



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Recuperação de microRNA através de Partículas Magnéticas

Joana Margarida Teixeira Pinto

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

Orientador: Prof. Doutora Fani Sousa
Co-orientadora: Prof. Doutora Cecília Roque

Covilhã, outubro de 2017

Para as pessoas mais importantes na minha vida
Os meus pais

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Fani Sousa por proporcionar o desenvolvimento deste projeto. Agradeço também toda a dedicação, disponibilidade e conhecimento que me transmitiu, bem como todas as críticas e sugestões feitas durante este ano, muito importantes para chegar aqui. Devo também um agradecimento à minha co-orientadora, a Professora Doutora Cecília Roque, por possibilitar a realização deste projeto bem como, a sua orientação e preocupação para que tudo corre-se pelo melhor em especial durante o tempo que estive na FCT da Universidade Nova de Lisboa.

O meu obrigada especial à Patrícia Pereira por todo o conhecimento, experiência e ajuda ao logo deste ano. Pelo apoio em todos os momentos, até à distância, e por tornares o dia-a-dia no laboratório muito mais fácil pela tua boa disposição. Disseste-me um dia que agora era “uma menina do RNA” e que por isso tinha que me portar bem, espero nunca ter desiludido a Rainha do RNA. Obrigada por todas as conversas, das mais científicas às mais ditas banais, mas todas foram muito importantes neste último ano. Um obrigada também especial ao Augusto Pedro, pela sua capacidade de transmitir o seu vasto conhecimento de forma simples e por permitir aos mais novos bons momentos de conversa e descontração.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório, em particular à Joana Valente por todo o apoio e conhecimento que me transmitiu, especialmente, durante o tempo que estivemos na FCT. Gostaria também de agradecer aos meus colegas de laboratório na FCT, em especial à Ana Pina e ao Gonçalo Abrantes pela forma como me receberam, por todo o conhecimento transmitido e disponibilidade que tiveram comigo durante a minha breve passagem pela FCT.

Aos que começaram por ser colegas de laboratório, mas que agora são amigos fantásticos, os meus “Milos”, Maria Barreira, João Martins, Pedro Almeida e Joel Alves. Obrigada por me ajudarem neste último ano, quer na realização deste projeto quer no apoio e incentivo dado. Todas as horas que passamos juntos no laboratório, em cafés e em casa uns dos outros tornaram esta experiência muito melhor. Muito Obrigada Milos!!!

Não podia deixar de agradecer aos amigos que a Faculdade me deu, um especial obrigada à Sofia Oliveira, Carolina Ribeiro, Daniela Correia e Daniela Rafain por todo o apoio, carinho e boa disposição ao longo destes anos.

Aos amigos de sempre que não sabem bem o que faço, nem sabem bem para o que dá o meu obrigada por todo o apoio e boa disposição. Dizem que os amigos são a família que escolhemos, vocês fazem parte da minha.

Aos meus, em especial aos meus pais, por todo carinho, incentivo, sacrifícios e paciência que tiveram comigo ao longo destes anos de Faculdade. Sem vocês nada disto seria possível. Obrigada por tudo, obrigada por acreditarem em mim.

Em último lugar, a ti Covilhã! Cidade para onde nunca quis vir estudar, mas quis o destino que passa-se aqui os meus últimos 6 anos. Obrigada por me teres dado as melhores pessoas para esta etapa e por todos os bons e maus momentos aqui passados.

Resumo

O conceito de utilizar moléculas de RNA como agentes terapêuticos é relativamente novo, e a sua concretização requer a preparação de RNA em grande quantidade, mantendo a sua integridade, pureza e atividade biológica. Assim, torna-se cada vez mais imperativo o desenvolvimento de novas metodologias de recuperação do RNA cada vez mais eficientes, robustas e seletivas. Independentemente da origem do RNA, as fases de recuperação/isolamento e purificação desta biomolécula são de particular relevância e são cruciais para a obtenção de RNA biologicamente ativo e quimicamente estável.

No presente trabalho, a bactéria *Rhodovulum sulfidophilum* DSM 1374 foi utilizada como hospedeiro recombinante para a produção de RNA, uma vez que apresenta várias vantagens, como a secreção diferencial de ácidos nucleicos durante o crescimento celular e a ausência de RNases. Para a recuperação do RNA presente no meio de cultura de *R. sulfidophilum*, mantendo a sua estabilidade, foi proposta uma estratégia baseada na utilização de nanopartículas magnéticas (MNP). Esta estratégia apresenta-se como mais vantajosa em relação a outras metodologias aplicadas, uma vez que com a secreção do RNA, o nível de contaminantes é inferior ao encontrado num extrato intracelular, o que facilita o processo de uma forma global. Por outro lado, a recuperação dos RNAs a partir do meio de fermentação poderá ser uma abordagem promissora, já que é evitada a utilização de sais e solventes orgânicos tipicamente necessários em processos convencionais de recuperação de RNA. No geral, é proposto o desenvolvimento de um método económico e rápido para a recuperação de moléculas de RNA funcionais com qualidade e atividade biológica.

Neste âmbito, as MNPs foram usadas como meio de captura do RNA pois são fáceis de utilizar e permitem uma operação numa vasta gama de condições. As interações entre o RNA e as MNPs revestidas com o polímero dextrano foram as primeiras a serem investigadas, de maneira a saber em que condições as interações inespecíficas eram minimizadas, de forma a explorar a especificidade da interação do RNA com os ligandos usados na funcionalização das partículas. Verificou-se que com 1,5 M de sulfato de amónio a pH 7,5 a percentagem de ligação era a mais baixa. Após este estudo inicial, as MNP foram funcionalizadas com diferentes aminoácidos ou derivados (arginina, agmatina, histidina, metionina e tirosina). Os resultados obtidos permitiram concluir que, o método utilizado para a funcionalização das MNP com os aminoácidos, deve ser otimizado, de modo a aumentar a densidade de ligando e, assim, aumentar a ligação do RNA às MNP. Como a estratégia de ligação com 1,5 M de sulfato de amónio em 10 mM de tampão Tris-HCl, a pH 7,5 e a variação da concentração das MNPs de 10 mg/mL para 30 mg/mL, não se traduziu num aumento significativo da ligação do RNA às MNP a estratégia foi alterada, sendo explorada a possibilidade de utilizar as MNPs revestidas para captura de RNA total ao invés de explorar a seletividade.

Assim, as MNP revestidas com dextrano foram testadas relativamente à captura de RNA a partir de meios de fermentação de *R. sulfidophilum* suplementado com RNA, de maneira a avaliar o comportamento das MNP com os componentes do meio. Como a percentagem de ligação foi relativamente baixa e, sabendo que durante o processo de fermentação há consumo de nutrientes e libertação de metabolitos para o meio, a estratégia seguinte consistiu na avaliação do comportamento de ligação em amostras reais de fermentação. A primeira abordagem conduziu a uma captura de 10,6% de RNA, mas após otimização da força iónica do meio, a captura foi significativamente aumentada. Assim, ajustando a força iónica do meio para 1,5 M de sal foi recuperado 12,3% do RNA e um aumento da força iónica para 3 M conduziu a uma recuperação de 30,2%. Estes resultados são muito relevantes uma vez que, a suplementação do meio é um recurso viável tornando possível a captura de uma biomolécula com um crescente interesse por parte da indústria.

De uma forma geral, este estudo preliminar permitiu concluir que com altas concentrações molares as percentagens de ligação são mais elevadas e que no futuro deve ser testado um novo método de funcionalização das MNP de maneira a aumentar a ligação e posteriormente, uma possível seletividade das MNPs para RNAs específicos.

Palavras-chave

Aminoácidos, Nanopartículas Magnéticas, RNA, *R. sulfidophilum*

Abstract

The concept of using RNA molecules as therapeutic agents is relatively new, and their implementation requires the preparation of RNA in large quantity, maintaining its integrity, purity and biological activity. Thus, it is becoming more and more imperative to develop new, more efficient, robust and selective RNA recovery methodologies. Regardless of the origin of the RNA, the recovery/isolation and purification stages of this biomolecule are of particular relevance, being crucial for obtaining biologically active and chemically stable RNA.

In the present work, the bacterium *Rhodovulum sulfidophilum* DSM 1374 was used as a recombinant host for RNA production, since it has several advantages, such as the differential secretion of nucleic acids during cell growth and the absence of RNases. For the recovery of the RNA present in the culture medium of *R. sulfidophilum*, maintaining its stability, a strategy based on the use of magnetic nanoparticles (MNP) was proposed. This strategy is more advantageous in relation to other applied methodologies, since with RNA secretion, the level of contaminants is lower than that found in an intracellular extract, which facilitates the process in a global way. On the other hand, the recovery of the RNAs from the fermentation medium may be a promising approach, since the use of organic salts and solvents typically required in conventional RNA recovery processes is avoided. In general, it is proposed the development of an economical and fast method for the recovery of functional RNA molecules with quality and biological activity.

In this context, MNPs were used as an RNA capture medium because they are easy to use and allow operation in a wide range of conditions. The interactions between RNA and MNPs coated with the polymer dextran were the first to be investigated, in order to know under what conditions the nonspecific interactions were minimized, allowing to explore the specificity of the RNA interaction with the ligands used in the functionalization of particles. It was found that with 1.5 M of ammonium sulfate at pH 7.5 the binding percentage was the lowest. After this initial study, the MNP were functionalized with different amino acids or derivatives (arginine, agmatine, histidine, methionine and tyrosine). The results obtained allowed us to conclude that the method used to functionalize MNPs with amino acids should be optimized in order to increase the ligand density and thus increase the binding of RNA to MNP. As the binding strategy with 1.5 M ammonium sulfate at pH 7.5 and the concentration variation of the MNPs from 10 mg/mL to 30 mg/mL did not translate into a significant increase in RNA binding with MNP the strategy was altered, being explored the possibility of using the coated MNPs to capture total RNA instead of exploring the selectivity.

Thus, dextran-coated MNPs were tested for RNA capture from *R. sulfidophilum* fermentation media supplemented with RNA in order to evaluate the behavior of MNPs with the media

components. As the percentage of binding was relatively low and, knowing that during the fermentation process there is nutrient consumption and release of metabolites into the medium, the following strategy consisted on evaluating the binding behavior in real fermentation samples. The first approach led to a 10.6% capture of RNA, but after optimization of the ionic strength of the medium, capture was significantly increased. Thus, by adjusting the ionic strength of the medium to 1.5 M salt was recovered 12.3% of the RNA and an increase in the ionic strength to 3 M led to a recovery of 30.2%. These results are very relevant since the supplementation of the medium is a viable resource making possible the capture of a biomolecule with a growing interest on the part of the industry.

In general, this preliminary study allowed to conclude that with high molar concentrations the percentages of binding are increased and that in the future a new method of functionalization of MNPs must be tested in order to increase the binding and later, a possible selectivity of MNPs for specific RNAs.

Keywords

Amino Acids, Magnetic Nanoparticles, RNA, *R. sulfidophilum*

Índice

Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Acrónimos	xvii
Comunicações em formato de poster	xix
Capítulo 1 - Introdução	1
1.RNA	1
1.1 Funções e Aplicações do RNA	2
1.2 RNAs Codificantes.....	4
1.3 RNAs não codificantes.....	5
1.3.1 Pequenos RNAs interferentes.....	6
1.4 Métodos de obtenção de RNA.....	8
1.5 Nanopartículas Magnéticas (MNP).....	10
1.5.1 Propriedades das MNP	11
1.5.2 Aplicações, vantagens e desvantagens das MNP	12
1.5.3 Síntese das MNP.....	13
1.5.4 Funcionalização das MNP.....	15
Capítulo 2 - Objetivo	17
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	19
3.1 Materiais.....	19
3.2 Métodos.....	19
3.2.1 Cultura de <i>R. sulfidophilum</i> e <i>E. coli</i>	19
3.2.2 Produção de pre-miR-29b em <i>R. sulfidophilum</i> e <i>E. coli</i> DH5α	20
3.2.3 Extração de RNA a partir de <i>R. sulfidophilum</i> e <i>E. coli</i> DH5α.....	20

3.2.4 Eletroforese em gel de agarose.....	21
3.3 Síntese de Nanopartículas Magnéticas	21
3.3.1 Primeiro Revestimento de Sílica (SiO ₃)	22
3.3.2 Segundo Revestimento de Sílica (TEOS)	22
3.3.3 Revestimento de Dextrano.....	22
3.3.4 Epóxi-ativação das nanopartículas magnéticas	23
3.3.4.1 Epóxi-ativação com Glymo	23
3.3.4.2 Epóxi-ativação com Epiclorohidrina	23
3.3.5 Funcionalização com os Aminoácidos	24
3.4 Quantificação dos grupos enxofre através da técnica ICP	24
3.5 Teste das Nanopartículas magnéticas em diferentes condições de ligação e eluição	24
Capítulo 4 - Resultados e Discussão	27
4.1 Caracterização das Nanopartículas Magnéticas Sintetizadas.....	27
4.1.1 Caracterização das MNP revestidas com Dextrano	27
4.1.1.1 Espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDX).....	27
4.1.1.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	28
4.1.1.3 Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES)	29
4.1.2 Caracterização das MNP funcionalizadas com os aminoácidos	31
4.1.2.1 Espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDX).....	31
4.1.2.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	32
4.2 Avaliação da ligação/eluição do RNA às MNPs.....	33
4.2.1 Nanopartículas Magnéticas revestidas com Dextrano	34
4.2.2 Nanopartículas Magnéticas funcionalizadas com os Aminoácidos.....	37
4.2.3 Captura de RNA a partir de meios de cultura de <i>R. sulfidophilum</i>	39
Capítulo 5 - Conclusão e Perspetivas Futuras	43
Capítulo 6 - Bibliografia	45

Lista de Figuras

Figura 1- Esquema da biossíntese do RNA pela <i>R. sulfidophilum</i>	10
Figura 2- Esquema geral representativo da síntese das nanopartículas magnéticas (MNP).	23
Figura 3 - Esquema dos testes realizados com as MNP nas diferentes condições.	25
Figura 4 - Percentagem da massa molar dos diferentes constituintes presentes nas MNP com os sucessivos revestimentos das partículas.	27
Figura 5 - Resultados do diâmetro hidrodinâmico (nm) das MNP ao longo dos revestimentos. Todas as amostras foram preparadas com uma concentração de 0,05 mg/mL em água Milli-Q.	28
Figura 6 - Percentagem da massa molar dos diferentes constituintes presentes nas MNP funcionalizadas com os diferentes aminoácidos.	31
Figura 7 - Resultados do diâmetro hidrodinâmico (nm) das MNP funcionalizadas com os aminoácidos. Todas as amostras têm uma concentração de 0,05 mg/mL em água Milli-Q.	32
Figura 8 - Resultados do potencial zeta (mV) das MNP iniciais, com os diferentes revestimentos e funcionalizadas com os aminoácidos. Todas as amostras foram preparadas com uma concentração de 0,05 mg/mL em água Milli-Q.	33
Figura 9 - Percentagem de ligação e eluição do RNA às MNPs revestidas com dextrano a pH 8. Ligação: (1) 10 mM de Tris-HCl; (2) 3 M de Sulfato de Amônio em 10mM de tampão Tris-HCl; Eluição: (1) 2 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl; (2) 10 mM de Tris-HCl. [MNP]= 10 mg/mL.	35
Figura 10 - Percentagem de ligação e eluição do RNA às MNPs revestidas com dextrano. Ligação: 10 mM de Tris-HCl; Eluição: 2 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl. [MNP]= 10 mg/mL.	36
Figura 11 - Percentagem de ligação e eluição do RNA às MNPs revestidas com dextrano. Ligação: Sulfato de Amônio em 10 mM de tampão Tris-HCl; Eluição:10 mM de Tris-HCl. [MNP]= 10 mg/mL.	36
Figura 12 - Percentagem de ligação e eluição do RNA às MNPs funcionalizadas com os aminoácidos Arginina, Agmatina, Metionina e Histidina com [MNP] de 10 mg/mL e 30 mg/mL. Ligação: 1,5 M de Sulfato de Amônio em 10 mM de tampão Tris-HCl a pH 7,5; Eluição: 10 mM de Tris-HCl a pH 7,5.	37
Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose das amostras obtidas nos passos de ligação e eluição com [MNP]= 10 mg/mL. Ligação: meio de fermentação da <i>R. sulfidophilum</i> suplementado com RNA; Eluição:10 mM de Tris-HCl a pH 7,5. M: meio de fermentação da <i>R. sulfidophilum</i> ; M RNA: meio de fermentação da <i>R. sulfidophilum</i> suplementado com RNA; I: Incubação; L1,L2,L3,L4 e L5: Ligação; E1,E2,E3,E4 e E5: Eluição após precipitação com etanol 100%.	40
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose das amostras obtidas nos passos de ligação e eluição com [MNP]= 30 mg/mL. Ligação: meio de fermentação da <i>R. sulfidophilum</i> suplementado com RNA; Eluição:10 mM de Tris-HCl a pH 7,5. M RNA: meio de fermentação da <i>R. sulfidophilum</i>	

suplementado com RNA I: Incubação; L1, L2 e L3: Ligação; E1, E2 e E3: Eluição após precipitação com etanol 100%. 40

Figura 15 - Percentagem de ligação e eluição do RNA às MNPs revestidas com dextrano e com [MNP]= 10 mg/mL (1) Ligação: meio de fermentação da *R. sulfidophilum* após 40h; Eluição: 10 mM de Tris-HCl a pH 7,5. (2) e (3) Ligação: meio de fermentação da *R. sulfidophilum* após 40 horas suplementado com uma solução de sulfato de amônio em que a concentração final foi 1,5 M e 3 M, respectivamente. 41

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Moléculas de RNA com envolvimento terapêutico. Adaptado de Martins e colaboradores (2014)[2].	2
Tabela 2 - Resultados obtidos da determinação da concentração do Ferro (Fe) e do Enxofre (S) por ICP, nas amostras de MNPs epóxi-ativadas com Glymo e Epiclorohidrina, com e sem funcionalização com metionina.	29
Tabela 3 - Avaliação da funcionalização das MNPs, com determinação da razão entre o Enxofre (S) e o Ferro (Fe) presentes nas amostras.	30
Tabela 4 - Condições de Ligação/Eluição testadas nas MNPs.....	33

Lista de Acrónimos

3' UTR	Extremidade 3' não traduzida
Agm	Agmatina
AGO	Proteína Argonaute
Arg	Arginina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO ₆₀₀	Densidade ótica a 600 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
gDNA	DNA genómico
His	Histidina
iRNA	RNA interferente
LB	“Luria-Bertani”
lncRNA	RNA não codificante longo
Met	Metionina
miRNA	Micro RNA
MNP	Nanopartículas Magnéticas
mRNA	RNA mensageiro
ncRNA	RNA não codificante
piRNA	PIWI-RNA
Pre-miRNA	Precursor do miRNA
Pri-miRNA	miRNA primário
RISC	Complexo de proteínas responsável por silenciar o RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
rRNA	RNA ribossomal
<i>R. sulfidophilum</i>	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i>
shRNA	RNA de hairpin curto
sRNA	Pequeno RNA
siRNA	Pequeno RNA de interferência
snRNA	Pequeno RNA não codificante
snoRNA	Pequeno RNA nucleolar
T	Timina
TAE	Ácido tris acético
TB	“Terrific Broth”
TEOS	Ortosilicato de tetraetilo
Tir	Tirosina
tRNA	RNA de transferência
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
U	Uracilo

Comunicações em formato de poster

I. Could it be possible to quickly determine the best ligands?

J.M. Pinto¹, J.F.A. Valente¹, A.S. Pina², P. Pereira³, J.A. Queiroz¹, A.C.A. Roque², F. Sousa¹
II International Congress in Health Sciences Research. Covilhã, Portugal

II. Recovery of recombinant microRNAs with modified magnetic nanoparticles

J.M. Pinto¹, G.A. Figueiró², J.F.A Valente¹, A.S. Pina², P. Pereira³, J.A. Queiroz¹, A.C.A. Roque², F. Sousa¹
XII Annual CICS-UBI Symposium 2017. Covilhã, Portugal

Capítulo 1 - Introdução

1. RNA

O RNA é uma molécula identificada desde o final dos anos de 1800 mas, a sua importância no funcionamento das células, esteve durante muito tempo na sombra do DNA e das proteínas[1]. Depois de 1950, quando se estabeleceu a estrutura molecular do DNA, foi sugerido que o RNA seria uma molécula intermediária no fluxo de informação entre DNA e proteínas. Mais tarde, isso foi demonstrado experimentalmente e revelado que, durante a expressão gênica, o DNA é copiado numa molécula de RNA mensageiro (mRNA), que é então traduzido para proteínas com a ajuda de outras moléculas de RNA, como RNA de transferência (tRNA) e RNAs ribossômicos (rRNAs) [1].

