



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Uso de gelana como uma nova abordagem na purificação de biomoléculas

Luís António Ferreira Rocha

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

Orientador: Professor Doutor Luís António Paulino Passarinha

Covilhã, Outubro de 2012

Aos meus pais pelo exemplo que são

Resumo

O desenvolvimento de novas estratégias de purificação de biomoléculas terapêuticas tem ganho uma elevada importância nos últimos anos. Por isso, e de forma inovadora, pretende-se com esta dissertação desenvolver uma nova matriz cromatográfica baseada no polímero polissacárido gelana. Esta nova abordagem cromatográfica tem em conta propriedades como a porosidade e hidrofiliabilidade dos géis de gelana. Pretendeu-se explorar a natureza aniônica natural deste polímero, bem como a carga dos contra-íons da sua formulação para o estabelecimento de interações com três proteínas modelo (lisozima, albumina bovina sérica e α -quimiotripsina). Para avaliar a potencial aplicação da gelana como fase estacionária foram efectuados ensaios de estabilidade com diferentes contra-íons, bem como de aferição da sua estrutura, procedendo-se por fim ao estudo dos comportamentos de ligação das três proteínas modelo em passos cromatográficos.

Dos três íons estudados (cobre, níquel e cálcio), o que conferiu maior estabilidade à matriz foi o cobre, constatando-se uma dependência da presença dos outros dois íons (cálcio e níquel) no ambiente químico de cada uma das suas formulações.

Para se melhor compreender a estrutura dos géis de gelana usou-se a técnica de microscopia electrónica de varrimento. As imagens obtidas revelam que o protocolo desenvolvido não foi aplicado com sucesso, tendo havido um comprometimento estrutural da matriz, por uma má desidratação ou por desadequamento do protocolo usado.

Finalmente aplicaram-se duas formulações, com dois íons diferentes (cálcio e cobre) em ensaios cromatográficos, estabelecendo-se diferentes comportamentos entre a matriz e as proteínas consoante o íon utilizado na formulação. Nos ensaios dos géis com cálcio a única biomolécula que ficou retida na matriz foi a lisozima, eluindo as outras duas proteínas em estudo nas primeiras fracções recolhidas. Desta forma, foi também possível nestas condições a separação de misturas simples de lisozima e α -quimiotripsina e de lisozima e albumina bovina sérica.

Os ensaios cromatográficos com cobre como contra-íon da matriz de gelana verificaram uma retenção de todas as proteínas estudadas, através de diferentes interações. A lisozima e a α -quimiotripsina, pela carga apresentada nos ensaios, interagiram com a gelana, ao passo que, a albumina bovina sérica interagiu com o cobre presente na matriz. Estes resultados preliminares carecem de confirmação por técnicas complementares, mas a interacção das proteínas em estudo com a matriz é visível pelos cromatogramas obtidos. Em conclusão, esta dissertação permitiu pela primeira vez a aplicação da gelana como matriz cromatográfica, conseguindo-se a retenção de diferentes proteínas, por diferentes tipos de interacção.

Palavras chave

Gelana; Cromatografia; Matriz; Troca iónica; Proteínas; Purificação

Abstract

The development of new therapeutic biomolecules purification strategies has gained an increased relevance in the last years. In that way, it is pretended to develop a new chromatographic matrix based in the polysaccharide polymer gellan. This new chromatographic approach takes in account properties like the porosity and hydrophilicity of gellan gels. It is intended to explore the natural anionic nature of this polymer as well as the charge of the counter-ion present in the formulation of these gels in order to establish different interactions with three model proteins (lysozyme, bovine serum albumin and α -chymotrypsin). To assess the potential of this new application stability assays in the presence of different counter-ions, as well as to gauge the structure of gellan, studying at last the interaction behavior of these three proteins in chromatographic steps.

Of the three studied ions (copper, nickel and calcium) it was copper who gave the biggest stability to the matrix, being noted that the formulations that used the other two ions were dependent of their presence in the chemical environment.

To best understand the structure of these gels it was used scanning electron microscopy. The obtained images revealed that the protocol was unsuccessfully applied, being noted a structural damage of the matrix, either by its bad dehydration or by the inadequacy of the used protocol.

Finally, two formulations with two different ions (calcium and copper) where applied in Chromatographic assays, being established different behaviors between the matrix and the proteins, according to the formulation ions. In the calcium assays the only retained biomolecule was lysozyme. In contrast, the other two proteins where eluted in the flowthrough fractions. These conditions also made possible to separate simple mixtures of lysozyme- α -chymotrypsin and lysozyme-bovine serum albumin. When the gellan with copper matrix was used it was verified the retention of all the studied proteins. Lysozyme and α -chymotrypsin, by the charge presented, interacted with gellan and bovine serum albumin with the copper of the matrix. These preliminary results lack of confirmation by complementary techniques, but the interaction with the matrix is visible in the obtained chromatograms.

In conclusion, this dissertation allowed the first application of gellan as a chromatographic matrix, with the retention of different proteins, by different kinds of interactions, in this new chromatographic stationary phase.

Keywords

Gellan; Cromatography; Matrix; Ion Exchange; Proteins; Purification

Índice

Capítulo I.....	1
Introdução.....	1
1.1 Gelana, estrutura e aplicações gerais.....	1
1.2 Biossíntese bacteriana de gelana.....	2
1.3 Formação de géis de gelana.....	8
1.4 Aplicações da gelana.....	9
1.5 Características gerais das matrizes e processos cromatográficos.....	13
Capítulo II.....	21
Materiais e Métodos.....	21
2.1 Materiais.....	18
2.2 Estudos da estabilidade dos géis de gelana.....	18
2.3 Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM).....	19
2.4 Cromatografia de Troca iónica.....	19
2.5 Electroforese SDS-PAGE.....	20
Capítulo III.....	21
Resultados e Discussão.....	21
3.1 Estudos da estabilidade dos géis de gelana.....	21
3.2 Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM).....	26
3.3 Cromatografia de Troca Iónica usando a gelana como fase estacionária.....	27
Capítulo IV.....	37
Conclusões.....	37
Capítulo V.....	39
Perspectivas futuras.....	39
Capítulo VI.....	40
Bibliografia.....	40

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação molecular do polímero polissacárido gelana.....	1
Figura 2 - Via sintética proposta para a síntese dos açúcares precursores envolvidos na biossíntese de gelana com glucose como substracto.....	3
Figura 3 - Modelo para a biossíntese e montagem da gelana.....	4
Figura 4 - Processo de fermentação típico com vista à produção de gelana.....	6
Figura 5 - Imagens obtidas por SEM.....	27
Figura 6 - Perfil de eluição obtido para a α -quimiotripsina na matriz de gelana com cálcio..	28
Figura 7 - Perfil de eluição obtido para a BSA na matriz de gelana.....	29
Figura 8 - Perfil de eluição obtido para a lisozima na matriz de gelana.....	30
Figura 9 - Electroforese SDS-PAGE dos picos obtidos nos ensaios simples com cálcio.....	30
Figura 10 - Perfil de eluição obtido para a mistura lisozima + BSA na matriz de gelana com cálcio.....	31
Figura 11 - Perfil de eluição obtido para a mistura lisozima + quimiotripsina na matriz de gelana com cálcio.....	31
Figura 12 - Perfil de eluição obtido para a lisozima na matriz de gelana com cobre.....	33
Figura 13 - Perfil de eluição obtido para a α -quimiotripsina na matriz de gelana formulada na presença.....	33
Figura 14 - Perfil de eluição obtido para a BSA na matriz de gelana formulada com cobre.....	34
Figura 15 - Perfil de eluição obtido para a BSA na matriz de gelana formulada com cobre.....	35
Figura 16 - Perfil de eluição obtido para a α -quimiotripsina na matriz de gelana formulada com cobre.....	36
Figura 17 - Perfil de eluição obtido para a lisozima na matriz de gelana formulada com cobre.....	37

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Aplicações alimentares típicas da gelana.....	10
Tabela 2 - Selecção de patentes cobrindo o uso de gelana, categorizadas por campo de aplicação.....	12
Tabela 3 - Princípios de acção em cromatografia.....	16
Tabela 4.1 - Condições experimentais utilizadas nos ensaios com Ca^{2+} e número de ensaios reprodutíveis.....	22
Tabela 4.2 - Tempos de passagem na matriz cromatográfica de gelana sintetizada com diferentes formulações e na presença de Ca^{2+}	23
Tabela 5.1 - Condições experimentais utilizadas nos ensaios com Ni^{2+} e número de ensaios reprodutíveis.....	24
Tabela 5.2 - Tempos de passagem na matriz cromatográfica de gelana sintetizada com diferentes formulações e na presença de Ni^{2+}	24
Tabela 6.1 - Condições utilizadas nos ensaios com Cu^{2+} e número de ensaios reprodutíveis.....	25
Tabela 6.2 - Tempos de passagem na matriz cromatográfica de gelana sintetizada com diferentes formulações e na presença de Cu^{2+}	25

Capítulo I

Introdução

1.1 Gelana, estrutura e aplicações gerais

A gelana é um polímero polissacárido bacteriano extracelular (EPS) sintetizado por *Sphingomonas elodea* [1], tendo sido descoberta durante um extensivo programa de “screening” de bactérias do solo e da água pela empresa Kelco (San Diego, EUA) [2]. Este polímero, inicialmente conhecido como polissacárido S-60, caracteriza-se por ser linear e aniônico com uma sequência que consiste na repetição de dois resíduos de β -D-glucose, um de glucuronato e um de α -L-ramnose (figura 1)[3, 4].

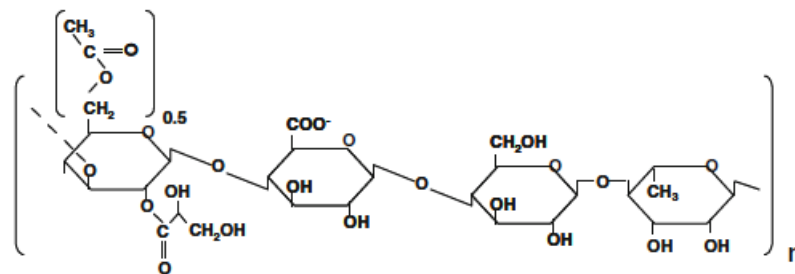


Figura 1 - Representação molecular do polímero polissacárido gelana (adaptado de [10]).

Tipicamente, as soluções de gelana formam géis transparentes, resistentes a temperatura e a condições extremamente ácidas [5, 6]. Assim, este polímero utilizado na indústria alimentar e farmacêutica, bem como na investigação científica como substituta do agar e como gel de electroforese [7]. Em média a gelana possui uma massa molecular de cerca de 500 kDa, tendo sido demonstrado que adquire uma estrutura aleatória e enrolada em soluções a elevada temperatura, alterando a sua conformação para dupla hélice com o decréscimo da temperatura da solução [8]. Na presença de catiões esta transição conformacional é acompanhada pela formação de uma rede tridimensional, formando-se um gel [9]. Três das quatro ligações glicosídicas do polímero envolvem ligações equatoriais localizadas no carbono 1 (C1) e no carbono 4 (C4) dos resíduos de gelana. A outra ligação, contudo, localiza-se no C1 e no C3, introduzindo uma torção na cadeia, originando uma geometria helical. Esta observação contraria a estrutura das moléculas glicosídicas que possuem todas as suas ligações do C1 para o C4, com estrutura plana e semelhante a um laço [2]. As propriedades físicas da gelana são bastante variáveis, dependendo da: concentração de polímero, temperatura, ambiente químico presente na solução e presença ou não de catiões (monovalentes, divalentes) [10].

Na forma nativa, em virtude do seu típico processo de biossíntese, a gelana possui dois grupos acil (O-acetato e L-glicerato) ligados ao mesmo resíduo de glucose, com um glicerato e 0,5 acetato por unidade de repetição [6]. Geralmente, na sua versão comercial, ambos os substituintes são removidos durante o processo fermentativo, através de um tratamento alcalino a elevada temperatura. O polímero desacetilado resultante é conhecido geralmente como goma de gelana (LA). A grande maioria destes grupos acil pode ser preservada no polímero, através do uso de processos de extracção sob condições mais suaves, obtendo-se gelana com elevado conteúdo acílico (HA), também disponível comercialmente [2].

1.2 Biossíntese bacteriana de gelana

1.2.1 Biossíntese de gelana

A via biossintética da gelana é um processo que pode ser dividido, fundamentalmente, em três passos sequenciais: (a) síntese intracelular dos precursores activados do polissacárido; (b) montagem das unidades do tetrassacárido ligadas à membrana interna; (c) translocação das repetições tetrassacáridas para o espaço periplasmático, seguida da polimerização e da exportação do polímero pela membrana externa [10].

As enzimas necessárias para a síntese destes nucleótidos são a fosfoglucomutase (PgmG), a UDP-glucose pirofosforilase (UgpG), a UDP glucose desidrogenase (UgdG), TDP glucose pirofosforilase (RmlA), dTDP-D-glucose-4,6-desidratase (RmlB), dTDP-6-desoxi-D-glucose-3,5-epimerase (RmlC) e a dTDP-6-desoxi-L-manose desidrogenase (RmlD) (figura 2) [11]. Entre as enzimas especificadas, a PgmG catalisa a conversão reversível da glucose-6-fosfato em glucose-1-fosfato [12], ocupando um ponto-chave na síntese dos precursores dos monómeros de gelana. A partir desta conversão derivam duas vias, uma que leva à formação de UDP-D-glucose e de UDP-D-ácido glucorónico e a segunda que origina a formação de dTDP-L-ramnose (figura 2) [10].

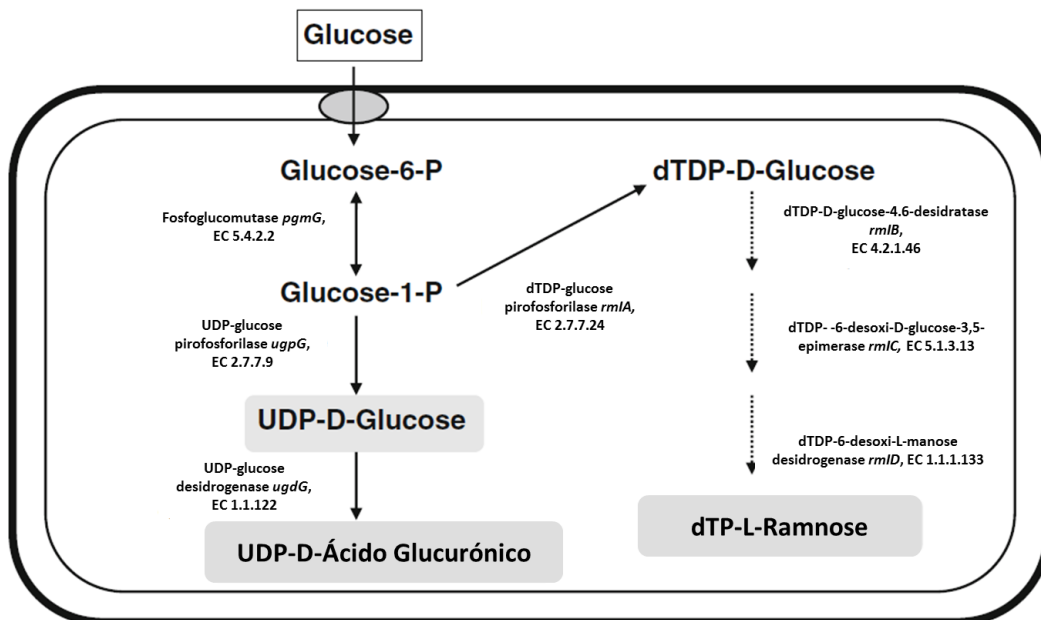


Figura 2 - Via sintética proposta para a síntese dos açúcares precursores envolvidos na biossíntese de gelana com glucose como substrato (adaptado de [10]).

A conversão reversível da glucose-1-fosfato e do UTP em UDP-D-glucose é catalisada pela UgpG [13]. Pela acção da UgdG, ocorre a conversão da UDP-D-glucose em UDP-D-ácido glucurónico [14]. O gene da RmlA é o primeiro de um “cluster” que agrupa 4 genes (rmlA, rmlB, rmlC e rmlD) cujas enzimas codificadas catalisam as transformações necessárias para a obtenção de dTDP-L-ramnose a partir de glucose-1-fosfato, transformando esta primeira enzima a glucose-1-fosfato e o TTP em TDP-D-glucose [15]. Este “cluster” compreende ainda genes que codificam glicosiltransferases e proteínas necessárias à polimerização da gelana, bem como à sua secreção para o espaço extracelular [11,16].

