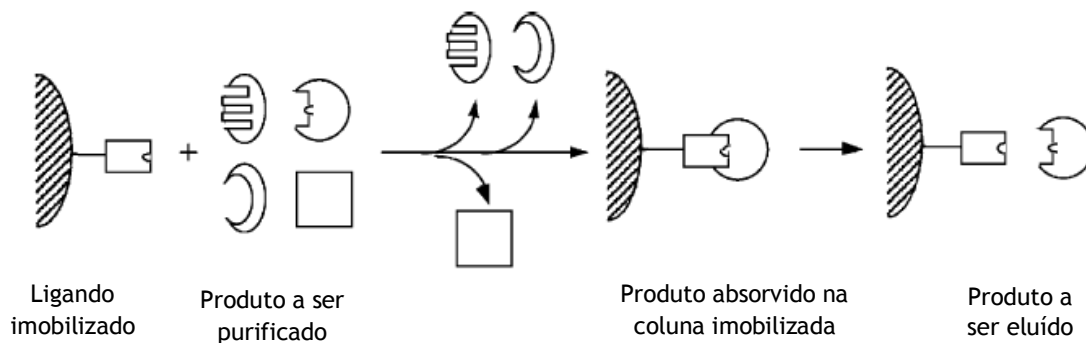


Figura 4 - Representação do processo de Cromatografia de afinidade [40].

A molécula que se pretende isolar, denominada de molécula alvo, é capturada selectivamente pelo ligando previamente imobilizado na matriz, pela simples passagem de uma solução, contendo a molécula alvo em condições favoráveis, por uma coluna cromatográfica. Posteriormente a molécula alvo é então libertada, ou eluída, usando soluções apropriadas a condições de eluição. Para tal ajusta-se por exemplo o pH, força iónica ou temperatura por adição de solventes específicos ou ligados competitivos, para que a interacção entre o ligando e a molécula alvo seja quebrada e a molécula alvo seja obtida na forma purificada. Após a eluição da molécula alvo, por exemplo uma determinada proteína é obtida na forma pura e concentrada e, após regeneração da coluna de afinidade, esta pode já ser reutilizada [42, 45].

A eluição pode ocorrer de três maneiras, através de eluição isocrática, eluição não específica e eluição biospecífica, dependendo da constante de associação do complexo ligando-analito. Se o ligando tem uma fraca ou moderada afinidade para o analito, a eluição do analito pode ser realizada sob condições isocráticas, e o tampão aplicado para realizar a ligação pode ser utilizado como tampão de eluição. Quando o ligando tem uma forte afinidade para o analito, este pode ser libertado, eluído, por eluição não-específica, por exemplo por adição de tampão com diferente pH, temperatura, força iónica, ou polaridade, ou por eluição biospecífica. Em último caso utiliza-se um agente competitivo, que liga mais fortemente ao ligando do que o analito usado forçando assim a eluição do analito [45].

Esta técnica é muito usada para separar moléculas bioactivas de moléculas desnaturadas ou de formas funcionalmente diferentes, para isolar substâncias puras presentes em pequena concentração num volume de amostra ou para remover contaminantes. Permite ainda a purificação de proteínas com base nas suas funções biológicas, mas também nas propriedades físicas e químicas. As interações globais entre a molécula alvo e o ligando imobilizado na matriz é o resultado de várias interações envolvidas, nomeadamente electrostáticas, ligações de hidrogénio, hidrofóbicas e van der Waals [11, 46].

Para obter sucesso no processo de cromatografia de afinidade é necessária a selecção adequada dos seus constituintes, e como poderemos verificar na figura 5 um suporte cromatográfico é constituído por:

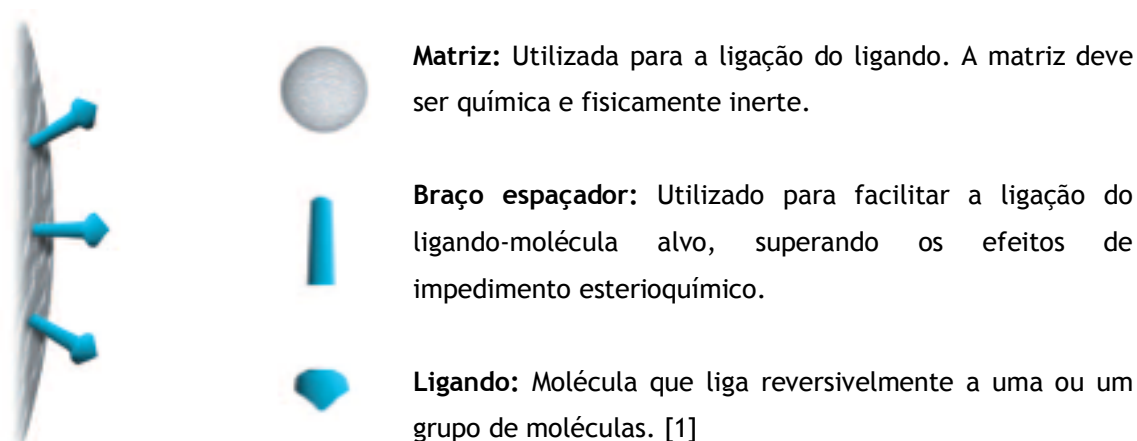


Figura 5 - Representação dos intervenientes da cromatografia de afinidade.

1.2.1.1 A matriz

A escolha da matriz é um passo importante em cromatografia de afinidade, devendo esta apresentar características importantes tais como:

- Baixa adsorção não específica, que está relacionada com grupos carregados à sua superfície, pois poderia comprometer a ligação do produto ao ligando, criando ligações não específicas;
- Conter na sua superfície grupos funcionais (hidroxilo, carboxilo, amina, etc.) para posterior derivatização e imobilização dos ligandos;
- Apresentar porosidade que permita a imobilização da maior quantidade de ligandos possível. Os poros devem ser largos, pois o ligando ou a molécula alvo, utilizados podem ser proteínas de tamanho grande, permitindo assim uma fácil difusão do produto durante os passos de separação, culminando numa rápida eluição/adsorção [42]. De acordo com a equação de Renquin [47] o tamanho do poro deve ser pelo menos cinco vezes maior do tamanho de uma biomolécula para o seu fácil acesso aos ligandos imobilizados. O tamanho do poro deve ser de pelo menos 300 Å ou maior, assumindo que o tamanho normal de uma proteína é 60 Å.

- Apresentar estabilidade física e química em diferentes condições como diferenças de pH, temperaturas, etc.
- Ser preferencialmente hidrofílica, pois reduz as adsorções não específicas e principalmente porque permite que esta possa expandir em meio aquoso, fornecendo mais área para possíveis ligações a ligandos.

É, no entanto, de salientar que uma grande quantidade de ligandos imobilizados na matriz não significa directamente elevada adsorção ou ligação do produto alvo ao ligando [42, 48].

Usualmente utilizam-se como matrizes a agarose, celulose, dextrano, sílica, policrilamidas de vidro, copolímeros de divinilbenzeno-estireno e politetrafluoretileno. Estão disponíveis comercialmente diversos materiais em forma de esferas nanométricas, sendo a celulose considerada como uma matriz de suporte útil para cromatografia. A sua utilização na forma de esferas do tamanho 50-400µm permite a aplicação de um elevado fluxo [42, 49]. A celulose é um polímero natural dos mais abundantes na natureza, é um polissacarídeo insolúvel em água, que contém unidades D-glucose unidas por ligações B-1,4 como representado na figura 6 [27, 50].

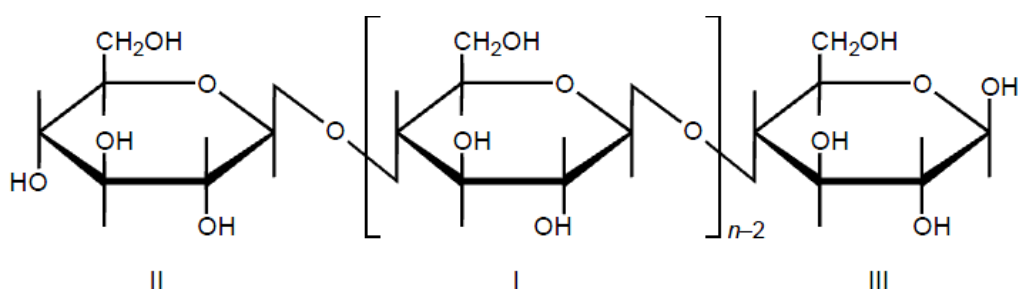


Figura 6 - Representação da celulose, projecção de Haworth [47]

A cadeia polimérica apresenta características essenciais, em I está presente a sequência de cadeias intermediárias, em II o grupo final não redutor, em III o grupo final redutor e as ligações glicosídicas. Cada unidade de glucose contém três grupos hidroxilo, e devido a conter uma elevada quantidade destes grupos hidroxilo, a celulose pode estabelecer ligações de hidrogénio, permitindo interacções com moléculas. A celulose em esferas apresenta elevada porosidade, boa estabilidade mecânica, e tem carácter hidrofílico [50].

1.2.1.2 Imobilização dos ligandos na matriz

Existem diversos métodos de imobilização dos ligandos em matrizes, que requerem na maioria das vezes diversos passos intermédios [42].

Na estratégia de imobilização verificada na figura 7, primeiramente a matriz é activada por um agente de activação, depois liga-se covalentemente um braço espaçador à

matriz nos pontos activos. O ligando reage então com a outra extremidade da molécula espaçadora.

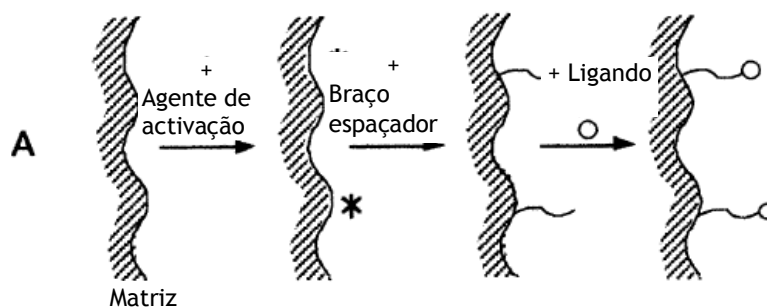


Figura 7 - Estratégia de imobilização do ligando ao suporte, através do braço espaçador.

Por outro lado a estratégia de imobilização do ligando ao suporte apresentada na figura 8 demonstra um processo de etapa única, no qual se realiza uma síntese prévia do conjugado braço espaçador-ligando seguida da ligação deste conjugado ao suporte [30, 42].

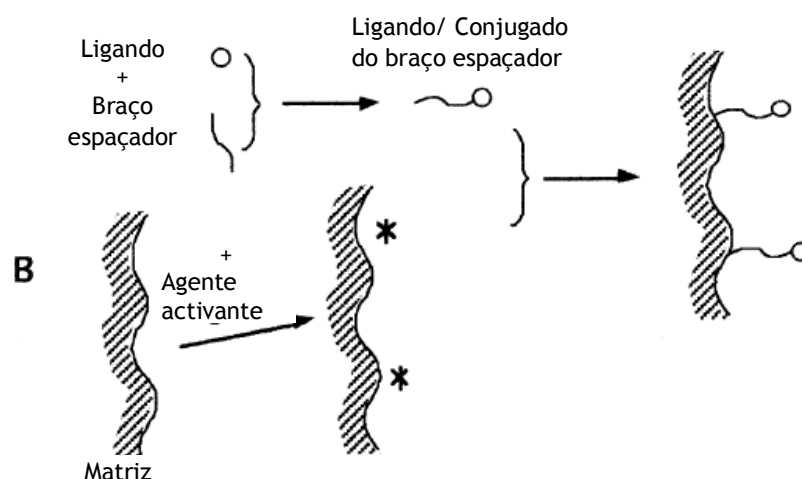


Figura 8 - Estratégia de imobilização do ligando ao suporte, através dos conjugados braço espaçador-ligando.

No caso da imobilização de corantes reactivos em matrizes, acontece muitas vezes por reacção directa entre os grupos reactivos (grupos hidroxilo) da matriz e as moléculas do corante (através dos átomos de cloro ou flúor) nos grupos triazinil [30, 42].