Estruturalmente, o RNA está organizado numa longa cadeia de monofosfatos de ribonucleótidos, mas é similar ao DNA em vários aspetos. O RNA compartilha as mesmas unidades químicas que o DNA, no entanto, existem duas diferenças fundamentais que distinguem o DNA do RNA. O RNA tem o nucleótido uracilo (U) em vez do nucleótido timina (T) e o grupo ribose 2'-OH presente nos nucleótidos do RNA está ausente no DNA. Consequentemente, a desoxirribose no DNA é menos reativa por causa das ligações C-H, o que leva a uma maior resistência do DNA à hidrólise alcalina [2].

Assim, até há pouco tempo, o RNA e as suas funções eram negligenciados em comparação com o DNA ou proteínas [3]. A noção de que os RNAs são muito mais do que as moléculas envolvidas no armazenamento/transferência de informações surgiu com a descoberta das ribozimas, moléculas de RNA que possuem, como as proteínas, papéis ativos, como catalisadores de reações químicas nas células [1]. Por isso, o RNA é agora conhecido por desempenhar muitos outros papéis funcionais e por ser responsável em muitos processos biológicos essenciais [3].

Ao longo das últimas décadas, a hipótese de utilizar RNA como estratégia terapêutica tem vindo a ganhar relevância, na perspectiva de alcançar tratamentos inovadores e eficazes para patologias consideradas incuráveis. Embora tenha sido conhecido desde 1990 que os ácidos nucleicos podem ser usados para modular a produção de proteínas *in vivo*, a administração terapêutica de RNA foi limitada por uma série de fatores. O RNA simples é propenso à degradação por nucleases, pode ativar o sistema imunológico, é muito grande e está carregado negativamente, tornando-se um problema quando tem que atravessar a membrana celular. Deve, portanto, ser provido de meios adicionais de entrada na célula e também garantir o escape dos endossomas [4].

1.1 Funções e Aplicações do RNA

As terapêuticas baseadas em RNA podem ser classificadas pelo mecanismo de atividade e incluem inibidores da tradução do mRNA (anti-sense), agentes de iRNA, moléculas de RNA cataliticamente ativas (ribozimas) e RNAs que se ligam a proteínas e outros ligandos moleculares (Aptamers) (tabela 1) [5].

Tabela 1 - Moléculas de RNA com envolvimento terapêutico. Adaptado de Martins e colaboradores (2014) [2].

Tipo de RNA	Função Celular	Conceito Terapêutico	Ref.
Codificante mRNA	Códigos de proteína	Vacinação	[6]
Não Codificante rRNA	Translação	Alvo do antibiótico	[7]
tRNA	Translação Regulação da apoptose	Compreender doenças humanas	muitas [8, 9]
snRNA	<i>Splincing</i> e outras funções	Compreender doenças humanas	muitas [10]
snoRNA	Modificação de nucleotídeos do RNA	Compreender doenças humanas	muitas [11]
Antisense RNA	Atenuação da transcrição; Degradação ou estabilização do mRNA; bloco de tradução	Inibição da tradução do mRNA	[12, 13]
miRNA	Clivagem do mRNA Repressão de tradução	Silenciamento de genes	[14, 15]
siRNA	Clivagem do mRNA Repressão de tradução	Silenciamento de genes	[16, 17]
ribozimas	Enzima do RNA Catalisa a clivagem do RNA e as reações de ligação	Reprogramação e reparação do mRNA	[18]
“Riboswitch”	Regular a expressão genética ligando-se a pequenos metabolitos	Regular a expressão genética; Alvo dos medicamentos antibacterianos.	[19-21]
Aptameros	Oligoribonucleótido, parte de um “riboswitch”, que se liga a uma molécula alvo específica com alta afinidade	Mecanismo de atração que inibe várias proteínas alvo	[22, 23]

A pesquisa sobre o RNA levou a muitas descobertas biológicas importantes e a melhoria das metodologias terapêuticas. Estudos sistemáticos da estrutura e função do RNA e o estabelecimento de terapias baseadas em RNA, geralmente requerem grandes quantidades do RNA alvo com integridade, pureza e atividade biológica adequadas [24]. Por outro lado, os desafios com a entrega, especificidade, estabilidade e imunogenicidade do RNA promoveram o desenvolvimento e otimização dos sistemas de proteção e entrega de ácido nucleicos sintéticos e naturais e no desenvolvimento de oligonucleótidos modificados quimicamente [5].

O envolvimento generalizado do RNA na regulação de numerosos genes evidenciou o seu vasto potencial terapêutico. Esta característica levou ao surgimento de numerosos tipos de terapêutica baseada em RNA, quer utilizando o RNA como um agente terapêutico ou como alvo terapêutico [3].

O conceito de utilizar moléculas de RNA como agentes terapêuticos é relativamente novo, mas recebeu uma atenção crescente durante a última década [25]. As moléculas de RNA podem adotar uma grande variedade de conformações e executar várias funções celulares. Alguns RNAs dobram-se para formar centros catalíticos, enquanto outros possuem estruturas que lhes permitem estabelecer interações específicas de RNA-RNA, RNA-DNA ou RNA-proteína [25]. Estas competências levaram os investigadores a explorar várias características da biologia e química do RNA para combater várias patologias. Registaram-se progressos significativos para este objetivo e as primeiras terapias baseadas em RNA estão agora a ser avaliadas em ensaios clínicos para o tratamento de doenças que variam do cancro a doenças infecciosas [25].

Os RNAs terapêuticos, que até ao momento receberam uma maior atenção, podem ser agrupados em quatro categorias: inibidores de genes, que induzem alterações nos genes, inibidores de proteínas e RNAs imunoestimuladores [25].

O RNA é instável *in vivo* devido à abundância de ribonucleases no soro e nas células, e as modificações químicas podem melhorar as suas propriedades sem reduzir a atividade. De uma forma geral, as modificações químicas para pequenos RNA interferentes (siRNAs), aptamers, ribozimas, oligonucleótidos anti-sense e miRNAs podem melhorar as propriedades farmacocinéticas (PK), farmacodinâmicas (PD) e reduzir a imunogenicidade [5].

No entanto, para alcançar o sucesso terapêutico, o isolamento e purificação do RNA alvo representam passos críticos devido à sua fácil degradação, que pode prejudicar a estabilidade química e a função biológica. As técnicas atuais para isolar e purificar as moléculas de RNA ainda têm várias limitações e há necessidade de novos métodos capazes de melhorar a qualidade do RNA [2].

1.2 RNAs Codificantes

Entre os diferentes modelos de antígenos avaliados para a vacinação, o RNA mensageiro (mRNA) está a surgir como uma opção particularmente atrativa já que, em 1990, Wolff e colaboradores (1998) descreveram que, após a injeção intramuscular de mRNA codificante de genes repórter, as respetivas proteínas eram detetadas [6, 26].

Desta forma, o mRNA tem sido objeto de estudo em vários trabalhos de investigação básica e aplicada. Nas primeiras décadas após a sua descoberta, o interesse foi na compreensão dos aspetos estruturais e funcionais do mRNA e no seu metabolismo na célula eucariótica [27]. Posteriormente, já na década de 1990, a investigação pré-clínica na área do mRNA teve o seu início em diversas aplicações, incluindo abordagens de substituição de proteínas e vacinação para cancro e doenças infecciosas. O conhecimento que se foi adquirindo permitiu avanços científicos e tecnológicos e assim, foi possível superar alguns dos obstáculos associados à manipulação e utilização do mRNA, nomeadamente relacionados com o seu reduzido tempo de semi-vida e imunogenicidade desfavorável [27].

Existem várias diferenças importantes entre as abordagens terapêuticas baseadas em mRNA e outras terapias baseadas em DNA. O mRNA não precisa de entrar no núcleo para ser funcional uma vez que, quando chega ao citoplasma é imediatamente traduzido. Esta é uma vantagem na utilização desta molécula, relativamente às terapias com DNA que precisam ter acesso ao núcleo para ocorrer a transcrição, e sua funcionalidade depende da passagem através dos poros nucleares. Além disso, as terapias baseadas em mRNA, ao contrário do DNA plasmídico e vetores virais, não se integram no genoma e, portanto, não representam o risco de mutagénese de inserção [27].

O mRNA possui várias características vantajosas que contribuem para a segurança da sua aplicação terapêutica, como por exemplo:

- É uma molécula que não tem sequências de controlo (promotor ou terminador) ou genes de resistência a antibióticos;
- É totalmente metabolizado, sendo que nenhum vestígio do componente administrado permanece no hospedeiro, e a expressão da proteína é transitória;
- Não tem capacidade de desregular persistentemente a expressão de genes endógenos.
- Nenhuma resposta imune anti-RNA (resposta auto-imune) foi descrita [28].

O mRNA pode codificar todos os tipos de proteínas, tem um perfil de segurança favorável e permite a indução de respostas imunes combinadas e assim, o mRNA está a ser utilizado como forma de vacinação para fornecer antígenos ao organismo, com potencial para induzir respostas imunes contra cancro ou doenças infecciosas[6]. O mRNA que codifica os antígenos, assegura a apresentação dos epítomos antigénicos, desencadeando mecanismos de imunidade

inata através de recetores de reconhecimento de padrões expressos por células apresentadoras de antígeno tais como células dendríticas [6].

Considerando o caso em que o mRNA é transcrito *in vitro*, com RNA polimerase de bacteriófagos (T7, T3 ou S6) a partir de modelos de DNA de plasmídeo, diversas modificações podem ser introduzidas na molécula de forma a promover a sua estabilidade, o que poderá igualmente facilitar o processo de produção e purificação [6].

Assim, de uma maneira geral, as abordagens clínicas baseadas na utilização de mRNA podem promover a sua administração direta ou podem recorrer à engenharia de células dendríticas que são posteriormente transferidas [6]. No campo da vacinação terapêutica contra cancro, o mRNA foi alvo de uma extensa investigação pré-clínica e atingiu os testes clínicos de Fase III. Em outras áreas, como as terapias de substituição de proteínas em oncologia, cardiologia, endocrinologia, hematologia, medicina pulmonar ou no tratamento de outras doenças, o desenvolvimento de terapias baseadas em mRNA está no estágio pré-clínico. Para as terapias de substituição de proteínas avançarem, é necessário ainda resolver alguns problemas, como a entrega direcionada do mRNA e a compreensão da sua farmacologia complexa [27].

1.3 RNAs não codificantes

Os RNA não codificantes (ncRNAs) contêm várias classes de RNA que não são transcritos em proteínas, mas para os quais foram identificadas funções importantes na regulação da transcrição, estabilidade ou expressão de proteínas [3]. Como cerca de 75% do genoma humano é transcrito em RNA e apenas 3% é transcrito em mRNAs que codificam proteínas, tudo indica que o número de ncRNAs é potencialmente muito maior do que o de proteínas. Ou seja, os ncRNAs podem representar uma área de estudo interessante para a pesquisa básica, descoberta de biomarcadores e aplicações terapêuticas [3].

Nos últimos anos, tornou-se cada vez mais evidente que o transcriptoma dos mamíferos é altamente complexo e inclui um grande número de pequenos RNAs não codificantes (sncRNAs) e RNAs não codificantes longos (lncRNA). Estes RNAs foram muito estudados e estão envolvidos em vias que conduzem ao silenciamento de genes específicos e à proteção de genomas contra vírus e transposões, por exemplo [1]. No grupo dos sncRNAs, três classes, nomeadamente RNAs de interferência curtos (siRNAs), microRNAs (miRNAs) e PIWI-RNAs (piRNAs), foram muito estudadas na última década, considerando a sua função biológica [1].

1.3.1 Pequenos RNAs interferentes

Em 1998, os RNAs de cadeia dupla foram identificados em primeiro lugar como os efetores de silenciamento para regular funções genéticas em *Caenorhabditis elegans* [26]. Pouco tempo depois, fenômenos semelhantes foram observados também em plantas e mamíferos, o que permitiu descobrir um novo mundo de RNA interferente (iRNA) e iniciou uma revolução na regulação mediada por RNA [26, 29]. Desde então, o iRNA tornou-se rapidamente uma das ferramentas mais poderosas e amplamente utilizadas para o estudo da função genética [29]. De uma forma geral, a tecnologia de interferência pode ser conseguida através da introdução de pequenos RNAs interferentes sintetizados quimicamente (siRNAs) num sistema celular. O iRNA tem sido assim utilizado em biologia molecular para compreensão da função de genes específicos [30].

Paralelamente, o iRNA emergiu como uma ferramenta potencialmente poderosa no tratamento de doenças genéticas e adquiridas, fornecendo siRNA ou miRNA direcionados a genes alvo, resultando no seu silenciamento. No entanto muitas barreiras físico-químicas e biológicas devem ser superadas para obter uma entrega eficiente das moléculas de siRNA e miRNA, no órgão/tecido de interesse, permitindo assim uma terapia eficaz [31].

O iRNA participa em vias de regulação de genes evolutivamente conservadas, que emergiu como uma descoberta importante no campo da biologia molecular [30]. O mecanismo de regulação pós-transcrição do iRNA, que ocorre naturalmente em todas as células eucarióticas, tem como resultado final o bloqueio da tradução, seja pela degradação do mRNA ou pela desativação do processo. Isto pode ser conseguido por um siRNA ou miRNA [32].

Identificados primeiro como reguladores do desenvolvimento larval em nemátodos, os miRNAs são agora conhecidos por desempenhar papéis fundamentais na regulação de quase todos os processos celulares importantes dos eucariotas multicelulares [1]. O que significa que processos como o desenvolvimento celular, proliferação, diferenciação, apoptose e transformação oncogénica estão dependentes e são regulados por miRNAs [1, 33]. O genoma das células humanas codifica mais de 1000 miRNA que regulam 60% de todos os genes codificantes de proteínas [1, 34]. A maioria dos alvos do mRNA contém vários locais de ligação de miRNA e, cada miRNA, pode regular genes múltiplos. Portanto, a desregulação dos níveis de miRNA pode perturbar a expressão de muitos genes, desempenhando assim um papel fundamental na ocorrência de doenças [1].

Efetivamente, a tecnologia baseada em iRNA possui características atrativas, como a alta especificidade, eficiência e capacidade para induzir a inibição robusta e potente dos genes alvo. Além disso, outra vantagem do iRNA em relação a outras terapias é a possibilidade de promover uma ação duradoura, que pode durar de dias até semanas, reduzindo os custos.

Geralmente a dosagem necessária da terapêutica com RNAs não codificantes é baixa, o que pode reduzir ou eliminar a ocorrência de efeitos adversos indesejáveis nos pacientes [31].

Devido ao potencial demonstrado pelo iRNA em inibir a expressão gênica, o uso de siRNA e miRNA tem sido muito estudado em células de mamíferos e espera-se que possa vir a implementar-se como uma nova classe de biofármacos importante e aplicável a diversas doenças [31].

No caso particular dos miRNAs, estes são processados a partir de transcritos expressos de forma endógena, e o mecanismo de silenciamento depende do grau de complementaridade entre a sua sequência e a sequência do mRNA alvo, podendo resultar na inibição da tradução, desestabilização ou degradação do mRNA [30, 35]. A grande maioria dos miRNAs, atualmente identificados, são expressos no cérebro, onde regulam a expressão de uma ampla gama de moléculas alvo, essenciais para desenvolvimento, diferenciação, proliferação, apoptose, metabolismo neuronal e glial [35]. Como um único miRNA consegue regular ao mesmo tempo centenas de mRNAs alvo, o conjunto de genes alvo co-regulados por um miRNA individual, constitui geralmente uma rede biologicamente integrada de moléculas funcionalmente associadas [35].

A biogênese dos miRNAs inclui várias etapas de processamento que envolvem diversas proteínas e complexos proteicos. De uma maneira geral, os miRNAs primários (pri-miRNAs) têm aproximadamente mais de 100 nucleótidos de comprimento e apresentam um ou mais *loops* na sua estrutura. Os pri-miRNAs são transcritos pela RNA polimerase e são processados por um complexo que consiste numa enzima Drosha e uma subunidade DCGR8, em miRNAs precursores (pre-miRNA) de aproximadamente 70 nucleótidos. Os pre-miRNAs são exportados para o citoplasma com a ajuda da proteína exportina 5, um factor de exportação nuclear que se liga aos pre-miRNA processados direta e especificamente [30, 36]. Uma vez no citoplasma ocorre uma segunda clivagem, envolvendo a ação de um complexo que contém a enzima Dicer, TRBP e PACT que converte os pre-miRNAs em miRNA-miRNA* de cadeia dupla (cadeias sense e anti-sense) [36]. A cadeia dupla obtida associa-se à proteína AGO no precursor iRNA-RISC (pré-RISC). A cadeia anti-sense é removida. O complexo RISC, um complexo de proteínas que é responsável por silenciar o RNA alvo, que contém a cadeia anti-sense do miRNA, direciona o complexo para o mRNA alvo e a cadeia anti-sense do miRNA liga-se à extremidade 3' não traduzida (3' UTR), resultando na repressão da tradução [30, 36].

