



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Novas estratégias de purificação de microRNAs usando líquidos iónicos

Inês Isabel Dias Rodrigues

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Professora Doutora Fani Sousa
Co-orientadora: Professora Doutora Mara G. Freire

Covilhã, junho de 2018

Para os meus pais e irmão, Amo-vos!

Agradecimentos

Em primeiro lugar queria agradecer à Professora Doutora Fani Sousa e à Professora Doutora Mara G. Freire por possibilitarem a realização deste trabalho, mas acima de tudo pela incrível transmissão de conhecimentos e força de vontade. Aprendi que por muito que as coisas pareçam difíceis há sempre uma solução e que com esforço e dedicação tudo acaba por resultar. Obrigado pelo incrível profissionalismo e dedicação que me foi transmitido desde o primeiro dia e por terem acreditado em mim para a realização deste trabalho. Foi uma viagem turbulenta que valeu muito a pena. Queria também agradecer à Doutora Márcia Neves pela ajuda prestada na preparação dos suportes, sem ela também não teria sido possível.

Também não posso deixar de agradecer à incrível Doutora Patrícia Pereira e ao Doutor Augusto Pedro pela persistência, mas principalmente pela paciência! Acolheram-me desde o primeiro dia de uma forma incrível e mostraram-me que nunca nada está perdido. Obrigado pela inacabável transmissão de conhecimentos e por me terem feito sentir que a cada dia mau se iam suceder dias melhores. Desejo-vos tudo de bom quer a nível pessoal quer a nível profissional. Admiro-vos imenso.

Um agradecimento a todas as pessoas que diariamente trabalham no Centro de Investigação de Ciências da Saúde por todo o acompanhamento laboratorial.

Obrigado ao Bruno e a Jane por terem sido companheiros tão incríveis nesta nossa jornada e por estarem sempre dispostos a ajudar quando as dificuldades teimavam em não desaparecer. Espero que tenham todo o sucesso que merecem.

Obrigado à família que ganhei nesta que também passou a ser a minha cidade, ao Diogo, ao Rúben, à Joana, à Leonor, à Inês e à Mafalda por me terem acompanhado nestes últimos 5 anos, vivi com vocês os melhores momentos da vida de estudante! À Ana Melo por ter sido a minha fiel companheira em todos os momentos desde o início, ganhei uma irmã!

Agradeço à Universidade da Beira Interior e à Universidade de Aveiro pela garantia das condições para o meu percurso académico e desenvolvimento deste trabalho

Por último, queria agradecer aos pilares da minha vida, aos meus pais por acreditarem e lutarem sempre pela minha felicidade e por serem os meus melhores amigos, ao meu irmão que é o meu herói e o meu exemplo e ao Bernardo por me acompanhar ao longo dos últimos 7 anos, por me ter feito crescer e por me ter ensinado que o amor está nas coisas simples do dia-a-dia. Amo-vos!

Resumo

As terapias baseadas em ácidos nucleicos têm tido cada vez mais destaque no tratamento de diversas doenças, nomeadamente em doenças autoimunes, oncológicas e neuro-degenerativas. No entanto, para a utilização destas biomoléculas é necessário que estas estejam integras, puras e que mantenham a sua atividade biológica. Os líquidos iónicos (LIs) são um grupo de sais orgânicos com bastante potencial na purificação de ácidos nucleicos pois apresentam características físico-químicas muito próprias e grande versatilidade para manipular o *design* do catião/anião. Acrescendo a este facto, alguns LIs são considerados “green solvents”, tornando-se assim uma alternativa mais ecológica aos solventes orgânicos normalmente utilizados.

O principal objetivo deste trabalho é investigar a aplicabilidade da cromatografia líquida preparativa, com recurso a uma matriz macroporosa funcionalizada com líquidos iónicos, na purificação de ácidos nucleicos. Para concretizar este objetivo foram extraídos três tipos diferentes de amostra (ARN de baixo peso molecular; ADN genómico e ARN de baixo peso molecular; ADN genómico, ARN ribossomal e ARN de baixo peso molecular) a partir da *Escherichia coli* DH5α que foram utilizados em ensaios de ligação em modo “batch” onde diferentes líquidos iónicos estavam imobilizados em sílica (S-Sil), usada como fase estacionária. Com estes ensaios foi possível avaliar a capacidade dos diferentes tipos de S-Sils (S-SilPrBenzCl; S-SilPrMImCl; S-SilPrNEt3Cl; S-SilPrMet2ButCl; e S-SilPrN(C8)3Cl) para reconhecer e ligar às diferentes espécies de ácidos nucleicos. Estes ensaios foram realizados repetidamente de modo a ser possível comprovar a sua reprodutibilidade e resistência à regeneração.

De uma forma geral os S-Sils demonstraram a possibilidade de promover diversas interações, nomeadamente iónicas e hidrofóbicas, com as diferentes espécies de ácidos nucleicos, dando, no entanto, destaque para S-SilPrNEt3Cl e S-SilPrMet2ButCl uma vez que demonstraram ser ligandos promissores para a aplicação na purificação de ácidos nucleicos.

Após os referidos ensaios foi realizada a funcionalização da matriz cromatográfica macroporosa como ligando mais promissor, SilPrNEt3Cl, para a realização dos ensaios de purificação de ADN genómico, ARN ribossomal e ARN de baixo peso molecular. No final, foi possível confirmar a separação das três espécies de ácidos nucleicos num único ensaio cromatográfico.

Palavras-chave:

Ácidos Nucleicos; Cromatografia; Líquidos iónicos

Abstract

Nucleic acids-based therapies are indispensable products of a modern society to treat several life-threatening diseases such as cancer, autoimmune, and neurodegenerative diseases. However, these biomolecules must be obtained with high integrity, -purity and biologically active, foreseeing their use as biopharmaceuticals in the (bio)pharmaceutical industry. Particularly, nucleic acids stability is often hampered by their susceptibility to degradation by nucleases. In this way, emerge the ionic liquids (IL), which are a group of organic salts that present a high potential in the stabilization and purification of nucleic acids. This improved ability results from their specific physical and chemical characteristics, and the large versatility to manipulate the design of the cation/anion. Furthermore, due to their outstanding biodegradability and biocompatibility and low toxicity, some ILs can be classified as green solvents, becoming this way a more ecological and sustainable alternative to the organic solvents usually applied in the purification process. Therefore, this work's main objective is to investigate the applicability of macroporous-based matrices functionalized with ILs for nucleic acids purification, in the context of preparative liquid chromatography. In order to achieve this objective, three different samples of nucleic acids were extracted (Low molecular weight RNA; genomic DNA and Low molecular weight RNA; genomic DNA, ribosomal RNA and Low molecular weight RNA) from the bacteria *Escherichia coli* DH5 α using appropriate protocols; these samples were then used in binding/elution assays, which were performed in a "batch" mode using immobilized silicas (S-Sil) with different ionic liquids, as stationary phases. These assays evaluated the ability of the different types of S-Sils (S-SilPrBenzCl; S-SilPrMImCl; S-SilPrNEt3Cl; S-SilPrMet2ButCl; e S-SilPrN(C8)3Cl) to recognize and bind the distinct species of nucleic acids. These assays were performed repeatedly in order to demonstrate their reproducibility and resistance to regeneration. In general, the best results were obtained with S-SilPrNEt3Cl and S-SilPrMet2ButCl silicas, indicating that NEt3Cl and Met2ButCl are the most promising ligands for the purification of the different nucleic acids classes. After the mentioned assays, the macroporous matrix was functionalized with the IL SilPrNEt3Cl, yielding the matrix MP-SilPNEt3Cl. Then, this chromatographic matrix was used in purification assays of distinct classes of nucleic acids - genomic DNA, ribosomal RNA and Low molecular weight RNA -, and the separation of the three different classes of nucleic acids was achieved. Overall, the chromatographic matrix MP-SilPNEt3Cl may represent an improvement in the current methodologies used for nucleic acids purification in terms of robustness and selectivity.

Keywords:

Nucleic acids, Chromatography, Ionic Liquids

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 Bioquímica dos ácidos nucleicos	1
1.1.1 Ácido ribonucleico (ARN)	2
1.1.2 Diferentes tipos de ARN	4
1.1.3 Ácido desoxirribonucleico	11
1.2 Métodos de obtenção de ARN	13
1.3 Métodos de obtenção de ADN	15
1.4 Cromatografia como método de purificação	18
1.4.1 Tipos de cromatografia	20
1.5 Líquidos Iônicos	24
1.5.1 Utilização de líquidos iônicos na cromatografia	25
1.5.1.1 Fase estacionária com líquidos iônicos com apenas um catião	28
1.5.1.2 Fase estacionária de líquidos iônicos com vários catiões	28
1.5.1.3 Fase estacionária de líquidos iônicos poliméricos	28
1.5.1.4 Fase estacionária de líquidos iônicos quirais	28
1.5.1.5 Monólitos funcionalizados com líquidos iônicos	29
Capítulo 2 - Objetivos	30
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	31
3.1 Materiais	31
3.2 Métodos	31
3.2.1 Suportes de sílica com líquidos iônicos imobilizados	31
3.2.2 Suportes de metacrilato macroporoso com líquidos iônicos imobilizados	32
3.2.3 Fermentação	32
3.2.4 Extração - Recuperação dos ácidos nucleicos	33
3.2.5 Eletroforese em Gel de Agarose	33
3.2.6 Ensaio em modo “batch” utilizando os suportes de sílica	33
3.2.7 Ensaio cromatográfico em coluna	37
3.2.8 Procedimento para a regeneração dos suportes funcionalizados	37
Capítulo 4 - Resultados e Discussão	38
4.1 Suportes de sílica funcionalizada com líquidos iônicos	38
4.1.1 Ensaio de ligação/eluição com ARN de baixo peso molecular nos suportes de sílica funcionalizada com líquidos iônicos	40
4.1.2 Ensaio de ligação/eluição de ADN genómico e ARN de baixo peso molecular nos suportes de sílica funcionalizada com líquidos iônicos	47
4.1.3 Ensaio de ligação/eluição de ADN genómico, ARN ribossomal e ARN	54

de baixo peso molecular nos suportes de sílica funcionalizada com líquidos iónicos	
4.2 Ensaaios cromatográficos com a matriz macroporosa funcionalizada com SiPrNEt ₃ Cl	60
Capítulo 5 - Conclusões e Perspetivas Futuras	64
Bibliografia	66

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação estrutural dos compostos heterocíclicos aromáticos pirimidina e purina.....	1
Figura 2 - Principais bases púricas. Derivados da purina: adenina (6-aminopurina) e guanina (2-amino-6-oxipurina).....	1
Figura 3 - Principais bases pirimídicas. Derivados da pirimidina: citocina (2-oxi-4-aminopirimidina), timina (5-metil-2,4-dioxipirimidina) e uracilo (2,4-dioxipirimidina).....	2
Figura 4 - Representação estrutural da D-ribose.....	2
Figura 5 - Estruturas secundárias que o ARN pode assumir. Onde A - “Hairpin-loop”; B - “Loops” internos; C - Protuberância “Bulge”; D - Pseudo-nó; E - G-Quadruplex.....	3
Figura 6 - Vias de silenciamento de ARN e seus componentes essenciais: siARN, miARN e piARN	8
Figura 7 - Representação estrutural da D-desoxirribose. Na posição 2’ a desoxirribose está desprovida do átomo de oxigénio existente no grupo hidroxilo da ribose.....	12
Figura 8 - Representação esquemática da clonagem de ADN.....	16
Figura 9 - Kits de extração de ADN e métodos usados para diferentes locais onde a amostra pode estar presente.	17
Figura 10 - Kits de extração de ADN e métodos utilizados em estudos focados na análise de ADN ambiental originário de diferentes taxas.....	17
Figura 11 - Estruturas catiónicas habituais em líquidos iónicos: 1 - imidazólios, 2 - piridínios, 3 - amónios, 4 - pirrolidínios, 5 - fosfónios, 6 - guanidínios.....	25
Figura 12 - Estruturas aniónicas habituais em líquidos iónicos: 7 - Cloreto, 8 - brometo, 9 - tetrafluoroborato, 10 - hexafluorofosfato, 11 - trifluorometanosulfonato, 12 - bis(trifluorometilsufonil)imidato, 13 - dicianamida, 14 - tiocianato e 15 - trifluoroacetato...25	25
Figura 13 - Diferentes formas de funcionalização dos suportes.....	26
Figura 14 - Esquema Representativo dos ensaios cromatográficos para interações iónicas.....	35
Figura 15 - Esquema Representativo dos ensaios cromatográficos para interações hidrofóbicas.....	36
Figura 16 - Representação da estrutura química das sílicas modificadas com os líquidos iónicos: A - S-SilPrBenzCl; B - S-SilPrMImCl; C- S-SilPrNEt ₃ Cl; D - S-SilPrMet ₂ ButCl; e E - S-SilPrN(C ₈) ₃ Cl.....	39
Figura 17 - Valores médios das absorvâncias nos diferentes passos do ensaio e respetivos desvio-padrão: A - SiO ₂ ; B - S-SilPrCl; C - S-SilPrBenzCl; D - S-SilPrMImCl; E - S-SilPrNEt ₃ Cl; F - S-SilPrMet ₂ ButCl; G - S-SilPrN(C ₈) ₃ Cl.....	42
Figura 18 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações iónicas, aplicando uma amostra de ARN de baixo peso molecular em sílicas	

modificadas com diferentes IIs: 1 - Amostra inicial; 2- SiO₂: Ligação; 3 - SiO₂: Eluição; 4 - S-SilPrCl: Ligação; 5 - S-SilPrCl: Eluição; 6 - S-SilPrBenzCl: Ligação; 7 - S-SilPrBenzCl: Eluição; 8 - S-SilPrMImCl: Ligação; 9 - S-SilPrMImCl: Eluição.....43

Figura 19 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações iônicas, aplicando uma amostra de ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes IIs: 1 - Amostra inicial; 2 - S-SilPrNEt₃Cl: Ligação; 3 - S-SilPrNEt₃Cl: Eluição; 4 - S-SilPrMet₂ButCl: Ligação; 5 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição; 6 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Ligação; 7 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição.....43

Figura 20 - Valores médios das absorvâncias nos diferentes passos do ensaio e respectivos desvio-padrão: A - SiO₂; B - S-SilPrCl; C - S-SilPrBenzCl; D - S-SilPrMImCl; E - S-SilPrNEt₃Cl; F - S-SilPrMet₂ButCl; G - S-SilPrN(C₈)₃Cl.....45

Figura 21 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações hidrofóbicas, aplicando uma amostra de ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes IIs: 1 - Amostra inicial; 2- SiO₂: Ligação; 3 - SiO₂: Eluição com Tris-HCl; 4 - SiO₂: Eluição com NaCl; 5 - S-SilPrCl: Ligação; 6 - S-SilPrCl: Eluição com Tris-HCl; 7 - S-SilPrCl: Eluição com NaCl; 8 - S-SilPrBenzCl: Ligação; 9 - S-SilPrBenzCl: Eluição com Tris-HCl; 10 - S-SilPrBenzCl: Eluição com NaCl; 11 - S-SilPrMImCl: Ligação; 12 - S-SilPrMImCl: Eluição com Tris-HCl; 13 - S-SilPrMImCl: Eluição com NaCl.....46

Figura 22 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações hidrofóbicas, aplicando uma amostra de ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes IIs: 1 - Amostra inicial; 2 - S-SilPrNEt₃Cl: Ligação; 3 - S-SilPrNEt₃Cl: Eluição com Tris-HCl; 4 - S-SilPrNEt₃Cl: Eluição com NaCl; 5 - S-SilPrMet₂ButCl: Ligação; 6 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição com Tris-HCl; 7 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição com NaCl; 8 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Ligação; 9 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição com Tris-HCl; 10 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição com NaCl.....46

Figura 23 - Valores médios das absorvâncias nos diferentes passos do ensaio e respectivos desvio-padrão: A - SiO₂; B - S-SilPrCl; C - S-SilPrBenzCl; D - S-SilPrMImCl; E - S-SilPrNEt₃Cl; F - S-SilPrMet₂ButCl; G - S-SilPrN(C₈)₃Cl 49

Figura 24 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações iônicas, aplicando uma amostra de ADN genómico e ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes IIs: 1 - Amostra inicial; 2- SiO₂: Ligação; 3 - SiO₂: Eluição; 4 - S-SilPrCl: Ligação; 5 - S-SilPrCl: Eluição; 6 - S-SilPrBenzCl: Ligação; 7 - S-SilPrBenzCl: Eluição; 8 - S-SilPrMImCl: Ligação; 9 - S-SilPrMImCl: Eluição.....50

Figura 25 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações iônicas, aplicando uma amostra de ADN genómico e ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes IIs: 1 - Amostra inicial; 2 - S-SilPrNEt₃Cl: Ligação; 3 - S-SilPrNEt₃Cl: Eluição; 4 - S-SilPrMet₂ButCl: Ligação; 5 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição; 6 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Ligação; 7 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição.....50

Figura 26 - Valores médios das absorvâncias nos diferentes passos do ensaio e respectivos desvio-padrão: A - SiO₂; B - S-SilPrCl; C - S-SilPrBenzCl; D - S-SilPrMImCl; E - S-SilPrNET₃Cl; F - S-SilPrMet₂ButCl; G - S-SilPrN(C₈)₃Cl.....52

Figura 27 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações hidrofóbicas, aplicando uma amostra de ADN genómico e ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes LIs: 1 - Amostra inicial; 2- SiO₂: Ligação; 3 - SiO₂: Eluição com Tris-HCl; 4 - SiO₂: Eluição com NaCl; 5 - S-SilPrCl: Ligação; 6 - S-SilPrCl: Eluição com Tris-HCl; 7 - S-SilPrCl: Eluição com NaCl; 8 - S-SilPrBenzCl: Ligação; 9 - S-SilPrBenzCl: Eluição com Tris-HCl; 10 - S-SilPrBenzCl: Eluição com NaCl; 11 - S-SilPrMImCl: Ligação; 12 - S-SilPrMImCl: Eluição com Tris-HCl; 13 - S-SilPrMImCl: Eluição com NaCl.....53

Figura 28 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações hidrofóbicas, aplicando uma amostra de ADN genómico e ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes LIs: 1 - Amostra inicial; 2 - S-SilPrNET₃Cl: Ligação; 3 - S-SilPrNET₃Cl: Eluição com Tris-HCl; 4 - S-SilPrNET₃Cl: Eluição com NaCl; 5 - S-SilPrMet₂ButCl: Ligação; 6 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição com Tris-HCl; 7 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição com NaCl; 8 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Ligação; 9 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição com Tris-HCl; 10 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição com NaCl.....53

Figura 29 - Valores médios das absorvâncias nos diferentes passos do ensaio e respectivos desvio-padrão: A - SiO₂; B - S-SilPrCl; C - S-SilPrBenzCl; D - S-SilPrMImCl; E - S-SilPrNET₃Cl; F - S-SilPrMet₂ButCl; G - S-SilPrN(C₈)₃Cl.....55

Figura 30 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações iónicas, aplicando uma amostra de ADN genómico, ARN ribossomal e ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes LIs: 1 - Amostra inicial; 2- SiO₂: Ligação; 3 - SiO₂: Eluição; 4 - S-SilPrCl: Ligação; 5 - S-SilPrCl: Eluição; 6 - S-SilPrBenzCl: Ligação; 7 - S-SilPrBenzCl: Eluição; 8 - S-SilPrMImCl: Ligação; 9 - S-SilPrMImCl: Eluição.....56

Figura 31 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações iónicas, aplicando uma amostra de ADN genómico, ARN ribossomal e ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes LIs: 1 - Amostra inicial; 2 - S-SilPrNET₃Cl: Ligação; 3 - S-SilPrNET₃Cl: Eluição; 4 - S-SilPrMet₂ButCl: Ligação; 5 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição; 6 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Ligação; 7 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição.....56

Figura 32 - Valores médios das absorvâncias nos diferentes passos do ensaio e respectivos desvio-padrão: A - SiO₂; B - S-SilPrCl; C - S-SilPrBenzCl; D - S-SilPrMImCl; E - S-SilPrNET₃Cl; F - S-SilPrMet₂ButCl; G - S-SilPrN(C₈)₃Cl..... 58

Figura 33 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações hidrofóbicas, aplicando uma amostra de ADN genómico, ARN ribossomal e ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes LIs: 1 - Amostra inicial; 2- SiO₂: Ligação; 3 - SiO₂: Eluição com Tris-HCl; 4 - SiO₂: Eluição com NaCl; 5 - S-SilPrCl: Ligação; 6 - S-SilPrCl: Eluição com Tris-HCl; 7 - S-SilPrCl: Eluição com NaCl; 8 - S-SilPrBenzCl: Ligação; 9 - S-SilPrBenzCl: Eluição com Tris-HCl; 10 - S-SilPrBenzCl: Eluição com NaCl; 11 - S-SilPrMImCl: Ligação; 12 - S-SilPrMImCl: Eluição com Tris-HCl; 13 - S-SilPrMImCl: Eluição com NaCl.....59

Figura 34 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações hidrofóbicas, aplicando uma amostra de ADN genómico, ARN ribossomal e ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes Lis: 1 - Amostra inicial; 2 - S-SilPrNEt₃Cl: Ligação; 3 - S-SilPrNEt₃Cl: Eluição com Tris-HCl; 4 - S-SilPrNEt₃Cl: Eluição com NaCl; 5 - S-SilPrMet₂ButCl: Ligação; 6 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição com Tris-HCl; 7 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição com NaCl; 8 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Ligação; 9 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição com Tris-HCl; 10 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição com NaCl.....59

Figura 35 - (A) Cromatograma representativo do estudo da interação dos ácidos nucleicos com a matriz Mp-SilPrNEt₃Cl. O gradiente usado está representado pela linha a tracejado (B) Electroforese em gel de agarose para análise das frações recolhidas do cromatograma. 1: Amostra Inicial; 2: Fração correspondente ao pico 1; 3: Fração correspondente ao pico 2; 4: fração correspondente ao pico 3.....61

Figura 36 - (A) Cromatograma representativo do estudo da interação dos ácidos nucleicos com a matriz Mp-SilPrNEt₃Cl, em que o gradiente usado está representado pela linha a tracejado. (B) Electroforese em gel de agarose para análise das frações recolhidas do cromatograma. 1: Amostra Inicial; 2: Fração correspondente ao pico 1; 3: Fração correspondente ao pico 2; 4: fração correspondente ao pico 3.....62

Figura 37 - Cromatograma representativo dos ensaios de reprodutibilidade da coluna em condições de interação iónica.....63

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Resumo das propriedades gerais de ARNs não-codificantes.....	5
Tabela 2 - Resumo das propriedades gerais de ARNs estruturais.....	11
Tabela 3 - Classificação primária da cromatografia com base na natureza física da fase móvel.....	19
Tabela 4 - Métodos de cromatografia de afinidade disponíveis utilizados na biosseparação de Ácidos Nucleicos.....	23
Tabela 5 - Extração e Separação de Ácidos Nucleicos Utilizando Processos Baseados em LI....	27

Lista de Acrónimos

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGO2	Proteína Argonaute-2
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferência
ARNm	ARN mensageiro
ARNr	ARN ribossômico
ARNt	ARN de transferência
C	Citosina
dsARNs	ARN dupla cadeia
dGMP	Monofosfato de desoxiguanosina
dAMP	Monofosfato de desoxiadenosina
dTMP	Monofosfato de desoxitimidina
dCMP	Monofosfato de desoxicitidina
DLS	Dispersão de Luz Dinâmica
DO	Densidade ótica
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
G	Guanina
LI	Líquido Iônico
miARNs	MicroARNs
Mp	Macroporosa
piARNs	Piwi-ARNs
PACT	Ativador proteico da proteína quinase induzida por interferão
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNAses	Ribonuclease
RISC	Complexo de silenciamento induzido por ARN
Rpm	Rotação por minuto
RMN	Espectroscopia por ressonância magnética nuclear
shARNs	ARN de <i>hairpin</i> pequeno
siARNs	Pequenos ARNs de interferência
S-Sil	Suportes de sílica
SEM	Microscópio eletrônico de varrimento
T	Timina
TRBP	Proteína de ligação ao ARN responsiva à transativação
UV	Ultravioleta

Capítulo 1- Introdução

1.1 Bioquímica dos ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos são macromoléculas constituídas por nucleótidos, que estabelecem ligações fosfodiéster entre si através do açúcar e o grupo fosfato de nucleótidos consecutivos. Assim, estas unidades monoméricas são constituídas por uma base azotada - anel heterocíclico de átomos de carbono e azoto; uma pentose - açúcar/monossacarídeo formado por cinco átomos de carbono (ocorrem dois tipos: a desoxirribose e a ribose, dependendo do ácido nucleico); e um grupo fosfato - derivado da molécula do ácido ortofosfórico (fósforo com quatro átomos de oxigénio). Relativamente às bases azotadas (Figura 1) estas podem ser classificadas em dois tipos: purinas - das quais fazem parte a adenina (A) e a guanina (G) sendo constituídas pela combinação de dois anéis de cinco e seis átomos (Figura 2); e pirimidinas - das quais fazem parte a timina (T), a citosina (C) e o uracilo (U) sendo constituídas por um anel de seis átomos (Figura 3) [1]. Consoante a sua composição química, existem dois tipos de ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico - ADN e ácido ribonucleico - ARN. Os ácidos nucleicos são dois importantes componentes das células que estão envolvidos em múltiplos processos biológicos, tais como a codificação genética, a síntese proteica, regulação e expressão de genes.

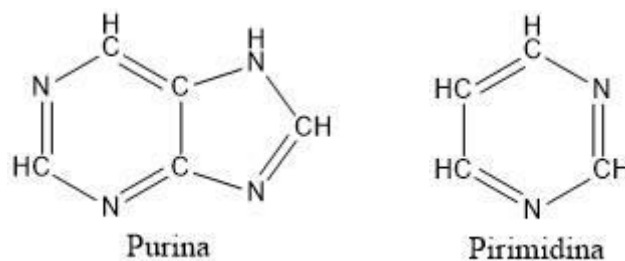


Figura 1 - Representação estrutural dos compostos heterocíclicos aromáticos pirimidina e purina.

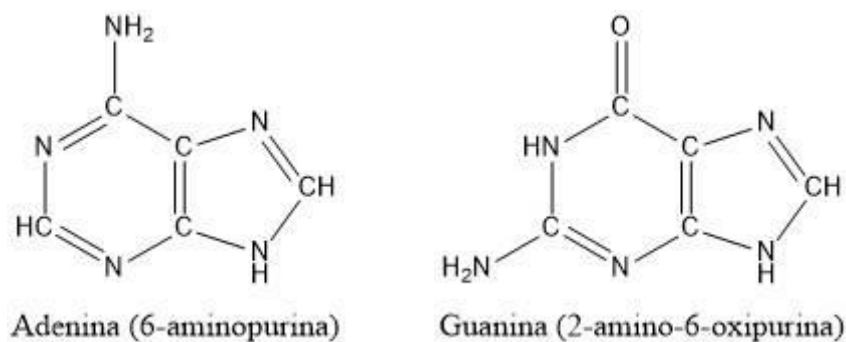


Figura 2 - Principais bases púricas. Derivados da purina: adenina (6-aminopurina) e guanina (2-amino-6-oxipurina).

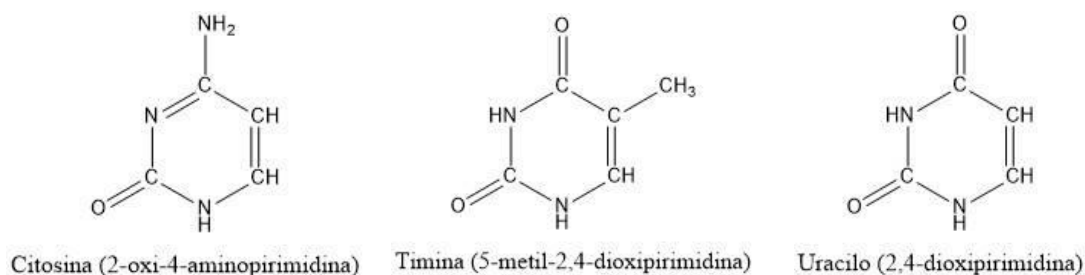


Figura 3 - Principais bases pirimídicas. Derivados da pirimidina: citosina (2-oxi-4-aminopirimidina), timina (5-metil-2,4-dioxipirimidina) e uracilo (2,4-dioxipirimidina).

1.1.1 Ácido ribonucleico (ARN)

O ácido ribonucleico (ARN) é um biopolímero composto por uma longa cadeia de ribonucleótidos, que se assemelha ao ácido desoxirribonucleico (ADN) uma vez que partilham as mesmas unidades químicas. No entanto, existem algumas diferenças fundamentais entre os dois ácidos nucleicos, nomeadamente que no ARN o nucleótido Timina é substituído pelo nucleótido Uracilo e o ARN apresenta como açúcar a ribose (Figura 4) nos seus nucleótidos em vez da desoxirribose encontrada no ADN. Os dois açúcares diferem na presença ou ausência de apenas um átomo de oxigénio, isto é, o açúcar do ARN contém um par oxigénio-hidrogénio ligado ao carbono 2' (grupo 2'-OH), enquanto apenas um átomo de hidrogénio é ligado ao carbono 2' nos açúcares do ADN. Esta última diferença faz com que o ARN seja uma molécula menos estável pois o seu grupo 2'-OH fica mais suscetível à clivagem nucleofílica e, por isso, é facilmente hidrolisado por iões hidróxido [2]. Relativamente à sua concentração na célula, esta biomolécula está presente em quantidades muito mais elevadas que o ADN uma vez que enquanto o ADN genómico é igual em todas as células somáticas, pois corresponde sempre ao genoma haploide, a concentração de ARN na célula varia de acordo com a atividade metabólica do tecido em causa [3].

