



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

Carbocianinas em cromatografia de afinidade

Ivo Manuel Sobral Cordeiro Paulo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Biotecnologia

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Renato Emanuel Félix Boto

Covilhã, junho de 2015

Dedicatória

A todos aqueles,
que partilhando comigo as suas vidas,
me ajudaram de uma forma ou de outra,
nesta longa e árdua caminhada.
Um especial agradecimento ao meu avô.

Resumo

Diferentes áreas da biologia dependem da cromatografia para obtenção de biomoléculas, sendo a cromatografia de afinidade o método de purificação mais seletivo para proteínas e outras biomoléculas.

O desenvolvimento de novos suportes cromatográficos tem sido um tema investigado intensivamente no intuito de se encontrar um bom suporte, que reúna um equilíbrio ideal de características, tais como custos baixos, eficiência, elevada capacidade e estabilidade físico-química.

Utilizando a esterificação de Steglich, que em anteriores trabalhos se tinha mostrado eficaz para a imobilização de ligandos a uma matriz de agarose, foram sintetizados vários suportes cromatográficos com dois ligandos e diferentes densidades de ligando.

Como ligandos imobilizados foram utilizadas duas carbocianinas simétricas que diferem no número de anéis aromáticos da sua constituição. As carbocianinas simétricas são constituídas por dois anéis heterocíclicos iguais ligados por uma cadeia de três átomos de carbono com ligações duplas conjugadas.

Posteriormente, foram estudadas as interações de afinidade entre os suportes cromatográficos obtidos e as várias proteínas modelo, dando preferência às interações iônicas e hidrofóbicas. Dentro de todos os resultados obtidos, o suporte com concentração inicial de 0,078mmol de ligando, apresentou picos mais bem definidos, tanto na separação da mistura proteica como nos testes com as proteínas isoladas, indicando ser o melhor suporte numa separação cromatográfica.

Estes estudos permitiram demonstrar o potencial da aplicabilidade de ligandos catiónicos, tais como as carbocianinas, para a separação e purificação de proteínas por cromatografia de afinidade.

Palavras-chave

Cromatografia de afinidade, carbocianinas, esterificação de Steglich, purificação de proteínas, sais de amónio quaternário.

Abstract

Different areas of biology depend on the chromatography in order to obtain biomolecules, being the affinity chromatography the most selective method of purification for proteins and other biomolecules.

The development of new chromatographic supports has been a topic investigated intensively in order to find a good support, bringing together an ideal balance of features, such as low cost, efficiency, high capacity and physical and chemical stability.

Using the Steglich esterification, which in previous work had shown itself effective for immobilization of ligands to an agarose matrix, were synthesized various chromatographic supports with two ligands and different densities of ligand.

As ligands immobilized were used two symmetric carbocyanines which differ in the number of aromatic rings. The symmetrical carbocyanines consist of two equal heterocyclic rings connected by a chain of three carbon atoms with conjugated double bonds.

Later, the affinity chromatographic interactions between the chromatographic supports and the various model proteins were studied, giving preference to ionic and hydrophobic interactions. Within all results obtained, the support with initial concentration of 0,078mmol of ligand, presented more clearly defined peaks, both in the separation of the protein mixture as in the tests with isolated proteins, indicating the best support a chromatographic separation.

These studies have made it possible to demonstrate the potential of the applicability of cationic ligands, such as the carbocyanines, for the separation and purification of proteins by affinity chromatography.

Keywords

Affinity chromatography, Carbocyanine, Steglich esterification, Protein purification, Quaternary ammonium salts.

Índice

Dedicatória	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice	ix
Lista de Figuras	xiii
Lista de Acrónimos	xvii
Objetivos	xx
CAPITULO I. INTRODUÇÃO	1
1.1 Cromatografia	2
1.1.1 Processo cromatográfico	3
1.1.2 Métodos cromatográficos	4
1.1.3 Cromatografia de afinidade	5
1.1.3.1 Matriz	5
1.1.3.2 Braço espaçador	7
1.1.3.3 Ligandos	8
1.1.3.4 Imobilização	9
1.2 Carbocianinas	10
1.2.1 Aspectos gerais	10
1.2.2 Métodos de síntese	12
1.2.3 Características e aplicações	12
CAPITULO II. PARTE EXPERIMENTAL	15
2.1 Materiais, solventes e reagentes	16
2.2 Equipamentos	16
2.3 Síntese de sais quaternários	17
	ix

2.3.1	Síntese de brometo de 1-(10-carboxidecil)-2,3,3-trimetil-3H-indól-1-io	17
2.3.2	Síntese de brometo de 3-(10-carboxidecil)-1,1,2-trimetil-1H-benzo[e]indól-3-io	17
2.4	Síntese de carbocianinas	17
2.4.1	Síntese de iodeto de 1-(10-carboxidecil)-2-((E)-3-((Z)-1-(10-carboxidecil)-3,3-dimetilindolin-2-ilidene)prop-1-en-1-il)-3,3-dimetil-3H-indól-1-io	18
2.4.2	Síntese de iodeto de 3-(10-carboxidecil)-2-((1E,3Z)-3-(3-(10-carboxidecil)-1,1-dimetil-1,3-dihidro-2H-benzo[e]indol-2-ilidene)prop-1-en-1-il)-1,1-dimetil-1H-benzo[e]indól-3-io	18
2.5	Preparação de novos suportes cromatográficos	19
2.5.1	Sepharose CL-6B	19
2.5.2	Esterificação de Steglich	19
2.6	Ensaio cromatográficos	19
2.6.1	Condições iônicas	20
2.6.1.1	Ensaio cromatográficos a pH 9	21
2.6.1.2	Ensaio cromatográficos a pH 10	21
2.6.2	Condições hidrofóbicas	22
2.6.3	Ensaio cromatográficos com mistura artificial de proteínas	22
CAPITULO III. RESULTADOS E DISCUSSÃO		23
3.1	Síntese de sais quaternários e carbocianinas	24
3.2	Preparação dos suportes cromatográficos	25
3.3	Estudos de cromatografia de afinidade	25
3.3.1	Condições iônicas	25
3.3.1.1	Estudos cromatográficos a pH 9	32
3.3.1.2	Estudos cromatográficos a pH 10	36
3.3.2	Condições hidrofóbicas	40
3.3.3	Estudos cromatográficos com mistura artificial de proteínas	44

CAPITULO IV. CONCLUSÕES	47
CAPITULO V. PERSPECTIVAS FUTURAS	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

Lista de Figuras

Capítulo I.

- Figura 1 - Representação esquemática das interações das cromatografias de: a) exclusão molecular, b) interação iônica, c) interação hidrofóbica, d) fase reversa e e) afinidade. (adaptado de Healthcare, 2010b). 4
- Figura 2 - Esquema de ligação em CA (adaptada de Sattasai N., 2012) 5
- Figura 3 - Modelo que demonstra a distribuição de poros num gel hidrofílico utilizado em cromatografia de exclusão molecular (adaptada de Sattasai N., 2012) 6
- Figura 4 - Estrutura parcial da Seharose e Sepharose CL, respectivamente. 7
- Figura 5 - Cromatograma representando o perfil de eluição na presença e na ausência de braço espaçador (adaptada de Magdeldin et al., 2012) 8
- Figura 6 - Estrutura química do corante-ligando Cibacron Blue F3G-A, comumente utilizado na purificação de albumina do soro bovino. 9
- Figura 7 - Estrutura geral das cianinas 11

Capítulo III.

- Figura 8 - Estrutura das carbocianinas sintetizadas. 24
- Figura 9 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A e B. Injeção de 50µL de Lisozima (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de Tris-HCl 10mM a pH 8 e dois passos de eluição com uma solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e uma solução tampão de NaCl 2M em Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro) 26
- Figura 10 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, C, D, E, F, G e H. Injeção de 50µL de Lisozima (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e dois passos de eluição com uma solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e uma solução tampão de NaCl 2M em Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro) 27
- Figura 11 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, C, D, E, F, G e H. Injeção de 50µL de RNase (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e dois passos de eluição com uma solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e uma solução tampão de NaCl 2M em 28

Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro)

Figura 12 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, C, D, E, F, G e H. Injeção de 50µL de α-Quimotripsina (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e dois passos de eluição com uma solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e uma solução tampão de NaCl 2M em Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro) 29

Figura 13 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, C, D, E, F, G e H. Injeção de 50µL de BSA (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e dois passos de eluição com uma solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e uma solução tampão de NaCl 2M em Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro) 31

Figura 14 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, C, D, E, F, G e H. Injeção de 50µL de Gamaglobulina (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e dois passos de eluição com uma solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e uma solução tampão de NaCl 2M em Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro) 32

Figura 15 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50µL de lisozima (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 9 e para o passo de eluição uma solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 9 (representados pela linha a negro) 34

Figura 16 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50µL de RNase (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 9 e para o passo de eluição uma solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 9 (representados pela linha a negro) 35

Figura 17 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50µL de α-quimotripsina (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 9 e para o passo de eluição uma solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 9 (representados pela linha a negro) 36

Figura 18 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50µL de lisozima (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de carbonato de sódio 10mM a pH 10 e para o passo de eluição uma solução tampão de NaCl 1M em carbonato de sódio 10mM a pH 10 (representados pela linha a negro) 38

Figura 19 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50µL de lisozima (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de NaCl 0,015M em carbonato de sódio 10mM a pH 10 e para o passo de eluição uma solução tampão de NaCl 39

1M em carbonato de sódio 10mM a pH 10 (representados pela linha a negro)

Figura 20 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50µL de RNase (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de carbonato de sódio 10mM a pH 10 e para o passo de eluição solução tampão de NaCl 1M em carbonato de sódio 10mM a pH 10 (representados pela linha a negro) 40

Figura 21 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50µL de lisozima (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de (NH₄)₂SO₄ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e para o passo de eluição uma solução tampão de (NH₄)₂SO₄ 0,6M em Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro) 41

Figura 22 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50µL de RNase (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de (NH₄)₂SO₄ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e para o passo de eluição uma solução tampão de (NH₄)₂SO₄ 0,6M em Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro) 42

Figura 23 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50µL de tripsina (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de (NH₄)₂SO₄ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e para o passo de eluição uma solução tampão de (NH₄)₂SO₄ 0,6M em Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro) 43

Figura 24 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50µL de BSA (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de (NH₄)₂SO₄ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e dois passos de eluição com uma solução tampão de (NH₄)₂SO₄ 0,6M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e solução de Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro) 44

Figura 25 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50µL de uma mistura artificial de proteínas (BSA a 12,5mg/mL, lisozima a 12,5mg/mL e RNase a 12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de (NH₄)₂SO₄ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e dois passos de eluição com uma solução tampão de (NH₄)₂SO₄ 0,6M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e uma solução de Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro) 46

Lista de Acrónimos

BSA	Albumina do soro bovino
CA	Cromatografia de afinidade
°C	Graus centígrados
c.c.f	Cromatografia de camada fina
d	Multiplicidade de sinal, duplete
DCC	diciclohexilcarbodiimida
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramas
h	Hora
<i>J</i>	Constante de acoplamento, em Hz
kDa	kilodalton
m	Multiplicidade de sinal, multiplete
Hz	Hertz
M	Molar
MHz	Mega Hertz
mL	Militro
mmol	Milimole
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
pH	Potencial de hidrogénio
p.f.	Ponto de fusão
pI	Ponto Isoelétrico
PM	Peso molecular
ppm	Partes por milhão
RNase	Ribonuclease A

RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de próton
s	Multiplicidade de sinal, singleto
t	Multiplicidade de sinal, tripleto
TMS	Tetrametilsilano
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV/Vis	Ultravioleta/visível
UK	United Kingdom
USA	United States of America
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
δ	Desvio químico, em ppm.

Objetivos

Com este trabalho pretende-se avaliar o potencial de duas carbocianinas como possíveis e inovadores ligandos de afinidade para a separação e purificação de proteínas.

O uso de corantes têxteis em cromatografia de afinidade (CA) tem sido bastante estudado, contudo o uso de cianinas como ligandos em CA, só muito recentemente foi estudado e com bons resultados. Esta escolha teve por base as potenciais propriedades singulares e promissoras deste tipo de ligando para o processo de afinidade uma vez que pode ser responsável por diferentes tipos de interações moleculares com as proteínas.

Objetiva-se a síntese de corantes cianínicos, para a preparação de suportes cromatográficos de Sepharose CL-6B com diferentes concentrações de ligando de forma a:

- Avaliar a influência da concentração de ligando na CA.
- Avaliar a existência de interação seletiva das diferentes proteínas com o ligando, em condições hidrofóbicas e iônicas.

CAPITULO I.
INTRODUÇÃO

1.1 Cromatografia

O conceito de separação de biomoléculas por meio de interações bioespecíficas com substratos imobilizados antecede ao início do século XX. Um farmacologista alemão, Emil Starkenstein, descreve no seu trabalho o conceito de separação de macromoléculas utilizando as interações com um substrato imobilizado. No trabalho publicado, descreve a influência de cloro na atividade enzimática da amilase do fígado, sendo considerado o responsável pela primeira demonstração de adsorção bioespecífica (Zachariou, 2008).

A maioria dos processos de purificação atuais utilizam diversas formas de cromatografia, tornando-a assim um processo essencial em laboratório ou em larga escala. Determinados produtos requerem uma pureza elevada que é conseguida através da combinação de diferentes técnicas cromatográficas com diferentes seletividades (Healthcare, 2010b). Por isso, a evolução dos processos biotecnológicos criou a necessidade de um desenvolvimento de técnicas, tecnologias e métodos de purificação de proteínas e outras biomoléculas (Janson, 2011).

Hoje, existem comercialmente disponíveis uma grande variedade de materiais para empacotamento de colunas, bem como técnicas e instrumentações avançadas. No entanto, a dificuldade de encontrar um método barato que mantenha a estabilidade biológica das biomoléculas, com alto rendimento e uma pureza de alta confiança ainda permanece (Janson, 2011).

De forma a aumentar a pureza das biomoléculas, exigida para aplicações industriais ou farmacêuticas, muitas vezes são utilizados vários passos cromatográficos consecutivos. A utilização de vários passos cromatográficos leva a perdas significativas na quantidade final de biomolécula purificada. Para contornar este problema são necessárias técnicas e estratégias de forma a diminuir o número de passos necessários. A CA apresenta-se assim como uma forma de maximizar o rendimento, pois permite reduzir para o mínimo o número de passos necessários e conseqüentemente diminuir as perdas de biomolécula (Healthcare, 2010b).

Desde o aparecimento da CA, à cerca de 50 anos, as purificações tradicionais baseadas em pH ou força iônica foram substituídas pela sofisticada abordagem da CA. Cerca de 60% das técnicas de purificação hoje em dia, utilizam formas de CA (Magdeldin, 2012).

Esta técnica tem como fundamento que todas as biomoléculas têm inerente um local de reconhecimento único através do qual é possível ligar uma molécula natural ou sintetizada. Utilizando uma molécula imobilizada numa matriz é assim possível reter as biomoléculas em determinadas condições (Magdeldin, 2012).

Apesar da CA ainda se encontrar em desenvolvimento, esta tem um papel muito importante nas variadas tecnologias “Omicas”, como a genómica e proteómica e a metabolómica. Permite aos investigadores explorar novos campos como as interações

proteína-proteína, modificações pós-traducionais e degradações proteicas. O seu acoplamento com espectrometria de massa permitiu a descoberta de novos biomarcadores (Magdeldin, 2012).

1.1.1 Processo Cromatográfico

A separação cromatográfica depende do diferencial de partição das biomoléculas entre a fase estacionária (suporte cromatográfico) e a fase móvel (eluente). A fase estacionária encontra-se empacotada numa coluna enquanto a fase móvel flui através da coluna.

A cromatografia em coluna demonstrou-se uma técnica extremamente poderosa para a separação de biomoléculas (Janson, 2011).

Antes de se iniciar uma purificação é necessário ter em atenção às características mais importantes da biomolécula e das suas impurezas mais comuns, tais como o peso molecular, ponto isoelétrico (pI), grau de hidrofobicidade, presença de glicoproteínas ou presença de grupos mercaptanos. Deve ser estabelecido um critério quanto à estabilidade da biomolécula obtida. Existem variados parâmetros que afetam a estabilidade da biomolécula e devem ser controlados, o pH, a temperatura, percentagem de oxigénio, presença de metais e a utilização de solventes orgânicos são alguns desses parâmetros. Deve também ter-se em especial atenção ao risco de degradação proteolítica (Janson, 2011).

Biomoléculas com grande afinidade para a fase estacionária vão se movimentar mais lentamente eluindo posteriormente, comparativamente a biomoléculas com maior afinidade para a fase móvel. Na maioria dos casos a cromatografia utiliza um eluente líquido, no entanto para compostos mais voláteis pode ser utilizado um gás em cromatografia gasosa.

O sistema solução-proteína-matriz tem como objetivo minimizar a cada momento a energia livre, promovendo a adesão da proteína ao ligado (Janson, 2011).

Para a eluição das proteínas podem ser utilizadas três métodos:

- Eluição isocrática, em que a ligação é promovida com um tampão, e a eluição é promovida com um tampão diferente, alterando muitas vezes a força iónica ou o pH (Janson, 2011);
- Eluição por gradiente, em que a ligação é promovida com um tampão de ligação. Para a eluição, a percentagem de tampão de ligação vai gradualmente diminuindo enquanto a percentagem de tampão de eluição vai aumentando. Contrariamente à eluição isocrática que diminui drasticamente a afinidade para a fase estacionária, este método vai gradualmente diminuindo a afinidade, sendo as primeiras proteínas a eluir as com menor afinidade para a matriz (Janson, 2011);

- Cromatografia de deslocamento, em que o tampão utilizado é sempre igual quer nas condições de ligação quer de eluição. A eluição da biomolécula é então feita por adição de um competidor. Este competidor pode ter maior afinidade para a matriz que a biomolécula, ou ter maior afinidade para a biomolécula que a matriz (Janson, 2011).

1.1.2 Métodos cromatográficos

Desde o desenvolvimento da primeira celulose com carga iónica, desenvolvida por Peterson e Sober, ao desenvolvimento da primeira filtração em gel por Porath e Flodin, uma grande variedade de materiais e propriedades físicas e químicas tem sido testadas de forma a se obter sempre um melhor rendimento (Janson, 2011).

Desta forma foi possível separar os tipos de cromatografia em grupos, segundo a importância dada a cada propriedade (Figura 1):

- Tamanho e forma - cromatografia de filtração em gel ou de exclusão molecular
- Distribuição de grupos carregados - cromatografia de troca iónica
- Hidrofobicidade - cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia de fase reversa
- Afinidade bioespecífica de ligandos, inibidores, recetores, anticorpos e outras biomoléculas - CA

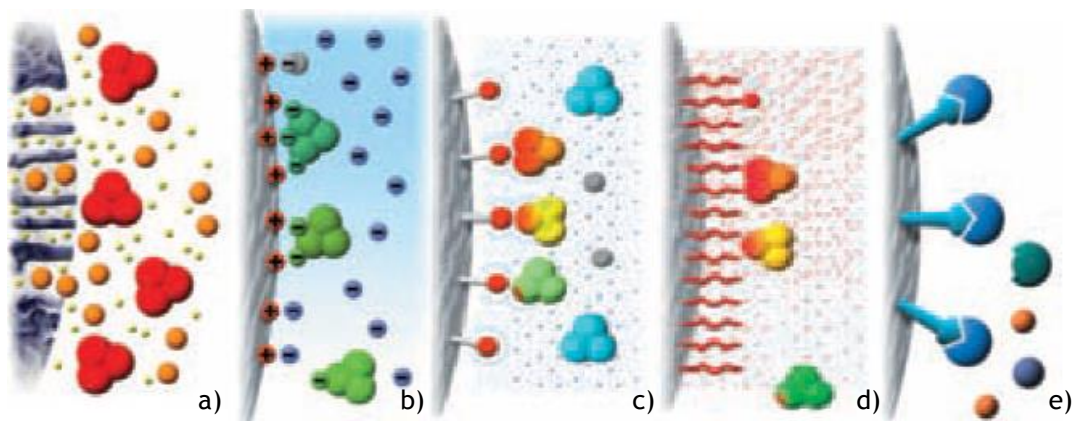


Figura 1 - Representação esquemática das interações das cromatografias de: a) exclusão molecular, b) interação iónica, c) interação hidrofóbica, d) fase reversa e e) afinidade. (adaptado de Healthcare, 2010b).

Os métodos divergem nos requerimentos das condições cromatográficas, como a força iónica, o pH, os aditivos utilizados tais como detergentes, agentes redutores e metais. O ajuste da composição do tampão para condições de adsorção e dessorção são alterados para a proteína desejada, de forma a otimizar o processo cromatográfico (Janson, 2011).

É de notar que o resultado da separação cromatográfica depende, normalmente, de vários parâmetros, como por exemplo, o comprimento da coluna, a largura da coluna, o tamanho dos poros, o fluxo do eluente, entre muitos outros. (Janson, 2011).