1.2.1.3 O Ligando

O ligando imobilizado é o factor chave que determina o sucesso do método de cromatografia de afinidade, pois é necessário promover interacções específicas com a biomolécula alvo [11]. Os ligandos podem ser denominados como naturais ou sintéticos. Existem também ligandos que têm origem biológica como é o caso de enzimas, coenzimas, cofactores, anticorpos, aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos e oligonucleótidos que promovem alta selectividade, apresentam baixa capacidade de ligação, e têm limitado ciclo de vida, necessitando de extensivos passos de purificação [11, 42, 51]. Surge então o desenvolvimento de ligandos sintéticos que combinam a selectividade dos ligandos naturais

com características novas como a elevada capacidade, durabilidade e o facto de serem mais baratos [49, 51, 52].

1.3 Cromatografia de afinidade com corantes como ligandos

A cromatografia de afinidade com corantes baseia-se na capacidade de um corante reactivo ligar a proteínas de modo selectivo ou reversível [53]. A generalidade dos corantes utilizados inicialmente neste método eram compostos monoclorotriazinas que foram desenvolvidos originalmente para a indústria têxtil. O grupo cloro reactivo na sua constituição permitia a facilidade de imobilização do corante triazina a uma matriz suporte, como a sefarose ou agarose e mais recentemente a membranas de nylon [54].

A descoberta inicial da capacidade que estes corantes tinham para ligar a proteínas, veio da observação de que o dextrano azul (um conjugado de cibacron azul FB-3A) usado como marcador em colunas de filtração em gel, retardava a eluição de certas proteínas [54, 55]. Assim, esta técnica começou a gerar interesse como método de purificação proteica, devido à variedade de vantagens que apresenta em comparação com outras formas de cromatografia de afinidade. Algumas dessas vantagens são referidas a seguir, sendo que o baixo custo e a fácil disponibilidade destes corantes, juntamente com a facilidade de imobilização especialmente em matrizes com grupo hidroxilo na sua constituição, representam as maiores vantagens perante outros ligandos de afinidade bioespecíficos tais como anticorpos, enzimas, cofactores e substratos [39, 42, 56].

Os corantes reactivos, como ligandos de afinidade para purificação proteica, apresentam vantagens tais como:

- Disponibilidade económica e em número considerável
- Fácil imobilização
- Evita a utilização de reagentes tóxicos e perigosos na activação da matriz
- Estabilidade a ataques biológicos e químicos
- Armazenamento do adsorvente sem perda de actividade
- Reutilizáveis (resistem á limpeza e esterilização)
- Fácil utilização para scale-up
- Elevada capacidade
- Especificidade média

Os corantes sintéticos, como ligandos em cromatografia de afinidade, ligam às proteínas através dos sítios de ligação da proteína imitando o substrato, co-inibidor ou outros agentes de ligação [57].

Um dos estudos pioneiros onde se utilizou corantes catiónicos imobilizados em agarose em cromatografia de afinidade revelou um comportamento cromatográfico diferente da tripsina em relação à quimotripsina e a BSA, sendo que a pseudoafinidade destas proteínas e os géis com cianina imobilizada, revelaram ser fortemente dependentes da composição da fase móvel [58].

Capítulo 2 - Materiais e Métodos/ Procedimentos Experimentais

Materiais utilizados

Os reagentes utilizados bem como os solventes eram analiticamente puros, sendo os reagentes comprados na Sigma Aldrich. A água utilizada foi destilada e purificada num sistema de purificação Mili-Q (Milipore Systems, Bedford, MA, USA).

As reacções foram acompanhadas por cromatografia de camada fina (c.c.f.) com uma mistura a 10% de metanol em diclorometano, sendo as placas de sílica Merck Kieselgel GF₂₅₄ com 0,2mm de espessura. Após a eluição, e secagem das placas, estas foram visualizadas à luz ultravioleta de comprimento de onda 254, 312 e 365 nm.

Os espectros de ultravioleta/ visível (UV/VIS) foram realizados num espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 6, utilizando como solvente etanol e células de 1cm de espessura.

Os espectros de infravermelho (IV) foram efectuados num espectrómetro de espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Mattson 5000 FTS.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão e carbono (RMN ¹H e ¹³C) realizaram-se num espectrofotómetro Brüker AC-250-P (250,13 e 62,90 MHz, respectivamente), utilizando como solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- *d*₆). Relativamente à descrição dos compostos é indicada pela seguinte ordem:

RMN ¹H - (resolução do aparelho; solvente); desvio químico (δ , em ppm); intensidade relativa (nH, número de protões); multiplicidade do sinal; constante de acoplamento (*J*, em Hz); atribuição do protão na molécula;

RMN ¹³C - solvente; desvio químico (δ , em ppm); atribuição do carbono na molécula.

Os pontos de fusão (pf) foram determinados num microscópio de ponto de fusão por capilar Büchi 530.

A celulose em esferas Perloza ST 50-75 μ m foram compradas em Iontosorb (Czech Republic), foram secas a 80°C, sob pressão reduzida na presença de pentóxido de fósforo por 16 horas, antes da sua utilização para imobilização dos ligandos.

Os padrões de proteína utilizados BSA, α -quimotripsina, lisozima foram também comprados na sigma-Aldrich Co.

Colunas cromatográficas descartáveis Econo - Pack ® (Bio-Rad, Hercules, CA).

Espectrofotómetro UV/ visível Ultrospec 3000 Pharmacia biotech.

2.2 Procedimentos experimentais

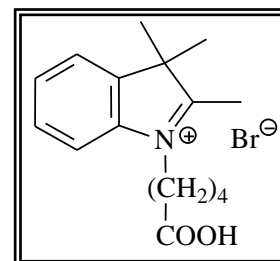
2.2.1 Síntese de Indocarbocianinas e imobilização do corante à celulose

2.2.1.1 Síntese dos sais quaternários precursores das Indocarbocianinas

Processo geral: Aqueceu-se a 150°C uma mistura de 2,3,3-trimetil-indole (1 equivalente) ou 1,1,2-trimetilbenz[e]indole (1 equivalente) com um ω -bromoácido (1,1 equivalentes). Acompanhou-se a reacção por c.c.f. com uma mistura a 10% de metanol em diclorometano. Uma vez que se formou um óleo acastanhado após 48 horas de reacção lavou-se com éter etílico para remover material de partida que não reagiu.

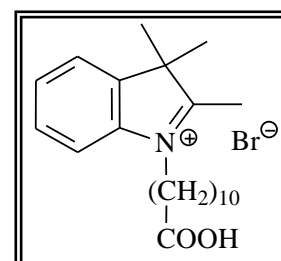
Brometo de 1(-4-carboxibutil)-2,3,3-trimetil-3H-indolio (2a)

Obtido a partir de 2,3,3-trimetil-indole (0,0187 mol) por aquecimento e agitação com ácido 5-bromovalérico (0,02057). Verificou-se a formação de um óleo castanho com aspecto viscoso que se lavou posteriormente com éter etílico para remover material de partida que não reagiu. O sal obtido não foi caracterizado devido à formação de um óleo viscoso.



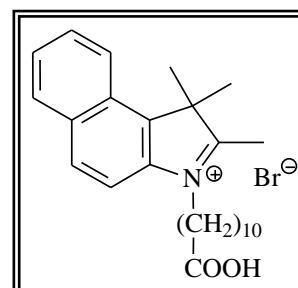
Brometo de 1(-10-carboxidecil)-2,3,3-trimetil-3H-indolio (2b)

Obtido a partir de 2,3,3-trimetil-indole (0,03109 mol) por aquecimento e agitação com ácido 11-bromoundecanoico (0,03420mol). Verificou-se a formação de um óleo castanho com aspecto viscoso que se lavou posteriormente com éter etílico para remover material de partida que não reagiu. O sal obtido não foi caracterizado devido à formação de um óleo viscoso.



Brometo de 3(-10 carboxideci)-1,1,2-trimetil-1H-benzo[e]indolio (2c)

Obtido a partir de 1,1,2-trimetilbenz[e]indole (0,024mol) por aquecimento e agitação com ácido 11-bromoundecanoico (0,0264 mol). Verificou-se a formação de um sólido arroxeadado que se lavou posteriormente com éter etílico para remover material de partida que não reagiu. Não foi realizada caracterização por métodos espectrofotométricos.



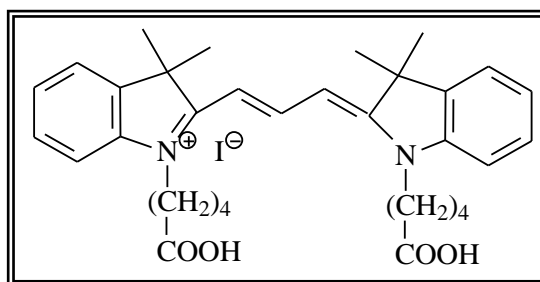
2.2.1.2 Síntese de indocarbocianinas

Processo geral (método do ortoéster): Aqueceu-se em refluxo uma mistura do sal quaternário sintetizado anteriormente, em piridina (10mL/ g de sal) e trietilortoformiato (2,04 equivalentes). Acompanhou-se a reacção por c.c.f. e após 12h verificou-se reacção completa. Adicionou-se éter etílico e deixou-se a 4°C em repouso durante a noite. A solução foi decantada, e o sólido rosa lavado várias vezes com éter etílico. Procedeu-se posteriormente à troca do contra-íão, no qual o sólido foi dissolvido numa solução de ácido sulfúrico a 5% em acetonitrilo com aquecimento. Adicionou-se 100 mL de uma solução aquosa de KI a 17% e manteve-se a mistura em ebulição por 5 minutos. Levou-se o balão ao evaporador rotativo para retirar o excesso de acetonitrilo, deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e colocou-se o balão a 4°C durante a noite. Decantou-se a cianina e lavou-se com éter etílico. O sólido foi seco sob vácuo e foi posteriormente caracterizado.

Iodeto de 1-(4-carboxibutil)-2-[(1E,3Z)-3-[1-(4-carboxibutil)-3,3-dimetilindoline-2-ilideno]prop-1-enil]-3,3-dimetil-3H-indólio

(Indocarbocianina 3a)

Obtida a partir do sal (2a) com aquecimento, em refluxo e agitação, com piridina e trietilortoformiato. Após realizada a troca do contra-íão obteve-se a cianina na forma de um sólido rosa dourado com $\eta = 60\%$; p.f. 95-97 °C; UV/ Vis: λ_{\max} (etanol) 552 nm; IV (ν_{\max} em cm^{-1} , KBr): 1557 (C=C arom), 1727 (C=O), 2852 e

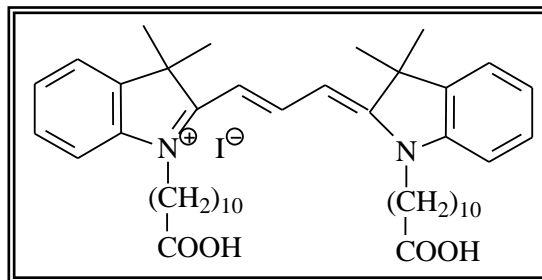


2926 ($\text{CH}_{\text{cadeia alquílica}}$); RMN ^1H (250MHz, d_6 -DMSO) δ ppm: 1.68-1.72 (m, 20H, 4 x CH_2 + 4 x CH_3), 2.30 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H, CH_2COOH) 4.13 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H, NCH_2), 6.57 (d, $J = 13.0$ Hz, 2H, α -CH), 7.30 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, ArH), 7.50 (m, 4H, ArH), 7.64 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, ArH), 8.35 (t, $J = 13.0$ Hz, 1H, β -CH); RMN ^{13}C (250MHz, d_6 -DMSO) δ ppm: 21.5 (CH_2), 26.7 (CH_2), 27.2 (CH_3), 33.0 (CH_2), 43.3 (CH_2), 51.0 (3-C), 102.3 (α -CH), 111.3 (CH), 122.3 (CH), 124.9 (CH), 128.4 (CH), 140.6 (C), 141.8 (C), 149.7 (β -CH), 173.1 (2-C), 174.2 (C=O).

iodeto de 1-(10-carboxidecil)-2-{{(1E,3Z)-3-[1-(10-carboxidecil)-3,3-dimetilindoline-2-ilideno]prop-1-enil}-3,3-dimetil-3H-indolio

(Indocarbocianina 3b)