Atualmente, mais de 1800 miRNAs humanos estão registados no miRBase Release 17 (agosto de 2017; www.mirbase.org) e sabe-se que um único miRNA é capaz de se ligar a vários mRNAs alvo, reduzindo em simultâneo a produção de centenas de proteínas. Consequentemente, todo o sistema de miRNA humano regula mais de 60% de todos os genes codificadores de proteínas essenciais para desenvolvimento celular, diferenciação, proliferação, apoptose e metabolismo [35].

1.4 Métodos de obtenção de RNA

Para que a aprovação e comercialização de biofármacos baseados em RNA possa ocorrer, será cada vez mais necessário o desenvolvimento de processos economicamente viáveis para o seu isolamento e purificação, bem como a implementação de metodologias capazes de controlar a sua qualidade [3]. O isolamento e a purificação do RNA são passos críticos devido à relativa instabilidade da molécula, o que pode prejudicar a sua estabilidade química, estrutural e a função biológica, podendo por isso limitar o sucesso da investigação e aplicação do RNA [3].

Devido ao número crescente de estudos estruturais, biofísicos e biomédicos que requerem grandes quantidades de RNA de elevada qualidade, surgiu também uma necessidade generalizada de melhorar a escala de produção e desenvolver esquemas de isolamento e purificação de RNA mais robustos, economicamente viáveis e eficazes. Este reconhecimento pelas indústrias farmacêuticas e biotecnológicas tem reforçado o investimento nestas áreas de investigação [3].

Atualmente, os estudos de silenciamento génico mediado por miRNA são realizados com recurso a RNAs sintetizados quimicamente, através de química de fosfoamidite, normalmente utilizados na síntese de pequenos oligoribonucleótidos [3]. Uma outra abordagem será a sua obtenção por métodos enzimáticos, em que, por exemplo, os RNAs mais longos podem ser produzidos por transcrição *in vitro* utilizando a RNA polimerase T7 [37]. A síntese química é normalmente utilizada em oligoribonucleótidos curtos (<50 nucleótidos), enquanto a transcrição *in vitro* pode produzir RNAs mais longos [3]. Sendo necessário, ocasionalmente, modificações no RNA para obter eficientemente a biomolécula de interesse, como a adição de sequências que permitam a ligação no caso do “scaffold tRNA”, que serão posteriormente removidas através de um tratamento com ribonucleases (RNase), levando a que todo este processo seja inadequado à síntese de RNA com fins farmacêuticos [38]. A transcrição *in vitro* é um procedimento simples que permite a síntese, mediada por um modelo de RNA, de qualquer sequência de oligonucleótidos curtos ou de vários kilobases em quantidades de µg a mg [37]. Baseia-se na engenharia de um modelo que inclui uma sequência promotora do bacteriófago, localizada antes da sequência de interesse. A transcrição é posteriormente realizada através da utilização da RNA polimerase correspondente [37]. Como durante o processo de síntese o produto final de RNA tem impurezas (enzimas, nucleótidos, oligonucleótidos aberrantes, sais ou tampão) este precisa de ser purificado [3].

Um terceiro método de obtenção de RNA, envolve ainda a extração de RNA de matrizes biológicas, como células ou tecidos. Neste caso, o princípio é a rutura das células e subsequente eliminação de contaminantes hospedeiros, como DNA genómico (gDNA) e proteínas, para obter moléculas de RNA intactas e puras [2, 3].

A produção de RNA, para aplicações terapêuticas, também pode ser realizada através da expressão endógena de RNAs, codificados por vetores virais ou plasmídeos em células eucarióticas [38-42]. No entanto, e tendo em conta as potenciais aplicações terapêuticas do RNA, é fundamental desenvolver métodos eficientes para a sua síntese. A utilização de microrganismos recombinantes é uma das estratégias mais promissoras para produzir biomoléculas de interesse, podendo também reduzir custos e continuar a ser altamente eficiente. Até ao momento surgiram algumas estratégias para produzir RNA recombinante estável, designadamente um aptámero de RNA circular, um "scaffold tRNA" e hsamir-27b, recorrendo a bactérias como hospedeiro [38, 42, 43].

A expressão de RNA recombinante pode ser realizada recorrendo principalmente à bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*), uma vez que este microrganismo pode ser cultivado de forma fácil e económica, estando disponíveis diferentes plasmídeos compatíveis [24].

Considerando a produção de RNA em *E. coli*, é necessário considerar um passo subsequente que envolve a lise celular para extrair os ácidos nucleicos. Este processo, que pode ser difícil e demorado, conduz também à recuperação do RNA num extrato complexo que inclui diversos contaminantes. Outro problema associado à lise celular é a libertação de endotoxinas, que pode levar à contaminação da amostra de RNA e, em último caso, pode levar a sintomas de síndrome de choque tóxico se estiver presente em *in vivo* [44, 45].

Como alternativa ao hospedeiro *E. coli*, foi descrita, recentemente, a utilização da bactéria fototrófica marinha *Rhodovulum sulfidophilum* (*R. sulfidophilum*), estando descrita como um hospedeiro atrativo para a produção recombinante de um modelo de RNA artificial e shRNAs [46-48]. Esta bactéria marinha não é patogénica e apresenta várias vantagens em relação à *E. coli*, como a capacidade de secreção de ácidos nucleicos diretamente para meio de cultura e a ausência de RNases do hospedeiro no meio extracelular. A sua capacidade de produzir ácidos nucleicos para o meio extracelular abre novas perspetivas na tecnologia recombinante de RNA, uma vez que a sua estabilidade está mais assegurada [24, 49-51]. O hospedeiro escolhido para a produção do RNA tem importância nos processos posteriores pois, quando o produto de interesse é expresso intracelularmente, os componentes celulares são as principais impurezas [24].

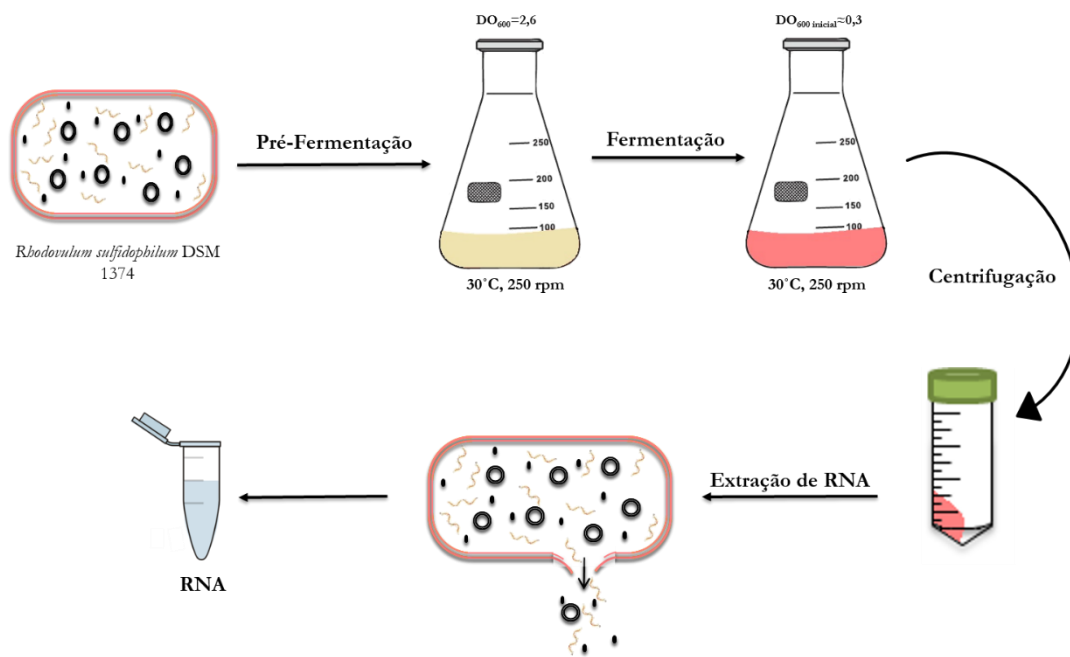


Figura 1- Esquema da biossíntese do RNA pela *R. sulfidophilum*.

1.5 Nanopartículas Magnéticas (MNP)

As nanopartículas magnéticas (MNP) são materiais compostos por elementos magnéticos, como ferro, cobalto e níquel, e apresentam propriedades características como superparamagnetismo, alta coercividade, alta suscetibilidade magnética e baixa temperatura de Curi [52]. As MNP podem ser definidas como um tipo de nanopartícula que pode ser manipulada através de um campo magnético [53]. Embora existam muitas nanopartículas magnéticas, as mais estudadas devido à sua biodegradabilidade, magnetismo, fácil síntese e por estarem disponíveis em muitas formas no meio natural são magnetita (Fe_3O_4), maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e a hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) [53, 54].

Já estão disponíveis no mercado micro e nanopartículas magnéticas tanto na forma simples como ativada, ou com moléculas imobilizadas [55]. No entanto, o preço elevado pode ser o principal obstáculo à sua aplicação biotecnológica na escala real. Recentemente, foram sintetizados diferentes tipos de partículas magnéticas em laboratórios, alguns deles usando procedimentos e materiais muito simples, que podem ser a base de materiais magnéticos novos e economicamente viáveis [55].

As MNP de óxido de ferro podem existir em diferentes formas, como magnetita, maghemite, wüstite, hematita, goethita ou outras combinações, dependendo da razão Fe (II)/Fe (III), que influencia o tamanho, composição, morfologia e propriedades magnéticas das partículas [52]. Estas MNP baseadas em óxido de ferro, são adequadas para as bio-separações devido à fácil

síntese, modificação e manipulação da superfície sob o efeito de íman externo, bem como sua compatibilidade com amostras biológicas [56].

1.5.1 Propriedades das MNP

As MNP, materiais compostos magnéticos, classificados como "materiais inteligentes" ou "materiais sensíveis aos estímulos", são de especial interesse em várias áreas como a biociência, medicina, biotecnologia e tecnologia ambiental, principalmente devido às seguintes propriedades:

- As MNP podem ser removidas seletivamente de amostras complexas utilizando um campo magnético externo, por exemplo, usando um separador magnético apropriado, íman permanente. Esta característica é muito importante para bioaplicações devido ao facto de que a maioria dos materiais biológicos possui propriedades diamagnéticas, que permitem uma separação seletiva eficiente de materiais magnéticos e modificados magneticamente.
- As MNP podem ser direcionadas para o local desejado e mantidas lá com recurso a um campo magnético externo. Estas propriedades podem ser utilizadas para entrega de medicamentos com propriedades magnéticas.
- As MNP podem gerar calor quando submetidas a um campo magnético alternativo; esta característica é utilizada especialmente durante a hipertermia do fluido magnético.
- As MNP geram um contraste T2 negativo durante a ressonância magnética, e assim podem funcionar como agentes de contraste eficientes.
- As MNP podem ser utilizadas para a modificação magnética de materiais biológicos diamagnéticos (por exemplo, células) e a funcionalização magnética de compostos biologicamente ativos [55].

As principais propriedades das partículas magnéticas exploradas intensivamente para aplicações médicas são a biocompatibilidade, a não toxicidade ou acumulação de alto nível no tecido ou órgão alvo [54].

De uma maneira geral, as propriedades estruturais e magnéticas dependem fortemente do tamanho e da forma das nanopartículas, por isso, o método de obtenção das nanopartículas é fundamental para se conseguirem as propriedades desejadas [57]. Para manter o seu superparamagnetismo, as partículas devem ter um diâmetro de núcleo abaixo de 20 nm, mas podem agregar-se em partículas maiores de tamanhos diferentes. Para melhorar a sua aplicabilidade, as MNPs podem ser revestidas com materiais que aumentam a sua seletividade ou afinidade para as moléculas alvo [52].

No caso de aplicação em separação de biomoléculas, as propriedades superparamagnéticas das MNPs permitem uma remoção fácil e seletiva de soluções biológicas viscosa. Para além disso, as partículas magnéticas têm áreas de superfície altamente acessíveis e são suportes não porosos, portanto as bio-separações não estão limitadas pela difusão de poros [58]. Não obstante as vantagens inquestionáveis do uso de separações baseadas em MNP, como baixo custo, velocidade, escalabilidade e compatibilidade com suspensões biológicas complexas, a maioria das aplicações comerciais da tecnologia de separação magnética, até agora, foi em indústrias de argila, minerais e processamento nuclear, bem como tratamento de águas residuais [59].

1.5.2 Aplicações, vantagens e desvantagens das MNP

Com os últimos desenvolvimentos em nanotecnologia, as MNPs podem ser aplicadas para a separação de uma ampla gama de materiais, pois proporcionam várias vantagens em relação a outros métodos de separação disponíveis, incluindo reciclabilidade para múltiplos usos, processo com alto rendimento, baixo custo operacional, alta eficiência, implementação flexível e escalabilidade [52]. Devido a estas características, as MNP são exploradas como suporte para bio-separações magnéticas, bem como no diagnóstico e terapia de várias doenças o que as torna muito atrativas em várias áreas, incluindo Biotecnologia/Biomedicina [52, 59-64].

A técnica de separação magnética é provavelmente um dos processos de separação mais versáteis na biotecnologia, uma vez que é capaz de capturar e/ou purificar células, vírus, proteínas e ácidos nucleicos diretamente de uma amostra [65]. No entanto, devido à alta área de superfície ativa e devido à sua alta relação superfície/volume, as nanopartículas magnéticas têm baixa estabilidade coloidal, resultando nos fenómenos de agregação e floculação das mesmas. Isso produz graves desvantagens quando utilizado em solução como suporte [66].

Isolamento, separação e purificação de vários tipos de compostos biologicamente ativos, xenobióticos e células são utilizados em quase todos os ramos das biociências. Contudo, são necessárias novas técnicas de separação, capazes de tratar soluções diluídas ou soluções que contenham apenas pequenas quantidades das moléculas alvo na presença de grandes quantidades de outros compostos presentes [55]. A separação magnética de compostos alvo tem várias vantagens em comparação com outras técnicas utilizadas para o mesmo propósito. Os compostos alvo podem ser isolados diretamente de amostras em bruto, como sangue, homogeneizados de tecido, meio de cultura, água, etc [55].

Além disso, a separação magnética é fácil de usar sem a necessidade de aparelhos sofisticados, permitindo a operação numa ampla gama de condições [58]. A natureza e as propriedades das partículas têm de ser adequadas para aplicações de bio-separação e devem, idealmente, ser

(i) estáveis nas condições das reações de síntese; (ii) hidrófilas e inertes para evitar interações não específicas; (iii) homogêneas, em forma de esfera e rígidas; (iv) possuir funcionalidade química disponível para modificação adicional; e (v) devem ser estáveis sob as condições de *screening* [65].

No entanto, podem ocorrer problemas inevitáveis associados a partículas na escala nano, tais como a sua instabilidade, tendência intrínseca para formar agregados e sua interação com o meio, muitas vezes de alta força iônica [52]. As forças magnéticas inerentes contribuem para as forças de atração entre as nanopartículas que podem levar à agregação [67]. Além disso, as nanopartículas metálicas não revestidas são quimicamente muito reativas e facilmente oxidadas, geralmente resultando na perda do magnetismo e estabilidade coloidal [52].

1.5.3 Síntese das MNP

Atualmente, estão disponíveis vários métodos para a síntese de MNP e todos têm o objetivo mútuo de produzir partículas descartáveis, estáveis, biocompatíveis e monodispersas [59]. Existem vários métodos para a síntese das partículas magnéticas tais como: decomposição em meio orgânico, co-precipitação, pirólise a laser, decomposição eletroquímica e redução a alta temperatura [57, 68-70]. Dependendo da forma desejada, estabilidade e dispersão das MNPs, o método de síntese é escolhido em conformidade. Para a obtenção de MNPs de alta qualidade, os métodos mais utilizados incluem co-precipitação, decomposição e/ou redução térmica, síntese de micelas, síntese de injeção de fluxo, micro emulsões, síntese sol-gel, hidrólise e termólise de precursores e técnicas de pirólise a laser. A natureza coloidal das MNPs é um desafio principalmente porque a síntese deve levar a uma população monodispersa de partículas magnéticas, com tamanho adequado e de forma reproduzível para produzir grandes quantidades, sem necessidade de procedimentos de purificação complexos [71].

Um dos métodos mais populares é o de síntese por co-precipitação química a partir de uma mistura de sais de ferro (II) e (III), por adição de uma base na forma de amônia aquosa e hidróxido de sódio ou potássio. Este método também é o mais simples, rápido e mais econômico [54]. Além disso, a capacidade de controlar as condições de síntese, como o pH da solução da reação, a temperatura da reação, a velocidade de adição da base, a concentração de solutos e a força iônica da solução da reação, possibilitam controlar o tamanho e a forma das nanopartículas resultantes [54]. As MNPs sintetizadas pelo método de co-precipitação apresentam normalmente diâmetros de aproximadamente 10 nm, mas elas rapidamente se agregam em solução apresentando depois diâmetros de aproximadamente 800 nm [70].

O núcleo das nanopartículas, à base de óxido de ferro, pode ser revestido por materiais inorgânicos (sílica, ouro) ou materiais orgânicos (fosfolípidos, ácidos gordos, polissacarídeos,

péptidos ou outros agentes tensoativos e polímeros) [54]. O revestimento das partículas com uma primeira camada de sílica com silicato de sódio (MNP-Si) permite a obtenção de partículas com diâmetros na ordem dos micrómetros [70]. No entanto, após o revestimento com o ortosilicato de tetraetilo (TEOS) as partículas magnéticas, com dois revestimentos de sílica (MNP-Si-Si), tornam-se mais estáveis e menos agregadas em solução aquosa, o que se traduz em diâmetros de aproximadamente 100-200 nm. Estando já descrito que uma camada de sílica pode ser insuficiente para proteger completamente a superfície das MNPs, a adição de TEOS proporciona um maior teor de sílica quando comparado ao silicato de sódio. A modificação com sílica não só aumenta a dispersão de partículas em solução, mas também melhora a sua resistência contra a lixiviação de ferro em ambientes ácidos [70]. Cada revestimento feito nas nanopartículas tem um objetivo específico. Os revestimentos de sílica permitem que as partículas sejam mais estáveis em condições aquosas (pelo menos se o valor do pH for suficientemente baixo), permite uma fácil modificação subsequente da superfície e um controlo das interações entre partículas [72].