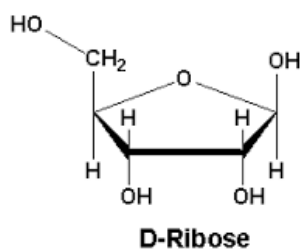


Figura 4 - Representação estrutural da D-ribose [4].

De uma forma geral, o ARN é uma cadeia simples de nucleotídeos, contudo, a cadeia de ARN pode adquirir diversas estruturas secundárias (Figura 5) consoante a existência de complementaridade entre as suas próprias bases, o que poderá facilitar a interação com outras moléculas, como proteínas, uma vez que pode ocultar ou expor determinadas bases da sequência de modo a que haja um reconhecimento mais efetivo [2]. A estrutura secundária mais comum é denominada de “*hairpin loop*”, que consiste numa estrutura dobrada sobre si mesma em forma de ansa, que resulta do emparelhamento intramolecular dos pares de bases complementares de uma única molécula de ARN, que é estabilizada por pontes de hidrogénio [5], [6]. As referidas ansas podem ocorrer em diferentes posições e em diferentes tipos de ARN formando assim outro tipo de estruturas secundárias como ansas internas e protuberâncias, o que permite uma enorme variabilidade em termos de interações específicas com proteínas [5]-[7]. O ARN pode ainda assumir estruturas terciárias que contêm ambientes internos com locais de ligação a iões metálicos para que possam promover reações catalíticas. Assim, as moléculas de ARN, que como as proteínas, podem catalisar importantes reações biológicas, funcionando como enzimas, são designadas de ribozimas. Esta alta reatividade química proporciona mais instabilidade à biomolécula o que aumenta a sua suscetibilidade à degradação [8]. No entanto, esta instabilidade é bastante importante para as células pois permite que os padrões de síntese proteica sejam alterados rapidamente de modo a dar resposta às necessidades biológicas [9].

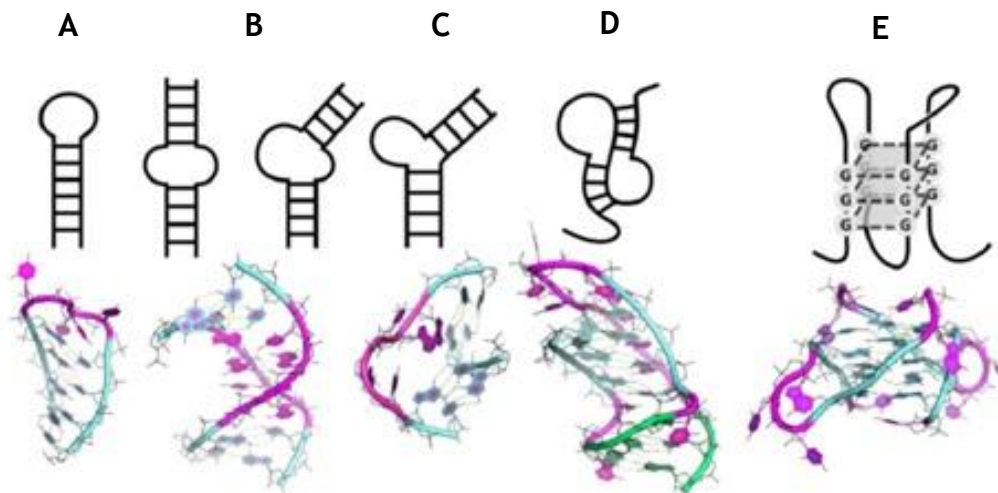


Figura 5 - Estruturas secundárias que o ARN pode assumir. Onde A - “*Hairpin-loop*”; B - “*Loops*” internos; C - Protuberância “*Bulge*”; D - Pseudo-nó; E - G-Quadruplex.

Independentemente da função biológica que os ARNs desempenham, estes são sempre sintetizados através de cópias de regiões específicas e bem delimitadas do ADN, tendo este processo o nome de transcrição. Deste modo, a transcrição constitui um processo bioquímico fundamental na formação do ARN e os seus mecanismos celulares obedecem a princípios gerais inerentes à estrutura polinucleotídica das cadeias de ADN e ARN. Assim sendo, a transcrição de genes eucariotas é mais complexa devido à organização supramolecular do ADN

genômico em cromatina e da sua compartimentalização no núcleo da célula, o que não existe nos procariontes [10], [11].

A transcrição pode considerar-se um processo assimétrico pois apenas uma das cadeias do ADN molde é transcrita em ARN. Essa mesma cadeia, cuja sequência é complementar ao produto, é designada de cadeia (-) “*antisense*”, por outro lado, a cadeia de ADN que não é transcrita e cuja sequência nucleotídica é idêntica à do ARN transcrito designa-se de cadeia (+) “*sense*” [10], [11]. A transcrição ocorre devido à ação de enzimas designadas de ARN polimerases. A reação de síntese de ARN ocorre entre o grupo 3’OH do resíduo da ribose do primeiro nucleótido trifosfato precursor e o grupo 5’fosfato do nucleótido trifosfato seguinte formando-se uma ligação fosfodiéster, e daí resultando o crescimento da cadeia de ARN na direção 5’P-3’OH. Existe uma grande diversidade destas enzimas dependendo do tipo de organismos. Por exemplo, nos procariontes apenas uma única enzima tem a capacidade de reconhecer os sítios do ADN genômico correspondentes ao início de cada gene e catalisa a reação de polimerização, por sua vez, nos organismos superiores existe uma maior variedade de polimerases pois cada classe de genes é reconhecida por um tipo específico de ARN polimerase: ARN polimerase I, II e III são as enzimas responsáveis pela síntese do ARN ribossomal, ARN mensageiro e ARN de transferência respetivamente. Nas células eucarióticas ainda existe a ARN polimerase mitocondrial IV que transcreve todos os genes que constituem o genoma mitocondrial [10], [11]. Estas enzimas são normalmente constituídas por duas subunidades de alto peso molecular e várias pequenas subunidades [1].

1.1.2 Diferentes tipos de ARN


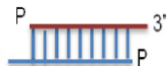
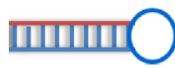

Os ARNs estão presentes nas células como produtos de genes que codificam para diferentes tipos de ARNs e estes, por sua vez, vão desempenhar uma panóplia de funções fisiológicas e biológicas. Existem essencialmente duas grandes classes de ARN: os regulatórios e os estruturais.

ARNs Regulatórios

Os ARNs de interferência são moléculas efetoras que podem regular a expressão de genes indesejáveis que se inserem no genoma, nomeadamente genes de vírus ou elementos genéticos internos. Os ARNs de interferência são ARNs de baixo peso molecular que derivam de cadeias longas de ARNs de dupla cadeia. Uma vez que são bastante específicos e eficientes têm sido alvo de intensa investigação como elementos fundamentais no desenvolvimento de uma técnica promissora no silenciamento de genes, sendo que esse silenciamento pode ocorrer devido a: i) clivagem endonucleotídica dos ARNs mensageiros, ii) repressão da tradução iii) repressão transcricional pela modificação do ADN e/ou histonas e por fim, iv) metilação do ADN pela modificação de histonas [10], [12].

Os fármacos baseados em ARNs de interferência possuem características atrativas em relação aos fármacos tradicionais que incluem a sua simplicidade, o alto grau de segurança, alta eficácia, possibilidade de serem modificados quimicamente de modo a melhorar os seus perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos e, por fim, a capacidade de promover terapias de longa duração reduzindo assim as despesas em tratamentos médicos. Por todas estas razões, os ARNi tornaram-se uma ferramenta bastante poderosa para o estudo da expressão de um gene alvo e, atualmente, já foram usados para regular várias vias envolvidas na origem e/ou progressão de um vasto número de doenças como as infeções virais (hepatite C, por exemplo), doenças metabólicas, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes (lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatoide, esclerose múltipla, entre outras) doenças inflamatórias, doenças neurodegenerativas (doença de Huntington, doença de Alzheimer e doença de Parkinson), doenças psiquiátricas e ainda diversos tipos de cancro [6]. Fazem parte dos ARNs de interferência: os pequenos ARNs de interferência (siARNs), os microARNs (miARNs) e os piwi-ARNs (piARNs), cujas características principais são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Resumo das propriedades gerais de ARNs não-codificantes [13].

Classe	Tamanho (bp)	Origem	Estrutura	Biogénese	Mecanismo de ação	Principais Funções
miARNs	21-25	Endógeno	Cadeia Dupla 	Clivagem em dois passos de precursores em forma de "hairpin" pela Drosha e Dicer	Repressão da tradução ou degradação do ARNm	Deadenilação/aprisionamento do ARNm; Resistência a fármacos; Estabilidade do ARN; Biomarcadores
siARNs	19-25	Exógeno ou Endógeno	Cadeia Dupla 	Clivagem de dsARNs longos endógenos pela Dicer	Induz a degradação do ARNm	Deadenilação/aprisionamento do ARNm; Resistência a fármacos; Estabilidade do ARN; Biomarcadores ;
shARNs	19-29	Exógeno	Cadeia Simples 	Processado pela Dicer para produzir siARN, transcrito pela ARN polimerase III	Induz a degradação do ARNm	
piARNs	24-31	Endógeno	Cadeia Simples 	Transcrito de loci genómicos específicos em piARNs primários que se associam às proteínas PIWI	Pode levar à degradação de moléculas do ARN alvo	Complexo de proteção de telómeros; Regulação epigenética

Os siARNs provêm de sequências repetitivas, pares "sense-antisense" ou ainda de precursores longos de ARN de cadeia dupla desenhados especificamente para silenciar a expressão de

genes alvo [13]. Este tipo de ARN pode ser introduzido exogenamente na célula assumindo uma forma curta, como por exemplo siARNs sintéticos, ou assumindo a forma de longas moléculas de ARN de dupla cadeia. Após a introdução no citoplasma, os ARNs longos de dupla cadeia são reconhecidos e processados por uma combinação de proteínas que incluem a enzima Dicer, a ribonuclease III, a TRBP e ainda a PACT acoplada a um ARN de dupla cadeia curto, com grupos fosfato em ambas as extremidades 5' juntamente com grupos hidroxilos e duas saliências de nucleótidos nas extremidades 3' [13]. Após o seu processamento, o siARN consiste numa cadeia “sense” e uma cadeia “antisense” complementar. Este siARN duplex, é nesta fase, incorporado no complexo RISC onde as cadeias “antisense” complementar e “sense” são separadas, sendo esta última subsequentemente degradada pela proteína Argonaute-2 (AGO2), que é um componente do RISC [13]. Posteriormente a cadeia “antisense”, que se encontra no complexo RISC, serve de molde para reconhecer uma região complementar da sequência de ARNm alvo. A interação resultante suprime a expressão génica, levando à clivagem endonucleotídica do ARNm que desta forma inibe a tradução para a proteína correspondente. Após o processo de silenciamento, os fragmentos existentes de ARNm são libertados e o RISC encontra-se disponível para se ligar a outro ARNm alvo e iniciar uma nova clivagem [13].

Como já foi referido é também possível silenciar a expressão génica através da introdução direta de siARNs ou ARNs de dupla cadeia obtidos sinteticamente. Quando os siARNs sintéticos são introduzidos nas células, podem ser reconhecidos diretamente pela maquinaria dos ARNs de interferência sem a necessidade de quaisquer etapas de processamento, o que evita a reação catalisada por Dicer. No entanto, como a meia-vida do siARN é curta, existem mecanismos para produzir siARN dentro da célula a partir de moléculas precursoras de siARN, sendo os shARN mais comuns. Estas moléculas são geralmente transcritas no núcleo a partir de um vetor de ADN de expressão externa. Um “hairpin-loop” é formado espontaneamente devido à região complementar, pela ARN polimerase II ou III. Nesta fase, o transcrito de shARN é processado pela Drosha, uma endonuclease da RNase III, resultando num pré-shARN que é exportado para o citoplasma onde é reconhecido pela maquinaria do ARNi e é processado pela Dicer para formar o siARN ativo, sendo posteriormente incorporado no RISC [13].

Os microARNs são uma classe de pequenos ARNs não codificantes constituídos por 21 a 25 nucleótidos, que atuam como reguladores chave na expressão génica através de um mecanismo intracelular altamente conservado que envolve o reconhecimento e controlo da tradução de um ARNm específico [3], [14]. Atualmente, sabe-se que o genoma humano contém mais de 500 miARNs e cada um deles pode reprimir centenas de genes, regulando uma diversidade de processos celulares [15]. A capacidade dos miARNs inibirem um ARNm específico é uma grande vantagem que tem bastante potencial como uma aplicação terapêutica em doenças que têm origem ou estão relacionadas com níveis desregulados de ARNm e miARN [16].

No núcleo, os pri-miARNs (transcritos de miARNs primários longos) são constituídos por vários pares de bases que contêm a sequência do miARN maduro e são transcritos pela ARN polimerase II, a partir de sequências genômicas codificantes de miARN. Após essa transcrição inicial, uma sequência comum de aproximadamente 11 nucleótidos é reconhecida e clivada por um microprocessador complexo, constituído por ribonuclease III, Drosha e proteína de ligação ao ARN - DGCR8, o que leva à formação de um precursor do miARN em forma de “*hairpin*”, designado de pré-miARN, com aproximadamente 70 a 110 nucleótidos. Os referidos pré-miARNs são exportados para o citoplasma pela Exportina-5, sendo este um transporte nuclear complexo dependente de Ran-GTP. Este transporte atua reconhecendo uma saliência de 2 a 3 pares de bases na extremidade 3’ do pré-miARN [17]. Uma vez no citoplasma, o pré-miARN é processado e o seu “*hairpin*” é removido por um complexo que contém a enzima Dicer- ribonuclease III, e os seus cofatores - TRBP e PACT. Posteriormente, um miARN maduro de cadeia dupla (miARN-miARN*), que pode variar no seu comprimento entre os 19 e 25 nucleótidos, é libertado. O miARN corresponde à cadeia “*antisense*” e o miARN* à cadeia “*sense*” [17], [18]. Após a remoção via Dicer, os miARNs maduros são associados à proteína Ago, sendo esta um componente central do RISC. Durante a abertura das cadeias, a cadeia “*sense*” é libertada e posteriormente direcionada para a clivagem endonucleotídica - catalisada por Ago2 - enquanto, a cadeia “*antisense*” é incorporada no RISC para formar o complexo de silenciamento de miARN - miRISC. Este complexo identifica o ARNm alvo com base na complementaridade da sequência com o ARNm [17].

Existem ainda os recém-descobertos ARNs de interação piwi - piARN - que possuem 24 a 31 nucleótidos e são amplamente expressos em diferentes tecidos e tipos celulares, mas em particular em células da linhagem germinativa de mamíferos. Estes ARNs podem funcionar como reguladores da expressão génica em diferentes processos celulares eucarióticos, no entanto os mecanismos de regulação da transcrição ainda precisam ser compreendidos. Sabe-se contudo que a via da biogénese destes ARNs é muito diferente dos miARN e siARN (Figura 6) pois é gerada por vias independentes da Ribonuclease III (RNase III) e não envolvem precursores de ARNs de dupla cadeia nem da enzima Drosha ou Dicer [10], [19], [13].

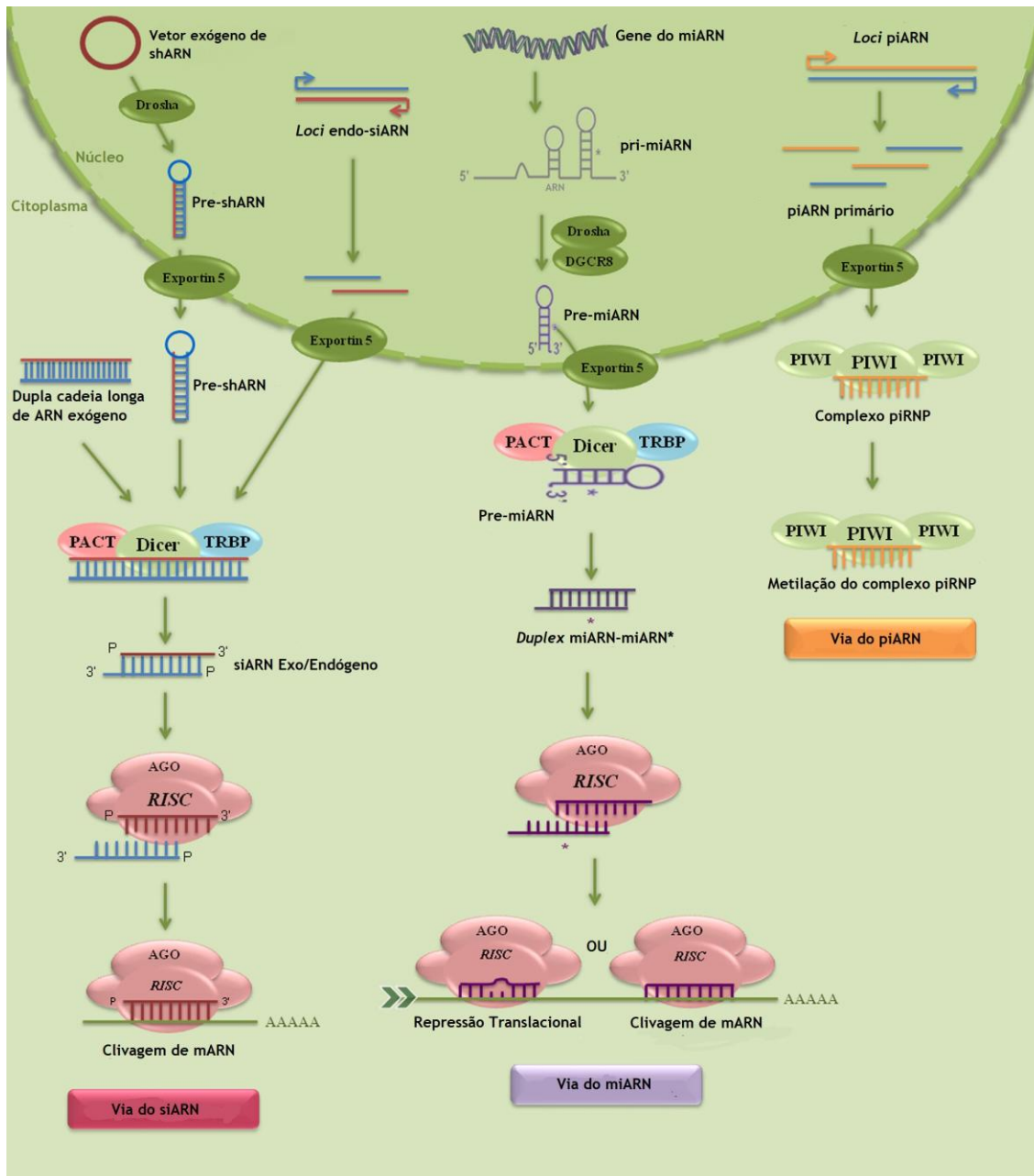


Figura 6 - Vias de silenciamento de RNA e seus componentes essenciais: siARN, miARN e piARN, adaptado de [13].

ARNs Estruturais

Os ARNs estruturais são compostos por três tipos de ARNs (Tabela 2): ARN ribossômico (ARNr) 80 a 90% do ARN celular, ARN de transferência (ARNt) que representa cerca de 10 a 15% do ARN celular, e o ARN mensageiro (ARNm) que raramente representa mais do que 2% do ARN total [2].

Os ARNs mensageiros são responsáveis pelo transporte de informação genética do ADN para o citosol, local onde é utilizado como modelo para a síntese proteica. Durante os últimos anos,


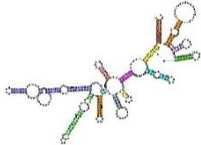
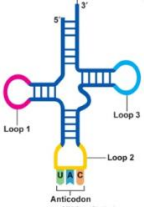
o ARNm tem despertado interesse como alvo terapêutico uma vez que é o responsável por passar a informação presente no gene podendo assim prevenir-se a tradução de uma determinada proteína que esteja associada a uma patologia [21]. O ARNm apresenta uma maior variedade de tamanhos e pode apresentar características diferentes consoante o tipo de células em questão. Nos procariotas, uma molécula de ARNm pode codificar diversas proteínas, sendo chamado de policistrónico. Relativamente aos eucariotas, o ARNm transporta informação para codificar uma única proteína [22], [23]. Nas células eucariotas, o transcrito primário é consideravelmente alterado após a transcrição, sendo alvo de modificações relativas à proteção da extremidade 5', à adição da cadeia polyA (sequência de 40 a 200 nucleótidos de adeninas que se ligam à extremidade da maioria dos ARNs) na extremidade 3' e à remoção dos intrões [1], [22], [24]. A primeira modificação referida ocorre devido à incorporação de um agente protetor, 7-metil-guanosina, com recurso a uma ligação trifosfato à extremidade 5' do ARNm seguido da metilação desse terminal de guanina. Esta incorporação ajuda na estabilização do ARNm. Relativamente à segunda modificação referida, a adição da cadeia polyA, também é importante para a estabilização dos ARNs e para o seu transporte do núcleo para o citosol, no entanto, uma vez no citosol, esta sequência vai sendo reduzida. Relativamente aos intrões, que são sequências do transcrito de ARNm que não codificam proteínas, a sua remoção ocorre para se obter o ARNm maduro, ficando desta forma apenas as sequências codificantes, os exões, que ao serem unidas formam o ARNm funcional [25]. Nos últimos anos, o potencial da molécula de ARNm tem sido explorado também numa perspectiva terapêutica. Em alternativa às vacinas de ADN, as vacinas baseadas em ARN mensageiro surgiram como uma abordagem terapêutica no tratamento de cancro e doenças infecciosas com foco em imunoterapias pois os antigénios codificados pelos ARNm são capazes de estimular todos os efetores da resposta imune adaptativa. Além disso, as moléculas de ARNm apresentam diversas vantagens como a sua alta viabilidade, segurança e eficácia. Esta nova abordagem terapêutica apresenta características adicionais de segurança bastante importantes uma vez que não se integram no genoma nem induzem a formação de auto-anticorpos. Outra vantagem é o facto dos ARNm produzidos *in vitro* serem fáceis de produzir em grandes quantidades e com uma pureza bastante elevada o que facilita o processo e garante a sua reprodutibilidade. Este processo de vacinação pode ser alcançado por vários métodos de entrega, nomeadamente recorrendo à injeção direta do ARNm, injeção do ARNm encapsulado em lipossomas, entrega do ARNm com partículas de ouro ou transfeção *in vitro* do ARNm em células seguido de re-injeção das células nos pacientes. Por estes motivos é fácil perceber que o desenvolvimento desta terapêutica é uma área de bastante interesse para as indústrias farmacêuticas e biotecnológicas, no entanto apesar das inúmeras opções já existentes apenas alguns medicamentos baseados em ARN estão a ser utilizados na prática clínica. Esta aceitação lenta pode estar relacionada com alguns problemas que ainda estão associados à utilização desta molécula, como a sua baixa estabilidade e fraca resistência a nucleases [6], [26].

O ARN ribossômico é o componente principal do ribossoma e está envolvido na tradução do ARNm em proteínas. Nos organismos eucariotas, os ARNs ribossomais são sintetizados a partir de um único transcrito primário de ARN que apresenta uma dimensão de 45S e cerca de 13kb. O referido transcrito é então processado em ARNs ribossomais de diferentes dimensões: 28S, 18S, 5.8S e 5S, sendo que o primeiro e o terceiro se associam a proteínas ribossomais para formar a subunidade grande do ribossoma. Por outro lado, o 18S liga-se a outras proteínas específicas de modo a formar a subunidade pequena do ribossoma. No caso dos organismos procariotas, os ARNs ribossomais atuam de forma similar, uma vez que também formam as mesmas subunidades, no entanto são caracteristicamente mais pequenos [27], [28].

Do ponto de vista funcional, o ribossoma é alvo de muitos agentes antibacterianos importantes por isso a investigação nesta área e nos elementos envolvidos, nomeadamente do ARNr, é crucial do ponto de vista terapêutico. Diversos antibióticos ligam-se às duas subunidades ribossomais em locais específicos o que interfere com vários aspetos das suas funções. A estrutura cristalina das referidas subunidades e dos seus componentes em ligação com os antibióticos são cruciais para interferir nos mecanismos de ação e seletividade do fármaco [29], [30]. Neste caso a seletividade é de extrema importância, já que o fármaco deverá reconhecer o ribossoma procariótico e interferir com a sua atividade, de forma a estabelecer-se a ação do fármaco, mas o ribossoma eucariótico não deverá ser reconhecido, para que não ocorra interferência na expressão proteica do hospedeiro.

Os ARNs de transferência são os mais pequenos dos três tipos referidos de ARNs estruturais, com cerca de 74 a 95 nucleótidos [22]. A função destes é transferir um aminoácido específico ativo para uma cadeia polipeptídica em formação no ribossoma, durante a tradução. Para cada aminoácido existe pelo menos um ARNt específico [31]. Este tipo de ARNs de transferência é definido como moléculas adaptadoras que traduzem as sequências nucleotídicas do ARNm nas sequências de aminoácidos das proteínas. Todos os ARNs de transferência possuem também uma organização conformacional em forma de trevo (quatro ansas) sendo que a ansa designada por anticodão é a estrutura responsável pelo reconhecimento do codão complementar de uma molécula de ARNm. Esse reconhecimento ocorre devido à complementaridade dos pares de bases entre as duas sequências trinucleotídicas [31]-[33].

Tabela 2 - Resumo das propriedades gerais de ARNs estruturais [6].

Classe	Tamanho	Estrutura	Descrição	Principais Funções
ARNms	Heterogéneo	Cadeia Simples 	O transcrito primário é processado pela ARN polimerase e, posteriormente, o ARNm é traduzido numa proteína.	Codificar proteínas (transfere informações genéticas do núcleo para o citoplasma, onde esta informação é traduzida para a proteína correspondente).
ARNrs	-1.9kb		Constituinte dos ribossomas (subunidades estruturais e catalíticas dos ribossomas)	ARN que participa na tradução de ARNm em proteína
ARNts	74-95 nucleótidos		Molécula adaptadora com uma estrutura em L invertido, sintetizada pelo processamento nuclear de uma molécula precursora; Serve como a ligação física entre o ARNm e a sequência de aminoácidos das proteínas.	Tradução do ARNm em proteína (transporta os aminoácidos ativados para o local de tradução, ou para o ribossoma);

1.1.3 Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

O ácido desoxirribonucleico (ADN) contém toda a informação genética que define as características hereditárias de cada organismo vivo, além de coordenar o desenvolvimento e funcionamento de todos os seres vivos e alguns vírus. Como mencionado anteriormente, a pentose existente neste ácido nucleico é a desoxirribose (Figura 7), uma vez que o carbono 2 deste açúcar não contém um átomo de oxigénio. Quase todo o ADN existente nos organismos procariontes localiza-se num único cromossoma, já nos eucariotes existem inúmeras moléculas de ADN, dependendo do número de cromossomas em cada célula. Por esse motivo a maioria do ADN situa-se no núcleo - ADN genómico - onde se combina com histonas [4], [34]. Os segmentos de ADN que contêm a informação genética são denominados genes, por sua vez os restantes segmentos da sequência de ADN têm importância estrutural ou estão envolvidos na regulação do uso da informação genética.

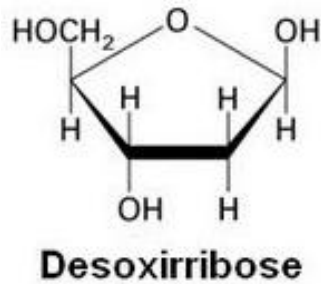


Figura 7 - Representação estrutural da D-desoxirribose. Na posição 2' a desoxirribose está desprovida do átomo de oxigénio existente no grupo hidroxilo da ribose [4].

Sabe-se que o ADN é composto por duas cadeias simples, complementares, apresentando-se em dupla hélice. Na parte exterior encontram-se ligações fosfato-açúcar-fosfato que ligam o átomo de carbono 5' de uma desoxirribose ao átomo 3' da desoxirribose adjacente podendo dizer-se que esta ligação tem polaridade. Já na parte interior da molécula encontram-se as bases azotadas, que interagem formando os pares de base através das ligações de hidrogénio, estabelecidos entre bases púricas e pirimídicas. Existem ainda interações hidrofóbicas e de van der Waals entre bases empilhadas. Uma vez que cada ligação fosfodiéster tem carga negativa, a suscetibilidade do ADN à hidrólise comparativamente com outros ésteres é menor. Além disso, a carga negativa do fosfato tem a capacidade de repelir espécies nucleofílicas, sendo este facto crucial para a manutenção da integridade da informação armazenada nos ácidos nucleicos [24].

Independentemente do tipo celular, as moléculas de ADN apresentam sempre o mesmo tipo de mononucleótidos (dAMP, dGMP, dTMP, dCMP), no entanto as proporções e sequências destes mononucleótidos variam consoante a espécie biológica obedecendo sempre a duas relações fundamentais: 1) a soma das bases púricas é igual à das pirimídicas; 2) a proporção molar da adenina iguala a da timina enquanto a guanina equivale à citosina [4].

A quantidade do ADN de uma espécie é constante em todo o organismo independentemente das alterações exteriores, do metabolismo celular e das condições nutritivas do meio, no entanto quanto mais complexa é a célula maior é a proporção de ADN que contém, por exemplo, enquanto nos mamíferos cada célula possui cerca de $6 \times 10^{-6}mg$ de ADN, os moluscos possuem aproximadamente $1.2 \times 10^{-6}mg$. No caso dos eucariotas, as células haploides têm metade do conteúdo de ADN das células somáticas (diploides) [4].