1.1.3 Cromatografia de afinidade

A CA separa as proteínas com base em interações reversíveis, entre uma proteína ou um grupo específico de uma proteína, e um ligando imobilizado na matriz cromatográfica (Figura 2).

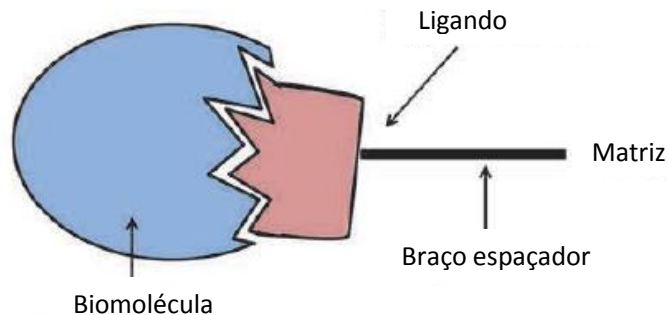


Figura 2 - Esquema de ligação em CA (adaptada de Sattasai N., 2012)

A interação pode ser bioespecífica, como a interação recetor-hormona, ou de pseudoafinidade, como a interação corante-proteína (Healthcare, 2010b).

Este tipo de cromatografia oferece alta seletividade e alta resolução com, normalmente, alta capacidade. A eluição não necessita de condições extremas.

A proteína é aplicada em condições que favorecem a interação com o ligando da matriz e eluída alterando essas condições. A eluição pode ser específica, colocando um ligando competitivo, ou não-específica, por alteração do pH, força iônica ou polaridade (Healthcare, 2010b).

A CA é utilizada muitas vezes como purificação de um só passo. No entanto, para casos em que a pureza exigida seja alta, poderá ser seguida de um segundo passo cromatográfico para remover as impurezas ou agregados restantes.

Para casos de aplicação farmacêutica a pureza exigida é muito alta, desta forma a aplicação de mais que um passo no final da CA pode ser requerido. Por vezes, estes passos poderão ser novas cromatografias de afinidade com diferentes ligandos (Healthcare, 2010b).

1.1.3.1 Matriz

A constituição da matriz de uma coluna cromatográfica é muito importante, pois é na matriz que são imobilizados os ligandos necessários para a CA.

Correntemente existem dois modelos de matrizes disponíveis comercialmente, partículas esféricas com um diâmetro que ronda os 100 μm , e géis polimerizados *in situ* que

contêm uma rede contínua de poros. De um ponto de vista funcional podem ser distinguidas entre microporosas ou macroporosas (Figura 3). Os géis macroporosos são obtidos por agregação e *cross-link* de polímeros, estes géis são bastante adequados para fases estacionárias destinadas a cromatografia de troca iónica, CA ou outro tipo de cromatografia com técnicas de adsorção (Janson, 2011).

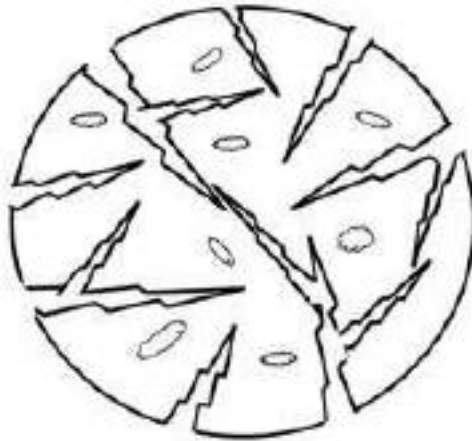


Figura 3 - Modelo que demonstra a distribuição de poros num gel hidrofílico utilizado em cromatografia de exclusão molecular (adaptada de Sattasai N., 2012).

Em adição a uma composição hidrofílica uma matriz ideal para cromatografia de proteínas não deve conter grupos que liguem espontaneamente a biomoléculas. No entanto devem conter grupos funcionais que permitam a imobilização de uma grande variedade de ligandos. A matriz deve ser física e quimicamente estável mesmo em condições mais adversas e deve ser rígida para permitir altos fluxos em colunas com baixos diâmetros.

Uma grande variedade de matérias quer inorgânicas quer orgânicas, naturais ou sintéticas têm sido utilizadas no desenho de matrizes sendo as mais comuns, sílica porosa, hidroxiapatite, poliacrilamida, polimetacrilato, poliestireno, celulose, dextrano e agarose.

No entanto, nenhuma destas matérias satisfaz todos os critérios para ser considerada uma matriz ideal para a purificação de proteínas (Janson, 2011).

A Sepharose é um gel de filtração de agarose composto por esferas de vários tamanhos permitindo fracionamento de uma ampla gama de biomoléculas (Figura 4). Existem três tipos de Sepharose comercial divergindo na percentagem de agarose que contêm. À medida que aumenta a concentração de agarose, a porosidade diminui, aumentando a rigidez e alterando a gama de fracionamento (Sigma-Aldrich, Sepharose® CL-6B).

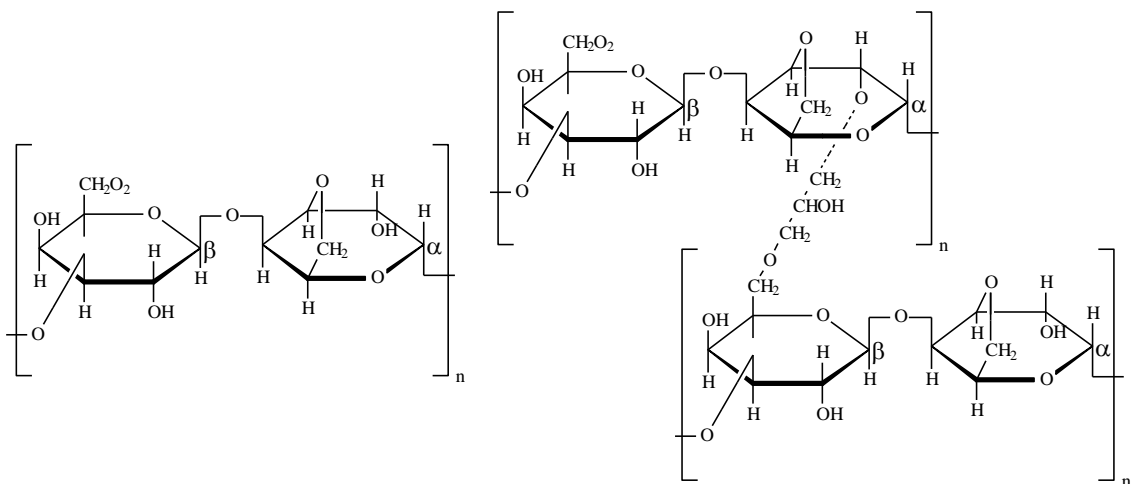


Figura 4 - Estrutura parcial da Sepharose e Sepharose CL, respetivamente.

A Sepharose-CL é um derivado *cross-linked* da Sepharose em esferas, preparado por reação de agarose com 2,3-dibromopropanol em condições extremamente alcalinas.

O polissacárido resultante tem baixo conteúdo de grupos ionizáveis, melhor resistência química e física que a Sepharose, bem como propriedades de fluxo melhoradas. A sua porosidade e gama de fracionamento são semelhantes às da Sepharose. No entanto, é estável em solventes orgânicos e em meio aquoso com uma gama de pH entre 3 a 14. Permite a utilização de agentes dissociantes e sais caotrópicos. A utilização de condições oxidantes pode alterar grupos constituintes dos resíduos de agarose. Esta matriz é resistente à degradação biológica (Sigma-Aldrich, Sepharose® CL-6B).

1.1.3.2 Braço espaçador

O impedimento estérico pode, por vezes, ser um fator que reduz drasticamente a afinidade de proteínas, especialmente observado para ligandos de baixo peso molecular (Figura 5).

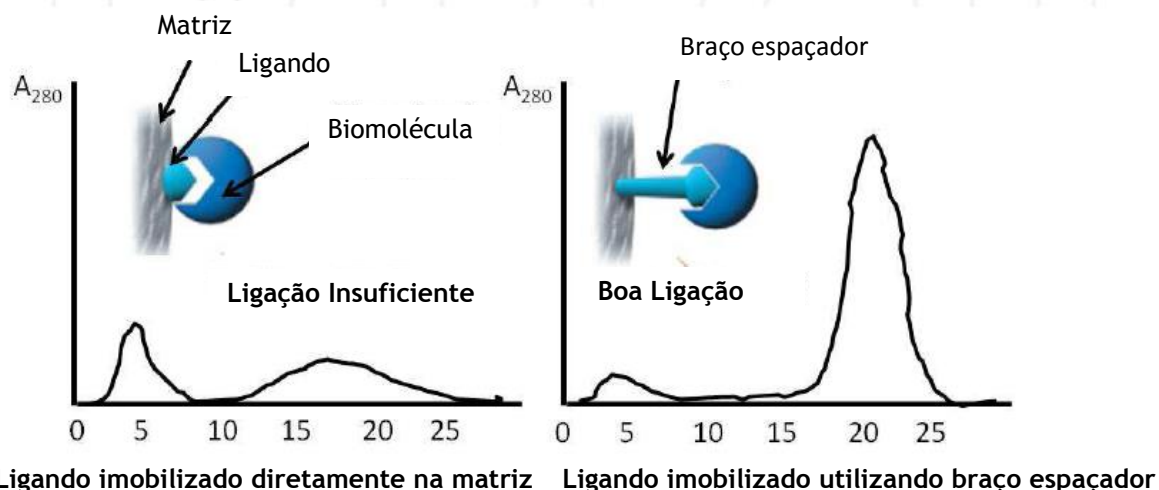


Figura 5 - Cromatograma representando o perfil de eluição na presença e na ausência de braço espaçador (adaptada de Magdeldin et al., 2012).

Assim muitas vezes é necessária a utilização de um grupo espaçador normalmente constituído por uma cadeia hidrocarbonada linear, alifática, com um grupo reacional em cada extremidade, sendo, normalmente, numa extremidade um grupo carboxilo (-COOH) e na outra um grupo amino (-NH₂) (Janson, 2011).

Existem duas possibilidades, anexar o braço espaçador à matriz por uma das extremidades e posteriormente imobilizar o ligando à outra extremidade, ou então ligar uma das extremidades ao ligando e posteriormente imobilizar na matriz o complexo braço espaçador-ligando (Janson, 2011).

O comprimento do braço espaçador é fundamental, pois se este for demasiado longo ou demasiado curto, pode levar à não existência de ligação ou ligação não específica (Magdeldin, 2012).

1.1.3.3 Ligandos

Os ligandos conferem especificidade e seletividade à matriz. No entanto, especificidade e seletividade não devem ser confundidas. Por exemplo, a imobilização de ligandos hidrofóbicos para cromatografia de interação hidrofóbica conferem seletividade à matriz, sendo a especificidade conferida por ligandos específicos para biomoléculas específicas como em CA.

A ligação específica de um ligando-proteína é complexa e pode dever-se a várias forças de interação:

- Interações iónicas ou ião-dipolo
- Pontes de hidrogénio
- Forças de dispersão ou de van der Waals

- Interações aromáticas ou π - π
- Interações hidrofóbicas

Apesar de estas interações ditarem a força da ligação podem ainda ser encontrados locais de ligação específica ao longo de proteínas grandes (Janson, 2011).

Como exemplo de especificidade aparecem os anticorpos que, devido à sua variabilidade de aminoácidos, podem ser utilizados para reconhecer locais específicos de uma biomolécula.

Já como ligandos mais seletivos e não tão específicos apresentam-se os corantes. A cromatografia utilizando corantes como ligandos teve origem em 1968 quando Haeckel et al. purificaram a piruvato cinase usando filtração em gel com *Blue dextran*, um gel de filtração com coloração azul, devendo-se a sua coloração à presença de Cibacron Blue F3G-A na sua formulação. Nos seus estudos, Haeckel et al. descobriram uma pequena molécula corada que co-eluiu com a proteína, o Cibacron Blue F3G-A (Figura 6). Após investigação concluiu-se que a co-eluição se devia à interação entre a enzima e o corante (Magdeldin, 2012).

A cromatografia biomimética corante-ligando leva ainda mais longe a cromatografia corante-ligando e utiliza corantes modificados de forma a mimetizar o recetor natural da proteína alvo. Como adição estes corantes sintéticos podem ser manipulados de forma a diminuir eventuais preocupações em termos de toxicidade dos corantes comercialmente disponíveis (Magdeldin, 2012).

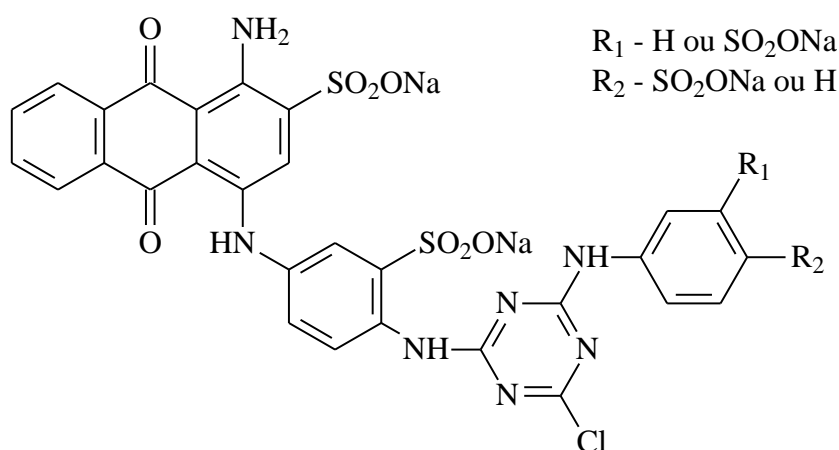


Figura 6 - Estrutura química do corante-ligando Cibacron Blue F3G-A, comumente utilizado na purificação de albumina do soro bovino.

1.1.3.4 Imobilização

De forma a poderem ser utilizados na separação por cromatografia, os ligandos necessitam previamente de ser imobilizados numa matriz cromatográfica.

A imobilização de ligandos é normalmente feita por uma reação de um passo simples envolvendo a ligação de um grupo halogeneto de ácido a um grupo hidroxilo presente na

matriz em condições alcalinas. No entanto, para determinados ligandos e/ou matrizes são necessários três passos, sendo o primeiro o de ativação dos locais de ligação da matriz, o segundo de imobilização covalente do ligando, e o terceiro de inativação e bloqueio dos locais de ligação restantes onde não houve reação (Janson, 2011).

Existem variados métodos de imobilização numa matriz cromatográfica, de entre os quais o método da diciclohexilcarbodiimida (DCC) (Janson, 2011).

Apesar do sucesso na síntese de alguns açúcares e derivados de aminoácidos este método não foi adotado pela maioria dos investigadores como método de preparação de carboxilatos e tiolatos, principalmente por causa dos rendimentos variáveis.

Estudos anteriores demonstram a ação catalítica da piridina como favorável neste tipo de reações, sugerindo que a utilização de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) possa ser uma significativa ajuda na esterificação de ácidos carboxílicos (Neises et al., 1978).

Estes estudos reportam que a utilização de 3-10% de DMAP por mol de DCC, aceleram a velocidade da reação na esterificação de ácidos carboxílicos com álcoois e tióis, permitindo até mesmo a formação de ésteres muito complicados de se sintetizarem, com bons rendimentos, mesmo à temperatura ambiente (Neises et al., 1978).

1.2 Carbocianinas

1.2.1 Aspectos gerais

Os sais de amónio quaternário são normalmente sintetizados pela reação de Menshutkin, em que uma amina terciária substitui um grupo abandonante numa cadeia alifática por reação nucleofílica de substituição, formando assim um sal quaternário (Neumann et al., 1997).

Nos anos recentes não tem havido desenvolvimento em métodos de quaternização de aminas, desta forma o método de Menshutkin continua ainda a ser utilizado, sem praticamente nenhuma alteração (Neumann et al., 1997).

Os agentes alquilantes mais reativos são compostos com grupos alquílicos fluorossulfonatos, tosilatos ou iodetos, mas por motivos práticos os brometos são os mais populares. Nestas reações o uso de solventes polares é usualmente recomendado, sendo o acetonitrilo o mais utilizado (Neumann et al., 1997).

Os sais de amónio quaternário tem como fórmula geral $R_4N^+X^-$, onde R pode ser um grupo alquilo, arilo ou arilalquilo e X representa qualquer anião.

Estes sais são catiões de amónio quaternários e encontram-se permanentemente carregados, independentemente do pH das suas soluções (Garcia, 2014).

A ligação de dois sais de amónio quaternário, por uma cadeia carbonada de ligações duplas conjugadas com número impar de átomos de carbono, forma uma estrutura de

ressonância com carga positiva à qual se dá a designação de cianina (Figura 7) (Almeida, 1999).

Uma cianina não possui uma fórmula simples uma vez que, apesar de um átomo de azoto ser terciário e o outro quaternário, o grupo ácido não está ligado mais fortemente a um que ao outro, criando assim a estrutura de ressonância (Almeida, 1999).

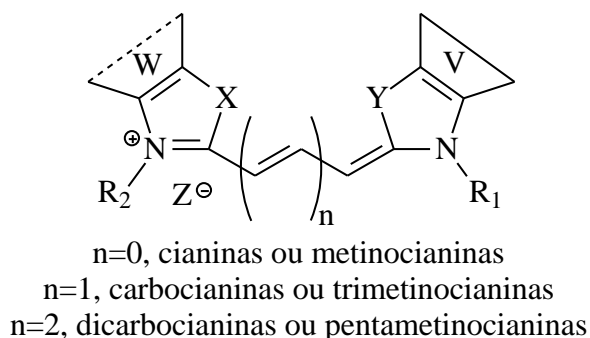


Figura 7 - Estrutura geral das cianinas

Podendo ser:

- Y igual ou diferente de X, sendo X= NR, O, S, -CH=CH-, C(CH₃)₂...
- W igual ou diferente de V, sendo V= Grupos heterocíclicos ou aromáticos
- R1 igual ou diferente de R2
- Z= Tos, I; Br, Cl, ClO₄...

A cor intensa apresentada pelas cianinas deve-se à ressonância molecular entre os átomos de azoto nos extremos da cadeia conjugada, provocada pelo “movimento” de elétrons (Almeida, 1999).

As cianinas são corantes que absorvem numa gama muito alargada do espectro eletromagnético, desde os 340 nm aos 1400 nm, ou seja desde o ultravioleta até ao infravermelho (Almeida, 1999).

Historicamente, um dos primeiros corantes examinados, foi acidentalmente preparado em 1856 por Greville Williams para uma exposição fotográfica. Devido à cor azul que apresentava, foi denominada por cianina, do grego *Kianos*, azul-escuro, denominação esta que se alargou a toda esta classe de corantes, apesar de poderem apresentarem qualquer cor (Almeida, 1999).

A gama de absorvência, e conseqüentemente a cor adquirida, é devida, em primeiro lugar ao tipo de anel heterocíclico e ao número de ligações duplas conjugadas ente os dois átomos de azoto, em segundo à existência de simetria, ou não, dos grupos heterocíclicos presentes, a natureza do grupo alquilo e os seus substituintes. O contra ião condiciona a

solubilidade, o grau de cristalização da cianina e a rigidez conformacional do sistema conjugado (Almeida, 1999).

1.2.2 Métodos de síntese

De uma maneira geral, a síntese de cianinas envolve várias etapas, que são simples sequências de adições de reagentes nucleofílicos e eletrofílicos, precedidas ou seguidas por desprotonações e remoções de grupos de saída (Almeida, 1999).

Existem vários métodos de síntese dependendo do número de átomos de carbono que contem a cadeia de ligações duplas conjugadas, e se a cianina resultante será simétrica ou assimétrica.

Para a síntese de carbocianinas simétricas, partindo de sais de amônio quaternário, o método mais usual é o método do orto éster. Este método baseia-se no refluxo de dois equivalentes de um sal de amônio quaternário, contendo um grupo metilo reativo, com um orto éster que atua como agente eletrofílico, em piridina (Garcia, 2014).

1.2.3 Características e aplicações

As cianinas tornam-se o centro das atenções depois de 1856 com a sua grande aplicação no campo da fotografia (Panigrahi et al. 2012). As suas aplicações neste campo devem-se não à sua cor mas por serem corantes funcionais, isto é, quando colocados numa emulsão de halogeneto de prata esta torna-se sensível às cores primárias. Combinando mais que uma cianina em proporções adequadas é possível reproduzir qualquer cor do espectro visível (Almeida, 1999).

Devido a estas propriedades de reproduzir qualquer cor, têm sido aplicadas em múltiplos sectores. São bastante utilizadas no fabrico de materiais semicondutores (Yadav, 2005), fotossintéticos (Wang et al., 2013), fotovoltaicos (Bouit et al., 2009), fotorrefrativos (Ostroverkhova et al., 2004), e componentes para lasers (Kameyama et al., 2004). São também utilizados como marcadores para polimerização fotoquímica, agentes anti-tumorais (Gong et al., 2010), sistemas óticos de armazenamento de dados, células solares orgânicas (Chou et al., 2012), proteómica, e biomarcadores fluorescentes (Todorova et al., 2013). Mais recentemente têm sido aplicadas em sistemas dinâmicos, no design de matérias “inteligentes” e em terapia fotodinâmica (Panigrahi et al., 2012).