As MNP tendem a ser instáveis em solução, exigindo a modificação da superfície com polímeros para aumentar a estabilidade e funcionalidade coloidais [65]. A estabilização das MNPs pode ser conseguida através do revestimento das partículas, facilmente adicionado durante ou após a síntese das MNP, seja por ligação química ou adsorção física, com uma ou várias camadas de revestimento [52, 59, 73]. Existem vários agentes de revestimento disponíveis com o objetivo de proporcionar suspensões de MNP estáveis, monodispersas e biocompatíveis. Tais revestimentos incluem polímeros naturais, tais como a goma-arábica, o quitosano, o alginato, a heparina, o dextrano ou dextrano carboximetilado, e polímeros sintéticos, incluindo o copolímero de acrílico, aplicado ao produto comercial Nanofer 25S® e copolímeros de triblocos anfífilos, tais como Pluronic F127 e Pluronic F68 [52, 73]. As forças repulsivas do material de revestimento, principalmente por impedimento estereoquímico e forças eletrostáticas equilibram as forças de van der Waals e magnéticas das MNP, e as nanopartículas são estabilizadas em suspensão diminuindo o efeito da aglomeração [65].

Neste trabalho, foi usado o dextrano pois é um polissacarídeo que tem sido utilizado frequentemente como revestimento devido, principalmente à sua biocompatibilidade [70]. Um fator importante na escolha do dextrano é o tamanho favorável das suas cadeias, que permitem o estabelecimento de interações polares (principalmente quelantes e ligações de hidrogénio) com superfícies de óxido de ferro. Embora as ligações de hidrogénio sejam relativamente fracas, a energia de ligação total das ligações de hidrogénio, ao longo do comprimento de uma molécula de polissacarídeo, pode ser muito alta devido ao grande número de grupos hidroxilo por molécula. No entanto, as moléculas de dextrano podem ser removidas da superfície de óxido de ferro por aquecimento a 120 °C ou diluição. A maneira usual de evitar a dessorção do dextrano é usar epicloroidrina, isto é, agentes com capacidades de reticulação [70].

A utilização de um revestimento de dextrano aumenta assim, a estabilidade coloidal e reduz a interação não específica das partículas com outros componentes que possam existir no meio [65, 66].

1.5.4 Funcionalização das MNP

De forma semelhante ao princípio usado na cromatografia de afinidade, várias moléculas biológicas podem ser usadas para funcionalizar partículas magnéticas [58]. A imobilização de enzimas, anticorpos, oligonucleótidos e outros compostos biologicamente ativos é uma estratégia usada na funcionalização de MNPs. Neste contexto, foram desenvolvidas várias formas de conjugação covalente utilizando grupos amina, hidroxilo, carboxilo, aldeído ou tiol expostos na superfície das MNP. Os compostos biologicamente ativos imobilizados em partículas magnéticas podem ser direcionados para o local desejado por ação de um campo magnético externo [55].

Recentemente, o uso de aminoácidos como ligandos imobilizados para cromatografia de afinidade foi explorado e implementado pelo grupo de investigação, como uma metodologia efetiva para a purificação eficiente de diferentes espécies de RNA (RNA total, rRNA, sRNA e RNA 6S). Esta técnica baseia-se na aplicação de aminoácidos como ligandos específicos para purificar o RNA com base no facto de existirem múltiplas interações a ocorrer entre os aminoácidos e os ácidos nucleicos, podendo conduzir à especificidade no reconhecimento de moléculas em particular. Esta estratégia tem sido essencialmente usada recorrendo a aminoácidos básicos, como histidina ou arginina [2, 74, 75]. Mais recentemente, os aminoácidos de lisina, tirosina e arginina foram também imobilizados com sucesso, sendo aplicados como ligandos de afinidade para a purificação de microRNAs, particularmente no isolamento de pré-mi-29. Os ligandos de aminoácidos descritos acima apresentaram alta seletividade, no entanto, é necessário um método de purificação mais rápido e mais robusto devido às características estruturais da molécula de RNA, incluindo a sua estabilidade [74, 75]. Tendo por base este desafio, o objetivo será a utilização de MNPs para capturar RNA de amostras complexas e testar a modificação das MNPs com aminoácidos (arginina, agmatina, metionina, tirosina e histidina) na interação mais seletiva com algumas espécies de RNA.

Capítulo 2 - Objetivo

Aumentar os níveis de recuperação de RNA em processos biotecnológicos é de grande importância para a indústria farmacêutica uma vez que, estão a surgir cada vez mais estudos e ensaios clínicos com aplicação desta molécula.

Tendo em consideração que a manipulação das MNPs é simples e económica, este projeto tem como o objetivo a síntese e utilização de MNPs para capturar RNA de amostras complexas e testar a modificação das MNPs com aminoácidos para, posteriormente, se avaliar a possibilidade de capturar, de uma forma mais seletiva, algumas espécies de RNA com elevado interesse para a ciência.

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Para a cultura da *E. coli* DH5 α , utilizou-se triptona e extrato de levedura da Bioakar (Beauvais, França), glicerol da Himedia, cloreto de sódio e K₂HPO₄ da Panreac (Barcelona, Espanha), KH₂PO₄ da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA), kanamicina da Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, EUA). O meio LB foi adquirido à Panreac. Para as eletroforeses foi utilizado um kit Greensafe Premium obtido na NZYTech (Lisboa, Portugal). O tiocianato de guanidina, o álcool isoamílico e o citrato de sódio foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA), N-lauroilsarcosina na Fluka Analytical (Reino Unido) e isopropanol na Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, EUA). O β -mercaptoetanol, o acetato de sódio anidro e o clorofórmio foram da Merck (Whitehouse Station, EUA) e o ácido acético glacial foi adquirido a Chem-Lab (Zedelgem, Bélgica). O sulfato de amônio e o cloreto de sódio utilizados nas soluções de ligação/eluição foram adquiridos à Panreac (Barcelona, Espanha) e o tris(hidroximetil) aminometano (Tris) na Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). As soluções foram preparadas com água esterilizada pré-tratada com 0,05% de pirocarbonato de dietila (DEPC; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Todos os materiais utilizados nas experiências eram *RNasefree*. Para a síntese das MNP foi necessário FeCl₃·6H₂O, FeCl₂·4H₂O, SiO₃, ortossilicato de tetraetilo (TEOS), Dextrano (D4876-100G) todos obtidos na empresa Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA) bem como todos os aminoácidos utilizados na funcionalização das MNP.

3.2 Métodos

3.2.1 Cultura de *R. sulfidophilum* e *E. coli*

A estirpe de *R. sulfidophilum* DSM 1374 (BCCM / LMG, Bélgica) modificada com o plasmídeo pBHSR1-RM que contém a sequência do pre-miR-29b humano foi utilizada neste estudo para a produção de pre-miR-29b. As células de *R. sulfidophilum* foram cultivadas em meio semi-definido, contendo 10 g/L de triptona, 5 g/L de polipeptona, 0,5 g/L de extrato de levedura, 30 g/L de NaCl, 4 g/L de K₂HPO₄, 1 g/L de KH₂PO₄, 50 g/L de Glicose, 0,2 g/L de MgSO₄·7H₂O, 0,05 g/L de CaCl₂·2H₂O, 1 g/L de (NH₄)₂SO₄ e 1 mL de solução de oligoelementos (TES). A solução TES tem a seguinte constituição: 5,56 g/L de FeSO₄·7H₂O, 3,96 g/L de MnCl₂·4H₂O, 5,62 g/L de CoSO₄·7H₂O, 0,34 g/L de CuCl₂·2H₂O, 0,58 g/L de ZnSO₄·7H₂O, 0,6 g/L de H₃BO₃, 0,04 g/L NiCl₂·6H₂O e 0,06 g/L de Na₂MoO₄·2H₂O em 0,5 N HCl [76, 77]. Para meios sólidos, utilizou-se o

meio MT (10,0 g/L de glucose, 10,0 g/L de peptona, 5,0 g/L de extrato de levedura, 20,0 g/L de NaCl, 10,0 mg/L de FeSO₄.7H₂O, 10,0 mg/L de MnSO₄.4H₂O, 1,0 mg/L de ZnSO₄.7H₂O, 4,1 g/L de MgCl₂ e 15,0 g/L de agar) [78]. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 0,1 M antes da autoclavagem. O meio usado para o crescimento da *E. coli* DH5α foi o meio TB (Terrific Broth) contendo 20 g/L de triptona, 24 g/L extrato de levedura, 4 mL/L de glicerol, 0,017 M de KH₂PO₄ e 0,072 M K₂HPO₄, tendo sido suplementado com kanamicina (30 µg/mL) como no meio para *R. sulfidophilum*. As células de *R. sulfidophilum* cresceram a 30°C, sob condições aeróbicas e no escuro e *E. coli* cresceu a 37 °C. O crescimento celular foi monitorizado através da medição da densidade ótica (DO) do meio de cultura a um comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀). Posteriormente, as células foram recuperadas por centrifugação e armazenadas a -20°C.

3.2.2 Produção de pre-miR-29b em *R. sulfidophilum* e *E. coli* DH5α

A biossíntese do pre-miR-29b recombinante foi realizada de acordo com o protocolo previamente estabelecido por Pereira e colaboradores (2016) [78]. As células foram cultivadas a 30 °C em placas de MT contendo kanamicina (30 µg/mL). Em seguida, procedeu-se à inoculação das colônias obtidas em 100 mL de meio semi-definido, em erlenmeyers de 500 mL. A pré-fermentação das colônias realizou-se a 30 °C e 250 rpm sob condições aeróbicas, até a DO₆₀₀ atingir 2,6. Posteriormente, para iniciar a fermentação com uma DO₆₀₀ de 0,3, retirou-se uma alíquota do meio da pré-fermentação para os erlenmeyers de 500 mL de fermentação. As fermentações foram realizadas durante 72 horas. As células de *E. coli* DH5α contendo o plasmídeo pBHSR1-RM com a sequência de pre-miR-29b foram cultivadas a 37 °C, durante a noite em placas com LB-Agar suplementadas com 30 µg/mL de Kanamicina. Em seguida, as colônias de *E. coli* DH5α foram transferidas para o meio de pré-fermentação e incubadas a 37 °C, 250 rpm. O crescimento celular foi monitorizado e quando atingiu uma DO₆₀₀ ~ 2,6 (fase exponencial), retirou-se uma alíquota do meio de pré fermentação para se iniciar a fermentação nas mesmas condições que a pré-fermentação, 37 °C, 250 rpm. O volume transferido da pré-fermentação para a fermentação foi calculado de maneira que a DO no início da fermentação fosse de aproximadamente 0,2. Por ultimo, as células das duas colônias utilizadas foram recolhidas por centrifugação (1500 g, 10 min, 4 °C) e armazenadas a -20 °C até à sua utilização.

3.2.3 Extração de RNA a partir de *R. sulfidophilum* e *E. coli* DH5α

A extração de RNA foi realizada com base no protocolo de isolamento de RNA de tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio [79]. Os *pellets* de *E. coli* DH5α e de *R. sulfidophilum*

(correspondentes a 50 mL de meio de cultura) foram descongelados e ressuspensos com uma solução a 0,8% de cloreto de sódio. As suspensões foram centrifugadas a 6000 g, 4 °C durante 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. A lise celular foi realizada com 5 mL de solução D (4 M de tiocianato de guanidina, 25 mM de citrato de sódio, 0,5 % de N-laurossarcosina e 0,1 M de β-mercaptoetanol) e os lisados foram sujeitos a ressuspensão através de pipetagens sucessivas e incubados em gelo durante 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de acetato de sódio 2 M a pH 4 (preparado com acetato de sódio anidro e ácido acético glacial), seguindo-se a adição de 5 mL de Fenol, cuidadosamente homogeneizados e de seguida procedeu-se à adição de 1mL de álcool isoamílico com clorofórmio (49:1) seguida de agitação vigorosa. As suspensões foram incubadas no gelo durante 15 minutos e centrifugadas a 10000 g, 4 °C durante 20 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente pipetados para novos tubos de lise e adicionaram-se 5 mL de isopropanol a cada tubo para precipitação do RNA, seguido de uma centrifugação (10000 g, 4 °C, 20 minutos). Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram ressuspensos com 1,5 mL de solução D com agitação de vortex, sendo posteriormente sujeitos a precipitação com isopropanol (mesmo volume de solução D). Após a centrifugação a 10000 g, 4 °C durante 10 minutos, o *pellet* resultante foi lavado com uma solução 75% de etanol (em água DEPC), incubado à temperatura ambiente durante 15 minutos e centrifugado a 10000 g, 4 °C por 5 minutos. Os *pellets* resultantes foram secos à temperatura ambiente durante 15 minutos e finalmente ressuspensos com 1 mL de água tratada com DEPC 0,05%. A concentração de RNA foi determinada utilizando um espectrofotómetro *NanoPhotometer* (IMPLEN, Reino Unido). As amostras foram armazenadas a -80 °C.

3.2.4 Eletroforese em gel de agarose

Para analisar a pureza e estabilidade das amostras obtidas no processo de extração de RNA, foi realizada electroforese em gel de agarose. As amostras foram preparadas com *loading buffer* (azul de bromofenol, glicerol e tampão Tris) e injetadas em um gel de agarose a 1% e 15 cm de comprimento corado com *GreenSafe Premium* a 0,01 %. A eletroforese foi realizada em tampão de ácido tris-acético 1X (TAE) (40 mM Tris-base, 20 mM de ácido acético e 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), pH 8,0) e correu a 130 V, durante 30 minutos. Os géis foram revelados sob luz UV, utilizando o sistema *UVITEC Cambridge Fire-reader XS D-56-26LM* (Cambridge, Reino Unido).

3.3 Síntese de Nanopartículas Magnéticas

As nanopartículas magnéticas foram sintetizadas pelo método de co-precipitação. Assim, dissolveram-se 24,33 g de FeCl₃·6H₂O (27%) em 400 mL de H₂O e 10,74 g de FeCl₂·4H₂O em 45 mL

de H₂O. Após estas duas soluções estarem homogeneizadas, adicionaram-se, gota-a-gota, 7,5 mL de NaOH (25%) e deixou-se reagir durante 5 minutos com agitação mecânica. No final da síntese, as nanopartículas magnéticas foram lavadas com água, para retirar qualquer composto que não tivesse reagido, até o pH do sobrenadante atingir o valor de 7, com recurso a um ímã sobre o copo de vidro. No final desta etapa foi reservada uma amostra para posterior análise.

3.3.1 Primeiro Revestimento de Sílica (SiO₃)

Para revestir 2 g de nanopartículas, sintetizadas anteriormente, dissolveram-se 2,4 g de SiO₃, em 84,21 mL de uma mistura de etanol/água a 50%, com recurso a aquecimento (30 °C). Adicionou-se a solução de sílica às nanopartículas, gota-a-gota, com sonicação, e permaneceu a reagir, durante 2 horas, a 40 °C, com agitação mecânica (400 rpm). No final da reação, lavaram-se as nanopartículas, 4 vezes com etanol (100%) e 4 vezes com água destilada. Retirou-se uma amostra para análise após o revestimento.

3.3.2 Segundo Revestimento de Sílica (TEOS)

Para o segundo revestimento de sílica, foi necessário ressuspender as nanopartículas numa solução de etanol (80%). Após sonicar a solução durante 10 minutos, adicionam-se gota-a-gota 3,16 mL de NH₄OH (5M) na *hotte* e com sonicação. De seguida, adicionam-se 1,58 mL de TEOS, novamente gota-a-gota e com sonicação. A mistura permaneceu em reação durante 2 horas, a 40 °C, com recurso a agitação mecânica na *hotte*. No final da reação, lavaram-se as nanopartículas, 3 vezes com etanol (80%) e 5 vezes com água destilada. No final desta etapa, foi reservada uma amostra para análise do segundo revestimento de sílica.

3.3.3 Revestimento de Dextrano

Após a realização dos dois revestimentos de sílica, realizou-se um revestimento com o polímero Dextrano. Para isso, dissolveram-se 2 g do polímero em 25 mL de água destilada. Após sonicação das nanopartículas com o segundo revestimento de sílica durante 10 minutos, adicionou-se, gota-a-gota a solução de polímero às nanopartículas, sob sonicação. A solução permaneceu em reação durante 2 horas, a 60 °C, com agitação mecânica (200 rpm). No final da reação, lavaram-se as nanopartículas com água destilada 5 vezes e retirou-se, novamente, uma amostra para determinar a concentração das nanopartículas.

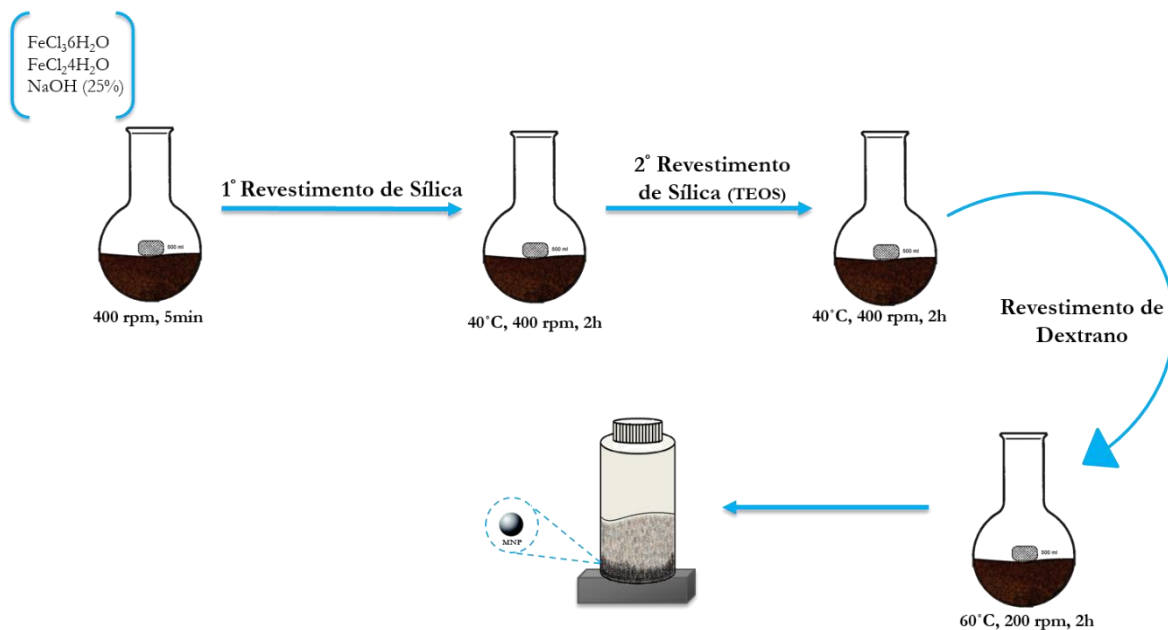


Figura 2- Esquema geral representativo da síntese das nanopartículas magnéticas (MNP).

3.3.4 Epóxi-ativação das nanopartículas magnéticas

Para proceder à modificação das nanopartículas magnéticas com ligandos, foram inicialmente testados dois protocolos de epóxi-ativação de maneira a saber com qual é que se conseguia obter melhores resultados de funcionalização.