Como já foi referido, o ADN contém a informação genética necessária para a síntese dos produtos biológicos funcionais, sejam proteínas ou ARNs sendo desta forma essencial para o desenvolvimento de todas as formas de vida conhecidas. A maioria das principais doenças têm um componente genético complexo, onde vários genes “predispostos” contribuem para a etiologia da doença, tornando-se importante saber quais são esses genes de forma a melhorar a saúde humana.

Desde a descoberta da estrutura básica e função do genoma humano que a manipulação de genes como terapia para cancro e distúrbios genéticos tem sido uma meta importante para a

investigação clínica. Um requisito imperativo para a aplicação terapêutica de qualquer ácido nucleico é a entrega bem-sucedida na célula hospedeira seguido da libertação no compartimento-alvo, citoplasma ou núcleo caso seja ARN e ADN, respetivamente. Os ácidos nucleicos por si só são incapazes de induzir efeito terapêutico relevante quando administrados sistemicamente *in vivo* pois são facilmente degradados por nucleases, existindo assim a necessidade de um vetor que melhore a superação das barreiras biológicas garantindo a estabilidade num ambiente extracelular, interação com a superfície celular e absorção celular, libertação de vesículas endossomais e lisossomais e ainda desintegração do vetor seguido de translocação do ADN para o núcleo quando necessário [35].

1.2 Métodos de Obtenção de ARN

Durante muitos anos, o ARN passou despercebido sendo considerado apenas um intermediário no fluxo de informação entre o ADN e as proteínas, no entanto, nos dias de hoje sabe-se que este desempenha diversas funções celulares e é responsável por uma infinidade de processos biológicos essenciais, o que tem elevado a sua importância terapêutica. Portanto, não é necessário apenas conseguir produzir grandes quantidades desta biomolécula mas também obter e preservar a sua boa qualidade e atividade biológica, atendendo à potencial aplicação [13], [36].

Atualmente, as principais metodologias disponíveis para obter moléculas de ARN são a síntese química, síntese enzimática e a produção recombinante. A síntese química é normalmente usada para a produção de oligorribonucleótidos curtos (< 50 nucleótidos). Este método requer a proteção dos grupos hidroxilo 5' e 2' e reações sequenciais de desproteção-ligação-oxidação que permitem modificar cada grupo em separado para posteriormente serem adicionados elementos específicos na sequência. Paralelamente às reações de síntese são incluídas modificações químicas às moléculas de ARN que têm como objetivo proporcionar-lhe uma maior estabilidade e afinidade. Apesar destas modificações permitirem um melhoramento farmacocinético podem comprometer a dinâmica estrutural, a atividade biológica e os perfis de segurança tornando-se assim uma desvantagem. Para além disso, os solventes necessários à sua realização e o alto custo de produção também são fatores menos positivos associados a este método [36]-[38]. Por sua vez, a síntese enzimática tem sido utilizada para produzir cadeias simples de ARN com a utilização da ARN polimerase. Este método apresenta como vantagem a sua simplicidade e versatilidade uma vez que consiste na produção de ARN com recurso à transcrição "in vitro", usando como molde uma sequência linear de ADN, produtos de PCR ou oligonucleótidos sintetizados de forma específica. No entanto também apresenta desvantagens uma vez que a correta aplicação da ARN polimerase pode ser posta em causa se a referida enzima não identificar o promotor para a transcrição levando a que o processo ocorra de forma não reprodutível [37], [39], [40]. Por fim, a reprodução recombinante é considerada como o método mais rentável uma vez que é possível

eliminar contaminantes e possíveis agentes de degradação do ARN que estão presentes nos métodos mencionados anteriormente [39]. Para a realização deste método têm sido utilizados hospedeiros procariotas, transformados com plasmídeos previamente desenhados de forma a produzir o ARN de interesse durante a etapa de crescimento do sistema hospedeiro [41].

Após a produção do ARN é imprescindível garantir os melhores métodos para que a biomolécula de interesse se mantenha com qualidade, ou seja, não se degrade e mantenha as suas funções para posterior aplicação. Sabe-se que o ARN é química e biologicamente mais lábil que o ADN, principalmente a temperaturas elevadas e na presença de pH alcalino [42]. Para além disso, esta biomolécula tem também um tempo de meia vida muito curto e a presença das enzimas que catalisam a degradação do ARN (RNAses) em praticamente todo o lado (tais como amostras biológicas, tampões aquosos, no laboratório e ainda no próprio operador) são uma preocupação constante pois comprometem a sua integridade. Portanto, um dos grandes cuidados quando se pretende purificar o ARN é o ajuste de todas as condições de trabalho, certificando-se sempre que todos os materiais de vidro, plásticos, instrumentos e reagentes estejam livres de RNAses para deste modo poder garantir a sua estabilidade estrutural e funcional e, assim, manter a sua atividade biológica [13], [36].

Devido à sua fácil degradação, consequência de uma estrutura química peculiar, os processos de isolamento e purificação ainda são etapas bastante críticas que podem comprometer a sua integridade e atividade biológica. Além disso, existe também a necessidade de maximizar o rendimento de recuperação, ou seja, remover contaminantes indesejáveis, minimizar a transferência de amostra e, ainda evitar ligações não específicas a contaminantes. Desta forma, a qualidade e quantidade das amostras de ARN são as principais preocupações, pois quando uma destas está comprometida há a possibilidade de restrição ao sucesso de diversos procedimentos baseados em ARN em ensaios clínicos [36]. De uma forma geral, os protocolos para o isolamento do ARN iniciam-se com a lise celular que ocorre devido à utilização de tampões que se dividem em duas categorias: os agentes caotrópicos que rompem a membrana plasmática e os organelos sub-celulares e ainda inativam as RNAses (sais de guanidina, N-laurilsarcosina (*sarcosyl*), ureia, fenol, clorofórmico, entre outros); e os tampões que solubilizam gentilmente a membrana plasmática enquanto mantêm a integridade nuclear [43]. Os restos celulares resultantes são posteriormente removidos por centrifugação diferencial. Em 1987 foi descrito um método para o isolamento e purificação do ARN através do tratamento das células com tiocianato de guanidina. Neste procedimento o ARN é isolado através da adição de sais de guanidina e posterior adição de clorofórmio para facilitar a compartimentação do material aquoso e orgânico, sendo que o ARN fica retido na fase aquosa e o ADN e as proteínas são repartidos entre a fase orgânica e a interface formada. De seguida, o ARN é recuperado por precipitação com isopropanol e recolhido por centrifugação [44]. Existem outros procedimentos para o isolamento de ARN, nomeadamente os que estão presentes em diversos *kits* comerciais mas estes não são amplamente utilizados devido ao seu elevado custo e ao facto de não superarem a simplicidade da precipitação [42].

1.3 Métodos de Obtenção de ADN

Uma técnica amplamente usada para obtenção de ADN é a tecnologia de ADN recombinante. É um método relativamente recente (início dos anos 80) mas desde a sua criação foi responsável por um aumento da compreensão da base molecular das patologias genéticas humanas. O objetivo desta técnica é introduzir um gene de um organismo numa célula hospedeira onde ele possa ser perpetuado [45].

Primeiramente começa-se por clivar o fragmento de ADN que contém o gene de interesse, recorrendo às enzimas de restrição. Posteriormente o vetor onde esses fragmentos vão ser inseridos é clivado pela mesma enzima de restrição, de seguida é utilizada uma enzima chamada de ligase que une os fragmentos de ADN ao vetor previamente clivado obtendo-se uma molécula de ADN recombinante que é inserida numa célula hospedeira. Normalmente cada célula hospedeira recebe apenas uma molécula de ADN recombinante, no entanto a eficiência de absorção dessas moléculas é muito baixa e por isso as células hospedeiras que incorporaram o ADN alvo devem ser identificadas e separadas das que não o fizeram através da utilização de um meio seletivo onde apenas as células que possuem o ADN recombinante consigam crescer (figura 8) [45].

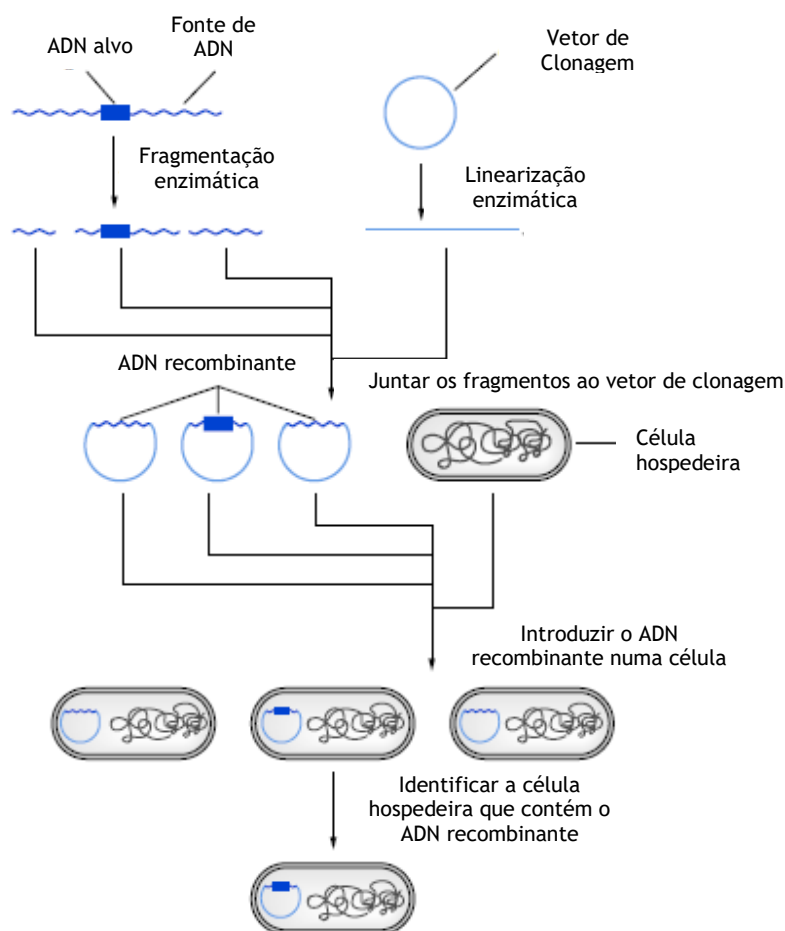


Figura 8 - Representação esquemática da clonagem de ADN.

Após a produção do ADN é necessária a sua extração, que consiste no processo pelo qual esta biomolécula é separada do meio de amostra. Isso é normalmente obtido usando métodos físicos e químicos para lisar células e separar o ADN de quaisquer contaminantes ou substâncias inibitórias associadas ao material da amostra.

Apesar de na tecnologia de ADN recombinante o ADN estar presente em células hospedeiras, existem diversas fontes de ADN e de onde ele pode ser extraído o que vai influenciar o modo como essa extração acontece. Existe uma variedade de *kits* comerciais para esse efeito que são escolhidos tendo em conta o local e o *Taxón* de onde se irá extrair como por exemplo o DNeasy PowerSoil® e PowerMax® são utilizados para extração de DNA do solo, sedimentos e fezes, o DNeasy PowerSoil® para extração de DNA do tecido vegetal, o DNeasy Sangue e Tecidos para extração de DNA de tecido animal e de macroorganismos em água e gelo, por sua vez o DNeasy PowerWater® é utilizado para extração de DNA de microorganismos em água e gelo (figura 9 e 10) [46].

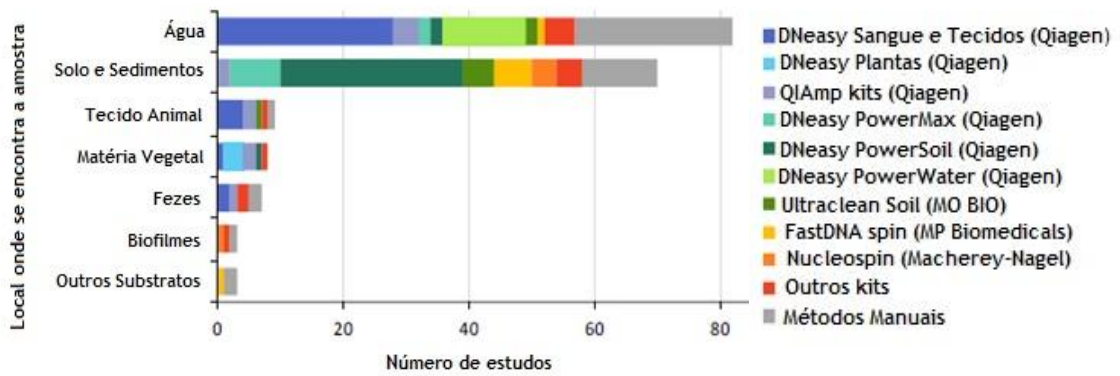


Figura 9 - Kits de extração de ADN e métodos usados para diferentes locais onde a amostra pode estar presente.

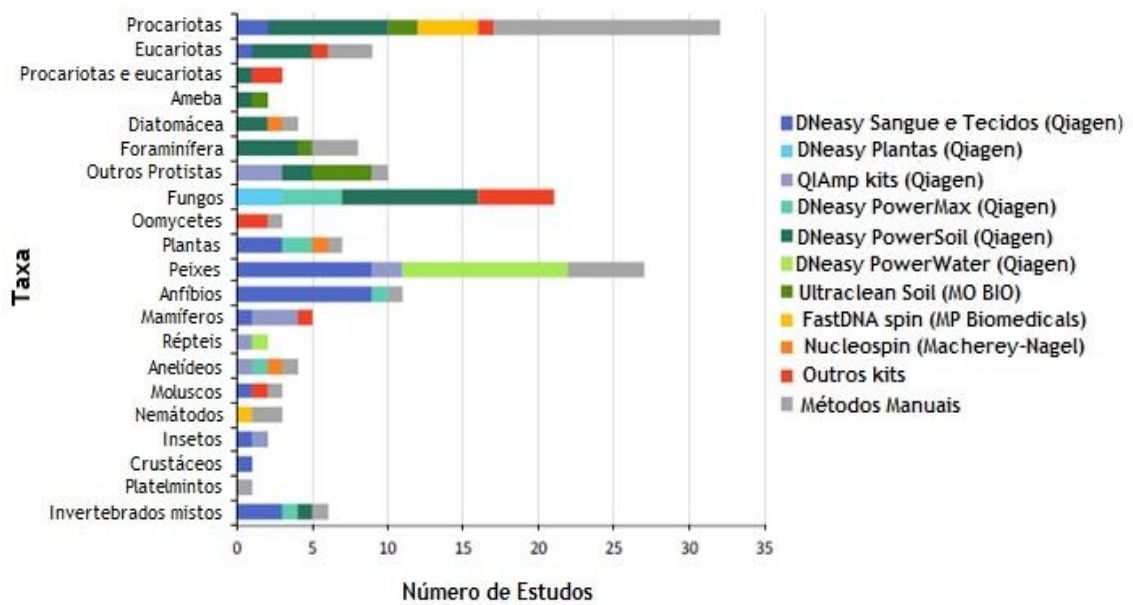


Figura 10 - Kits de extração de ADN e métodos utilizados em estudos focados na análise de ADN ambiental originário de diferentes taxas.

No entanto, apesar da maioria dos *kits* existentes serem consideravelmente eficazes, também apresentam diversas desvantagens que são comuns a todos eles, tais como o seu elevado custo e o facto de necessitarem de protocolos por vezes demorados e complexos. Assim sendo, continua a ser necessário a otimização de um método que permita obter ADN livre de impurezas de forma barata, rápida e eficaz.

1.4 Cromatografia como método de purificação

Apesar de todas as técnicas referidas de isolamento apresentarem resultados satisfatórios ainda apresentam diversas limitações existindo assim a necessidade de implementar novos métodos de purificação que sejam capazes de melhorar a qualidade do ARN de forma a que este possa atender às exigências regulatórias [36]. Para além das estratégias referidas, nos últimos anos a cromatografia tem sido explorada para superar os crescentes desafios na purificação do ARN, nomeadamente a cromatografia de afinidade baseada em aminoácidos, que foi bastante explorada pelo nosso grupo de investigação [13], [38], [47]-[52], tendo sido descrita como uma abordagem eficaz para a purificação de ácidos nucleicos.

A cromatografia pode definir-se como o processo de separação efetuado pela distribuição dos componentes de uma mistura em duas fases, uma fase estacionária e uma fase móvel. A cromatografia permite através de um único passo separar componentes de uma mistura e ainda ter uma estimativa da sua quantidade tornando-a assim, na técnica mais poderosa e versátil. A vantagem de as moléculas presentes na amostra apresentarem diferentes propriedades físicas e químicas faz com que se distribuam diferencialmente entre as duas fases e como tal, os componentes preferencialmente mantidos na fase estacionária são retidos mais tempo no sistema do que aqueles que são distribuídos seletivamente na fase móvel. Como consequência, os solutos são eluídos do sistema de acordo com os seus coeficientes de distribuição em relação à fase estacionária [53], [54].

Um processo cromatográfico, de uma forma geral, ocorre em cinco etapas: 1) Equilíbrio das fases, de forma a ajustar as fases móvel e estacionária às condições de ligação; 2) Aplicação da amostra; 3) Lavagem ou remoção do material que não liga; 4) Eluição da biomolécula através da alteração da composição da fase móvel; e, por fim, 5) Regeneração da coluna, onde ocorre a eluição total e lavagem das impurezas da fase estacionária [54]. Como já foi referido, todas as cromatografias são realizadas recorrendo a uma fase móvel e uma fase estacionária, portanto a classificação primária desta técnica é baseada na natureza física destes componentes (Tabela 3) e do princípio de separação.

Tabela 3 - Classificação primária da cromatografia com base na natureza física da fase móvel.

Fase Móvel	Fase Estacionária
Gás	Líquida
Cromatografia Gasosa	Cromatografia Gasosa-Líquida
	Sólida
	Cromatografia Gasosa-Sólida
Líquida	Líquida
Cromatografia Líquida	Cromatografia Líquida-Líquida
	Sólida
	Cromatografia Líquida-Sólida

Através de uma escolha adequada do tipo de cromatografia conseguem-se separações efetivas de moléculas mesmo que estas apresentem grandes homologias. Esta flexibilidade permitiu o avanço da tecnologia cromatográfica o que se traduz em constantes inovações em termos de colunas o que leva a uma melhor resolução, robustez, elevada capacidade e estabilidade física.

Apesar de nem sempre ter sido assim, nos dias de hoje a cromatografia é reconhecida como um método de separação bastante eficaz no que diz respeito à sua resolução e versatilidade. Também é reconhecido que o seu poder de resolução é superior à centrifugação e ultracentrifugação e, que é capaz de efetuar isolamentos em larga escala [55]. Pode considerar-se que a cromatografia é apropriada para praticamente todas as situações de separação em biotecnologia e pode ser dividida em cromatografia de partição e cromatografia de adsorção. Na primeira, a fase estacionária pode ser um solvente, um líquido, um sólido imobilizado como papel ou ainda uma matriz em gel, e as interações específicas entre as moléculas a serem separadas e as fases estacionárias são ínfimas. Por outro lado, no segundo tipo de cromatografia referido, a fase estacionária compreende numa matriz granular fina ou em esferas que por sua vez é empacotada numa coluna e equilibrada com um tampão e a amostra é adicionada ao topo dessa mesma coluna onde a sua difusão é permitida. Desta forma, a amostra entra em contacto com as partículas da matriz e estabelecem-se interações distintas com o tampão e com a matriz o que leva a um fracionamento das várias espécies presentes na amostra [56].

1.4.1 Tipos de Cromatografia

Uma grande vantagem da cromatografia é o facto de poder explorar diferentes tipos de interações entre as duas fases existentes, o que faz com que existam quatro tipos principais de técnicas cromatográficas que exploram determinada característica específica da biomolécula de interesse: tamanho, carga, hidrofobicidade, entre outras.

Cromatografia de Interação Hidrofóbica

Este método cromatográfico é baseado na agregação de moléculas não polares quando expostas a um solvente polar, ou seja, este método está relacionado com o efeito hidrofóbico como fator de grande importância e fundamental na estrutura e estabilidade das biomoléculas. Desta forma, a molécula apolar fica rodeada pelas moléculas polares do solvente diminuindo assim a entropia. Para diminuir o decréscimo entrópico as moléculas apolares tendem a diminuir a superfície de contacto. A fase estacionária é normalmente um material inerte, modificado com grupos hidrofóbicos funcionais, tais como o etil, propil, hexil, octil e fenil. A amostra pode ser aplicada à coluna com um tampão que favoreça a exposição de regiões hidrofóbicas, como por exemplo o sulfato de amónio, o que leva ao estabelecimento de interações hidrofóbicas entre a biomolécula e a fase estacionária. A eluição, por sua vez, é promovida pela aplicação de um tampão com efeito contrário, normalmente diminuindo a concentração de sal e consequentemente a força iónica, o que limita a exposição de regiões hidrofóbicas, bloqueando a interação com a fase estacionária, o que conduz à eluição das moléculas anteriormente retidas [57], [58],[56], [59].

O facto de ser necessária uma elevada concentração de sal é uma desvantagem desta técnica, nomeadamente em aplicações na indústria, uma vez que esta característica está associada a maiores custos, assim como um maior impacto ambiental [58]. No entanto, esta técnica continua a ser usada uma vez que o dano causado às biomoléculas é bastante baixo e a sua atividade biológica permanece intacta uma vez que as interações estabelecidas são mais fracas que noutras técnicas cromatográficas [57].

No caso dos ácidos nucleicos, a sua separação é conseguida devido às diferenças de hidrofobicidade entre o ADN plasmídico, os ARNs de cadeia simples e endotoxinas. Assim sendo o tamanho, a composição e a estrutura dos ácidos nucleicos são o que mais influenciam a sua retenção aquando a utilização desta técnica [58].

Cromatografia de Exclusão Molecular

A cromatografia de exclusão molecular separa os componentes de um lisado com base nos seus tamanhos. Devido à imensa diversidade de tamanhos que as espécies de ácidos nucleicos podem apresentar, a sua capacidade de resolução é baixa, podendo portanto ser utilizada de forma mais eficiente na separação de amostras menos complexas [58].

A fase estacionária consiste numa rede de poros de tamanho controlado, onde as moléculas, cujas dimensões não ultrapassam o tamanho máximo do poro, conseguem entrar. Quando a amostra é injetada na matriz, as moléculas de maiores dimensões são as primeiras a eluir seguidas pelas moléculas de menores dimensões uma vez que estas conseguem entrar nos poros e, por isso, percorrem um caminho mais longo o que resulta num maior tempo de retenção. Desta forma, as moléculas são eluídas por ordem decrescente do seu tamanho molecular [57], [59], [60]. A cromatografia de exclusão molecular pode ser usada para separar espécies com pesos moleculares entre os 10^2 e 10^6 Daltons [54].

Esta técnica cromatográfica é bastante utilizada na separação de ácidos nucleicos uma vez que as moléculas de alto peso molecular como o ADN genómico, ADN plasmídico e ADN complementar eluem perto do limite de exclusão da matriz, já as moléculas de baixo peso molecular, tais como ARN, proteínas e endotoxinas, apresentam uma retenção muito maior na matriz. Para além deste facto, esta técnica permite que o tampão utilizado seja substituído por uma solução ou por um tampão de armazenamento, o que permite um controlo rigoroso relativamente a pequenas quantidades de contaminantes que possam ser introduzidas durante o processo. No entanto, esta técnica não é muito eficaz na separação de ARN presente em amostras complexas e induz a diluição da mesma [57].

Cromatografia de Troca Iónica

Esta técnica cromatográfica separa as biomoléculas com base nas interações electrostáticas que se estabelecem entre os grupos funcionais carregados das moléculas alvo e as cargas presentes nos ligandos da fase estacionária. Esta interação é reversível pois ao utilizar-se um contra-íão na fase móvel este vai competir com a molécula ligada à fase estacionária e deste modo ocorrerá a separação das biomoléculas de acordo com a intensidade das interações. Quando a amostra é injetada no suporte, as moléculas que têm a mesma carga que a fase estacionária ou as que não apresentam carga, eluem de imediato, posteriormente e após um aumento gradual da concentração do contra-íão na fase móvel ou alterando o pH, as moléculas que interagem com a fase estacionária são eluídas por ordem crescente de intensidade de interação [57], [58], [61].

Existem duas possibilidades de operação na cromatografia de troca iónica: a troca aniónica caso a fase estacionária possua carga positiva e a molécula e o contra-íão tenham carga negativa, ou caso se verifique o oposto, ou seja, a fase estacionária possua carga negativa e a molécula e o contra-íão possuam carga positiva designa-se por troca catiónica [58].

A utilização desta técnica para a separação de ácidos nucleicos é possível devido à interação dos grupos negativos das referidas biomoléculas com as matrizes carregadas positivamente, sendo que os primeiros compostos a eluir serão os que apresentam menor densidade de carga, ou seja, os ácidos nucleicos de cadeia simples como o ARN, seguido pelos ácidos nucleicos de maiores dimensões que possuem interações mais fortes. Apesar de bastante utilizada, esta técnica apresenta algumas limitações no caso da purificação de ARN uma vez que se torna

difícil separar espécies particulares uma vez que apresentam estruturas e propriedades físico-químicas semelhantes [57], [58].

Cromatografia de Afinidade

A cromatografia de afinidade baseia-se no estabelecimento de múltiplas interações bioespecíficas, que mimetizam processos de reconhecimento que ocorrem entre os domínios proteicos e os ácidos nucleicos nos sistemas biológicos, envolvendo em particular aminoácidos básicos como a histidina ou a arginina [36], [47]. A cromatografia de afinidade enquadra-se na categoria das cromatografias líquidas, sendo considerada a mais multifacetada e adaptável, pois é a única que utiliza um agente de ligação específico - ligando - para purificar uma biomolécula tendo em conta a sua função biológica ou estrutura individual química [57], [58]. A separação ocorre tendo por base uma interação reversível entre a biomolécula alvo e o seu ligando específico que é acoplado à matriz cromatográfica, através de uma conjugação de múltiplas interações não covalentes. Assim, as interações podem ser de vários tipos, nomeadamente eletrostáticas, hidrofóbicas, forças de *van der Waals* e/ou pontes de hidrogénio, entre outras. Os processos de eluição podem ser de dois tipos: específicos - através da utilização de agentes competitivos, ou não específicos - por manipulação das condições da fase móvel através da alteração do pH, força iónica ou polaridade, dependendo da matriz em uso e das características químicas das biomoléculas em estudo [58].

Em comparação com os outros tipos de cromatografia líquida, a cromatografia de afinidade apresenta algumas vantagens, tais como a especificidade das interações que confere elevada seletividade e resolução, permitindo eliminar etapas adicionais no processo, assim como aumentar o rendimento e melhorar a componente económica. Contudo, a origem biológica dos ligandos é tida como uma limitação uma vez que estes tendem a ser frágeis e estão normalmente associados a baixas capacidades de ligação [58]. Devido às fragilidades apontadas relativamente aos ligandos biológicos, existem estudos que visam desenhar e sintetizar ligandos sintéticos tendo em conta as características naturais das biomoléculas de interesse, que teriam a seletividade dos naturais. No entanto, apesar de já se terem alcançado resultados promissores relativamente a ligandos para proteínas específicas, o seu desenvolvimento para ácidos nucleicos ainda não foi largamente descrito [58].

Existe uma diversidade enorme de ligandos que podem ser utilizados neste tipo de cromatografia como os aminoácidos, péptidos e proteínas. Na tabela 4 pode ver-se a diversidade que ligandos que já são utilizados neste momento. No entanto, todas as abordagens apresentam diversas desvantagens e devido à fragilidade dos ligandos e à sua baixa capacidade de ligação às matrizes, continuam a ser necessárias novas abordagens para desenhar ligandos sintéticos que combinem a seletividade de um ligando natural com a elevada capacidade e durabilidade dos atuais ligandos sintéticos [62].

Tabela 4 - Métodos de cromatografia de afinidade disponíveis utilizados na biosseparação de Ácidos Nucleicos [13], [63].

Método	Alvo	Vantagens	Desvantagens
Cromatografia de Afinidade com Boronato	ARNts	- Isolamento de ARN a partir de extratos celulares complexos; - Alta pureza e qualidade do ARN purificado; - Processo muito rápido; - Eliminação eficiente do ADN genómico	- Por vezes, a coluna deve ser lavada com 6 M de ureia antes da lavagem com o tampão de regeneração
Cromatografia de Afinidade com sequências de oligoribonucleótidos	shARN miARN	- Alta recuperação e pureza devido à seleção específica das sequências com elevada afinidade à molécula alvo; - Amplamente aplicável a qualquer ARN de interesse	- Em alguns casos, contaminação do ARN alvo com a sequência ligando, que pode ser libertada da coluna durante as etapas de lavagem e eluição; - Durante o processo de purificação, modificações químicas podem levar a perturbações estruturais que podem inibir a formação de complexos ou degradar significativamente o ARN.
Cromatografia de afinidade baseada em aminoácidos	Precusores de miARN ARNrs ARNts ARN total	- Isolamento de ARN alvo a partir de extratos celulares complexos num único passo cromatográfico; - Alta pureza e qualidade do ARN purificado, já que as etapas envolvidas são muito rápidas; - Purificação com alta reprodutibilidade	- Em alguns casos, são necessárias elevadas concentrações de sal para a eluição das moléculas alvo; - Baixos rendimentos de recuperação - Menor durabilidade dos suportes

Portanto a utilização de uma matriz macroporosa é bastante vantajosa pois devido à presença de poros com diâmetro elevado permite que haja um aumento da área de superfície e faz com que parte da fase móvel flua através desses poros e não em torno deles, melhorando desta forma a cinética de separação no seu interior reduzindo o comprimento do percurso de difusão. Para além disso a lenta difusão dos solutos dentro dos poros não restringe a qualidade da separação e a pressão de retorno da coluna também é melhorada [64]. Acrescentando a estas vantagens o uso de líquidos iónicos, consegue-se executar um processo cromatográfico bastante promissor ao nível da separação de ácidos nucleicos, uma vez que estes compostos permitem uma imensidão de combinações entre os aniões e os catiões, que são escolhidos em função das características pretendidas tornando-se assim altamente seletivos. Acrescendo a este facto, os líquidos iónicos são uma alternativa muito mais

ecológica que as misturas de solventes que normalmente são utilizadas e são responsáveis pela libertação de imensos compostos voláteis. No caso concreto do presente trabalho será utilizada uma matriz macroporosa com $\text{SiPrNEt}_3\text{Cl}$ imobilizado (catião: trietilamina; anião cloreto).