As cianinas possuem uma ampla gama de aplicabilidade, no entanto como ligandos de CA ainda pouca investigação foi realizada.

Um dos primeiros estudos, que descreve o uso destes corantes catiónicos imobilizados em agarose, revela comportamentos cromatográficos diferentes com BSA e tripsina. Estes comportamentos devem-se a uma combinação de interações específicas, como interações hidrofóbicas, hidrofílicas, iónicas e π - π , podendo ser esperada uma interação seletiva com as biomoléculas (Pardal et al., 2002b).

Os grupos carboxílicos existentes nas estruturas destes corantes torna-os reativos e potencialmente capazes de ligar a moléculas com grupos hidroxilos por esterificação, tornando fácil a sua imobilização num suporte cromatográfico (Boto et al., 2008).

As carbocianunas utilizadas neste trabalho foram escolhidas porque em trabalhos anteriores havia sido reportada a sua interação com algumas das proteínas utilizadas (Cruz et al. 2014). Para além disso possuem ainda um conjunto de fatores que as torna bons ligandos de afinidade. Estas carbocianinas permitem estabelecer várias interações específicas com as proteínas, como por exemplo interações hidrofóbicas, hidrofílicas, iónicas e π - π . Adicionalmente possuem uma cadeia alquílica longa que permite a sua ligação à matriz de Sepharose CL6B, atuando igualmente como braço espaçador, podendo assim aumentar o seu potencial de separação.

CAPITULO II.

PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiais, solventes e reagentes

Os reagentes 2,3,3-Trimetilindolenina, 1,1,2-Trimetilbenz[e]índole, ácido 11-Bromo-undecanoico, trietilortoformiato, DCC, DMAP, piridina, iodeto de potássio, ácido clorídrico concentrado e ácido sulfúrico concentrado, cuja síntese não se encontra descrita, foram adquiridos à Sigma-Aldrich Company (St. Louis, Missouri, EUA).

Todos os produtos químicos utilizados eram de grau analítico ou superior e foram utilizados como recebidos.

Os solventes *N,N*-dimetilformamida (DMF), metanol, etanol, diclorometano, acetonitrilo e éter dietílico foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Os solventes, sempre que necessário, foram secos sobre peneiros moleculares 4Å.

A Sepharose CL-6B foi adquirida à GE Healthcare Life Sciences (Uppsala, Suécia).

Todas as reações foram acompanhadas por cromatografia em camada fina (c.c.f.) utilizando placas de sílica Merck Kieselgel GF254 com 0,2mm de espessura. O eluente consistiu numa mistura de metanol em diclorometano, variando a percentagem de metanol entre 10 e 30%, quando necessário. Após a eluição e secagem das placas, estas foram visualizadas à luz ultravioleta de comprimento de onda de 254nm e/ou 365nm.

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada purificada num sistema de purificação Milli-Q da Millipore Systems (Bedford, Massachusetts). O cloreto de sódio, o sulfato de amónio, o tris(hidroximetil)aminometano (Tris), o carbonato de sódio e todas as proteínas utilizadas foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

2.2 Equipamentos

Os pontos de fusão (P.f.) foram determinados em tubos capilares abertos, num aparelho medidor de P.f. Büchi 530 e não foram corrigidos.

Os espectros de RMN de ¹H foram efetuados num espectrómetro Bruker Avance 400 MHz e processados com o software TOPSPIN 3.1 (Fitchburg, Wisconsin, EUA), utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Como solvente foi utilizado dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) (RMN de ¹H a 400 MHz). Nos dados de RMN de ¹H são indicados o desvio químico (δ em ppm), o número de prótons a que corresponde o sinal, a multiplicidade do sinal [singleto (s), duplete (d), tripleto (t), multiplete (m)], o valor da constante de acoplamento (*J* em Hz) e a atribuição do sinal aos prótons correspondentes.

Os suportes obtidos foram secos num forno de vidro de secagem Büchi TO-51, sob pressão reduzida e na presença de pentóxido de fósforo.

Aguardam-se os resultados das análises quantitativas dos suportes.

As absorvências foram medidas num espectrofotômetro UV-Vis Thermo Fisher Scientific model Evolution 160 (Madison, Wisconsin, EUA), a 280nm, com células de quartzo de 10mm 700µL, após a recolha das frações resultantes dos ensaios cromatográficos.

2.3 Síntese de sais quaternários

Os sais de amónio quaternário *N*-carboxialquílicos, foram sintetizados por reação de fusão entre as bases heterocíclicas derivadas de indol e o ácido 11-bromoundecanóico. Os sais foram sintetizados tendo em vista a sua utilização como precursores das carbocianinas em estudo.

2.3.1 Síntese de brometo de 1-(10-carboxidecil)-2,3,3-trimetil-3H-indól-1-íon (1)

Uma mistura de 5,02g de 2,3,3-trimetilindoline (31,5mmol) e 9,20g de ácido 11-bromoundecanóico (34,7mmol) foi aquecida a 150°C durante 144h. Após arrefecimento à temperatura ambiente a mistura foi lavada com éter dietílico de forma a remover restos de material de partida que não tenha reagido.

A síntese seguinte foi realizada sem o isolamento do produto, uma vez que, o sal em estudo já havia sido sintetizado e caracterizado (Cruz et al. 2014). Todas as reações de síntese foram seguidas por c.c.f., comparando a mistura reacional com o sal previamente sintetizado para garantir a síntese do sal de interesse.

2.3.2 Síntese de brometo de 3-(10-carboxidecil)-1,1,2-trimetil-1H-benzo[e]indól-3-íon (2)

Uma mistura de 5,20g de 1,1,2-trimetilbez[e]índole (23,9mmol) e 6,98g de ácido 11-bromoundecanóico (26,3mmol) foi aquecida a 150°C durante 138h. Após arrefecimento à temperatura ambiente, a mistura foi lavada com éter dietílico de forma a remover restos de material de partida que não tenha reagido.

Tal como o sal anterior, a síntese seguinte foi realizada sem o isolamento do produto, uma vez que, o sal em estudo já havia sido sintetizado e caracterizado (Cruz et al. 2014).

2.4 Síntese de carbocianinas

A síntese das carbocianinas simétricas foi realizada utilizando o método do orto éster, pela reação de 2 equivalentes dos sais de amónio quaternário **1** e **2**, anteriormente sintetizados, com trietilortoformiato catalisado por piridina. As carbocianinas simétricas foram sintetizadas visando a sua imobilização numa matriz de Sepharose CL-6B para posteriores testes cromatográficos.

2.4.1 Síntese de iodeto de 1-(10-carboxidecil)-2-((E)-3-((Z)-1-(10-carboxidecil)-3,3-dimetilindolin-2-ilideno)prop-1-en-1-il)-3,3-dimetil-3H-indól-1-io (3)

Uma mistura de 8,48g de sal 1 (24,6mmol) e 3,04g de trietilortoformiato (3,4mL, 20,5mmol) foi aquecida a 120°C durante 18h em refluxo de piridina, utilizando 10mL de piridina por grama de sal. Após arrefecimento à temperatura ambiente, a mistura foi lavada com éter dietílico e recristalizada de acetonitrilo seco. Foi adicionada uma solução de 2,5% de ácido sulfúrico em acetonitrilo e levou-se a refluxo. De seguida foi adicionada uma solução de iodeto de potássio a 14%, seguida de um novo refluxo. A recristalização foi realizada novamente de acetonitrilo seco. O sólido foi filtrado e lavado com éter dietílico de forma a remover restos de material de partida que não tenha reagido. Rendimento:75%. P.f. 76-78°C. RMN de 1H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.09-1.28 (16H, m, CH₂), 1.29-1.35 (4H, m, CH₂), 1.36-1.42 (4H, m, CH₂), 1.43-1.50 (4H, m, CH₂), 1.71 (12H, s, 3-CH₃), 2.16 (4H, q, *J*=7.4Hz, NCH₂CH₂, N''CH₂CH₂), 2.50 (4H, t, *J*=7.4Hz, CH₂COO), 4.13 (4H, t, *J*=7.2Hz, NCH₂, N''CH₂), 6.53 (2H, d, *J*=13.5Hz, 1'-CH, 3'-CH), 7.31 (2H, t, *J*=7.8 Hz, 5-CH, 5''-CH), 7.41-7.49 (4H, m, 6-CH, 6''-CH, 7- CH, 7''-CH), 7.64 (2H, d, *J*=7.4 Hz, 4-CH, 4''-CH), 8.36 (1H, t, *J*=13.4Hz, 2'-CH).

Os dados espectroscópicos obtidos estão de acordo com a literatura (Cruz et al. 2014).

2.4.2 Síntese de iodeto de 3-(10-carboxidecil)-2-((1E,3Z)-3-(3-(10-carboxidecil)-1,1-dimetil-1,3-dihidro-2H-benzo[e]indol-2-ilideno)prop-1-en-1-il)-1,1-dimetil-1H-benzo[e]indól-3-io (4)

Uma mistura de 6,63g de sal 2 (16,8mmol) e 2,37g de trietilortoformiato (2,7mL, 16,0mmol) foi aquecida a 120°C durante 24h em refluxo de piridina, utilizando 10mL de piridina por grama de sal. O restante procedimento utilizado no resto da reação foi igual ao procedimento utilizado na síntese da cianina 3. Rendimento:73%. P.f. 81-83°C. RMN de 1H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.16-1.29 (16H, m, CH₂), 1.30-1.37 (4H, m, CH₂), 1.46-1.60 (8H, m, CH₂), 1.80-1.90 (4H, m, NCH₂CH₂, N''CH₂CH₂), 2.00 (12H, s, 1-CH₃), 2.30 (4H, t, *J* = 7.2 Hz, CH₂COO,), 4.26 (4H, t, *J* = 7.6 Hz, NCH₂, N''CH₂), 7.02 (2H, d, *J* = 13.5 Hz, 1'-CH, 3'-CH), 7.32 (2H, t, *J* = 8.8 Hz, 7-CH, 7''-CH), 7.42 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, 8-CH, 8''-CH), 7.56 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, 4-CH, 4''-CH), 7.88 (2H, d, *J* = 4.2 Hz, 6-CH, 6''-CH), 7.92 (2H, d, *J* = 3.7 Hz, 5-CH, 5''-CH), 8.05 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, 9-CH, 9''-CH), 8.59 (1H, t, *J* = 13.4 Hz, 2'-CH).

Os dados espectroscópicos obtidos estão de acordo com a literatura (Cruz et al. 2014).

2.5 Preparação de novos suportes cromatográficos

Após a imobilização, as matrizes derivatizadas foram lavadas sequencialmente com várias porções de DMF e metanol e submetidas à extração de Soxhlet com os mesmos solventes e na mesma ordem, durante cerca de 4 dias, até não se observar perda de ligando.

2.5.1 Sepharose CL-6B

A Sepharose CL-6B foi sucessivamente lavada num funil de vidro sinterizado, de placa porosa, com várias porções de etanol e éter dietílico. Em seguida, a Sepharose CL-6B foi seca pelo menos durante 48h a 60°C, sob pressão reduzida na presença de pentóxido de fósforo. Esta matriz foi submetida à esterificação de Steglich.

2.5.2 Esterificação de Steglich

A uma mistura de Sepharose CL-6B (0,5g) e de composto 3 (0,0625g, 0,125g e 0,25g) adicionou-se DMAP (0,2 equivalentes molares), DCC (2,0 equivalentes molares) e DMF (30mL). A mistura resultante foi mantida sob agitação suave durante cerca de 96h à temperatura ambiente, tendo-se adicionado mais duas vezes as mesmas quantidades de DMAP/DCC após 2h e 4h de reação, respetivamente. Utilizando o mesmo procedimento, foi imobilizado o composto 4 em Sepharose CL-6B. A Tabela 1 relaciona as quantidades iniciais de ligando com os suportes em estudo.

Tabela 1 - Suportes cromatográficos obtidas com diferentes ligandos a diferentes concentrações

Sepharose 0,5g	Sem ligando		Suporte A		
	Sem ligando	Submetido a condições de ligação	Suporte B		
			0,25g	Suporte C	
	Ligando 2			0,125g	Suporte D
				0,0625g	Suporte E
			0,25g	Suporte F	
	Ligando 4			0,125g	Suporte G
				0,0625g	Suporte H

Os suportes foram armazenados a 25 °C em água desionizada.

O suporte B, que funcionou como suporte de controlo, foi submetido às mesmas condições mas na ausência de ligando.

2.6 Ensaio cromatográficos

Todos os ensaios foram acompanhados por dois suportes de controlo, um de Sepharose CL-6B e outro de Sepharose CL6-B submetida às condições de ligação.

Os suportes resultantes modificados com as cianinas 3 e 4 foram estudados como suportes específicos para CA.

As proteínas modelo utilizadas nos ensaios foram a lisozima (PM 14,3 kDa, pl 11,4) (Sigma-Aldrich, Lysozyme from chicken egg white), α -quimotripsina (PM 25 kDa, pl 8,8)

(Sigma-Aldrich, α -Chymotrypsin from bovine pancreas), BSA (PM 66 kDa, pl 4,7) (Sigma-Aldrich, Bovine Serum Albumin), RNase (PM 13,7 kDa, pl 9,6) (Sigma-Aldrich, Ribonuclease A from bovine pancreas), tripsina (PM 23,3 kDa, pl 10,1-10,5) (Sigma-Aldrich, Trypsin from bovine pancreas) e gamma-globulina (PM 155-160 kDa, pl 6,8-6,9) (Sigma-Aldrich, γ -Globulins from bovine blood). Em cada etapa cromatográfica foram recolhidas frações de 1mL, após às quais foi monitorizada a absorvência a 280nm num espectrofotómetro de UV-Vis.

Foram preparadas soluções padrão das proteínas referidas com concentrações de 12,5mg de proteína/mL de solução tampão. A solução tampão utilizada para a preparação dos padrões de proteína foi a solução tampão utilizada para o passo de ligação.

A preparação das colunas cromatográficas foi realizada através do empacotamento dos géis em mini-colunas de bancada, à temperatura ambiente, de forma a obter-se um volume de cerca de 1mL de gel. Após o empacotamento, as colunas foram abundantemente lavadas com água destilada e equilibradas com a fase móvel desejada para o ensaio cromatográfico.

2.6.1 Condições iónicas

Os ensaios foram realizados com as proteínas isoladas (lisozima, α -quimotripsina, BSA, RNase, Gamaglobulina), 50 μ L de cada amostra foi injetada no suporte cromatográfico com uma concentração de 12,5mg/mL de solução tampão Tris-HCl 10mM a pH 8. Estes ensaios cromatográficos consistiram nos seguintes passos cromatográficos:

1º passo - equilíbrio da coluna com 5mL de solução tampão de Tris-HCl 10mM pH 8;

2º passo - injeção da solução de proteína nas concentrações indicadas anteriormente;

3º passo - injeção de 5mL de solução tampão de Tris-HCl 10mM a pH 8 e recolha das frações de 1mL;

4º passo - injeção de 5mL de solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e recolha das frações de 1mL.

5º passo - injeção de 5mL de solução tampão de NaCl 2M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e recolha das frações de 1mL.

Devido à interação registada entre as proteínas e as colunas utilizadas como branco, foram efetuados testes de forma a encontrar uma concentração mínima de NaCl em que não houvesse interação nas colunas de controlo mas sim nas colunas a testar. Os novos ensaios cromatográficos consistiram então nos seguintes passo:

1º passo - equilíbrio da coluna com 5mL de solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM pH 8;

2º passo - injeção da solução de proteína nas concentrações indicadas anteriormente;

3º passo - injeção de 5mL de solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e recolha das frações de 1mL;

4º passo - injeção de 5mL de solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e recolha das frações de 1mL.

5º passo - injeção de 5mL de solução tampão de NaCl 2M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e recolha das frações de 1mL.

2.6.1.1 Ensaios cromatográficos a pH 9

Os ensaios foram realizados com as proteínas isoladas (lisozima, α -quimotripsina, RNase), 50 μ L de cada amostra foi injetada no suporte cromatográfico com uma concentração de 12,5mg/mL de solução tampão Tris-HCl 10mM a pH 9. Estes ensaios cromatográficos consistiram nos seguintes passos cromatográficos:

1º passo - equilíbrio da coluna com 5mL de solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM pH 9;

2º passo - injeção da solução de proteína nas concentrações indicadas anteriormente;

3º passo - injeção de 5mL de solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 9 e recolha das frações de 1mL;

4º passo - injeção de 10mL de solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 9 e recolha das frações de 1mL.

2.6.1.2 Ensaios cromatográficos a pH 10

Os ensaios foram realizados com as proteínas isoladas (lisozima, RNase), 50 μ L de cada amostra foi injetada no suporte cromatográfico com uma concentração de 12,5mg/mL de solução tampão carbonato de sódio 10mM a pH 10. Estes ensaios cromatográficos consistiram nos mesmos passos que os ensaios em 2.6.1.1. diferindo apenas na solução tampão utilizada, sendo neste caso utilizada uma solução tampão de carbonato de sódio 10mM a pH 10 em vez de uma solução tampão de Tris-HCl 10mM a pH 9.

2.6.2 Condições hidrofóbicas

Os ensaios foram realizados com as proteínas isoladas (lisozima, BSA, RNase, tripsina), 50 μ L de cada amostra foi injetada no suporte cromatográfico com uma concentração de 12,5mg/mL de solução tampão $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8. Estes ensaios cromatográficos consistiram nos seguintes passos cromatográficos:

1º passo - equilíbrio da coluna com 5mL de solução tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5M em Tris-HCl 10mM pH 8;

2º passo - injeção da solução de proteína nas concentrações indicadas anteriormente;

3º passo - injeção de 5mL de solução tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e recolha das frações de 1mL;

4º passo - injeção de 5mL de solução tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e recolha das frações de 1mL.

No caso específico da BSA, não se registou eluição no final dos 5mL de solução tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6M em Tris-HCl 10mM a pH 8. Para eluir a proteína retida foi então adicionado um quinto passo:

5º passo - injeção de 5mL de solução tampão de Tris-HCl 10mM a pH 8 e recolha das frações de 1mL.

2.6.3 Ensaios cromatográficos com mistura artificial de proteínas

Para estes ensaios cromatográficos apenas foi considerada a variação da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Para estes ensaios cromatográficos preparou-se uma mistura artificial de proteínas (lisozima, RNase e BSA) pela junção de 50 μL de cada proteína isolada com uma concentração de 12,5 mg/mL de solução tampão $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8. Assim, foram injetados 50 μL da mistura artificial na coluna. Estes ensaios cromatográficos consistiram nos seguintes passos cromatográficos:

1º passo - equilíbrio da coluna com 5mL de solução tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5M em Tris-HCl 10mM pH 8;

2º passo - injeção da solução de proteína nas concentrações indicadas anteriormente;

3º passo - injeção de 5mL de solução tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e recolha das frações de 1mL;

4º passo - injeção de 5mL de solução tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e recolha das frações de 1mL.

5º passo - injeção de 5mL de solução tampão de Tris-HCl 10mM a pH 8 e recolha das frações de 1mL.

Após leitura das absorvências de todas as amostras, foram traçados e analisados os perfis de eluição de cada ensaio.

CAPITULO III.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese de sais quaternários e carbocianinas

Os sais quaternários **1** e **2**, foram sintetizados por fusão, a aproximadamente 150°C, da base heterocíclica com o reagente alquilante apropriado. Estes compostos foram apenas utilizados como precursores das carbocianinas **3** e **4**. Todas as reações foram acompanhadas por c.c.f, tendo a mistura reacional sido comparada com os mesmos sais quaternários já previamente sintetizados e caracterizados, de forma a comprovar a sua síntese. Em virtude de se tratar de uma síntese fácil, e já descrita, estes compostos, não foram isolados nem caracterizados.

As carbocianinas **3** e **4**, foram sintetizadas pelo método do orto éster, com bom rendimento, levando a refluxo uma solução de piridina com o respectivo sal quaternário e trietilortoformiato. Após purificação, as carbocianinas (Figura 8), foram caracterizadas por p.f. e por RMN de ¹H.

Os p.f. obtidos diferem cerca de 20°C dos p.f descritos em literatura, podendo esta diferença ser considerada significativa.

Por análise do espectro da carbocianina **3** são de salientar os picos entre 7,31 e 8,36 ppm, que correspondem aos anéis aromáticos, o pico a 6,53 ppm, que corresponde aos grupos metínicos que ligam os dois anéis aromáticos e o pico a 4,13 ppm, que corresponde ao N-CH₂ devido à formação da amina quaternária.

Relativamente ao espectro da carbocianina **4** são de salientar os picos entre 7,32 e 8,59 ppm, que correspondem aos anéis aromáticos, o pico a 7,02 ppm, que corresponde aos grupos metínicos que ligam os dois anéis aromáticos e o pico a 4,26 ppm, que corresponde ao N-CH₂ devido à formação da amina quaternária.