1.2.2 Montagem da unidade tetrassacárida, polimerização e secreção do polímero

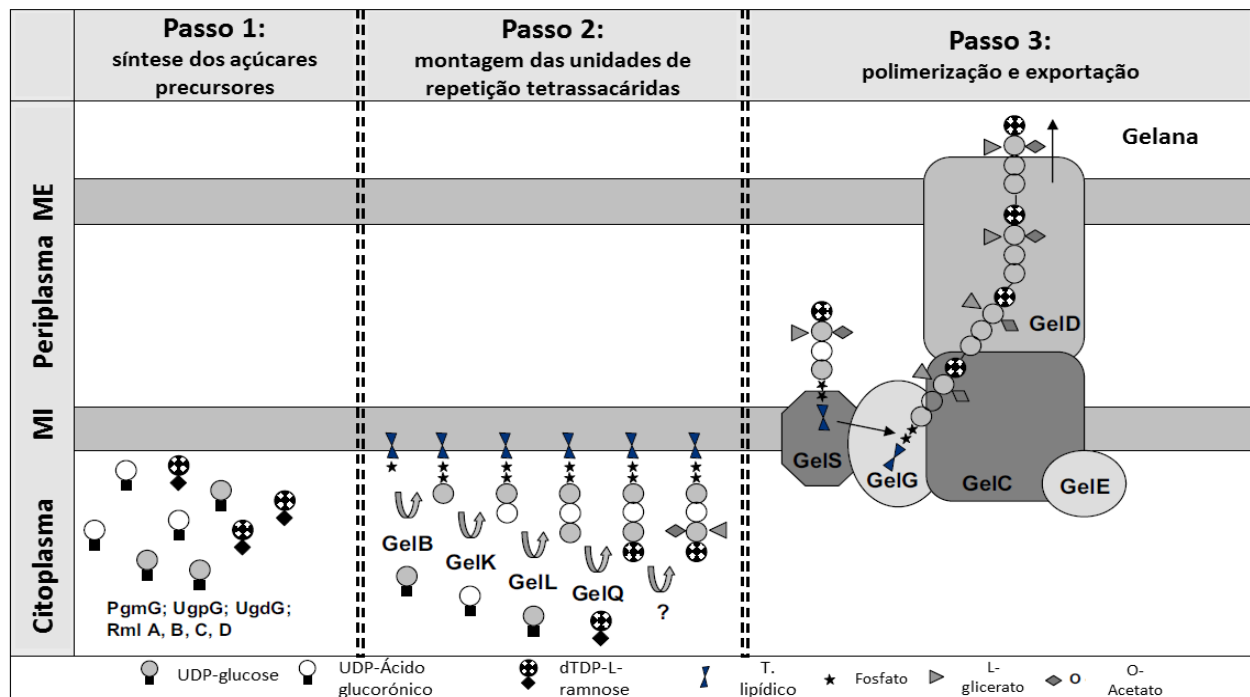


Figura 3 - Modelo para a biossíntese e montagem da gelana (adaptado de [10]).

Tipicamente, as unidades tetrassacáridas de gelana são agregadas num transportador lipídico que compreende o transportador C55-isoprenilfosfato (figura 3, passo 2) [10]. Assim, transferência da glucose-1-fosfato, a partir do seu precursor UDP-glucose, para o transportador lipídico é feita por uma glicosiltransferase [17]. A adição do segundo açúcar, ácido glucorónico, a partir do seu precursor UDP-ácido glucorónico, ao intermediário glicosil- α -pirofosforilpoliprenal é catalisada pela GelK [18]. Em 1998, Pollock e seus colaboradores, através da transferência de genes entre estirpes de *Sphingomonas* e pela observação da restituição (ou não) da síntese de polímeros análogos da gelana propuseram que o gene *spsL* seria o responsável pela codificação de uma glicosil-(β 1-4)-glucuronosiltransferase. Pela homologia encontrada entre este gene, e o gene *gelL* que é responsável pela codificação da glicosiltransferase GelL da via de montagem de gelana, considera-se altamente provável que esta enzima seja responsável pela adição do terceiro monossacárido (glucose) à unidade em formação.

Por fim, a enzima que catalisa a adição do último açúcar à unidade tetrassacárida, ramnose, é a glicosiltransferase GelQ [11, 16]. O passo de montagem do polímero só estará completo depois da adição dos grupos acetato e glicerato ao primeiro resíduo de glucose. Estas reacções são catalisadas por duas enzimas com actividade de acetiltransferase e de gliceriltransferase, respectivamente [10]. O próximo passo na biossíntese do polissacárido é a

polimerização das suas unidades, de modo a formarem-se cadeias mais longas. A via Wzy-dependente, propõe um mecanismo comum para a polimerização de polissacáridos em bactérias. Nesta via, um transportador, denominado por Wzx, é responsável pela deslocação da unidade de repetição da parte citoplasmática da membrana interna, para a parte periplasmática. Além disso, uma polimerase denominada Wzy, junta as unidades de repetição através da sucessiva transferência do polímero nascente a partir do seu transportador lipídico para o lado redutor da nova unidade de repetição [19]. As proteínas responsáveis por este mecanismo na gelana são a GelS e a GelG, com funções de translocase e polimerase, respectivamente (fig. 3, passo 3) [10]. Os seus genes encontram-se localizados na região IV “gel cluster”, denominando-se gelS e gelG [16].

A extensão da cadeia do polímero é ditada por uma família de enzimas denominada por polissacárido co-polimerase (PCP). Na síntese de gelana, estas enzimas são a GelC e a GelE. São polipéptidos independentes, em que a GelC é composta por hélices transmembranares N-terminal e C-terminal típicas desta classe de enzimas separadas por uma região “coiled coil” localizadas no espaço periplasmático [20]. Adicionalmente, a análise computacional da estrutura da GelE revelou uma potencial hélice anfipática na região C-terminal, que poderá estar envolvida na associação desta enzima com a membrana plasmática e com a interação com a GelC. A relevância destas enzimas é revelada pela deleção dos genes responsáveis pela sua síntese, que resulta na total ausência da síntese de gelana a partir de *S. elodea*. A inexistência de síntese de gelana, na ausência de GelE sugere também que esta proteína possui um papel regulador na actividade da GelC [10].

A secreção do polissacárido é mediada por uma proteína integral, localizada na membrana externa de *S. elodea*, designada por GelD [10]. Esta proteína faz parte de uma família responsável pela exportação de outros polissacáridos produzidos por bactérias designada por “outer membrane auxiliary” (OMA), que formam um canal proteico através do qual as cadeias polissacáridas têm acesso à superfície celular [19, 21].

1.2.3 Biossíntese bacteriana de gelana

A produção de gelana é um processo que ocorre durante a fase de crescimento bacteriano, sendo que a representação dos vários passos ser visualizada na figura 4. Durante a biossíntese a viscosidade do meio de cultura aumenta durante as fases estacionária e exponencial, atingindo um valor bastante elevado no final do processo. Devido a esta viscosidade é necessária uma diluição do meio de cultura antes da precipitação com álcool isopropílico. Após vários passos de precipitação com álcool isopropílico a gelana é ressuspensa em água, seguindo-se um passo de diálise e liofilização [10].

Pela mais valia que este polímero representa para o tecido industrial é de todo o interesse aumentar a eficiência da etapa de produção [22]. Na literatura estão descritos vários estudos com vista à optimização das suas condições de cultura, tais como: a composição e proporção

das fontes de carbono e azoto [23-25]; substratos adicionais [26] pH [27]; agitação [28] e percentagem ideal oxigénio dissolvido [29].

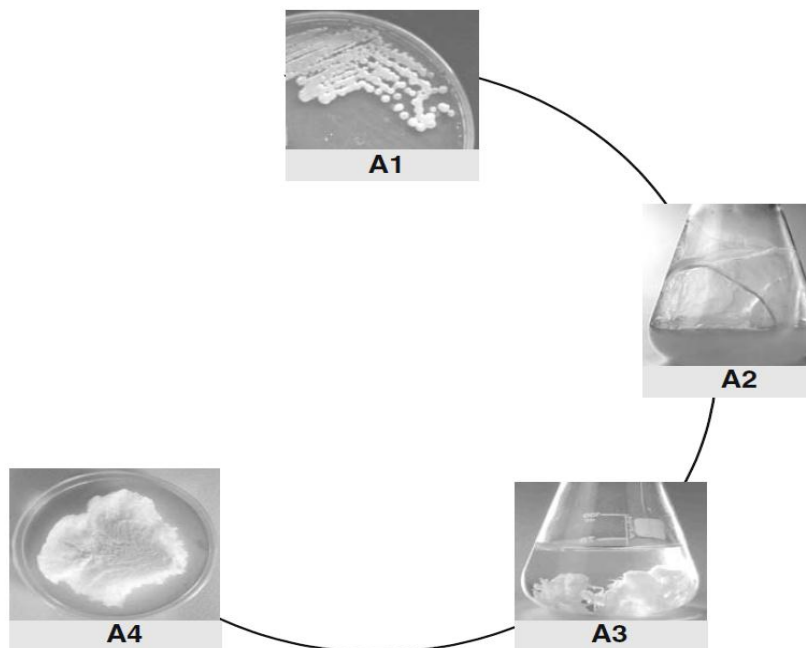


Figura 4 - Processo de fermentação típico com vista à produção de gelana onde: A1 representa o fenótipo da estirpe produtora de gelana (*S. elodea* ATCC 31461); A2 o meio de cultura passadas 72h de crescimento bacteriano; A3 a gelana precipitada com álcool isopropílico; A4 a gelana liofilizada (adaptada de [10]).

Em 2007, Banik e os seus colaboradores, testaram 20 nutrientes usando desenho experimental por aplicação do método de Placket e Burman, tendo concluído que 5 nutrientes causavam um efeito significativo na produção de gelana, nomeadamente, o melação, a triptona, o ácido casamínico, o hidrogeno-ortofosfato disódico e o cloreto de manganês. A sua concentração foi otimizada observando-se a composição do meio mais adequada para a produção de gelana deveria conter 112,5 g/l de melação, 1 g/l de hidrogeno-ortofosfato disódico, 1 g/l de triptona, 1 g/l de ácido casamínico e 0,947 g/l de cloreto de mangês [23]. Adicionalmente, Kanari e seus colaboradores, em 2002, avaliaram o efeito que vários hidratos de carbono têm na produção de gelana. De entre as fontes de carbono usadas, a utilização de sacarose a 4%, glucose a 3% e o amido registaram os maiores rendimentos de gelana. Este grupo concluiu que a utilização de uma concentração inicial de 4% de glucose, num processo de fermentação em modo batch, não melhora a produção de gelana, devido à inibição do crescimento bacteriano por repressão catabólica. Contudo, passando para uma estratégia de crescimento em modo fed-batch com dois passos, utilizando uma concentração inicial de glucose de 2% levou a um incremento na produção de gelana em relação à estratégia em batch (6,1 g/l versus 8,12 g/l). Este grupo também investigou outros factores envolvidos na produção de gelana, tendo-se alcançado uma produção máxima de gelana, à temperatura 30 °C, e o pH óptimo de 6,5 [24].

Em 2006, Wang e seus colaboradores, estudaram a produção de gelana através de um meio simplificado, usando glucose como a única fonte de carbono. Devido ao baixo custo associado à etapa de biossíntese, os autores do estudo, concluíram que a aplicação deste meio apresenta um elevado potencial de aplicação na escala industrial. O modo de operação que conduziu a melhores resultados foi o fed-batch, que quando comparado com a técnica de batch, obteve um rendimento superior em 20% (17,71 g/l versus 14,75 g/l) [25].

O uso de surfactantes não iônicos na produção de gelana, nomeadamente o Triton X-100, o Tween 80 e o Tween 40, foi estudado em 2007 por Arockiasamy e seus colaboradores [26]. Através de desenho experimental, os autores, optimizaram as concentrações óptimas de surfactante, pH e temperatura do processo fermentativo. O surfactante com maior impacto na produção de gelana foi o Triton X-100 (10, 44 g/l gelana), seguido do Tween 80 (9,38 g/l gelana) e do Tween 40 (9,24 g/l). Quando comparados com o controlo (8,63 g/l de gelana), no qual não foi adicionado nenhum dos três surfactantes em estudo, todos aparentam ter um efeito positivo na síntese de gelana. Especificamente, a acção dos surfactantes poderá relacionar-se com uma interação com a membrana celular da bactéria, de modo a incrementar o processo de polimerização, ou facilitando a libertação do polímero da membrana. Aplicando desenho experimental, os autores verificaram que as condições ideais de surfactante, pH e temperatura eram, respectivamente, 1 g/l de Triton X-100, 6 e 30°C [26].

A análise do efeito da agitação e do arejamento na síntese da gelana foi estudado por Giavasis e seu colaboradores em 2006, em biorreactores em modo “batch”. Este grupo verificou que uma elevada agitação, bem como arejamento, favorecem o crescimento celular, às custas da síntese de gelana. Foi sob condições de agitação e de arejamento moderadas que se obtiveram as maiores concentrações de gelana (12,3 g/l) e os valores de massa molecular de gelana mais elevado [28].

Actualmente, a engenharia metabólica respresenta uma estratégia promissora tanto na produção de gelana modificada, como no incremento da produtividade mássica. Como a síntese deste polímero se dá na fase de crescimento bacteriano, havendo uma baixa taxa de conversão de açúcares (40-50%), o aumento na produção de gelana provavelmente irá requerer estratégias que incrementem a conversão de substractos [30].

Vartak e seus colaboradores, em 1995, implementaram esta estratégia num mutante geneticamente desenhado de *S. elodea* no qual o gene codificador da glucose-6-P-desidrogenase estava silenciado, prevendo-se por isso um desvio do fluxo de carbono na direcção da síntese de gelana. Contudo, o uso desta estirpe recombinante não aumentou significativamente a síntese do polissacárido alvo [30]. Tipicamente, as condições de fermentação óptimas para a produção de gelana são favorecidas pelo desequilíbrio da razão C/N, contudo, estas condições de crescimento favorecem a síntese de quantidades consideráveis de ácido poli-β-hidroxibutirico (PHB), um produto que compete com a síntese de gelana. Por mutagénesis aleatória a síntese do PHB foi bloqueada, não produzindo qualquer efeito na síntese de gelana [31]. Outras estratégias aplicadas têm visado os primeiros passos

da biossíntese de gelana, através da síntese de precursores, com o objectivo de redireccionar o fluxo de carbono. A sobre expressão individual do gene responsável pela fosfoglucomutase (pgmG) e pela UDP-glucose pirofosforilase (ugpG) resultam num aumento de actividades enzimáticas específicas, que irão incrementar a síntese de UDP-glucose em *S. elodea*, porém a abordagem descrita aumento não aumenta significativamente a síntese de gelana [11]. De forma contrária, a sobre expressão simultânea dos dois genes alvo referenciados anteriormente originou um aumento de 20% na produção de gelana [11].

1.3 Formação dos géis de gelana

O mecanismo que leva à formação dos géis de gelana consiste numa alteração conformacional termorreversível do polímero, passando de uma estrutura desordenada para uma estrutura ordenada em dupla hélice [32]. Esta transição é influenciada pelas propriedades físico-químicas do solvente e acontece quando a temperatura desce ou a força iónica aumenta. Este mecanismo é geralmente explicado como sendo um processo termorreversível de dois passos, nos quais primeiro se dá o ordenamento das hélices, seguido da associação entre as hélices duplas, por interacções intermoleculares [33]. A agregação é inibida pela repulsão electrostática entre as hélices. Uma forma de suprimir esta repulsão, permitindo a formação de géis, é pela redução do pH da solução. Deste modo, decrescendo o pH ocorrerá uma redução na carga das hélices pela conversão dos grupos carboxilo do glucuronato da sua forma carregada negativamente (COO^-) para a sua forma sem carga (COOH). Na presença de catiões existe uma diminuição na repulsão entre as hélices, tornando a sua associação mais fácil, através de interacções por pontes de hidrogénio, levando à formação de géis com uma maior estabilidade térmica [34].

Estudos feitos pela Kelco [35], e externamente à empresa [36], estabeleceram que catiões divalentes (M^{++}) são muito mais eficazes na promoção da formação de géis de gelana que catiões monovalentes (M^+), conseguindo os primeiros induzir a formação de géis com uma menor quantidade em solução [2]. Na presença dos últimos ocorre um “cross-link” indirecto dos catiões às duplas hélices de gelana (dupla hélice- M^+ -água- M^+ -dupla hélice), enquanto que na presença de catiões divalentes ocorre um “cross-link” directo entre os catiões e as duplas hélices (M^{++} -dupla hélice- M^{++} -dupla hélice), formando estruturas ordenadas [37,38]. Estas estruturas ordenadas tornam-se extremamente estáveis termicamente com a adição progressiva dos catiões [39].

O catião monovalente que conduz à formação mais eficaz de géis é o cézio (Cs^+), seguido do potássio (K^+) e do sódio (Na^+), sendo o menos eficaz o lítio (Li^+) [36]. Adicionalmente, o tamanho de agregados formado está relacionado com a eficácia dos catiões monovalentes na formação de géis de gelana, por isso, o cézio conduzirá aos maiores agregados, enquanto que o lítio aos menores [40]. Quando na formulação destes géis são usados catiões divalentes, os

metais de transição (zinco (II), chumbo (II) e cobre (II)) apresentam uma maior eficácia em relação aos alcalino-terrosos (magnésio, cálcio, estrôncio e bário). A eficácia relativa dos metais alcalino-terrosos é aproximadamente igual entre si, enquanto que entre os metais de transição o chumbo (II) (Pb^{2+}) é o mais eficiente, seguido do cobre (II) (Cu^{2+}) e do zinco (II) (Zn^{2+}). Para além de mais eficazes na formação dos géis de gelana, dão também origem a cadeias maiores, bem como mais espessas, deste polímero [2]. O aumento da concentração destes iões aumenta inicialmente a dureza destes géis, sendo que continuando este aumento ocorrerá eventualmente uma diminuição na dureza dos géis. Em contraste, a sua fragilidade aumenta com o aumento da força iónica [35].

Como referenciado anteriormente, existem dois tipos de gelana dependendo do seu conteúdo em grupos acil (LA e HA), observando-se variações nas características do polímero consoante o seu conteúdo acílico. Apesar dos géis de HA serem mais fracos que os de LA a sua estrutura é intrinsecamente mais estável. Uma característica destes géis que suporta esta premissa é a temperatura em que se observa o ordenamento conformacional ser maior para a gelana que possui elevado conteúdo acílico [41]. O grupo acetato posicionado na periferia da dupla hélice não exerce impedimento estérico numa dupla hélice isolada, tendo pouco ou nenhum efeito na sua agregação [38]. Quanto ao grupo glicerato localizado no interior da dupla hélice, força o grupo carboxilato do resíduo de glucuronato a rodar, alterando as características iónicas de ligação, de forma a diminuir o impedimento estérico [37, 38]. Este grupo também apresenta efeitos estabilizadores na estrutura de dupla hélice, pois 3 átomos de oxigénio desta espécie química estabilizam esta estrutura através da formação de 4 novas ligações de hidrogénio, intra-cadeia ou inter-cadeia, participando também na ligação iónica [37]. De facto, verifica-se uma alteração esteroquímica aquando da substituição do grupo glicerato, que conduz à perda de várias interações de hidrogénio intra, ou inter-cadeia, havendo uma diminuição de 4 ligações por unidade de repetição de gelana, da gelana HA para a LA [37, 38, 42].