3.3.4.1 Epóxi-ativação com Glymo

Para realizar a epóxi-ativação com Glymo foram usadas 150 mg de nanopartículas magnéticas e adicionadas a 7,9 mL de água destilada para que as partículas ficassem numa concentração de 10 mg/mL. Pipetaram-se, gota-a-gota, 135 μL de Glymo na solução anterior, sob sonicação, e deixou-se em incubação durante 3 horas, a 36 °C, e 230 rpm. De seguida as nanopartículas ativadas foram lavadas com água destilada, por cinco vezes.

3.3.4.2 Epóxi-ativação com Epiclorohidrina

Neste procedimento, 150 mg de nanopartículas magnéticas foram adicionadas a 7,9 mL de água destilada de maneira a ficarem numa concentração de 10 mg/mL. Adicionaram-se 9 μL de NaOH (10 M), gota-a-gota, e em sonicação, e incubou-se a solução a 30 °C, durante 30 minutos, e 230

rpm. Posteriormente, pipetaram-se 9 μL de epiclorohidrina, gota-a-gota e no sonicador e de seguida deixou-se incubar a 36 °C, durante 3 horas, a 230 rpm. Finalmente lavaram-se as partículas cinco vezes com água destilada.

3.3.5 Funcionalização com os Aminoácidos

Para a funcionalização das MNPs com os aminoácidos dissolveram-se em 15 mL de água destilada os aminoácidos de forma a manter a concentração final das MNP em 10 mg/mL. A quantidade de aminoácidos necessária foi estimada tendo em consideração o número de amins que se obtém quando se amina as MNP e não o número de grupos épxi uma vez que, pelo teste de kaiser não se conseguem quantificar os grupos épxi na superfície das MNP. Assim, utilizou-se a estimativa de 530 μmol de NH_2 por grama de MNP revestida com dextrano e aminada que se obtém, normalmente, pelo teste de Kaiser [56, 65]. Para tentar favorecer e garantir a funcionalização, colocou-se um excesso de cinco vezes. Centrifugaram-se as MNP epóxi-ativadas anteriormente (15000 g, 10 minutos) de maneira a retirar o sobrenadante. De seguida, adicionou-se a solução de aminoácidos às MNP e deixou-se reagir durante 12 horas, a 30 °C e 200 rpm. Da reação com o aminoácido metionina retiraram-se 50 μL de amostra para o teste ICP, que permite avaliar a eficiência de ligação do aminoácido às MNPs.

3.4 Quantificação dos grupos enxofre através da técnica ICP

De maneira a saber que método de Epóxi-ativação para a funcionalização das MNP consegue maior quantidade de aminoácidos na superfície das partículas, determinou-se através da técnica ICP, a concentração do Ferro (Fe) e do Enxofre (S), nas amostras de MNPs epóxi-ativadas com Glymo e Epiclorohidrina, com e sem funcionalização com o aminoácido metionina. Assim, adicionaram-se 50 μL de cada amostra a 100 μL de água-régia e deixou-se atuar durante 2 horas.

3.5 Teste das Nanopartículas magnéticas em diferentes condições de ligação e eluição

As partículas magnéticas funcionalizadas e não funcionalizadas foram testadas quanto à capacidade de ligação de RNA, usando amostras de RNA total obtidas através da extração de lisados de *E. coli DH5a* e posteriormente em alíquotas do meio de fermentação da *R. sulfidophilum*. As MNPs foram previamente equilibradas antes dos ensaios com a solução de ligação. Foram testadas duas soluções de ligação (Tris-HCl ou Sulfato de Amónio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$) e duas soluções de eluição (Cloreto de Sódio (NaCl) e Tris-HCl). Para a otimização das condições

de ligação/eluição, foram variadas as seguintes condições: (i) concentração de partículas magnéticas (10 mg/mL e 30 mg/mL); (ii) concentração molar das soluções de sulfato de amónio (1.5 M, 2 M e 3 M); (iii) pH das soluções de ligação/eluição (7, 7.5 e 8). As MNP foram incubadas com a amostra de RNA durante 30 minutos, a 15 rpm, à temperatura ambiente. A seguir, realizaram-se cinco passos de ligação e cinco de eluição recuperando-se o sobrenadante em cada etapa, com recurso a um ímã, para avaliar o teor de RNA. Procedeu-se à leitura da concentração do RNA nos sobrenadantes obtidos com recurso a um espectrofotómetro *NanoPhotometer* (IMPLEN, Reino Unido).

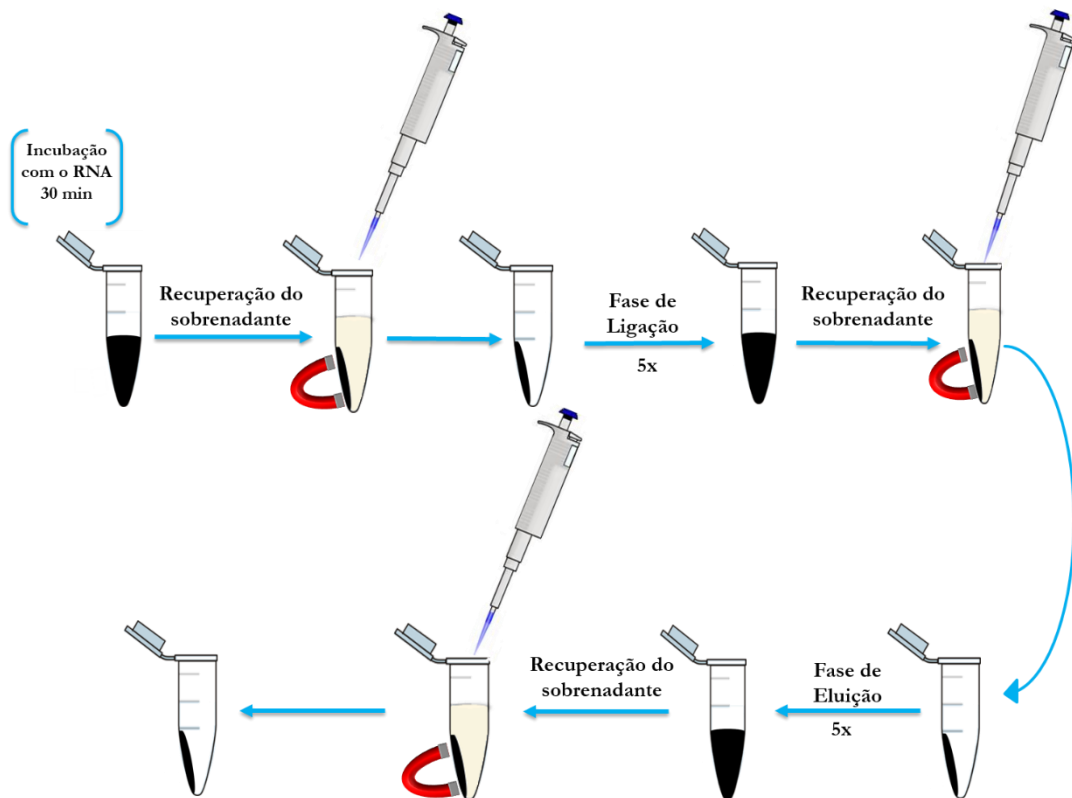


Figura 3 - Esquema dos testes realizados com as MNP nas diferentes condições.

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

4.1 Caracterização das Nanopartículas Magnéticas Sintetizadas

Uma caracterização inicial das MNPs preparadas por co-precipitação foi realizada de maneira a conhecer as características físicas do suporte. Para isso, caracterizaram-se as MNPs iniciais (Bare), as MNPs com os sucessivos revestimentos (1ª Sílica, TEOS e Dextrano) e as MNPs funcionalizadas com os diferentes aminoácidos por EDX, DLS e por ICP.

4.1.1 Caracterização das MNP revestidas com Dextrano

4.1.1.1 Espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDX)

Para a análise elementar da composição química das amostras, na síntese inicial das MNP e nos sucessivos revestimentos, utilizou-se o Microscópio Eletrónico de Varrimento, VP SEM Hitachi S - 3400N que tem acoplado ao microscópio um detetor de espectrometria de energia dispersiva (EDX) XFLASH, modelo 5010, com resolução de 129 eV em $K\alpha$ de Mn, da Bruker.

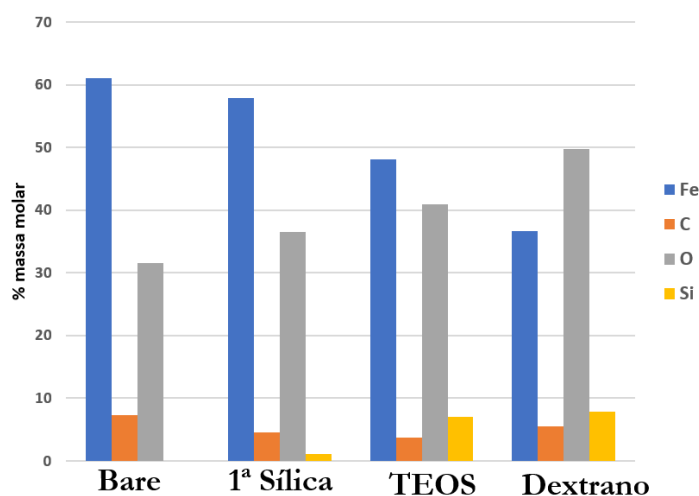


Figura 4 - Percentagem da massa molar dos diferentes constituintes presentes nas MNP com os sucessivos revestimentos das partículas.

A figura 4 mostra que com os sucessivos revestimentos de sílica e com o polímero, a percentagem de ferro detetada nas MNPS vai diminuindo gradualmente e, o oxigénio aumenta com os revestimentos. Isto comprova a correta realização dos sucessivos revestimentos uma vez que, as partículas iniciais (Bare) são sintetizadas apenas com $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ e $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ e, como a técnica EDX emite um raio X na superfície da amostra, com os sucessivos revestimentos, o elemento ferro deixa de estar tão exposto e prevalece a deteção dos elementos mais superficiais, ou seja, sucessivamente do primeiro revestimento de sílica e do revestimento com TEOS. É por isso coerente o aumento da percentagem de massa molar relacionado com o Oxigénio e a Sílica. O revestimento com o polímero Dextrano vai permitir ter na sua superfície

maior número de grupos funcionais OH. Os resultados permitem comprovar este revestimento com o polímero, já que, comparando as MNPs com o revestimento de TEOS e o revestimento de Dextrano, é possível observar que a percentagem de Sílica mantêm-se mais ou menos constante e a percentagem de oxigénio aumenta. Este resultado permite também concluir que o revestimento com TEOS não fica comprometido com o último procedimento de revestimento das partículas com o polímero, e que as MNP ficam efetivamente revestidas com Dextrano. Os sucessivos revestimentos além de permitirem a estabilização das MNPs e de melhorarem a sua dispersão, também permitem melhorar a biocompatibilidade e aumentar a funcionalidade da superfície [73].

4.1.1.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

As partículas magnéticas foram analisadas por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) para determinar o diâmetro hidrodinâmico e os valores de potencial zeta utilizando um Zetasizer Nano ZS da Malvern.

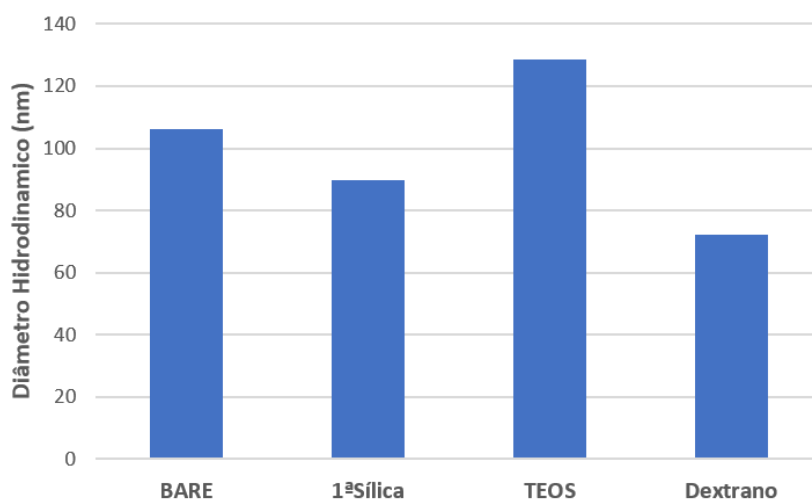


Figura 5 - Resultados do diâmetro hidrodinâmico (nm) das MNP ao longo dos revestimentos. Todas as amostras foram preparadas com uma concentração de 0,05 mg/mL em água Milli-Q.

Geralmente, as MNPs sintetizadas pelo método de co-precipitação apresentam diâmetros centrais de aproximadamente 10 nm [65]. Contudo, as MNP-Bare rapidamente agregam em solução apresentando diâmetros hidrodinâmicos superiores devido à baixa estabilidade proporcionada pela falta de revestimento [58]. Neste âmbito, os resultados obtidos, e apresentados na figura 5, estão de acordo com o descrito. O revestimento das partículas com a primeira camada de sílica (SiO_3) produziu partículas com diâmetros inferiores, o que sugere alguma estabilização promovida pelo 1º revestimento. No entanto, após o revestimento com

TEOS, as partículas tornam-se mais estáveis e menos agregadas em solução aquosa, que o que devia ser traduzido em diâmetros hidrodinâmicos inferiores. Contudo, isso não acontece, fenómeno esse que também já foi observado e descrito em outros trabalhos e pode ser atribuído às interações não covalentes que se estabelecem entre os biopolímeros de revestimento e partículas vizinhas [66]. Apesar disso, o TEOS proporcionou maior teor de sílica quando comparado ao primeiro revestimento. Como referido anteriormente, a modificação com sílica não só aumenta a dispersão de partículas em solução, mas também melhora sua resistência contra lixiviação de ferro em ambientes ácidos [56]. Por último, com o revestimento de polímero dextrano foi observado um menor diâmetro hidrodinâmico nas MNPs, que poderá resultar da estabilização adicional e controlo das interações inter-partículas.

4.1.1.3 Espectrometria de Emissão Atómica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES)

Durante a síntese das MNPs foi necessário realizar um teste intermédio para poder determinar qual o melhor protocolo de funcionalização das MNPs com os aminoácidos. Com a possibilidade de proceder à ativação das MNPs de duas formas, com recurso a Glymo ou Epiclorohidrina, foi necessário estudar qual a técnica que permite obter mais grupos epóxi na superfície, que consequentemente poderão estar disponíveis para a modificação com os aminoácidos. Esta avaliação foi realizada por Espectroscopia de Emissão Atómica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES), realizada utilizando um Espectrofotómetro Horiba Jobin-Yvon Ultima com um potencial de 1200 kW para determinar a intensidade dos elementos Ferro e Enxofre, elementos que estão presentes nas amostras das MNP epóxi-ativadas pelos dois métodos. Como o método permite determinar Enxofre, foi selecionado o aminoácido metionina para a realização deste teste, como uma aproximação para posterior aplicação nos restantes aminoácidos.

Tabela 2 - Resultados obtidos da determinação da concentração do Ferro (Fe) e do Enxofre (S) por ICP, nas amostras de MNPs epóxi-ativadas com Glymo e Epiclorohidrina, com e sem funcionalização com metionina.

Amostra	Int Fe	Fe (mg/L)	Int S	S (mg/L)
EPI1	29460042	201,41	63309	0,33
EPI2	28751801	196,56	64781	0,34
EPI3	29999003	205,09	57678	0,29
GLY1	28393411	194,11	55990	0,28
GLY2	26693075	182,48	59120	0,30
GLY3	27282617	186,51	73483	0,40

EPI+MET1	20790382	142,11	91372	0,52
EPI+MET2	18585401	127,02	110904	0,64
EPI+MET3	19245825	131,54	97996	0,56
GLY+MET1	23284318	159,16	98953	0,57
GLY+MET2	21538524	147,22	95181	0,54
GLY+MET3	22362849	152,86	77945	0,43

Esta técnica baseia-se na avaliação da intensidade medida para o Ferro e o Enxofre (tabela 2), permitindo a determinação das suas concentrações nas amostras, através da utilização de curvas de calibração adequadas. Posteriormente é determinada a razão (tabela 3) entre os dois componentes (Enxofre e Ferro) para a obtenção dos resultados sobre a funcionalização.

Tabela 3 - Avaliação da funcionalização das MNPs, com determinação da razão entre o Enxofre (S) e o Ferro (Fe) presentes nas amostras.

	Glymo ([S]/[Fe])	Glymo+Met ([S]/[Fe])	EPI ([S]/[Fe])	Epi+MET ([S]/[Fe])
1	0,025197933	0,061287839	0,028401115	0,073320388
2	0,028744949	0,06335329	0,029948612	0,061287839
3	0,036844313	0,04825248	0,024781668	0,06335329
Média*	0,030262398	0,057631203	0,027710465	0,065987173
Desvio-padrão*	0,005969634	0,008187604	0,002651806	0,006434171
Média	0,302623982	0,576312032	0,27710465	0,659871726
Desvio-padrão	0,059696337	0,081876042	0,026518063	0,064341711
Funcionalização	0,27368805		0,382767076	

*amostras diluídas 10 vezes

Assim, através dos resultados obtidos (análise dos triplicados), podemos concluir que o método em que se conseguiu uma maior funcionalização foi com a técnica de epóxi-ativação com epíclorohidrina. Com esta metodologia foi possível obter um valor de Enxofre ligado às MNPs de 0,38 µg/mL, por comparação com o valor de 0,27 µg/mL obtidos com a epóxi-ativação com Glymo. Estes resultados sugerem que a ativação com epíclorohidrina é mais efetiva, sendo possível obter maior número de grupos epóxi que posteriormente facilitam a ligação do aminoácido, conduzindo a uma maior densidade de ligando. Desta forma, considerando os resultados obtidos para a ligação de metionina, e que esta serviu de modelo uma vez que a ligação química dos restantes aminoácidos será semelhante à ligação da metionina, procedeu-se à funcionalização das MNPs com arginina, agmatina, histidina e tirosina usando o mesmo protocolo de epóxi-ativação, com epíclorohidrina.

4.1.2 Caracterização das MNP funcionalizadas com os aminoácidos

4.1.2.1 Espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDX)

A análise elementar da composição química das amostras das MNPs funcionalizadas com os diferentes aminoácidos foram caracterizadas por EDX, nas mesmas condições utilizadas na caracterização das MNPs com os sucessivos revestimentos.