1.5 Líquidos Iônicos

Os líquidos iônicos (LIs) são um conjunto de sais que têm estruturas e propriedades variáveis, no entanto apresentam características comuns como o ponto de fusão inferior a 100 °C o que lhes confere uma grande estabilidade térmica e química, baixa pressão de vapor, alta polaridade, elevado espectro eletroquímico, pouca inflamabilidade, baixa volatilidade e boa capacidade de solubilidade [65]-[69]. Estas características levam a que os líquidos iônicos tenham uma variedade de aplicações, nomeadamente em diversas reações sintéticas, separações e extrações e processos nanotecnológicos, biotecnológicos e de engenharia [67], [69]. Os líquidos iônicos são normalmente constituídos por um catião orgânico de grande dimensão e baixa simetria e por um anião que pode ser orgânico ou inorgânico. Uma vez que as combinações possíveis são imensas, são chamados de “design solvents”, o que leva a que sejam escolhidos de acordo com as características pretendidas [67], [70], [71]. De acordo com essas mesmas características e também com as suas propriedades estruturais podem ser classificados em líquidos apróticos (convencionais) que utilizam catiões grandes e orgânicos que podem ser derivados de imidazol, amónio, piridina, sulfónio, fosfónio e muitos outros. Relativamente aos aniões, estes podem ser orgânicos ou inorgânicos. Por outro lado, existem os líquidos iônicos próticos que surgem a partir da transferência de prótons de um ácido de Bronsted para uma base Bronsted [67], [72], [73].

Apesar da enorme variedade de catiões e aniões que se podem utilizar existem alguns que são utilizados com mais frequência, por exemplo no caso dos catiões temos imidazólio, o fosfónio, o amónio, entre outros; já relativamente aos aniões temos o cloreto, o iodeto, o brometo, entre outros (figura 11 e 12).

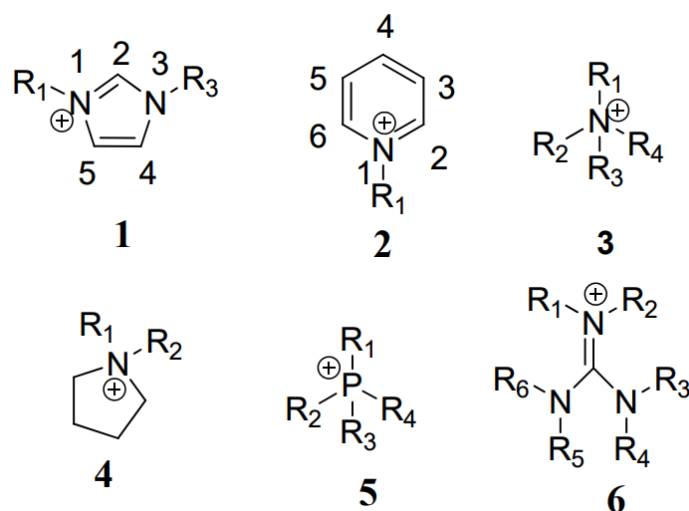


Figura 11 - Estruturas catiônicas habituais em líquidos iônicos: 1 - imidazólios, 2 - piridínios, 3 - amónios, 4 - pirrolidínios, 5 - fosfónios, 6 - guanidínios.

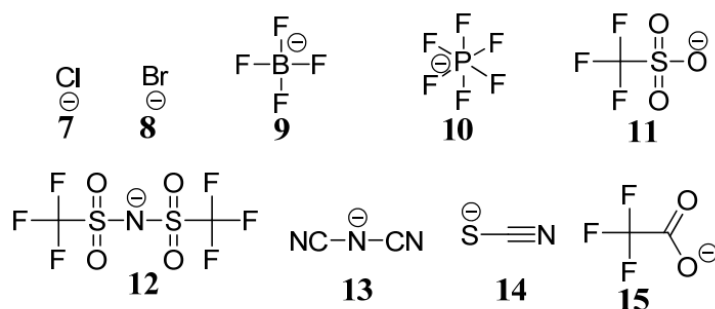


Figura 12 - Estruturas aniônicas habituais em líquidos iônicos: 7 - Cloreto, 8 - brometo, 9 - tetrafluoroborato, 10 - hexafluorofosfato, 11 - trifluorometanosulfonato, 12 - bis(trifluorometilsufonil)imidato, 13 - dicianamida, 14 - tiocianato e 15 - trifluoroacetato.

1.5.1 Utilização de Líquidos Iônicos na cromatografia

Nas técnicas cromatográficas por vezes são utilizadas misturas de solventes que podem libertar compostos voláteis, como é sabido estes são bastante prejudiciais para o meio ambiente e para a saúde pública, e para além disso, são muito dispendiosos nos seus processos de reciclagem [65]. Os líquidos iônicos vêm também ajudar neste aspeto uma vez que são considerados “*green solvents*” o que faz com que sejam uma alternativa bastante promissora à utilização de solventes [66]. A sua primeira utilização nos processos cromatográficos ocorreu em 1999, onde foram utilizados na separação de moléculas orgânicas de acordo com a sua polaridade [67]. Desde aí as diversas aplicações destes compostos em cromatografia têm vindo a despertar grande interesse e atualmente são conhecidos mais de 200 líquidos iônicos [68], [69].

A polaridade dos líquidos iónicos depende da combinação feita entre os catiões e os aniões devido às interações por pontes de hidrogénio e às densidades de carga, e como já foi referido existem inúmeras combinações possíveis (cerca de 10^6 e 10^8), portanto têm vindo a ser aplicados em extracções de fase sólida uma vez que se podem controlar parâmetros como a seletividade, afinidade e capacidade segundo o composto imobilizado na matriz sólida [70], [71]. A aplicação em cromatografia gasosa é também possível, pois quando estão acoplados à fase estacionária conferem bastante estabilidade e seletividade tornando-se assim bastante viáveis. A sua aplicação em cromatografia líquida apresenta como principal vantagem o facto de ser possível modelar as interações a explorar, devido às características de “*design*” dos líquidos iónicos [65].

Existe a possibilidade de imobilizar os líquidos iónicos em suportes sólidos de modo a serem usados como ligandos. Existem diversas formas de realizar esta abordagem, como se pode ver na figura 13. Na representação a) e b) ocorre a imobilização do ião no suporte sólido e o contra-ião apresenta-se livre o que vai facilitar a síntese e promove interações por troca iónica, no entanto apresenta uma desvantagem pois pode provocar a remoção do contra-ião durante os ensaios cromatográficos. Em c) e d) está indicada um tipo de imobilização que ultrapassa a desvantagem apontada anteriormente, uma vez que os contra-íons estão ligados covalentemente; e por fim em e) o anião e o catião estão imobilizados na matriz [72], [73].

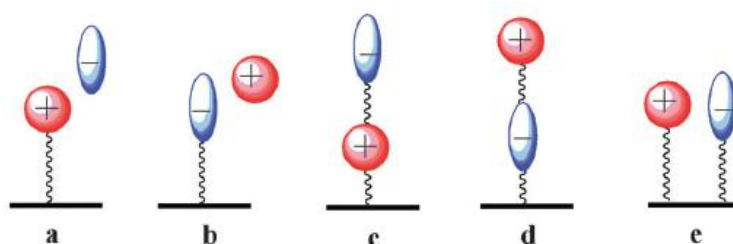


Figura 13 - Diferentes formas de funcionalização dos suportes [69].

Por outro lado, a aplicação dos líquidos iónicos na fase móvel da cromatografia tem dois grandes objetivos: a otimização da resolução da técnica através da otimização na separação dos picos obtidos e a redução dos tempos de retenção da amostra. Este melhoramento deve-se ao facto dos catiões dos líquidos iónicos conseguirem competir pela ligação aos grupos silanol da superfície do suporte através de interações electrostáticas, o que provoca uma repulsão dos adsorventes da amostra que estavam anteriormente retidos na matriz. Outra explicação para esta competição acontecer é a existência de interações hidrofóbicas entre os grupos alquil apolares da fase estacionária e os grupos alquil de anéis heterocíclicos e catiões quaternários dos líquidos iónicos [74].

Portanto, a utilização de líquidos iónicos supera a seletividade limitada de solventes orgânicos voláteis comuns e assim, permite o desenvolvimento de métodos de purificação mais eficazes. A substituição de solventes orgânicos voláteis por líquidos iónicos não voláteis

também elimina as perdas de solvente para a atmosfera o que diminuiu a pegada ambiental assim como o custo do processo. Por estes motivos os líquidos iônicos têm recebido cada vez mais atenção [75]

No entanto, independentemente do tipo de aplicação, a pureza e a integridade dos ácidos nucleicos são parâmetros essenciais que dependem das condições sob as quais o processo de purificação é conduzido. A possibilidade de criar abordagens eficientes de purificação depende do cumprimento de alguns critérios: ruptura da célula para que ocorra a libertação completa do material intracelular, inativação enzimática para evitar a degradação dos ácidos nucleicos e a recuperação dos ácidos nucleicos com alta pureza, ou seja, sem contaminantes. Já existem deste modo, diversos exemplos da utilização de líquidos iônicos na separação de ácidos nucleicos como se pode ver na tabela 5 [75].

Tabela 5 - Extração e Separação de Ácidos Nucleicos Utilizando Processos Baseados em LI.

	Ácido Nucleico	LI usado + sistema/meio	Estratégia de isolamento
Extração Líquida-Líquida	ADN	[C ₄ C ₁ im][PF ₆] + água [C ₂ C ₁ im][PF ₆] + água [C ₆ C ₁ im][PF ₆] + água [C ₄ C ₁ im][BF ₄] + água [C ₄ C ₁ im]Cl + água	Precipitação; Imersão em tampão.
	ARN	[N ₁₈₈₈][Calc] + suspensão de vírus [C ₁ C ₁ im][C ₁ PO ₃] + suspensão de vírus	Precipitação;
Extração Sólido-Líquido	ADN	[C ₂ C ₁ im][C ₁ CO ₂] + tampão [C ₆ C ₁ im]Cl + tampão [guan][C ₁ CO ₂] + tampão [guan][C ₃ CO ₂] + tampão	
Materiais modificados com LI para extração em fase sólida	ADN	Microsfers de poly([VC ₁ O(O)C ₂ im][PF ₆])	“Stripping” com NaCl

1.5.1.1 Fase estacionária com líquidos iônicos com apenas um catião

Neste tipo de fase estacionária existem principalmente catiões do grupo imidazol que se encontram ligados à matriz e têm demonstrado resultados interessante na separação de alcalóides, catiões e aniões inorgânicos [76], silose e glucose [77] e também compostos polares [78]. Quando comparados com outros suportes, estes apresentam uma alta estabilidade e eficiência [73]. Também tem sido estudada a adição de um espaçador, entre a matriz e o ião, constituído por compostos à base de sileno e grafeno. O objetivo da sua utilização é influenciar a seletividade da matriz pois afeta a distribuição dos grupos polares [79].

1.5.1.2 Fase estacionária de líquidos iônicos com vários catiões

Neste caso são utilizadas várias espécies de catiões que se encontram ligados à matriz por um espaçador. Esta estratégia permitiu melhorar o desempenho dos suportes pois a matriz adquire um comportamento multimodal o que melhora a seletividade e a estabilidade térmica uma vez que apresentam múltiplos locais de interação [80]. Existem duas formas de reproduzir esta técnica: dois catiões e dois contra-íões ou através da utilização de um espaçador de três braços ligados a um grupo que apresente carga positiva [81], [82].

1.5.1.3 Fase estacionária de líquidos iônicos poliméricos

O objetivo desta técnica é promover o aumento dos locais de interação o que irá promover um comportamento multimodal da matriz através de interações por fase reversa, troca iónica e ainda interações hidrofóbicas. Para conseguir esta melhoria, a matriz é preparada através da polimerização dos líquidos iônicos [83].

1.5.1.4 Fase estacionária de líquidos iônicos quirais

A boa separação conseguida com estes suportes deve-se à fácil inclusão de complexos na cadeia formada pelos compostos quirais e analitos [84]. Devido às suas características, as ciclodextrinas foram utilizadas na preparação de suportes cromatográficos sólidos pois apresentam uma cavidade que permite reter a molécula de interesse [85]. A sua ligação ao imidazol permite que a interação com substratos seja maior e assim promova a separação de enantiómeros [85], [86].

1.5.1.5 Monólitos funcionalizados com líquidos iônicos

Uma coluna monolítica possui estrutura sólida e altamente porosa que fornece alta permeabilidade da fase móvel através dos canais porosos. Esses podem ser classificados como microporos, mesoporos e macroporos, dependendo do molde utilizado na síntese do monólito. Portanto, tendo em conta as características dos monólitos, pode retirar-se vantagens da sua utilização como suporte para a funcionalização dos líquidos iônicos. Estudos demonstram interação com os compostos de interesse através de um comportamento multimodal onde a separação de compostos decorre de forma correta e sem alteração das características dos suportes, tais como a sua permeabilidade. No entanto, a principal vantagem das colunas monolíticas é a redução do tempo de análise, uma vez que se podem utilizar caudais elevados sem grande aumento da pressão do sistema [87]-[89].

Desta forma pode-se perceber o porquê da escolha dos líquidos iônicos imobilizados numa matriz macroporosa como método de purificação de ácidos nucleicos. Como foi possível perceber, os líquidos iônicos trazem diversas vantagens a diversos níveis. Uma vez que existe uma enorme variedade de catiões e aniões, a sua escolha é altamente específica e selecionada de acordo com a sua finalidade melhorando desta forma a sua seletividade. Estes compostos apresentam também uma elevada estabilidade e são uma alternativa muito mais ecológica às que habitualmente são usadas. Relativamente à matriz macroporosa, também se apresenta como uma mais-valia uma vez que o seu elevado diâmetro de poros aumenta bastante a área de superfície e facilita a passagem da fase móvel uma vez que esta ocorre através desses mesmos poros e não em torno deles diminuindo assim o percurso de difusão.

Capítulo 2 - Objetivos

Nos últimos anos tem-se assistido a um crescente interesse no estudo e caracterização de biomoléculas que podem apresentar potencialidades na utilização como novos agentes/métodos terapêuticos. Um exemplo óbvio dessas biomoléculas são os ácidos nucleicos, uma vez que estes são cruciais para a manutenção da viabilidade celular e dos organismos, desempenhando papéis de extrema importância ao nível biológico. A sua aplicação na biomedicina, como agentes terapêuticos, tem sido explorada quer em estratégias de vacinação quer no tratamento de diversas doenças oncológicas, neurodegenerativas, entre outras. Considerando este potencial, existe a necessidade de investigar e desenvolver novos métodos, mais eficientes, para a separação e purificação de ácidos nucleicos, e cada vez mais esta vertente da ciência tem suscitado interesse.

Os líquidos iónicos (LIs) têm surgido como agentes muito interessantes, que podem estar envolvidos no desenvolvimento de métodos alternativos muito viáveis a aplicar em estratégias de recuperação e purificação de biomoléculas, e tem sido um campo com um desenvolvimento exponencial. O grande interesse nesta vertente advém do facto de estes possuírem um conjunto de características únicas que fazem dos líquidos iónicos compostos incrivelmente versáteis nos elementos que os compõem, o que resulta também numa diversidade de propriedades que podem ser adaptadas às aplicações em estudo. Para além disso, os processos que usam líquidos iónicos permitem também a redução do impacto ambiental e são economicamente mais interessantes.

O objetivo principal deste trabalho é a utilização de líquidos iónicos como ligandos cromatográficos que permitam a separação e purificação de ácidos nucleicos, nomeadamente ADN genómico, ARN ribossomal e ARN de baixo peso molecular. A estratégia a utilizar prende-se na avaliação do comportamento de ligação e eluição dos ácidos nucleicos em diferentes LIs imobilizados em sílica de modo a estudar o tipo de interações estabelecidas entre as referidas biomoléculas e os diversos suportes em estudo de forma a perceber qual o mais indicado para utilizar posteriormente num suporte cromatográfico.

De uma forma geral, o trabalho pretende desenvolver um processo de separação vantajoso e com potencial para aplicação na purificação de diversas espécies de ácidos nucleicos com possível aplicação terapêutica.

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Para o crescimento bacteriano da estirpe *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α , utilizou-se Extrato de levedura e Triptona adquiridos à empresa Bioakar (Beauvais, França), Glicerol da Himedia, Hidrogenofosfato de potássio (K_2HPO_4) da Panreac (Barcelona, Espanha), Dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) e “Luria-Broth Agar” da Pronalab (Mérida, Iucatã, México). Os reagentes utilizados na lise celular foram β -mercaptoetanol da Merck (Whitehouse Station, EUA), Isopropanol da Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, EUA), Citrato de sódio, Tiocianato de guanidina e Sarcosyl da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Para os ensaios cromatográficos foram usados os seguintes reagentes: Cloreto de sódio (NaCl) e Sulfato de amónio ($(NH_4)_2SO_4$) da Panreac (Barcelona, Espanha) e Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todas as soluções utilizadas na lise celular bem como nos ensaios cromatográficos foram previamente preparadas utilizando água Milli-Q [água desionizada ultra-pura, purificada com o sistema Milli-Q da Milipore (Billerica, MA, EUA)] tratada com 0,05% de Pirocarbonato de dietilo (DEPC) da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Os tampões cromatográficos foram ainda filtrados através de membranas com poros de 0,20 μm e sonicados durante 15 minutos antes de cada utilização. O marcador de peso molecular foi obtido através da Vivantis Technologies (Selangor DE, Malásia). Na eletroforese em gel de agarose foi utilizado GreenSafe da Grisp (Porto, Portugal), como agente intercalante.

3.2 Métodos

3.2.1 Suportes de sílica com líquidos iónicos imobilizados

Para o estudo das interações entre os LIs e os ácidos nucleicos, os LIs foram primeiramente imobilizados em suportes de sílica (S-Sil) [90]. Resumidamente, a ativação da sílica (5 g) foi efetuada por contacto com 37% de HCl. Após a lavagem com água, adicionaram-se 5 mL de 3-(cloropropil)trimetoxisilano (agente de ligação ao grupo epóxi da sílica), 0,5 mL de trietilamina (catalisador da reação) e 60 mL de tolueno (solvente principal). A reação ocorreu a 115 °C durante 24 horas a 550 rpm de agitação, após a qual se efetuou uma lavagem com 100 mL de tolueno, 200 mL de MeOH/H₂O, 500 mL de H₂O e 100 mL de MeOH. Por fim, adicionaram-se 5 mL de LI a 60 mL de tolueno e, após 24 horas a 115 °C e 550 rpm, foi efetuada uma nova lavagem do mesmo modo que foi descrito anteriormente. As sílicas foram

caracterizadas por RMN, SEM, DLS e Análise Elementar para comprovar a sua funcionalização com os diversos LIs.

3.2.2 Suporte de metacrilato macroporoso com líquidos iônicos imobilizados

A imobilização de LIs na matriz macroporosa foi realizada de modo idêntico ao descrito anteriormente para os suportes de sílica. No entanto, devido às características da matriz macroporosa não foi necessária a sua ativação inicial com HCl.

3.2.3 Fermentação

As amostras de lisado bacteriano foram obtidas a partir de uma cultura bacteriana da estirpe *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α . Inicialmente, efetuou-se a cultura celular em meio sólido “Luria Broth-Agar”, durante a noite a 37 °C. A pré-fermentação e fermentação foram realizadas em Erlenmeyers usando o meio de cultura “Terrific Broth” (TB) composto por: 12 g/L de Triptona; 24 g/L de Extrato de levedura; $5,5 \times 10^{-5}$ M de Glicerol; 0,017 M de KH₂PO₄ e 0,072 M de K₂HPO₄. Após o crescimento em placa, as colônias bacterianas foram inoculadas no meio da pré-fermentação e incubadas a uma temperatura de 37 °C, num agitador orbital a 250 rpm. Foi medida a Densidade ótica (DO) a 600 nm, de hora a hora durante a pré-fermentação e quando esta atingiu um valor próximo de 2,6 iniciou-se a fermentação, sendo transferido um determinado volume de meio de cultura da pré-fermentação para a fermentação de modo a que esta se iniciasse a uma DO de 0,2, de acordo com a seguinte fórmula:

$$DO_{pré-fermentação} \times V_{retirar\ da\ pré-fermentação} = (V_{retirar\ da\ pré-fermentação} + V_{fermentação}) \times DO_{fermentação} \quad (1)$$

A DO da fermentação foi também medida ao longo do processo de produção utilizando o espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 UV/Visible (Cambridge, Inglaterra). O crescimento foi interrompido após 3 horas de fermentação se o objetivo fosse a obtenção de ADN genómico, ARN ribossomal e ARNs de baixo peso molecular, ou após 7 horas para obtenção de ADN genómico e ARNs de baixo peso molecular. Em qualquer dos casos, as células foram recuperadas através de uma centrifugação durante 10 minutos a 3900 g e, posteriormente, os *pellets* celulares foram armazenados a -20 °C.

3.2.4 Extração - Recuperação dos ácidos nucleicos

De modo a extrair o material genético das células bacterianas obtidas durante a fermentação, realizou-se uma lise química. Inicialmente, os *pellets* celulares foram ressuspensos em 5 mL de Solução D (4 M de Tiocianato de Guanidina; 0,025 M de Citrato de sódio; 0,5 % de Sarcosil e 0,1 M de β -mercaptoetanol), de modo a proceder-se à desintegração da membrana celular. De seguida, os tubos de lise foram incubados durante 10 minutos em gelo e, posteriormente, foram sujeitos a uma centrifugação a 4°C durante 30 minutos a 16000 g. Os sobrenadantes foram recolhidos para novos tubos de lise, onde se adicionaram 5 mL de Isopropanol (armazenado a -20°C) para precipitação dos ácidos nucleicos. Os tubos foram novamente incubados em gelo durante 30 minutos e, por fim, centrifugados a 16000 g durante 20 minutos a uma temperatura de 4 °C. Após descartar o sobrenadante, adicionaram-se 2,5 mL de Etanol a 75% (em água DEPC) e procedeu-se a uma incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, de modo a remover eventuais resíduos da solução D. O sobrenadante foi descartado após uma centrifugação de 5 minutos a 16000 g e o *pellet* de ácidos nucleicos foi incubado à temperatura ambiente durante 15 minutos, sendo posteriormente solubilizado em 2 mL de água DEPC. Os tubos de lise foram incubados num banho a 60°C durante 10 minutos e, finalmente, procedeu-se a uma centrifugação de 30 minutos a 16000 g e o sobrenadante foi recuperado para eppendorfs. A concentração de ácidos nucleicos foi determinada com o espectrofotómetro NanoPhotometer (IMPLEN, Reino Unido) e a integridade das amostras foi verificada por eletroforese em gel de agarose. As amostras são armazenadas a -80°C.

3.2.5 Eletroforese em Gel de Agarose

A análise das amostras obtidas após a lise celular e os ensaios cromatográficos foi efetuada por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% (Hoefer, Holliston, MA, EUA). Para se proceder à visualização do gel usou-se 0,012 μ L/mL de Greensafe Premium (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes, Lisboa, Portugal). A eletroforese foi realizada a 120 V, durante 30 minutos em tampão TAE (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA, pH 8,0). O gel foi visualizado com recurso à exposição a luz ultravioleta (UV) no equipamento Uvitec Cambridge FireReader equipado com uma câmara UV (UVITEC Cambridge, Cambridge, Reino Unido).

3.2.6 Ensaios de ligação em modo “batch” utilizando os suportes de sílica

De modo a avaliar as condições de ligação e eluição das diferentes espécies de ácidos nucleicos nos suportes de sílica funcionalizados com Lls, pesou-se 0,2 g de sílica a usar como fase estacionária. Devido à diversidade de interações que os Lls podem promover com os

diferentes ácidos nucleicos, foram testadas estratégias de ligação/eluição que podem promover maioritariamente interações iônicas ou hidrofóbicas.

Condições que favorecem as Interações Iônicas

Para promover maioritariamente as interações iônicas foram utilizados os seguintes tampões cromatográficos: 10 mM de Tris-HCl como tampão de equilíbrio e de ligação e 2 M de NaCl em 10 mM de Tris-HCl como tampão de eluição. A fase de equilíbrio da sílica foi efetuada com a adição de 1 mL de 10 mM de Tris-HCl seguido de 10 segundos de vórtex. Após a remoção do sobrenadante, foi adicionado 1 mL de 10 mM de Tris-HCl + 100 µg/mL de Lisado efetuando-se uma agitação lenta durante 10 minutos a 4 °C, para promover a ligação dos ácidos nucleicos. Para o passo de eluição foi adicionado 1 mL de 2 M NaCl em 10 mM de Tris-HCl também seguido de uma agitação lenta durante 10 minutos a 4 °C. Por fim, de modo a lavar a sílica, adicionou-se 1 mL de água DEPC efetuando-se novamente uma agitação no vórtex de 10 segundos. Após cada passo do gradiente foi efetuada uma centrifugação a 5000 g durante 2 minutos e o sobrenadante foi recuperado para posterior leitura da absorvância a 260 nm no espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 UV/Visible (Cambridge, Inglaterra). Às frações recuperadas durante os passos de ligação e de eluição foram adicionados 2 mL de água DEPC e de seguida foram sujeitas ao processo de concentração e dessalinização usando concentradores Vivaspin (Vivascience) até se obter um volume de 100 µL. Todos os sobrenadantes foram analisados através de uma eletroforese horizontal em gel de 1% de agarose. Após cada utilização realizou-se a regeneração do suporte de acordo com o descrito no ponto 3.2.8.

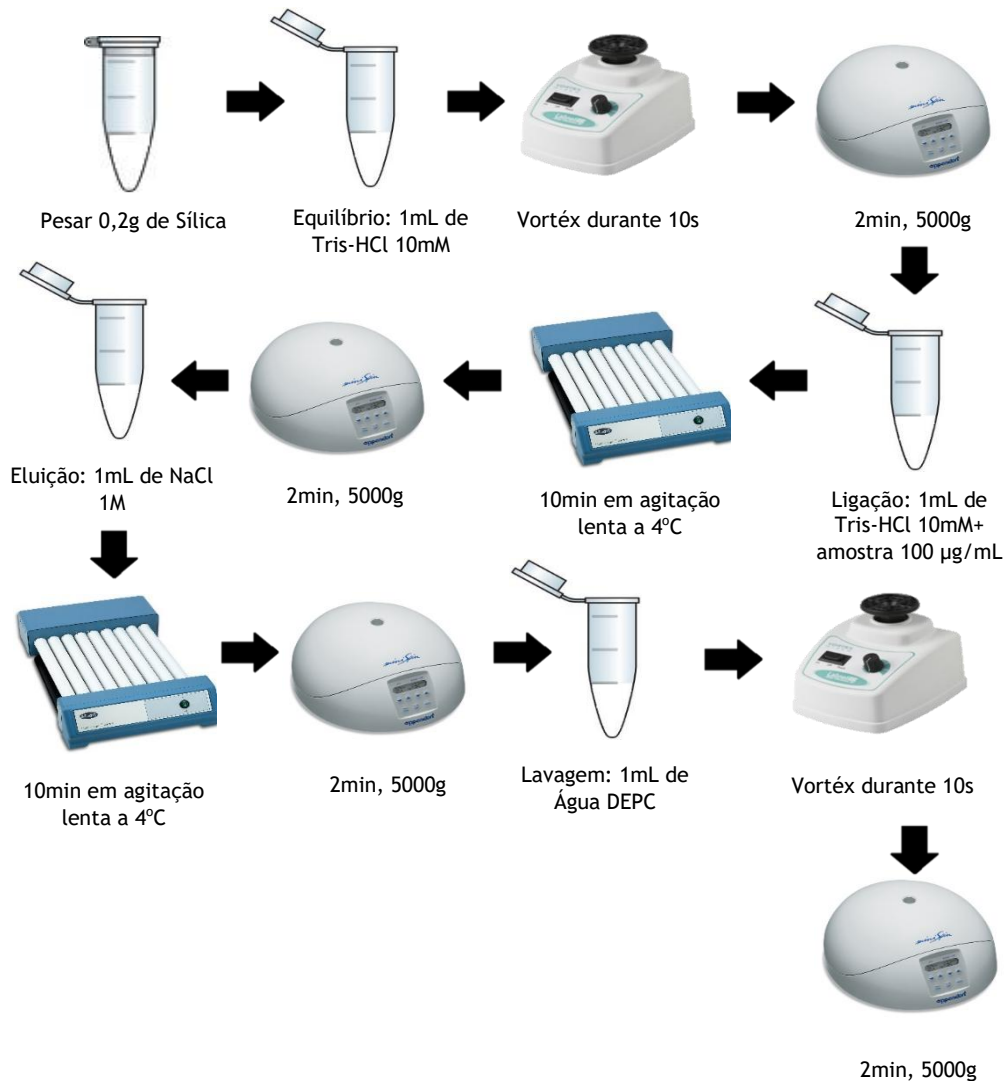


Figura 14 - Esquema Representativo dos ensaios cromatográficos para interações iônicas.