Obtida a partir do sal quaternário (2b) em refluxo e agitação com piridina e trietilortoformiato. Após realizada a troca do contra-íon obteve-se a cianina na forma de um sólido rosa dourado com $\eta = 70\%$; p.f. 73-76 °C; UV/ Vis: λ_{\max} (etanol) 552 nm; IV (ν_{\max} em cm^{-1} , KBr): 1557 (C=C arom), 1707 (C=O), 2852 e

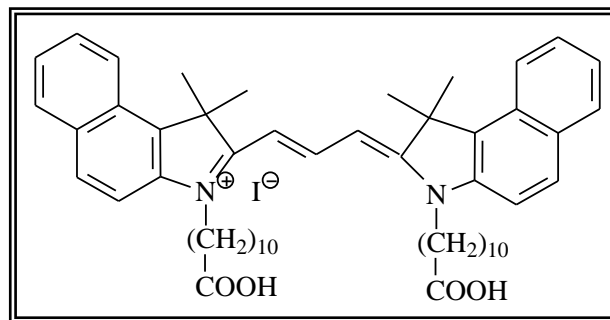


2925 (CH cadeia alquílica); RMN ^1H (250MHz, d_6 -DMSO) δ ppm: 1,20-1,47 (m, 28H, CH_2), 1.68-1.75 (m, 14H, $\text{CH}_2 + 4 \times \text{CH}_3$), 2.14 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H, CH_2COOH) 4.13 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H, NCH_2), 6.57 (d, $J = 13.5$ Hz, 2H, α -CH), 7.29 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, ArH), 7.40 (m, 4H, ArH), 7.64 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, ArH), 8.37 (t, $J = 13.5$ Hz, 1H, β -CH); RMN ^{13}C (250MHz, d_6 -DMSO) δ ppm: 24.2 (CH_2), 25.7 (CH_2), 27.1 (CH_3), 26.7 (CH_2), 27.1 (CH_2), 28.2 (CH_2), 28.4 (CH_2), 28.4 (CH_2), 28.5 (CH_2), 28,5 (CH_2), 33.5 (CH_2), 48.8 (3-C), 102.3 (α -CH), 111.3 (CH), 122.2 (CH), 124.9 (CH), 128.4 (CH), 140.5 (C), 141.8 (C), 149.5 (β -CH), 173.7 (2-C), 174.5 (C=O).

iodeto de 3-(10-carboxidecil)-2-{{(1E,3Z)-3-[3-(10-carboxidecil)-1,1-dimetil-1H-benzo[e]indol-2(3H)-ilideno]prop-1-enil}-1,1-dimetil-1H-benzo[e]indolio

(Indocarbocianina 3c)

Obtida a partir do sal quaternário (2c) em refluxo e agitação com piridina e trietilortoformiato. Após realizada a troca do contra-íon obteve-se a cianina na forma de cristais roxos com $\eta = 71\%$; p.f. 100-102 °C; UV/ Vis: λ_{\max} (etanol) 591 nm; IV (ν_{\max} em cm^{-1} , KBr):



1557 (C=C arom), 1727 (C=O), 2929 e 2969 (CH cadeia alquílica); RMN ^1H (250MHz, d_6 -DMSO) δ ppm: 1.17-1.48 (m, 28H, CH_2), 1.71-1.80 (m, 4H, CH_2), 2.00 (m, 12H, 4 x CH_3), 2.23 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H, CH_2COOH) 4.28 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H, NCH_2), 6.65 (d, $J = 14.0$ Hz, 2H, α -CH), 7.54 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, ArH), 7.69 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, ArH), 7.80 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, ArH), 8.10 (t, $J = 8.5$ Hz, 4H, ArH), 8.30 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, ArH), 8.58 (t, $J = 14.0$ Hz, 1H, β -CH); RMN ^{13}C (250MHz, d_6 -DMSO) δ ppm: 24.3 (CH_2), 25.9 (CH_2), 27.0 (CH_3), 27.3 (CH_2), 28.3 (CH_2), 28.6 (CH_2), 28.6 (CH_2), 28.7 (CH_2), 28.7 (CH_2), 33.1 (CH_2), 43.9 (CH_2), 50.5 (3-C), 102.0 (α -CH), 111.7 (CH), 122.1 (CH), 125.0 (CH), 127.3 (C), 127.8 (CH), 129.9 (CH), 130.4 (CH), 131.4 (C), 133.0 (C), 139.5 (C), 148.4 (β -CH), 173.2 (2-C), 175.0 (C=O).

2.2.1.3 Imobilização das Indocarbocianinas na celulose

Após secar a celulose em esferas por 16 horas, fizeram-se as seguintes misturas:

- **Matriz 1** - 4g de celulose + 1g de indocarbocianina 3b
- **Matriz 2** - 4g de celulose + 2g de indocarbocianina 3b
- **Matriz 3** - 4g de celulose + 1g de indocarbocianina 3c
- **Matriz 4** - 4g de celulose + 2g de indocarbocianina 3c
- **Matriz 5** - 4g de celulose + 2g de indocarbocianina 3a

Procedeu-se de igual forma para as 5 amostras, tendo a mistura sido homogeneizada num almofariz de ágata. A mistura foi transferida para um tubo de vidro e adicionaram-se umas gotas de *N,N*-dimetilformamida (DMF) e cobriu-se o tubo com folha de alumínio. A mistura foi então inserida num vaso de reacção sob vácuo, variando a temperatura consoante o tempo como poderemos ver na figura 9, até atingir 220°C [49].

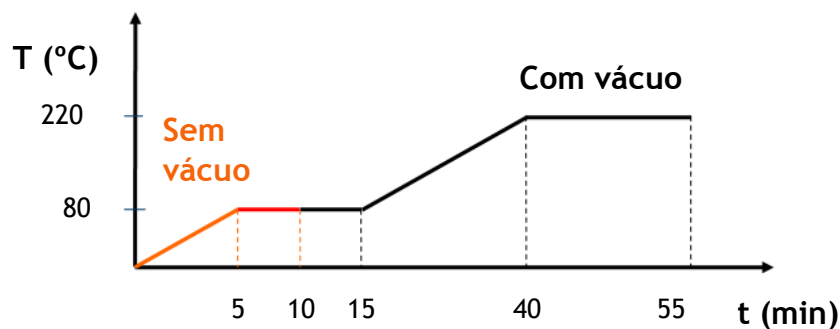


Figura 9 - Condições de derivatização da celulose.

A mistura celulose-corante obtida foi sequencialmente lavada com porções de DMF e etanol e tendo-se extraído por soxhlet com os mesmos solventes, o resto de corante que não ficou ligado. A amostra foi posteriormente seca durante 24 horas a 50°C, sob vácuo, com pentóxido de fósforo.

2.2.2 Cromatografia de afinidade das matrizes com indocarbocianinas

1. Preparação das soluções das proteínas

Prepararam-se soluções padrão de proteína, BSA, lisozima e α -quimotripsina, com concentração 25 mg proteína/ mL de tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8.

2. Preparação das colunas cromatográficas

As amostras de indocarbocianinas imobilizadas na celulose foram colocadas em água para hidratação das esferas de celulose, permitindo a sua expansão. Posteriormente empacotou-se o gel nas mini-colunas cromatográficas, de forma a obter-se um volume de cerca de 1mL de gel.

Após o empacotamento, lavaram-se bem as colunas com água destilada até não sair cor. Posteriormente estas foram equilibradas com 4mL de tampão Tris-HCl 10 mM a pH8 [49].

3. Realização dos ensaios cromatográficos

Ensaio preliminares

Foram realizados ensaios preliminares com o objectivo de estabelecer a concentração de proteína adequada para injeção na coluna cromatográfica. Após equilíbrio da coluna com 4 mL de tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8, injectaram-se 34 μ L de solução de proteína (BSA, lisozima ou α -quimotripsina) 25 mg/ mL em cada coluna. Adicionaram-se 4 mL de solução tampão Tris-HCl 10 mM pH 8 na coluna e recolheram-se fracções de 0,5 mL. Injectou-se posteriormente 4 mL de solução de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM pH 8 e recolheram-se fracções de 0,5 mL. As fracções de 0,5 mL foram então medidas no espectrofotómetro UV/ Vis a c.d.o. 280 nm. Posteriormente realizaram-se ensaios cromatográficos fazendo variar a concentração de proteína a injectar. Assim injectaram-se 34 μ L de proteína nas concentrações 12,5 e 18,75 mg/ mL. Após analisar os resultados ajustou-se a concentração de proteína a injectar, sendo que para a **matriz 1, 2, 3 e 5** injectaram-se 34 μ L de proteína nas concentrações 12,5 mg de proteína/ mL de tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8, já para a **matriz 4** injectaram-se 34 μ L de proteína nas concentrações 18,75 mg de proteína/ mL de tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8.

Ensaio com variação da concentração de NaCl

Após análise dos resultados, fez-se variar a concentração de NaCl (0,2 M; 0,1 M; 0,005 M e 0,001 M em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8), e realizaram-se novos ensaios cromatográficos, nas cinco colunas para duas proteínas, lisozima e α -quimotripsina. Cada ensaio foi dividido em 6 passos (1º passo - Equilíbrio da coluna com 4 mL de solução tampão Tris-HCl 10 mM pH 8; 2º passo - injeção da proteína nas concentrações indicadas anteriormente (lisozima ou α -quimotripsina); 3º passo - injeção 4 mL de solução tampão Tris-HCl 10 mM pH 8 e recolha de fracções de 0,5 mL; 4º passo - Injeção de 4 mL de solução de NaCl 0,2 M em Tris-HCl 10 mM pH 8 e recolha de fracções de 0,5 mL; 5º passo - Injeção de 4 mL de solução de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM pH 8 e recolha de fracções de 0,5 mL; 6º passo - As fracções de 0,5 mL foram medidas no espectrofotómetro a c.d.o. 280 nm. Realizaram-se ensaios para as duas proteínas, fazendo variar o 4º passo, no qual varia a injeção da solução de NaCl, passou para 0,1 M, 0,005 M e 0,001 M em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8.

Ensaio com variação de pH

Prepararam-se soluções tampão acetato de sódio (NaOAc) 10 mM a pH 4, 5, 6 e tampão Tris-HCl 10 mM a pH 7. Iniciaram-se os ensaios cromatográficos para as 3 proteínas (BSA, lisozima ou α -quimotripsina) a diferentes valores de pH. Começou-se pelo pH 4, realizando-se então ensaios cromatográficos para as 3 proteínas. Cada ensaio é dividido em 6 passos (1º passo - Equilíbrio da coluna com 4 mL de solução tampão Tris-HCl 10 mM pH 8; 2º passo - injeção da proteína nas concentrações indicadas anteriormente (lisozima, α -quimotripsina ou BSA); 3º passo - injeção 4 mL de solução tampão 10 mM pH 8 e recolha de fracções de 0,5 mL; 4º passo - Injeção de 4 mL de solução de NaOAc 10 mM a pH 4 e recolha de fracções de 0,5 mL; 5º passo - Injeção de 4 mL de solução de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM pH 8 e recolha de fracções de 0,5 mL; 6º passo - As fracções de 0,5 mL foram medidas no espectrofotómetro a c.d.o. 280nm. Para os ensaios seguintes, procedeu-se da mesma maneira para as proteínas lisozima e α -quimotripsina variando apenas o 4º passo, no qual a solução de eluição é tampão NaOAc a pH 5 e 6 de concentração 10 mM e tampão Tris-HCl a pH 7 de concentração 10 mM.

Ensaio com adição de sulfato de amónio

Realizaram-se ensaios cromatográficos para as 3 proteínas (BSA, lisozima ou α -quimotripsina) de forma a verificar interacções hidrofóbicas com adição de sulfato de amónio 1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8.

Cada ensaio é dividido em 5 passos (1º passo - Equilíbrio da coluna com 4 mL de solução sulfato de amónio 1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8; 2º passo - injeção da proteína (lisozima, α -quimotripsina ou BSA) nas concentrações: para a matriz 1, 2, 3 e 5 12,5mg de proteína/ mL solução sulfato de amónio 1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8, para a matriz 4 18,75mg/ mL solução sulfato de amónio 1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8; 3º passo - injeção 4 mL de solução sulfato de amónio 1,5 M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e recolha de fracções de 0,5 mL; 4º passo - injeção de 4 mL de solução tampão 10 mM pH 8 e recolha de fracções de 0,5 mL; 5º passo - As fracções de 0,5 mL foram medidas no espectrofotómetro a c.d.o. 280 nm.