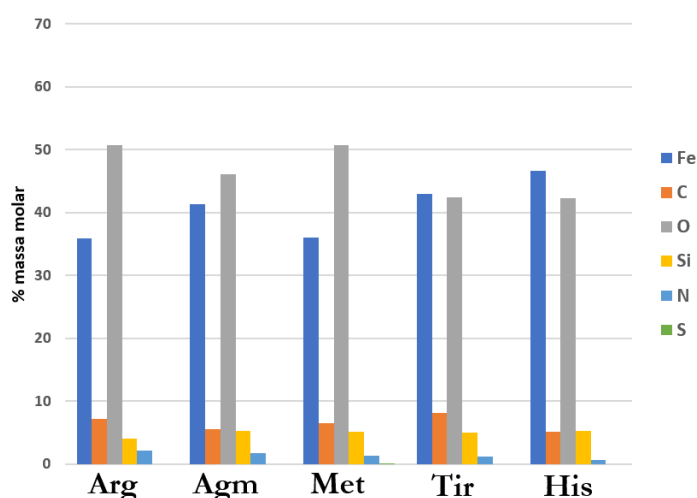


Figura 6 - Percentagem da massa molar dos diferentes constituintes presentes nas MNP funcionalizadas com os diferentes aminoácidos.

A figura 6 mostra os resultados obtidos da caracterização das MNP funcionalizadas com os aminoácidos Arginina, Agmatina, Metionina, Tirosina e Histidina. Podemos concluir que a percentagem de Carbono, Oxigénio e de Sílica é muito similar em todos os aminoácidos o que pode comprovar que o revestimento de dextrano não foi danificado após a funcionalização. Em relação ao elemento Azoto (N) presente em todos os aminoácidos a percentagem mais elevada foi encontrada para a funcionalização no aminoácido Arginina (2,10%), muito próxima da percentagem do derivado de aminoácido Agmatina (1,74%) e posteriormente, com a realização dos ensaios de ligação, veio a observar-se que foram as MNP funcionalizadas com a Agmatina que apresentaram uma percentagem de ligação mais elevada. O enxofre, característico do aminoácido Metionina, apresentou uma percentagem muito baixa (0,03%) e nos ensaios posteriores de ligação/eluição também se confirmou a obtenção de uma percentagem de ligação de RNA muito reduzida, usando estas MNPs funcionalizadas com a Metionina.

4.1.2.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

As partículas magnéticas foram analisadas por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) nas condições referidas anteriormente.

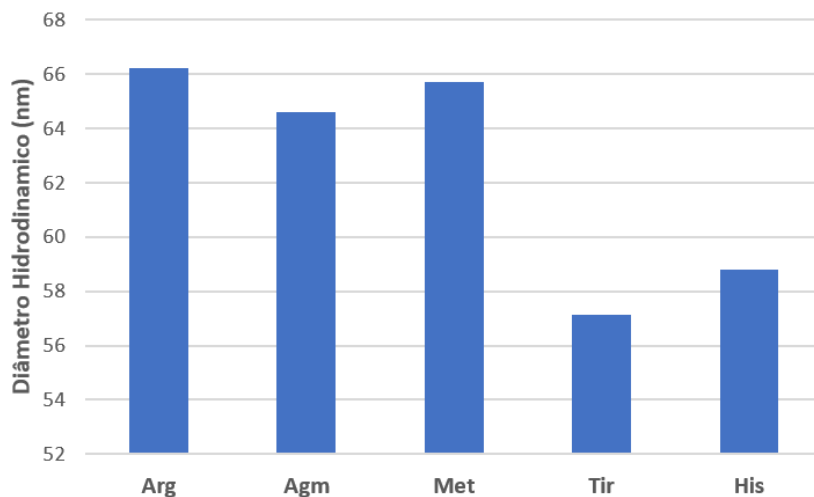


Figura 7 - Resultados do diâmetro hidrodinâmico (nm) das MNP funcionalizadas com os aminoácidos. Todas as amostras têm uma concentração de 0,05 mg/mL em água Milli-Q.

De acordo com a figura 7, o diâmetro hidrodinâmico para as MNP funcionalizadas com os aminoácidos diminuiu ligeiramente após a modificação com os aminoácidos, uma vez que esta funcionalização pode criar restrições na superfície, alteração da carga superficial e aumento da hidrofobicidade. Este comportamento também já tinha sido verificado em trabalhos anteriores realizados Santana e colaboradores (2012) [66].

Tal como é possível observar na figura 8, as MNPs iniciais (Bare) apresentaram valores de potencial zeta de aproximadamente 11,04 mV, o que significa que as partículas tendem a formar aglomerados em solução [56]. Observou-se que para as restantes MNPs o potencial zeta foi sempre negativo, o que também está de acordo com os diâmetros hidrodinâmicos obtidos, uma vez que, as partículas são mais estáveis em solução [56]. O valor negativo do potencial zeta nas MNP revestidas com o polímero dextrano confirma a existência de um invólucro de rede polímero-sílica [56]. Após a modificação química das MNP com os aminoácidos, o potencial zeta tornou-se menos negativo, o que está relacionado com a presença do aminoácido. De facto, esta alteração no potencial zeta sugere um rearranjo da carga de superfície devido à presença de novos grupos funcionais [66].

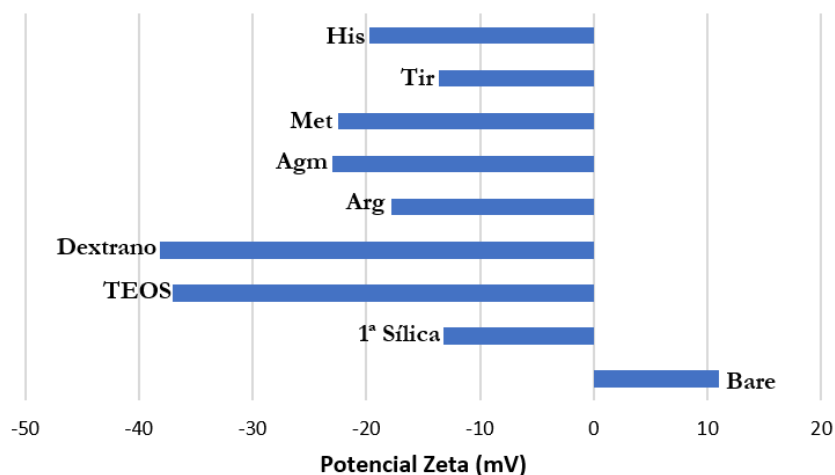


Figura 8 - Resultados do potencial zeta (mV) das MNP iniciais, com os diferentes revestimentos e funcionalizadas com os aminoácidos. Todas as amostras foram preparadas com uma concentração de 0,05 mg/mL em água Milli-Q.

4.2 Avaliação da ligação/eluição do RNA às MNPs

As diferentes estratégias de ligação/eluição utilizadas para avaliar as interações entre as MNP e o RNA foram estabelecidas com base na manipulação do tipo e concentração de sal e o pH, sendo que todos os ensaios foram realizados à temperatura ambiente (tabela 4). Inicialmente, nos ensaios realizados utilizaram-se amostras de RNA total obtido através do protocolo de isolamento de RNA com tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio. Posteriormente, para simular o meio de fermentação da *R. sulfidophilum* e avaliar o comportamento das MNP, suplementou-se o meio com uma amostra de RNA obtida pelo método citado anteriormente. Os últimos testes foram realizados com amostras reais, recolhidas durante o procedimento de fermentação da *R. sulfidophilum*.

Tabela 4 - Condições de Ligação/Eluição testadas nas MNPs.

Ligação	Eluição
10 mM Tris-HCl	2 M de NaCl em 10 mM de Tris-HCl
Sulfato de Amônio em 10mM de tampão Tris-HCl	10 mM Tris-HCl
1,5 M	
2 M	
3 M	

4.2.1 Nanopartículas Magnéticas revestidas com Dextrano

Numa primeira abordagem as MNP revestidas com dextrano foram usadas para estudar o tipo de interações que poderiam estabelecer-se entre as partículas e a amostra de RNA total e avaliar as condições em que se conseguem minimizar as interações com o revestimento de dextrano. Quando se pretende, que após a funcionalização das MNPs, a interação ocorra especificamente entre o ligando e o RNA, qualquer interação com o revestimento seria considerada inespecífica.

Assim, começou-se por testar duas estratégias de ligação e eluição distintas, de maneira a determinar com qual é que se conseguia obter menor percentagem de ligação do RNA às MNPs revestidas de dextrano. O objetivo particular deste estudo é determinar condições de não ligação do RNA, uma vez que se pretende uma ligação específica aos aminoácidos nas MNPs funcionalizadas. No entanto, para explorar a especificidade é necessário reduzir as interações não específicas com o revestimento de dextrano. Desta forma, aquando da realização dos testes com as MNP funcionalizadas, qualquer ligação estabelecida será resultado da presença e contacto com os aminoácidos. Este parâmetro é relevante, uma vez que o revestimento das MNP com o biopolímero é susceptível de criar uma rede de estruturas porosas que deixa o óxido de ferro reativo parcialmente exposto para criar interações e pode ter alguma contribuição na adsorção inespecífica de cada partícula [66].

Considerando o objetivo de aplicação de captura de RNA por interação com os aminoácidos imobilizados nas MNPs, sabe-se que potencialmente podem ser estabelecidas múltiplas interações que envolvem maioritariamente interações iónicas e hidrofóbicas. Este conhecimento resulta dos trabalhos anteriores do grupo de investigação que já desenvolveu metodologias de cromatografia de afinidade usando aminoácidos como ligandos para purificar RNA [2, 74, 75]. Assim, supondo que na interação com o RNA podem ser usadas condições de ligação que promovem interações iónicas ou hidrofóbicas, foram testadas essas mesmas condições nas MNPs revestidas de dextrano de forma a perceber se em algum dos casos seria possível minimizar as interações inespecíficas com o revestimento.

Deste modo, utilizou-se uma solução de 10 mM de Tris-HCl a pH 8 e uma solução de 3 M de Sulfato de Amónio em 10mM de tampão Tris-HCl a pH 8 para a ligação e 2 M de NaCl em 10mM de tampão Tris-HCl a pH 8 e 10 mM de Tris-HCl a pH 8 para e eluição, respetivamente. Desta forma iríamos estudar se as interações entre o RNA e as MNP eram mais iónicas ou mais hidrofóbicas, selecionando a condição que diminui a interação não específica com o revestimento de dextrano. Podemos observar, pela análise da figura 9 que se obteve uma menor interação das MNP com a amostra do RNA quando se utilizou como solução de ligação 10 mM

Tris-HCl a pH 8. Contudo, para recuperar o sobrenadante, para posterior leitura da concentração da amostra, foi necessário realizar uma centrifugação (12500 g, 10 minutos a 4 °C), uma vez que as MNPs não respondiam ao íman, tornando-se uma desvantagem.

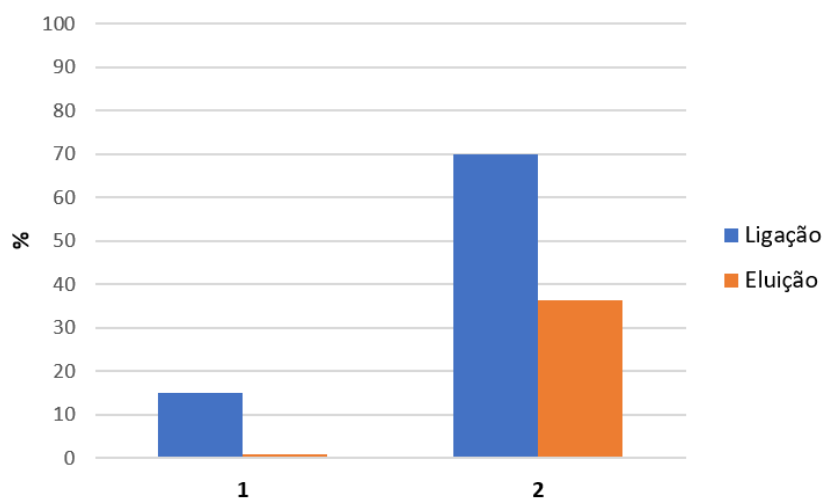


Figura 9 - Percentagem de ligação e eluição do RNA às MNPs revestidas com dextrano a pH 8. Ligação: (1) 10 mM de Tris-HCl; (2) 3 M de Sulfato de Amónio em 10mM de tampão Tris-HCl; Eluição: (1) 2 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl; (2) 10 mM de Tris-HCl. [MNP]= 10 mg/mL.

Quando o passo de ligação ocorreu com 3M de Sulfato de Amónio a pH 8 percentagem de ligação é superior (49,94%), mas nesta estratégia de ligação não é necessário recorrer à centrifugação para recuperar os sobrenadantes. Como a força iónica da solução de ligação é superior à utilizada anteriormente as MNP já respondem à força do íman tornando a recuperação dos sobrenadantes mais simples (figura 9).

O plano seguinte passou por manipular o pH das soluções entre 8 e 7, para verificar quais as condições que permitiam a resposta das MNPs ao íman. De qualquer forma, os resultados alcançados anteriormente no grupo, indicam que valores de pH inferiores favorecem a retenção do RNA ao suporte, sugerindo o estabelecimento de interações eletrostáticas mais fortes, mas também múltiplas interações não covalentes, nomeadamente interações catião- π , ligação de hidrogénio, interações hidrogénio- π e ligações mediadas pela água [74]. Este facto poderia comprometer a utilização do revestimento, ou comprometer a seletividade promovida pelos aminoácidos, mas foi necessário testar uma vez que é necessário garantir a resposta das MNPs ao íman para que a captura seja possível. Nestas condições de pH 7,0 de facto verificou-se uma elevada percentagem de ligação, mas as MNPs formavam aglomerados e permaneciam adsorvidas aos *ependorfs* tornando os ensaios irreproduzíveis nas duas estratégias utilizadas (figura 10).

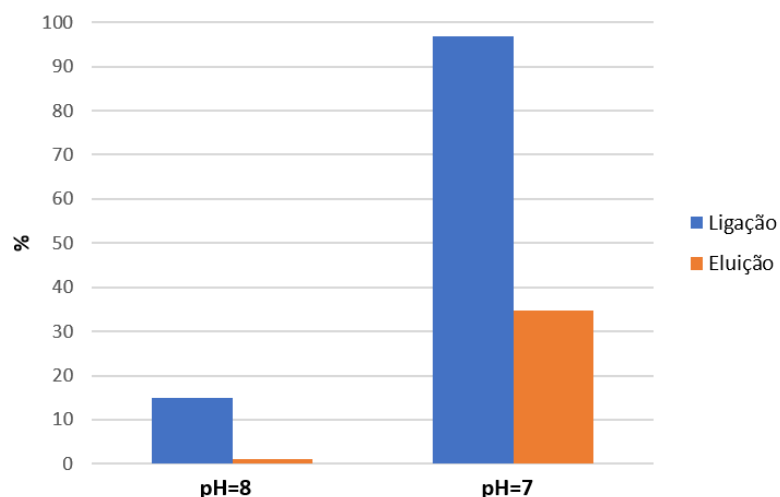


Figura 10 - Percentagem de ligação e eluição do RNA às MNPs revestidas com dextrano. Ligação: 10 mM de Tris-HCl; Eluição: 2 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl. [MNP]= 10 mg/mL.

Assim, a estratégia de ligação com 10 mM de Tris-HCl foi totalmente abandonada uma vez que para recuperar o sobrenadante, quer a pH 7 quer a pH 8, era necessário proceder a um passo de centrifugação (12500 g, 10 minutos a 4 °C) pois as MNPs não responderam ao poder magnético do íman em ambiente de baixa concentração de sal.

Visto que, com a estratégia anterior não foi possível obter a resposta das MNPs desejada, foi testada posteriormente a estratégia de ligação com 3 M de Sulfato de Amónio em 10 mM de tampão Tris-HCl a pH 7,5 de maneira a estudar o comportamento das MNPs nestas condições onde se favorecem maioritariamente interações hidrofóbicas. Neste caso verificou-se que a percentagem de ligação do RNA às MNPs diminuiu, como se pode observar na figura 11.

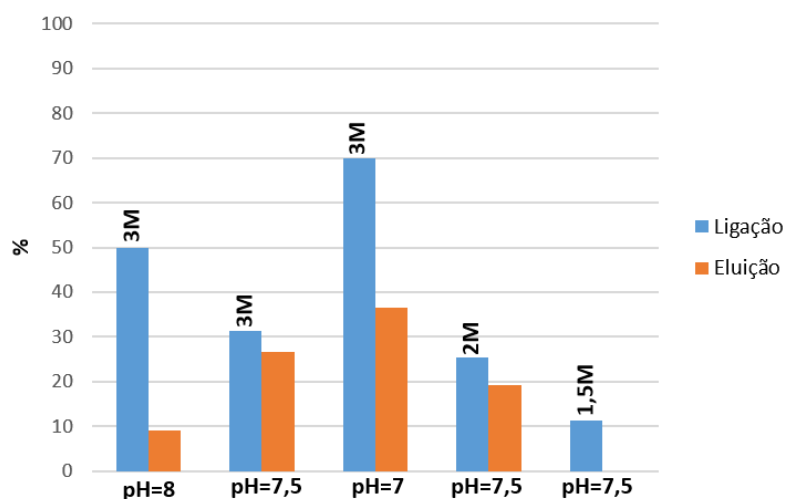


Figura 11 - Percentagem de ligação e eluição do RNA às MNPs revestidas com dextrano. Ligação: Sulfato de Amónio em 10 mM de tampão Tris-HCl; Eluição: 10 mM de Tris-HCl. [MNP]= 10 mg/mL.

A etapa seguinte foi reduzir a concentração de sal da solução de ligação de maneira a diminuir as interações inespecíficas entre as MNP e a amostra. Na figura 11, é possível observar que a

menor percentagem de ligação das MNPs revestidas com dextrano à amostra de RNA (11,3%) obteve-se quando se utilizou uma solução de 1,5 M de sulfato de amónio em 10 mM de tampão Tris-HCl a pH 7,5. De forma geral, conclui-se que a diminuição da concentração molar da solução de ligação e a diminuição do pH contribuem para a diminuição da percentagem de ligação da amostra de RNA às MNPs. Estas seriam as melhores condições para evitar as interações inespecíficas com o revestimento de dextrano, e tentar potenciar as interações mais seletivas entre o RNA e os aminoácidos.

4.2.2 Nanopartículas Magnéticas funcionalizadas com os Aminoácidos

Dado que, com a estratégia anterior se obteve a menor percentagem de ligação, os testes realizados com as MNPs funcionalizadas com os diferentes aminoácidos (arginina, agmatina, metionina, tirosina e histidina), foram baseados nestas condições, na tentativa de promover a ligação do RNA aos ligandos. No entanto, como pode ser constatado na figura 12, a percentagem de ligação da amostra de RNA às MNPs funcionalizadas com os diferentes aminoácidos, para uma concentração de MNP de 10 mg/mL foi relativamente baixa. Este facto pode ser devido à baixa densidade de ligando, que resulta numa reduzida disponibilidade de pontos de ligação entre a biomolécula de interesse e as MNPs.

De maneira a ultrapassar este obstáculo, foi ainda testada uma estratégia que consiste no aumento da concentração de MNPs nos ensaios, de 10 mg/mL para 30 mg/mL.