Condições que favorecem as Interações Hidrofóbicas

Para promover maioritariamente as interações hidrofóbicas foram utilizados os seguintes tampões cromatográficos: 2 M de Sulfato de amónio em 10 mM de Tris-HCl como tampão de equilíbrio e de ligação e 10 mM de Tris-HCl e 2 M de Cloreto de sódio em 10 mM de Tris-HCl como tampões de eluição. Como descrito anteriormente, de modo a equilibrar a sílica foi adicionado 1 mL de 2 M de Sulfato de amónio em Tris-HCl, seguido de 10 segundos de vortex. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de 2 M de Sulfato de amónio + 100 µg/mL de Lisado efetuando-se uma agitação lenta durante 10 minutos a 4 °C. Para o passo da primeira eluição foi adicionado 1 mL de 10 mM de Tris-HCl também seguido de uma agitação lenta durante 10 minutos a 4°C. No caso de não se verificar a eluição total das espécies de ácidos nucleicos nesta condição, recorreu-se a uma segunda eluição por adição de 1 mL de 2 M de NaCl efetuando-se também uma agitação lenta durante 10 minutos a 4 °C. Por fim, de modo a lavar a sílica, adicionou-se 1 mL de água DEPC efetuando-se novamente uma agitação durante

10 segundos no vórtex. Entre cada passo do gradiente foi efetuada uma centrifugação a 5000g durante 2 minutos e o sobrenadante foi recuperado para posterior leitura da absorvância a 260 nm no espectrofotômetro Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 UV/Visible (Cambridge, Inglaterra). Às frações recuperadas durante os passos de ligação e de eluição foram adicionados 2 mL de água DEPC e de seguida foram sujeitas ao processo de concentração e dessalinização usando concentradores Vivaspin (Vivascience) até se obter um volume de 100 µL. Todos os sobrenadantes foram analisados através de uma eletroforese horizontal em gel de 1% de agarose. Após cada utilização realizou-se a regeneração do suporte, de acordo com o descrito no ponto 3.2.8.

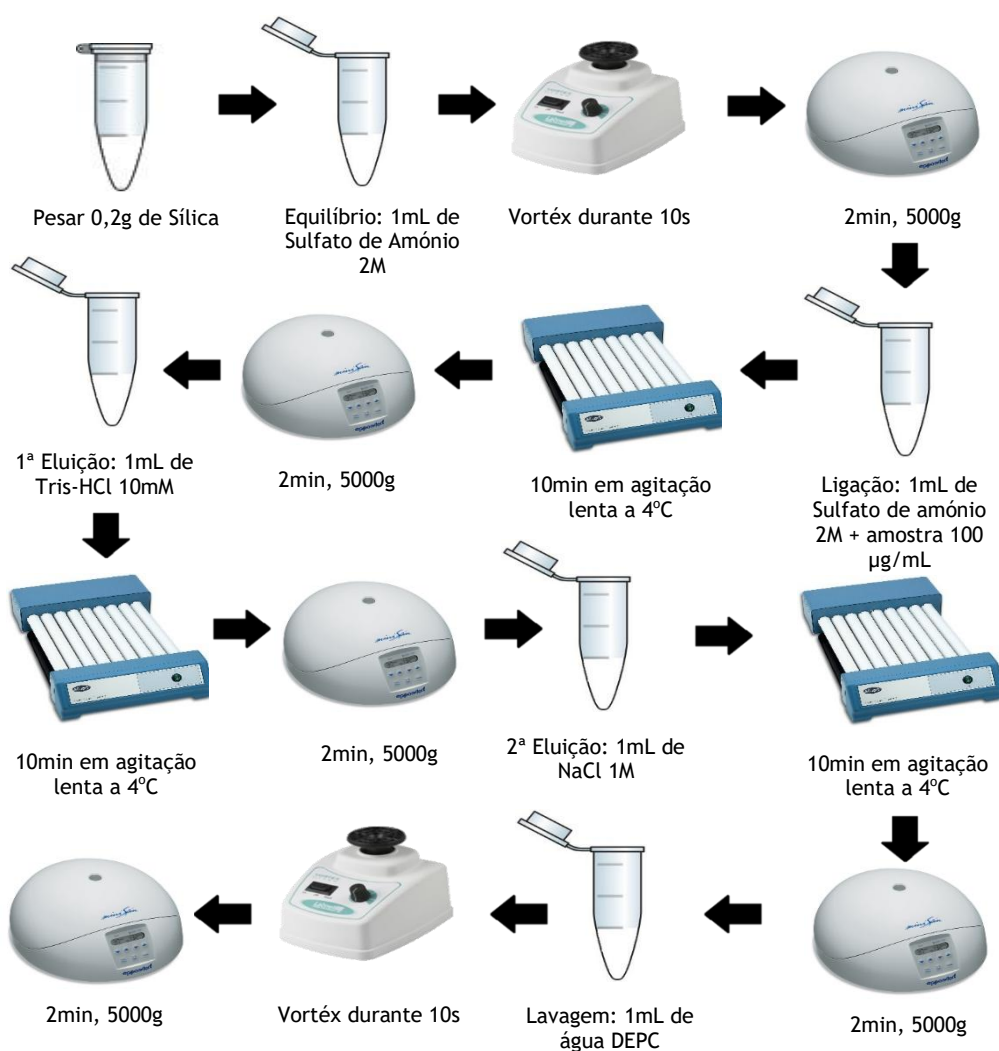


Figura 15 - Esquema Representativo dos ensaios cromatográficos para interações hidrofóbicas.

3.2.7 Ensaios cromatográficos em coluna

Os ensaios cromatográficos foram realizados no equipamento AKTA Avant com o software UNICORNTM 6.3 (GE Healthcare Biosciences Uppsala, Suécia) utilizando a matriz macroporosa funcionalizada com o LI, Net3Cl. Para realizar os ensaios cromatográficos, a matriz foi empacotada numa coluna de 10 mm de diâmetro × 6,5 mm de altura. Para a purificação do ARN, a coluna foi equilibrada com uma solução de NaCl em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 8), a um caudal de 1 mL/min. Posteriormente, a amostra de lisado bacteriano que resultou da lise química foi injetada utilizando um loop de 200 µL a um caudal igual ao utilizado durante a fase de equilíbrio. Neste primeiro passo do gradiente, as espécies eluídas são as que não ligam à matriz sendo seguidas da eluição das espécies que ligaram à coluna através do aumento da força iónica do tampão para 1 M NaCl em Tris-HCl 10 mM (pH 8). Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente. A absorvância das espécies que eluem da coluna foi constantemente monitorizada a 260 nm. As frações foram recuperadas de acordo com os cromatogramas, e de seguida procedeu-se à sua dessalinização usando concentradores Vivaspin (Vivascience) até atingirem um volume de 100 µL sendo posteriormente analisadas por eletroforese horizontal em gel de agarose.

3.2.8 Procedimento para a regeneração dos suportes funcionalizados

O estudo das interações estabelecidas entre os suportes e os ácidos nucleicos, requer diversas utilizações das matrizes, para tal é necessário um processo de regeneração eficaz de modo a manter as condições de utilização dos suportes entre vários ensaios. No caso da matriz macroporosa utilizada nos ensaios cromatográficos realizados no equipamento AKTA Avant, a sua regeneração foi realizada através de uma lavagem com 150 mL de água DEPC seguida da adição de 150 mL de 0,2 M de NaOH com o objetivo de remover qualquer resíduo de amostra presente na matriz. Para repor o contra-íão Cloro do LI foi adicionado 150 mL de 0,5 M de HCl. Por fim, foi efetuada uma nova lavagem com 150 mL de água DEPC. Relativamente à regeneração das sílicas utilizadas nos ensaios em batch o processo é semelhante, apenas o volume das soluções foi ajustado para 4mL.

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Devido à enorme diversidade de aplicações dos líquidos iônicos (LIs) e às diversas interações que podem ser estabelecidas por manipulação da estrutura química dos mesmos, surgiu a ideia de estudar a potencial aplicação de suportes cromatográficos com LIs imobilizados como ligandos, para a separação e purificação de diferentes ácidos nucleicos. Com esta abordagem, espera-se que a diversidade de interações estabelecidas possa refletir-se numa maior especificidade na ligação de ácidos nucleicos o que, conseqüentemente, levará a uma otimização nos processos de purificação já estabelecidos para essas biomoléculas. Primeiramente, foram realizadas várias técnicas de caracterização, tais como análise elementar, potencial zeta e espectroscopia por ressonância magnética nuclear, para verificar a correta imobilização dos líquidos iônicos em estudo nos suportes. Todos esses testes foram previamente elaborados e descritos no nosso grupo de investigação [90]. Para o trabalho, foram utilizados diversos líquidos iônicos como ligandos, tendo havido a necessidade de realizar um estudo inicial de modo a perceber qual o mais promissor para a purificação de ácidos nucleicos, considerando os diferentes perfis de interação dos LIs com os diferentes tipos de ácidos nucleicos. Estes ensaios iniciais foram realizados através da modificação da matriz de sílica, uma vez que é um material mais barato e adequado para uma fase inicial de otimização de condições sem comprometer a aplicabilidade e reprodutibilidade dos referidos ensaios.

4.1 Suportes de sílica funcionalizada com líquidos iônicos

No estudo inicial, foram utilizadas sílicas modificadas com diferentes LIs, nomeadamente, cloreto de benzilmetilamina (S-SilPrBenzCl), cloreto de 1-metilimidazol (S-SilPrMImCl), cloreto de trietilamina (S-SilPrNEt₃Cl), cloreto de dimetilbutilamina (S-SilPrMet₂ButCl) e cloreto de trioctilamina (S-SilPrN(C₈)₃Cl) (Figura 16). É importante mencionar que em todos os ensaios foram também testadas a sílica ativada (SiO₂) e a sílica apenas modificada com o agente de acoplamento (S-SilPrCl), como controlos, de modo a perceber qual a sua participação na retenção da amostra e quais as interações efetivas que cada líquido iónico estabelece com as diversas classes de ácidos nucleicos em estudo.

Nos LIs, os catiões são tipicamente grandes, volumosos e assimétricos, apresentando baixos pontos de fusão, sendo que ao aumentar o comprimento da cadeia alquílica do catião, a solubilidade em água tende a diminuir aumentando assim a sua hidrofobicidade. De uma forma geral, os aniões são escolhidos para controlar as propriedades químicas dos LIs, uma vez que a sua mudança afeta drasticamente a estabilidade do líquido iónico. Já os catiões são essencialmente escolhidos de forma a determinar as propriedades físicas [91].

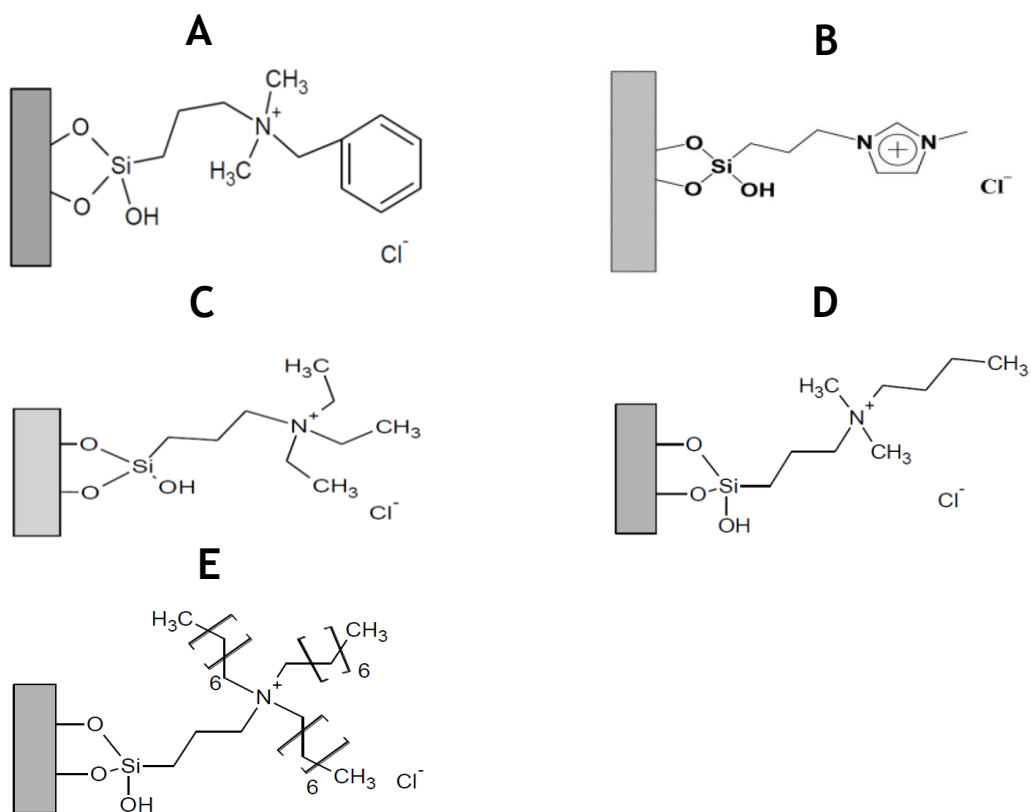


Figura 16 - Representação da estrutura química das sílicas modificadas com os líquidos iônicos: A - S-SilPrBenzCl; B - S-SilPrMImCl; C - S-SilPrNEt₃Cl; D - S-SilPrMet₂ButCl; e E - S-SilPrN(C₈)₃Cl.

Os ensaios realizados permitiram em primeiro lugar avaliar as diversas interações estabelecidas entre os suportes de sílica funcionalizados com LIs e as diferentes classes de ácidos nucleicos, adaptando as condições experimentais, de forma a promover maioritariamente as interações iônicas ou hidrofóbicas. Após esta análise, foi também possível verificar qual ou quais dos suportes poderiam ser mais promissores para a purificação dos ácidos nucleicos presentes em misturas complexas. Assim, de modo a explorar ao máximo a já referida versatilidade dos LIs foram realizados ensaios com amostras contendo diferentes tipos de ácidos nucleicos, nomeadamente: 1º ARN de baixo peso molecular; 2º ADN genómico e ARN de baixo peso molecular; 3º ADN genómico, ARN ribossomal e ARN de baixo peso molecular.

4.1.1 Ensaios de ligação/eluição com ARN de baixo peso molecular nos suportes de sílica funcionalizada com líquidos iônicos

Como referido, os estudos iniciais foram realizados, adaptando as condições experimentais, nomeadamente com utilização de diferentes tipos de gradiente para determinar os perfis de ligação/eluição das amostras nos suportes modificados com LIs.

Para favorecer maioritariamente as interações electrostáticas, os ensaios em *batch* incluíram a realização de um passo de ligação com o tampão Tris-HCl 10 mM pH 8, um passo de eluição com adição de NaCl 1M em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8, de modo a aumentar a força iónica do tampão. Todos os ensaios apresentam no mínimo um $n=2$ e o resultado do comportamento de ligação/eluição das diferentes espécies de ácidos nucleicos nos suportes de sílica foi analisado pela medição da absorvância a 260 nm (Figura 17) e por eletroforese em gel de agarose.

Os resultados permitiram verificar que no caso do suporte S-SilPrMImCl não foi possível visualizar qualquer banda no gel de agarose (figura 18), o que significa que pode não ter ocorrido uma correta ligação do ARN de baixo peso molecular ao referido suporte. Ainda assim, neste caso seria de esperar a visualização de banda no passo inicial de ligação, o que também não se verificou, sugerindo que ocorreu alguma interferência ou problema no ensaio. Este resultado pode ser justificado pelo facto de o S-SilPrMImCl apresentar um comportamento bastante hidrofóbico, pois quando era adicionado o tampão Tris-HCl 10 mM formavam-se agregados que permaneciam em suspensão mesmo após centrifugação, o que poderá ter limitado todo o ensaio. Também o suporte S-SilPrN(C₈)₃Cl apresentava o mesmo comportamento, no entanto a formação de agregados não era tão intensa e quando era efetuado o passo da ligação, a sua formação era praticamente inexistente podendo desta forma ter facilitado a ligação do ARN de baixo peso molecular ao suporte. De uma forma geral, este poderia ser um resultado esperado, já que a ligação de ARN a suportes hidrofóbicos poderá não ser efetiva quando exploramos condições que favorecem essencialmente o estabelecimento de interações iónicas.

Relativamente ao suporte S-SilPrMet₂ButCl é notório através do gel de agarose (figura 19), que houve uma perda significativa da quantidade da amostra, já que se confirmou a retenção total de ARN, mas aparentemente, a recuperação é apenas parcial, a avaliar pelo baixo valor de absorvância obtido, e pela fraca intensidade de banda (linha 5, figura 19). Este resultado pode indicar que será necessário um aumento da concentração de sal no passo da eluição de forma que a totalidade de ARN ligado possa ser recuperada. Por outro lado, o suporte S-SilPrNEt₃Cl apresentou um resultado mais favorável no que diz respeito à interação com a amostra, uma vez que pela análise do gel de agarose (figura 19) todo o ARN se ligou à coluna. Relativamente ao suporte S-SilPrBenzCl ocorre uma retenção parcial da amostra, que é confirmada pela presença de uma banda no gel de agarose (linha 6, figura 18).

Relativamente aos controlos, SiO_2 e S-SilPrCl, é possível verificar que existe alguma retenção da amostra (Figura 18) o que pode contribuir para a ligação dos ácidos nucleicos ao suporte. No entanto, é expectável que sejam os líquidos iónicos responsáveis pela seletividade entre as diferentes espécies de biomoléculas.

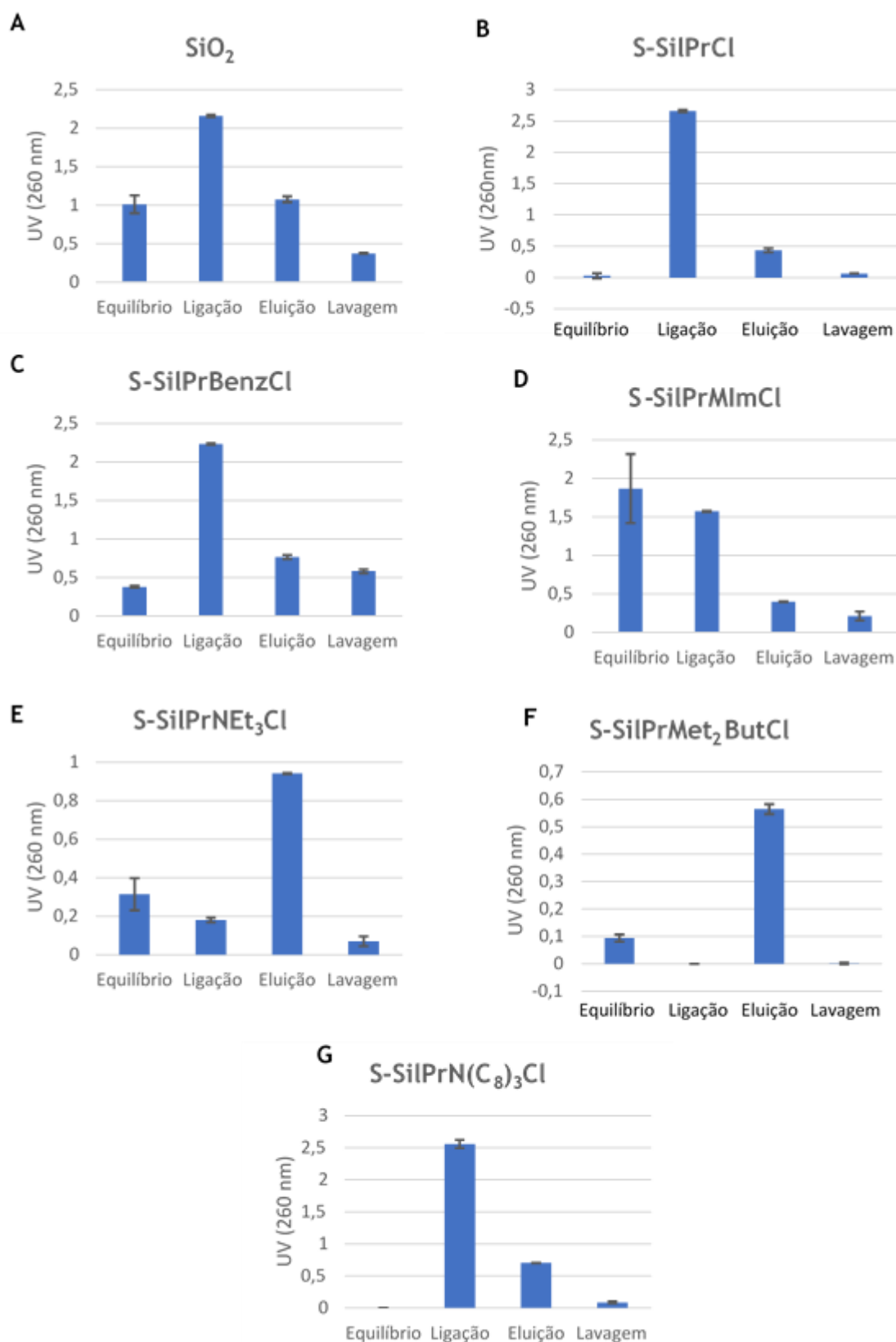


Figura 17 - Valores médios das absorvâncias nos diferentes passos do ensaio e respetivos desvio-padrão: A - SiO_2 ; B - S-SilPrCl; C - S-SilPrBenzCl; D - S-SilPrMImCl; E - S-SilPrNET₃Cl; F - S-SilPrMet₂ButCl; G - S-SilPrN(C₈)₃Cl.

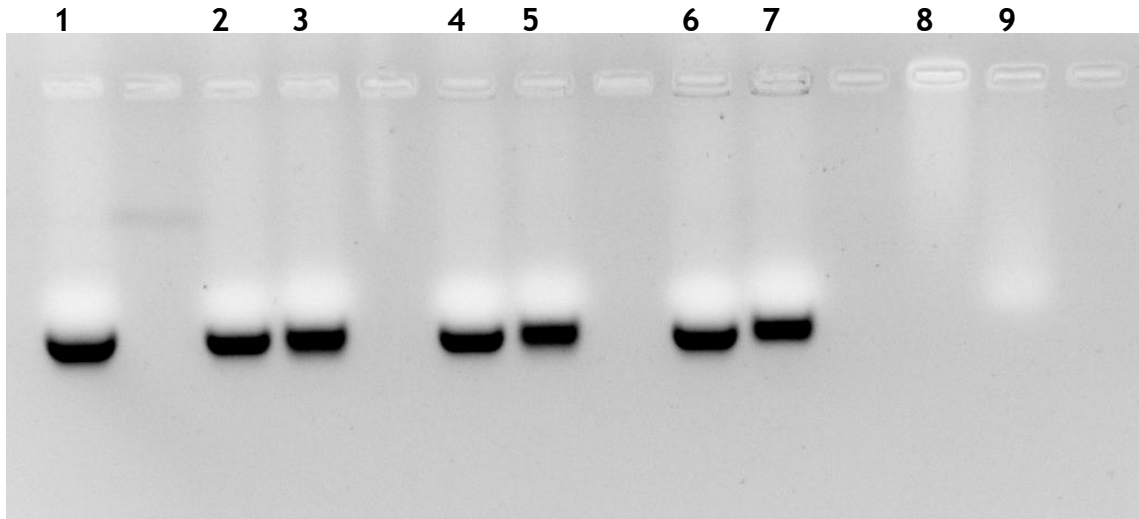


Figura 18 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações iónicas, aplicando uma amostra de ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes LIs: 1 - Amostra inicial; 2- SiO₂: Ligação; 3 - SiO₂: Eluição; 4 - S-SilPrCl: Ligação; 5 - S-SilPrCl: Eluição; 6 - S-SilPrBenzCl: Ligação; 7 - S-SilPrBenzCl: Eluição; 8 - S-SilPrMImCl: Ligação; 9 - S-SilPrMImCl: Eluição.

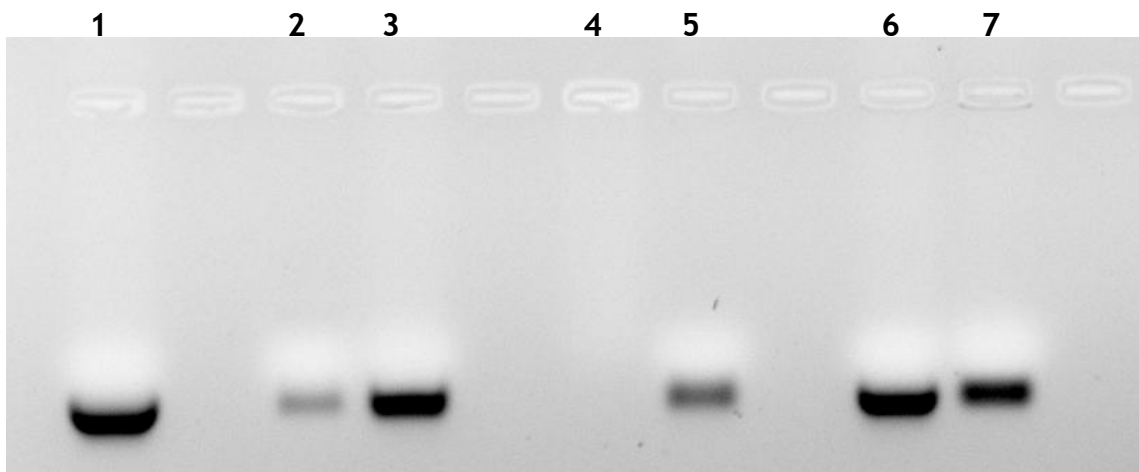


Figura 19 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações iónicas, aplicando uma amostra de ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes LIs: 1 - Amostra inicial; 2 - S-SilPrNEt₃Cl: Ligação; 3 - S-SilPrNEt₃Cl: Eluição; 4 - S-SilPrMet₂ButCl: Ligação; 5 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição; 6 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Ligação; 7 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição.

Numa segunda abordagem foram realizados ensaios estabelecendo condições que favorecem maioritariamente interações hidrofóbicas que incluíam, inicialmente, a realização de um passo de equilíbrio/ligação com Sulfato de Amónio 2M em tampão Tris-HCl 10mM pH 8, seguido de um passo de eluição por diminuição da força iónica do tampão para Tris-HCl 10 mM pH 8. Durante a realização destes estudos verificou-se que poderia ser necessário mais um passo de eluição de modo a promover a eluição total da amostra retida à matriz. Assim, foi incluído mais um passo no gradiente, que consistiu na eluição com NaCl 1M em tampão Tris-HCl 10mM pH 8. Este facto é indicativo que estas matrizes possuem um comportamento multimodal onde vários tipos de interações podem ocorrer em simultâneo.

No caso dos ensaios com sulfato de amônio, o suporte S-SilPrMImCl apresentou mais uma vez um comportamento altamente hidrofóbico em todos os passos, o que comprometeu a ligação da biomolécula pois esta não eluiu em nenhum passo como se pode verificar na figura 21. Relativamente ao suporte S-SilPrN(C₈)₃Cl, este apresentou um comportamento mais hidrofóbico, em todos os passos do ensaio, quando comparado com o ensaio realizado em condições que favorecem as interações iônicas. A amostra não liga totalmente ao suporte, comprovada pela banda ténue presente na eletroforese em gel de agarose (Figura 22), podendo portanto ser necessário iniciar os passos de equilíbrio e ligação com uma concentração de sulfato de amônio mais elevada de modo a favorecer a retenção e a ligação total da amostra. Relativamente aos suportes S-SilPrNEt₃Cl e S-SilPrMet₂ButCl (Figura 22) ambos apresentaram bons resultados ao promover interação com ARN, uma vez que a amostra parece ter ligado completamente ao suporte eluindo apenas no segundo passo de eluição (com NaCl 1M). Isto é indicativo que foi promovida a ligação do ARN através de interações hidrofóbicas mas na ausência de um sal estas interações são desfavorecidas ocorrendo assim outro tipo de interações que permitem o ARN permanecer ligado eluindo apenas na segunda alteração de gradiente. Este resultado é indicador do comportamento multimodal do ligando que permite que ocorram diferentes tipos de interações com os ácidos nucleicos. Tal como aconteceu nos ensaios onde as interações iônicas era favorecidas, os controlos apresentaram alguma retenção da amostra (Figura 21), no entanto mais uma vez é esperado que sejam as propriedades dos líquidos iônicos responsáveis pela seletividade dos suportes.