Capítulo 3 - Resultados/ Discussão dos Resultados

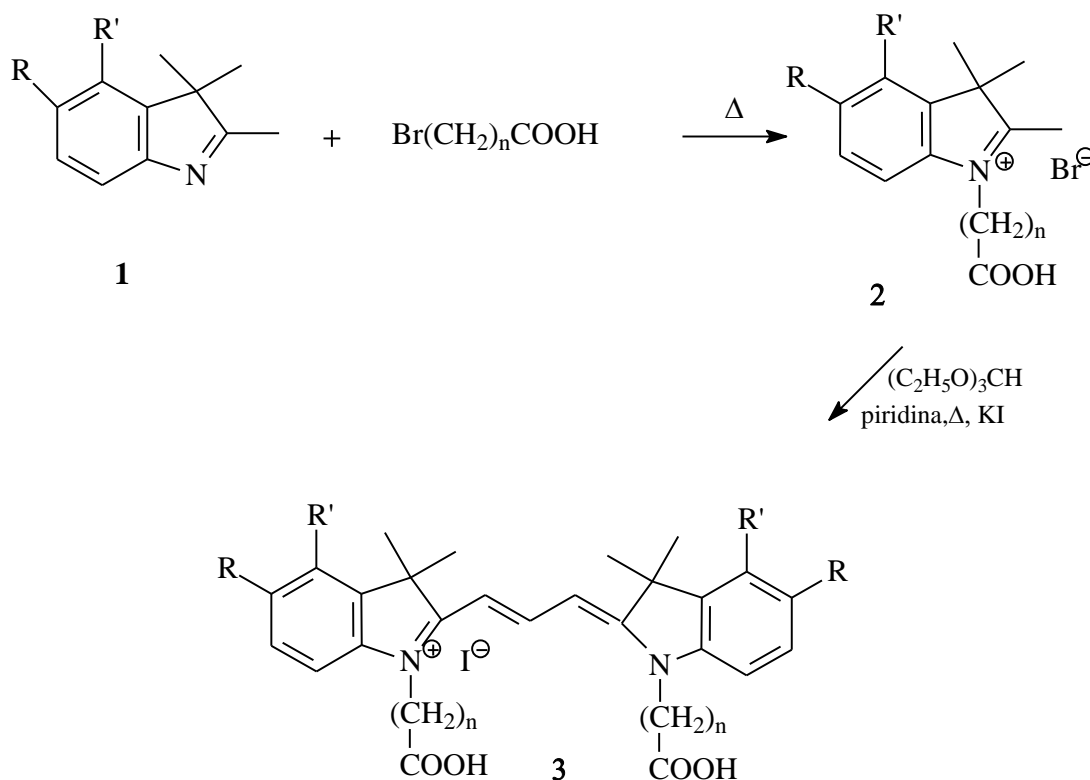
Este trabalho teve como objectivo a síntese de indocarbocianinas que funcionam como ligandos, em cromatografia de afinidade. Pretende-se verificar a existência ou não de interacções entre os ligandos e as proteínas padrão (lisozima, α -quimotripsina e BSA) com o intuito de obter a separação destas em diferentes condições de eluição. Assim numa primeira parte deste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados da síntese e imobilização das cianinas na celulose. Assim, serão indicados para cada indocarbocianina os rendimentos, p.f., caracterização espectroscópica por IV, UV/Vis, e por RMN ^1H e RMN ^{13}C . Nos espectros de IV, são indicadas as bandas características dos grupos funcionais das indocarbocianinas.

Será também analisado e discutido o método de imobilização das indocarbocianinas à celulose, bem como os resultados de análise elementar no qual se verifica a quantidade de ligandos imobilizados na celulose.

Numa segunda parte deste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados da cromatografia de afinidade realizada em mini-colunas com matrizes nas quais se imobilizaram as indocarbocianinas.

3.1 Síntese de indocarbocianinas

O método de síntese utilizado foi o método de ortoéster [12], no qual se realiza a síntese de sais quaternários, benz[e]indole e indole com ω -bromoácidos e posterior condensação na presença de um ortoéster (esquema 5).



1-3	a)	b)	c)
R	H	H	C*
R'	H	H	C*
n	4	10	10

Esquema 5 - Síntese das indocarbocianinas.

O método utilizado para obtenção dos sais quaternários foi o método de fusão, a aproximadamente 150°C no qual se verifica quaternização de um indole (1a e 1b) e um benz[e]indole (1c) com um ω -bromoácido. Posteriormente, realizou-se a síntese das indocarbocianinas pelo método do ortoéster, no qual os sais quaternários (2) em refluxo com piridina originam a respectiva base metilénica, que por condensação, na presença de um ortoéster dá origem a uma indocarbocianina. A adição de ácido sulfúrico com posterior adição de iodeto de potássio, tem como objectivo a troca do contra-íão de brometo para iodeto (3). A troca do contra-íão realizou-se para isolamento do produto final, visto que a cianina na forma de íão brometo não se conseguia isolar devido á formação de um óleo. Após a troca para o contra-íão iodeto isolou-se o produto com sucesso.

As cianinas sintetizadas possuem dois grupos carboxílicos, tornando a cianina reactiva, que por esterificação directa com a celulose e com aumento da temperatura conduz á imobilização da indocarbocianina na celulose. Dependendo do ω -bromoácido utilizado, fará variar o comprimento da cadeia carbonada, que irá funcionar como cadeia espaçadora. Assim em **1a** utilizou-se ácido 5-bromoalérico e em **1b** e **1c** utilizou-se ácido 11-bromoundecanóico.

As reacções foram acompanhadas por c.c.f. usando como eluente uma mistura de metanol em diclorometano a 10%, e foram visualizados a luz ultravioleta a c.d.o. 254, 312 e 365 nm.

Neste método de síntese obtiveram-se rendimentos satisfatórios referentes ao último passo de síntese das indocarbocianinas, verificando-se maior rendimento na síntese das indocarbocianinas **3b** e **3c**, revelando-se um método de fácil execução e isolamento de produtos.

Na tabela 3 estão presentes os dados físicos e espectroscópicos das indocarbocianinas sintetizadas pelo método referido. Verifica-se que as indocarbocianinas sintetizadas apresentam pontos de fusão relativamente baixos, e como apresentam uma diferença de 2 ou 3 °C verifica-se que estes compostos apresentam elevada pureza.

Na análise dos espectros no UV/ visível em etanol, verificaram-se bandas típicas de cianinas, bem definidas a 552 nm para a indocarbocianina **3a** e **3b**. Estas duas cianinas apresentam o mesmo valor de λ_{\max} uma vez que a têm estrutura semelhante, já que o que varia é apenas o comprimento da cadeia alquílica, facto que não interfere no valor de λ_{\max} . Para a indocarbocianina **3c** o valor de λ_{\max} é de 591 nm, apresentando um valor mais alto uma vez que contém na sua constituição mais um anel aromático.

Os espectros de IV das 3 cianinas apresentam uma banda forte a 1557 cm^{-1} referente á banda de deformação axial da ligação C=C correspondente ao anel aromático característico das cianinas. Apresentam bandas a 1707 cm^{-1} na indocarbocianina **3b**, e 1727 cm^{-1} nas indocarbocianinas **3a** e **3c** correspondentes á deformação axial C=O do grupo carboxílico. Verifica-se ainda bandas a 2852 cm^{-1} e 2926 cm^{-1} para a indocarbocianina **3a**, a 2852 cm^{-1} e 2925 cm^{-1} para a indocarbocianina **3b**, e a 2929 cm^{-1} e 2969 cm^{-1} para a indocarbocianina **3c**, bandas estas de deformação axial referentes a ligações C-H presentes na cadeia alquílica.

Para realização dos espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C utilizou-se como solvente DMSO- d_6 , e a atribuição dos picos baseou-se em valores tabelados pré-definidos e para identificação dos protões e carbonos utilizou-se a nomenclatura pela IUPAC [59-62].

Relativamente à análise dos espectros de RMN ^1H observa-se a presença de três zonas características das cianinas. Em campos mais altos (1-5 ppm) está presente a zona alifática, já numa zona intermédia encontra-se a zona vinílica (4,5-7,5 ppm) e em campos mais baixos encontra-se a zona dos grupos aromáticos e heteroaromáticos (6-9ppm) [59-61]. A indocarbocianina **3a** apresenta todos os sinais esperados. No que respeita aos protões dos grupos CH_2 referentes à cadeia alquílica e CH_3 encontram-se entre 1,68 e 1,72 ppm. Já a 2,30 ppm encontram-se os do grupo CH_2COOH , enquanto o grupo NCH_2 apresenta-se a 4,13 ppm.

Os prótons referentes aos grupos aromáticos encontram-se entre 7,30 e 7,64. Relativamente aos prótons do α -CH encontram-se a 6,57, enquanto os prótons referentes ao β -CH estão a 8,35.

O espectro de RMN ^1H da **indocarbocianina 3b** apresenta todos os sinais esperados. No que respeita aos prótons dos grupos CH_2 referentes à cadeia alquílica encontram-se entre 1,20 e 1,47 ppm. Verifica-se um multiplete a 1,68-1,75 ppm referente aos prótons do grupo CH_3 e CH_2 . A 2,14 ppm encontra-se o grupo CH_2COOH . Já o grupo NCH_2 apresenta-se a 4,13 ppm. Os prótons referentes aos grupos aromáticos encontram-se entre 7,29 e 7,64. Relativamente aos prótons do α -CH encontram-se a 6,57, enquanto os prótons referentes ao β -CH estão a 8,37.

A **indocarbocianina 3c** apresenta todos os sinais esperados. No que respeita aos prótons dos grupos CH_2 referentes à cadeia alquílica encontram-se entre 1,17 e 1,48 ppm assim como entre 1,71 e 1,80 ppm. Verifica-se um multiplete a 2,0 ppm referente aos prótons do grupo CH_3 . A 2,23 ppm encontra-se o grupo CH_2COOH . Já o grupo NCH_2 apresenta-se a 4,28 ppm. Os prótons referentes aos grupos aromáticos encontram-se entre 7,54 e 8,30. Relativamente aos prótons do α -CH encontram-se a 6,65, enquanto os prótons referentes ao β -CH estão a 8,58. Verifica-se um aumento dos valores de ppm em relação à indocarbocianina 3b uma vez que este composto tem mais um anel aromático na posição 5.

Nos espectros de RMN ^{13}C existe também a presença de uma zona alifática (0-60 ppm), de uma zona vinílica (100-150 ppm), de uma zona de carbonos aromáticos e heteroaromáticos (100-165 ppm) e verifica-se também o carbono quaternário na zona dos 150 a 180 ppm e o grupo carboxílico encontra-se também nessa zona, uma vez que as indocarbocianinas apresentam grupos carboxílicos na sua constituição.

A **indocarbocianina 3a** apresenta todos os sinais esperados. No que se refere aos carbonos dos grupos CH_2 respeitantes à cadeia alquílica encontram-se entre 21,5 e 43,3 ppm. A 27,2 ppm encontra-se o grupo CH_3 . Já os carbonos quaternários referentes aos grupos aromáticos estão presentes a 140,6 e 141,8, enquanto o carbono quaternário da posição 3 está presente a 51,0 ppm. Já os carbonos quaternários referentes ao grupo carboxílico verificam-se a 174,2 ppm e o 2-C encontra-se a 173,1 ppm. Os carbonos CH estão presentes entre 111,3 e 128,4 ppm. Os carbonos referentes a α -CH e β -CH estão presentes a 102,3 e 149,7 ppm respectivamente.

A **indocarbocianina 3b** apresenta todos os sinais esperados. No que se refere aos carbonos dos grupos CH_2 respeitantes à cadeia alquílica entre 24,2 e 33,5 ppm. A 27,1 ppm encontra-se o grupo CH_3 . Já os carbonos quaternários referentes aos grupos aromáticos estão presentes a 140,5 e 141,8, enquanto o carbono quaternário da posição 3 está presente a 50,5 ppm. Já os carbonos quaternários referentes ao grupo carboxílico verificam-se a 174,5 ppm e o 2-C encontra-se a 173,2 e ppm. Os carbonos CH estão presentes entre 111,3 e 130,4 ppm. Os carbonos referentes a α -CH e β -CH estão presentes a 102,3 e 149,5 ppm respectivamente.