Todos os sinais integravam para o número de prótons existentes, sendo que os dados obtidos por RMN de ¹H das cianinas sintetizadas se encontram de acordo com os referidos na literatura (Cruz et al. 2014).

As carbocianinas foram posteriormente imobilizadas em Sepharose CL-6B de forma a permitir estudos de interação de afinidade com proteínas padrão.

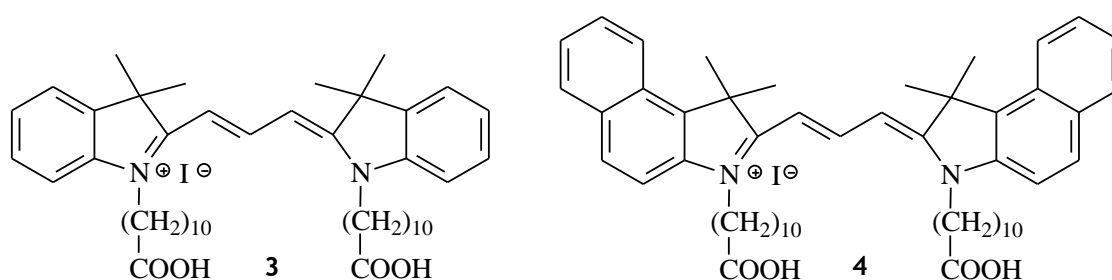


Figura 8 - Estrutura das carbocianinas sintetizadas.

3.2 Preparação dos suportes cromatográficos

Para a imobilização das carbocianinas à Sepharose CL-6B, o método utilizado foi a esterificação de Steglich. Foi utilizada esta esterificação por demonstrar um bom rendimento quando utilizada, com sucesso em trabalhos anteriores, na síntese de tiolatos e carboxilatos (Neises et al. 1978), bem como na imobilização de sais de amónio quaternário em Sepharose CL-6B (Alves et al. 2014).

Este método de imobilização apresenta como grande vantagem o facto de não necessitar de condições de pH e temperatura altos, que poderiam levar à destruição da estrutura de ressonância. O procedimento de imobilização das carbocianinas à Sepharose CL-6B foi baseado e adaptado do procedimento de um trabalho já descrito anteriormente (Alves et al. 2014).

A remoção da carbocianina não ligada foi realizada utilizando vários ciclos de lavagem com DMF e etanol em soxhlet, durante cerca de 72h, até os solventes já não apresentarem coloração. No final desse tempo, a coloração dos suportes cromatográficos se mantinha, podendo assim afirmar-se que a carbocianina se encontrava covalentemente ligada à matriz de Sepharose CL-6B.

3.3 Estudos de cromatografia de afinidade

As interações de afinidade foram estudadas por cromatografia em mini colunas de bancada empacotadas com cada suporte, pretendendo-se verificar a existência de interações entre as proteínas padrão e as carbocianinas sintetizadas, imobilizadas em diferentes concentrações numa matriz de Sepharose CL-6B.

Para cada carbocianina foram preparadas três colunas com concentrações diferentes de ligando inicial. Foram também preparadas duas colunas de Sepharose CL-6B, tendo uma sido submetida às condições de esterificação, de forma a serem utilizadas como brancos.

3.3.1 Condições iónicas

Para os estudos de interação iónica foram utilizados os suportes preparados com diferentes concentrações de carbocianina 2 (C, D e E), bem como os preparados com diferentes concentrações de carbocianina 4 (F, G e H). Foram igualmente utilizados dois suportes de controlo, o suporte A, contendo apenas Sepharose CL-6B, e o suporte B, contendo Sepharose CL-6B exposta às condições de imobilização. Os controlos serviram para observar interações não específicas das proteínas utilizadas com a matriz de Sepharose CL-6B.

Os ensaios em CA iniciaram-se pelo estudo das interações iónicas. Para tal, as soluções de proteínas foram preparadas e as colunas foram equilibradas com uma solução tampão de Tris-HCl 10mM a pH 8 seguindo-se os passos descritos em 2.6.1.

Inicialmente foi estudada a lisozima usando como tampão de ligação uma solução tampão de Tris-HCl 10mM a pH 8. É possível observar na Figura 9, que nas condições utilizadas eram promovidas interações não específicas com os suportes A e B, levando a acreditar que a proteína interagiu com o suporte cromatográfico sem ligando. Desta forma não seria possível estudar as interações da proteína com o ligando. O mesmo teste foi realizado com as restantes proteínas em estudo, revelando-se a BSA a única que não tinha qualquer interação com a coluna nas condições referidas.

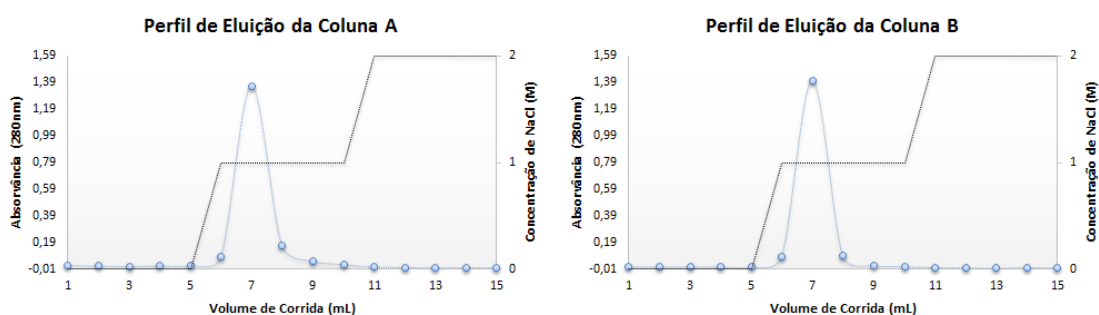


Figura 9 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A e B. Injeção de 50 μ L de Lisozima (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de Tris-HCl 10mM a pH 8 e dois passos de eluição com uma solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e uma solução tampão de NaCl 2M em Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro)

Procedeu-se assim à otimização das condições cromatográficas, tentando encontrar quais eram as condições de eluição que eliminavam as interações não específicas.

Por meio de vários testes, com soluções tampão de diferentes concentrações de NaCl na sua composição, foi possível determinar que utilizando uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM pH 8, a interação não específica com o suporte de Sepharose CL-6B era minimizada.

Através da análise dos perfis cromatográficos representados na Figura 10, verifica-se uma elevada retenção da lisozima nos suportes F, G e H quando se promove a ligação com a adição da solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 8. No suporte A verifica-se uma retenção bastante significativa, enquanto o suporte B não apresenta retenção.

Os suportes C e D apresentam uma retenção bastante elevada, indicando a existência de interação mas que esta não é suficientemente forte para uma eventual separação. O suporte E, com menor densidade de ligando, apresenta pouca retenção, ou seja, a retenção é aparentemente proporcional à densidade de ligando.

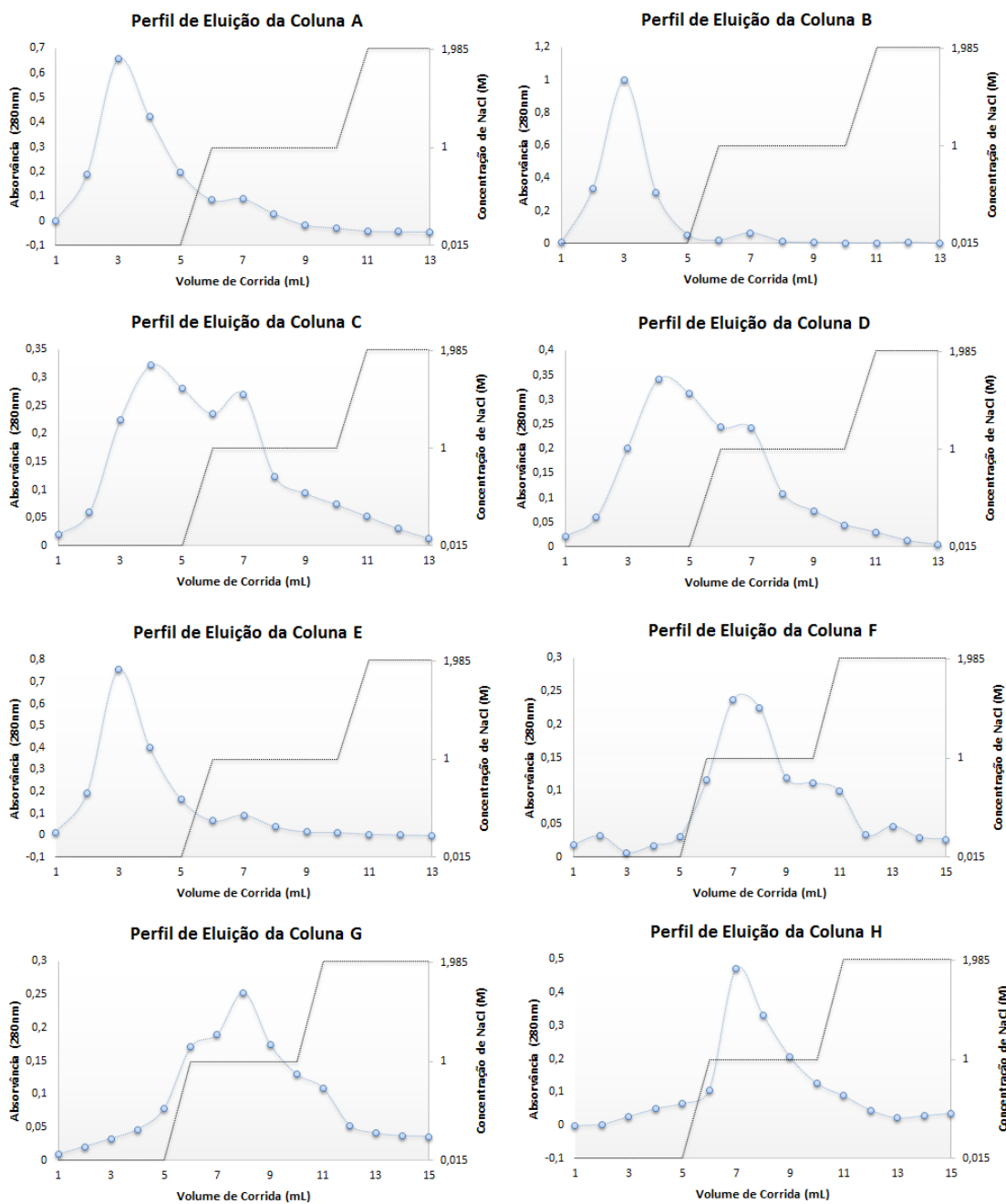


Figura 80 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, C, D, E, F, G e H. Injeção de 50 μ L de Lisozima (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e dois passos de eluição com uma solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e uma solução tampão de NaCl 2M em Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro)

A proteína seguinte a ser estudada foi a RNase. Para tal, as colunas foram equilibradas com uma solução tampão de Tris-HCl 10mM a pH 8 seguindo-se os passos descritos em 2.6.1.

Através da análise dos perfis cromatográficos representados na Figura 11, verifica-se que não existe qualquer retenção da RNase em qualquer dos suportes sintetizados. É possível

afirmar, por análise dos dados, que não se verificaram interações iônicas com o ligando imobilizado.

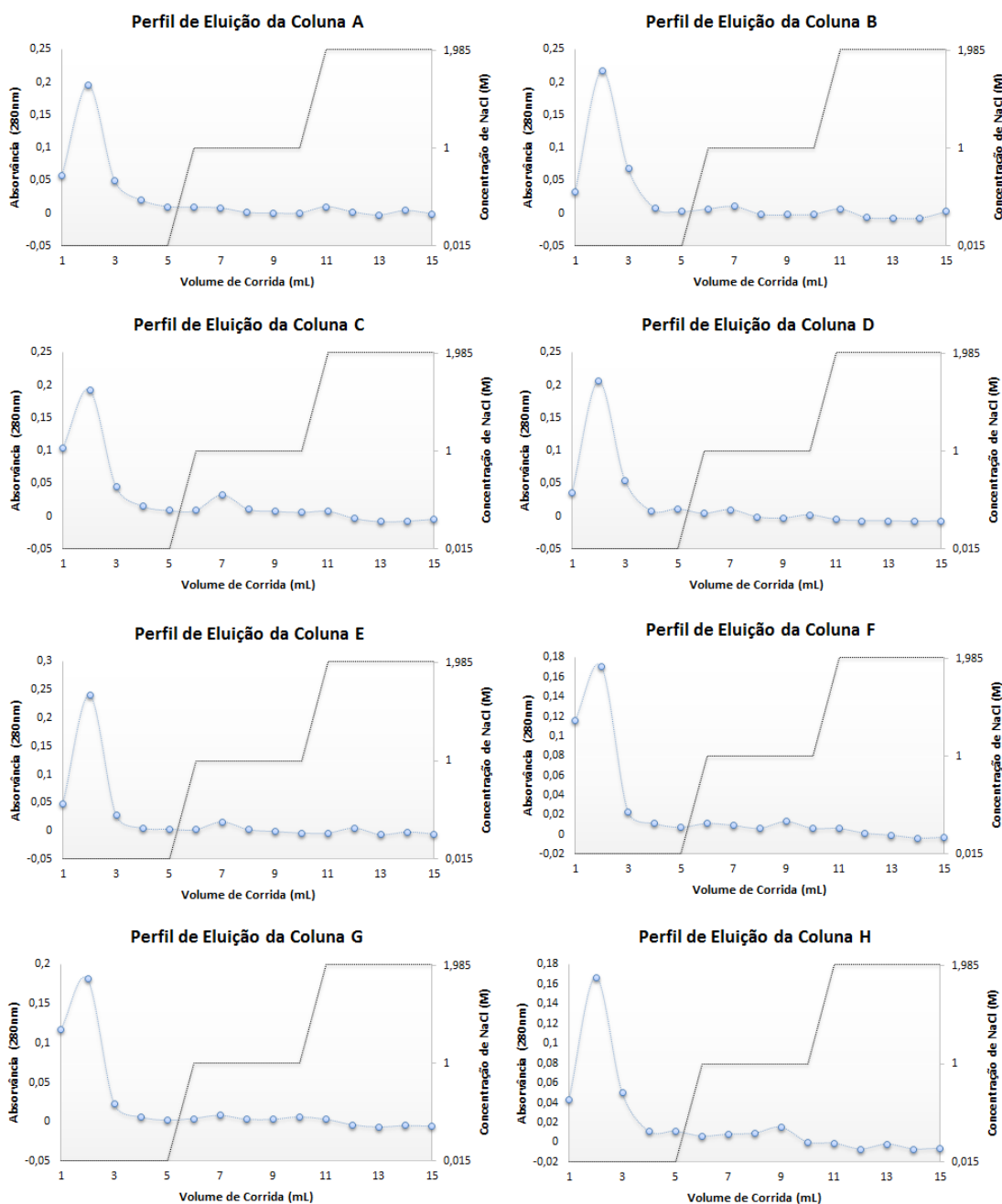


Figura 91 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, C, D, E, F, G e H. Injeção de 50 μ L de RNase (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e dois passos de eluição com uma solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e uma solução tampão de NaCl 2M em Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro)

Após o estudo com a RNase, seguiu-se a α -quimotripsina. As condições utilizadas foram iguais às anteriores, sendo as colunas equilibradas com uma solução tampão de Tris-HCl 10mM a pH 8 seguindo-se os passos descritos em 2.6.1.

Através da análise dos perfis cromatográficos representados na Figura 12, verifica-se a retenção da α -quimotripsina nos suportes C e D, quando se promove a ligação com a adição da solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 8. Nos suportes A e B, que servem de controlo, não se regista retenção, enquanto que os suportes E, F, G e H apresentam uma retenção pouco significativa. Para efeitos de aplicações industriais ou farmacêuticas é desejável que a eluição seja feita num só passo, apresentando um único pico não muito largo. Os perfis cromatográficos obtidos mostram três picos de eluição de proteína, sendo considerado um perfil não desejável para uma purificação cromatográfica.

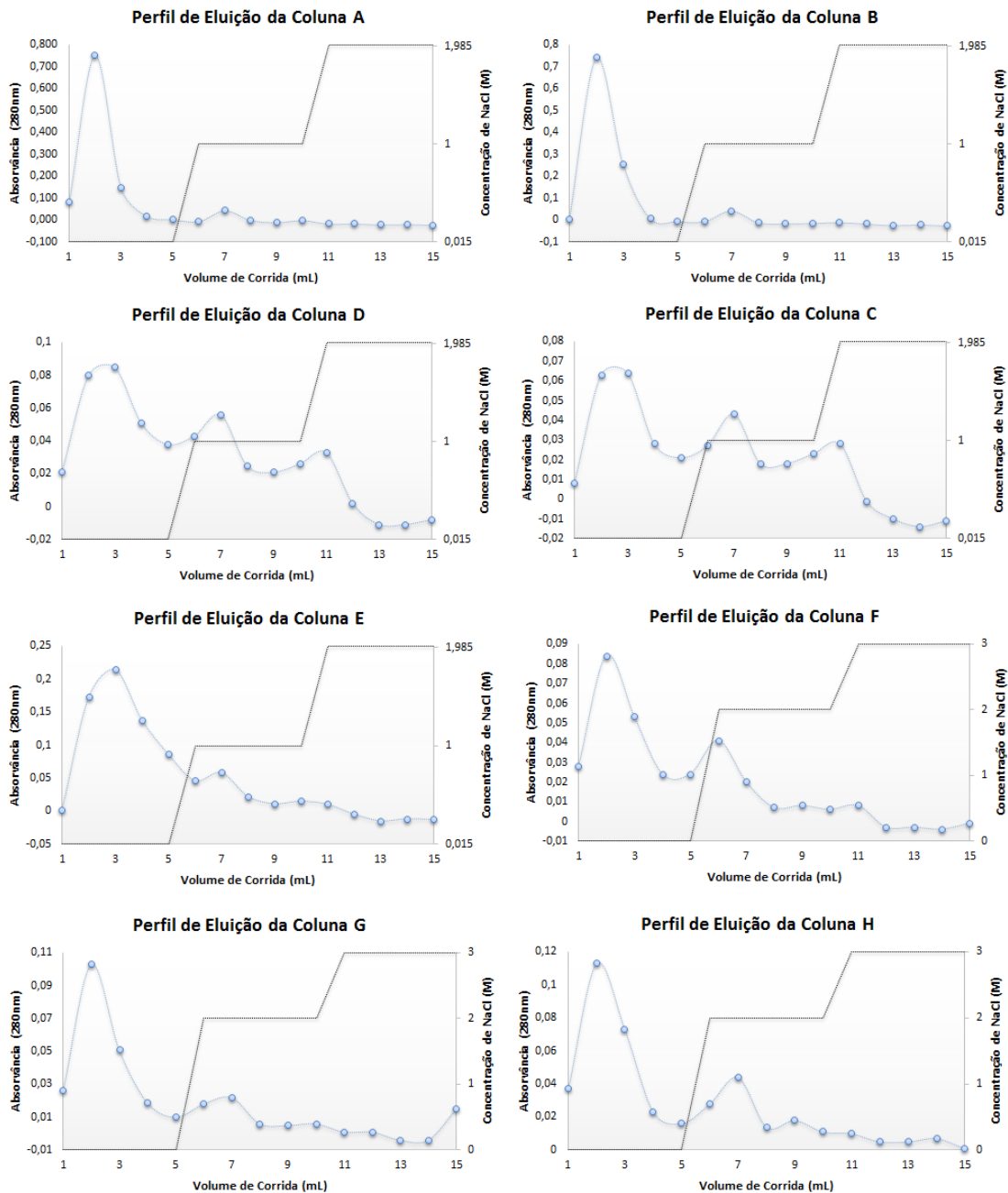


Figura 102 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, C, D, E, F, G e H. Injeção de 50 μ L de α -quimotripsina (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de NaCl 0,015M em

Tris-HCl 10mM a pH 8 e dois passos de eluição com uma solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e uma solução tampão de NaCl 2M em Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro)

Posteriormente foi estudada a BSA, mantendo as condições de trabalho e equilibrando as colunas com uma solução tampão de Tris-HCl 10mM a pH 8. Seguindo-se os passos descritos em 2.6.1.

Nas restantes proteínas era observada retenção quando utilizada uma solução tampão de Tris-HCl 10mM a pH 8, para promover a ligação nos suportes A e B. O mesmo não ocorria com os testes iniciais da BSA. Assim, as condições de ligação para a BSA foram promovidas com uma solução tampão de Tris-HCl 10mM a pH 8, em vez de uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 8.

Através da análise dos perfis cromatográficos representados na Figura 13, verifica-se uma ligeira retenção da BSA nos suportes D, F, G e H quando se promove a ligação com a adição da solução tampão de Tris-HCl 10mM a pH 8, enquanto que nos suportes C e E não é verificada qualquer interação.