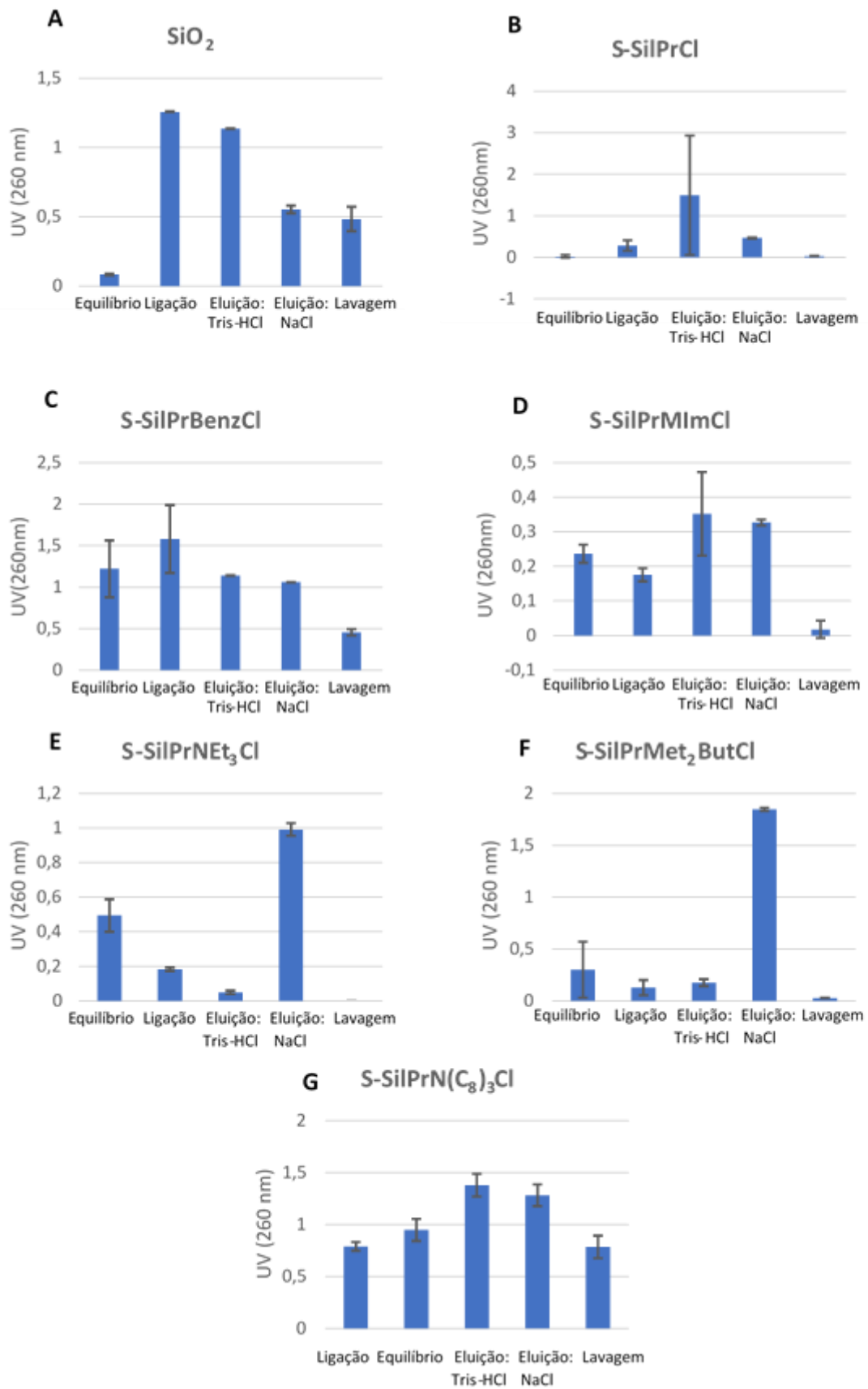


Figura 20 - Valores médios das absorvâncias nos diferentes passos do ensaio e respectivos desvio-padrão: A - SiO₂; B - S-SilPrCl; C - S-SilPrBenzCl; D - S-SilPrMImCl; E - S-SilPrNEt₃Cl; F - S-SilPrMet₂ButCl; G - S-SilPrN(C₈)₃Cl.

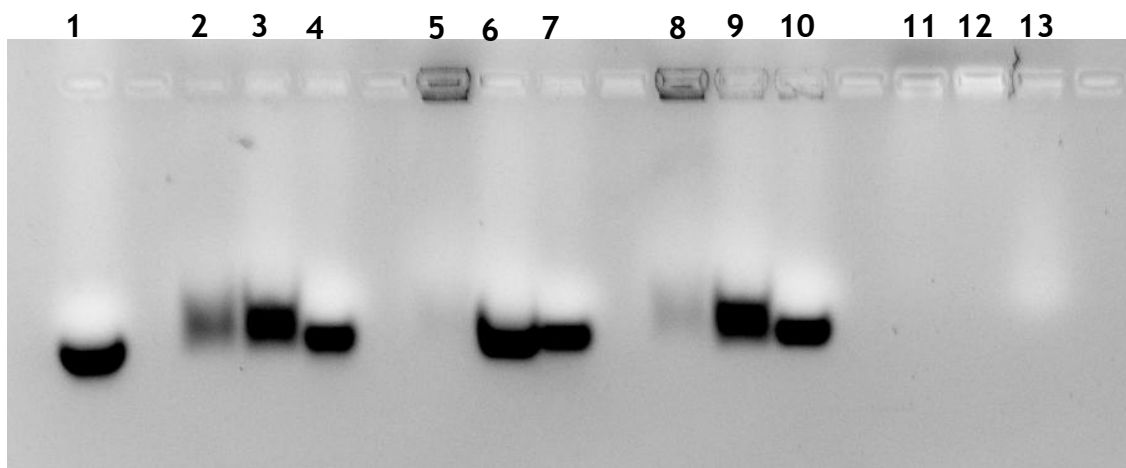


Figura 21 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações hidrofóbicas, aplicando uma amostra de ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes LIs: 1 - Amostra inicial; 2 - SiO₂: Ligação; 3 - SiO₂: Eluição com Tris-HCl; 4 - SiO₂: Eluição com NaCl; 5 - S-SilPrCl: Ligação; 6 - S-SilPrCl: Eluição com Tris-HCl; 7 - S-SilPrCl: Eluição com NaCl; 8 - S-SilPrBenzCl: Ligação; 9 - S-SilPrBenzCl: Eluição com Tris-HCl; 10 - S-SilPrBenzCl: Eluição com NaCl; 11 - S-SilPrMImCl: Ligação; 12 - S-SilPrMImCl: Eluição com Tris-HCl; 13 - S-SilPrMImCl: Eluição com NaCl.

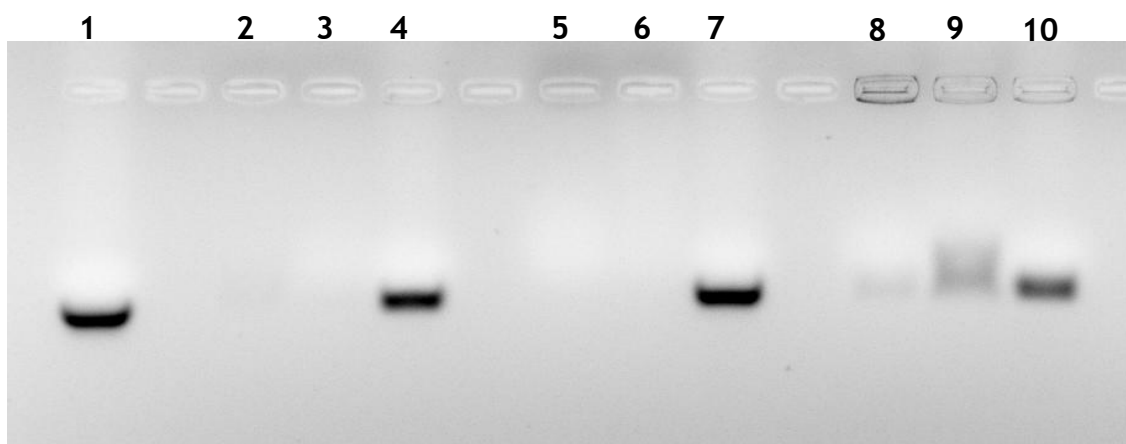


Figura 22 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações hidrofóbicas, aplicando uma amostra de ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes LIs: 1 - Amostra inicial; 2 - S-SilPrNET₃Cl: Ligação; 3 - S-SilPrNET₃Cl: Eluição com Tris-HCl; 4 - S-SilPrNET₃Cl: Eluição com NaCl; 5 - S-SilPrMet₂ButCl: Ligação; 6 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição com Tris-HCl; 7 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição com NaCl; 8 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Ligação; 9 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição com Tris-HCl; 10 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição com NaCl.

Com estes ensaios foi possível verificar que a matriz S-SilPrMImCl apresenta um comportamento bastante hidrofóbico uma vez que existia a formação de agregados em suspensão mesmo após a sua centrifugação quer nos ensaios em que o passo de ligação era realizado com tampão Tris-HCl 10 mM, quer nos ensaios em que esse passo de ligação era realizado com sulfato de amônio, o que é justificado pela presença de um anel imidazol no seu cátion. Este comportamento dificulta bastante a realização dos ensaios pelo que não seria dos suportes com melhores características para aplicação em cromatografia. Também a matriz S-SilPrN(C₈)₃Cl tornava os ensaios bastante morosos e difíceis uma vez que também

apresentava elevada hidrofobicidade, pois apesar de geralmente as amins apresentarem alta solubilidade, neste caso concreto existem 3 longas cadeias alquílicas, que contribuem para o aumento da hidrofobicidade e da massa molecular diminuindo drasticamente a solubilidade. Já as matrizes S-SilPrNEt₃Cl e S-SilPrMet₂ButCl foram as que demonstraram melhores resultados, no entanto, uma vez que a segunda leva a uma pequena perda na quantidade de amostra que fica retida na matriz, pode-se considerar a primeira como a mais eficaz nos ensaios realizados com ARN de baixo peso molecular. Todas as matrizes apresentam valores de absorvância mais ou menos residuais no passo de equilíbrio que pode estar associado a pequenas interferências provocadas por possíveis suspensões de sílica.

4.1.2 Ensaios de ligação/eluição de ADN genómico e ARN de baixo peso molecular nos suportes de sílica funcionalizada com líquidos iónicos

Posteriormente, foram realizados os mesmos ensaios de ligação, que anteriormente foram descritos para favorecer maioritariamente as interações electrostáticas, utilizando neste caso uma amostra de lisado que continha ADN genómico e ARN de baixo peso molecular. No passo de ligação foi usado o tampão Tris-HCl 10 mM pH 8 e no passo de eluição foi adicionado NaCl 1 M em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8. Todos os ensaios apresentam no mínimo um n=2 e o resultado do comportamento de ligação/eluição dos ácidos nucleicos aos suportes foi analisado por medição da absorvância, que se encontram descritas na figura 23 por eletroforese em gel de agarose (Figuras 24 e 25). Com a mudança da amostra em estudo, os comportamentos das diferentes matrizes mantiveram-se semelhantes ao descrito no ponto anterior. No caso das matrizes S-SilPrMImCl e S-SilPrN(C₈)₃Cl mais uma vez apresentaram um comportamento bastante hidrofóbico com a adição de Tris-HCl 10 mM. No caso da primeira matriz, uma vez mais não foi possível confirmar a eluição dos ácidos nucleicos em nenhum passo, como se pode verificar na figura 24 (linhas 8 e 9 da eletroforese). Em relação à segunda matriz a formação de agregados não foi tão intensa, no entanto acabou por tornar o ensaio de difícil realização. Mais uma vez os suportes S-SilPrNEt₃Cl e S-SilPrMet₂ButCl foram os que apresentaram resultados mais promissores para a retenção e/ou separação das diferentes espécies de ácidos nucleicos, no entanto a primeira destaca-se uma vez mais, porque no passo de eluição com NaCl 1M praticamente não ocorreu eluição de ADN genómico tendo este eluído imediatamente no passo de ligação. Este resultado pode indicar que, otimizando as condições, será possível a separação entre ADN e ARN. Por outro lado, na matriz S-SilPrMet₂ButCl ocorre eluição de ADN genómico quer no passo de ligação quer no passo de eluição (Figura 25, linhas 4 e 5) não favorecendo tanto a separação. Relativamente ao suporte S-SilPrBenzCl, apesar da banda de ADN genómico ser de fraca intensidade, pode observar-se alguma diferença na seletividade pois ocorreu maior interação com o ARN uma vez que o ADN genómico eluiu no passo de ligação (Figura 24, linhas 6 e 7).

Observando os resultados obtidos nos controlos (Figura 24, linhas 2,3,4 e 5) pode verificar-se que tendencialmente o ADN genómico não liga ao suporte, o que passa a acontecer com alguns suportes modificados com LIs. Este facto demonstra a ligação e o efeito dos lípidos iónicos na retenção da amostra o que pode favorecer a sua separação.

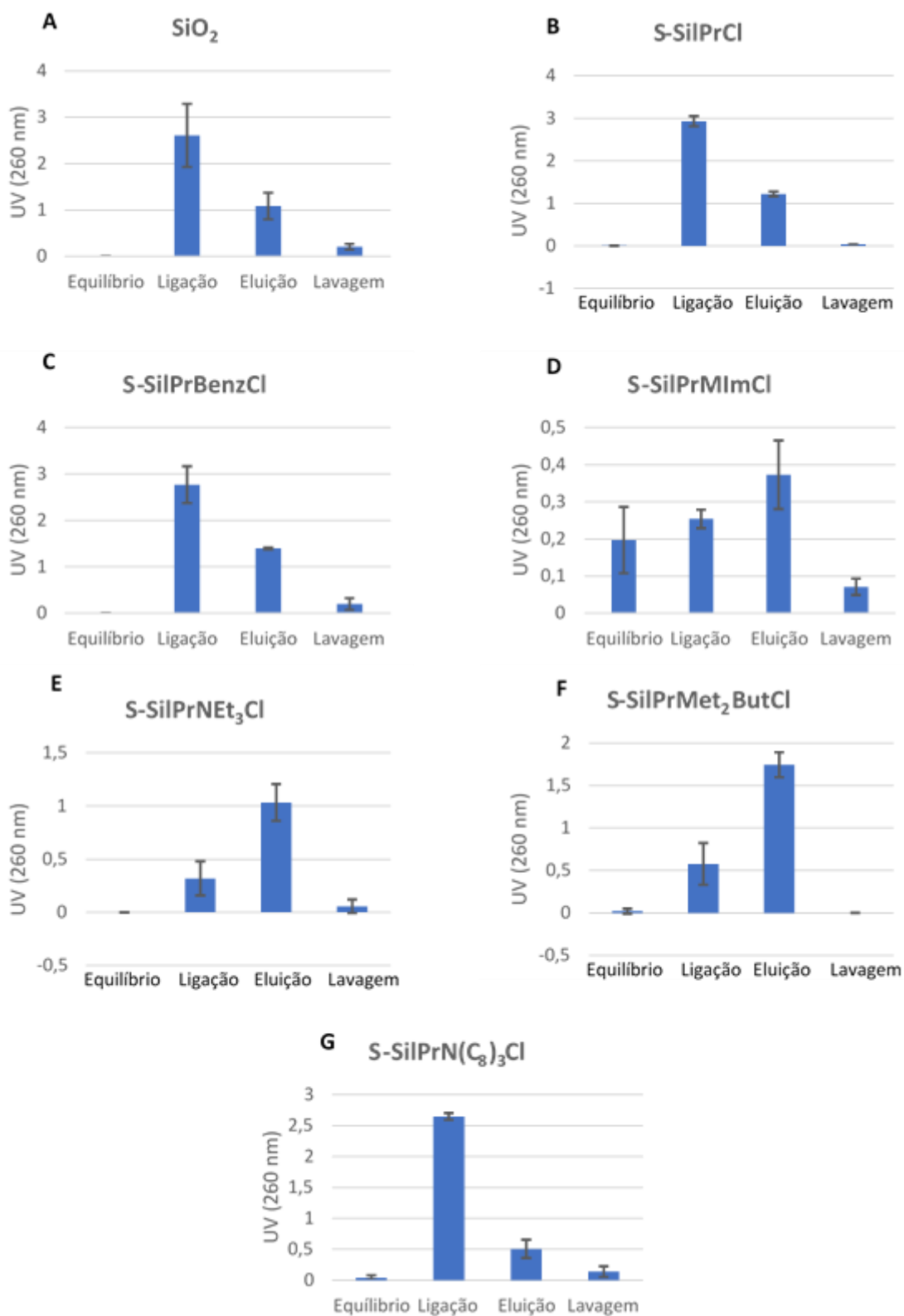


Figura 23 - Valores médios das absorvâncias nos diferentes passos do ensaio e respectivos desvio-padrão: A - SiO_2 ; B - S-SilPrCl; C - S-SilPrBenzCl; D - S-SilPrMImCl; E - S-SilPrNEt₃Cl; F - S-SilPrMet₂ButCl; G - S-SilPrN(C₈)₃Cl.

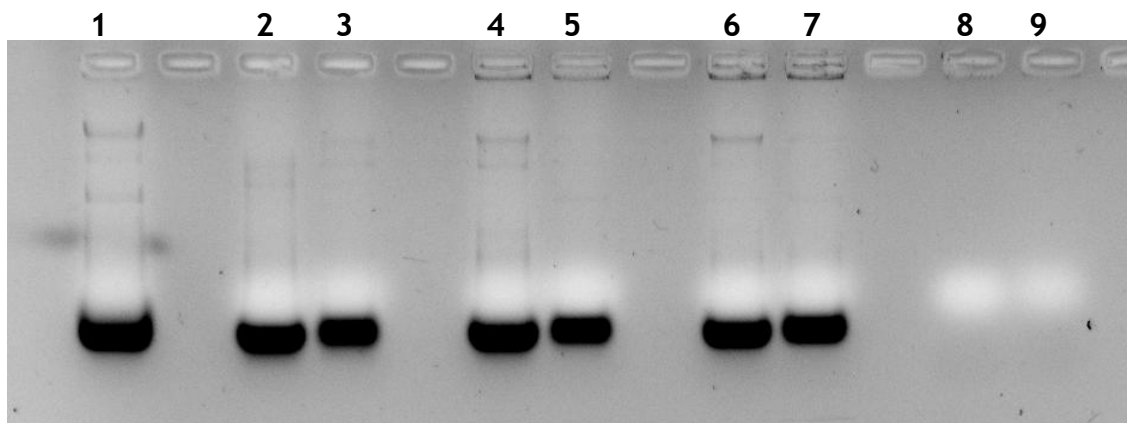


Figura 24 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações iônicas, aplicando uma amostra de ADN genômico e ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes LIs: 1 - Amostra inicial; 2- SiO₂: Ligação; 3 - SiO₂: Eluição; 4 - S-SilPrCl: Ligação; 5 - S-SilPrCl: Eluição; 6 - S-SilPrBenzCl: Ligação; 7 - S-SilPrBenzCl: Eluição; 8 - S-SilPrMImCl: Ligação; 9 - S-SilPrMImCl: Eluição.

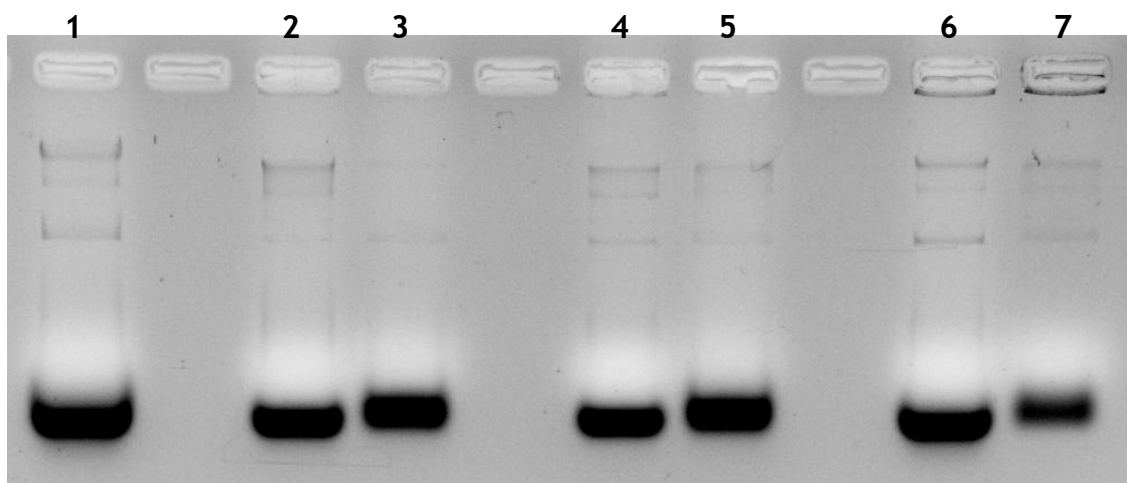


Figura 25 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações iônicas, aplicando uma amostra de ADN genômico e ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes LIs: 1 - Amostra inicial; 2 - S-SilPrNET₃Cl: Ligação; 3 - S-SilPrNET₃Cl: Eluição; 4 - S-SilPrMet₂ButCl: Ligação; 5 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição; 6 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Ligação; 7 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição.

Também com este tipo de amostra foram realizados ensaios em condições que favorecem maioritariamente interações hidrofóbicas que mais uma vez incluíam, inicialmente, a realização de um passo de equilíbrio/ligação com Sulfato de Amônio 2 M em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8, seguido de um passo de eluição por diminuição da força iônica com o tampão Tris-HCl 10 mM pH 8. Também neste caso foi notória a necessidade de realizar um passo de eluição adicional de modo a promover a eluição total da amostra retida na matriz. Assim sendo, foi incluído mais um passo no gradiente que consiste na eluição com NaCl 1 M em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8. Todos os ensaios apresentam no mínimo um n=2 e o resultado do comportamento de ligação/eluição dos ácidos nucleicos aos suportes foi analisado pela

medição da absorvância, que se encontram descritas na figura 26 e por eletroforese em gel de agarose (Figuras 27 e 28).

Com estas condições foi possível observar a eluição da amostra, aquando da utilização da matriz S-SilPrMImCl, tendo o ARN de baixo peso molecular eluído com NaCl 1M e o ADN genómico com Tris-HCl 10mM. Nestas condições foi possível verificar a seletividade do suporte, que resultou na total separação entre o ADN e o ARN de baixo peso molecular, confirmando-se ainda a maior afinidade para o ARN. Verificou-se ainda que o ADN ligou à matriz maioritariamente por interações hidrofóbicas e por isso a sua recuperação foi possível quando se alteraram as condições de forma a quebrar este tipo de interações. No entanto, o ARN que também estava retido, não foi igualmente recuperado, e terá sido sujeito à retenção associado a diferentes interações, que só quebraram quando foi aplicado o segundo passo de eluição. Relativamente à matriz S-SilPrN(C₈)₃Cl manteve o seu comportamento hidrofóbico e é possível verificar pela figura 28 que o ARN de baixo peso molecular eluiu na ligação com sulfato de amónio e em ambas as eluições, quer com Tris-HCl 10mM, quer com NaCl 1M, no entanto no caso do passo de ligação a quantidade de amostra que eluiu foi bastante inferior.

Mais uma vez a matriz S-SilPrNEt₃Cl apresentou um bom resultado, que sugere ser possível a separação entre as espécies de ADN e ARN. No passo de ligação é possível observar a eluição de ADN genómico, o que já tinha acontecido no ensaio anterior para as condições iónicas. No entanto, no ensaio com sulfato de amónio a eluição de ARN ocorreu nos dois passos de eluição, após adição de Tris-HCl 10 mM e NaCl 1 M. Apesar desta diferente distribuição, este é um resultado que pode ser um bom indicador para a aplicação do suporte na separação de ARNs específicos. A amostra de ARN de baixo peso molecular apresenta alguma heterogeneidade e diversidade de ARNs, sendo por isso natural que se possam encontrar diferentes perfis de retenção nos suportes e interação com os ligandos.

Com a utilização da matriz S-SilPrMet₂ButCl ocorreu a ligação total da amostra e a eluição das espécies de ácidos nucleicos apenas ocorreu no passo de eluição com NaCl 1M.

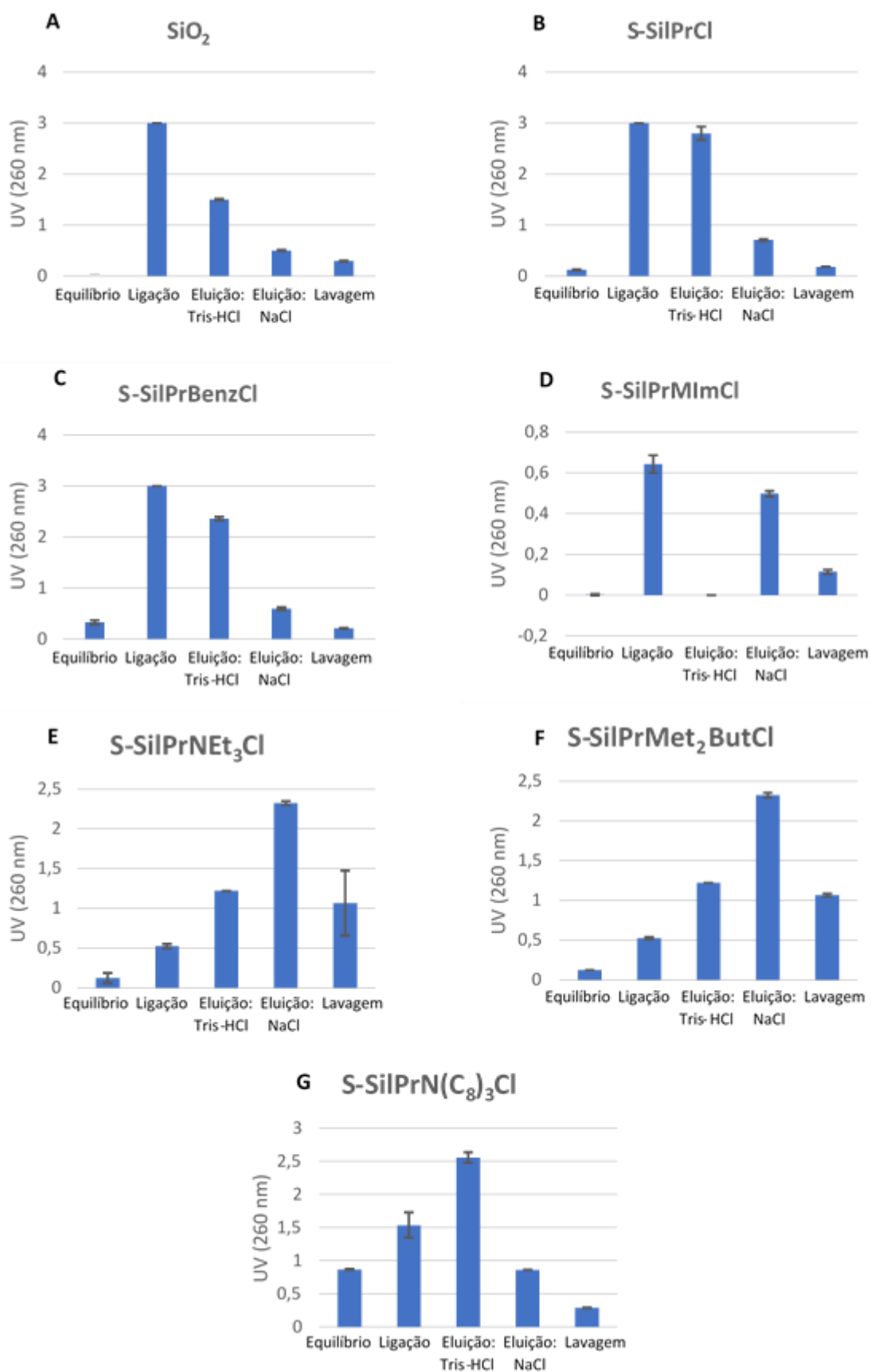


Figura 26 - Valores médios das absorvâncias nos diferentes passos do ensaio e respectivos desvio-padrão: A - SiO₂; B - S-SilPrCl; C - S-SilPrBenzCl; D - S-SilPrMImCl; E - S-SilPrNEt₃Cl; F - S-SilPrMet₂ButCl; G - S-SilPrN(C₈)₃Cl.

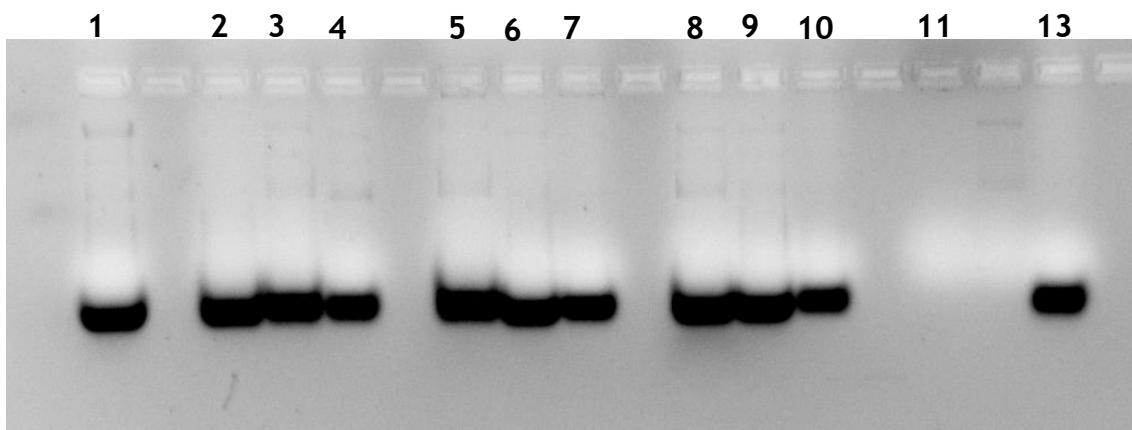


Figura 27 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações hidrofóbicas, aplicando uma amostra de ADN genómico e ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes LIs: 1 - Amostra inicial; 2 - SiO₂: Ligação; 3 - SiO₂: Eluição com Tris-HCl; 4 - SiO₂: Eluição com NaCl; 5 - S-SilPrCl: Ligação; 6 - S-SilPrCl: Eluição com Tris-HCl; 7 - S-SilPrCl: Eluição com NaCl; 8 - S-SilPrBenzCl: Ligação; 9 - S-SilPrBenzCl: Eluição com Tris-HCl; 10 - S-SilPrBenzCl: Eluição com NaCl; 11 - S-SilPrMImCl: Ligação; 12 - S-SilPrMImCl: Eluição com Tris-HCl; 13 - S-SilPrMImCl: Eluição com NaCl.