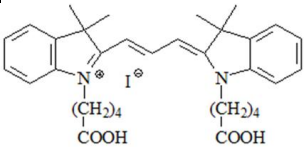
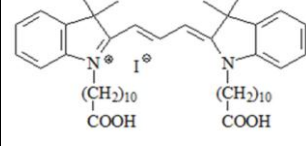
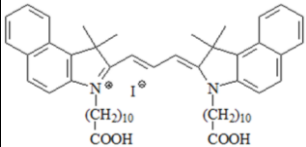
A indocarbocianina **3c** apresenta todos os sinais esperados. No que se refere aos carbonos dos grupos CH₂ da cadeia alquílica entre 24,3 e 43,9 ppm. A 27,0 ppm encontra-se o grupo CH₃. Já os carbonos quaternários referentes aos grupos aromáticos estão presentes entre 127,3 e 139,5, enquanto o carbono quaternário da posição 3 está presente a 50,5ppm. Já os carbonos quaternários referentes ao grupo carboxílico verificam-se a 175,0 ppm e o 2-C encontra-se a 173,2 ppm. Os carbonos CH estão presentes entre 111,7 e 130,4 ppm. Os carbonos referentes a α-CH e β-CH estão presentes a 102,0 e 148,4 ppm respectivamente.

O método de ligação da celulose às cianinas demonstrou ser eficaz, uma vez que as matrizes apresentavam cor, o que significa a presença de cianina. No entanto para se tentar quantificar a porção de indocarbocianinas ligadas à celulose fez-se análise elementar. Esta técnica baseia-se na quantificação dos átomos de azoto, carbono, hidrogénio e enxofre presentes numa amostra. Tendo em atenção que a celulose não tem azoto na sua constituição, esta técnica permite calcular a quantidade de azoto e conseqüentemente de cianina presente, verificando-se então a quantidade de cianina ligada à celulose [63]. De acordo com a equação:

$$Q = \frac{\% N}{2,8} \text{ (mmol corante/ g celulose corada)}$$

Verificou-se para a **matriz 4** uma percentagem de azoto 0,45% e nas outras matrizes não foi detectável, o que indica que a quantidade de ligandos era inferior ao limite de detecção do método, que é de 0,09%. Assim para a **matriz 4** verifica-se um valor de *Q* de 0,16 nmol corante/ g celulose corada.

Tabela 3 - Dados físicos e espectroscópicos das indocarbocianinas sintetizadas.

Estrutura	η (%)	P.f. (°C)	λ_{\max} (nm)	umax (cm ⁻¹)	RMN ¹ H (250MHz, d ₆ -DMSO) δ ppm	RMN ¹³ C (250MHz, d ₆ -DMSO) δ ppm
 <p>3a</p>	60	95-97	552	1557 (C=C arom) 1727 (C=O) 2852 (CH cadeia alquílica) 2926 (CH cadeia alquílica)	1.68-1.72 (m, 20H, 4 x CH ₂ + 4 x CH ₃), 2.30 (t, J = 7.0 Hz, 4H, CH ₂ COOH) 4.13 (t, J = 6.0 Hz, 4H, NCH ₂), 6.57 (d, J = 13.0 Hz, 2H, α -CH), 7.30 (t, J = 7.0 Hz, 2H, ArH), 7.50 (m, 4H, ArH), 7.64 (d, J = 7.0 Hz, 2H, ArH), 8.35 (t, J = 13.0 Hz, 1H, β -CH)	21.5 (CH ₂), 26.7 (CH ₂), 27.2 (CH ₃), 33.0 (CH ₂), 43.3 (CH ₂), 51.0 (3-C), 102.3 (α -CH), 111.3 (CH), 122.3 (CH), 124.9 (CH), 128.4 (CH), 140.6 (C), 141.8 (C), 149.7 (β -CH), 173.1 (2-C), 174.2 (C=O).
 <p>3b</p>	70	73-76	552	1557 (C=C arom) 1707 (C=O) 2852 (CH cadeia alquílica) 2925 (CH cadeia alquílica)	1,20-1,47 (m, 28H, CH ₂), 1.68-1.75 (m, 14H, CH ₂ + 4xCH ₃), 2.14 (t, J = 7.0 Hz, 4H, CH ₂ COOH) 4.13 (t, J = 7.0 Hz, 4H, NCH ₂), 6.57 (d, J = 13.5 Hz, 2H, α -CH), 7.29 (t, J = 7.0 Hz, 2H, ArH), 7.40 (m, 4H, ArH), 7.64 (d, J = 7.5 Hz, 2H, ArH), 8.37 (t, J = 13.5 Hz, 1H, β -CH)	24.2 (CH ₂), 25.7 (CH ₂), 27.1 (CH ₃), 26.7 (CH ₂), 27.1 (CH ₂), 28.2 (CH ₂), 28.4 (CH ₂), 28.4 (CH ₂), 28.5 (CH ₂), 28.5 (CH ₂), 33.5 (CH ₂), 48.8 (3-C), 102.3 (α -CH), 111.3 (CH), 122.2 (CH), 124.9 (CH), 128.4 (CH), 140.5 (C), 141.8 (C), 149.5 (β -CH), 173.7 (2-C), 174.5 (C=O).
 <p>3c</p>	71	100-102	591	1557 (C=C arom) 1727 (C=O) 2929 (CH cadeia alquílica) 2969 (CH cadeia alquílica)	1.17-1.48 (m, 28H, CH ₂), 1.71-1.80 (m, 4H, CH ₂), 2.00 (m, 12H, 4 x CH ₃), 2.23 (t, J = 7.5 Hz, 4H, CH ₂ COOH) 4.28 (t, J = 7.5 Hz, 4H, NCH ₂), 6.65 (d, J = 14.0 Hz, 2H, α -CH), 7.54 (t, J = 7.5 Hz, 2H, ArH), 7.69 (t, J = 8.0 Hz, 2H, ArH), 7.80 (d, J = 8.5 Hz, 2H, ArH), 8.10 (t, J = 8.5 Hz, 4H, ArH), 8.30 (d, J = 8.5 Hz, 2H, ArH), 8.58 (t, J = 14.0 Hz, 1H, β -CH);	24.3 (CH ₂), 25.9 (CH ₂), 27.0 (CH ₃), 27.3 (CH ₂), 28.3 (CH ₂), 28.6 (CH ₂), 28.6 (CH ₂), 28.7 (CH ₂), 28.7 (CH ₂), 33.1 (CH ₂), 43.9 (CH ₂), 50.5 (3-C), 102.0 (α -CH), 111.7 (CH), 122.1 (CH), 125.0 (CH), 127.3 (C), 127.8 (CH), 129.9 (CH), 130.4 (CH), 131.4 (C), 133.0 (C), 139.5 (C), 148.4 (β -CH), 173.2 (2-C), 175.0 (C=O).

3.2 Cromatografia de afinidade com indocarbocianinas como ligandos

O estudo das interações de afinidade foi desenvolvido pela realização de ensaios cromatográficos em colunas empacotadas com cada matriz, pretendendo verificar-se a existência de interações entre as proteínas padrão BSA, α -quimotripsina e lisozima e os ligandos presentes nas matrizes 1, 2, 3, 4 e 5. Os cromatogramas foram traçados a partir dos valores de densidade óptica obtidos em cada fracção, a c.d.o. de 280nm.

Entre as 5 matrizes varia a estrutura da indocarbocianina imobilizada assim como a quantidade de ligando usado na preparação dos suportes. Assim, a matriz 1 contém indocarbocianina 3b, tal como a matriz 2, sendo que esta última foi preparada misturando-se o dobro quantidade de cianina que a matriz 1. Já a matriz 3 contém indocarbocianina 3c como ligando, do mesmo modo que a matriz 4, o que difere é o facto de esta última ter sido preparada misturando-se o dobro de quantidade de cianina na imobilização. A matriz 5 contém indocarbocianina 3a. Deste modo, pretende-se avaliar, não só as diferenças das possíveis interações entre as proteínas e os ligandos com diferentes estruturas, como também verificar de que forma a quantidade de cianina homogeneizada na celulose interfere nas interações proteína/ligando. No que se refere às interações estabelecidas entre o ligando e as proteínas e, tendo em conta a estrutura catiónica das cianinas prevê-se que estabeleçam interações iónicas. Como têm na sua constituição cadeias alquílicas antecipa-se também a possibilidade da existência de interações hidrofóbicas, assim como interações π - π uma vez que contêm dois núcleos heterocíclicos que estão ligados por uma cadeia de ligações duplas conjugadas.

Na Figura10, que se segue, está representada a constituição das matrizes.

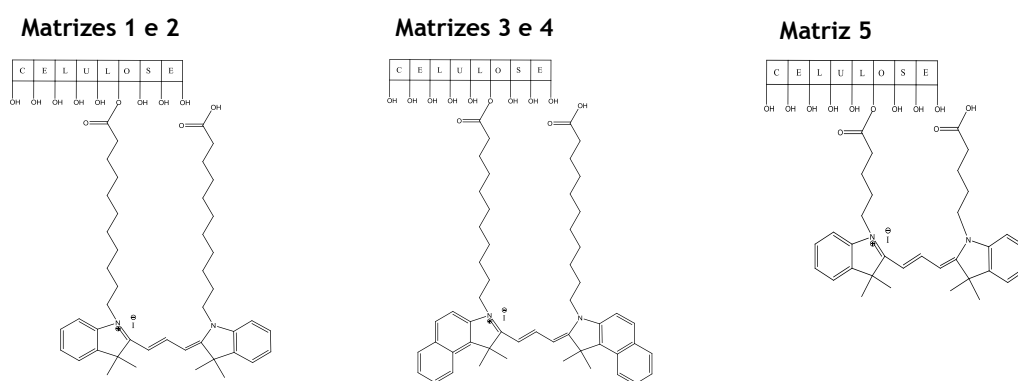


Figura 10 - Constituição das matrizes.

O passo inicial para a realização da cromatografia de afinidade com os corantes foi verificar se a concentração de proteína descrita seria adequada para a realização dos ensaios [49]. Esse estudo foi efectuado em ensaios preliminares, e como se pode verificar na figura 11 A, concentração 25mg de lisozima/ mL de tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8 verifica-se que, para a matriz 1, existe ligação da proteína à matriz, uma vez que uma parte da proteína fica

ligada. No entanto, a ligação não é total, uma vez que existe eluição, o que leva a concluir que existe proteína em excesso para a quantidade de ligandos presente. Assim sendo, diminuiu-se a concentração de lisozima inicial para 12,5 mg de proteína/ mL de tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8 e, na figura 11 B, pode verificar-se que nas 8 fracções recolhidas com adição de tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8, existe ligação da proteína à matriz uma vez que apenas uma quantidade vestigial de proteína elui. Já com a adição de NaCl 1M verifica-se eluição completa da proteína que se encontrava ligada (fracção 9).

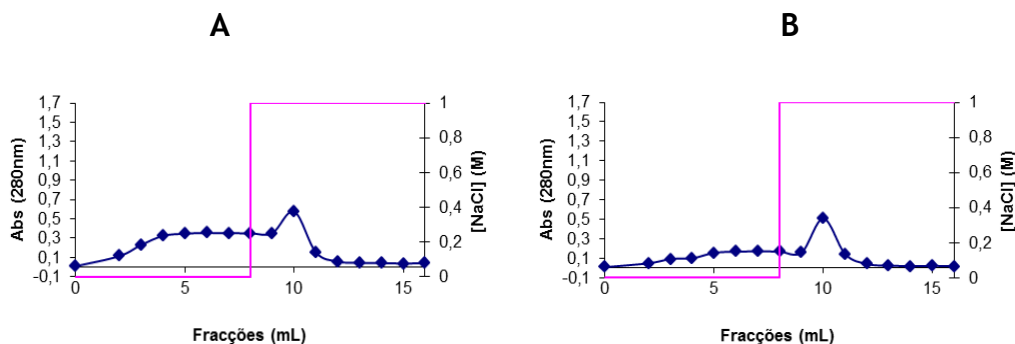


Figura 11 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 1. Ligação: tampão Tris-HCl 10mM a pH 8; Eluição: tampão Tris-HCl 10 mM com 1 M de NaCl a pH 8. Em A injeção de 34 μ L de lisozima (25 mg/ mL); Em B injeção de 34 μ L de lisozima (12,5 mg/ mL).