A desacilação química da forma nativa de gelana torna géis fracos, elásticos e termorreversíveis em géis firmes e frágeis, em condições óptimas para a sua formação [6, 43]. Estas alterações devem-se essencialmente aos grupos glicerato [6].

1.4 Aplicações da gelana

O uso da gelana na área alimentar e medicinal como agente gelante, estabilizador e de suspensão foi aprovado na UE e nos EUA [44]. Em comparação com outros polissacáridos a gelana possui várias vantagens, entre as quais a sua excelente estabilidade termal e a condições ácidas, os seis géis possuem transparência e elasticidade e rigidez ajustável. Comercialmente encontra-se disponível em duas formas, LA e HA, como referido anteriormente, com as designações comerciais de Gelrite® (LA), Kelcogel® (LA) e Kelcogel® LT100 (HA) [10]. O Geltite® é usado como substituto do ágar na cultura de espécies

bacterianas termofílicas, bem como em culturas de tecido de plantas [45]. Este facto deve-se à ausência de impurezas encontradas no ágar, às concentrações reduzidas de polissacárido, a uma maior clareza dos géis, o que permite melhores observações do desenvolvimento dos tecidos [46]. Esta forma de gelana apresenta também potencial na área ambiental, na biodegradação de gasolina [47] e no transporte de bactérias encapsuladas para a bioaumentação de aquíferos contaminados [48].

Tanto o Kelcogel® como o Kelcogel® LT100 são aplicados como agentes gelantes na alimentação (designados por E418) e em produtos de higiene pessoal (loções, cremes e pastas dos dentes), sendo maioritariamente aplicados como estabilizadores e agentes de suspensão numa vasta gama de aplicações na indústria alimentar [49]. Os produtos alimentares que tipicamente incorporam gelana na sua formulação vão desde sobremesas, coberturas de bolos, molhos e pudins [10] e encontram-se resumidas na tabela 1 [2].

Tabela 1 - Aplicações alimentares típicas da gelana (Adaptado de [2]).

ÁREA ALIMENTAR	PRODUTOS TÍPICOS
Confeitaria	Gomas de amido e pectina, recheios, “marshmallows”
Geleias e Gelatinas	Compotas de baixa caloria
Comida pré-feita	Frutos, vegetais e carnes
Géis baseados em água	Gelatina, Aspic
Recheios de tartes e pudins	Sobremesas instantâneas, pudins embalados, recheios de tarte
Coberturas	Coberturas para pastelaria
Produtos derivados do leite	Gelados, iogurte, batidos, pastas com baixo teor de gordura
Bebidas	Fruta, bebidas baseadas em leite e iogurte, bebidas carbonadas
Filmes/Revestimentos	polme, coberturas

Actualmente, novas bebidas podem ser obtidas pela incorporação de “beads” de gelana. Estas podem ser facilmente preparadas através do derramamento de uma solução de gelana que contenha tanto o aroma, como a cor, apropriados numa solução que contenha Ca²⁺. Este polímero dissolve-se no leite quente (acima de 80°C), e a rede que forma durante o arrefecimento pode ser usada para suspender partículas de cacau em bebidas de leite achocolatadas, podendo também estabilizar produtos como batidos, gelados, natas e iogurtes. Concentrações baixas de gelana podem aumentar o prazo de validade de bebidas ácidas derivadas do leite, provavelmente através da associação electrostática de fragmentos de caseína à rede de gelana, restringindo a sedimentação da caseína [50]. A gelana pode

também ser usada como filme protector de produtos como frango, peixe, queijo, batatas e outros vegetais [2]. O revestimento da superfície de vegetais com gelana foi também sugerido como uma forma de aumentar o seu prazo de validade, mais especificamente o alho [52]. As aplicações da gelana na área biomédica incluem excipientes nasais, oculares e gástricos, bem como a sua aplicação na entrega de fármacos no cólon [52, 53]. Em 2011, Norton e seus colaboradores, sugeriram que a indução da formação de géis de gelana a pH gástrico poderia induzir saciedade através da estruturação dos conteúdos do estômago, sendo por isso útil no combate à obesidade [54].

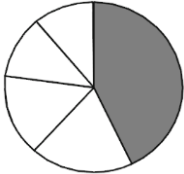
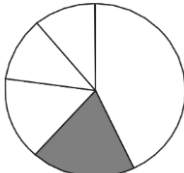
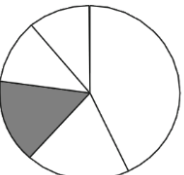
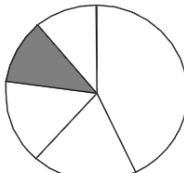
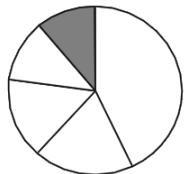
As “beads” hidrocolóides de gelana também têm demonstrado serem úteis para libertação lenta de fármacos [55]. Um filme deste polímero foi implantado em ratos diabéticos com o objectivo de fazer a entrega de insulina. Os níveis de glucose nos ratos diabéticos implantados com os filmes contendo insulina correspondiam a cerca de metade quando comparados com os que continham filmes sem insulina. Os resultados obtidos indicam que a gelana poderá ser um candidato ideal no desenvolvimento de sistemas de administração exógena proteica [56].

Este polissacárido tem sido usado também como biomaterial na construção de “scaffolds” 3D na engenharia de tecidos [57-59]. Ciardelli e seus colaboradores, em 2005, demonstraram que a gelana é um material apropriado para a construção de misturas baseadas em poli-(ε-caprolactona) para a aplicação em “scaffolds” [57]. Deste modo, para usar uma proteína modificada em engenharia de tecidos a transglutaminase foi “cross-linked” com gelatina, sendo depois incorporada numa matriz de gelana para aumentar a sua estabilidade em meio aquoso [59].

Noutra perspectiva, utilizou-se gelana na imobilização e cultura de células de medula óssea de ratos, mostrando que usando o meio correcto tem potencial como matriz de cultura 3D [58]. Este estudo demonstra que a estrutura 3D da gelana aumenta notoriamente a viabilidade celular. Em 2006, Suri e Banerjee, sugeriram a mistura de ácido hialurónico e gelana como substituto do humor vítreo. Esta mistura demonstrou ter uma excelente biocompatibilidade (viabilidade celular superior a 90 %), se bem que mais estudos serão necessários para a sua validação e aplicação final [60].

Pelos factores já enunciados, este polímero tornou-se alvo do patenteamento do seu uso em diversas áreas, registando-se em Março de 2008 cerca de 120 patentes concedidas a nível mundial (tabela 2). A maioria destas patentes centra-se na aplicação da gelana como agente gelante e emulsificante na indústria alimentar. Recentemente, contudo, o número de patentes concedidas na área farmacêutica tem vindo a aumentar, nomeadamente na aplicação da gelana como veículo de entrega de fármacos, sugerindo que a gelana é um dos mais relevantes exopolissacáridos bacterianos comercializados [10].

Tabela 2 - Selecção de patentes cobrindo o uso de gelana, categorizadas por campo de aplicação (Adaptado de [10]).

APLICAÇÃO	NOME DA PATENTE
<p data-bbox="311 360 480 389">Comida (50/117)</p> 	<p data-bbox="667 342 1257 405">Bebida baseada em gelana e processo para efectuar a bebida gelificada.</p> <p data-bbox="647 421 1270 450">Confecção de gomas sem gelatina, usando gelana e carragenina.</p> <p data-bbox="619 461 1302 524">Gelana HA com cálcio como forma de aumentar a estabilidade coloidal em bebidas.</p> <p data-bbox="804 555 1114 584">Comida contendo gelana nativa.</p>
<p data-bbox="240 629 552 658">Médico/Farmacêutica (22/117)</p> 	<p data-bbox="754 651 1166 680">Revestimento de gelana para comprimidos</p> <p data-bbox="711 680 1209 710">Composição oftalmológica líquida contendo gelana.</p> <p data-bbox="799 719 1121 748">Spray para tratamento de feridas</p> <p data-bbox="818 757 1102 786">Via de libertação controlada.</p>
<p data-bbox="240 909 552 938">Processo de produção (18/117)</p> 	<p data-bbox="820 945 1098 974">Meio de gelana livre de PHB.</p> <p data-bbox="794 983 1123 1012">Gelana geneticamente purificada.</p> <p data-bbox="780 1021 1137 1050">Gelana modificada e a sua produção.</p> <p data-bbox="668 1059 1252 1122">Estirpe mutante de <i>Sphingomonas elodea</i> que produz gelana desacetilada.</p>
<p data-bbox="272 1193 520 1223">Higiene pessoal (14/117)</p> 	<p data-bbox="695 1209 1222 1238">Composição cosmética contendo gelana e carragenina.</p> <p data-bbox="679 1247 1238 1276">Emulsão contendo gelana e um surfactante e os seus usos.</p> <p data-bbox="673 1285 1244 1348">Composição de pasta dos dentes com propriedades físicas e estabilidade melhoradas, contendo gelana.</p> <p data-bbox="635 1357 1283 1386">Cápsula de gelana quebrável de gelana e o seu processo de fabrico.</p>
<p data-bbox="261 1496 531 1525">Outras aplicações (13/117)</p> 	<p data-bbox="660 1516 1259 1579">Processo que usa gelana como redutor de filtrado para fluídos perfuradores baseados em água.</p> <p data-bbox="647 1590 1272 1619">Revestimento de papel contendo uma mistura de gelana e amido</p> <p data-bbox="703 1628 1216 1657">Purificação e uso de gelana em géis de electroforese</p> <p data-bbox="624 1688 1294 1751">Meio e métodos para promover a maturação somática de embriões de coníferas.</p>

1.5 Características gerais das matrizes e processos cromatográficos

1.5.1 Características gerais das matrizes cromatográficas

O desenvolvimento de novos suportes cromatográficos com características adequadas, e específicas, é uma solução para a purificação de biomoléculas terapêuticas. As matrizes cromatográficas actuam como material de suporte para o ligando que possuem imobilizado. É este ligando que lhes confere a interacção específica a explorar [61]. Estas matrizes deverão ser altamente selectivas, apresentarem elevada capacidade de ligação, permitirem uma adequada transferência de massa, serem incompressíveis, apresentarem poucas interacções inespecíficas, providenciarem uma imobilização estável dos ligandos imobilizados, não possuírem toxicidade, reutilizáveis e apresentarem viabilidade económica [62]. Para além destas características, uma resina cromatográfica deverá também ser uniforme, macroporosa, hidrofílica, mecanicamente e quimicamente estável, ser insolúvel no solvente usado na purificação e proporcionar uma elevada área de superfície ao ligando acoplado [61]. Geralmente não é possível conciliar todas estas características, e por isso, compromissos têm de ser procurados.

Tipicamente, a natureza química das proteínas determina as propriedades de superfície do meio cromatográfico, enquanto que o seu tamanho as propriedades físicas. Como já referido, é necessário ter-se uma grande área de superfície para se ter elevada capacidade de ligação das biomoléculas alvo. Para tal, podem-se usar materiais altamente porosos, constituídos por numerosos poros pequenos. No entanto, estes poros iriam limitar e impedir a difusão de biomoléculas maiores. Desta forma, deve-se estabelecer uma harmonia entre a área e o tamanho de poro.

Para ser possível uma adsorção reversível, a matriz cromatográfica deve ser bastante hidrofílica. Polímeros naturais como a celulose, agarose e dextrano são frequentemente usadas com este fim. A sua elevada substituição em grupos hidroxilo torna-os hidrofílicos, com grupos disponíveis para modificar a sua superfície de acordo com a aplicação pretendida. Na purificação de proteínas, uma densidade de ligandas abaixo de 100 μM é normalmente suficiente.

Um dos problemas da natureza hidrofílica natural dos polímeros é a sua estrutura mole, pois, aumentando o fluxo, irá haver a compressão do meio cromatográfico, com um aumento na pressão da matriz [63]. De forma a melhorar a sua estabilidade, muitas vezes faz-se o “cross-linking” das resinas com moléculas específicas. A introdução de “crosslinkers” leva a um aumento na hidrofobicidade do meio, com por vezes um provável incremento das ligações inespecíficas.

Várias empresas dispõem de meios cromatográficos com a mesma superfície química, estrutura de poro semelhante, diferindo no tamanho de partícula [62]. Este facto dá maior liberdade na optimização de um processo de separação cromatográfico. Muitos meios cromatográficos são praticamente esféricos, produzindo menos pressão na coluna que os não-esféricos, se bem que o seu fabrico é complicado e mais dispendioso [63]. As matrizes cromatográficas podem ser feitas de vários tipos de materiais, desde, polímeros naturais (agarose, dextrano, celulose e quitosano), polímeros sintéticos (polimetacrilato, poliácridamida, trisacril e poliestireno), materiais inorgânicos (silica, óxido de zircónio, vidro, hidroxiapatite) e compósitos [64, 65]. Os polímeros naturais quando usados como meios cromatográficos exibem baixa interacção inespecífica, sendo extremamente hidrofílicos, devido à elevada quantidade de grupos hidroxilo na cadeia polimérica [62]. As matrizes de maior sucesso são compostas por “beads” de dextrano e agarose, tendo a designação comercial de Sephadex e Sepharose, respectivamente [66]. Estas possuem a vantagem de possibilitarem a passagem de fluxos mais elevados pela coluna, quando comparadas com a celulose. A celulose fibrosa é extremamente hidrofílica, sendo também muito difícil de empacotar. As “beads” de celulose estão disponíveis comercialmente, como Cellufine ou Sephacel [67].

Polímeros sintéticos são também usados como resinas cromatográficas, nomeadamente, os polímeros de vinil hidrofóbicos, a poliácridamida e o poliestireno. Uma característica comum aos polímeros sintéticos descritos é a sua hidrofobicidade. Deste modo, necessitam de ser revestidos de forma a evitar a sua baixa regeneração. Uma vantagem que estes meios cromatográficos apresentam é a sua resistência a condições químicas extremas, tais como de pH, ou a um ambiente oxidante, desde que o seu revestimento seja estável. O poliestireno pode ser usado sem qualquer modificação em cromatografia de fase reversa (RPC), sendo que, para outros tipos de cromatografia necessita de ser revestido com um polímero hidrofílico [62]. Materiais inorgânicos como hidroxiapatite e silica são também usados como meios cromatográficos. Inicialmente, a hidroxiapatite apresentava propriedades de fluxo inapropriadas, tendo contudo uma selectividade excelente. Neste campo a hidroxiapatite cerâmica constitui um grande progresso[68]. As pequenas partículas de hidroxiapatite são sinterizadas a partículas esféricas com grandes poros, que possuem excelentes propriedades de fluxo, boa selectividade e elevada capacidade de ligação. Esta matriz é usada em processos industriais, nomeadamente, em processos de purificação de anticorpos [62].

O principal suporte inorgânico é a sílica [69-71]. A sílica possui grupos OH que podem interagir com proteínas, especialmente a elevado pH. Desta forma, é necessário inactivar os grupos Si-OH residuais [62]. Este material pode também ser revestido por dextrano [71] e por polivinilpirrolidona [72], através da sua interacção com um copolímero de vinilmetildietoxisilano e vinilpirrolidona. O protocolo de revestimento origina uma estrutura de elevada porosidade e o material demonstrou boa selectividade para proteínas em HIC. A sílica pode também ser revestida com camadas hidrofílicas [73], celulose, poliestirol [74] e agarose [75]. Finalmente outra das abordagens para estabilizar os suportes de sílica foi obtida

através do seu tratamento com sais de zircónio, sendo posteriormente ligada covalentemente com “organo-silone”. Esta superfície não apresenta as habituais restrições nas condições de operação, permitindo o uso de tampões de eluição a pH 9,0 [76].

Também foram desenvolvidas matriz cromatográfica baseadas em vidro como, sendo a mais comumente usado o “controlled porous glass” (CPG), com excelentes propriedades de fluxo. A sua superfície possui grupos hidroxilo reactivos que podem ser sujeitos a inúmeras modificações. Este suporte tem sido aplicado com sucesso na purificação de anticorpos em larga escala [77].

Os compósitos também são utilizados como suportes cromatográficos. Neste campo, um dos compósitos utilizados é o HypderD [64, 65]. Este material baseia-se num hidrogel semelhante ao Trisacryl (derivado da poliacrilamida) com um baixo grau de “crosslinking” e um elevado grau de grupos funcionais. Estas características originam uma elevada capacidade de ligação para proteínas, apresentando porém dificuldades de empacotamento numa coluna cromatográfica. Desta forma, o gel é polimerizado para um revestimento poroso feito de sílica ou zircónio, podendo ser operado a velocidades elevadas sem perder a sua capacidade de ligação. A elevada capacidade do compósito permite a captura directa das proteínas a partir do sobrenadante de culturas celulares, sem passos de clarificação adicionais [78].

Actualmente, os monolitos representam uma classe completamente diferente de fases estacionárias cromatográficas, quando comparados com as convencionais. O material é introduzido numa coluna cromatográfica como um bloco contínuo interlaçado com canais [79]. Os seus canais ramificados são contínuos e, por esse motivo, o transporte de solutos para as suas superfícies é feito apenas por convexão, ao invés de difusão como nos meios cromatográficos convencionais [80, 81]. Este meio cromatográfico é caracterizado pelas suas excelentes propriedades de transferência de massa e por uma baixa pressão na coluna. O grande diâmetro dos canais dos monolitos torna-os uma excelente fase estacionária para a cromatografia proteica. Dentro desta categoria, os monolitos que usam polimetacrilato são os mais usados na cromatografia de proteínas, utilizando-se os monolitos baseados em sílica para a separação de pequenas biomoléculas [82-84]. Esta fase estacionária também tem sido usada como suporte para síntese em fase sólida [79]. Um exemplo desta aplicação é a síntese directa de péptidos em colunas monolíticas. Como a síntese é executada em monolitos com polimetacrilato o péptido sintetizado pode ser usado como ligando de afinidade sem quaisquer tratamento adicional [85-87].