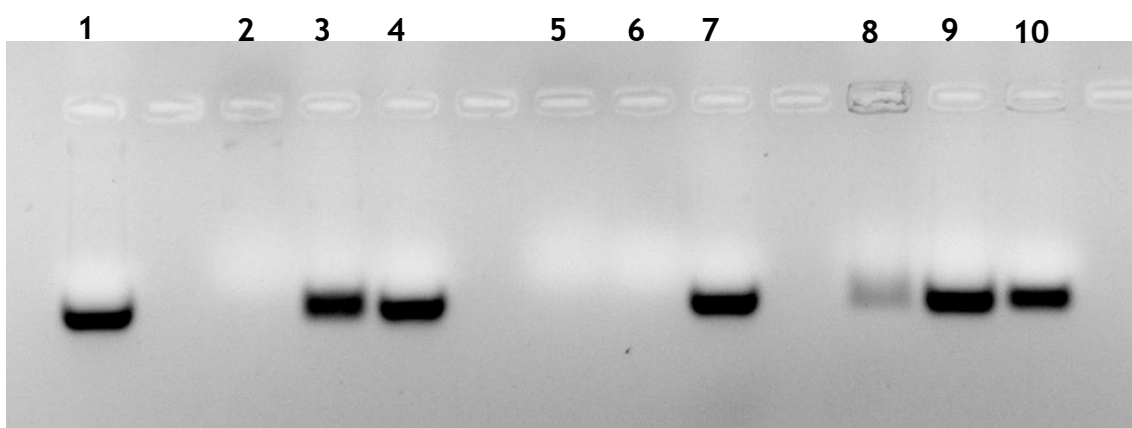


Figura 28 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações hidrofóbicas, aplicando uma amostra de ADN genómico e ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes LIs: 1 - Amostra inicial; 2 - S-SilPrNEt₃Cl: Ligação; 3 - S-SilPrNEt₃Cl: Eluição com Tris-HCl; 4 - S-SilPrNEt₃Cl: Eluição com NaCl; 5 - S-SilPrMet₂ButCl: Ligação; 6 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição com Tris-HCl; 7 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição com NaCl; 8 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Ligação; 9 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição com Tris-HCl; 10 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição com NaCl.

Os resultados obtidos com a amostra de lisado destacam uma vez mais a matriz S-SilPrNEt₃Cl pela positiva, uma vez que no passo de ligação os valores de absorvância são consideravelmente baixos o que reflete uma correta ligação do ARN ao suporte. No caso da matriz S-SilPrBenzCl foram obtidos valores ligeiramente superiores na absorvância dos sobrenadantes no passo de ligação, isto pode ser indicativo de uma ligação incompleta das espécies ao suporte, outra possibilidade para apresentar valores elevados nesse passo é uma possível interferência provocada pelo anel aromático presente na constituição da matriz.

4.1.3 Ensaios de ligação/eluição de ADN genómico, ARN ribossomal e ARN de baixo peso molecular nos suportes de sílica funcionalizada com líquidos iónicos

Nestes ensaios foi utilizada uma amostra de lisado mais complexa contendo ADN genómico, ARN ribossomal e ARN de baixo peso molecular. Tal como nas amostras anteriores, também neste caso foram realizados ensaios que favorecem maioritariamente as interações iónicas, estes incluíram também a realização de um passo de ligação com o tampão Tris-HCl 10 mM pH 8 e um passo de eluição com a adição de NaCl 1 M em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8. Todos os ensaios apresentam no mínimo um $n=2$ e o resultado do comportamento de ligação/eluição dos ácidos nucleicos aos suportes foi analisado pela medição da absorvância, que se encontram descritas na figura 29 e por eletroforese em gel de agarose (Figuras 30 e 31).

Mais uma vez os resultados são coerentes com os obtidos anteriormente, e as matrizes S-SilPrMImCl e S-SilPrN(C₈)₃Cl voltaram a demonstrar o seu comportamento hidrofóbico tornando difícil a visualização dos ácidos nucleicos no gel de agarose, devido à formação de aglomerados.

O comportamento da matriz S-SilPrNEt₃Cl também se demonstrou concordante, pois uma vez mais no passo da ligação ocorreu a eluição de ADN genómico e ARN de baixo peso molecular, mas desta vez também existia a presença de ARN ribossomal. Já no passo da eluição com NaCl 1M apenas ocorreu a eluição de ARN de baixo peso molecular, o que demonstra que haverá uma interação de maior intensidade com este tipo de biomolécula. Por sua vez, na matriz S-SilPrMet₂ButCl, o ARN de baixo peso molecular apenas eluiu no passo em que foi adicionado NaCl 1M, o que não tinha acontecido com a amostra anterior, enquanto que o ADN genómico e ARN ribossomal eluíram no passo de ligação. Neste caso verificou-se total seletividade entre as biomoléculas de maior peso molecular (ADN e ARN ribossomal) e as de mais baixo peso.

No caso da matriz S-SilPrBenzCl, não ocorreu interação da amostra com o suporte uma vez que todas as espécies eluíram no passo de ligação tendo havido apenas uma retenção muito residual (Figura 30, linhas 6 e 7).

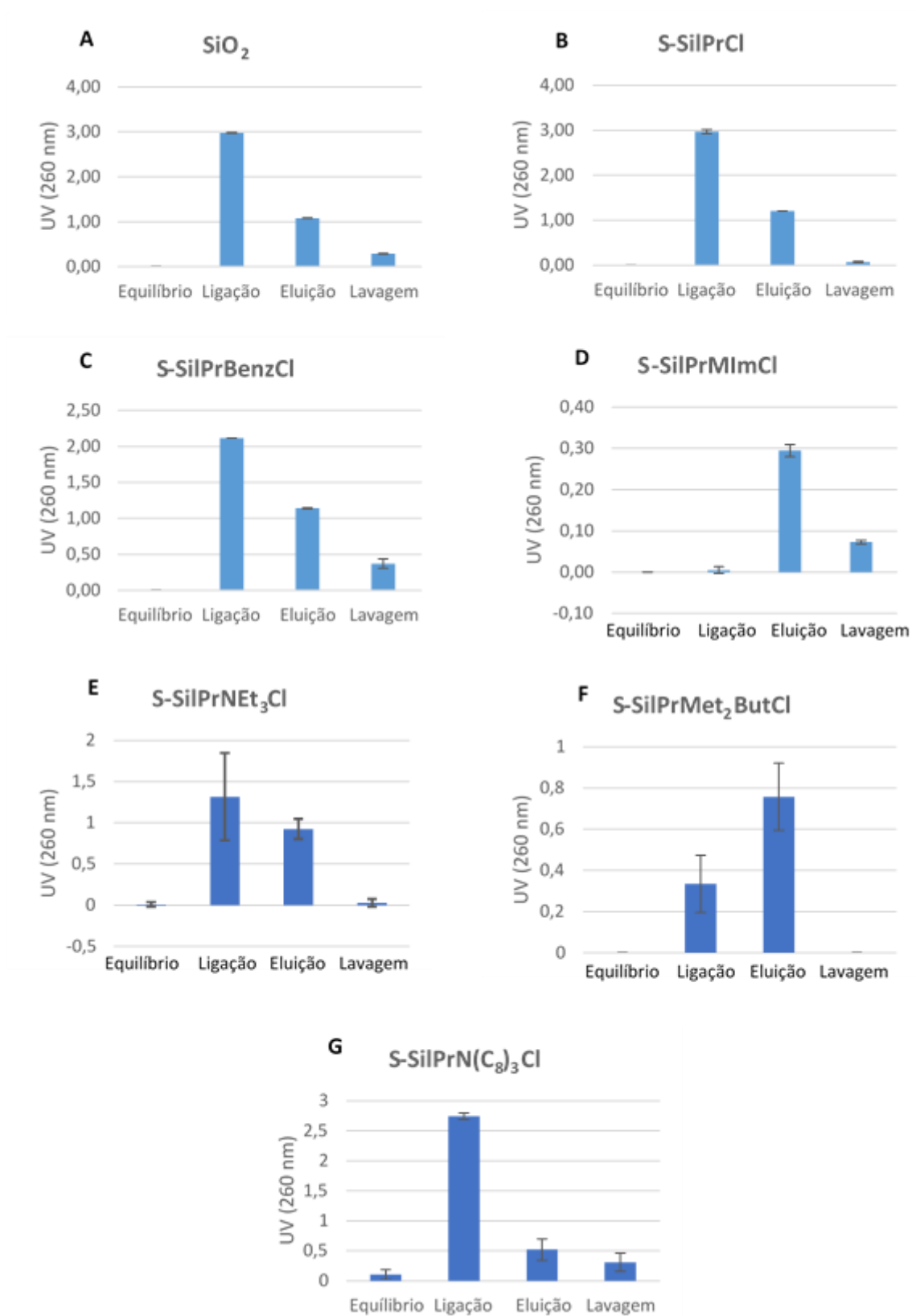


Figura 29 - Valores médios das absorvâncias nos diferentes passos do ensaio e respectivos desvio-padrão: A - SiO₂; B - S-SilPrCl; C - S-SilPrBenzCl; D - S-SilPrMImCl; E - S-SilPrNEt₃Cl; F - S-SilPrMet₂ButCl; G - S-SilPrN(C₈)₃Cl.

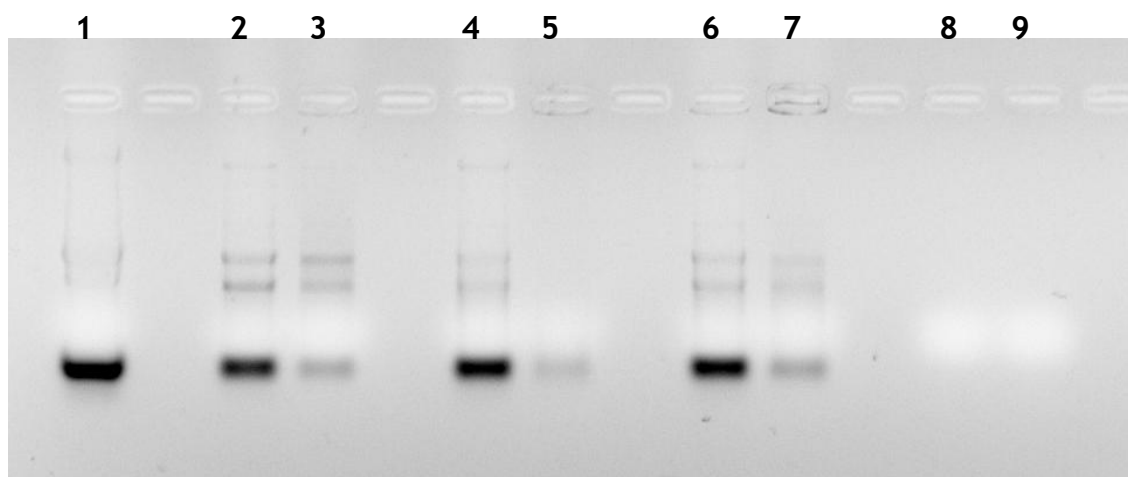


Figura 30 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações iônicas, aplicando uma amostra de ADN genômico, ARN ribossomal e ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes LIs: 1 - Amostra inicial; 2- SiO₂: Ligação; 3 - SiO₂: Eluição; 4 - S-SilPrCl: Ligação; 5 - S-SilPrCl: Eluição; 6 - S-SilPrBenzCl: Ligação; 7 - S-SilPrBenzCl: Eluição; 8 - S-SilPrMImCl: Ligação; 9 - S-SilPrMImCl: Eluição.

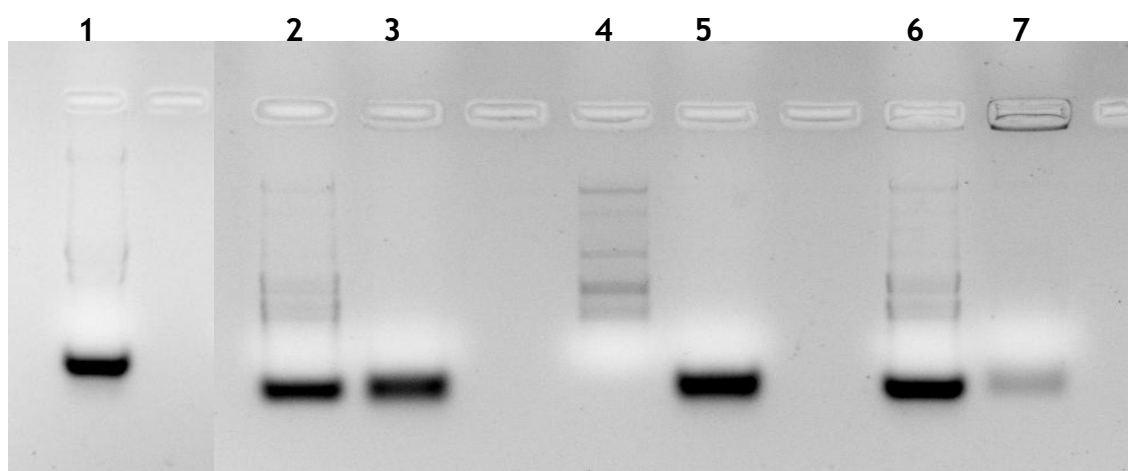


Figura 31 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações iônicas, aplicando uma amostra de ADN genômico, ARN ribossomal e ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes LIs: 1 - Amostra inicial; 2 - S-SilPrNET₃Cl: Ligação; 3 - S-SilPrNET₃Cl: Eluição; 4 - S-SilPrMet₂ButCl: Ligação; 5 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição; 6 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Ligação; 7 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição.

Por fim, foram realizados ensaios que favorecem maioritariamente interações hidrofóbicas que mais uma vez incluíam, inicialmente, a realização de um passo de equilíbrio/ligação com Sulfato de Amônio 2 M em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8, seguido de um passo de eluição com a adição de Tris-HCl 10 mM pH 8. Também neste caso foi notória a necessidade de realizar mais um passo de eluição de modo a promover a eluição total da amostra ligada à matriz. Assim foi incluído um passo que consiste na eluição com NaCl 1M em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8.

Os suportes S-SilPrNEt₃Cl e S-SilPrMet₂ButCl apresentaram comportamentos diferentes relativamente ao ensaio em que eram promovidas as condições iónicas. Relativamente ao primeiro, no caso dos ensaios em condições iónicas não apresentava seletividade e neste caso já existe uma diferença na eluição dos ácidos nucleicos de maior peso molecular (ADN genómico e ARN ribossomal) em relação aos de menor peso molecular (Figura 34, linhas 2,3 e 4). Já no caso do segundo suporte ocorreu o oposto, em condições iónicas apresentava seletividade e em condições hidrofóbicas todas as espécies de ácidos nucleicos eluíram no último passo (Figura 34, linhas 5,6 e 7). Confirma-se desta forma a versatilidade dos suportes e a possibilidade de adaptar condições dependendo da amostra e do que se pretende recuperar.

Em todos os ensaios realizados é notória a dificuldade em visualizar bandas de ARN ribossomal completamente íntegras, este facto pode dever-se às condições de elevada concentração de sal que são utilizadas.

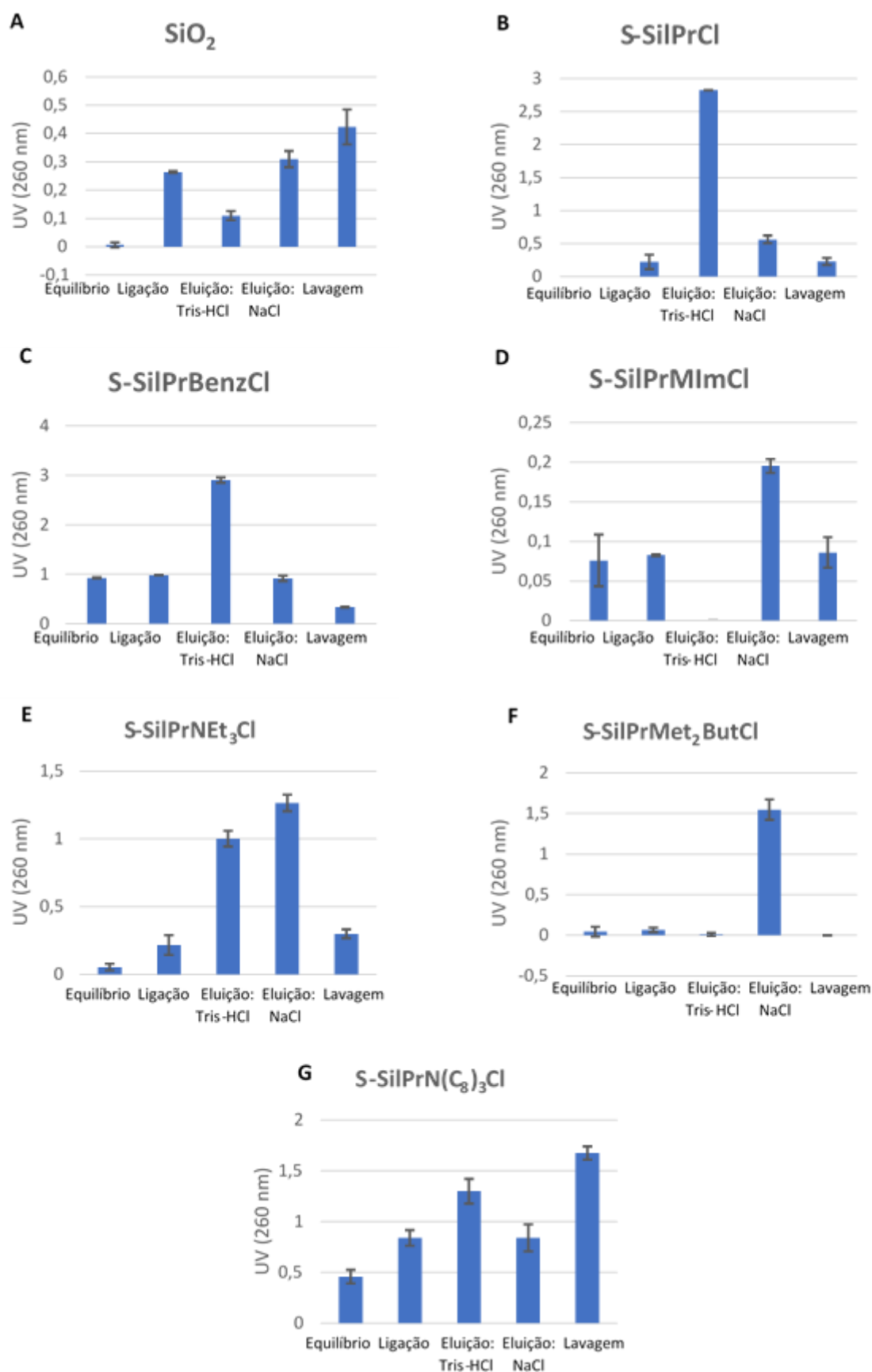


Figura 32 - Valores médios das absorvâncias nos diferentes passos do ensaio e respetivos desvio-padrão: A - SiO₂; B - S-SilPrCl; C - S-SilPrBenzCl; D - S-SilPrMImCl; E - S-SilPrNEt₃Cl; F - S-SilPrMet₂ButCl; G - S-SilPrN(C₈)₃Cl

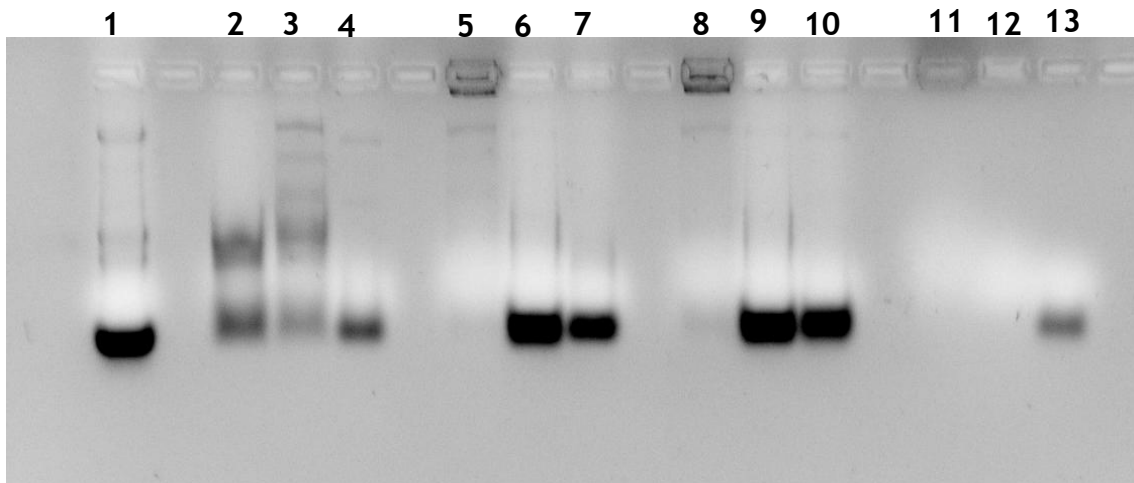


Figura 33 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações hidrofóbicas, aplicando uma amostra de ADN genómico, ARN ribossomal e ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes LIs: 1 - Amostra inicial; 2- SiO₂: Ligação; 3 - SiO₂: Eluição com Tris-HCl; 4 - SiO₂: Eluição com NaCl; 5 - S-SilPrCl: Ligação; 6 - S-SilPrCl: Eluição com Tris-HCl; 7 - S-SilPrCl: Eluição com NaCl; 8 - S-SilPrBenzCl: Ligação; 9 - S-SilPrBenzCl: Eluição com Tris-HCl; 10 - S-SilPrBenzCl: Eluição com NaCl; 11 - S-SilPrMimCl: Ligação; 12 - S-SilPrMimCl: Eluição com Tris-HCl; 13 - S-SilPrMimCl: Eluição com NaCl.

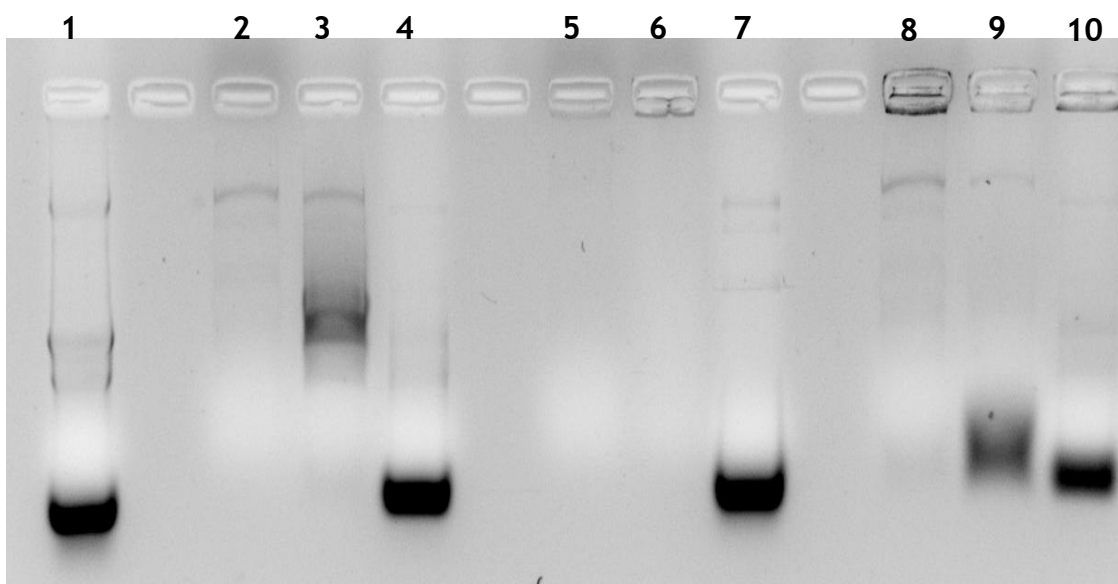


Figura 34 - Eletroforese representativa dos ensaios realizados em condições que promovem interações hidrofóbicas, aplicando uma amostra de ADN genómico, ARN ribossomal e ARN de baixo peso molecular em sílicas modificadas com diferentes LIs: 1 - Amostra inicial; 2 - S-SilPrNEt₃Cl: Ligação; 3 - S-SilPrNEt₃Cl: Eluição com Tris-HCl; 4 - S-SilPrNEt₃Cl: Eluição com NaCl; 5 - S-SilPrMet₂ButCl: Ligação; 6 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição com Tris-HCl; 7 - S-SilPrMet₂ButCl: Eluição com NaCl; 8 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Ligação; 9 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição com Tris-HCl; 10 - S-SilPrN(C₈)₃Cl: Eluição com NaCl.

Em suma, os resultados sugerem que as matrizes apresentam um comportamento multimodal pois nos ensaios realizados com sulfato de amónio seria esperado que ocorresse a eluição das biomoléculas com a diminuição da força iónica para Tris-HCl 10 mM, mas o que se verificou foi que as biomoléculas permaneciam retidas à matriz, provavelmente devido ao facto da

condição de eluição que quebra as interações hidrofóbicas acabar por favorecer as interações iônicas e assim as biomoléculas permaneciam ligadas.

Considerando os ensaios realizados com todas as diferentes amostras considerou-se que existem duas matrizes bastante promissoras: a S-SilPrNEt₃Cl e a S-SilPrMet₂ButCl uma vez que demonstraram ser as que apresentavam resultados com uma coerência mais elevada. No entanto o presente trabalho avançou para os ensaios seguintes com a S-SilPrNEt₃Cl.

4.2 Ensaios cromatográficos com a matriz macroporosa funcionalizada com SilPrNEt₃Cl

Após a realização dos ensaios *screening* nos suportes de sílica e avaliação dos resultados obtidos, procedeu-se à modificação da matriz macroporosa com o líquido iónico mais promissor. A matriz escolhida foi a AF- Epoxy-650 uma vez que apresenta uma alta capacidade de funcionalização através dos grupos epóxi, sendo por isso altamente versátil para a funcionalização de novos grupos químicos, além de ser uma matriz macroporosa, o que pode resultar numa maior capacidade de ligação.

Apesar de existirem várias sílicas funcionalizadas com LIs que demonstraram potencial, o trabalho foi elaborado com o LI tendo como catião a trietilamina e anião o cloreto, Mp-SilPrNEt₃Cl. Recorremos a uma técnica cromatográfica em que as condições de ligação favoreciam maioritariamente interações iônicas, pois os ensaios em sílica modificada com o mesmo LI mostraram que esta interação poderia ter um comportamento promissor na separação das diferentes espécies de ácidos nucleicos. Embora nas condições hidrofóbicas também se tenham obtidos resultados positivos, no entanto, a utilização de sulfato de amónio requer um maior tempo para a remoção do sal, além disso tem também um maior impacto ambiental.

Assim, para separar os diferentes ácidos nucleicos presentes na amostra complexa de lisado foi iniciado o equilíbrio das duas fases com uma solução de NaCl 170 mM em Tris-HCl 10 mM pH 8 seguindo-se a injeção da amostra. Pode observar-se na figura 35 (A) que no primeiro passo foi obtido um pico no cromatograma, que através da análise da eletroforese em gel de agarose, figura 35 (B) confirmou-se corresponder ao ADN genómico, desta forma percebemos que a referida biomolécula não interage com o suporte nas condições estabelecidas, eluindo assim de forma imediata após a injeção do lisado. De seguida, a concentração de sal foi aumentada para os 300 mM de NaCl em Tris-HCl 10mM tendo-se obtido outro pico, ou seja, foi provida a eluição de outras espécies de ácidos nucleicos. Analisando a eletroforese em gel de agarose percebemos que neste passo eluiu ARN de baixo peso molecular, tendo desta forma interagido mais fortemente com o suporte modificado com o líquido iónico em estudo. Como terceiro passo do ensaio cromatográfico foi utilizada a concentração de 500 mM de NaCl em Tris-HCl 10 mM. Mais uma vez foi obtido um pico no cromatograma que se revelou tratar da

eluição de duas espécies distintas, justificando assim o valor elevado do referido pico, sendo elas ARN ribossomal e uma pequena quantidade de ADN genómico. No final do ensaio a concentração de sal foi aumentada para 1M de NaCl em Tris-HCl 10mM de modo a verificar se todas as biomoléculas tinham eluído do suporte.

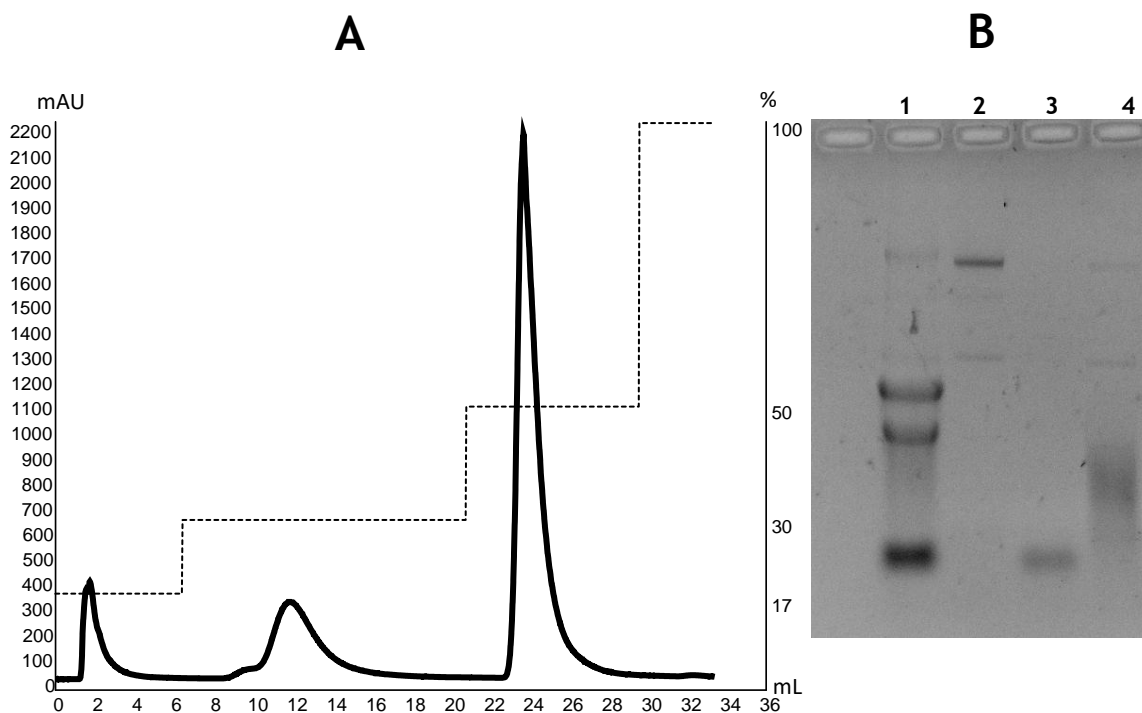


Figura 35 - (A) Cromatograma representativo do estudo da interação dos ácidos nucleicos com a matriz Mp-SilPrNET₃Cl. O gradiente usado está representado pela linha a tracejado (B) Electroforese em gel de agarose para análise das frações recolhidas do cromatograma. 1: Amostra Inicial; 2: Fração correspondente ao pico 1; 3: Fração correspondente ao pico 2; 4: fração correspondente ao pico 3.