Relativamente às matrizes 2, 3, 4 e 5, o comportamento de ligação da lisozima foi semelhante, verificando-se que a proteína injectada na concentração de 25mg/ mL era excessiva. Realizaram-se também ensaios, no qual se injectou uma concentração de proteína intermédia, e verificou-se que para a matriz 4 esta concentração seria a mais adequada. Como poderemos verificar na figura 12 a concentração de proteína injectada foi de 18,75 mg/ mL no qual se verificou ligação e posterior eluição com adição de NaCl 1 M.

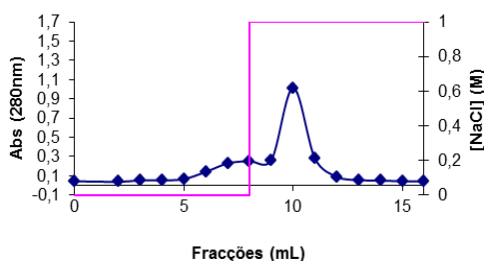


Figura 12 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 4. Ligação: tampão Tris-HCl 10mM a pH 8; Eluição: tampão Tris-HCl 10 mM com 1 M de NaCl a pH 8. Injeção de 34 μ L de lisozima (18,75 mg/ mL).

Os ensaios realizados com a proteína BSA revelaram que esta proteína interage fortemente com os ligandos, uma vez que nem com a adição de elevadas concentrações de NaCl se promoveu eluição. Como se pode verificar na figura 13, a BSA estabelece uma forte interacção com a matriz 1 promovendo-se a ligação com a adição de tampão Tris-HCl 10 mM

a pH 8, verificando-se a eluição de uma pequena quantidade de proteína não significativa, considerando neste caso que ocorreu ligação completa. Posteriormente ao adicionar-se NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH8, verificou-se que a interação se mantém, não tendo sido possível promover a eluição da BSA, nestas condições.

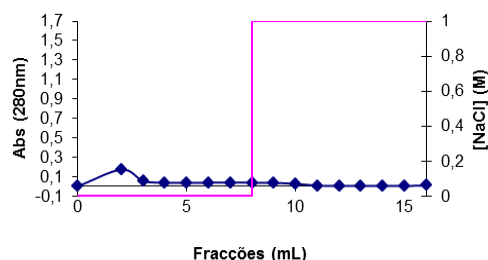


Figura 13 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 1. Ligação: tampão Tris-HCl 10mM a pH 8; Eluição: tampão Tris-HCl 10 mM com 1 M de NaCl a pH 8. Injeção de 34 μ L de BSA (12,5 mg/ mL);

Relativamente ao estudo das matrizes 2, 3, 4, e 5 verificou-se que o comportamento da BSA é muito semelhante, observando-se também com as restantes matrizes interações fortes que impediram a eluição da proteína mesmo com a adição de NaCl 1M.

A proteína α -quimotripsina demonstrou comportamento ligação semelhante à lisozima, como poderemos verificar na figura 14, verificando-se que nas primeiras 8 frações recolhidas, correspondentes à adição do tampão de ligação Tris-HCl, se promoveu a ligação da proteína à matriz 1. A eluição foi conseguida com posterior adição de NaCl 1 M, verificando-se eluição completa na fração 10.

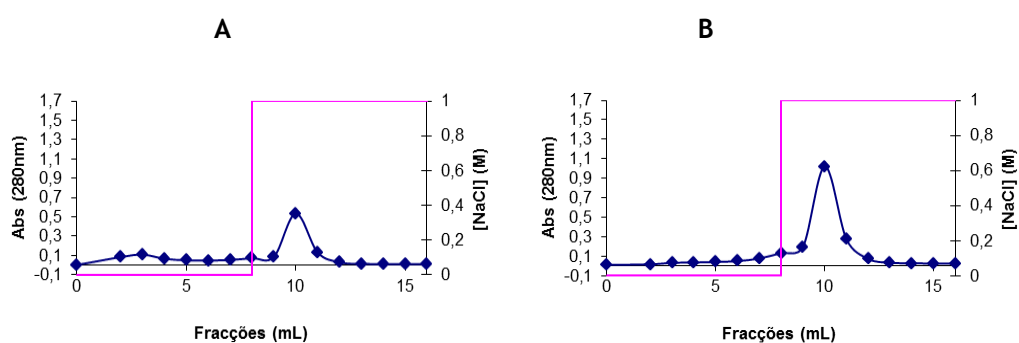


Figura 14 - Cromatografia de afinidade realizada nas matrizes 1 e 4. Ligação: tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8; Eluição: tampão Tris-HCl 10 mM com 1 M de NaCl a pH 8. A refere-se ao ensaio com a matriz 1 - injeção de 34 μ L de α -quimotripsina (12,5 mg/mL); Em B está presente a matriz 4 - injeção de 34 μ L de a quimotripsina (18,75 mg/mL).

Relativamente às matrizes 2, 3, e 5 o comportamento da α -quimotripsina é muito semelhante. Quanto ao cromatograma referente à matriz 4 verifica-se um valor de absorvância mais elevado na fracção 10 do que observado nos ensaios das outras matrizes, sugerindo a existência de uma maior quantidade de ligandos e conseqüentemente a possibilidade de ligação e eluição de uma maior quantidade de proteína.

De uma maneira geral os ensaios demonstraram a existência de interações entre as 3 proteínas padrão e as 5 matrizes. Assim, visto que o tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8 promove a ligação proteína/ matriz e que, ao injectar-se NaCl 1M em Tris-HCl 10 mM a pH 8, é promovida a eluição das proteínas lisozima e α -quimotripsina, variou-se a concentração da solução de NaCl na fase móvel, para verificar se eventualmente se promovia eluição das proteínas a diferentes concentrações deste sal.

Assim, realizaram-se ensaios nas 5 matrizes usando concentrações de NaCl de 0,2M, 0,1M e 10mM. Nestes ensaios verificou-se a eluição completa de ambas as proteínas (lisozima e α -quimotripsina) com NaCl 0,2M e 0,1M. Como se pode verificar na figura 15 para a matriz 1 não se verificam diferenças no comportamento de eluição da lisozima (figura 15 - A) e α -quimotripsina (figura 15 - B). O mesmo se verificou nos ensaios realizados nas restantes matrizes.

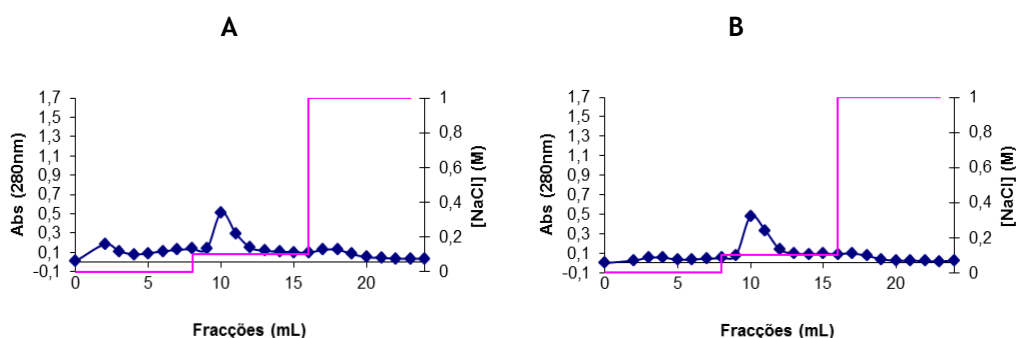


Figura 15 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 1. Ligação: tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8; Eluição: tampão Tris-HCl 10 mM com 0,1 M de NaCl a pH 8. Em A - injeção de 34 μ L de lisozima (12,5 mg/ mL); Em B - injeção de 34 μ L de α -quimotripsina (12,5 mg/ mL).

Uma vez que as duas proteínas em estudo revelaram comportamentos semelhantes realizaram-se novos ensaios com utilização de tampão de eluição NaCl 10mM em Tris-HCl 10mM a pH 8. Verificou-se mesmo assim, que as duas proteínas se comportavam da mesma maneira em todas as colunas, como poderemos verificar na figura 16. Deste modo não se justificava diminuir ainda mais a concentração de NaCl.

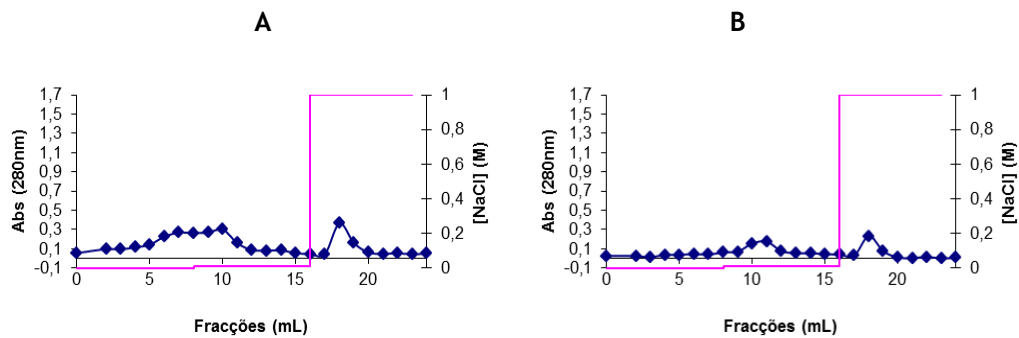


Figura 16 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 1. Ligação: tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8; Eluição parcial: tampão Tris-HCl 10 mM com 10 mM de NaCl a pH 8; Eluição parcial: tampão Tris-HCl 10 mM com 1 M de NaCl a pH 8. Em A - injeção de 34 μ L de lisozima (12,5 mg/ mL); Em B - injeção de 34 μ L de α -quimotripsina (12,5 mg/ mL)

Relativamente as restantes colunas, o comportamento da lisozima e α -quimotripsina foi semelhante. Deste modo verificou-se que as diferenças na força iónica não surtiram o efeito esperado, não sendo possível separar as 3 proteínas em diferentes concentrações de NaCl.

Portanto, tendo em conta os resultados obtidos nesta abordagem, verifica-se que existem interações iónicas entre as proteínas e as matrizes. No entanto seria esperado encontrar algumas diferenças de eluição das proteínas nas diferentes matrizes, e serem estabelecidas outras interações, isso não aconteceu talvez devido à quantidade reduzida de ligandos existente nas matrizes. Assim, sabendo à partida que as interações iónicas poderão estar envolvidas na retenção das proteínas a estas matrizes, tentou-se outra abordagem de eluição para tentar separar as três proteínas, uma vez que se mantêm dois problemas, o primeiro vem do facto de a BSA ligar tão fortemente que não se obteve eluição com elevadas concentrações de NaCl, e o segundo, que se prende ao facto de a lisozima e α -quimotripsina eluírem nas mesmas concentrações de NaCl.

Seguiu-se então a abordagem de variar o valor de pH (4, 5, 6 e 7) das soluções tampão, tentando deste modo a separação, uma vez que as proteínas têm pontos isoeléctricos diferentes. Assim, a BSA que apresenta um ponto isoeléctrico de 4,7, estará carregada negativamente nas condições de eluição utilizadas (pH 8), sendo que a lisozima e a α -quimotripsina apresentam pontos isoeléctricos 8,7 e 11,0-11,2 respectivamente, estando carregadas positivamente a pH 8 [49].

Os ensaios cromatográficos realizados para estudo do comportamento das proteínas a pH 4, basearam-se na aplicação do tampão de ligação Tris-HCl 10mM a pH 8, e como tampão de eluição o tampão acetato (NaOAc) 10mM a pH 4. Relativamente à BSA, e na etapa de eluição, como o pH é mais baixo que o seu ponto isoeléctrico, a proteína passa a estar carregada positivamente, o que desfavorece a interacção ligando/proteína, sendo então de esperar que a proteína eluísse. No entanto verificou-se que nem a pH 4 se conseguiria eluição

da BSA. Como poderemos verificar na figura 17, a BSA estabelece uma ligação muito forte com os ligandos da matriz 1, sendo que o mesmo acontece com as outras matrizes. Deste modo esta abordagem não permitiu a eluição da BSA.

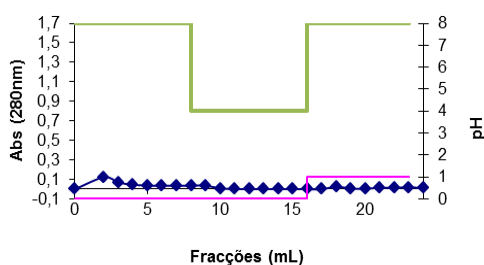


Figura 17 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 1. Ligação: tampão Tris-HCl 10mM a pH 8; Eluição: tampão acetato 10mM a pH4. Injecção de 34 μ L de BSA (12,5 mg/ mL).