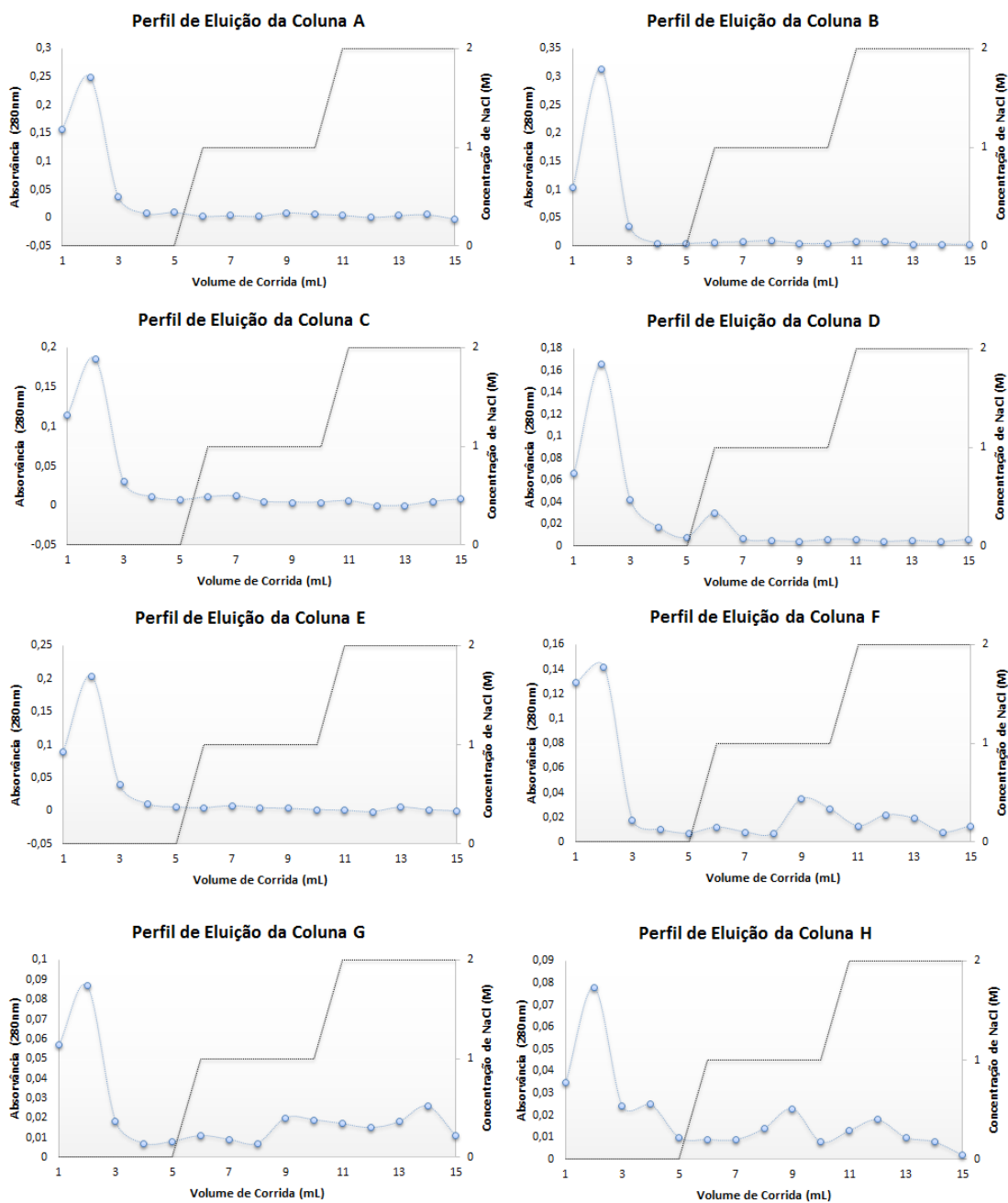


Figura 113 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, C, D, E, F, G e H. Injeção de 50µL de BSA (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de Tris-HCl 10mM a pH 8 e dois passos de eluição com uma solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e uma solução tampão de NaCl 2M em Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro)

Por fim foi estudada a Gamaglobulina, utilizando uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e seguindo os passos descritos em 2.6.1.

Através da análise dos perfis cromatográficos representados na Figura 14, verifica-se que não existe retenção significativa em qualquer um dos suportes sintetizados. É possível afirmar, por análise dos dados, que não existe interação iônica com o ligando imobilizado.

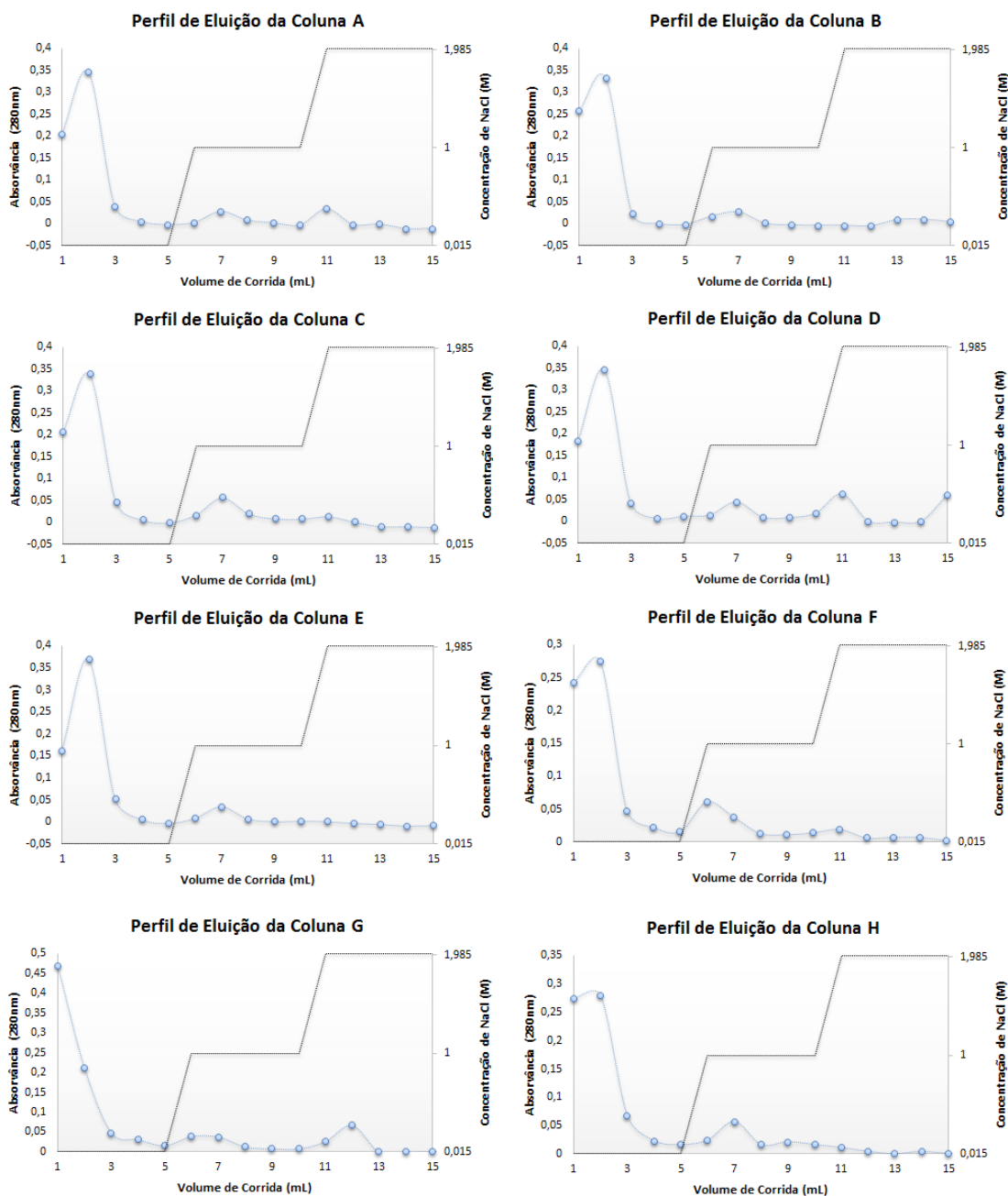


Figura 124 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, C, D, E, F, G e H. Injeção de 50 μ L de Gamaglobulina (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e dois passos de eluição com uma solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e uma solução tampão de NaCl 2M em Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro)

Os suportes C, D e E não foram utilizados nos testes seguintes pois começaram a perder ligando nas sucessivas lavagens, indicando uma reutilização reduzida.

3.3.1.1 Estudos cromatográficos a pH 9

Uma vez que a carga superficial da proteína interfere grandemente na sua adsorção, a manipulação da carga superficial para valores positivos ou negativos pode aumentar a

interação da proteína com o ligando. Esta carga superficial pode ser alterada modificando o pH da solução tampão para valores superiores ou inferiores ao pI da proteína.

Para os ensaios do estudo das interações iônicas a pH 9, as soluções de proteínas foram preparadas e as colunas foram equilibradas com uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 9 seguindo-se os passos descritos em 2.6.1.1.

A primeira proteína a ser testada foi a lisozima, esta apresenta um pI de 11,4, ou seja, está carregada positivamente a pH abaixo do seu pI.

Através da análise dos perfis cromatográficos representados na Figura 15, verifica-se uma elevada retenção da lisozima nos suportes F, G e H quando se promove a ligação com a adição da solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 9. Nos suportes A e B que servem de controlo regista-se uma ligeira retenção.

A retenção registada nos suportes A e B revelam que a alteração do pH afeta grandemente a afinidade da proteína para a Sepharose. Por outro lado, comparativamente aos dados obtidos a pH 8, é possível observar que o aumento da densidade de ligando piora o perfil de eluição, tornando os picos mais largos, indicando que o aumento do pH aumenta a afinidade da lisozima para os suportes sintetizados.

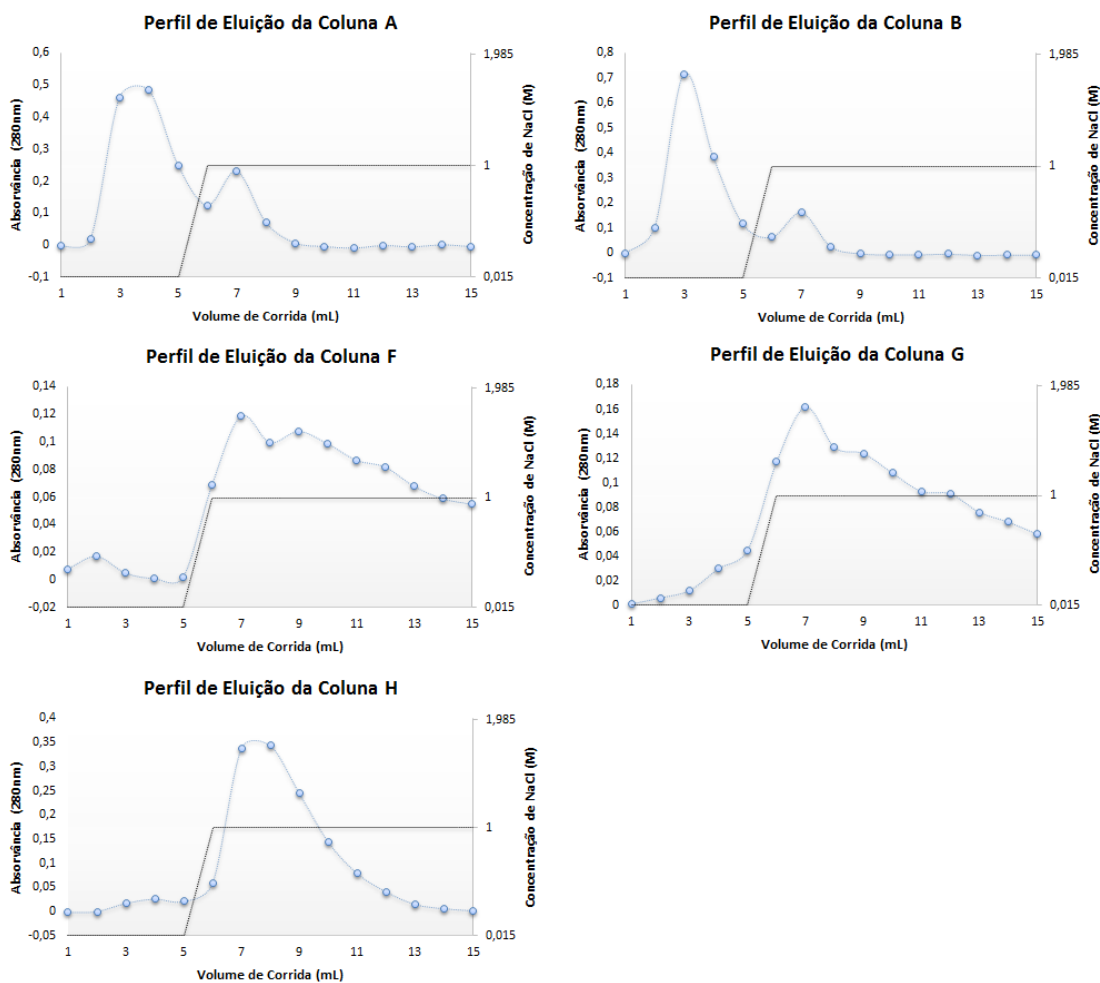


Figura 135 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50 μ L de lisozima (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 9 e para o passo de eluição uma solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 9 (representados pela linha a negro)

Posteriormente foi testada nas mesmas condições a RNase. Esta apresenta um pI de 9,6, encontrando-se esta carregada positivamente a pH 9, o pH da solução de tampão utilizada.

Através da análise dos perfis cromatográficos representados na Figura 16, verifica-se que não existe qualquer retenção da RNase nos suportes A e B quando a ligação é promovida com uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 9.

Nos suportes sintetizados a retenção observada é muito pouco significativa, no entanto é ligeiramente superior à interação observada quando a ligação é promovida com a solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 8.

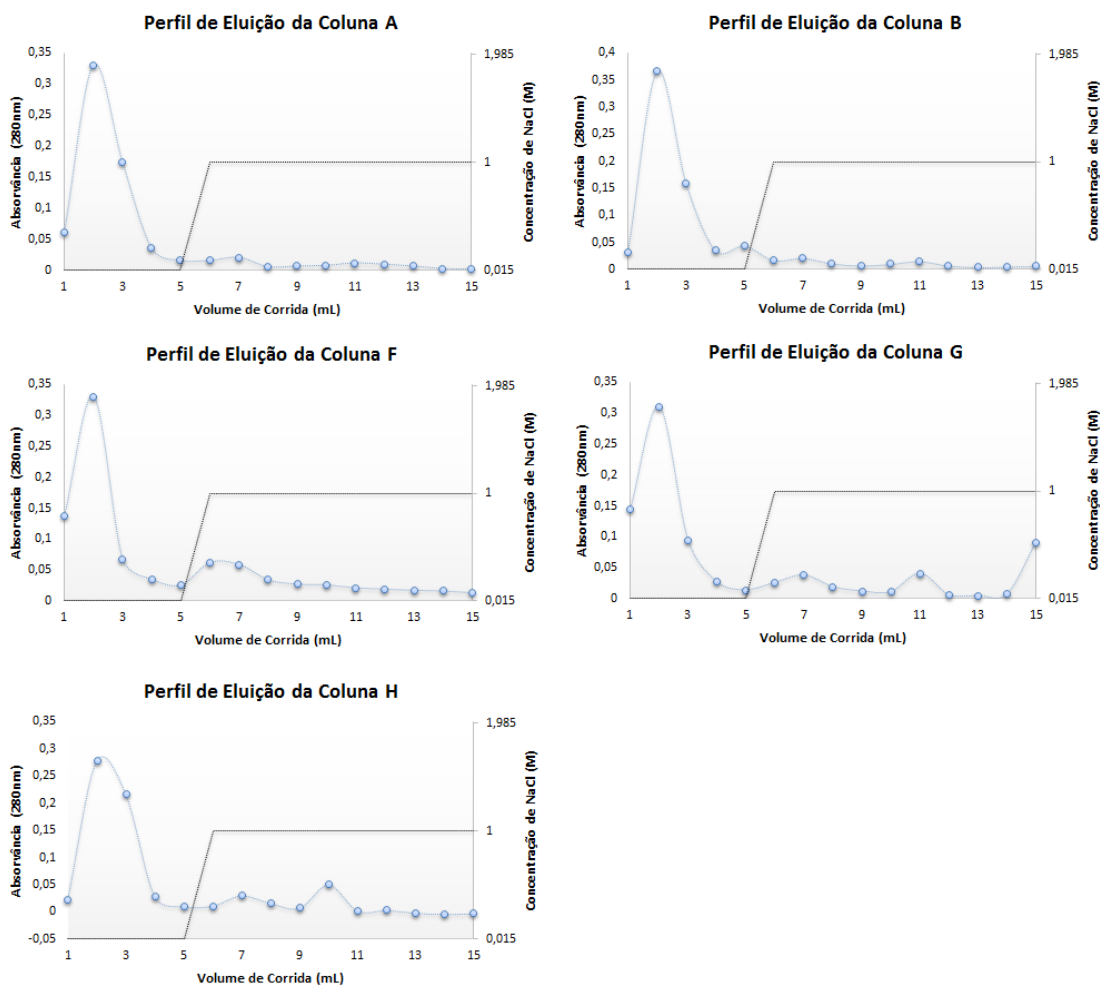


Figura 146 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50 μ L de RNase (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 9 e para o passo de eluição uma solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 9 (representados pela linha a negro)

E por último, foi testada a α -quimotripsina que apresenta um pI de 8,8, encontrando-se esta carregada negativamente a pH acima do seu pI. O pH 9, da solução de tampão utilizada, é ligeiramente acima do pI da proteína.

Através da análise dos perfis cromatográficos representados na Figura 17, verifica-se uma ligeira retenção da α -quimotripsina nos suportes A, B, F e H quando se promove a ligação com a adição da solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 9. Já no suporte G é possível verificar um ligeiro alongamento do pico, indicando baixa interação.

Comparativamente aos resultados obtidos quando a ligação é promovida com a solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 8, é possível verificar um pequeno aumento da retenção da α -quimotripsina.

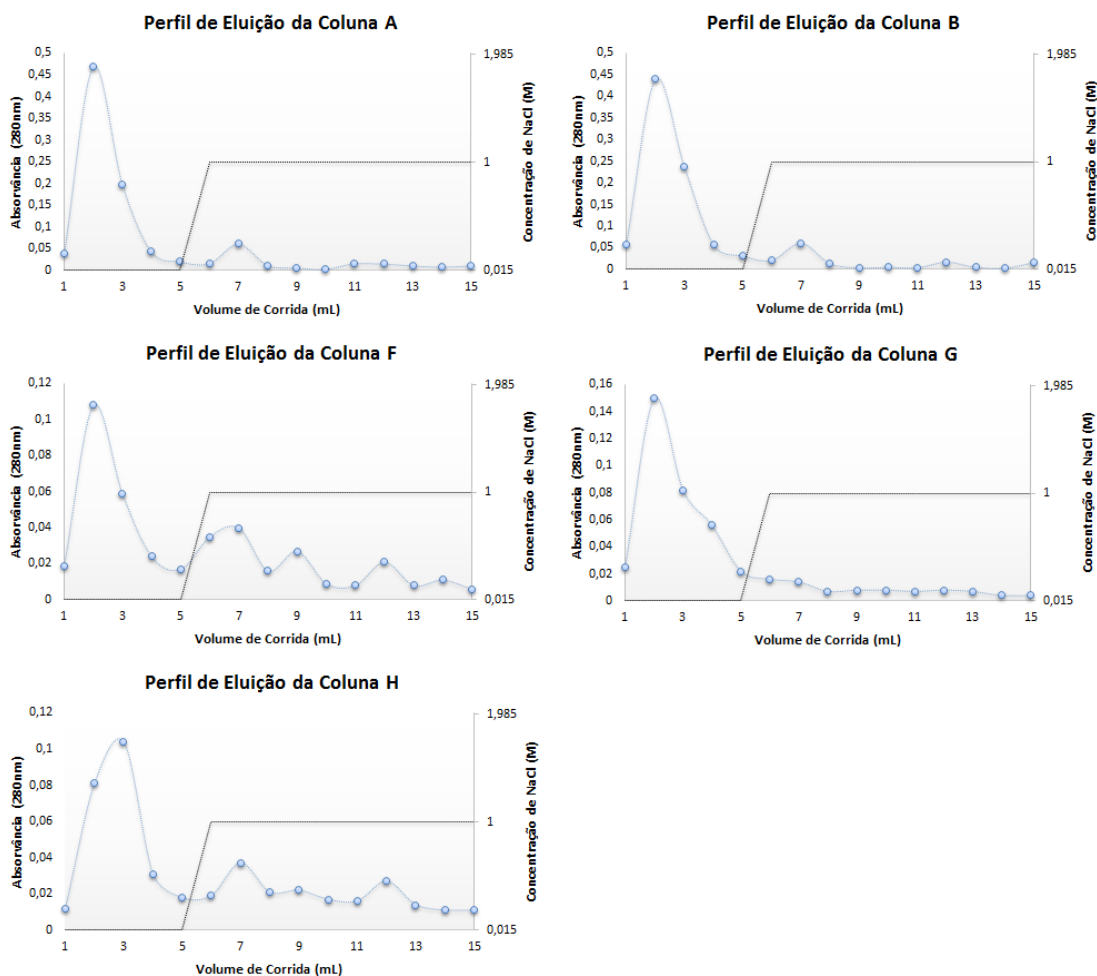


Figura 157 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50 μ L de α -quimotripsina (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de NaCl 0,015M em Tris-HCl 10mM a pH 9 e para o passo de uma eluição solução tampão de NaCl 1M em Tris-HCl 10mM a pH 9 (representados pela linha a negro)

3.3.1.2 Estudos cromatográficos a pH 10

Os estudos realizados a pH 9 demonstram uma ligeira modificação, bastante significativa, no comportamento de interação entre as proteínas e as carbocianinas imobilizadas. Uma vez que a carga superficial das proteínas utilizadas não é grandemente alterada, pois o pH utilizado não é superior aos pIs, foi então realizado o estudo utilizando a pH 10.