1.5.2 Características gerais dos processos cromatográficos

Actualmente, a investigação de estratégias de purificação simples e eficazes, com o intuito da obtenção de biomoléculas farmacêuticas (proteínas, anticorpos e ácidos nucleicos) com o grau de pureza exigido pelas agências de regulação para a sua aplicação terapêutica tem ganho uma extrema importância nos processos biotecnológicos [61, 88-91]. Na tabela 3 encontram-se discriminados os princípios de acção aplicados na cromatografia de biomoléculas. Estes incluem a cromatografia “mixed mode”, cromatografia de troca iónica (IEX), cromatografia de exclusão molecular (SEC), cromatografia de afinidade (AFC), cromatografia de interacção hidrofóbica (HIC), cromatografia de fase normal (NPC) e cromatografia de fase reversa (RPC) [62].

Tabela 3 - Princípios de acção em cromatografia (adaptado de [62]).

Nome	Princípio de acção	Separação por
Cromatografia “mix mode”	Ligação múltipla	Estrutura molecular
Cromatografia de troca iónica	Ligação iónica	Carga superficial
Cromatografia de exclusão molecular	Exclusão por tamanho	Tamanho e forma molecular
Cromatografia de afinidade	Adsorção/Dessorção bioespecífica	Estrutura molecular
Cromatografia de interacção hidrofóbica	Formação de complexos hidrofóbicos	Hidrofobicidade e superfícies hidrofóbicas das moléculas
Cromatografia de fase normal	Formação de complexos hidrofóbicos	Hidrofobicidade
Cromatografia de fase reversa	Formação de complexos hidrofóbicos	Hidrofobicidade

Em NPC, a fase estacionária contém um ligando polar imobilizado e o eluente consiste numa mistura de água com solvente orgânico, muitas vezes apolar, sendo a eluição das moléculas conseguida com o aumento de polaridade do meio [92]. Este tipo de cromatografia tem sido usado para a separação de péptidos [93,94], ou para a separação de proteínas, tais como histonas [95]. Na RPC, a fase estacionária é apolar, contrariamente à NPC, e a retenção é conseguida através da interacção entre estes ligandos apolares e partes hidrofóbicas da superfície de proteínas ou péptidos. A fase móvel deste tipo de cromatografia é polar, sendo que a eluição das moléculas é conseguida pelo aumento da polaridade do meio. A HIC, está relacionada com a RPC, mas como eluente usa soluções salinas na sua fase móvel.

Por IEX, a separação das biomoléculas é conseguida de acordo com as diferenças na sua carga de superfície. A fase estacionária encontra-se carregada com um ligando específico imobilizado (carregado positivamente ou negativamente) que irá interagir com biomoléculas com carga oposta à sua. Existem dois tipos de IEX troca catiónica e troca aniónica. Na troca catiónica moléculas carregadas positivamente interagem com a resina carregada negativamente, enquanto que na troca aniónica a matriz carregada positivamente interage com proteínas carregadas negativamente. É uma das técnicas mais frequentemente empregues na purificação de proteínas, péptidos e ácidos nucleicos, oferecendo elevada resolução [62]. A eluição é conseguida pelo aumento da força iónica do meio [96].

A AFC, foi especialmente desenvolvida para a purificação cromatográfica de proteínas. A sua elevada resolução deve-se à capacidade das proteínas interagirem com moléculas específicas. O complexo formado pode ser separado sob condições suaves, de forma a dessirver a proteína da coluna sem danificar a sua estrutura nativa. As separações por cromatografia “mixed mode”, como indicado pelo nome, aplicam vários princípios físicos na interacção entre a matriz e as biomoléculas a isolar. Podem apresentar simultaneamente, troca catiónica e aniónica, IEX com HIC, ou IEX com AFC [97].

Por SEC, as proteínas são separadas com base no seu tamanho, sendo apenas usada como passo de polimento devido à sua selectividade [62]. Para se obter uma elevada resolução o volume do “feed” deve ser constituído por menos de 5% do volume da coluna [98].

Capítulo II

Materiais e Métodos

2.1 Materiais

A água com a pureza suficiente e apropriada para as todas soluções experimentais foi obtida com um sistema Mili-Q (Milipore/Waters). A gelana, o ácido 4-morfolinoetanosulfónico (MES), o cloreto de cálcio anidro (CaCl_2), o ácido iminodiacético (IDA), a N,N-Dimetilformamida (DMF), o carbonato de sódio (Na_2CO_3), o tetróxido de ósmio, o glutaraldeído a lisozima, a albumina bovina sérica (BSA) e a α -quimiotripsina foram obtidos na Sigma Chemical (St Louis, MO). O cacodilato de sódio foi obtido na Agar Scientific (Stansted, England). A solução de Acrilamida 30%/Bis foi obtida na BioRad (Hercules, CA). O Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) foi obtido na Fisher Scientific (Epson, United Kingdom), o sulfato de cobre anidro (Cu_2SO_4) na Merck (Darmstadt, Germany), o cloreto de sódio (NaCl) da Panreac (Barcelona, Spain), o glicerol na Himedia (Mumbai, India). O marcador de pesos baixos pesos moleculares (Low Molecular Weight) foi adquirido à GE Healthcare (Uppsala, Sweden).

2.2 Estudo da estabilidade dos géis de gelana

A capacidade da aplicação dos géis de gelana como matriz cromatográfica foi avaliada pela quantidade de ensaios reprodutíveis que diferentes condições de formulação permitiam. Estas condições incluíam a percentagem massa volume (% (m/v)) de gelana, concentração de contra ião utilizado, percentagem volume volume (% (v/v)) de DMF, temperatura e duração da reacção. Os iões utilizados foram o Ca^{2+} , Ni^{2+} e Cu^{2+} numa gama de concentrações de 30 a 150 mM. A formulação dos géis consistiu na dissolução dos iões em 50 mL de água, à temperatura ambiente, e com agitação constante e com posterior adição de DMF, com elevação da temperatura da mistura. Seguidamente fez-se a adição de gelana, ficando a solução em agitação constante, durante o tempo da formulação estipulado. Aquando do fim da reacção, e do arrefecimento da suspensão obtida, esta é empacotada numa coluna Econo-Pac (BioRad, Hercules, CA), sendo equilibradas com tampão MES 10 mM a pH 6,2. Posteriormente, procederam-se aos ensaios de estabilidade que cada condição permitia. Estes ensaios consistiram no tempo que 15 mL de MES 10 mM a pH 6,2 demoravam a percorrer a

coluna. Os ensaios foram considerados reprodutíveis quando a variação temporal entre cada um deles era considerada como não sendo afectada pela perda de estabilidade da matriz. Quando do uso cromatográfico de géis com a presença Cu^{2+} na formulação, ao protocolo previamente descrito foi adicionado 5 % (v/v) de uma solução contendo IDA 0,5 M em Na_2CO_3 1 M, “over night”, em agitação moderada [99].

2.2.1 Análise estatística

Foi efectuada uma análise estatística aos tempos de passagem (em minutos) que cada formulação com o ião cobre permitiu, fazendo uso das potencialidades SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 19.0. Os dados foram apresentados sob a média \pm desvio padrão e foram analisados mediante o teste paramétrico ANOVA. Os géis de gelana com cobre na sua formulação foram os únicos tratados por aplicação deste teste por serem os únicos cujas condições de estabilidade se apresentavam. Os valores são apresentados com 95% de índice de confiança.

2.3 Microscopia electrónica de varrimento (SEM)

De modo a correlacionarem-se as características macroscópicas dos géis de gelana com a sua estrutura utilizou-se a técnica de microscopia electrónica de varrimento (SEM). Esta técnica é amplamente usada para a caracterização microscópica de géis de gelana [100, 101], pelo que se procedeu à adaptação do protocolo usado por Yamamoto e Cunha, em 2007 [100]. As amostras foram fixadas “overnight” numa solução contendo 2,5% (v/v) de glutaraldeído, em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,2). Posteriormente, procedeu-se à fractura em azoto líquido, passando-se de seguida duas vezes por tampão cacodilato, fixando-se “overnight” numa solução 0,1% (v/v) de tetróxido de ósmio. Seguidamente, fez-se a desidratação das amostras num gradiente de etanol (20%, 40%, 60%, 70% e 90%). A desidratação continuou em 100 % etanol, sendo posteriormente executada a sua secagem no ponto crítico de CO_2 . As amostras secas foram montadas em cilindros de alumínio e revestidas com ouro num Emitech K550 Sputter Coater. Foram recolhidas três imagens dos géis referentes a 100, 1000 e 15000 vezes a sua amplificação num microscópio electrónico de varrimento Hitachi S-2700.

2.4 Cromatografia de troca iónica

Os ensaios cromatográficos foram executados à temperatura ambiente e em colunas Econo-Pac (BioRad, Hercules, CA). Todos os tampões utilizados foram preparados com água proveniente de um sistema Mili-Q, filtrados através de uma membrana com um poro de 0,20

μm (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemanha) e desgaseificados por ultra sons. As formulações utilizadas nos ensaios cromatográficos foram preparadas como descrito anteriormente (ponto 2.2). Estes ensaios foram efectuados na presença de diferentes proteínas modelo (lisozima, α -quimiotripsina e BSA), puras ou em mistura, com o objectivo de estabelecer os seus perfis de eluição com base nos seus pontos isoeléctricos, sendo injectados no sistema 500 μL de amostra correspondendo a uma concentração final de 0,5 mg/ml. Na presença do ião cálcio, os ensaios cromatográficos consistiram em dois passos cromatográficos. O primeiro passo foi feito na presença de tampão MES 10 mM com CaCl_2 90 mM, a pH 6,2, efectuando-se o segundo passo nas mesmas condições de tampão, mas com um incremento da força iónica para 750 mM NaCl. Esta condição é mantida durante 3 volumes de coluna (CV) de modo a eluir as proteínas que ficaram adsorvidas na matriz. Com o ião cobre na formulação da matriz foram feitos ensaios de 2 e 3 passos cromatográficos, em que o passo de ligação é com tampão MES 10 mM a pH 6,2. Nos ensaios com 2 passos cromatográficos a eluição foi feita por aumento da força iónica para 750 mM NaCl, durante 3 CV para permitir a eluição das proteínas ligadas à matriz. Para os ensaios com 3 patamares cromatográficos, a eluição foi feita em dois passos, por aumento da concentração de sal para 200 mM NaCl, e por fim para 400 mM NaCl. Em ambos os casos as condições são mantidas durante 3 CV, para inicialmente se eluirem as biomoléculas que interagem de forma mais fraca com a matriz, fazendo-se a eluição das proteínas que interagem de forma mais intensa no passo final. Em todos os ensaios a absorvência foi monitorizada a 280 nm num espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultraspec 3000, recolhendo-se fracções de 1 mL. As fracções correspondentes aos picos cromatográficos foram concentradas e dessalinizadas em concentradores Vivaspin® 6 (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany), por meio de centrifugadoras Macrosep® Advance, , sendo conservadas a 4°C para análise posterior.

2.5 Electroforese SDS-PAGE

A electroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-Poliacrilamida (SDS-PAGE) foi executada de acordo com o método de Laemmli [102] e conforme descrito anteriormente [103]. As amostras analisadas por SDS-PAGE foram preparadas pela adição de 10 μL de tampão de redução [103] a 30 μL das amostras concentradas. Estas amostras foram desnaturadas num “loading buffer” contendo Tris-HCl 500 mM, pH 6,8, 0,02 azul de bromofenol (m/v), 0,2 % glicerol (v/v), 10% (m/v) SDS e 0,02 % β -mercaptoetanol (v/v) durante 10 minutos. Seguidamente fez-se a sua corrida num gel de concentração a 4 % e num gel de migração a 12,5 %, com 0,1% SDS em tampão de corrida constituído por Tris (25mM), glicina (192 mM), SDS (0,1 m/v) a 150 V durante 90 minutos. Posteriormente os géis electroforese foram corados com azul de Comassie, procedendo-se posteriormente à sua análise.

Capítulo III

Resultados e discussão

3.1 Estudos da estabilidade dos géis de gelana

Como referenciado na introdução desta dissertação, a gelana possui a capacidade de formar géis, tornando-se mais estáveis na presença de catiões divalentes [34]. Desta forma, inicialmente os estudos realizados focaram a estabilidade de géis de gelana, como matriz cromatográfica, na presença de diferentes catiões divalentes (Cu^{2+} , Ni^{2+} e Ca^{2+}), avaliando-se o efeito de diferentes parâmetros utilizados na sua formulação (enumerados no ponto 2.2 do capítulo materiais e métodos).

Estes estudos visaram avaliar o efeito que a modificação de diferentes parâmetros da formulação dos géis (concentração de ião, $\%(\text{m}/\text{v})$ gelana, $\%(\text{v}/\text{v})$ DMF, temperatura e duração da reacção) faziam à estabilidade dos géis. Para tal, contou-se o tempo (em min) que 15 mL de tampão MES 10 mM, pH 6,2, demorava a percorrer a matriz, apresentando-se os resultados obtidos 4.1, 4.2, 5.1, 5.2, 6.1 e 6.2. Analisando superficialmente estas tabelas, observa-se que, tal como descrito na literatura, os metais de transição conferem maior estabilidade estrutural à matriz (Cu^{2+} e Ni^{2+}). Formulações de gelana na presença de metais alcalino-terrosos (Ca^{2+}), parecem contribuir para um decréscimo da estabilidade da matriz. Especificamente, entre os metais de transição usados, o Cu^{2+} permitiu um maior número de ensaios reprodutíveis (10) comparativamente ao Ni^{2+} (4). Os dois metais foram utilizados na formulação dos géis de gelana pois para além de pertencerem a um grupo da tabela periódica que confere elevada estabilidade aos géis, são amplamente utilizados como ligandos em cromatografia de afinidade. O ião Ca^{2+} foi utilizado por ser um dos mais extensivamente estudados na formulação de géis de gelana.

Pela análise da tabela 4.1 verifica-se que independentemente da variação das diversas condições aplicadas nas formulações testadas, o número máximo de ensaios reprodutíveis foi de três. De facto, quando esta informação é cruzada com a da tabela 4.2, constata-se que apesar das diferenças nos vários tempos de passagem apenas quatro condições de síntese do gel de gelana permitiram a execução de três ensaios sem perda da permeabilidade da matriz. Estes ensaios foram o 6, 7, 12 e 13, e apenas a formulação 6 apresenta os três ensaios como reprodutíveis.

Especificamente, as formulações 6 e 7 apresentam características idênticas, diferindo apenas na duração da reacção de “cross-linking”. A condição 7 obteve tempos de passagem consideravelmente maiores do que em relação às condições aplicadas em 6, estipulando-se que a duração da reacção poderá ser o factor principal na diferença de permeabilidade de ambas as condições (tabela 4.2). Na condição 7 houve a formação de um gel coeso devido a

uma extensa polimerização, sendo que este facto não levou a um aumento da sua estabilidade como matriz cromatográfica, verificando-se ao invés uma perda de permeabilidade mais célere comparativamente à formulação 6.

A condição 6 é aquela que aparenta o melhor compromisso entre todos os parâmetros em estudo na formulação de géis de gelana na presença de Ca^{2+} , visto permitir um maior número de ensaios reprodutíveis. Este número, contudo, descreve-se como escaço para a formulação de uma matriz cromatográfica com todos os pressupostos já descritos anteriormente. Da comparação da formulação 13 com a 11, em que ambas diferem na presença de DMF, verificamos que a condição com DMF na formulação apresenta uma maior estabilidade. Desta forma, e sabendo que o DMF é usado como agente polimerizador em reacções orgânicas, seria necessário efectuar triplicados das formulações com os melhores resultados com o intuito de verificar se o impacto deste reagente é relevante ou não na formulação dos géis de gelana com Ca^{2+} .

Tabela 4.1 - Condições experimentais utilizadas nos ensaios com Ca^{2+} e número de ensaios reprodutíveis.

Formulação	% Gelana (m/v)	$[\text{CaCl}_2]$ (mol/dm ³)	%DMF (v/v)	Temperatura (°C)	Duração da reacção (h)	Ensaio reprodutíveis
1	2,5	30	10	55	14	1
2	2,5	20	5	55	14	1
3	2,5	30	10	55	54	-
4	2,5	90	70	90	14	2
5	2,5	20	5	90	14	1
6	2,5	90	5	90	14	3
7	2,5	90	5	90	56	2
8	2,5	90	5	90	4	2
9	2,5	150	5	90	14	1
10	1,25	90	5	90	14	1
11	5	90	5	90	4	1
12	1,25	90	5	90	14	2
13	5	90	0	90	4	2

Tabela 4.2 - Tempos de passagem na matriz cromatográfica de gelana sintetizada com diferentes formulações e na presença de Ca^{2+} .