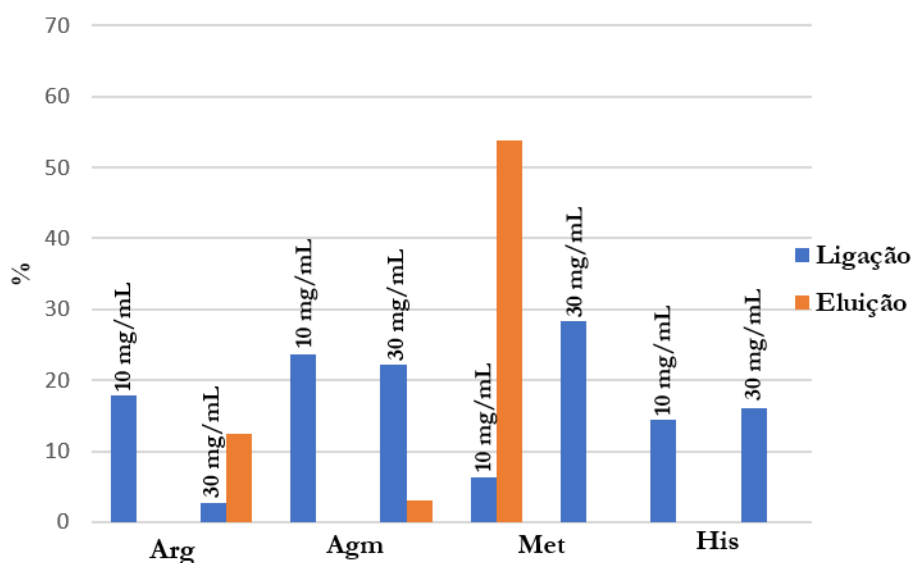


Figura 12 - Percentagem de ligação e eluição do RNA às MNPs funcionalizadas com os aminoácidos Arginina, Agmatina, Metionina e Histidina com [MNP] de 10 mg/mL e 30 mg/mL.

Ligação: 1,5 M de Sulfato de Amónio em 10 mM de tampão Tris-HCl a pH 7,5; Eluição: 10 mM de Tris-HCl a pH 7,5.

Como podemos constatar na figura 12 o aumento da percentagem de ligação não foi significativo quando se aumenta a concentração de MNP de 10 mg/mL para 30 mg/mL tendo, no caso do ensaio realizado com o aminoácido Arginina a percentagem de ligação diminuído de 17,8% para 2,7% (figura 12). Uma vez que, o RNA é carregado negativamente são estabelecidas interações eletrostáticas favoráveis entre os grupos fosfato do RNA e os ligandos de Arginina. No entanto, dependendo das condições dos ensaios, algumas interações podem ser mais favorecidas do que outras [75]. E neste caso, mesmo o aumento de MNPs não favoreceu a ligação do RNA à Arginina, provavelmente por estar a ser usada uma condição de ligação que favorece essencialmente as interações hidrofóbicas e não as iónicas.

Em relação aos ensaios realizados com o aminoácido Agmatina, houve um decréscimo na percentagem de ligação, de 23,6% para 22,2% e uma pequena percentagem de eluição da biomolécula de interesse (3%) quando se aumentou a concentração de MNPs de 10 para 30 mg/mL não sendo considerado relevante (figura 12). As interações entre o RNA e a Agmatina (interações eletrostáticas mais fortes, mas também múltiplas interações não covalentes, nomeadamente interações catião- π , pontes de hidrogénio, interações hidrogénio- π e ligações mediadas pela água) podem estar relacionadas com a carga positiva da Agmatina ($pK_a=13$), considerando o pH 7,5 das soluções de ligação/eluição onde o aminoácido se encontra protonado. Além disso, a Agmatina é um derivado do aminoácido Arginina, que não apresenta o grupo carboxilo, de modo que ambos os aminoácidos possuem estruturas muito semelhantes. Assim, a multiplicidade de interações também pode ocorrer porque a Agmatina possui um centro polar com o qual o RNA pode associar-se fortemente [74].

O aumento mais significativo que se observou na ligação de RNA ocorreu para os ensaios com o aminoácido Metionina, de 6,3% para 28,3%. Contudo, com o aumento da concentração das MNP a percentagem de eluição da biomolécula de interesse passou para zero tornando-se um obstáculo para uma possível utilização (figura 12), uma vez que não seria possível recuperar o RNA.

Em relação aos ensaios realizados com o aminoácido Histidina, quer com uma concentração de MNP de 10 mg/mL, quer com uma concentração de 30 mg/mL as diferenças não foram significativas, aumentou de 14,4% para 16,1%, e a percentagem de eluição dos dois ensaios foi sempre zero. Este resultado pode estar relacionado com a presença da cadeia lateral do anel aromático imidazol do aminoácido de Histidina, e com o facto de que a pH 7,5 a Histidina ($pK_a=6,5$) não está significativamente protonada e as interações entre o RNA e as MNP funcionalizadas com Histidina poderão ser principalmente empilhamento de anel/interações hidrofóbicas e ligação de hidrogénio diretas entre Histidina-RNA (figura 12) [2]. O resultado

sugere que a retenção é efetiva e as interações estabelecidas são fortes, não sendo possível a recuperação do RNA mesmo com a diminuição da força iônica (condição eluição).

Para o último aminoácido testado, a Tirosina, não foi possível concluir sobre a interação, uma vez que quer para a ligação quer para a eluição foram obtidos valores de absorvância de zero, mesmo testando as duas concentrações de MNPs. Estudos anteriores de Afonso e colaboradores (2014) demonstraram que os RNA permanecem ligados a matrizes funcionalizadas com o aminoácido Tirosina em condições em que as interações hidrofóbicas foram as mais favorecidas [80]. Neste caso, se não foi possível promover estas interações pode ser indicador de uma incorreta ou insuficiente modificação das MNPs com o aminoácido.

De uma forma geral, estes resultados permitem concluir que o método de funcionalização das MNPs deve ser otimizado de maneira a aumentar a densidade de ligando na superfície das MNPs e, assim aumentar a percentagem de ligação.

Uma vez que, os resultados obtidos neste estudo de ligação entre as MNPs funcionalizadas e o RNA não mostraram o potencial destas partículas para a captura de RNA ou purificação seletiva do miRNA ou qualquer outra espécie, testou-se uma nova abordagem que tem como objetivo usar as MNPs revestidas de dextrano para capturar RNA total dos meios de cultura de *R. sulfidophilum*.

4.2.3 Captura de RNA a partir de meios de cultura de *R. sulfidophilum*

Como a estratégia de captura de RNA ou recuperação de RNAs específicos com as MNP funcionalizadas com os aminoácidos não conduziu aos resultados esperados, a estratégia seguinte teve por objetivo o estabelecimento de condições para capturar RNA total de extratos complexos, usando as MNPs revestidas com dextrano. Os ensaios iniciais foram realizados com o meio de cultura de *R. sulfidophilum*, preparado de fresco e suplementado com RNA obtido através do protocolo de isolamento de RNA de tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio.

Como os constituintes do meio de fermentação da *R. sulfidophilum*, interferiam na leitura da concentração do RNA pelo espectrofotômetro *NanoPhotometer* (IMPLEN, Reino Unido) utilizou-se como estratégia para avaliar a ligação do RNA às MNP revestidas com dextrano uma eletroforese em gel de agarose das amostras recolhidas ao longo do ensaio.

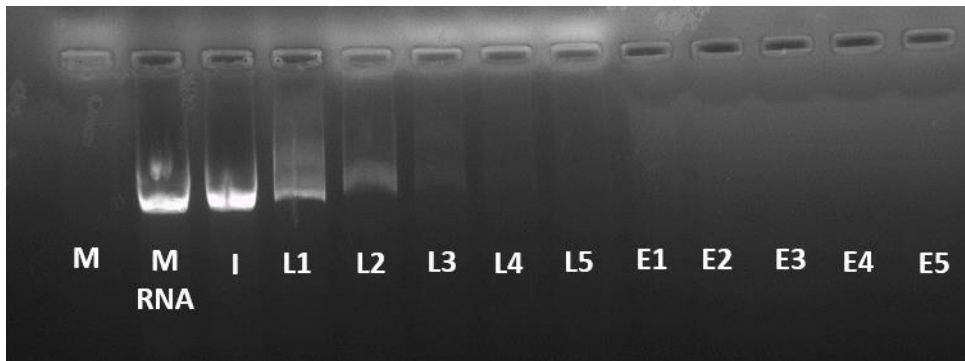


Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose das amostras obtidas nos passos de ligação e eluição com [MNP]= 10 mg/mL. Ligação: meio de fermentação da *R. sulfidophilum* suplementado com RNA; Eluição: 10 mM de Tris-HCl a pH 7,5. M: meio de fermentação da *R. sulfidophilum*; M RNA: meio de fermentação da *R. sulfidophilum* suplementado com RNA; I: Incubação; L1,L2,L3,L4 e L5: Ligação; E1,E2,E3,E4 e E5: Eluição após precipitação com etanol 100%.

Como podemos verificar na figura 13, nestas condições em que a ligação foi testada apenas com o meio de cultura, não se verificou qualquer ligação do RNA às MNP revestidas com dextrano. Assim, considerando este resultado foi ainda testado o aumento da concentração de MNP de 10 mg/mL para 30 mg/mL de maneira a tentar promover mais interações entre o RNA e as partículas.

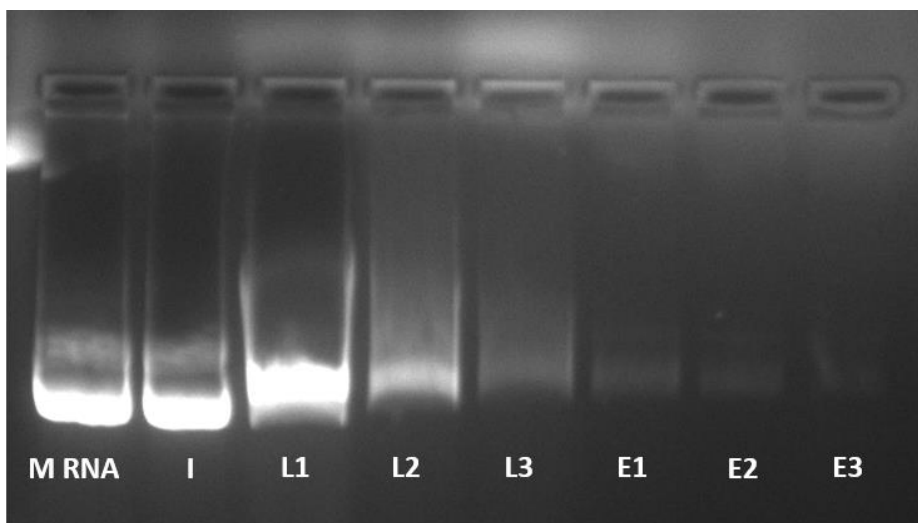


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose das amostras obtidas nos passos de ligação e eluição com [MNP]= 30 mg/mL. Ligação: meio de fermentação da *R. sulfidophilum* suplementado com RNA; Eluição: 10 mM de Tris-HCl a pH 7,5. M RNA: meio de fermentação da *R. sulfidophilum* suplementado com RNA I: Incubação; L1,L2 e L3: Ligação; E1,E2 e E3: Eluição após precipitação com etanol 100%.

O aumento da concentração de MNP de 10 mg/mL para 30 mg/mL levou a um ligeiro aumento na ligação do RNA às MNP. Para além disso reduziu-se o número de passos realizados para a ligação e eluição de maneira a tentar recuperar mais RNA e isso verificou-se como podemos observar nas colunas E1, E2 e E3. De uma maneira geral, esta poderá ser uma estratégia

promissora que poderá conduzir a uma maior ligação e recuperação do RNA presente em extratos complexos, requerendo ainda alguma otimização (figura 14).

Os ensaios anteriores foram desenhados para simular o meio de fermentação da *R. sulfidophilum* no entanto, é necessário estudar o comportamento de ligação do RNA às MNPs num meio de fermentação real uma vez que durante a fermentação há consumo de nutrientes e secreção de metabolitos que alteram a constituição do meio e, conseqüentemente, podem alterar as interações entre o RNA e as MNPs.

Assim, os ensaios realizados com o meio de fermentação da *R. sulfidophilum* foram feitos recorrendo a alíquotas do meio de fermentação da *R. sulfidophilum* após 40 horas de crescimento bacteriano já que, é nesse período em que ocorrem maiores níveis de RNA extracelular [24]. Podemos verificar, pela figura 15 que quando as MNP foram colocadas em contacto com alíquotas do meio de fermentação a percentagem de ligação foi de 10,6% e a eluição foi total.

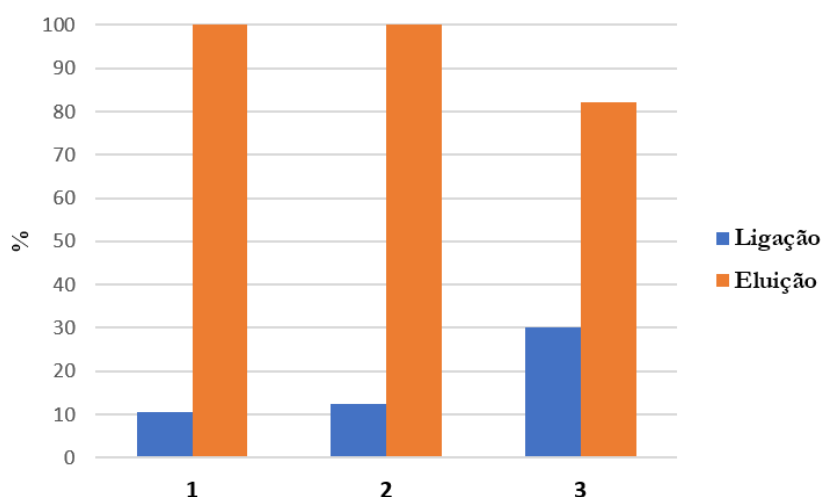


Figura 15 - Percentagem de ligação e eluição do RNA às MNPs revestidas com dextrano e com [MNP]= 10 mg/mL (1)Ligação: meio de fermentação da *R. sulfidophilum* após 40h; Eluição:10 mM de Tris-HCl a pH 7,5. (2) e (3) Ligação: meio de fermentação da *R. sulfidophilum* após 40 horas suplementado com uma solução de sulfato de amónio em que a concentração final foi 1,5 M e 3 M, respetivamente.

Este resultado de ligação do RNA às MNPs, sugere que podem não estar estabelecidas as melhores condições de ligação do RNA e, como nos resultados obtidos inicialmente concluímos que o aumento da força iónica e a variação do pH influenciavam a percentagem de ligação essa estratégia foi tida em consideração nos ensaios seguintes. Assim, de maneira a aumentar a percentagem de ligação do RNA às MNPs, a estratégia seguida foi a de determinar a concentração molar do meio de fermentação da *R. sulfidophilum* sabendo que pelos resultados obtidos anteriormente e com estratégias de purificação utilizadas no grupo que a maior concentração de sal promove a retenção do RNA [75]. Desse modo, constatou-se que a

concentração molar do meio de fermentação da *R. sulfidophilum* é de aproximadamente 0,5 M e, tendo em conta que durante o processo de fermentação são consumidos os nutrientes, decidiu-se suplementar as alíquotas com uma solução de sulfato de amónio, de maneira a promover mais ligações entre o RNA e as MNP, para se obter uma concentração final de 1,5 M e 3 M. Desse modo, podemos verificar pela figura 15 que o aumento da concentração molar final permitiu aumentar significativamente a ligação do RNA às MNP. Também é possível constatar que a percentagem de eluição diminuiu de 100% para 82,1%, o que pode dever-se à capacidade de ligação das MNP. A suplementação do meio com uma solução de sulfato de amónio permitiu aumentar a força iónica e, assim aumentar a percentagem de ligação. Este resultado é muito promissor, uma vez que este tipo de suplementação pode ser realizado em amostras reais para capturar o RNA tornando-se numa alternativa viável e exequível.

Capítulo 5 - Conclusão e Perspetivas Futuras

O estudo do RNA foi negligenciado durante algum tempo, em comparação com o DNA ou proteínas, uma vez que se considerava apenas um simples intermediário na sequência de informação de genes para as moléculas funcionais em células vivas. A noção de que os RNAs são muito mais do que moléculas envolvidas no armazenamento/transferência de informação genética, permitiu saber que o RNA desempenha diversas funções celulares, sendo responsável pelo controlo de muitos processos biológicos.

Ao longo dos últimos anos, a investigação avançou no sentido de identificar e desenvolver novos fármacos tendo por base o RNA, com o objetivo de tratar várias patologias. Contudo, as terapias baseadas em RNA, quer sendo utilizado como agente terapêutico ou como alvo terapêutico, requerem grandes quantidades de RNA com integridade, pureza e atividade biológica adequadas. No entanto, devido à suscetibilidade do RNA à degradação, torna-se necessário desenvolver novas técnicas de isolamento e recuperação de RNA, de maneira que a estabilidade química e a funcionalidade biológica não sejam prejudicadas. O desenvolvimento de processos economicamente viáveis para o isolamento/purificação de RNA, bem como a realização de métodos que sejam capazes de controlar a qualidade do RNA, serão uma prioridade para que os produtos de RNA cheguem aos mercados.

As MNP são uma alternativa eficaz nos processos de recuperação do RNA. As MNP tendem a ser instáveis em solução, sendo necessário modificar a superfície com polímeros de maneira a aumentar a estabilidade e a funcionalidade. Assim, neste trabalho procedeu-se à síntese e funcionalização de MNP de maneira a aumentar o rendimento de recuperação deste ácido nucleico, a partir de meios de cultura. Um estudo de otimização foi feito para melhorar as condições de ligação e eluição, que representam um passo crítico em qualquer novo suporte de recuperação. Assim, numa fase inicial, para que fosse possível implementar um processo de recuperação eficaz, testaram-se as MNP revestidas com o polímero dextrano de maneira a avaliar as interações inespecíficas entre o RNA e as partículas e saber em que condições eram minimizadas. De uma forma geral foi concluído que para evitar interações inespecíficas se deveria aplicar um tampão de baixa força iónica, uma vez que aumentando a concentração de sal, a ligação de RNA era mais significativa. Nesta avaliação inicial foram também testados diferentes valores de pH, sendo concluído que baixando o pH de 8 para 7 induzia a aglomeração das MNPs, observando-se uma adsorção aos *ependorfs* tornando os ensaios irreproduzíveis já que as partículas deixavam de responder ao poder magnético.

Para avaliar a especificidade da captura do RNA foram funcionalizadas as MNPs com aminoácidos, no entanto foram encontradas percentagens de ligação muito reduzidas o que pode ser devido à baixa densidade de ligando imobilizado. Neste âmbito seria ideal otimizar a

etapa de funcionalização, numa perspetiva futura, de modo a explorar a vertente de captura de um RNA específico, recorrendo à especificidade da ligação aos ligandos das MNPs.