Para os ensaios do estudo das interações iônicas a pH 10, as soluções de proteínas foram preparadas com uma solução tampão de carbonato de sódio 10mM a pH 10, tendo as colunas sido equilibradas com a mesma solução tampão, seguindo-se os passos descritos em 2.6.1.2.

A lisozima apresenta um pI de 11,4, ou seja, está carregada positivamente nas condições utilizadas para promover a ligação.

Devido à existência de interação da lisozima com os suportes de controlo foi realizada uma corrida cromatográfica em condições de ligação diferentes. As colunas foram então equilibradas com uma solução tampão de NaCl 0,015M em carbonato de sódio 10mM a pH 10 seguindo-se os passos descritos em 2.6.1.2.

Através da análise dos perfis cromatográficos representados na Figuras 18 e 19, é possível verificar em todos os suportes preparados que a utilização de solução tampão de carbonato de sódio 10mM a pH 10 obtém um perfil cromatográfico bastante diferente da utilização de solução tampão de NaCl 0,015M em carbonato de sódio 10mM a pH 10.

Utilizando solução tampão de carbonato de sódio 10mM a pH 10, verifica-se uma grande retenção nos suportes F,G e H. No entanto também se regista alguma retenção nos suportes A e B.

Adicionalmente os picos largos demonstram que as condições utilizadas não são as mais indicadas para uma purificação, de tal forma foi realizado outro ensaio utilizando uma solução tampão de NaCl 0,015M em carbonato de sódio 10mM a pH 10 para promover a ligação.

Relativamente à utilização de solução tampão de NaCl 0,015M em carbonato de sódio 10mM a pH 10, verifica-se uma diminuição muito significativa na retenção nos suportes F e G, mas principalmente no suporte H. No entanto os picos obtidos nos suportes A e B, que agora apresentam retenção menor, são mais estreitos, indicando um melhor potencial de separação.

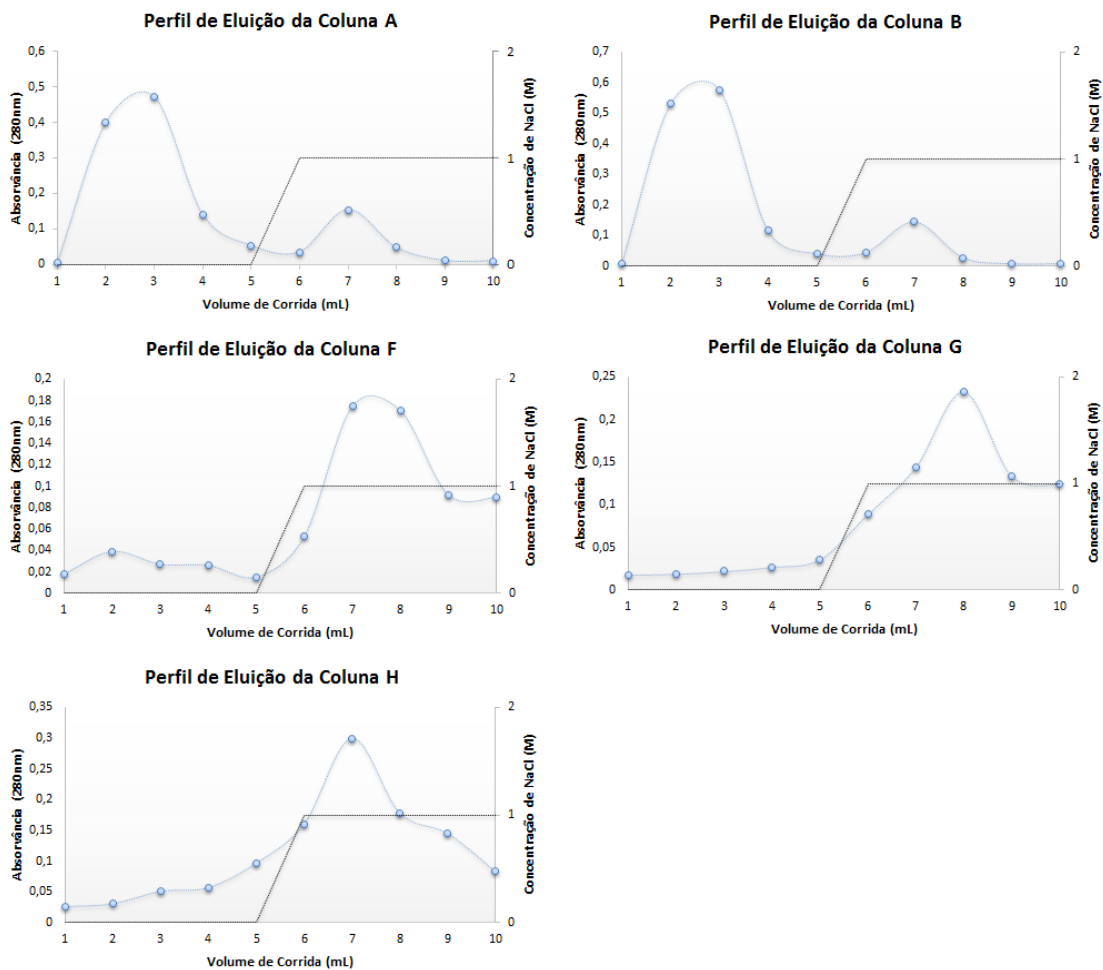


Figura 168 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50 μ L de lisozima (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de carbonato de sódio 10mM a pH 10 e para o passo de eluição uma solução tampão de NaCl 1M em carbonato de sódio 10mM a pH 10 (representados pela linha a negro)

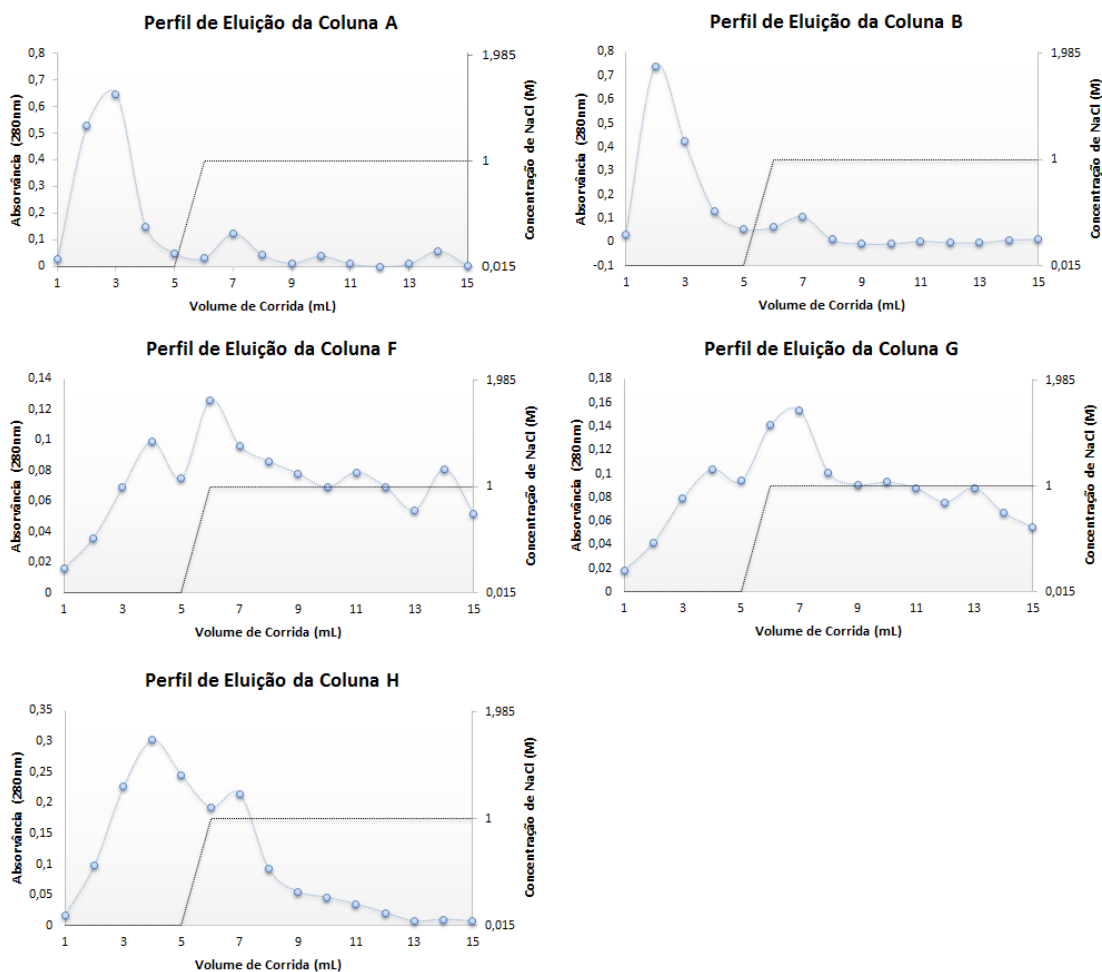


Figura 1917 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50 μ L de lisozima (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de NaCl 0,015M em carbonato de sódio 10mM a pH 10 e para o passo de eluição uma solução tampão de NaCl 1M em carbonato de sódio 10mM a pH 10 (representados pela linha a negro)

A RNase apresenta um pI de 9,6, encontrando-se esta carregada negativamente a pH 10, o pH da solução tampão utilizada.

Através da análise dos perfis cromatográficos representados na Figura 20, verifica-se que não existe qualquer retenção da RNase nos suportes sintetizados, quando a ligação é promovida com solução tampão de carbonato de sódio 10mM a pH 10, contrariando assim a dedução realizada a quando a utilização de solução tampão de NaCl 0,15M em Tris-HCl 10mM a pH 9.

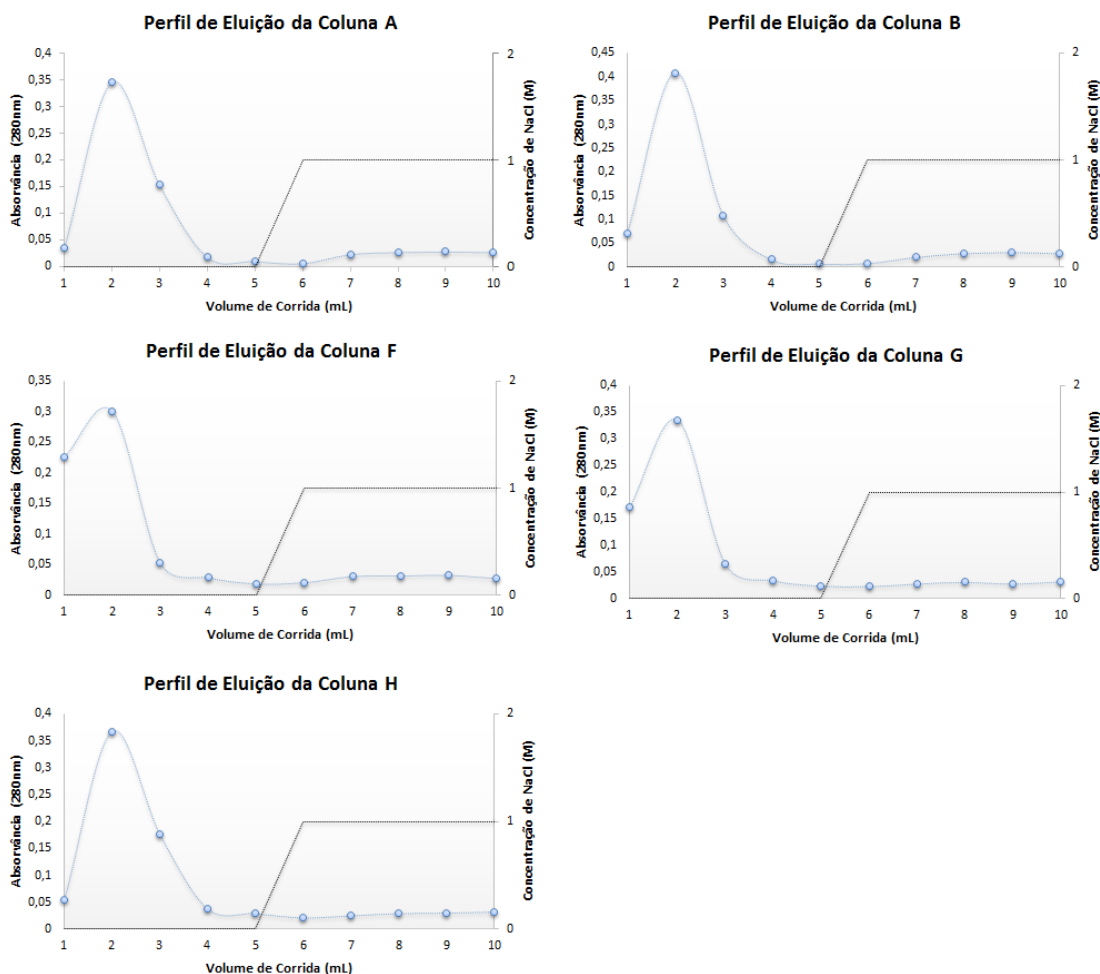


Figura 180 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50µL de RNase (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de carbonato de sódio 10mM a pH 10 e para o passo de eluição uma solução tampão de NaCl 1M em carbonato de sódio 10mM a pH 10 (representados pela linha a negro)

3.3.2 Condições hidrofóbicas

As carbocianinas sintetizadas possuem um grupo alifático longo. Podendo este ser responsável por interações hidrofóbicas que não estejam a ser contabilizados. De forma e verificar a existência deste tipo de interações foram feitos testes promovendo interações hidrofóbicas.

Para os ensaios do estudo das interações hidrofóbicas, as soluções de proteínas foram preparadas e as colunas foram equilibradas com uma solução tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8 seguindo-se os passos descritos em 2.6.2.

Através da análise dos perfis cromatográficos representados na Figura 21, verifica-se uma elevada retenção da lisozima nos suportes F, G e H quando se promove a ligação com a adição da solução tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8. Nos suportes A e B que

servem de controlo não houve retenção. Para além da forte retenção, os suportes apresentam um bom perfil de eluição com picos bem definidos.

Estes suportes, apresentam assim elevado potencial para separação de uma mistura artificial de proteínas.

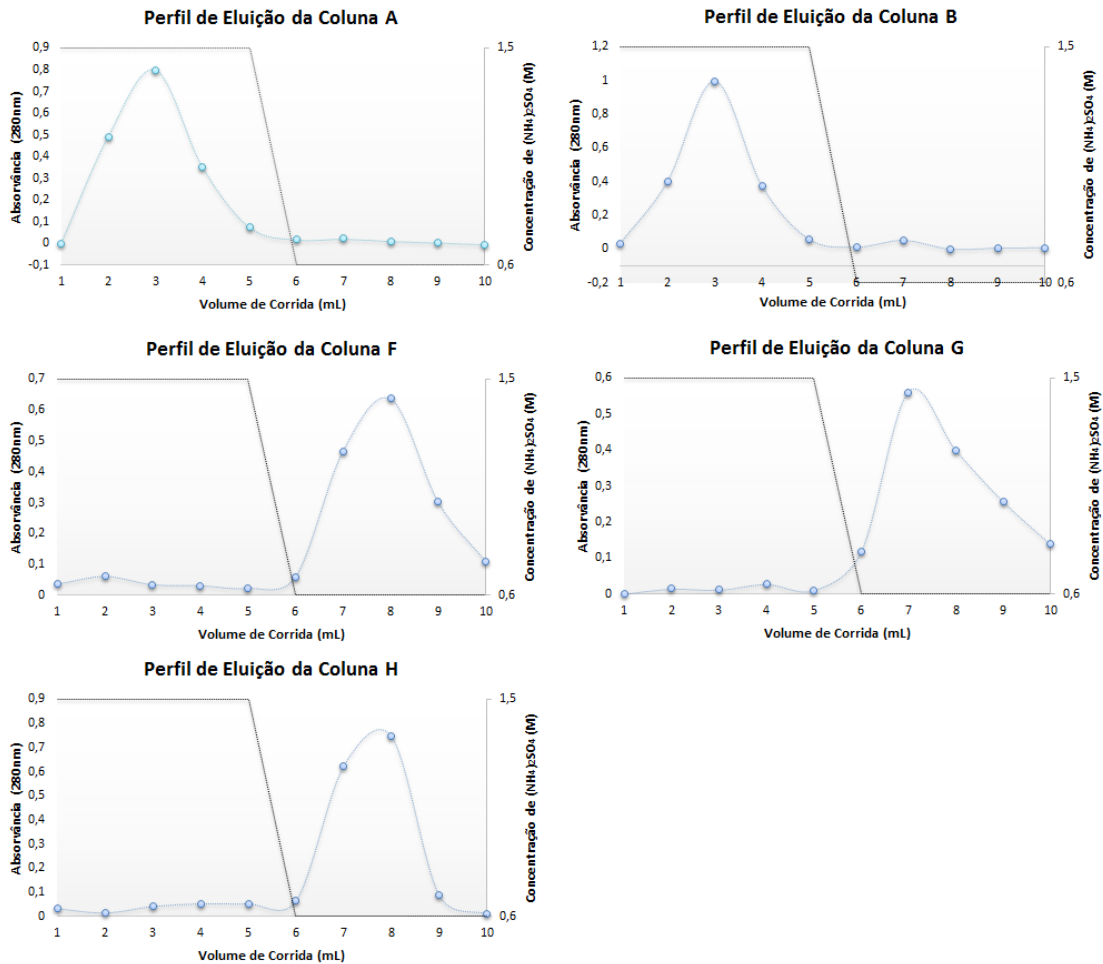


Figura 21 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50µL de lisozima (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de (NH₄)₂SO₄ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e para o passo de eluição uma solução tampão de (NH₄)₂SO₄ 0,6M em Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro)

Através da análise dos perfis cromatográficos representados na Figura 22, verifica-se que não existe qualquer retenção da RNase, tanto nos suportes A e B, que servem de controlo, como nos suportes G e H, quando é promovida a ligação com a adição da solução tampão de (NH₄)₂SO₄ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8. No suporte F é verificada uma pequena retenção pouco significativa, que no entanto pode ser um impeditivo à aplicação deste suporte em produções industriais e farmacêuticas.