Formulação	Primeiro ensaio (min)	Segundo ensaio (min)	Terceiro ensaio (min)	Quarto ensaio (min)
1	1,87	5,20	-----	-----
2	5,83	19,77	-----	-----
3	0,97	1,25	-----	-----
4	10,40	11,38	-----	-----
5	6,07	12,57	-----	-----
6	2,77	3,75	4,83	-----
7	8,17	9,50	14,17	-----
8	2,08	2,97	-----	-----
9	5,83	11,08	-----	-----
10	11,42	16,00	-----	-----
11	8,42	13,67	-----	-----
12	2,53	3,03	5,87	-----
13	5,65	6,08	12,13	-----

Nas tabelas 5.1 e 5.2, discriminam-se respectivamente, a informação referente às condições utilizados nos ensaios com Ni^{2+} e os tempos de passagem nos diversos ensaios efectuados. Pela sua análise constata-se um aumento da reprodutibilidade comparativamente às formulações com Ca^{2+} , ainda que esta reprodutibilidade seja bastante inferior às formulações com Cu^{2+} . Entre todas as condições aplicadas a que obteve um maior número de ensaios reprodutíveis é a 6. Esta formulação é idêntica à 8, diferindo apenas na duração da reacção. Tal como para as condições 6 e 7 dos géis com Ca^{2+} , a variação da duração da reacção conduziu a uma diferença tanto na permeabilidade, como na estabilidade, de ambas as formulações. Igualmente foi na formulação que apresentou uma menor duração de reacção que se obteve uma maior permeabilidade, bem como reprodutibilidade, da matriz. Este resultado reforça que uma reacção de “cross-linking” demasiado extensa levará à formação de géis menos permeáveis, e com menor estabilidade, na aplicação desta matriz em ensaios cromatográficos. Quando comparados estes resultados com os do Ca^{2+} é de notar que as formulações que conduziram a melhores resultados foram aquelas cujas reacções foram menos extensas temporalmente. Este facto poderá estar relacionado com a maior afinidade dos metais de transição para a gelana, conseguindo-se assim uma reacção mais eficaz para o fim pretendido num intervalo temporal menor. Para confirmar esta premissa seria de todo o interesse fazer um ensaio nas mesmas condições da formulação 6, mas com uma duração

maior. Tal como para o Ca^{2+} , seria relevante fazer duplicados das condições utilizadas por forma a comprovar a relevância, ou não, do DMF nas formulações. O uso do desenho experimental poderia também ser uma boa estratégia na análise da contribuição relativa que cada parâmetro tem na estabilidade destes géis.

Tabela 5.1 - Condições experimentais utilizadas nos ensaios com Ni^{2+} e número de ensaios reproduzíveis.

Formulação	% Gelana (m/v)	$[\text{NiSO}_4]$ (mol/dm ³)	%DMF (v/v)	Temperatura (°C)	Duração da reacção (h)	Ensaio reproduzíveis
1	2.5	20	5	90	14	3
2	2.5	20	5	55	14	2
3	2.5	90	5	90	14	4
4	2.5	150	10	90	4	4
5	2.5	150	5	90	14	3
6	1.25	90	5	90	4	5
7	1.25	20	10	90	4	3
8	1.25	90	5	90	64	3

Tabela 5.2 - Tempos de passagem dos ensaios das diferentes formulações dos géis de gelana na presença de Ni^{2+} .

Formulação	Primeiro ensaio (min)	Segundo ensaio (min)	Terceiro ensaio (min)	Quarto ensaio (min)	Quinto ensaio (min)	Sexto ensaio (min)
1	3,42	3,67	4,58	-----	-----	-----
2	3,05	3,33	5,13	-----	-----	-----
3	2,07	2,38	2,80	3,42	9,58	-----
4	2,05	2,27	2,53	2,88	4,75	-----
5	3,80	4,08	4,47	5,97	-----	-----
6	1,63	1,85	2,12	2,35	3,17	8,67
7	1,60	1,87	2,22	-----	-----	-----
8	3,65	4,37	4,90	8,25	-----	-----

Através da análise das tabelas 6.1 e 6.2, que representam as condições utilizadas nos ensaios com Cu^{2+} e o tempo de passagem de cada uma delas, respectivamente, constata-se um incremento no número de ensaios reprodutíveis, quando comparados com os obtidos para os outros dois íões testados. Deste modo, as três formulações utilizadas na presença de Cu_2^+ possibilitaram a execução de 10 ensaios, nas condições já descritas, sem ocorrer perda de permeabilidade da matriz, sendo a condição 2 (1,25%(m/v) gelana, 90mM CuSO_4 , 5% (v/v) DMF, 90°C e 4h reacção) a mais reprodutível. Assim, este é o íão que confere a maior estabilidade à estrutura polimérica da gelana, sendo por isso aquele que apresenta maior potencial na formulação dos géis deste polímero como matriz cromatográfica. A estabilidade adquirida na presença de Cu_2^+ aparenta ser independente das condições de síntese, visto que todas as formulações permitiram a execução de dez ensaios reprodutíveis. Estes dados dão liberdade para no futuro modelar as condições experimentais de preparação dos géis na presença deste catião, de acordo com características específicas que se possam pretender para a matriz, nomeadamente, densidade de ligandos, permeabilidade e tamanho de poro. De qualquer forma, em futuros estudos a independência das condições das formulações na presença de Cu^{2+} deverá ser otimizada, através, de ensaios variando as quantidades de cada reagente, de modo a se obterem as condições-limite de formulação, com o intuito de se verificar a versatilidade já descrita.

Tabela 6.1 - Condições utilizadas nos ensaios com Cu^{2+} e número de ensaios reprodutíveis.

Formulação	[CuSO_4] (mol/dm ³)	%DMF (v/v)	Temperatura (°C)	% Gelana (m/v)	Duração da reacção (h)	Ensaios reprodutíveis
1	90	5	90	2.5	14	10
2	90	5	90	1.25	4	10
3	150	5	90	2.5	4	10

Tabela 6.2 - Tempos de passagem dos ensaios das diferentes formulações dos géis de gelana na presença de Cu^{2+} .

Formulação	Primeiro ensaio (min)	Segundo ensaio (min)	Terceiro ensaio (min)	Quarto ensaio (min)	Quinto ensaio (min)	Sexto ensaio (min)	Sétimo ensaio (min)	Oitavo ensaio (min)	Nono ensaio (min)	Décimo ensaio (min)	Média ± desvio padrão
1	2,95	2,32	2,03	1,98	1,95	1,97	2,02	2,10	2,13	2,28	2,17±0,30
2	1,05	1,10	1,15	1,22	1,28	1,42	1,62	1,48	1,50	1,60	1,34±0,21
3	11,58	5,20	2,68	2,27	2,00	1,92	1,83	1,87	1,98	2,08	3,34±3,07

3.2 Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

De forma a obter-se uma análise pormenorizada da estrutura microscópica dos géis, da sua reticulação e porosidade utilizou-se a técnica de Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM). As condições de processamento da amostra foram 90 mM de CaCl_2 , 5% DMF (v/v), 2,5% (m/v) de gelana, a 90°C , tendo a reacção a duração de 14h. As imagens obtidas para as diferentes ampliações podem ser observadas na Figura 5. Como já foi referenciado anteriormente, uma matriz cromatográfica deve ser bastante porosa de modo a permitir a passagem da fase móvel e estabelecer o contacto molecular entre a matriz e as biomoléculas de interesse. Deste modo, pela análise da figura 5 constatamos que os géis de gelana, pelo menos nesta formulação, não seriam ideais para serem aplicados como matrizes cromatográficas por apresentar uma estrutura desorganizada, quase folicular, e pouco porosa. Contudo, a literatura contraria as imagens obtidas, pois geralmente os géis de gelana quando analisados por SEM apresentam-se estruturalmente ordenados e com elevado grau de porosidade [100, 101]. Deste modo, poderemos referir que os resultados alcançados podem estar relacionados com a execução do protocolo, ou não se adaptar à formulação utilizada, comprometendo provavelmente a obtenção de uma estrutura tridimensional do gel. Estas falhas podem ter ocorrido durante os passos de fixação ou durante o processo de partição da amostra. Assim, a fixação poderá ter ocorrido de forma ineficaz, modificando a estrutura da matriz observada na Figura 5. Adicionalmente, a fractura em azoto líquido por se efectuar de modo aleatória poderá ter originado aglomerados de gelana estruturalmente aleatórios, como os observados na Figura 5. Para contrariar este facto tentou-se fixar a amostra em parafina líquida com o objectivo de fazer o seu corte de secção e obter-se uma amostra de estrutura ordenada. Este passo adicional foi infurtivo, devido à inviabilidade da fixação da amostra na parafina. Pelas dificuldades obtidas neste protocolo outras alternativas deverão ser procuradas e analisadas, nomeadamente a microscopia confocal, e com aplicações de sucesso descritas para géis de gelana em condições de formulação semelhantes [33].

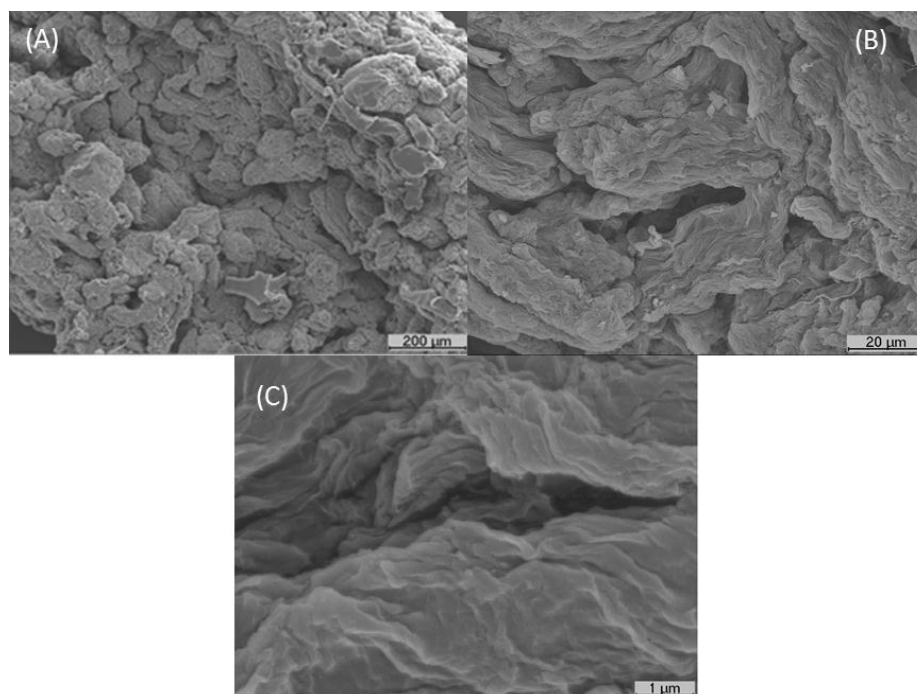


Figura 5 - Imagens obtidas por SEM do gel de gelatina sintetizado na presença de 90 mM de CaCl_2 , 2,5 % (m/v) de gelatina, 5 % (v/v) DMF, a 90°C durante 14h (Tabela 4.1, condição 6). (A) Imagem da estrutura ampliada 100x; (B) Imagem da estrutura ampliada 1000x; (C) Imagem da estrutura ampliada 15000x.

3.3 Cromatografia de troca iónica (IEX) usando a gelatina como fase estacionária.

A IEX é uma técnica amplamente usada na purificação de proteínas de uso terapêutico [90, 104-106]. Deste modo, efectuaram-se ensaios cromatográficos preliminares com três proteínas modelo (lisozima, BSA e α -quimiotripsina) utilizando como fase estacionária duas das formulações estudadas nos ensaios de estabilidade (secção 3.1). Os ensaios efectuados visaram compreender a sustentabilidade e performance da matriz de gelatina tirando partido da sua natureza aniónica natural, estabelecendo os seus perfis de eluição das três proteínas, jogando com sua carga. A grande vantagem da obtenção de uma matriz de gelatina estável reside no seu carácter iónico natural, visto que, as matrizes convencionais necessitam de ser funcionalizadas com um ligando específico para possuírem o tipo de interacção a explorar.

3.3.1 Ensaios cromatográficos preliminares usando o cálcio como contra-ião

Os primeiros ensaios cromatográficos foram executados em géis de gelana com o Ca^{2+} como contra-ião. Apesar destes géis apresentarem menor reprodutibilidade, estando dependentes da presença de Ca^{2+} no tampão de ligação e eluição, foram as primeiras formulações estudadas e como tal estabeleceram-se os comportamentos de ligação das proteínas na formulação que permitiu maior reprodutibilidade (formulação 6).

Inicialmente, estabeleceram-se os perfis de eluição das proteínas modelo em estudo, através de ensaios cromatográficos individuais. Os cromatogramas obtidos encontram-se representados na figura 6, 7 e 8.

A figura 6 representa o perfil de eluição obtido para a enzima α -quimiotripsina, podendo-se observar que a mesma não interagiu com a coluna, sendo eluída nas primeiras fracções na presença de tampão MES. Este facto mostra-se incoerente com o comportamento que seria de esperar entre esta enzima e a matriz. Como o pH do ensaio encontra-se abaixo do seu ponto isoeléctrico (8,75), a proteína encontra-se carregada positivamente, devendo por isso interagir com a matriz de gelana. No entanto, observa-se que não há retenção da proteína nas condições experimentais aplicadas, registando-se um efeito de arrastamento, visível no pico de absorvência obtido, o que poderá significar que a proteína interagiu, ainda que, de forma muito ténue com a gelana. Este facto poderá estar relacionado com a densidade de ligandos da matriz não ser o suficiente para interagir fortemente com a α -quimiotripsina, à conformação da proteína não disponibilizar grupos carregados suficientes à sua superfície para que a interacção seja favorecida, à possível competição entre a biomolécula e os iões de Ca^{2+} ou até à formação de agregados entre a proteína e o catião, algo que se encontra descrito na literatura e constituirá a alternativa mais viável para o comportamento observado [107].

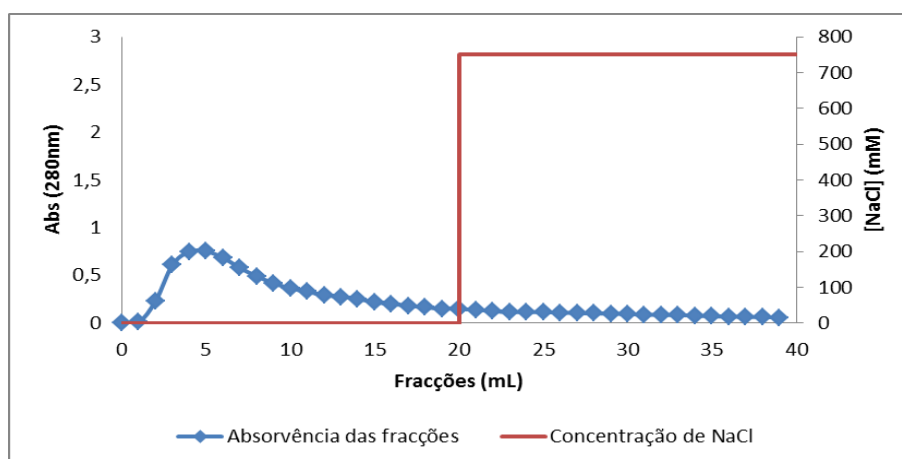


Figura 6 - Perfil de eluição obtido para a α -quimiotripsina na matriz de gelana formulada na presença de 90 mM CaCl_2 , 90 mM de CaCl_2 , 2,5 % (m/v) de gelana, 5 % (v/v) DMF, a 90°C durante 14h (Tabela 4.1, condição 6). O passo de ligação processa-se em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 90 mM CaCl_2 e o segundo passo (eluição) em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 90 mM CaCl_2 e 750 mM NaCl.

Adicionalmente, o comportamento que a BSA regista nas condições de ligação e eluição já descritas, assemelha-se aos obtidos com a proteína α -quimiotripsina. Contudo, pela análise do único pico obtido no cromatograma da figura 7, observa-se que o mesmo se encontra bem resolvido, sem arrastamentos, sendo por isso esta biomolécula totalmente eluída nas primeiras fracções do ensaio. Tal comportamento é coerente com a carga da BSA nas condições de pH aplicadas no ensaio, visto que se encontram acima do seu ponto isoeléctrico de 4,9. Deste modo, a proteína encontra-se carregada negativamente, apresentando a mesma carga com a matriz, não havendo a interacção entre ambas.

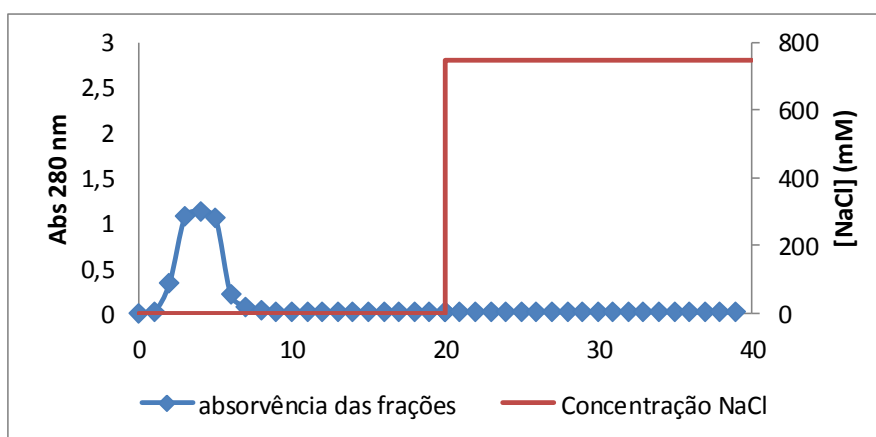


Figura 7 - Perfil de eluição obtido para a BSA na matriz de gelana formulada na presença de 90 mM CaCl_2 , 90 mM de CaCl_2 , 2,5 % (m/v) de gelana, 5 % (v/v) DMF, a 90°C durante 14h (Tabela 4.1, condição 6). O passo de ligação processa-se em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 90 mM CaCl_2 e o segundo passo (eluição) em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 90 mM CaCl_2 e 750 mM NaCl.