Uma vez que, com a estratégia de recuperação do RNA com as MNP funcionalizadas não se conseguiu obter os resultados esperados, foram testadas as MNP revestidas com dextrano para capturar RNA total do meio de fermentação da *R. sulfidophilum* suplementado com RNA. Como os resultados de ligação obtidos foram relativamente baixos e, sabendo que durante o processo de fermentação há consumo de nutrientes e libertação de metabolitos para o meio que alteram a sua constituição, a estratégia adotada passou por avaliar o desempenho das MNP com o RNA em amostras reais de fermentação da *R. sulfidophilum*. Numa primeira abordagem verificou-se uma recuperação de 10,6% de RNA. Tendo em conta os resultados preliminares que indicavam a influência da força iónica na retenção, foi testada a suplementação das alíquotas de meio com uma solução de sulfato de amónio de maneira a obter uma concentração final de 1,5 M e 3 M. Esta alteração resultou num aumento da percentagem de ligação de RNA de 10,6% para 12,3% quando a concentração é de 1,5M e depois, com uma concentração de 3M, a percentagem de ligação foi de 30,2%. Estes resultados confirmam que o aumento da força iónica promove mais interações entre o RNA e as MNP.

Concluindo, o tipo e a concentração de sal e o pH têm uma grande influencia nas estratégias de ligação/eluição utilizadas e, conseqüentemente, nas diferentes interações que se estabelecem. A avaliação destas interações pode levar à criação de novas estratégias de recuperação e assim, aumentar a percentagem de ligação do RNA às MNPs. A temperatura a que é feita o passo de incubação dos ensaios, no futuro, também pode ser um passo em ter em conta devido às características conhecidas do RNA, como a sua instabilidade. Em relação à funcionalização das MNP, o método utilizado deverá ser otimizado ou alterado de maneira a que nos próximos ensaios a realizar, se consiga aumentar a ligação e, conseqüentemente a recuperação, bem como, no futuro poder ter alguma seletividade.

Capítulo 6 - Bibliografia

1. Gomes, A. Q., Nolasco, S., & Soares, H. (2013). Non-coding RNAs: Multi-tasking molecules in the cell. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 16010-16039. doi:10.3390/ijms140816010
2. Martins, R., Queiroz, J. A., & Sousa, F. (2014). Ribonucleic acid purification. *Journal of Chromatography A*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.chroma.2014.05.075
3. Ling, H., Fabbri, M., & Calin, G. A. (2013). MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nature Publishing Group*, 12(11), 847-865. doi:10.1038/nrd4140
4. Kaczmarek, J. C., Kowalski, P. S., & Anderson, D. G. (2017). Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality. *Genome Medicine*, 9(1), 60. doi:10.1186/s13073-017-0450-0
5. Burnett, J., & Rossi, J. (2012). RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chemistry & biology*, 19(1), 60-71. doi:10.1016/j.chembiol.2011.12.008.RNA-based
6. Kreiter, S., Diken, M., Selmi, A., Türeci, Ö., & Sahin, U. (2011). Tumor vaccination using messenger RNA: Prospects of a future therapy. *Current Opinion in Immunology*, 23(3), 399-406. doi:10.1016/j.coi.2011.03.007
7. Tenson, T., & Mankin, A. (2006). Antibiotics and the ribosome. *Molecular Microbiology*, 59(6), 1664-1677. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05063.x
8. van Raam, B. J., & Salvesen, G. S. (2010). Transferring Death: A Role for tRNA in Apoptosis Regulation. *Molecular Cell*, 37(5), 591-592. doi:10.1016/j.molcel.2010.02.001
9. Belostotsky, R., Frishberg, Y., & Entelis, N. (2012). Human mitochondrial tRNA quality control in health and disease: a channelling mechanism? *RNA biology*, 9(1), 33-39. doi:10.4161/rna.9.1.18009
10. Matera, A. G., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2007). Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3), 209-220. doi:10.1038/nrm2124
11. Kiss, T. (2001). Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO Journal*, 20(14), 3617-3622. doi:10.1093/emboj/20.14.3617
12. Dias, N., & Stein, C. a. (2002). Minireview Antisense Oligonucleotides : Basic Concepts and Mechanisms. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1, 347-355. doi:10.1016/s1357-4310(99)01638-x

13. Brantl, S. (2002). Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim Biophys Acta*, 1575(1-3), 15-25. doi:S0167478102002804 [pii]
14. Kusenda, B., Mraz, M., Mayer, J., & Pospisilova, S. (2006). MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 150(2), 205-215. doi:10.5507/bp.2006.029
15. Lin, S. L., Miller, J. D., & Ying, S. Y. (2006). Intronic microRNA (miRNA). *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2006, 1-13. doi:10.1155/JBB/2006/26818
16. Doench, J. G., Petersen, C. P., & Sharp, P. A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes and Development*, 17(4), 438-442. doi:10.1101/gad.1064703
17. Ghildiyal, M., & Zamore, P. D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics*, 10(2), 94-108. doi:10.1038/nrg2504
18. Phylactou, L. A., Kilpatrick, M. W., & Wood, M. J. A. (1998). Ribozymes as therapeutic tools for genetic disease. *Human Molecular Genetics*, 7(10), 1649-1653. doi:10.1093/hmg/7.10.1649
19. Tucker, B. J., & Breaker, R. R. (2005). Riboswitches as versatile gene control elements. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(3 SPEC. ISS.), 342-348. doi:10.1016/j.sbi.2005.05.003
20. Wittmann, A., & Suess, B. (2012). Engineered riboswitches: Expanding researchers' toolbox with synthetic RNA regulators. *FEBS Letters*, 586(15), 2076-2083. doi:10.1016/j.febslet.2012.02.038
21. Blount, K. F., & Breaker, R. R. (2006). Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nature Biotechnology*, 24(12), 1558-1564. doi:10.1038/nbt1268
22. Mayer, G. (2009). The chemical biology of aptamers. *Angewandte Chemie - International Edition*, 48(15), 2672-2689. doi:10.1002/anie.200804643
23. Ni, X., Castanares, M., Mukherjee, A., & Lupold, S. E. (2011). Nucleic Acid Aptamers: Clinical Applications and Promising New Horizons. *Current Medicinal Chemistry*, 18(27), 4206-4214. doi:10.2174/092986711797189600
24. Pereira, P., Pedro, A. Q., Queiroz, J. A., & Figueiras, A. R. (2017). New insights for therapeutic recombinant human miRNAs heterologous production: *Rhodovulum sulfidophilum* vs *Escherichia coli*. *Bioengineered*, 0(0), 1-8. doi:10.1080/21655979.2017.1284710
25. Sullenger, B. a, & Gilboa, E. (2002). Emerging clinical applications of RNA. *Nature*, 418(July), 252-258. doi:10.1038/418252^a

26. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *391*(6669), 806-811. doi:10.1038/35888
27. Sahin, U., Karikó, K., & Türeci, Ö. (2014). mRNA-based therapeutics – developing a new class of drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, *13*(10), 759-780. doi:10.1038/nrd4278
28. Pascolo, S. (2006). Vaccination with messenger RNA. *Methods in molecular medicine*, *127*, 23-40. doi:10.1385/1-59745-168-1:23
29. Deng, Y., Wang, C. C., Choy, K. W., Du, Q., Chen, J., Wang, Q., ... Tang, T. (2014). Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: Principles, challenges, and new strategies. *Gene*, *538*(2), 217-227. doi:10.1016/j.gene.2013.12.019
30. Ramachandran, P. V., & Ignacimuthu, S. (2013). RNA interference - A silent but an efficient therapeutic tool. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *169*(6), 1774-1789. doi:10.1007/s12010-013-0098-1
31. Nidhi, K., Indrajeet, S., Khushboo, M., Gauri, K., & Sen, D. J. (2011). Hydrotropy: A promising tool for solubility enhancement: A review. *International Journal of Drug Development and Research*, *3*(2), 26-33. doi:10.1002/jps
32. Dessy, A., & Gorman, J. M. (2011). The Emerging Therapeutic Role of RNA Interference in Disorders of the Central Nervous System. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *89*(3), 450-454. doi:10.1038/clpt.2010.312
33. Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, *136*(2), 215-233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
34. Siomi, H., & Siomi, M. C. (2009). On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, *457*(7228), 396-404. doi:10.1038/nature07754
35. Maes, O. C., Chertkow, H. M., Wang, E., & Schipper, H. M. (2009). MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders. *Current genomics*, *10*(3), 154-68. doi:10.2174/138920209788185252
36. Kosik, K. S. (2006). The neuronal microRNA system. *Nature reviews. Neuroscience*, *7*(12), 911-920. doi:10.1038/nrn2037
37. Beckert, B., & Masquida, B. (2011). Synthesis of RNA by In Vitro Transcription. In *RNA, Methods in Molecular Biology* (Vol. 703, pp. 29-41). doi:10.1007/978-1-59745-248-9_3
38. Ponchon, L., & Dardel, F. (2007). Recombinant RNA technology: the tRNA scaffold. *Nature Methods*, *4*(7), 571-576. doi:10.1038/nmeth1058

39. Chen, S., Ni, M., Yu, B., Lv, T., Lu, M., & Gong, F. (2007). Construction and identification of a human liver specific microRNA eukaryotic expression vector. *Cell Mol Immunol*, 4(6), 473-477. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18163960
40. Ponchon, L., & Dardel, F. (2011). Large scale expression and purification of recombinant RNA in Escherichia coli. *Methods*. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.ymeth.2011.02.007
41. Huang, Y., Zou, Q., Wang, S., Tang, S., Zhang, G., & Shen, X. (2011). Construction and detection of expression vectors of microRNA-9a in BmN cells. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 12(7), 527-33. doi:10.1631/jzus.B1000296
42. Li, M. M., Wang, W. P., Wu, W. J., Huang, M., & Yu, A. M. (2014). Rapid production of novel pre-MicroRNA agent hsa-mir-27b in escherichia coli using recombinant RNA technology for functional studies in mammalian cells. *Drug Metabolism and Disposition*, 42(11), 1791-1795. doi:10.1124/dmd.114.060145
43. Umekage, S., & Kikuchi, Y. (2009). In vitro and in vivo production and purification of circular RNA aptamer. *Journal of Biotechnology*, 139(4), 265-272. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.12.012
44. Wassarman, K. M., Zhang, A., & Storz, G. (1999). Small RNAs in Escherichia coli. *Trends in Microbiology*. doi:10.1016/S0966-842X(98)01379-1
45. Wei, Z., Huang, W., Li, J., Hou, G., Fang, J., & Yuan, Z. (2007). Studies on endotoxin removal mechanism of adsorbents with amino acid ligands. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 852(1-2), 288-292. doi:10.1016/j.jchromb.2007.01.038
46. Suzuki, H., Ando, T., Umekage, S., Tanaka, T., & Kikuchi, Y. (2010). Extracellular production of an RNA aptamer by ribonuclease-free marine bacteria harboring engineered plasmids: A proposal for industrial RNA drug production. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3), 786-793. doi:10.1128/AEM.01971-09
47. Suzuki, H., Umekage, S., Tanaka, T., & Kikuchi, Y. (2011). Artificial RNA aptamer production by the marine bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*: Improvement of the aptamer yield using a mutated transcriptional promoter. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(5), 458-461. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.07.025
48. Nagao, N., Suzuki, H., Numano, R., Umekage, S., & Kikuchi, Y. (2014). Short hairpin RNAs of designed sequences can be extracellularly produced by the marine bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 60(6), 222-226. doi:10.2323/jgam.60.222

49. Ando, T., Suzuki, H., Komura, K., Tanaka, T., & Hiraishi, A. (2004). Extracellular RNAs produced by a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*, (48), 165-166.
50. Ando, T., Suzuki, H., Nishimura, S., Tanaka, T., Hiraishi, A., & Kikuchi, Y. (2006). Characterization of extracellular RNAs produced by the marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *Journal of Biochemistry*, 139(4), 805-811. doi:10.1093/jb/mvj091
51. Suzuki, H., Daimon, M., Awano, T., Umekage, S., Tanaka, T., & Kikuchi, Y. (2009). Characterization of extracellular DNA production and flocculation of the marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(2), 349-356. doi:10.1007/s00253-009-2031-7
52. Kadar, E., Batalha, Í. L., Fisher, A., & Roque, A. C. A. (2014). The interaction of polymer-coated magnetic nanoparticles with seawater. *Science of the Total Environment*, 487(1), 771-777. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.082
53. Prathna T.C. , Lazar Mathew, N. Chandrasekaran, Ashok M. Raichur, A. (2010). *Biomimetic Synthesis of Nanoparticles: Science, Technology & Applicability. Design, Control and Applications of Mechatronic Systems in Engineering*. doi:10.5772/67458
54. Bobik, M., Korus, I., & Dudek, L. (2017). The effect of magnetite nanoparticles synthesis conditions on their ability to separate heavy metal ions. *Archives of Environmental Protection*, 43(2), 3-9. doi:10.1515/aep-2017-0017
55. Safarik, I., & Safarikova, M. (2009). Magnetic nano- and microparticles in biotechnology. *Chemical Papers*, 63(5), 497-505. doi:10.2478/s11696-009-0054-2
56. Batalha, I. L., Zhou, H., Lilley, K., Lowe, C. R., & Roque, A. C. A. (2016). Mimicking nature: Phosphopeptide enrichment using combinatorial libraries of affinity ligands. *Journal of Chromatography A*, 1457, 76-87. doi:10.1016/j.chroma.2016.06.032
57. S P Gubin, Yu A Koksharov, G B Khomutov, G. Y. Y. (2005). Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties. *Russian Chemical Reviews*, 74(6), 489-520. doi:10.1070/RC2005v074n06ABEH000897
58. Fernandes, C. S. M., Ottengy, S., Canani, A., Béhar, G., Mouratou, B., Pecorari, F., & Roque, A. C. A. (2016). Affitins for protein purification by affinity magnetic fishing. *Journal of Chromatography A*, 1457, 50-58. doi:10.1016/j.chroma.2016.06.020
59. Wu, W., He, Q., & Jiang, C. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Research Letters*, 3(11), 397-415. doi:10.1007/s11671-008-9174-9
60. Bucak, S., Jones, D. A., Laibinis, P. E., & Hatton, T. A. (2003). Protein Separations Using Colloidal Magnetic Nanoparticles. *Biotechnology Progress*, 9(2), 477-484.

61. Meyer, A., Hansen, D. B., Gomes, C. S. G., Hobley, T. J., Thomas, O. R. T., & Franzreb, M. (2005). Demonstration of a strategy for product purification by high-gradient magnetic fishing: Recovery of superoxide dismutase from unconditioned whey. *Biotechnology Progress*, 21(1), 244-254. doi:10.1021/bp049656c
62. Lattuada, M., & Hatton, T. A. (2007). Functionalization of Monodisperse Magnetic Nanoparticles Functionalization of Monodisperse Magnetic Nanoparticles. *Langmuir*, 23(4), 2158-2168. doi:10.1021/la062092x
63. Roque, A. C. A., & Wilson, O. C. (2008). Adsorption of gum Arabic on bioceramic nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 28(3), 443-447. doi:10.1016/j.msec.2007.04.009
64. Wilson, O. C., Blair, E., Kennedy, S., Rivera, G., & Mehl, P. (2008). Surface modification of magnetic nanoparticles with oleylamine and gum Arabic. *Materials Science and Engineering C*, 28(3), 438-442. doi:10.1016/j.msec.2007.04.008
65. Batalha, I. L., Hussain, A., & Roque, A. C. A. (2010). Gum arabic coated magnetic nanoparticles with affinity ligands specific for antibodies. *Journal of Molecular Recognition*, 23(5), 462-471. doi:10.1002/jmr.1013
66. Santana, S. D. F., Dhadge, V. L., & Roque, A. C. A. (2012). Dextran-coated magnetic supports modified with a biomimetic ligand for IgG purification. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 4(11), 5907-5914. doi:10.1021/am301551n
67. Rosická, D., & Sembera, J. (2011). Influence of structure of iron nanoparticles in aggregates on their magnetic properties. *Nanoscale research letters*, 6, 527. doi:10.1186/1556-276X-6-527
68. Morales, M. P., & Serna, C. J. (1998). Continuous production of γ -Fe₂O₃ ultrafine powders by laser pyrolysis. *Materials Letters*, 35(May), 227-231.
69. Hyeon, T. (2003). Chemical synthesis of magnetic nanoparticles. *Chemical communications (Cambridge, England)*, (September 2002), 927-934.
70. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Elst, L. Vander, & Muller, R. N. (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews*, 108(6), 2064-2110.
71. Cristea, C., Tertis, M., & Galatus, R. (2017). Magnetic nanoparticles for antibiotics detection. *Nanomaterials*, 7(6). doi:10.3390/nano7060119
72. Lu, A. H., Salabas, E. L., & Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie - International Edition*. doi:10.1002/anie.200602866

73. A.M.G.C. Dias, A. Hussain, A.S. Marcos, A. C. A. R. (2011). A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29, 142-155. doi:10.1007/s12274-016-1131-9
74. Pereira, P., Sousa, Â., Queiroz, J. a., Figueiras, A., & Sousa, F. (2014). Pharmaceutical-grade pre-miR-29 purification using an agmatine monolithic support. *Journal of Chromatography A*, 1368, 173-182. doi:10.1016/j.chroma.2014.09.080
75. Pereira, P., Sousa, Â., Queiroz, J., Correia, I., Figueiras, A., & Sousa, F. (2014). Purification of pre-miR-29 by arginine-affinity chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 951-952(1), 16-23. doi:10.1016/j.jchromb.2014.01.020
76. Silva, F., Passarinha, L., Sousa, F., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C. (2008). Influence of Growth Conditions on Plasmid DNA Production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(November), 1-7. doi:10.4014/jmb.0805.329
77. Kim, D. Y., Kim, Y. B., & Rhee, Y. H. (2000). Evaluation of various carbon substrates for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates bearing functional groups by *Pseudomonas putida*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28(1), 23-29. doi:10.1016/S0141-8130(00)00150-1
78. Pedro, A. Q., Bonifácio, M. J., Queiroz, J. A., Maia, C. J., & Passarinha, L. A. (2011). A novel prokaryotic expression system for biosynthesis of recombinant human membrane-bound catechol-O-methyltransferase. *Journal of Biotechnology*, 156(2), 141-146. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.08.022
79. Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Nature Protocols*, 1(1), 581-585. doi:10.1016/0003-2697(87)90021-2
80. Afonso, A., Pereira, P., Queiroz, J. A., Sousa, Â., & Sousa, F. (2014). Purification of pre-miR-29 by a new O-phospho-l-tyrosine affinity chromatographic strategy optimized using design of experiments. *Journal of Chromatography A*, 1343, 119-127. doi:10.1016/j.chroma.2014.03.071