Uma vez que as proteínas lisozima e α -quimotripsina apresentam pontos isoeléctricos diferentes, e supondo que estas se encontram carregadas positivamente a pH ácido desfavorecendo a interacção ligando/ proteína, procedeu-se ao estudo de variação de pH para tentar eluir estas proteínas a valores de pH diferentes. Verificou-se que com adição tampão Tris-HCl 10mM a pH8 era promovida ligação das proteínas à matriz 1, e que após adição de tampão NaOAc 10mM a pH 4 era promovida a eluição total das proteínas lisozima (em A) e α -quimotripsina (em B), como se pode verificar na figura 18, tendo portanto as duas proteínas um comportamento de interacção semelhante relativamente aos ligandos presentes na matriz 1.

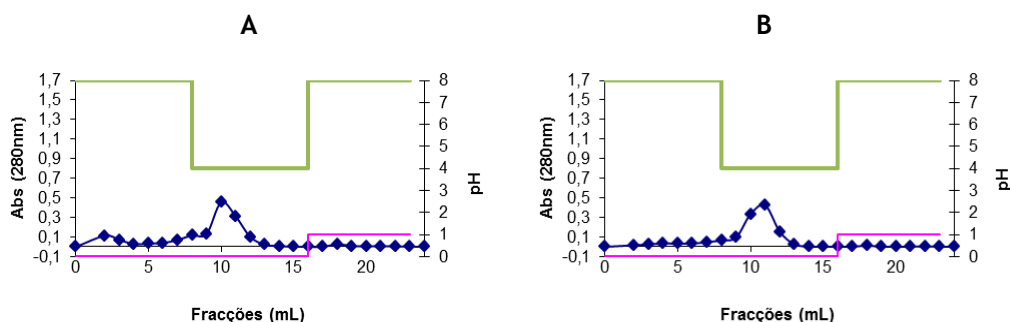


Figura 18 - Cromatografia de afinidade realizada em colunas descartáveis com a matriz 1. Ligação: Tampão Tris-HCl 10mM a pH 8; Eluição: tampão acetato 10mM a pH4. Em A - injecção de 34 μ L de lisozima (12,5 mg/ mL); Em B - injecção de 34 μ L de α -quimotripsina (12,5 mg/ mL).

Relativamente às restantes matrizes, verificou-se que a lisozima e α -quimotripsina tinham um comportamento semelhante.

Uma vez que não se verificaram diferenças significativas, seguiu-se com o estudo de pH e, a pH 5 verificou-se um comportamento semelhante ao anterior, já a pH 6 e 7 verificou-se eluição parcial de ambas as proteínas. Como poderemos verificar na figura 19, no ensaio referente a pH 7 ocorreu ligação das proteínas lisozima (em A) e α -quimotripsina (em B) com

tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8, verificando-se posteriormente eluição parcial com tampão Tris-HCl 10 mM a pH 7, tendo a proteína restante que ainda se encontrava ligada à **matriz 1** eluído com adição do tampão Tris-HCl 10mM a pH 8. O comportamento das proteínas nas **matrizes 2, 3, 4 e 5** foi muito semelhante.

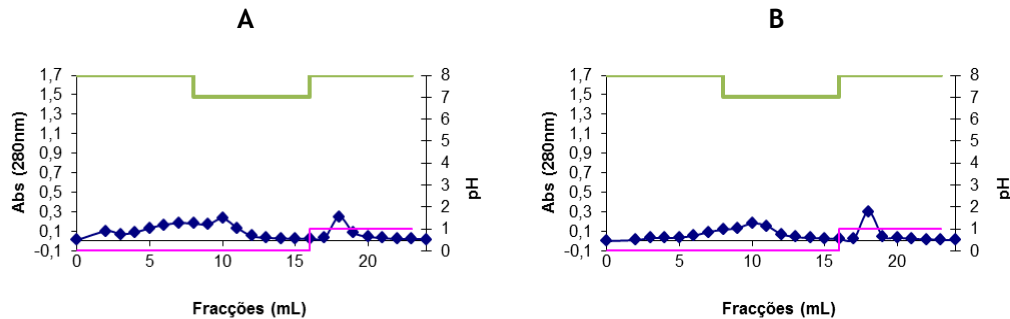


Figura 19 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 1. Ligação: Tampão Tris-HCl 10mM a pH 8; Eluição parcial: Tris-HCl 10mM a pH 7; Eluição: Tris-HCl 10mM a pH 8. Em A - injeção de 34 μ L de lisozima (12,5 mg/ mL); Em B - injeção de 34 μ L de α -quimotripsina (12,5 mg/ mL).

Com a realização dos ensaios com os diferentes valores de pH (4-7) verificou-se que a proteína BSA estabelece ligações muito fortes com os ligandos presentes nas **matrizes 1, 2, 3, 4 e 5**, não eluindo com adição de tampão acetato a pH 4. Seria de esperar que esta eluísse neste valor de pH, no entanto não se efectuaram ensaios para pH mais baixo pois poderia comprometer a estrutura do ligando. Já relativamente às proteínas lisozima e α -quimotripsina estas revelaram um comportamento muito semelhante face ao estudo de pH, não tendo sido possível eluí-las a pH diferente, provavelmente devido a terem pontos isoeléctricos muito próximos. Deste modo seguiu-se para uma abordagem hidrofóbica, com adição do sulfato de amónio 1,5M, para tentar verificar se poderiam favorecer-se as interacções hidrofóbicas. Até porque a presença de anéis aromáticos e cadeias carbonadas nas indocarbocianinas podem favorecer as interacções hidrofóbicas com as proteínas. Poderiam até verificar-se diferenças de eluição, uma vez que as indocarbocianinas têm diferentes estruturas.

Na abordagem hidrofóbica, utilizou-se como tampão de ligação Sulfato de amónio 1,5M a pH 8 e como tampão de eluição Tris-HCl 10mM a pH8. Como poderemos verificar na figura 20, a BSA estabelece uma ligação forte com os ligandos da **matriz 1**, sendo que o Sulfato de amónio promove a ligação proteína/ ligando. A adição de Tris-HCl não promoveu a eluição da proteína. O mesmo se verifica para as restantes matrizes.

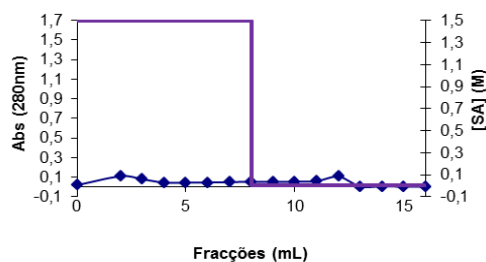


Figura 20 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 1. Ligação: Solução de Sulfato de amónio 1,5M a pH 8; Eluição: Tris-HCl 10mM a pH 8. Injecção de 34 μ L de BSA (12,5 mg proteína/ mL de solução de Sulfato de amónio 1,5M a pH8)

As proteínas lisozima e α -quimotripsina, perante a abordagem hidrofóbica revelaram não estabelecer interações com os ligandos presentes nas matrizes, isto porque como poderemos verificar na figura 21, para a **matriz 1** verifica-se que ao adicionar-se a solução de sulfato de amónio 1,5 M a pH8 não é promovida a ligação da proteína, sendo que as proteínas lisozima (em **A**) e α -quimotripsina (em **B**) eluem imediatamente na fracção 2.

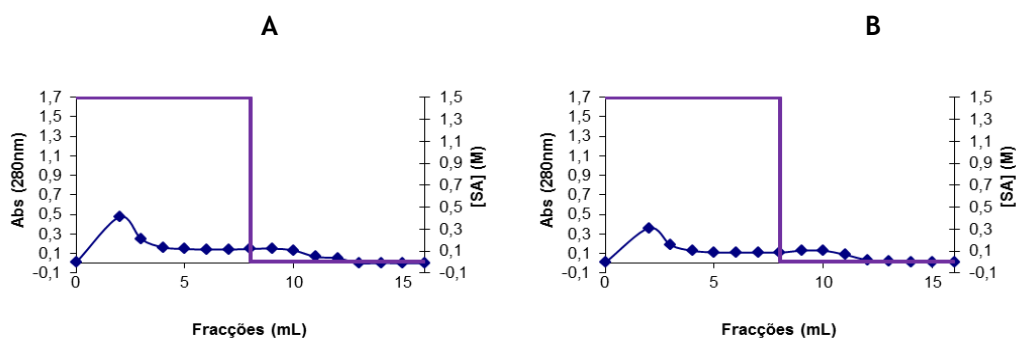


Figura 21 - Cromatografia de afinidade realizada com a matriz 1. Ligação: Solução de Sulfato de amónio 1,5M a pH 8; Eluição: Tris-HCl 10mM a pH 8. Em A - Injecção de 34 μ L de lisozima (12,5 mg proteína/ mL de solução de Sulfato de amónio 1,5M a pH8); Em B - Injecção de 34 μ L de α -quimotripsina (12,5 mg proteína/ mL de solução de Sulfato de amónio 1,5M a pH8).

Relativamente ao comportamento das proteínas lisozima e α -quimotripsina com os ligandos presentes nas **matrizes 2, 3, 4 e 5**, é semelhante, não ocorrendo ligação total com 1,5M de Sulfato de amónio, o que leva a concluir que estas proteínas interagem mais em condições iónicas do que hidrofóbicas.

Portanto, com a realização dos ensaios cromatográficos verificou-se que as proteínas BSA, lisozima e α -quimotripsina interagem com os ligandos das **matrizes 1, 2, 3, 4 e 5**, verificando-se uma interação mais forte em condições iónicas.

Seria de esperar que se verificassem diferenças de ligação e eluição das proteínas às matrizes. Relativamente à **matriz 1 e 2**, uma vez que têm a mesma indocarbocianina como ligando, seria de esperar que a **matriz 2** ligasse maior quantidade de proteína, uma vez que teoricamente teria uma maior quantidade de ligandos. O mesmo se esperaria das **matrizes 3**

e 4. No entanto a única matriz que apresentou valores mais elevados de absorvância foi a **matriz 4**, o que indica que continha uma maior quantidade de ligandos, facto comprovado por análise elementar, na qual apenas esta matriz continha ligandos acima do limite de detecção. O facto da quantidade de ligandos imobilizados ser muito reduzida poderá ter influenciado os resultados e poderá explicar o facto de não terem sido obtidos resultados diferentes nas matrizes.

Poderiam também ter-se verificado diferenças entre as matrizes devido à existência de três estruturas diferentes, sendo que o ligando das **matrizes 1 e 2** apresenta uma cadeia carbonada com 10 carbonos favorecendo as interações hidrofóbicas comparativamente à **matriz 5**, que contém uma cadeia carbonada de 4 carbonos. Já relativamente às **matrizes 3 e 4**, como na posição 5 foi introduzido um anel aromático seria de esperar que favorecesse também as interações hidrofóbicas assim como as π - π .

Como a quantidade de ligandos imobilizados foi reduzida, não foi possível verificar diferenças nas interações das proteínas com as matrizes, não sendo possível estabelecer condições adequadas à separação das três proteínas.

Verificou-se que a proteína BSA embora estabeleça interações fortes e ligue às matrizes não foi conseguida a sua eluição, uma vez que esta continuou ligada as matrizes mesmo em condições iónicas, hidrofóbicas ou para diferentes valores de pH. A lisozima e α -quimotripsina revelaram um comportamento semelhante, eluindo nas mesmas condições de concentração de NaCl, pH e concentração de sulfato de amónio. Apresentam interações de carácter maioritariamente iónico no entanto, como é promovida a eluição com baixas concentrações de sal indica que a ligação não é muito forte, ou então a quantidade de ligandos é reduzida.

Conclusão

As cianinas marcaram o ramo da fotografia bem como diversas áreas que abrangem aplicações biomédicas, e mais recentemente a aplicação destas como ligandos em cromatografia de afinidade.

Pela realização deste trabalho de investigação, verificou-se que as indocarbocianinas sintetizadas pelo método do ortoéster revelaram rendimentos aceitáveis, tendo-se verificado dificuldades no isolamento dos produtos, que foi conseguido com posterior troca de contra-íão. Após isolamento das indocarbocianinas foi feita a sua caracterização e, comparando com os dados tabelados já existentes comprovou-se a existência das cianinas no estado puro para imobilização na celulose.