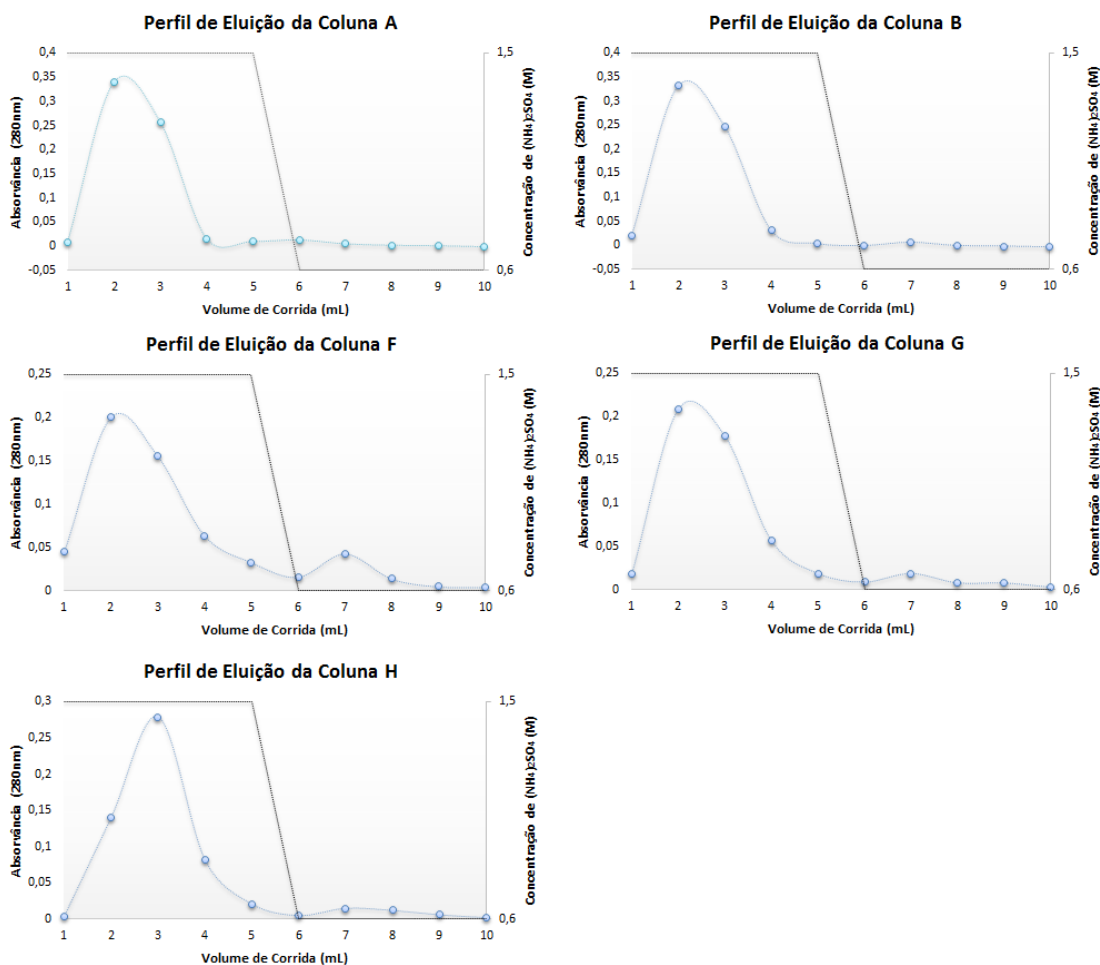


Figura 22 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50µL de RNase (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de (NH₄)₂SO₄ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e para o passo de eluição uma solução tampão de (NH₄)₂SO₄ 0,6M em Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro)

Através da análise dos perfis cromatográficos representados na Figura 23, verifica-se que existe retenção da tripsina nos suportes B, F, G e H. No suporte A não se regista qualquer interação, enquanto a interação registada nos suportes F, G e H é forte.

No suporte B regista-se uma interação bastante forte, levando a pensar que a tripsina tem interação hidrofóbica com a Sepharose que sofreu o processo de derivatização. É também possível verificar que o aumento da concentração de ligando imobilizado aumenta a afinidade para a coluna. No entanto pelo facto de existir afinidade com o branco, estes suportes, relativamente a esta proteína, necessitam de mais testes antes de poderem ser utilizadas em purificação.

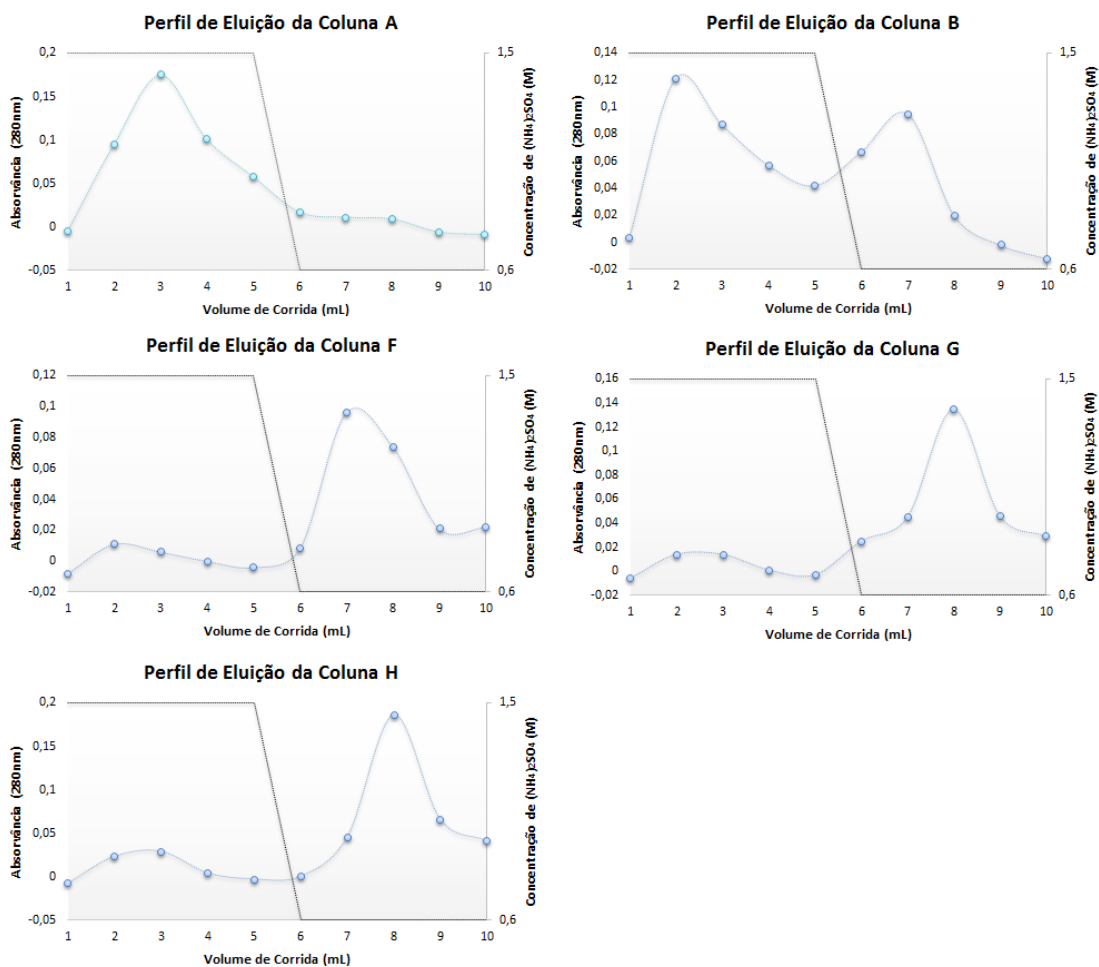


Figura 23 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50 μ L de tripsina (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de $(NH_4)_2SO_4$ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e para o passo de eluição uma solução tampão de $(NH_4)_2SO_4$ 0,6M em Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro)

Através da análise dos perfis cromatográficos representados na Figura 24, verifica-se uma retenção da BSA muito elevada nos suportes F, G e H quando se promove a ligação com a adição da solução tampão de $(NH_4)_2SO_4$ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8. Nos suportes A e B que servem de controlo não houve retenção.

A retenção da BSA pode ser considerada tão elevada que foi necessária a utilização de uma solução tampão de Tris-HCl 10mM a pH 8 para promover a sua eluição.

Apesar da interação entre a proteína e a coluna é de notar pequenas perdas em cada um dos passos anteriores. Perdas que podem ser comprometedoras numa purificação para aplicação farmacêutica ou industrial.

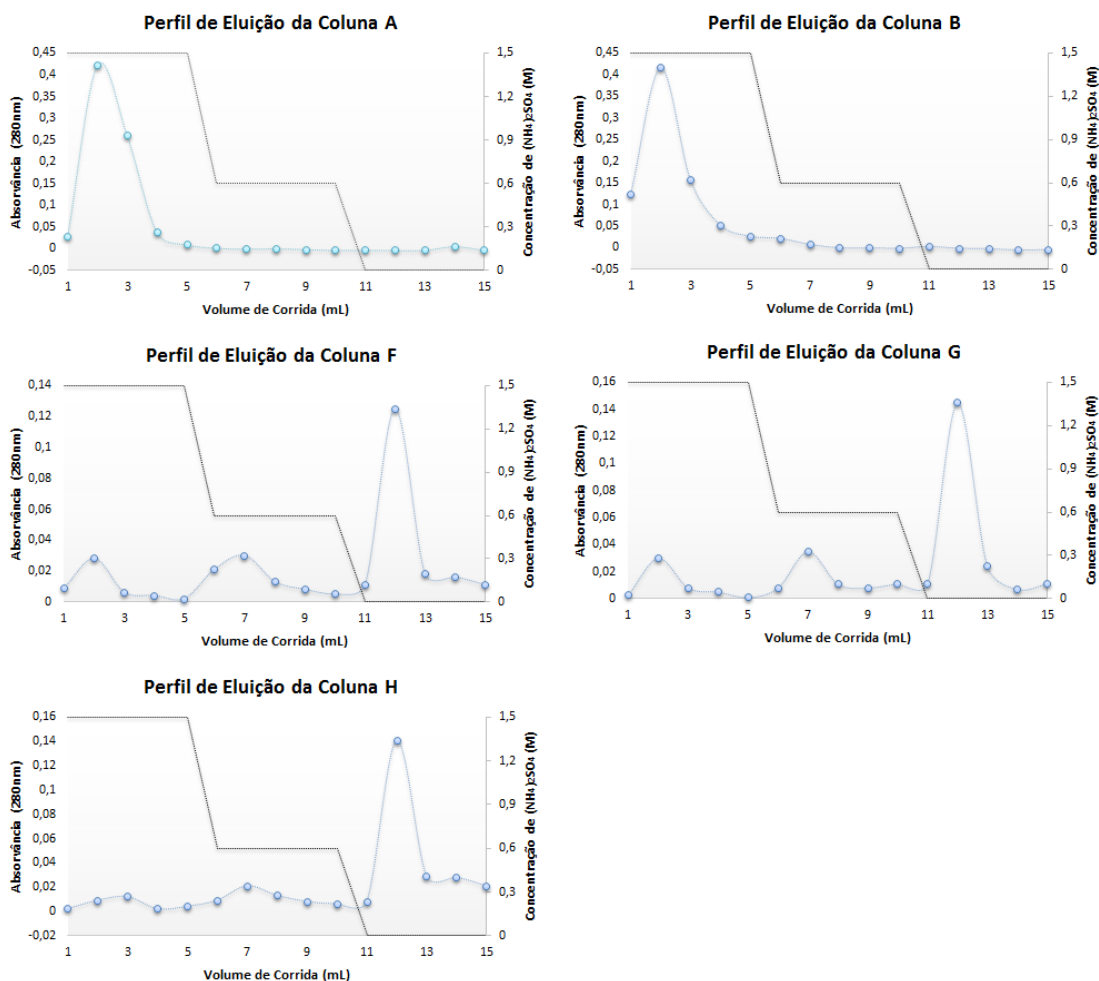


Figura 194 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50 μ L de BSA (12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de $(NH_4)_2SO_4$ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e dois passos de eluição com uma solução tampão de $(NH_4)_2SO_4$ 0,6M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e uma solução de Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro)

3.3.3 Estudos cromatográficos com mistura artificial de proteínas

Os ensaios cromatográficos representativos realizados em 3.3.2 mostraram claramente que uma diminuição na concentração de $(NH_4)_2SO_4$ promove a eluição seletiva das proteínas nos suportes F, G e H.

Foi criada uma mistura artificial contendo 100 μ L de RNase (12,5mg/mL), 100 μ L de BSA (12,5mg/mL) e 50 μ L de lisozima (12,5mg/mL). Posteriormente foram injetados 50 μ L da solução de mistura em cada um dos suportes de teste. A lisozima, utilizando a mesma concentração que as restantes proteínas, apresenta uma absorvência muito superior. De tal forma a sua concentração foi diminuída de forma a ser possível observar os picos da RNase e da BSA. As colunas foram equilibradas com uma solução tampão de $(NH_4)_2SO_4$ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8 seguindo-se os passos descritos em 2.6.3.

Através da análise dos perfis cromatográficos representados na Figura 25, é possível observar que num primeiro passo, utilizando a solução tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8, eluiu a RNase, uma vez que anteriormente não interagiu com o ligando, nas mesmas condições, enquanto que a lisozima e a BSA se encontravam anteriormente retidas nas mesmas condições. Quando a força iónica do tampão foi reduzida para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6M em Tris-HCl 10mM a pH 8, a lisozima eluiu. A BSA já havia demonstrado que continha a interação mais forte com o ligando, no entanto, não é registado um pico específico na eluição da mesma, quando se muda o tampão de eluição para uma solução de Tris-HCl 10mM a pH 8.

É possível observar que os picos obtidos não são definidos, podendo haver mistura de proteínas em algumas das frações recolhidas. A obtenção dos picos definidos neste caso poderá ser obtida pela utilização de um maior volume em cada passo da eluição.

É ainda de referir que os picos correspondentes à RNase são muito pouco visíveis, enquanto o pico correspondente à BSA não é observável nos suportes F e H, e pouco visível no suporte G. Estes picos são muito pouco visíveis, não devido a sua interação com o suporte cromatográfico, mas sim devido a elevada absorvência da lisozima comparativamente as restantes proteínas.

Nos estudos com os suportes de controlo, nenhuma das proteínas apresentou interação com o ligando nas condições de ligação com a solução tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8. Estes ensaios demonstraram claramente que o ligando é o responsável pelas interações observadas com as proteínas.

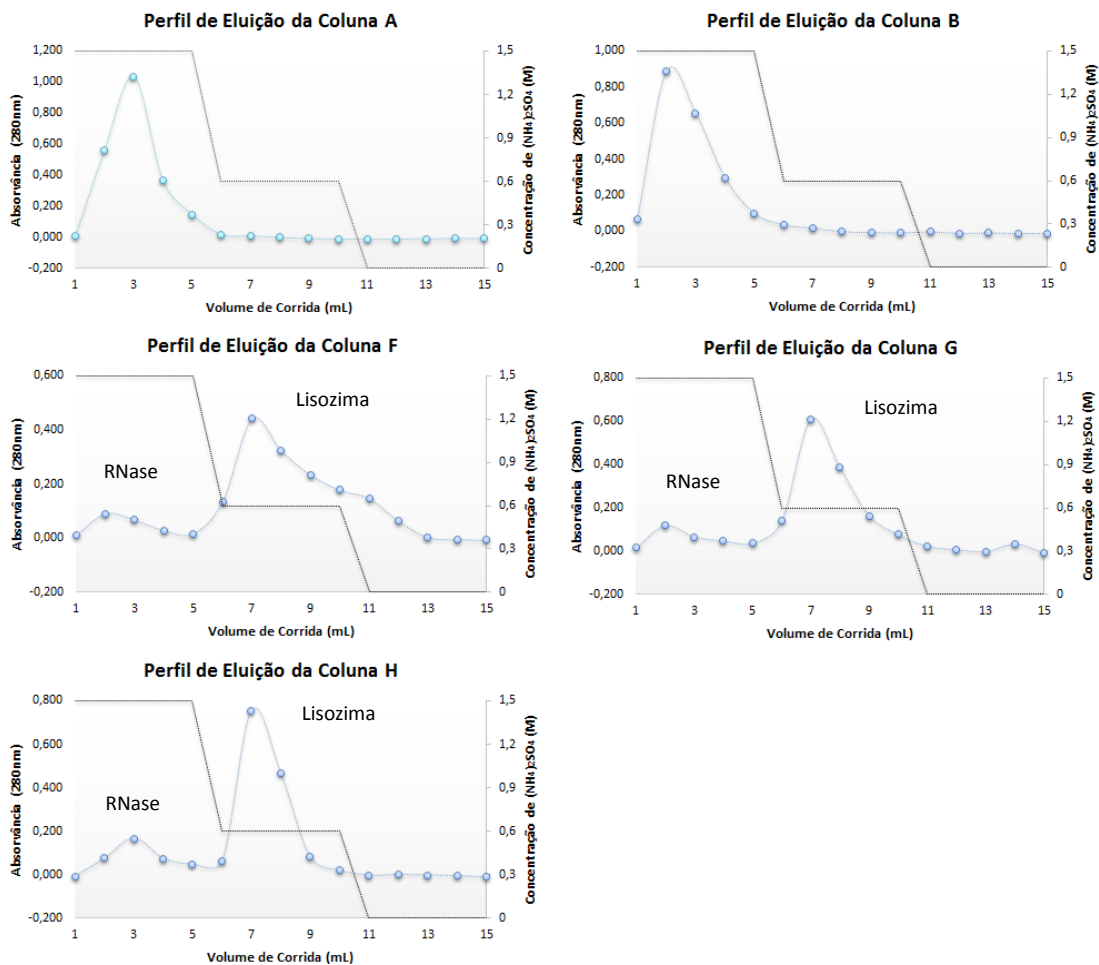


Figura 25 - Perfis cromatográficos obtidos com os suportes A, B, F, G e H. Injeção de 50 μ L de uma mistura artificial de proteínas (BSA a 12,5mg/mL, lisozima a 12,5mg/mL e RNase a 12,5mg/mL) utilizando para passo de ligação uma solução tampão de $(NH_4)_2SO_4$ 1,5M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e dois passos de eluição com uma solução tampão de $(NH_4)_2SO_4$ 0,6M em Tris-HCl 10mM a pH 8 e uma solução de Tris-HCl 10mM a pH 8 (representados pela linha a negro)

CAPITULO IV.
CONCLUSÕES

Ao longo dos últimos anos, o desenvolvimento de novas técnicas para a purificação de biomoléculas tem sido um tema amplamente explorado devido à importância que representam em várias e diferentes áreas do conhecimento, com especial interesse para a biotecnologia e para as ciências da saúde.

Dentro dos vários métodos de purificação, a cromatografia desempenha um papel especial, pois permite separação com grande eficácia e baixo custo. Em especial a CA, tem desempenhado um papel fundamental nestas áreas de conhecimento.

Dentro da CA, a utilização de ligandos de pseudo-afinidade com origem sintética tem-se revelado cada vez mais importante. Estes são fáceis de obter a partir de produtos químicos relativamente baratos e possuem alta estabilidade.

O desenvolvimento de novos suportes cromatográficos baseados em corantes cianínicos, como os sintetizados e estudados neste trabalho, possuidores de um grupo carboxílico capaz de se ligar covalentemente a matrizes hidroxílicas por métodos de esterificação em condições suaves, concretamente pelo método de Steglich. Este método mostrou-se bastante eficaz na imobilização das carbocianinas sintetizadas.

A preparação de novos suportes cromatográficos utilizando o método do orto éster para a síntese de carbocianinas e a esterificação se Steglich para a sua imobilização, revelou-se um procedimento simples e barato de concretizar, obtendo bom rendimento.

Dentro dos resultados obtidos o suporte H, que continha 0,078mmol iniciais de ligando, apresentou picos mais bem definidos, tanto na separação da mistura proteica como nos testes com as proteínas isoladas, indicando ser a melhor escolha numa separação cromatográfica. É de notar que nos resultados obtidos utilizando a solução tampão de carbonato de sódio 10mM com pH 10, a quantidade de ligando deste suporte não foi suficiente para promover a ligação, podendo este fator ser um impedimento dependendo do objetivo da sua utilização.

O desempenho demonstrado pelo suporte poderá ser explicado pelo facto do acesso do ligando aos locais de ligação da proteína não ser prejudicado, apontando para que uma densidade de ligando nesta gama de concentrações seja um bom compromisso entre uma maior capacidade possível e um melhor desempenho cromatográfico.

Os suportes cromatográficos sintetizados, testados através de uma seleção criteriosa da fase móvel e do gradiente de sal perante várias proteínas modelo, revelaram ser capazes de separar seletivamente pelo menos duas das proteínas padrão RNase, lisozima e BSA. Os resultados relativamente à BSA tornam-se inconclusivos, devido à baixa absorvência da mesma quando comparada com a absorvência da lisozima.

Concretamente, os suportes cromatográficos revelaram não interagir com a RNase ao contrário das restantes duas proteínas (lisozima e BSA) que ficaram retidas nas colunas, sendo

estas duas últimas posteriormente eluídas seletivamente com a diminuição gradual da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Os resultados cromatográficos obtidos indicam a prevalência das interações hidrofóbicas com o braço espaçador. No entanto, é possível observar, especialmente nos primeiros ensaios realizados com solução tampão de Tris-HCl 10mM, a existência de interações iônicas com os núcleos heterocíclicos carregado positivamente e a cadeia *N*-alquílica que os liga.

Sendo este estudo apenas exploratório no que diz respeito à aplicação de apenas duas cianinas como ligandos em processos cromatográficos, esperamos que os resultados aqui obtidos, incluindo os menos bem-sucedidos, sirvam para apontar um caminho na escolha de melhores ligandos, melhores braços espaçadores e melhores condições cromatográficas.

CAPITULO V.
PRESPECTIVAS FUTURAS

A CA demonstra-se mais uma vez como um método altamente promissor em termos de purificação de biomoléculas de interesse terapêutico e industrial.

Apresenta grande versatilidade e simplicidade no que diz respeito a ligandos que podem ser utilizados. No entanto estes ainda carecem de muita investigação.

De tal forma, os ligandos sintéticos, como os aqui apresentados, devem ser ainda mais profundamente investigados e melhorados, de forma a obter, não só melhores rendimentos de purificação pelo menor custo, mas também um tempo de utilização mais prolongado.