A lisozima tem um ponto isoeléctrico de 11,35, encontrando-se assim carregada positivamente durante os ensaios cromatográficos. No cromatograma registado na figura 8 observa-se que a lisozima é retida na matriz, conseguindo-se a sua eluição total com o aumento da força iónica, observado pelo aumento da absorvência após o aumento da força iónica da fase móvel. Estes resultados foram confirmados por SDS-PAGE, através da recolha das fracções correspondentes aos picos obtidos, tendo-se conseguido comprovar deste modo o comportamento cromatográfico destas proteínas, pela análise dos picos obtidos em comparação com os padrões (Figura 9).

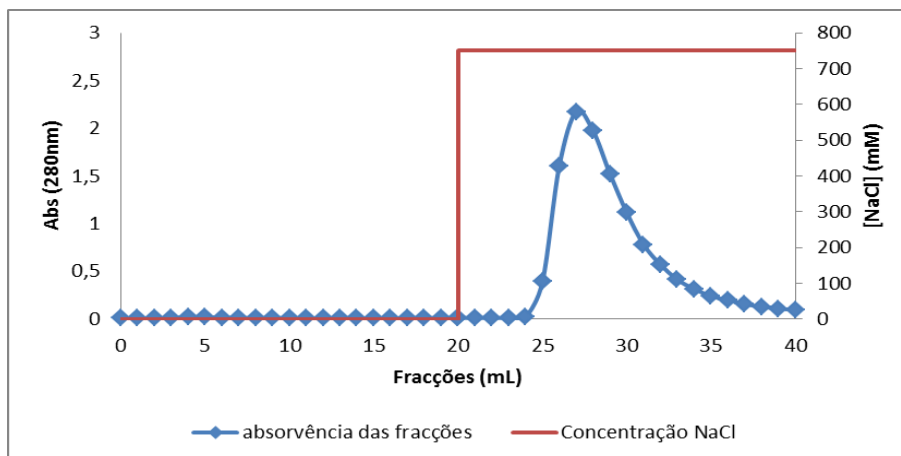


Figura 8 - Perfil de eluição obtido para a lisozima na matriz de gelana formulada na presença de 90 mM CaCl₂, 90 mM de CaCl₂, 2,5 % (m/v) de gelana, 5 % (v/v) DMF, a 90°C durante 14h (Tabela 4.1, condição 6). O passo de ligação consistiu em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 90 mM CaCl₂ e o segundo passo (eluição) em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 90 mM CaCl₂ e 750 mM NaCl.

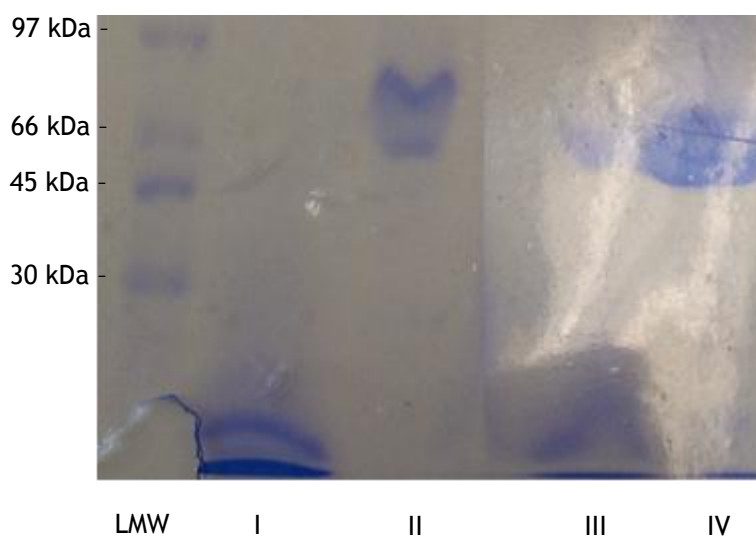


Figura 9 - Electroforese SDS-PAGE dos picos obtidos nos ensaios cromatográficos descritos anteriormente. LMW - marcador de pesos moleculares. I - padrão de lisozima. II - padrão de BSA. III - pico do ensaio de lisozima. IV - pico do ensaio com BSA.

Após o estabelecimento dos perfis de eluição das três proteínas, e verificando-se que estas interagiam de forma diferente com a matriz, posteriormente efectuaram-se ensaios cromatográficos de misturas proteicas simples (lisozima e BSA; lisozima e α -quimiotripsina). Os resultados obtidos pode ser visualizados nas figuras 10 e 11.

No cromatograma da mistura lisozima e BSA obtêm-se preferencialmente dois picos, um na zona de ligação e outro na zona de eluição. Tendo em conta o comportamento de ambas as proteínas isoladas, teoricamente o primeiro pico pertence à BSA, enquanto o pico situado no passo de eluição pertence à lisozima.

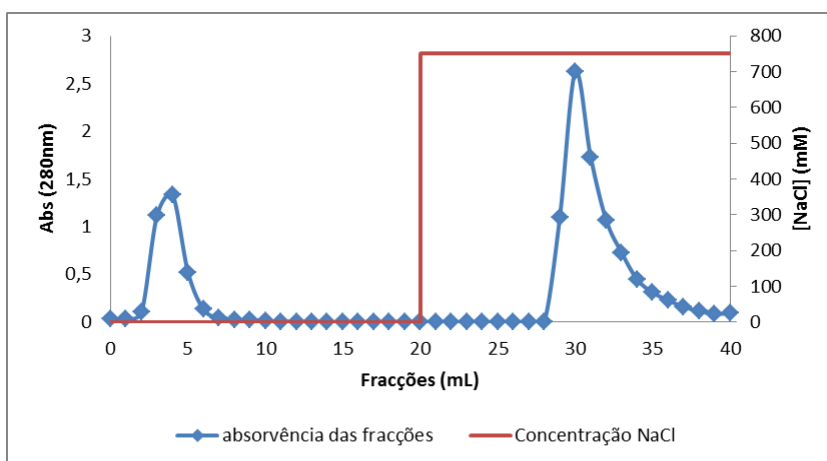


Figura 10 - Perfil de eluição obtido para a mistura lisozima + BSA na matriz de gelana formulada na presença de 90 mM CaCl₂, 90 mM de CaCl₂, 2,5 % (m/v) de gelana, 5 % (v/v) DMF, a 90°C durante 14h (Tabela 4.1, condição 6). O passo de ligação consistiu em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 90 mM CaCl₂ e o segundo passo (eluição) em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 90 mM CaCl₂ e 750 mM NaCl.

Pela análise do cromatograma da figura 11, que corresponde à mistura α -quimiotripsina+lisozima, constata-se a presença de dois picos, um obtido no passo de ligação e o outro no passo de eluição a 750 mM NaCl. Tendo em conta que o pico observado no ensaio da α -quimiotripsina isolada é arrastado, e constatando que o primeiro pico desta mistura se apresenta nas mesmas condições conclui-se que este pertence à α -quimiotripsina. O pico situado no passo de eluição, corresponde à lisozima pois apresenta a mesma topologia do obtido para a proteína isolada.

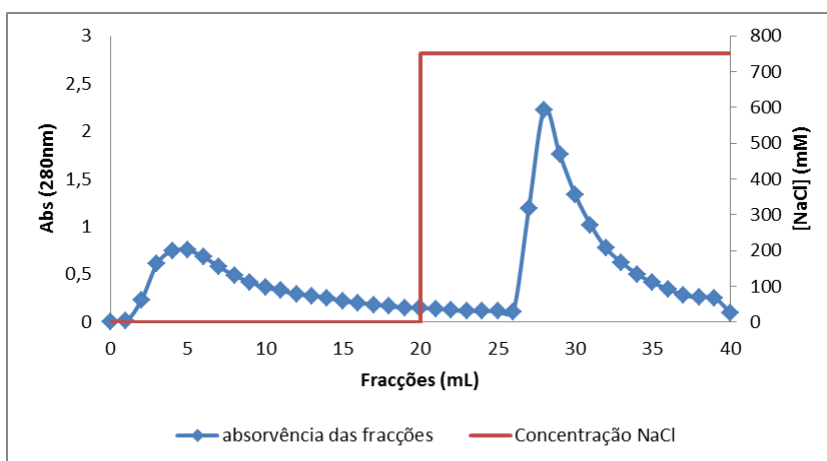


Figura 11 - Perfil de eluição obtido para a mistura α -quimiotripsina+lisozima na matriz de gelana formulada na presença de 90 mM CaCl₂, 90 mM de CaCl₂, 2,5 % (m/v) de gelana, 5 % (v/v) DMF, a 90°C durante 14h (Tabela 4.1, condição 6). O passo de ligação consistiu em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 90 mM CaCl₂ e o segundo passo (eluição) em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 90 mM CaCl₂ e 750 mM NaCl.

De um modo geral, com os dois ensaios de misturas proteicas simples prova-se a reprodutibilidade dos ensaios das proteínas isoladas, bem como a capacidade da matriz de gelana em conseguir separar biomoléculas com comportamentos de interação iónicos

diferentes. A limitação em termos de reprodutibilidade dos géis de gelana com Ca^{2+} , e consequentemente a necessidade da presença deste catião na formulação dos tampões dos ensaios cromatográficos poderá no futuro impedir a purificação de proteínas em larga escala, ora por interacção e formação de agregados destas com o Ca^{2+} , ora pela possível competição deste ião aos locais de ligação na matriz.

3.3.2 Ensaios cromatográficos usando o cobre como contra-ião

As formulações com o ião Cu^{2+} foram as que conduziram a uma maior reprodutibilidade nos ensaios de estabilidade, sendo independentes da sua presença no tampão usado para a execução dos ensaios cromatográficos. Assim, os géis de gelana com Cu^{2+} na sua formulação são aqueles que apresentam a maior potencialidade para serem aplicados em ensaios cromatográficos. Para testar a veracidade desta premissa tentou-se estabelecer os perfis de eluição das proteínas modelo estudadas anteriormente em ensaios cromatográficos essencialmente de troca iónica. A formulação utilizada foi a 2, apresentada na tabela 6.1 (90 mM CaCl_2 , 5% (m/v) gelana, 5 % (v/v) DMF a 90°C e durante 4h) por ter sido aquela que apresentou menor desvio padrão nos seus ensaios ($\pm 0,21$) e dessa forma ter apresentado a maior reprodutibilidade. À formulação juntou-se posteriormente 2,5 % (v/v) de uma solução 0,5 M de IDA em Na_2CO_3 1 M, “over night”, sob agitação moderada. Teoricamente, o IDA permite a formação de complexos com iões metálicos (Cu(II) , Zn(II) , Co(II) , Ni(II)) utilizando-se por isso na imobilização destes iões em matrizes de IMAC [99]. Tal como nos ensaios cromatográficos cujas formulações possuíam Ca^{2+} , primeiramente estudou-se a interacção da matriz com as proteínas modelo. Estes ensaios foram executados com dois passos cromatográficos simples, nas condições já descritas. Foi efectuado um primeiro passo de ligação em tampão MES 10 mM, pH 6,2; seguido de um passo de eluição em tampão MES 10 mM, pH 6,2; com 500 mM NaCl.

Desta forma, e tal como nos ensaios apresentados no ponto 3.3.1, pretendeu-se aproveitar o carácter aniónico natural da gelana para promover a interacção com as proteínas carregadas positivamente testadas (lisozima e α -quimiotripsina). Por o ião Cu^{2+} possuir afinidade para aminoácidos específicos, bem como maior electronegatividade que o ião Ca^{2+} , tentou-se aproveitar estas suas características numa possível interacção com a BSA (carregada negativamente nestas condições). A figura 11 representa o perfil de eluição obtido para a lisozima, nas condições já descritas. Pela sua análise, verifica-se que a proteína ficou retida na coluna, uma vez que se observa um incremento acentuado da absorvência aquando do aumento de força iónica. Como nestas condições a lisozima se encontra carregada positivamente, visto o seu ponto isoeléctrico ser superior ao pH das condições cromatográficas, esta proteína interagiu com a matriz de gelana suficientemente para promover a sua completa retenção. Este facto apresenta-se coerente com a interacção

esperada gelana-lisozima, e é coincidente com os ensaios realizados aplicando Ca^{2+} como contra-íão.

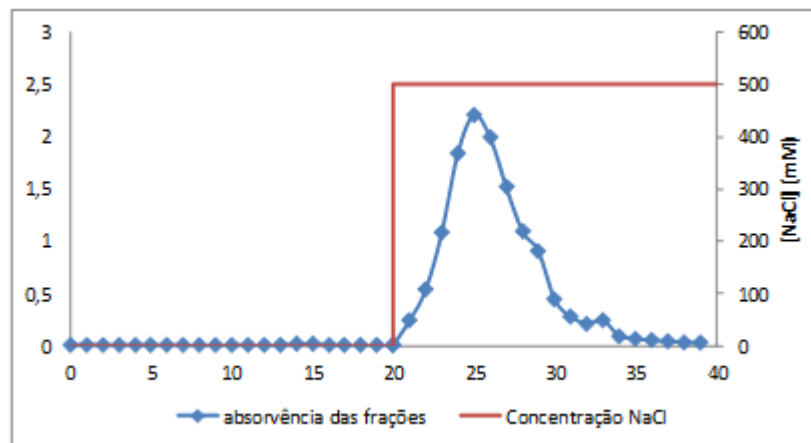


Figura 12 - Perfil de eluição obtido para a lisozima na matriz de gelana formulada na presença de 90 mM de CuSO_4 , 1,25 % (m/v) de gelana, 5 % (v/v) DMF, a 90°C durante 4h (Tabela 6.1, condição 2). O passo de ligação consistiu em tampão MES 10 mM a pH 6,2 e o segundo passo (eluição) em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 750 mM NaCl.

O perfil de eluição da α -quimiotripsina pode ser visualizado na figura 13. Neste ensaio verifica-se uma interação entre esta proteína e a gelana, contrariamente aos ensaios com Ca^{2+} como contra-íão. Sem a presença do íão nas condições utilizadas, a proteína encontra-se na sua forma livre para interagir com a coluna, ganhando maior força a formação de complexos α -quimiotripsina- Ca^{2+} (hipótese já discutida anteriormente) [107]. Como no caso da lisozima, com o aumento da força iónica observou-se um pico de absorvência que corresponderá à eluição da α -quimiotripsina.

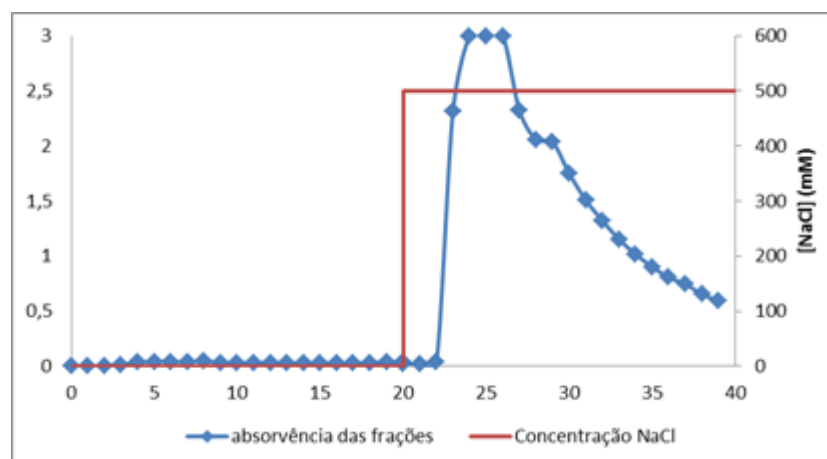


Figura 13 - Perfil de eluição obtido para a α -quimiotripsina na matriz de gelana formulada na presença de 90 mM de CuSO_4 , 1,25 % (m/v) de gelana, 5 % (v/v) DMF, a 90°C durante 4h (Tabela 6.1, condição 2). O passo de ligação consistiu em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 90 mM CaCl_2 e o segundo passo (eluição) em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 750 mM NaCl.

Analisando-se a figura 14, verifica-se também que, contrariamente aos ensaios na presença de Ca^{2+} , a BSA interagiu com a matriz. Pensa-se que esta interação não poderá ocorrer com a gelana, pois esta proteína nas condições cromatográficas utilizadas encontra-se carregada negativamente, impossibilitando qualquer interação iónica com a gelana. A única interação possível da BSA com a matriz será com o ião Cu^{2+} . De facto, este ião é utilizado em IMAC pela sua capacidade de adsorver proteínas que possuam grupos electrónicos doadores específicos nas suas superfícies, sendo conhecida a sua afinidade por resíduos de histidina ou cisteína [108], assim, alguns dos resíduos carregados negativamente de BSA poderão ter interagido com o Cu^{2+} da matriz de gelana, favorecendo a sua retenção completa.

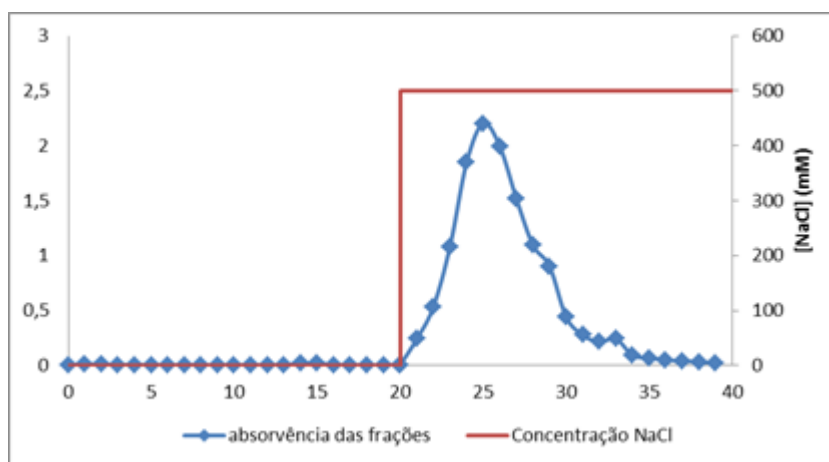


Figura 14 - Perfil de eluição obtido para a BSA na matriz de gelana formulada na presença de 90 mM de CuSO_4 , 1,25 % (m/v) de gelana, 5 % (v/v) DMF, a 90°C durante 4h (Tabela 6.1, condição 2). O passo de ligação consistiu em tampão MES 10 mM a pH 6,2 e o segundo passo (eluição) em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 750 mM NaCl.