O método de imobilização utilizado, aparentemente revelou-se eficaz uma vez que o suporte apresentava cor, no entanto após análise elementar verificou-se que a cianina ligada à celulose era de pequena quantidade, e para algumas matrizes a cianina presente estava abaixo do limite de detecção do método de análise elementar.

Relativamente à realização da cromatografia de afinidade, usando as indocarbocianinas como ligandos, foi concluído que as proteínas padrão BSA, lisozima e α -quimotripsina estabelecem interações com os ligandos, maioritariamente de carácter iónico. A proteína BSA revelou um comportamento diferente perante os ligandos, verificando-se que esta proteína liga e não elui, mesmo fazendo variar as condições de força iónica, de pH ou explorando interações hidrofóbicas. Já as proteínas lisozima e α -quimotripsina revelaram ter um comportamento semelhante face aos suportes. Verificou-se que estas estabelecem interações maioritariamente iónicas com as matrizes. Assim, como as três proteínas tem um comportamento semelhante em todas as matrizes, verifica-se que a diferenças estruturais entre as indocarbocianinas sintetizadas não revelaram diferenças a nível de ligação e eluição das proteínas.

Embora o objectivo principal deste trabalho de investigação não tenha sido cumprido na totalidade, uma vez que não se conseguiu a eluição das proteínas em condições diferentes, verificou-se que existe interacção entre as proteínas e os ligandos.

No futuro poder-se-á sintetizar indocarbocianinas introduzindo outros grupos funcionais no anel aromático das cianinas, entre os quais grupos sulfónicos, uma vez que já está descrito na literatura a obtenção de bons resultados com cianinas contendo grupos sulfónicos na sua constituição, ou introduzir grupos carboxílicos ou nitro-. Uma outra abordagem assenta na possibilidade de utilização de outro método de imobilização, para obtenção de melhores resultados, uma vez que o método utilizado neste trabalho revelou imobilização de uma quantidade reduzida, quase vestigial de ligandos.

Já relativamente ao método cromatográfico utilizado, poderia utilizar-se outro tipo de abordagem para tentar eluir as proteínas a diferentes concentrações, ou então tentar

ligar proteínas com outras características. Poderia até utilizar-se as indocarbocianinas como ligandos para separação de moléculas de DNA, uma vez que estas cianinas têm carga positiva e o DNA apresenta carga negativa, o que poderia resultar em diversas interações.

Referências bibliográficas

1. Zollinger H., *Color Chemistry: Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*. 2nd ed. 1991, Weinheim: VCH.
2. Abraham E. N., *Dyes and their intermediates*. 1968, Oxford: Pergamon Press.
3. Meybeck J., *Les Colorants*. 1963, Paris: Presses Universitaires de France.
4. Waring D. W. and Hallas G., *The chemistry and application of dyes*. 1990, New York: Plenum Press.
5. Griffiths J., *Color and Constitution of Organic Molecules*. 1976, London: Academic Press.
6. *Color Index*. 3rd ed. Vol. 4. 1971: The Society of Dyers and Colorists.
7. Allen R.L.M., *Colour Chemistry: Studies in Modern Chemistry*. 1971, Great Britain: Pitman Press, Bath.
8. Mishra A., et al., *Cyanines during the 1990s: A Review*. Chem Rev, 2000. **100**(6): p. 1973-2012.
9. Voznyak D. A., et al., *Primary Photoprocesses in Molecules of Carbocyanine Dyes in Binary Solvent Mixtures*. High Energ Chem, 2010. **44**(1): p. 25-30.
10. Wang L. Y., et al., *Monomethine cyanine dyes with an indole nucleus: Microwave-assisted solvent-free synthesis, spectral properties and theoretical studies*. Dyes Pigments, 2009. **82**(3): p. 409-415.
11. Boto R. E. F., et al., *Thiacarbocyanine as ligand in dye-affinity chromatography for protein purification. II. Dynamic binding capacity using lysozyme as a model*. Biomed Chromatogr, 2009. **23**(9): p. 987-993.
12. Hamer F. M., *The cyanine dyes and related compounds*. 1964, London: Wiley.
13. Chipon B., et al., *Synthesis and post-synthetic derivatization of a cyanine-based amino acid. Application to the preparation of a novel water-soluble NIR dye*. Tetrahedron Lett, 2006. **47**(47): p. 8279-8284.

14. Zhao W.F., et al., *Effects of thiocarbocyanine and indocarbocyanine dye with different substituents on absorption to AgBr microcrystal and size distribution of J-aggregates*. *Photogr Sci Photochem*, 1997. **15**(4): p. 327-34.
15. Kietzmann R., et al., *Temperature-dependent electron-transfer quenching of dye monomer fluorescence on octahedral silver bromide grains*. *J Am Chem Soc*, 1993. **115**(5): p. 1930-1936.
16. Deligeorgiev T.G., et al., *Synthesis and properties of novel asymmetric monomethine cyanine dyes as non-covalent labels for nucleic acids*. *Dyes Pigments*, 2007. **75**(2): p. 466-73.
17. Volkova K. D., et al., *Specific fluorescent detection of fibrillar alpha-synuclein using mono- and trimethine cyanine dyes*. *Bioorgan Med Chem*, 2008. **16**(3): p. 1452-9.
18. Zhang X.H., et al., *Microwave-assisted solvent free synthesis and spectral properties of some dimethine cyanine dyes as fluorescent dyes for DNA detection*. *Dyes Pigments*, 2008. **79**(2): p. 205-9.
19. Zhao H.L., Yuan H.H., and Lan M.B., *Application of cyanine dyes and related compounds as fluorescent probes and photodynamic therapy*. *Photogr Sci Photochem*, 2003. **21**(3): p. 212-22.
20. Delaey E., et al., *A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes*. *J Photoch Photobio B*, 2000. **55**(1): p. 27-36.
21. Su J.J., et al., *Synthesis, Absorption and Fluorescence Spectral Characteristics of Trinucleus Dimethine Cyanine Dyes as Fluorescent Probes for DNA Detection*. *J Brazil Chem Soc*, 2011. **22**(1): p. 73-79.
22. Abd E.A.R.M and Younis M., *Synthesis and antimicrobial activity of certain novel monomethine cyanine dyes*. *Dyes Pigments*, 2004. **60**(3): p. 205-14.
23. Matsuoka M., *Infrared Absorbing Dyes: Topics in Applied Chemistry*. 1990, New York: Plenum Press.
24. Dai Z., Qun L., and Peng B., *Synthesis and Characterization of Some Stabilized Indocarbocyanine Dye Complex Colorants for Optical Recording Media*. *Dyes Pigments*, 1998. **36**(3): p. 243-248.

25. Johansson L.B.A., Vallmark T., and Lindblom G., *Polarized-light Spectroscopic Study of Indocarbocyanine Dyes Solubilized in Amphiphile Aggregates*. J Chem Soc Faraday T, 1985. 1(81): p. 1389-1400.
26. Almeida P., Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, 1999: p. 73,79.
27. Venkataraman K., *The Chemistry of Synthetic Dyes*. 1952, London: Academic Press.
28. Voet D. and Voet J. G., *Biochemistry*. 3rd Edition ed. 2004, United States of America: Wiley.
29. Wixon R. L. and Gehrke C. W., *Chromatography. A Science of discovery*. 2010, United States of America: Wiley.
30. Scopes R.K., *Protein Purification: Principles and Practice*. 3rd ed. 1994, New York: Springer.
31. Sewell P. A. and Clarke B., *Chromatographic Separations*. 1987, London: Jon Wiley & Sons.
32. Heftmann E., *Chromatography*. 6th ed. Vol. 69A. 2004: Elsevier.
33. Miller J. M., *Chromatography Concepts and Contrasts*. 2nd ed. 2005, New Jersey: Wiley Interscience.
34. Singh R., *Chromatography*. 1st ed. 2002, New Dehli: Mittal publications.
35. Quintas A., Freire A. P., and Halpern M. J., *Organização Molecular da Vida*. 2008, Lisboa: Lidel.
36. Basar N., et al., *Lysozyme purification with dye-affinity beads under magnetic field*. Int J Biol Macromol, 2007. 41(3): p. 234-242.
37. *Affinity Chromatography: Principles and Methods*. 2002: Amersham Bioscience.
38. Garg N., Galaev I. Y., and Mattiasson B., *Dye-affinity techniques for bioprocessing: Recent developments*. J Mol Recognit, 1996. 9(4): p. 259-274.
39. Boyer P. M. and Hsu J. T., *Protein purification by dye-ligand chromatography*. Adv Biochem Eng Biot, 1993. 49: p. 1-44.

40. Cuatrecasas P., Wilchek M., and Anfinsen C. B., *Selective enzyme purification by affinity chromatography*. P Natl Acad Sci USA, 1968. **61**(2): p. 636-43.
41. Mondal, K. and M.N. Gupta, *The affinity concept in bioseparation: evolving paradigms and expanding range of applications*. Biomol Eng, 2006. **23**(2-3): p. 59-76.
42. Denizli A. and Piskin E., *Dye-ligand affinity systems*. J Biochem Bioph Meth, 2001. **49**(1-3): p. 391-416.
43. Ganten D. and Ruckpaul K., *Encyclopedic reference of genomics and proteomics in molecular medicine*. Vol. 1. 2006, New York: Springer.
44. Urh M., Simpson D., and Zhao K., *Affinity chromatography: general methods*. Method Enzymol, 2009. **463**: p. 417-38.
45. Tetala K. K. R. and Van B. T. A., *Bioaffinity chromatography on monolithic supports*. J Sep Sci, 2010. **33**(3): p. 422-438.
46. Firer M. A., *Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography*. J Biochem Bioph Meth, 2001. **49**(1-3): p. 433-42.
47. Renkin and E. M., *Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes*. J Gen Physiol, 1954. **38**(2): p. 225-43.
48. Zachariou M., *Affinity Chromatography: Methods and Protocols*. 2007, Totowa, NJ: Human Press.
49. Boto R. E. F., Queiroz J. A., and Almeida P., *Thiacarbocyanine as ligand in dye-affinity chromatography for protein purification*. Biomed Chromatogr, 2008. **22**(3): p. 278-288.
50. Nevell T.P., *Cellulosics Dyeing*. Vol. 1. 1995, Oxford: Alden Press.
51. Lowe C. R., Lowe A. R., and Gupta G., *New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals*. J Biochem Bioph Meth, 2001. **49**(1-3): p. 561-574.
52. Labrou N. E., *Dye-ligand affinity adsorbents for enzyme purification*. Mol Biotechnol, 2002. **20**(1): p. 77-84.

53. Labrou, N.E., *Dye-ligand affinity chromatography for protein separation and purification*. *Methods Mol Biol*, 2000. **147**: p. 129-39.
54. McGettrick A.F. and Worrall D.M., *Dye-Ligand Affinity Chromatography*. *Method Mol Biol*, 2004. **244**: p. 151-157.
55. Angal S., *Dye-Ligand Chromatography*. *Method Mol Biol*, 1988. **3**: p. 111-122.
56. Clonis Y. D., et al., *Biomimetic dyes as affinity chromatography tools in enzyme purification*. *J Chromatogr A*, 2000. **891**(1): p. 33-44.
57. Hage D. S., *Affinity chromatography: a review of clinical applications*. *Clin Chem*, 1999. **45**(5): p. 593-615.
58. Pardal A.C., et al., *Preliminary studies on the use of cyanines as ligands in dye-affinity chromatography of protein*. *Color Technol*, 2002. **118**: p. 95-99.
59. Pretsch E., Buhlmann P., and Affolter C., *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*. 2000, New York: Springer.
60. Silverstein R. M., Bassler G. C., and Morrill T.C., *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 5^a ed. 1994, Rio de Janeiro.
61. Friebolin H., *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*. 4th ed. 1991: wiley, John & sons, Incorporated.
62. Quiñoá E. and Riguera R., *Numenclatura y Representación de los Compuestos Orgânicos*. 1996, Madrid: McGraw-Hill.
63. Silva A., et al., *Rhodamine B as ligand for affinity chromatography. Fixation studies onto cellulose by a curing method*. *Eur Polym J*, 2006. **42**(10): p. 2270-2282