No poço nº1 da corrida de eletroforese em gel de agarose foi injetada a amostra inicial onde é possível observar as 3 espécies de ácidos nucleicos presentes na amostra complexa de lisado. Após concentração e remoção do excedente de sal das amostras correspondentes aos picos 1, 2 e 3 do cromatograma, as mesmas foram injetadas na eletroforese confirmando-se as espécies que eluíram em cada condição.

De modo a melhorar a separação das 3 espécies presentes foram realizados ensaios com condições ajustadas tendo-se iniciado o equilíbrio das duas fases com uma solução de NaCl 150mM em Tris-HCl 10mM, seguindo-se a injeção da amostra. É possível observar na figura 36 que o primeiro pico corresponde à eluição de AND genómico que mais uma vez não interagiu com o suporte tendo sido desta forma a primeira biomolécula a eluir. De seguida, a concentração de sal foi aumentada para 300 mM de NaCl em Tris-HCl 10 mM tendo-se obtido desta forma mais um pico correspondente ao ARN de baixo peso molecular, como se pode observar pela figura 36 B. De forma a obter o último pico, a concentração de NaCl foi ajustada para 500 mM em Tris-HCl 10mM, que por análise da eletroforese em gel de agarose,

figura 36 B, de confirmou que se tratava do ARN ribossomal. Tal como nas condições anteriores, também neste caso se realizou um último passo em que a concentração de NaCl era de 1M em Tris-HCl 10 mM de modo a verificar se toda a amostra tinha eluído do suporte, o que se confirmou uma vez que não ocorreu a formação de nenhum pico.

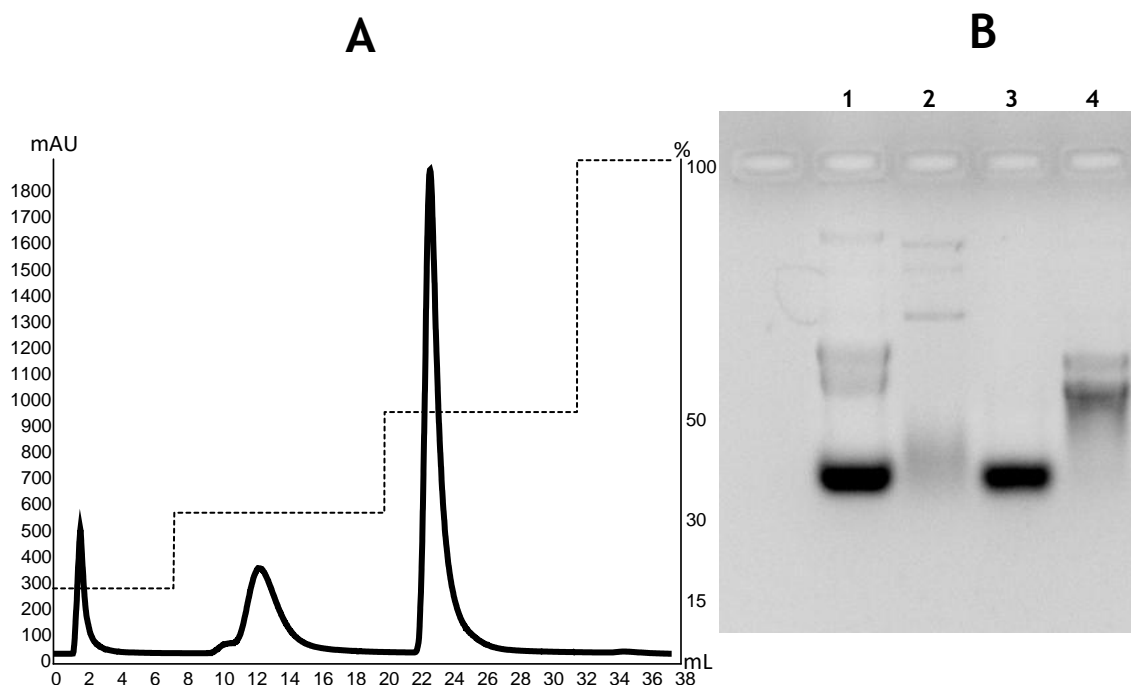


Figura 36 - (A) Cromatograma representativo do estudo da interação dos ácidos nucleicos com a matriz Mp-SilPrNEt₃Cl, em que o gradiente usado está representado pela linha a tracejado. (B) Electroforese em gel de agarose para análise das frações recolhidas do cromatograma. 1: Amostra Inicial; 2: Fração correspondente ao pico 1; 3: Fração correspondente ao pico 2; 4: fração correspondente ao pico 3.

Também neste ensaio foi injetado no poço nº1 da corrida de eletroforese em gel de agarose a amostra inicial onde é possível observar as 3 espécies de ácidos nucleicos presentes na amostra complexa de lisado. Após concentração e remoção do excedente de sal das amostras correspondentes aos picos 1, 2 e 3 do cromatograma, as mesmas foram injetadas na eletroforese confirmando-se as espécies que eluíram em cada condição.

Através do ajuste das concentrações de sal foi assim possível separar de forma mais eficiente as diferentes espécies de ácidos nucleicos presentes na amostra inicial. Uma vez que estes ensaios cromatográficos são realizados de uma forma consideravelmente rápida (em média 40 minutos) as biomoléculas são recuperadas rapidamente o que é uma vantagem uma vez que os ácidos nucleicos são bastantes sensíveis à temperatura, desta forma pode ser mais fácil garantir a sua estabilidade e integridade.

De forma a poder verificar os resultados obtidos e verificar a reprodutibilidade da coluna foram efetuados oito ensaios onde foram mantidas as condições de equilíbrio, ligação e eluição. Desta forma foi obtido um perfil cromatográfico semelhante em todos os ensaios como se pode observar na figura 37. Existem variações na quantidade de amostra eluída,

verificada pelas diferentes alturas dos picos. Este facto pode estar relacionado com o manuseamento da amostra aquando da sua homogeneização. Outra diferença visível é o facto de os picos serem obtidos em volumes diferentes o que é justificável pelo facto dos ensaios não terem todos a mesma duração.

É assim possível observar que matriz macroporosa funcionalizada com o líquido iónico permite a realização de diversos ensaios não comprometendo a separação das três espécies de ácidos nucleicos presentes na amostra.

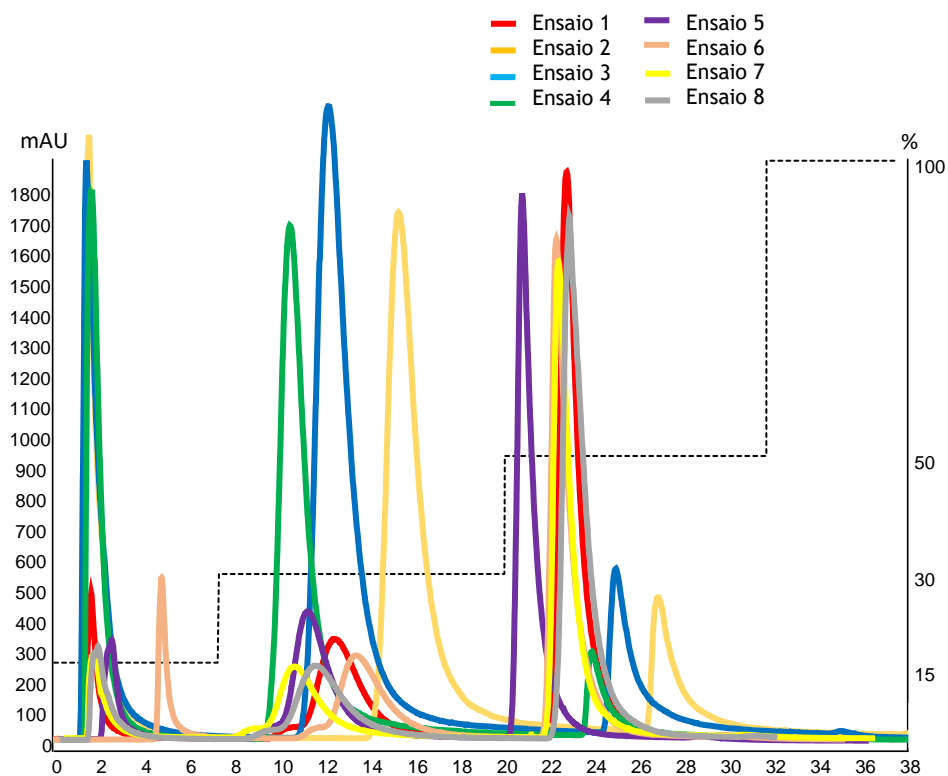


Figura 37 - Cromatograma representativo dos ensaios de reprodutibilidade da coluna em condições de interação iónica.

Capítulo 5 - Conclusões e Perspetivas Futuras

É inegável a importância bioquímica e clínica das diferentes espécies dos ácidos nucleicos, pois todas têm um papel crucial em diversos processos biológicos e celulares. Cada vez mais são utilizados em diferentes tipos de terapias, como por exemplo o uso de ARN ribossomal para estudo e caracterização da ação de antibióticos e o ARN de interferência como agente terapêutico e, por isso têm vindo a ganhar um enorme interesse para a obtenção de novos métodos mais efetivos para o combate de patologias que afetam grande parte da população mundial. No entanto, a aplicação clínica destas biomoléculas está dependente da implementação de técnicas adequadas que garantam a sua estabilidade assim como a sua purificação. Apesar das diversas opções já disponíveis, ainda existe um extenso caminho até se conseguir obter um processo biotecnológico ideal com o qual se consiga realizar a separação das biomoléculas para posterior aplicação.

Dentro dos diversos processos biotecnológicos, a cromatografia líquida é um método que permite, tendo por base interações reversíveis, a separação e a purificação seletiva dos diferentes tipos de biomoléculas. No entanto, a grande desvantagem desta técnica são os tipos de suportes disponíveis, a limitada capacidade ou os solventes normalmente usados que podem ser economicamente desvantajosos ou representar algum impacto negativo para o meio ambiente. É neste campo que os líquidos iónicos se apresentam como uma grande vantagem pois possuem ótimas características físico-químicas que permitem uma alta manipulação de modo a anular os referidos efeitos prejudiciais.

Com este trabalho, através de um *screening* inicial verificou-se que os líquidos iónicos com os catiões trietilamina e dimetilbutilamina são os que apresentam melhores características de modo a promover interação com as diferentes espécies de ácidos nucleicos. Além disso apresentam um comportamento multimodal potenciando desta forma a utilização de interações iónicas e hidrofóbicas na separação. Após a funcionalização em sílica, foi realizada a funcionalização da matriz cromatográfica macroporosa com o líquido iónico cloreto de trietilamina e foram realizados ensaios de purificação com as diferentes espécies de ácidos nucleicos: ADN genómico, ARN ribossomal e ARN de baixo peso molecular a partir de lisados de *E. coli*. Neste estudo foi confirmada a separação das três referidas espécies através de dois passos cromatográficos. Foi possível ainda demonstrar a reprodutibilidade da coluna onde se verifica que ocorre sempre a separação das espécies presentes na amostra embora a eficiência seja variável.

Considerando os resultados obtidos pode-se considerar esta técnica bastante promissora e com grande potencial para a purificação de ácidos nucleicos.

No futuro poderá testar-se esta matriz na separação e purificação dos diversos ARNs não-codificantes como os miARNs uma vez que cada vez mais revelam ter uma enorme

importância biológica e são ótimas opções como agentes terapêuticos. Também deverá ser efetuado um estudo da matriz funcionalizada com líquidos iônicos baseados em dimetilbutilamina como ligandos na matriz macroporosa para cromatografia líquida uma vez que também demonstrou excelentes interações com as espécies de ácidos nucleicos aquando da funcionalização em sílica. Também deverá ser avaliada a possibilidade da utilização de uma técnica onde é aplicado o conceito multimodal das matrizes uma vez que esta característica é uma mais-valia para esta técnica de separação.

Bibliografia

- [1] J. Baynes and M. Dominiczak, *Medical Biochemistry*. 1999.
- [2] R. Martins, J. A. Queiroz, and F. Sousa, "Ribonucleic acid purification," *J. Chromatogr. A*, vol. 1355, pp. 1-14, 2014.
- [3] C. Azevedo and C. Sunkel F., *Biologia Celular e Molecular*, 5^a. 1999.
- [4] J. Martins and Silva, *Bioquímica da informação genética*. 2006.
- [5] L. . Shen, Z. Cai, and I. J. Tinoco, "RNA structure at high resolution," *FASEB J*, vol. 1, no. 3, pp. 1023-1033, 1995.
- [6] P. Pereira, M. Barreira, J. A. Queiroz, F. Veiga, F. Sousa, and A. Figueiras, "Smart micelleplexes as a new therapeutic approach for RNA delivery," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 14, no. 3, pp. 353-371, 2017.
- [7] P. Svoboda and A. Di Cara, "Hairpin RNA: A secondary structure of primary importance," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 63, no. 7-8, pp. 901-918, 2006.
- [8] L. Stryer, *Biochemistry*, 4^a. New York: W. H. Freeman and Company, 1995.
- [9] C. Pabo and R. T. Sauer, "Protein-DNA Recognition," 1984.
- [10] A. Griffiths, S. Wessler, S. Carrol, and J. Doebley, *Introdução à Genética*, Guanabara. Rio de Janeiro, 2006.
- [11] R. . Murray and E. Al., *Harper's Biochemistry*, 25th ed. USA, 2000.
- [12] M. Meringer and J. Goodwin, "227 Views of RNA: Is RNA Unique in Its Chemical Isomer Space?," *Astrobiology*, vol. 15, pp. 538-558, 2015.
- [13] P. Pereira, J. A. Queiroz, A. Figueiras, and F. Sousa, "Affinity approaches in RNAi-based therapeutics purification," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1021, pp. 45-56, 2016.
- [14] R. Brimacombe and W. Stiege, "Structure and function of ribosomal RNA," *Biochem. J.*, vol. 229, pp. 1-17, 1985.
- [15] J. A. Broderick and P. D. Zamore, "MicroRNA therapeutics," no. April, pp. 1104-1110, 2011.
- [16] H. S. Soifer, J. J. Rossi, and P. Sætrom, "MicroRNAs in Disease and Potential Therapeutic Applications," *Mol. Ther.*, vol. 15, no. 12, pp. 2070-2079, 2007.
- [17] P. Pereira, J. A. Queiroz, A. Figueiras, and F. Sousa, "Current progress on microRNAs-based therapeutics in neurodegenerative diseases," vol. 8, pp. 1-26, 2017.
- [18] Y. Qi *et al.*, "Prognostic value of the MicroRNA- - 29 family in multiple human cancers : A meta- - analysis and systematic review," *Clin Exp Pharmacol Physiol*, vol. 44, pp. 441-454, 2017.
- [19] P. Pereira, A. Q. Pedro, J. A. Queiroz, A. R. Figueiras, and F. Sousa, "New insights for therapeutic recombinant human miRNAs heterologous production: *Rhodovulum sulfidophilum* vs *Escherichia coli*," *Bioengineered*, vol. 8, no. 5, pp. 1-8, 2017.
- [20] P. Pereira, J. A. Queiroz, A. Figueiras, and F. Sousa, "Affinity approaches in RNAi-

- based therapeutics purification,” *J. Chromatogr. B*, vol. 1021, pp. 45-56, 2016.
- [21] R. R. Gutell, I. N. Larsen, and C. R. Woese, “Lessons from an Evolving rRNA : 16S and 23S rRNA Structures from a Comparative Perspective,” *Microbiol. Rev.*, vol. 58, pp. 10-26, 1994.
- [22] B. . Clark, “The crystal structure of tRNA,” *J. Biosci.*, vol. 31, pp. 453-457, 2006.
- [23] U. L. Rajbhandary and C. Kohrer, “Early days of tRNA research : Discovery , function , purification and sequence analysis,” *J. Biosci.*, vol. 31, pp. 439-451, 2006.
- [24] P. . Champe and R. . Harvey, *Biochemistry*, 2^a. Lippincott Williams and wilkkins, 1994.
- [25] M. Sprinzl, “Chemistry of aminoacylation and peptide bond formation on the 3´ terminus of tRNA,” *J. Biosci.*, vol. 31, pp. 489-496, 2006.
- [26] S. Pascolo, “Vaccination With Messenger RNA,” vol. 127, pp. 23-40.
- [27] B. . Jones and A. . Schreiber, “mRNA as a Therapeutic Target in Lung Disease,” *Drug Des. Rev. - Online*, vol. 2, pp. 361-372, 2005.
- [28] W. H. Elliott and D. C. Elliott, *Biochemistry and molecular biology*. New York: Oxford University Press, 2001.
- [29] P. B. Moore and T. A. Steitz, “The involvement of RNA in ribosome function,” *Nature*, vol. 418, no. 6894, pp. 229-235, 2002.
- [30] E. C. Böttger, B. Springer, T. Prammananan, Y. Kidan, and P. Sander, “Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics,” *EMBO Rep.*, vol. 2, no. 4, pp. 318-323, 2001.
- [31] D. . Nelson and M. . Cox, *Lehninger principles of biochemistry*, 4^a. New York: Worth Publishers, 2004.
- [32] T. Ikemura and J. Dahlberg, “Smal Ribonucleic Acids of Echerichia coli,” *Biol. Chem.*, vol. 248, pp. 5024-5032, 1973.
- [33] J. C. Pinder, “Electrophoresis of RNA in Formamide,” *Biochemistry*, vol. 13, pp. 5373-5378, 1974.
- [34] G. De Sousa Vieira, C. A. Pereira Tavares, F. Capurucho, and H. Bouchardet, “Analysis of DNA in Forensic Dentistry,” *Arqu bras odontol*, vol. 6, no. 2, pp. 64-70, 2010.
- [35] D. W. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun, and P. S. Stayton, “Design and development of polymers for gene delivery,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 4, no. 7, pp. 581-593, 2005.
- [36] R. Martins, J. A. Queiroz, and F. Sousa, “Ribonucleic acid purification,” vol. 1355, pp. 1-14, 2014.
- [37] P. Y. Ho and A. M. Yu, “Bioengineering of noncoding RNAs for research agents and therapeutics,” *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, vol. 7, no. 2, pp. 186-197, 2016.
- [38] P. Pereira, Â. Sousa, J. Queiroz, I. Correia, A. Figueiras, and F. Sousa, “Purification of pre-miR-29 by arginine-affinity chromatography,” vol. 952, pp. 16-23, 2014.
- [39] P. Pereira *et al.*, “Advances in time course extracellular production of human pre-miR-29b from *Rhodovulum sulfidophilum*,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 8, pp. 3723-3734, 2016.
- [40] L. Ponchon and F. Dardel, “Large scale expression and purification of recombinant RNA

- in *Escherichia coli*,” *Methods*, vol. 54, no. 2, pp. 267-273, 2011.
- [41] M.-M. Li *et al.*, “Chimeric miR-1291 biosynthesized efficiently in *E. coli* is effective to reduce target gene expression in human carcinoma cells and improve chemosensitivity,” *at ASPET Journals on*, no. July, pp. 1129-1136, 2015.
- [42] R. E. Farrell, *RNA methodologies : a laboratory guide for isolation and characterization*. Elsevier/Academic Press, 2005.
- [43] J. Sambrook and D. W. Russell, “A Single-step Method for the Simultaneous Preparation of DNA, RNA, and Protein from Cells and Tissues,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2006, no. 1, p. pdb.prot4056, Jun. 2006.
- [44] P. Chomczynski and N. Sacchi, “The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on,” *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 2, pp. 581-585, 2006.
- [45] D. P. Clark and N. J. Pazdernik, *Recombinant DNA Technology*. 2016.
- [46] G. Lear *et al.*, “Methods for the extraction , storage , amplification and sequencing of DNA from environmental samples,” vol. 42, 2018.
- [47] R. Martins, J. A. Queiroz, and F. Sousa, “A new affinity approach to isolate *Escherichia coli* 6S RNA with histidine-chromatography,” *J. Mol. Recognit.*, vol. 23, no. 6, pp. 519-524, 2010.
- [48] A. Afonso, P. Pereira, J. A. Queiroz, Â. Sousa, and F. Sousa, “Purification of pre-miR-29 by a new O-phospho-l-tyrosine affinity chromatographic strategy optimized using design of experiments,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1343, pp. 119-127, 2014.
- [49] R. Martins, J. A. Queiroz, and F. Sousa, “Histidine affinity chromatography-based methodology for the simultaneous isolation of *Escherichia coli* small and ribosomal RNA,” *Biomed. Chromatogr.*, vol. 26, no. 7, pp. 781-788, 2012.
- [50] P. Pereira, Â. Sousa, J. Queiroz, A. Figueiras, and F. Sousa, “New approach for purification of pre-miR-29 using lysine-affinity chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1331, pp. 129-132, 2014.
- [51] R. Martins, C. J. Maia, J. A. Queiroz, and F. Sousa, “A new strategy for RNA isolation from eukaryotic cells using arginine affinity chromatography,” *J. Sep. Sci.*, vol. 35, no. 22, pp. 3217-3226, 2012.
- [52] F. Sousa, C. Cruz, and J. A. Queiroz, “Amino acids-nucleotides biomolecular recognition: From biological occurrence to affinity chromatography,” *J. Mol. Recognit.*, vol. 23, no. 6, pp. 505-518, 2010.
- [53] R. Scott, *Principles and practice of chromatography, Series: The Instant Chromatography Reference Library*. Library4Science, 2003.
- [54] I. . Rosenberg, *Protein Analysis and Purification*. Boston, MA: Birkhäuser Boston, 1996.
- [55] U. G. P. J. Curling, “Process Chromatography: Five Decades of Innovation.”
- [56] J.-C. Janson and L. Rydén, *Protein purification : principles, high-resolution methods, and applications*. Wiley, 1998.
- [57] F. Sousa, L. Passarinha, and J. A. Queiroz, “Biomedical application of plasmid DNA in

- gene therapy : A new challenge for chromatography,” *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, vol. 26, pp. 83-116, 2009.
- [58] F. Sousa, D. M. F. Prazeres, and J. A. Queiroz, “Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA,” *Trends Biotechnol.*, vol. 26, pp. 518-525, 2008.
- [59] A. J. Ninfa, D. P. Ballou, and M. Benore, *Fundamental laboratory approaches for biochemistry and biotechnology*. John Wiley, 2010.
- [60] G. N. M. Ferreira, G. A. Monteiro, D. M. F. Prazeres, and J. M. S. Cabral, “Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications,” *TIBTECH*, vol. 18, pp. 380-388, 2000.
- [61] G. Xindu and W. Lili, “Liquid chromatography of recombinant proteins and protein drugs,” *J. Chromatogr. B*, vol. 866, pp. 133-153, 2008.
- [62] D. S. Hage, “Affinity chromatography: a review of clinical applications.,” *Clin. Chem.*, vol. 45, no. 5, pp. 593-615, 1999.
- [63] F. Sousa, C. T. Tomaz, D. M. F. Prazeres, and J. A. Queiroz, “Separation of supercoiled and open circular plasmid DNA isoforms by chromatography with a histidine-agarose support,” *Anal. Biochem.*, vol. 343, no. 1, pp. 183-185, 2005.
- [64] C. Rods and C. S. Media, “Continuous Rods of Macroporous Polymer as High-Performance Liquid,” pp. 820-822, 1992.
- [65] L. Vidal, M. Riekkola, and A. Canals, “Ionic liquid-modified materials for solid-phase extraction and separation : A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 715, pp. 19-41, 2012.
- [66] M. G. Freire, F. M. Cla, A. P. Coutinho, and I. M. Marrucho, “Chem Soc Rev Aqueous biphasic systems : a boost brought about by using ionic liquids,” *Chem. Soc. Rev*, vol. 41, pp. 4966-4995, 2012.
- [67] D. W. Armstrong, L. He, and Y. Liu, “Examination of Ionic Liquids and Their Interaction with Molecules , When Used as Stationary Phases in Gas Chromatography,” *Anal. Chem*, vol. 71, pp. 3873-3876, 1999.
- [68] S. Sowmiah, V. Srinivasadesikan, M. C. Tseng, and Y. H. Chu, *On the chemical stabilities of ionic liquids*, vol. 14, no. 9. 2009.
- [69] L. Brown and M. J. Earle, “Ionic Liquid-Liquid Chromatography: A New General Purpose Separation Methodology,” *Top Curr Chem*, 2017.
- [70] Ł. Justyna, M. Paszkiewicz, A. Krukowska, A. Malankowska, and A. Zaleska-medynska, “Ionic liquids for nano- and microstructures preparation . Part 1 : Properties and multifunctional role,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 230, pp. 13-28, 2016.
- [71] N. V Plechkova and K. R. Seddon, “Applications of ionic liquids in the chemical industry,” *Chem. Soc. Rev*, vol. 37, pp. 123-150, 2008.
- [72] X. Shi, L. Qiao, and G. Xu, “Recent development of ionic liquid stationary phases for liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1420, pp. 1-15, 2015.
- [73] H. Qiu, A. K. Mallik, T. Sawada, and H. Ihara, “New surface-confined ionic liquid stationary phases with enhanced chromatographic selectivity and stability by co-

- immobilization of polymerizable anion and cation pairs," *Chem. Commun.*, vol. 48, pp. 1299-1301, 2012.
- [74] D. Han and K. H. Row, "Recent Applications of Ionic Liquids in Separation Technology," *Molecules*, vol. 15, pp. 2405-2426, 2010.
- [75] S. P. M. Ventura, F. A. e Silva, M. V. Quental, D. Mondal, M. G. Freire, and J. A. P. Coutinho, "Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends," *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 10, pp. 6984-7052, 2017.
- [76] H. Qiu, L. Wang, X. Liu, and S. Jiang, "Preparation and characterization of silica confined ionic liquids as chromatographic stationary phases through surface radical chain-transfer reaction," *Analyst*, vol. 134, pp. 460-465, 2009.
- [77] W. Bi, J. Zhou, and K. H. Row, "Separation of xylose and glucose on different silica-confined ionic liquid stationary phases," *Anal. Chim. Acta*, vol. 677, pp. 162-168, 2010.
- [78] L. Qiao *et al.*, "Development and evaluation of new imidazolium-based zwitterionic stationary phases for hydrophilic interaction chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1286, pp. 137-145, 2013.
- [79] M. Zhang, J. Chen, T. Gu, H. Qiu, and S. Jiang, "Novel imidazolium-embedded and imidazolium-spaced octadecyl stationary phases for reversed phase liquid chromatography," *Talanta*, vol. 126, pp. 177-184, 2014.
- [80] M. Sun, J. Feng, X. Wang, L. Li, H. Duan, and C. Luo, "Dicationic imidazolium ionic liquid modified silica as a novel reversed-phase / anion-exchange mixed-mode stationary phase for high-performance liquid chromatography," *J. Sep. Sci.*, vol. 37, pp. 2153-2159, 2014.
- [81] K. Huang, X. Han, X. Zhang, and D. W. Armstrong, "PEG-linked geminal dicationic ionic liquids as selective, high-stability gas chromatographic stationary phases," *Anal Bioanal Chem*, vol. 389, pp. 2265-2275, 2007.
- [82] J. Chang, W. Ho, I. Sun, Y. Tung, M. Tsui, and T. Wu, "Synthesis and characterization of dicationic ionic liquids that contain both hydrophilic and hydrophobic anions," *Tetrahedron*, vol. 66, pp. 6150-6155, 2010.
- [83] M. Sun, H. Qiu, L. Wang, X. Liu, and S. Jiang, "Poly (1-allylimidazole) -grafted silica, a new specific stationary phase for reversed-phase and anion-exchange liquid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, pp. 3904-3909, 2009.
- [84] X. Li and Z. Zhou, "Enantioseparation performance of novel benzimido- B - cyclodextrins derivatized by ionic liquids as chiral stationary phases," *Anal. Chim. Acta*, vol. 819, pp. 122-129, 2014.
- [85] L. Wang *et al.*, "Spherical B-cyclodextrin-silica hybrid materials for multifunctional chiral stationary phases," *J. Chromatogr. A*, vol. 1383, pp. 70-78, 2015.
- [86] R. Wang, T. Ong, and S. Ng, "Synthesis of cationic B-cyclodextrin derivatives and their applications as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography

- and supercritical fluid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1203, pp. 185-192, 2008.
- [87] Y. Wang, Q. Deng, G. Fang, M. Pan, Y. Yu, and S. Wang, “A novel ionic liquid monolithic column and its separation properties in capillary electrochromatography,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 712, pp. 1-8, 2012.
- [88] Y. Li, L. Qi, Y. Shen, H. Zhang, and H. Ma, “Facile Fabrication of Polymeric Ionic Liquid Grafted Porous Polymer Monolith for Mixed-Mode High Performance Liquid Chromatography,” *Chin. J. Chem*, vol. 32, pp. 619-625, 2014.
- [89] C. Eduardo, D. Nazario, and F. M. Lanças, “Suportes cromatográficos e fases estacionárias para cromatografia líquida : preparo , evolução e tendências,” no. January 2013, 2015.
- [90] Martins J, “Novas estratégias de purificação de RNAs usando líquidos iônicos,” 2017. Tese de Mestrado
- [91] G. W. Meindersma, M. Maase, and A. B. De Haan, “Ionic Liquids,” *Ullmann’s Encycl. Ind. Chem.*, 2012.