Como as proteínas modelo em estudo ficaram todas retidas na matriz de gelana- Cu^{2+} , posteriormente efectuaram-se ensaios cromatográficos em condições iónicas diferentes, de modo a estabelecer as condições de eluição limite à matriz. Os resultados obtidos podem ser visualizados nas figuras 15, 16 e 17. Estes ensaios consistiram em três passos cromatográficos, sendo um de ligação, e os outros dois de eluição, através do aumento faseado da força iónica. O primeiro passo foi efectuado em tampão MES 10 mM, pH 6,2; o segundo passo em tampão MES 10 mM, pH 6,2 com 200 mM NaCl e o terceiro passo em tampão MES 10 mM, pH 6,2; com 400 mM NaCl.

Pela análise da figura 15, que representa o cromatograma obtido para a BSA, constata-se que a sua eluição total se dá a 200 mM de NaCl, em duas fases. A figura 16 representa o perfil obtido nestas condições para a α -quimiotripsina, observando-se que a eluição desta proteína ocorre totalmente no início do segundo patamar cromatográfico (200 mM NaCl), contrariamente à BSA. O perfil cromatográfico obtido para a lisozima encontra-se na figura 17. Da sua análise é possível verificar que a eluição desta biomolécula só foi possível quando a força iónica foi aumentada para 400 mM NaCl. Estes resultados demonstram a possibilidade da existência de interações com diferentes afinidades entre a matriz e diferentes

biomoléculas, observando-se maior afinidade da matriz para a lisozima, por ser necessária maior força iónica para promover a sua eluição.. Tal facto poder-se-á dever ao facto da lisozima apresentar maior densidade de grupos carregados à sua superfície que as outras duas proteínas em estudo, ou ao invés, a sua conformação se apresentar mais favorável à ligação com a matriz.

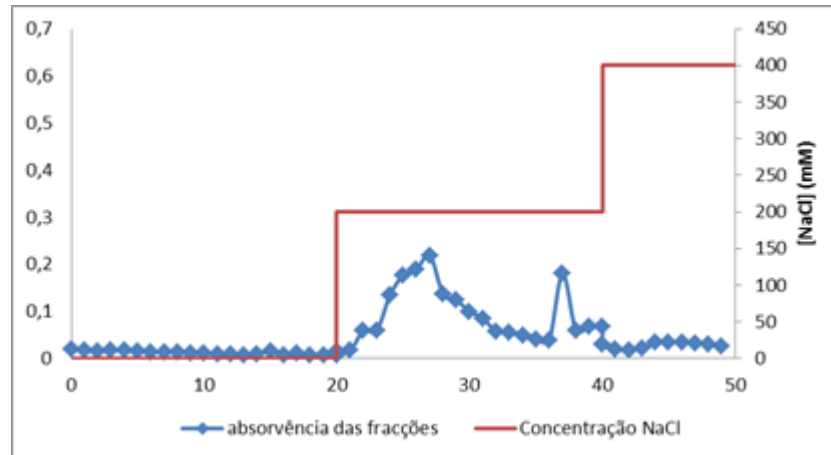


Figura 15 - Perfil de eluição obtido para a BSA na matriz de gelana formulada na presença de 90 mM de CuSO_4 , 1,25 % (m/v) de gelana, 5 % (v/v) DMF, a 90°C durante 4h (Tabela 6.1, condição 2). O passo de ligação consistiu em tampão MES 10 mM a pH 6,2; o segundo passo (eluição) em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 200 mM NaCl e o terceiro (eluição) em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 400 mM NaCl.

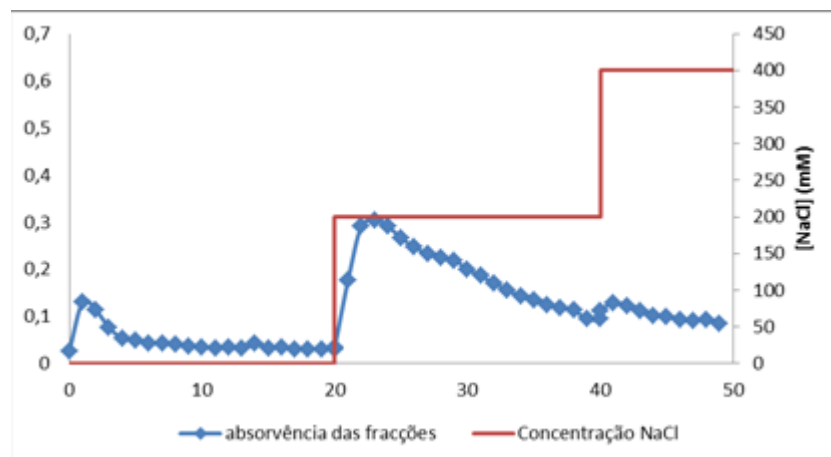


Figura 16 - Perfil de eluição obtido para a α -quimiotripsina na matriz de gelana formulada na presença de 90 mM de CuSO_4 , 1,25 % (m/v) de gelana, 5 % (v/v) DMF, a 90°C durante 4h (Tabela 6.1, condição 2). O primeiro passo consistiu em tampão MES 10 mM a pH 6,2, o segundo em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 200 mM NaCl e o terceiro em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 400 mM NaCl.

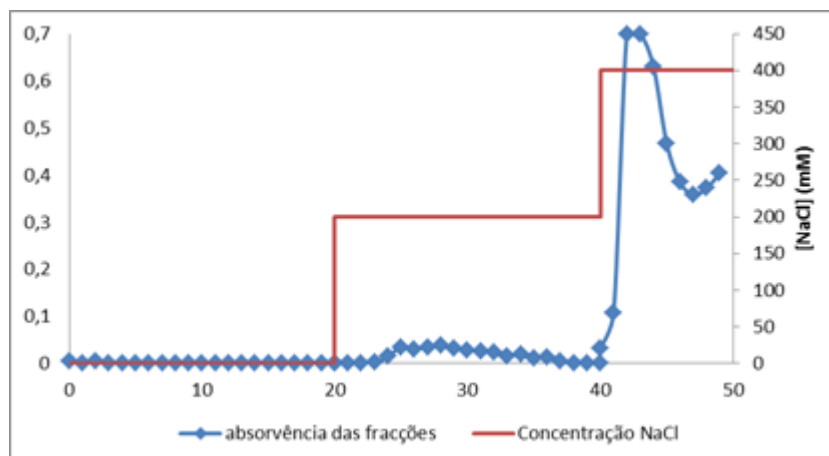


Figura 17 - Perfil de eluição obtido para a lisozima na matriz de gelana formulada na presença de 90 mM de CuSO_4 , 1,25 % (m/v) de gelana, 5 % (v/v) DMF, a 90°C durante 4h (Tabela 6.1, condição 2). O primeiro passo consistiu em tampão MES 10 mM a pH 6,2, o segundo em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 200 mM NaCl e o terceiro em tampão MES 10 mM a pH 6,2 com 400 mM NaCl.

Estes resultados preliminares carecem de confirmação por técnicas complementares como SDS-PAGE, sendo que, no futuro seria de todo o interesse repeti-los fazendo a recolha das fracções correspondentes aos picos cromatográficos de modo a confirmar as informações obtidas nos cromatogramas. De qualquer forma, os dados preliminares reforçam o uso potencial da gelana como matriz cromatográfica, sendo que, as formulações com o ião Cu^{2+} poderão apresentar vários tipos de interacção proteína-matriz podendo ser aplicadas em cromatografia “mix-mode” de misturas mais complexas, jogando com diferentes propriedades das biomoléculas em estudo. Esta matriz poderá também ser usada em IMAC fazendo uso da afinidade já descrita do Cu^{2+} para certos aminoácidos.

Capítulo IV

Conclusões

A cromatografia é uma técnica amplamente usada na purificação de biomoléculas de interesse farmacológico, no estudo das moléculas envolvidas em patologias, bem como, na aplicação destas biomoléculas em fármacos inovadores. Actualmente, existe uma grande diversidade de suportes cromatográficos, desde polímeros polissacáridos naturais e sintéticos a materiais inorgânicos. Estas matrizes apresentam-se geralmente inertes, necessitando muitas vezes de ser funcionalizadas com ligandos específicos que lhes confirmam o carácter cromatográfico a explorar. Assim, a busca de novas matrizes com características distintas das convencionais poderá constituir tanto uma mais-valia científica, na purificação de novas biomoléculas farmacológicas, como uma mais-valia industrial pela diminuição dos custos associados à produção das matrizes cromatográficas.

Neste campo, a gelana poderá aparecer como uma nova solução, visto ser um polímero naturalmente aniónico, podendo ser usada em troca catiónica sem a necessidade de funcionalização. A necessidade da presença de catiões na formulação dos géis de gelana confere a esta matriz a capacidade de conjugar num só suporte os dois tipos de IEX, sendo que quando aplicados catiões metálicos se poderá fazer uso da sua afinidade para moléculas específicas.

Tendo em conta estas premissas, nesta dissertação aplicou-se a gelana pela primeira vez como fase estacionária de processos cromatográficos. Os ensaios de estabilidade das diversas formulações utilizadas demonstraram uma maior reprodutibilidade nos ensaios dos dois catiões metálicos (Cu^{2+} e Ni^{2+}) em relação ao Ca^{2+} . Entre os dois iões metálicos estudados aquele que conferiu maior estabilidade estrutural à matriz foi o Cu^{2+} . De resto, foi notada uma dependência da presença dos outros dois iões nos tampões usados nos ensaios dessas formulações, caso contrário havia a perda da integridade estrutural destas matrizes.

A análise estrutural por SEM não obteve o sucesso desejado não permitindo a caracterização estrutural desta nova matriz, por uma desadequação do protocolo usado à condição aplicada na formulação dos gel estudado, ou devido a uma má desidratação. Como dito anteriormente, os géis de gelana com cálcio na sua formulação apresentaram uma dependência deste ião no seu ambiente químico, em termos de fases moveis, aplicando-se em ensaios cromatográficos cujos tampões possuíam este catião na sua formulação. Estes estudos de interacção permitiu-nos estabelecer o perfil de eluição de três proteínas-modelo (BSA, lisozima e α -quimiotripsina), provando-se em primeiro lugar a capacidade da gelana em interagir com biomoléculas, com base na sua carga. A lisozima por apresentar carga oposta à da matriz interagiu com a matriz de gelana, eluindo completamente por aumento da força iónica. Quer a BSA quer a α -quimiotripsina foram eluídas nas primeiras fracções recolhidas, não

interagindo com a matriz. Se no caso da BSA o resultado obtido era o esperado por ter a mesma carga que a matriz, no caso da α -quimiotripsina esperava-se que esta interagisse e ficasse retida. No entanto, a presença de Ca^{2+} no tampão de ligação deverá ter originado a formação de complexos α -quimiotripsina- Ca^{2+} , facto que se encontra descrito cientificamente. Foi ainda conseguida a separação das misturas simples das proteínas com comportamentos de ligação diferentes.

Nos ensaios realizados com Cu^{2+} verificou-se a interacção de todas as biomoléculas com a matriz. Se tanto para a α -quimiotripsina como para a lisozima este comportamento era expectável, a interacção da BSA com a matriz foi surpreendente e deveu-se provavelmente à presença de Cu^{2+} na matriz, confirmando a possibilidade de estabelecimento de múltiplas interacções num único passo cromatográfico. Estes dados carecem, contudo, de confirmações por técnicas adicionais.

Capítulo V

Perspectivas futuras

A aplicação da gelana como matriz cromatográfica é algo de completamente novo na vasta gama de usos que este polímero polissacárido possui na literatura. Deste modo, os resultados altamente preliminares obtidos nesta dissertação, assentam e reforçam o potencial que a gelana tem dentro da cromatografia. No futuro será de todo o interesse entender melhor o efeito que todos os componentes (DMF, gelana, contra-íão, temperatura e duração da reacção) têm na síntese dos géis de gelana. O estudo de novos iões (magnésio, zinco, cobalto) na sua formulação poderá ser uma estratégia promissora na obtenção de um suporte estável e com potencial uso comercial. A introdução na formulação dos géis de “cross-linkers” adicionais que lhe aumentem a estabilidade estrutural poderá ser um outro parâmetro relevante a investigar. Estudos estruturais adequados serão necessários de forma a entender e quantificar a porosidade da matriz, bem como o tamanho dos seus poros. Assim, tanto a porosimetria de mercúrio como a microscopia confocal surgem como técnicas promissoras, que poderão suprir a necessidade de se obter um maior conhecimento das propriedades estruturais dos géis de gelana. Para além de estudos estruturais e de estabilidade, são também necessários mais dados cromatográficos, sendo interessante avaliar melhor a potencialidade da matriz de gelana com Cu^{2+} na separação das misturas simples das proteínas estudadas nesta dissertação, e na confirmação dos comportamentos obtidos nesses ensaios, bem como nos ensaios preliminares já discutidos. Confirmando esses resultados poder-se-á partir para a tentativa de separar biomoléculas de interesse a partir de extratos celulares complexos, ora por cromatografia de troca iónica, ora por cromatografia “mix-mode”, ou até mesmo por IMAC.

Toda esta potencial versatilidade, caso confirmada, poderá no futuro constituir uma grande mais-valia ao CICS, podendo o centro contar com uma matriz com diferentes comportamentos mediante o ambiente químico presente, sintetizada no próprio centro e com baixos custos de produção associados.

Capítulo VI

Bibliografía

- [1] Pollock T.J., *Gellan-related polysaccharides and adgenus Sphingomonas*, *Journal of General Microbiology*, 1993. 139, p.1939-1945.
- [2] Edwin R. Morris K.N., Rinaudo M., *Gelation of Gellan - A review*. *Food Hydrocolloids*, 2012. 28, p.373-411.
- [3] Jansson P.L., Sandford P., *Structural studies of gellan gum, and extracellular polysaccharides elaborated by Pseudomonas elodea*. *Carbohydr Res*, 1983. 124, p.135-139.
- [4] O'Neill M.A., Selvendran R. R., Morris V. J. , *Structure of the acidic extracellular gelling polysaccharide produced by Pseudomonas elodea*. *Carbohydr Res*, 1983. 124, p.123-133.
- [5] Brownsey G.J., Chilvers G. R., Anson K. L., Morris V. J., *Some observation (or problems) on the characterization of gellan gum solutions*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1984. 6, p. 211-214.
- [6] Jay, A.J. Coquhoun I. J., Ridout M. J., Brownsey G. J., Fialho A. M. *Analysis of structure and funtion of gellans with different substitution patterns*. *Carbohydrates Polymers*, 1998. 35, p. 179-188.
- [7] Malafaya P.B., G.A. Silva, R.L. Reis, *Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007. 59, p. 207-33.
- [8] JN B., *Structure-property relationships of water-soluble polysaccharides*. *Journal of Applied Glycoscience*, 1996. 43, p. 377-384.
- [9] Shingo M., T.W., *Gelation mechanism and network structure of mixed solution of low- and high-acyl gellan studied by dynamic viscoelsticity, CD and NMR measurements*. *Food Hydrocolloids*, 2007. 21, p. 1355-1361.

- [10] Fialho A.M., L. Moreira, A. Granja, Popescu A. O., Hoffmann K., Sá-Correia I., *Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives*. Appl Microbiol Biotechnol, 2008. 79, p. 889-900.
- [11] Sa-Correia I., *Gellan gum biosynthesis in Sphingomonas paucimobilis ATCC 31461: genes, enzymes and exopolysaccharide production engineering*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2002. 29, p. 170-6.
- [12] Videira P., *Identification of the pgmG gene, encoding a bifunctional protein with phosphoglucomutase and phosphomannomutase activities in the gellan gum-producing strain Sphingomonas paucimobilis ATCC 31461*. Appl Environ Microbiol, 2000. 66, p. 2252-2258.
- [13] Marques A.R., Ferreira P.B., Sá-Correia I., Fialho A.M., *Characterization of the ugpG gene encoding a UDP-glucose pyrophosphorylase from the gellan gum producer Sphingomonas paucimobilis ATCC 31461*. Mol Genet Genomics, 2003. 268:816-824.
- [14] Granja A.T., Popescu A, Marques A.R., Sá-Correia I., Fialho A.M., *Biochemical characterization and phylogenetic analysis of UDP-glucose dehydrogenase from the gellan gum producer Sphingomonas elodea ATCC 31461*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007. 76, p.1319-1327.
- [15] Silva E., Marques A.R., Fialho A.M., Granja A.T., Sá-Correia I., *Proteins encoded by Sphingomonas elodea ATCC 31461 rmlA and ugpG genes, involved in gellan gum biosynthesis, exhibit both dTDP- and UDP-glucose pyrophosphorylase activities*. Appl Environ Microbiol, 2005. 71: p.4703-4712.
- [16] Harding N.E., Patel Y.N., Coleman R.J., *Organization of genes required for gellan polysaccharide biosynthesis in Sphingomonas elodea ATCC 31461*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2004. 31, p.70-82.
- [17] Pollock T.J., Thorne L., Yamazaki M., Mikolajczak M.J., Armentrout R.W., *Mechanism of bacitracin resistance in gram-negative bacteria that synthesize exopolysaccharides*. J Bacteriol, 1994. 176, p.6229-6237.
- [18] Videira P., Fialho A.M., Geremia R.A., Breton C., Sá-Correia I, *Biochemical characterization of the beta-1,4-glucuronosyltransferase GelK in the gellan gum-producing strain Sphingomonas paucimobilis A.T.C.C. 31461*. Biochem J, 2001. 358, p.457-464.