Assim a redução do braço espaçador poderá ser um objetivo, aumentando a influência das interações iónicas e diminuindo as interações hidrofóbicas. A adição de grupos funcionais aos grupos heterocíclicos pode favorecer a ligação bem como permitir diferentes ligações a diferentes pHs.

A pesquisa de locais de ligação específicos ou diferentes locais com diferentes interações pode também ser uma vantagem, permitindo utilizar estratégias combinadas de forma a aumentar a separação e purificação das biomoléculas.

A utilização de outras proteínas modelo, bem como uma investigação mais profunda das proteínas, que por diversos motivos, não puderam ser utilizadas em todos os testes, pode fornecer uma melhor compreensão das interações possíveis e da sua força.

Ficam ainda em aberto questões relativamente à toxicidade destes compostos, bem como a sua influência na atividade das proteínas recuperadas e a taxa de recuperação efetiva conseguida com este método.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agbavwe, C. and M. M. Somoza (2011). "Sequence-Dependent Fluorescence of Cyanine Dyes on Microarrays." PLoS ONE 6(7): e22177.

Ali, A. M., B. Hill and S. D. Taylor (2009). "Trichloroethyl Group As a Protecting Group for Sulfonates and Its Application to the Synthesis of a Disulfonate Analog of the Tyrosine Sulfated PSGL-143-50 Peptide." The Journal of Organic Chemistry 74(9): 3583-3586.

Almeida, P. (1999). ... a Cor. "Cianinas, a cor não visível da fotografia" Química - Boletim da Sociedade Portuguesa de Química 73: 9-12.

Alves, L. P., S. S. Ramos, F. Sousa, R. E. F. Boto and P. Almeida (2014). "A Benzothiazolium Salt as Chromatography Ligand for Protein Purification." Chromatographia 77(23-24): 1597-1605.

Avitabile, B. G., C. A. Smith and D. B. Judd (2005). "Pentafluorophenyl Sulfonate Ester as a Protecting Group for the Preparation of Biaryl- and Heterobiaryl Sulfonate Esters." Organic Letters 7(5): 843-846.

Ayyar, B. V., S. Arora, C. Murphy and R. O'Kennedy (2012). "Affinity chromatography as a tool for antibody purification." Methods 56(2): 116-129.

Berek, D. (2010). "Size exclusion chromatography--a blessing and a curse of science and technology of synthetic polymers." Journal of Separation Science 33(3): 315-335.

Borisenko, V., T. Loughheed, J. Hesse, E. Füreder-Kitzmüller, N. Fertig, J. C. Behrends, G. A. Woolley and G. J. Schütz (2003). "Simultaneous Optical and Electrical Recording of Single Gramicidin Channels." Biophysical Journal 84(1): 612-622.

Boto, R., P. Santos, L. Reis and P. Almeida (2007a). "Synthesis and characterization of mono- and dicarboxyalkyloxacyanines." Dyes and Pigments 75(2): 298-305.

Boto, R. E., P. Almeida and J. A. Queiroz (2008). "Thiacarbocyanine as ligand in dye-affinity chromatography for protein purification." Biomedical Chromatography 22(3): 278-288.

Boto, R. E., U. Anyanwu, F. Sousa, P. Almeida and J. A. Queiroz (2009). "Thiacarbocyanine as ligand in dye-affinity chromatography for protein purification. II. Dynamic binding capacity using lysozyme as a model." Biomedical Chromatography 23(9): 987-993.

Boto, R. E. F., R. M. El-Shishtawy, P. F. Santos, L. V. Reis and P. Almeida (2007b). "Synthesis and characterization of novel mono- and dicarboxyalkylthiacarbocyanines and their ester derivatives." Dyes and Pigments 73(2): 195-205.

Boto, R. E. F., A. S. Oliveira, L. F. Vieira Ferreira and P. Almeida (2001). "A study of N,N'-dicarboxyalkylthiacarbocyanines as cyanine reactive dyes covalently bound to cellulose." Dyes and Pigments 48(2): 71-84.

Bouit, P. A., D. Rauh, S. Neugebauer, J. L. Delgado, E. Di Piazza, S. Rigaut, O. Maury, C. Andraud, V. Dyakonov and N. Martin (2009). "A "cyanine-cyanine" salt exhibiting photovoltaic properties." Organic Letters 11(21): 4806-4809.

Broadbent, A. D. (2001). *Basic Principles of Textile Coloration*. Bradford, West Yorkshire, UK, Society of Dyers and Colourists.

Carr, S. A., M. E. Hemling, M. F. Bean and G. D. Roberts (1991). "Integration of mass spectrometry in analytical biotechnology." Analytical Chemistry 63(24): 2802-2824.

Chen, S. H., C. T. Ho, K. Y. Hsiao and J. M. Chen (2000). "Pressure-induced retention of the lysozyme on reversed-phase liquid chromatography." Journal of Chromatography A 891(2): 207-215.

Chou, H.-H., C.-Y. Hsu, Y.-C. Hsu, Y.-S. Lin, J. T. Lin and C. Tsai (2012). "Dipolar organic pyridyl dyes for dye-sensitized solar cell applications." Tetrahedron 68(2): 767-773.

Clonis, Y. D., N. E. Labrou, V. P. Kotsira, C. Mazitsos, S. Melissis and G. Gogolas (2000). "Biomimetic dyes as affinity chromatography tools in enzyme purification." Journal of Chromatography A 891(1): 33-44.

Cramer, S. M. and G. Jayaraman (1993). "Preparative chromatography in biotechnology." Current Opinion in Biotechnology 4(2): 217-225.

Cruz, C., R. E. Boto, P. Almeida and J. A. Queiroz (2011). "Study of specific interaction between nucleotides and dye support by nuclear magnetic resonance." Journal of Molecular Recognition 24(6): 975-980.

Cruz, C., R. E. Boto, A. K. Drzazga, P. Almeida and J. A. Queiroz (2014). "NMR screening of new carbocyanine dyes as ligands for affinity chromatography." Journal of Molecular Recognition 27(4): 197-204.

Cuatrecasas, P., M. Wilchek and C. B. Anfinsen (1968). "Selective enzyme purification by affinity chromatography." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 61(2): 636-643.

Denizli, A. and E. Piskin (2001). "Dye-ligand affinity systems." Journal of Biochemical and Biophysical Methods 49(1-3): 391-416.

Deshmukh, N. R. and A. M. Lali (2005). "Adsorptive purification of pDNA on superporous rigid cross-linked cellulose matrix." Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences 818(1): 5-10.

Deutscher, R. R. B. a. M. P. (2009). *Methods in Enzymology. Guide to Protein Purification*. London, UK, Academic Press.

Dogan, A., S. Ozkara, M. M. Sari, L. Uzun and A. Denizli (2012). "Evaluation of human interferon adsorption performance of Cibacron Blue F3GA attached cryogels and interferon purification by using FPLC system." Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences 893-894: 69-76.

Ebert, B., B. Riefke, U. Sukowski and K. Licha (2011). "Cyanine dyes as contrast agents for near-infrared imaging in vivo: acute tolerance, pharmacokinetics, and fluorescence imaging." Journal of Biomedical Optics 16(6): 066003.

Ekinci, D. (2012). Chemical Biology. Rijeka, Croatia, InTech Europe.

Fabian, J., H. Nakazumi and M. Matsuoka (1992). "Near-infrared absorbing dyes." Chemical Reviews 92(6): 1197-1226.

Federici, M. M., P. B. Chock and E. R. Stadtman (1985). "Interaction of Cibacron Blue F3GA with glutamine synthetase: use of the dye as a conformational probe. 1. Studies using unfractionated dye samples." Biochemistry 24(3): 647-660.

Fekete, S., E. Olah and J. Fekete (2012). "Fast liquid chromatography: the domination of core-shell and very fine particles." Journal of Chromatography A 1228: 57-71.

Feng, H., L. Jia, H. Li and X. Wang (2006). "Screening and chromatographic assessing of a novel IgG biomimetic ligand." Biomedical Chromatography 20(10): 1109-1115.

Garcia, S. B. (2014). "Preparação e Estudo por STD-NMR de Sais Quaternários de Amônio." Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica (2º ciclo de estudos), Universidade da Beira Interior.

Garg, N., I. Y. Galaev and B. Mattiasson (1996). "Dye-affinity techniques for bioprocessing: Recent developments." Journal of Molecular Recognition 9(4): 259-274.

Ghose, S. and S. M. Cramer (2001). "Characterization and modeling of monolithic stationary phases: application to preparative chromatography." Journal of Chromatography A 928(1): 13-23.

Ghose, S., T. M. Mc Nerney and B. Hubbard (2004). "Preparative protein purification on underivatized silica." Biotechnology and Bioengineering 87(3): 413-423.

Gong, H., J. Kovar, G. Little, H. Chen and D. M. Olive (2010). "In Vivo Imaging of Xenograft Tumors Using an Epidermal Growth Factor Receptor-Specific Affibody Molecule Labeled with a Near-infrared Fluorophore." Neoplasia 12(2): 139-149.

Gore, S., S. Baskaran and B. König (2012). "Fischer Indole Synthesis in Low Melting Mixtures." Organic Letters 14(17): 4568-4571.

- Guiochon, G. (2002). "Preparative liquid chromatography." Journal of Chromatography A 965(1-2): 129-161.
- Hage, D. S. (1999). "Affinity Chromatography: A Review of Clinical Applications." Clinical Chemistry 45(5): 593-615.
- Hamer, F. M. (1964). Chemistry of Heterocyclic Compounds. The Cyanine Dyes and Related Compounds, Volume 18. Hoboken, New Jersey, USA, John Wiley & Sons, Inc.
- Healthcare, G. (1998). Gel Filtration. Principles and Methods. Uppsala, Sweden, Amersham Pharmacia Biotech AB.
- Healthcare, G. (2002a). Gel Filtration. Principles and Methods. Uppsala, Sweden, Amersham Biosciences AB.
- Healthcare, G. (2002b). Ion Exchange Chromatography. Principles and Methods. Uppsala, Sweden, Amersham Biosciences AB.
- Healthcare, G. (2006). Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography. Principles and Methods. Uppsala, Sweden, GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- Healthcare, G. (2007a). Affinity Chromatography. Principles and Methods. Uppsala, Sweden, GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- Healthcare, G. (2007b). Purifying Challenging Proteins. Principles and Methods. Uppsala, Sweden, GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- Healthcare, G. (2010a). Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing. Principles and Methods. Uppsala, Sweden, GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- Healthcare, G. (2010b). Strategies for Protein Purification. Handbook. Uppsala, Sweden, GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- Healthcare, G. (2012). ÄKTA™ Laboratory-scale Chromatography Systems. Instrument Management Handbook. Uppsala, Sweden, GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- Healthcare, G. (2013). Multimodal Chromatography. Handbook. Uppsala, Sweden, GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- Healthcare, G. (2014a). Cross Flow Filtration. Method Handbook. Uppsala, Sweden, GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- Healthcare, G. (2014b). Size Exclusion Chromatography. Principles and Methods. Uppsala, Sweden, GE Healthcare Bio-Sciences AB.

Hess, D., T. C. Covey, R. Winz, R. W. Brownsey and R. Aebersold (1993). "Analytical and micropreparative peptide mapping by high performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry of proteins purified by gel electrophoresis." Protein Science 2(8): 1342-1351.

Hutta, M., R. Gora, R. Halko and M. Chalanyova (2011). "Some theoretical and practical aspects in the separation of humic substances by combined liquid chromatography methods." Journal of Chromatography A 1218(49): 8946-8957.

Janson, J.-C. (2011). Protein Purification. Principles, High Resolution Methods, and Applications. Hoboken, New Jersey, USA, John Wiley & Sons, Inc.

Jiang, L.-L., L.-F. Dou and B.-L. Li (2007). "An efficient approach to the synthesis of water-soluble cyanine dyes using poly(ethylene glycol) as a soluble support." Tetrahedron Letters 48(33): 5825-5829.

John Leonard, B. L. a. G. P. (1998). Advanced Practical Organic Chemistry. Cheltenham, UK, Stanley Thornes.

Jones, R. A. (2001). Quaternary Ammonium Salts. Their Use in Phase-Transfer Catalysis (Best Synthetic Methods). Amsterdam, Netherlands, Elsevier Ltd.

Jungbauer, A. (1993). "Preparative chromatography of biomolecules." Journal of Chromatography A 639(1): 3-16.

Kameyama, A., Y. Kaneda, H. Yamanaka, H. Yoshimine, H. Narimatsu and Y. Shinohara (2004). "Detection of oligosaccharides labeled with cyanine dyes using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." Analytical Chemistry 76(15): 4537-4542.

Kim, H., C. Webster, J. K. Roberts, J. Kositsawat, L. W. Hung, T. C. Terwilliger and C. Y. Kim (2012). "Enhancement of crystallization with nucleotide ligands identified by dye-ligand affinity chromatography." Journal of Structural and Functional Genomics 13(2): 71-79.

Kim, S. H., S. H. Hwang, J. J. Kim, C. M. Yoon and S. R. Keum (1998). "Syntheses and Properties of Functional Aminosquarylium Dyes." Dyes and Pigments 37(2): 145-154.

Klán, P., A. Paola Pelliccioli, T. Pospíšil and J. Wirz (2002). "2,5-Dimethylphenacyl esters: A photoremovable protecting group for phosphates and sulfonic acids Dedicated to Professor Waldemar Adam on the occasion of his 65th birthday." Photochemical & Photobiological Sciences 1(11): 920-923.

Labrou, N. E. (2003). "Design and selection of ligands for affinity chromatography." Journal of Chromatography B 790(1-2): 67-78.

- Landini, D., A. Maia and A. Rampoldi (1986). "Stability of quaternary onium salts under phase-transfer conditions in the presence of aqueous alkaline solutions." The Journal of Organic Chemistry 51(16): 3187-3191.
- Liapis, A. I. (1989). "Theoretical aspects of affinity chromatography." Journal of Biotechnology 11(2-3): 143-160.
- Lopalco, M., E. N. Koini, J. K. Cho and M. Bradley (2009). "Catch and release microwave mediated synthesis of cyanine dyes." Organic & Biomolecular Chemistry 7(5): 856-859.
- Lowe, C. R., A. R. Lowe and G. Gupta (2001). "New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals." Journal of Biochemical and Biophysical Methods 49(1-3): 561-574.
- Magdeldin, S. (2012). Affinity Chromatography. Rijeka, Croatia, InTech Europe.
- Mishra, A., R. K. Behera, P. K. Behera, B. K. Mishra and G. B. Behera (2000). "Cyanines during the 1990s: A Review." Chemical Reviews 100(6): 1973-2012.
- Mujumdar, S. R., R. B. Mujumdar, C. M. Grant and A. S. Waggoner (1996). "Cyanine-Labeling Reagents: Sulfobenzindocyanine Succinimidyl Esters." Bioconjugate Chemistry 7(3): 356-362.
- Narayanan, S. R. (1994). "Preparative affinity chromatography of proteins." Journal of Chromatography A 658(2): 237-258.
- Neises, B. and W. Steglich (1978). "Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids." Angewandte Chemie International Edition in English 17(7): 522-524.
- Neumann, Y. S. a. R. (1997). Handbook of Phase Transfer Catalysis. London, UK, Blackie Academic and Professional.
- Nishikido, J. O. a. J. (2010). Esterification. Methods, Reactions, and Applications. Weinheim, Germany, Wiley-VCH.
- Ostroverkhova, O. and W. E. Moerner (2004). "Organic Photorefractives: Mechanisms, Materials, and Applications." Chemical Reviews 104(7): 3267-3314.
- Panigrahi, M., S. Dash, S. Patel and B. K. Mishra (2012). "Syntheses of cyanines: a review." Tetrahedron 68(3): 781-805.
- Pardal, A., S. Ramos, P. Santos, L. Reis and P. Almeida (2002a). "Synthesis and Spectroscopic Characterisation of N-Alkyl Quaternary Ammonium Salts Typical Precursors of Cyanines." Molecules 7(3): 320-330.

Pardal, A. C., M. J. Nunes, A. M. Gama, J. A. Queiroz and P. Almeida* (2002b). "Preliminary studies on the use of cyanines as ligands in dye-affinity chromatography of proteins." Coloration Technology 118(3): 95-99.

Pardal, A. C., S. S. Ramos, L. Santos and P. Almeida* (2001). "Synthesis and fixation of aminocyanines to microcrystalline cellulose using cyanuric chloride as a cross-linking agent." Coloration Technology 117(1): 43-48.

Park, J. W., Y. Kim, K. J. Lee and D. J. Kim (2012). "Novel cyanine dyes with vinylsulfone group for labeling biomolecules." Bioconjugate Chemistry 23(3): 350-362.

Pfaunmiller, E. L., M. L. Paulemond, C. M. Dupper and D. S. Hage (2013). "Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications." Analytical and Bioanalytical Chemistry 405(7): 2133-2145.

Pham, W., Z. Medarova and A. Moore (2005). "Synthesis and Application of a Water-Soluble Near-Infrared Dye for Cancer Detection Using Optical Imaging." Bioconjugate Chemistry 16(3): 735-740.

Queiroz, J. A., C. T. Tomaz and J. M. Cabral (2001). "Hydrophobic interaction chromatography of proteins." Journal of Biotechnology 87(2): 143-159.

Ragnarsson, U. (2001). "Synthetic methodology for alkyl substituted hydrazines." Chemical Society Reviews 30(4): 205-213.

Reichelt, S. (2015). Affinity Chromatography. Methods and Protocols. Totowa, New Jersey, USA, Humana Press.

Shi, Y. C., Y. M. Jiang, D. X. Sui, Y. L. Li, T. Chen, L. Ma and Z. T. Ding (1996). "Affinity chromatography of trypsin using chitosan as ligand support." Journal of Chromatography A 742(1-2): 107-112.

Sigma-Aldrich Bovine Serum Albumin Product Information Sheet. S.-A. Corporation. St. Louis, Missouri, USA.

Sigma-Aldrich Lysozyme from chicken egg white. Product Information Sheet. S.-A. Corporation. St. Louis, Missouri, USA.

Sigma-Aldrich Ribonuclease A from bovine pancreas. Product Information Sheet. S.-A. Corporation. St. Louis, Missouri, USA.

Sigma-Aldrich Sepharose® CL-6B. Product Information Sheet. S.-A. Corporation. St. Louis, Missouri, USA.

Sigma-Aldrich Trypsin from bovine pancreas. Product Information Sheet. S.-A. Corporation. St. Louis, Missouri, USA.

Sigma-Aldrich α -Chymotrypsin from bovine pancreas. Product Information Sheet. S.-A. Corporation. St. Louis, Missouri, USA.

Sigma-Aldrich γ -Globulins from bovine blood. Product Information Sheet. S.-A. Corporation. St. Louis, Missouri, USA.

Silva, A., R. E. F. Boto, R. M. El-Shishtawy and P. Almeida (2006). "Rhodamine B as ligand for affinity chromatography. Fixation studies onto cellulose by a curing method." European Polymer Journal 42(10): 2270-2282.

Silva, M. S., V. C. Graca, L. V. Reis, P. F. Santos, P. Almeida, J. A. Queiroz and F. Sousa (2013). "Protein purification by aminosquarylium cyanine dye-affinity chromatography." Biomedical Chromatography 27(12): 1671-1679.

Sousa, A., F. Sousa and J. A. Queiroz (2012). "Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA purification." Journal of Separation Science 35(22): 3046-3058.

Stickel, J. J. and A. Fotopoulos (2001). "Pressure-Flow Relationships for Packed Beds of Compressible Chromatography Media at Laboratory and Production Scale." Biotechnology Progress 17(4): 744-751.

Subramanian, S. and P. D. Ross (1984). "Dye-Ligand Affinity Chromatography: The Interaction of Cibacron Blue F3GA® with Proteins and Enzyme." Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 16(2): 169-205.

Todorova, M., R. Bakalska and T. Kolev (2013). "Synthesis, crystal structure, and spectroscopic properties of new stilbazolium salt with enlarged pi-conjugated system." Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy 108: 211-222.

Wang, N., X. Bao, C. Yang, J. Wang, H. Y. Woo, Z. Lan, W. Chen and R. Yang (2013). "Design and synthesis of indole-substituted fullerene derivatives with different side groups for organic photovoltaic devices." Organic Electronics 14(2): 682-692.

Wehrli, A., U. Hermann and J. F. K. Huber (1976). "Effect of phase system selectivity in preparative column liquid chromatography." Journal of Chromatography A 125(1): 59-70.

Yadav, H. O. (2005). "Relation between the thermal activation energy of conduction and the first excited singlet state energy—a case of photo-conducting organic materials." Thin Solid Films 477(1-2): 222-226.

Zachariou, M. (2008). Affinity Chromatography. Methods and Protocols. Totowa, New Jersey, USA, Humana Press.

Zanders, E. D. (2005). Chemical Genomics. Reviews and Protocols. Totowa, New Jersey, USA, Humana Press.

Zou, H., Q. Luo and D. Zhou (2001). "Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins." Journal of Biochemical and Biophysical Methods 49(1-3): 199-240.