- [19] Whitfield C., Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem*, 2006. 75, p.39-68.
- [20] Moreira L.M., Hoffmann K., Albano H., Becker A., Niehaus K., Sá- Correia I, *The gellan gum biosynthetic genes gelC and gelE encode two separate polypeptides homologous to the activator and the kinase domains of tyrosine autokinases*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2004. 8, p.43-57.
- [21] Collins RF, Derrick JP, *Wza: a new structural paradigm for outer membrane secretory proteins?* *Trends Microbiol*, 2007. 15, p.96-100.
- [22] Xuechang W., O. L. Yamin , Chaodong Q., Xianglin T., *A carotenoid-free mutant strain of Sphingomonas paucimobilis ATCC 31461 for the commercial production of gellan*. *Carbohydrate Polymers*, 2011. 84, p.1201-1207.
- [23] Banik R. M., Santhiagu A., Upadhyay S. N., *Optimization of nutrients for gellan gum production by Sphingomonas paucimobilis ATCC-31461 in molasses based medium using response surface methodology*. *Bioresource Technology*, 2007. 98, p.792-797.
- [24] Kanari B., Banik R. R., & Upadhyay S. N., *Effect of environmental factors and carbohydrate on gellangumproduction*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2002. 102, p.129-140.
- [25] Wang, X., Xu P., Yuan Y., Liu C., Zhang D. Yang, Z., *Modeling for gellan gum production by Sphingomonas paucimobilis ATCC 31461 in a simplified medium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006. 72, p.3367-3374.
- [26] Arockiasamy S., & Banik, R. M., *Optimization of gellan gum production by Sphingomonas paucimobilis ATCC 31461 with nonionic surfactants using central composite design*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008. 105, p.204-210.
- [27] West T. P., & Fullenkamp N. A., *Effect of culture medium pH on bacterial gellan production*. *Microbios*, 2001. 105, p.133-140.
- [28] Giavasis I., Harvey L. M., & McNeil B., *The effect of agitation and aeration on the synthesis and molecular weight of gellan in batch cultures of Sphingomonas paucimobilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006. 38, p.101-108.

- [29] Banik R. M., & Santhiagu A., *Improvement in production and quality of gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis* under high dissolved oxygen tension levels*. Biotechnology Letters, 2006. 28(17), p.1347-1350.
- [30] Vartak N. B., Lin C. C., Cleary J. M., Fagan M. J., & Saier M. H., *Glucose metabolism in '*Sphingomonas elodea*': Pathway engineering via construction of a glucose-6-phosphate dehydrogenase insertion mutant*. Microbiology, 1995. 141(9), p.2339-2350.
- [31] Baird J. K., & Cleary J. M., *PHB-free gellan gum broth*, 1994. US Patent 5,300,429.
- [32] Crescenzi V., & Dentini M., *The influence of side-chains on the dilute solution properties of three structurally related, bacterial anionic polysaccharides*. Carbohydrate Research, 1987. 160, p.283-302.
- [33] Pérez-Camposa S. J., Chavarría-Hernández N., Tecante A., Ramírez-Gilly M., Rodríguez-Hernández A. I., *Gelation and microstructure of dilute gellan solutions with calcium ions*. Food Hydrocolloids, 2012. 28, p.291-300.
- [34] Noda S., Funami T., Nakauma M., Asai I., Takahashi R., Al-Assaf S., *Molecular structures of gellan gum imaged with atomic force microscopy in relation to the rheological behaviour in aqueous systems. 1. Gellan gum with various acyl contents in the presence and absence of potassium*. Food Hydro-colloids, 2008. 22, p.1148-1159.
- [35] Sanderson G. R., Bell V. L., Clark R. C., & Ortega D., *The texture of gellan gum gels. Gums and stabilisers for the food industry*, 1988. 4, p. 219-229. Oxford, UK: IRL Press.
- [36] Grasdalen H., & Smidsrød O., *Gelation of gellan gum*. Carbohydrate Polymers, 1987. 7, p.371-393.
- [37] Chandrasekaran R., Radha A., & Thailambal V. C., *Roles of potassium ions, acetyl and L-glycerol groups in native gellan double helix: An X-ray study*. Carbohydrate Polymers, 1992. 224, p.1-17.
- [38] Chandrasekaran R., & Thailambal V. G., *The influence of calcium ions, acetate and L-glycerate groups on the gellan double-helix*. Carbohydrate Polymers, 1990. 12, p.431-442.

- [39] Nickerson M. T., Paulson A. T., & Hallet F. R., *Pre-gel solution properties of gellan polysaccharides: effect of potassium and calcium ions on chain associations*. Food Research International, 2008. 41, p.462-471.
- [40] Yuguchi Y., Urakawa H., Kitamura S., Wataoka I., & Kajiwara, K., *Progress in Colloid and Polymer Science*, 1999. 114, p.41-47.
- [41] Morris E. R., Gothard M. G. E., Hember M. W. N., Manning C. E., & Robinson G., *Conformational and rheological transitions of welan, rhamsan and acylated gellan*. Carbohydrate Polymers, 1996. 30, p.165-175.
- [42] Chandrasekaran R., Millane R. P., & Arnott S., *Cation interactions in gellan: An X-ray study of the potassium salt*. Carbohydrate Research, 1988. 175, p.1-15.
- [43] Rinaudo M., Milas M., *Gellan gum, a bacterial gelling polymer*. In: Doxastakis G, Kiosseoglou V (eds) *Novel macromolecules in food systems*, 2000. Elsevier, Amsterdam, p. 239-263.
- [44] Giavasis I., Harvey L.M., McNeil B., *Gellan gum*. Crit Rev Biotechnol, 2000. 20, p.177-211.
- [45] Lin C.C., Casida L.E., *GELRITE as a gelling agent in media for the growth of thermophilic microorganisms*. Appl Environ Microbiol, 1984. 47, p.427-429.
- [46] Shimomura K., & Kamada H., *Roles of gelling agents in plant tissue culture*. Plant Tissue Culture, 1986. 3, p.38-41.
- [47] Moslemy P., Guiot S.R., Neufeld R.J., *Activated sludge encapsulation in gellan gum microbeads for gasoline biodegradation*. Bioprocess Biosyst Eng, 2004. 26, p.197-204.
- [48] Moslemy P., Neufeld R.J., Millette D., Guiot S.R., *Transport of gellan gum microbeads through sand: an experimental evaluation for encapsulated cell bioaugmentation*. J Environ Manage, 2003. 69, p.249-59.
- [49] Sutherland I.W., *Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria*. Int Dairy J, 2001. 11, p.663-674.
- [50] Kiani H., Mousavi M. E., Razavi H., & Morris E. R., *Effect of gellan, alone and in combination with high-methoxy pectin, on the structure and stability of doogh, a yogurt-based Iranian drink*. Food Hydrocolloids, 2010. 24, p.744-754.

- [51] Nussinovitch A., Hershko V., *Gellan and alginate vegetable coatings*. Carbohydrate Polymers, 1996. 30, p.185-192.
- [52] Sultana Y., Aqil M., Ali A., *Ion-activated. Gelrite-based in situ ophthalmic gels of pefloxacin mesylate: comparison with conventional eye drops*. Drug Deliv, 2006. 13, p.215-219.
- [53] Jansson B., Hägerström H., Fransén N., Edsman K., Björk E., *The influence of gellan gum on the transfer of fluorescein dextran across rat nasal epithelium in vivo*. Eur J Pharm Biopharm, 2005. 59, p.557-564.
- [54] Norton A. B., Cox P. W., & Spyropoulos F., *Acid gelation of low acyl gellan gum relevant to self-structuring in the human stomach*. Food Hydrocolloids, 2011. 25, p.1105-1111.
- [55] Gal A., Nussinovitch A., *Hydrocolloid carriers with filler inclusion for diltiazem hydrochloride release*. J Pharm Sci, 2007. 96, p.168-178.
- [56] Li J., Kamath K., Dwivedi C., *Gellan film as an implant for insulin delivery*. J Biomater Appl, 2001. 15, p.321-343.
- [57] Ciardelli G., Chiono V., Vozzi G., Pracella M., Ahluwalia A., Barbani N., Cristallini C., Giusti P. *Blends of poly-(epsilon-caprolactone) and polysaccharides in tissue engineering applications*. Biomacromolecules, 2005. 6, p.1961-1976.
- [58] Smith A.M., Shelton R.M., Perrie Y., Harris J.J. *An initial evaluation of gellan gum as a material for tissue engineering applications*. J Biomater Appl, 2007. 22, p.241-254.
- [59] Bertoni F., Barbani N., Giusti P., Ciardelli G. *Transglutaminase reactivity with gelatine: perspective applications in tissue engineering*. Biotechnol Lett, 2006. 28, p.697-702.
- [60] Suri S., Banerjee R., *In vitro evaluation of in situ gels as short term vitreous substitutes*. J Biomed Mater Res A, 2006. 79, p.650-64.
- [61] Vijayalakshmi B., Sushrut A., Caroline M., Richard O., *Affinity chromatography as a tool for antibody purification*. Methods, 2012. 56, p.116-129.

- [62] Jungbauer A., *Chromatographic media for bioseparation*. Journal of Chromatography A, 2005. 1065, p.3-12.
- [63] Stickel J. J., Fotopoulos A., *Pressure-Flow Relationships for Packed Beds of Compressible Chromatography Media at Laboratory and Production Scale*. Biotechnology Progress, 2001. 17, p. 744-751.
- [64] Horvath J., Boschetti E., Guerrier L., Cooke N., *High-performance protein separations with novel strong ion exchangers*. Journal of Chromatography A, 1994. 679, p.11-22.
- [65] E. Boschetti, Guerrier L., Girot P., Horvath J., *Preparative high-performance liquid chromatographic separation of proteins with HyperD ion-exchange supports*. Journal of Chromatography B, 1995. 664, p. 225-231.
- [66] Janson J., *On the history of the development of Sephadex*. Chromatographia, 1987. 23, p.361-365
- [67] Levison P., Hopkins A., Hathi P., Badger S., Mann F., Dickson N., Purdom G., *Suspended bed chromatography, a new approach in downstream processing*. Journal of Chromatography A, 2000. 890. p.45-51.
- [68] Toshihiko K., Toshiaki I., Masatomi E., Tetsuo O., Masaya S., Hideyuki K., Akimitsu K., Toshihiro I., Tsuneo O., *A New Spherical Hydroxyapatite for High Performance Liquid Chromatography of Proteins*. Journal of Liquid Chromatography, 1986. 9, p.3543-3549.
- [69] Unger K., Schick-Kalb J., Krebs K., *Preparation of porous silica spheres for column liquid*. Journal of Chromatography A, 1973. 83. p. 5-9.
- [70] Unger K., Roumeliotis P., Mueller H., Goetz H., *Novel porous carbon packings in reversed-phase high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1980. 202. p. 3-14.
- [71] Unger K., Janzen R., *Packings and stationary phases in preparative column liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1986. 373, p. 227-264.
- [71] Petroa M., Gemeiner P., Berek D., *Dextran-grafted silica gel for high-performance size-exclusion chromatography of proteins*. Journal of Chromatography A, 1994. 665, p.37-45.

- [72] Kurganov A., Puchkova Y., Davankova V., Eisenbeiss F., *Polyvinylpyrrolidone-coated silica packings for chromatography of proteins and peptides*. Journal of Chromatography A, 1994. 663, p.163-174
- [73] Ahmed F., Modrek B., *Biosep-SEC-S high-performance size-exclusion chromatographic columns for proteins and peptides*. Journal of Chromatography A, 1992. 599, p.25-33.
- [74] Davankova V., Kurganova A., Unger K., *Reversed-phase high-performance liquid chromatography of proteins and polypeptides on polystyrene-coated silica supports*. Journal of Chromatography A, 1989. 500, p.519-530.
- [75] Zhou F., Muller D., Santarelli X., Jozefonvicz J., *Coated silica supports for high-performance affinity chromatography of proteins*. Journal of Chromatography A, 1989. 476, 195-203.
- [76] Stout R., DeStefano J., *A new, stabilized, hydrophilic silica packing for the high-performance gel chromatography of macromolecules*. Journal of Chromatography A, 1985.326, 63-78.
- [77] Hahn R., Schlegel R., Jungbauer A., *Comparison of protein A affinity sorbents*. Journal of Chromatography B, 2002. 790, p.35-51.
- [78] Necina R., Amatschek K., Jungbauer A. *Capture of human monoclonal antibodies from cell culture supernatant by ion exchange media exhibiting high charge density*. Biotechno. Bioen., 1998. 60, p.689-698.
- [79] Jungbauer A., Hahn R., Svec F., Tenikova T., Deyl Z., *Monolithic Materials: Preparation, Properties and Applications*, Elsevier, New York, 2002, p. 561.
- [80] Hahn R., Panzer M., Hansen E., Mollerup J., Jungbauer A. *Mass transfer properties of monoliths*. Sep. Sci. Tech, 2002. 37, p.1545-1565.
- [81] Hahn R., Jungbauer A., *Peak Broadening in Protein Chromatography with Monoliths at Very Fast Separations*. Ana. Chem., 2000. 72, p. 4853-4858.
- [82] Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N., Ishizuka N., Tanaka N., *Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography*, Ana. Chem., 1996. 68. p. 3498-3501.

- [83] Minakuchia H., Ishizukaa N., Nakanishia K., Sogaa N., Tanakab N., *Performance of an octadecylsilylated continuous porous silica column in polypeptide separations*. Journal of Chromatography A, 1998. 828, p.83-90.
- [84] Nakanishi K., Minakuchi H., Soga N. , Tanaka N., *Structure Design of Double-Pore Silica and Its Application to HPLC*. J. Sol-Gel Sci. Tech., 1998. 13, 163-169.
- [85] Pfliegerl K., Podgornik A., Berger E., Jungbauer A., *Direct Synthesis of Peptides on Convective Interaction Media Monolithic Columns for Affinity Chromatography*. J. Comb. Chem, 2002. 4, 33-37.
- [86] Pfliegerl K., Podgornik A., Berger E., Jungbauer A., *Screening for peptide affinity ligands on CIM monoliths*. Biotech Bioeng, 2002. 79, 733-740.
- [87] Pfliegerl K., Hahn R., Berger E., Jungbauer A. , *Mutational analysis of a blood coagulation factor VIII-binding peptide*. Chem. Bio. D. Des., 2002. 59, 174-182.
- [88] Kanazawa H., Teruo O., *Temperature-responsive chromatography for the separation of biomolecules*. Journal of Chromatography A, 2011. 1218, p.8738- 8747
- [89] Burnouf T., Mirjana R., *Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use*. J. Biochem. Biophys. Methods, 2001. 49, p. 575-586.
- [90] Gagnon Pete, *Technology trends in antibody purification*. Journal of Chromatography A, 2012. 1221, p. 57- 70.
- [91] Rodrigues T., Manuel J.T. Carrondo, P. M. Alves, P. E. Cruz, *Purification of retroviral vectors for clinical application: Biological implications and technological challenges*. Journal of Biotechnology, 2007. 127, p.520-541.
- [92] Alpert A., *High-performance hydrophobic-interaction chromatography of proteins on a series of poly(alkyl aspart-amide)-silicas*. Journal of Chromatography A, 1986. 359, p. 85-97.
- [93] Oyler A., Armstrong B., Cha J., Zhou M., Yang Q., Robinson R., Dunphy R., Burinsky D., *Hydrophilic interaction chromatography on amino-silica phases complements reversed-phase high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for peptide analysis*. Journal of Chromatography A, 1996. 724, p.378-383.

- [94] Yoshida T., *Peptide Separation in Normal Phase Liquid Chromatography*. Anal. Chem., 1997. 69, p.3038-3043.
- [95] Lindner H., Sarg B., Meraner C., Helliger W., *Separation of acetylated core histones by hydrophilic-interaction liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1996. 743, p. 137-144.
- [96] Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods. GE Healthcare, 2004.
- [97] Burton S., Harding D., *Salt-independent adsorption chromatography: new broad-spectrum affinity methods for protein capture*. J. Bio. Bioph. Meth., 2001. 49, p. 275-287.
- [98] Yamamoto S., Nomura M., Sano Y., *Resolution of proteins in linear gradient elution ion-exchange and hydrophobic interaction chromatography*. Journal of Chromatography A, 1987. 409, p.101-110.
- [99] Arvidsson P., Plievab F. M., Lozinsky V. I., Galaeva I., Mattiasson B., *Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent*. Journal of Chromatography A, 2003. 986, p. 275-290.
- [100] Yamamoto F., Cunha R.L., *Acid gelation of gellan: Effect of final pH and heat treatment conditions*. Carbohydrate Polymers, 2007. 68, p. 517-527.
- [101] Picone C., Cunha R., *Influence of pH on formation and properties of gellan gels*. Carbohydrate Polymers, 2011. 84, p. 662-668
- [102] Laemmli U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227, p. 680-685
- [103] Passarinha LA, Bonifácio MJ, Queiroz JA. *Comparative study on the interaction of recombinant human soluble catechol-O-methyltransferase on some hydrophobic adsorbents*. Biomed Chromatogr, 2007. 20, p. 937-44.
- [104] Karlsson E., Ryden L., Brewer J., Janson J.C., Ryden L., *Protein Purification*, second ed., Wiley-VCH, New York, 1998, pp.145-205.

- [105] Yamamoto S., Nakanishi K., Matsuno R., *Ion-Exchange Chromatography of Proteins*, Marcel Dekker, New York, 1988.
- [106] Ladisch M., *Bioseparations Engineering: Principles, Practice, and Economics*, Wiley, New York, 2001.
- [107] Karunakar K., Biju A., Nand K., *Thermodynamics of the interactions of calcium chloride with α -chymotrypsin*. J. Chem. Thermodynamics, 2002. 34, 319-336
- [108] Porekar V.G., Menart V., *Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography*. J. Biochem. Biophys. Methods, 2001. 49, p. 335-360